



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ZNAČENÍ BUNĚK MAGNETICKÝMI ČÁSTICEMI

CELL LABELING WITH MAGNETIC PARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dziyana Kukhta

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

BRNO 2017

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Dziyana Kukhta

ID: 154638

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Značení buněk magnetickými částicemi

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši tématu značení buněk magnetickými značkami a manipulace s buňkami externím magnetickým polem. Seznamte se základními průtokovými mikrosystémy, které již byly testovány na našem pracovišti [1]. 2) Realizujte statické a pulzní magnetické pole s využitím selenoidu vhodného tvaru v okolí mikrokapiláry. Pomocí mikroskopu bezkontaktně detekujte pohyb a zastavení značených buněk vlivem magnetického pole. 3) Seznamte se s optickými kamerami na našem pracovišti vhodnými k těmto účelům. Popište jejich kompatibilitu s mikroskopy a parametry v případě využití v bodě 2). 4) Otestujte na modelových kapilárách techniku vizualizace protékajících buněk a zachycení buněk s využitím generovaného magnetického pole. 5) Sledujte migraci buněk, navrhnete a realizujte vhodné řešení zpracování získaných obrazových dat se zaměřením na hodnocení pohybu buněk vlivem magnetického pole. 6) Proveďte diskusi získaných výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] EICHNER, Dominik. Návrh fantomu kapilárního řečiště pro testování akumulace buněk a blokace cév [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016

[2] GABAYNO, Jacquelyn F., et al. Controlled manipulation of Fe₃O₄ nanoparticles in an oscillating magnetic field for fast ablation of microchannel occlusion. *Nanoscale*, 2015, 7.9: 3947-3953.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 2.6.2017

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Josef Skopalík, Ing. Zdeněk Roubal, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce popisuje pohyb buněk, označených magnetickými nanočásticemi, v magnetickém poli směrem k magnetu. Nejprve popisuje magnety dvou typů, a to permanentní magnet a elektromagnet. Dále se věnuje senzorům magnetického pole, magnetickým nanočásticím a jejich inkorporaci do buněk, optickým systémům pro detekci pohybu buněk a vlivu elektromagnetického pole na ně. Praktická část je věnovaná inkorporaci nanočástic do buněk, měření intenzity magnetického pole neodymového magnetu a elektromagnetu a způsobům regulace elektromagnetu. Dále je popsán vliv elektromagnetického pole na fibroblasty a závislost koncentrace nanočástic na schopnost reagovat na magnetické pole. Poslední část práce je věnovaná přípravě průtokové komory, analýze pohybu buněk v této komoře a následnému zachytu buněk v různě nastaveném magnetickém poli.

KLÍČOVÁ SLOVA

Magnetické nanočástice, permanentní magnet, elektromagnet, senzory založené na Halově jevu, AMR, GMR, TMR, vysokorychlostní kamery, průtoková komora, neodymový magnet, elektromagnet.

ABSTRACT

This bachelor thesis describes the movement of cells labelled with magnetic nanoparticles in the magnetic field in the direction of the magnet. First, it describes two types of magnets: permanent magnet and electromagnet. Then, it is dedicated to magnetic field sensors, magnetic nanoparticles and their incorporation in cells, optical systems for detecting cell movement and the effect of electromagnetic fields on cells. The practical part is dedicated to the incorporation of nanoparticles in cells, the measurement of the magnetic field intensity of a neodymium magnet and an electromagnet, and the methods of electromagnet control. It also describes the effect of electromagnetic fields on fibroblasts and the concentration of nanoparticles on the ability of the labelled cells to react to a magnetic field. The last part is dedicated to the production of a flow chamber, the analysis of the movement of cells in the chamber and the subsequent capture of cells in various magnetic fields.

KEYWORDS

Magnetic nanoparticles, permanent magnets, electromagnets, sensors based on Hall effect, AMR, GMR, TMR, high-speed cameras, flow chamber, neodymium magnet, electromagnet.

KUKHTA, D. *Značení buněk magnetickými částicemi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma „*Značení buněk magnetickými částicemi*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Vratislavu Čmielovi, Ph.D., za účinnou pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji panu Mgr. Josefu Skopalíkovi za odborné konzultace a vynaložený čas a Ing. Zdeňku Roubalovi, Ph.D., (Ústav teoretické a experimentální elektrotechniky, VUT) za konzultace a možnost využití gaussmetrů pro precizní měření magnetického pole magnetů.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

Obsah

Úvod	1
1. Magnety.....	2
1.1. Permanentní magnety	2
1.2. Elektromagnety	3
2. Měření magnetického pole	4
2.1. Senzory založené na Hallovu jevu	5
2.2. AMR senzory	5
2.3. GMR senzory.....	6
2.4. TMR senzory	7
3. Magnetické nanočástice a jejich inkorporace do buněk	8
3.1. Využití magnetických nanočástic v diagnostice.....	9
3.2. Využití MNPs <i>in vivo</i>	10
4. Optické systémy pro detekci pohybu buněk	11
4.1. Mikroskopy vhodné pro snímání buněk	11
4.2. Optické materiály pro průtokové cely	12
4.3. Kamery kompatibilní s invertovaným mikroskopem	12
5. Vliv elektromagnetického pole na buňky	14
5.1. Vliv elektromagnetického pole na přirozenou strukturu buňky.....	14
5.2. Vliv elektromagnetického pole na buňku s obsahem kovových nebo magnetických nanočástic	15
6. Praktická část.....	17
6.1. Značení buněk magnetickými částicemi	18
6.2. Kontrola inkorporace částic	19
6.3. Charakteristika magnetického pole.....	21
6.3.1. Permanentní magnet	21
6.3.2. Elektromagnet	22
6.3.3. Výsledky	24
6.4. Regulace elektromagnetu	26
6.4.1. Elektromagnet s pulzní regulací.....	26
6.4.2. Elektromagnet s potenciometrickou regulací	27
6.5. Vliv elektromagnetického pole na fibroblasty	28
6.5.1. Výsledky	29

6.6.	Test značení buněk.....	30
6.6.1.	Permanentní neodymový magnet.....	30
6.6.2.	Elektromagnet	32
6.6.3.	Výsledky	33
6.7.	Příprava průtokové komory	37
6.7.1.	Výsledky	38
6.8.	Test migrace buněk z fluidní komory	39
6.8.1.	Výsledky	40
Diskuze.....		42
Literatura		46
Seznam symbolů, veličin a zkratk.....		50
Seznam obrázků.....		51
Příloha.....		53

Úvod

Nanočástice jsou velice diskutovaným tématem poslední doby díky svému širokému aplikačnímu potenciálu. Mají velikost jednotek až desítek nanometru a kvůli své velikosti mohou snadno pronikat do potřebných míst. Nanočástice se postupně uplatňují v medicíně a také biomedicíně.

V dnešní době existuje velké množství magnetických nanočástic, které se vyrábějí na bázi *Co*, *Fe*, *Ni*, oxidu železa, a taky $MgFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, $LiFe_5O_8$, *CoPt*, *FePt*, *MnAl*, $SmCo_5$, $Fe_{14}Nd_2B$. V současné době se v biomedicíně nejvíce používají nanočástice z oxidu železa. Tento materiál vykazuje vysokou biokompatibilitu, což jej předurčuje k využití v biomedicíně jako terapeutického média pro magnetickou hypertermii, jako kontrastní látky pro MRI, případně jej lze využít jako nosič léků. [1, 2]

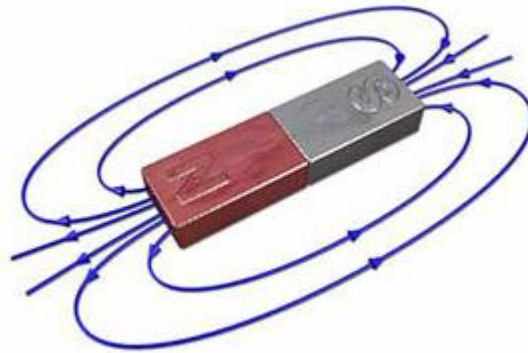
Mikro- a nanostrukturované materiály se staly důležitými zejména pro vědy o živé přírodě hlavně, protože pokroky v jejich výrobě nyní dovolují přizpůsobit jejich velikost tak, aby odpovídaly velikostem biologických entit. Velikost se může pohybovat od desítek nanometrů (průměrná velikost viru) až do desítek mikrometrů (průměrná velikost savčí buňky). Povrch nanočástic pokrývá povlaky, což má dva účely: zvýšit biokompatibilitu nanočástic a získat biologickou aktivitu. Biologická aktivita se využívá pro cílení buněk, dodávku léků a genů. Magnetické nanočástice (MNP) mohou být vzdáleně manipulovány magnetickými poli. Pomocí polí stejnosměrného proudu mohou být MNP zachyceny, koncentrovány nebo použity při separaci buněk. Pod střídavým polem mohou být MNP zahřívány nebo otáčeny. [34, 3]

Tato bakalářská práce se zabývá testováním značení buněk magnetickými částicemi, směřováním jejich pohybu v externím magnetickém poli. Cílem bylo provést literární rešerši tématu značení buněk magnetickými částicemi a manipulace s buňkami externím magnetickým polem, realizovat statické a pulzní magnetické pole s využitím solenoidu, pomocí mikroskopu detekovat pohyb a zastavení buněk vlivem magnetického pole. Dále bylo potřeba seznámit se s optickými kamerami na pracovišti, které jsou vhodné k těmto účelům, otestovat na modelových kapilárách techniky vizualizace protékajících buněk a zachycení s využitím generovaného magnetického pole a sledovat migraci buněk.

1. Magnety

Magnety jsou důležitou součástí dnešního života, používají se do elektromotorů, televizorů a počítačových monitorů, kreditních a magnetických karet. Za nejmenší magnet můžeme považovat elektron. Magnetické vlastnosti všech ostatních magnetů jsou podmíněné magnetickým momentem elektronů uvnitř. Magnet je objektem, který má vlastní magnetické pole, které vzniká v důsledku pohybu elektricky nabitých částic. Základní veličinou magnetického pole je magnetická indukce B , jednotkou magnetické indukce je tesla [T]. Magnetické pole lze znázornit pomocí indukčních čar. Jsou to uzavřené křivky, které vždy vycházejí z jednoho konce magnetu a vstupují do jiného. Konec, ze kterého indukční čáry vycházejí, je severní pól magnetu, do jižního naopak vcházejí (viz Obrázek 1). [3, 4]

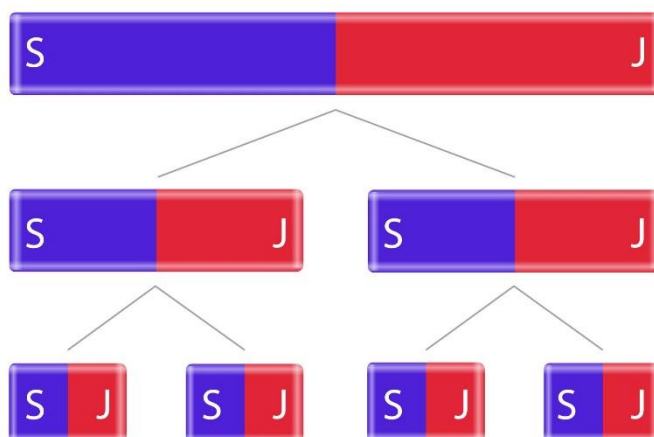
Existují magnety dvou typů: permanentní magnety a elektromagnety.



Obrázek 1: Zobrazení permanentního tyčového magnetu, kde S - jižní pól, N - severní pól a modré čáry - siločáry [1]

1.1. Permanentní magnety

Permanentní magnety se vyrábějí z feromagnetických látek, které mají schopnost vytvářet magnetické pole v nepřítomnosti vnějšího magnetického pole. Jejich částice jsou uspořádané takovým způsobem, že jejich magnetické momenty se sčítají a tím vytvářejí magnetické pole. Každý magnet má severní a jižní pól, pokud permanentní magnet rozpůlíme, dostaneme dva magnety, které budou mít vlastní severní a jižní magnetický pól (viz Obrázek 2).[4, 5]

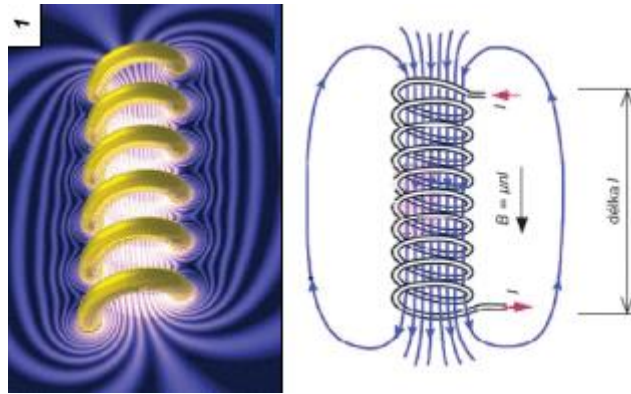


Obrázek 2: Změna rozložení pólů při zlomení tyčového magnetu. S – severní pól, J – jižní pol.

Existují permanentní magnety těchto typů: neodymové, samarium-kobaltové, plastické, keramické a Alnico. Základem nejběžnějších slitin pro magnety jsou oxidy železa, ke kterým se přidává hliník, nikl, kobalt, a jejich obchodní názvy jsou Alnico a Alcomax. Méně se používají prvky jako měď, titan a niob. Magnety vyráběné ze samaria a kobaltu jsou daleko silnější než magnety vyráběné ze železa, ale jejich cena je mnohem větší. Velké rozšíření mají magnety ze vzácných zemin, na bázi neodymu, železa a boru. Tento typ magnetu je silnější a levnější než samarium-kobaltové. [6]

1.2. Elektromagnety

Elektromagnety se skládají z cívky navinuté kolem ocelového jádra. Jsou to ale jen dočasné magnety, které vytvářejí magnetické pole pomocí elektrického proudu. Nejčastějším typem elektromagnetu je solenoid. Solenoid je válcová cívka se stejně hustými závitů a délka je mnohem větší než průměr (viz Obrázek 3). Po průchodu elektrického proudu cívkou se vytváří magnetické pole. [3, 7, 8]



Obrázek 3: Schéma solenoidu. Modré čáry – siločáry. B – magnetická indukce, l – délka solenoidu, I – proud procházející solenoidem, n – počet závitů [9]

Velikost magnetického pole kolem cívky je dána procházejícím proudem I , počtem závitů n a materiálem jádra μ_0 . Vzorec (1) platí, pokud délka L je mnohem větší než šířka solenoidu R .

$$B \approx \frac{\mu_0 I n}{2} \quad (1)$$

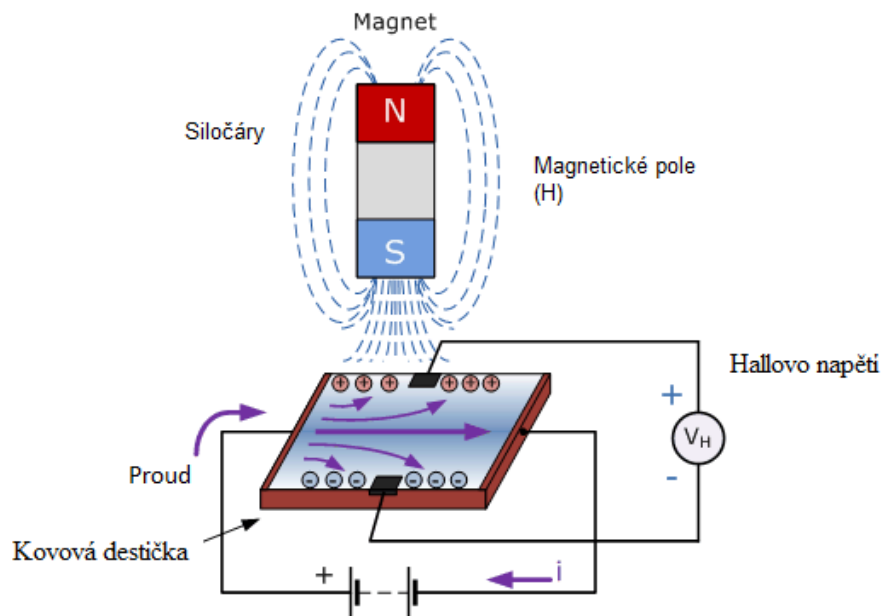
2. Měření magnetického pole

Magnetické pole se vytváří vždy, když se elektrický náboj pohybuje. Toto pole lze pozorovat kolem elektrických vodičů nebo kolem permanentních magnetů. Existuje magnetické pole dvou typů: stacionární a nestacionární.

Stacionární pole se nemění s časem a může být vytvořeno permanentním magnetem a elektromagnetem, který se nachází v klidu, nebo vodičem, kterým prochází stálý elektrický proud. Nestacionární magnetické pole lze vytvořit pohybem magnetu nebo vodičem, kterým prochází časově proměnný proud. Toto pole se mění v závislosti na čase. [10, 11]

2.1. Senzory založené na Hallovu jevu

Většinu magnetických senzorů tvoří Hallovy sondy. Podstata Hallova jevu spočívá v tom, že na bočních hranách polovodičové nebo kovové destičky, kterou protéká proud, vložené do magnetického pole s vektorem magnetické indukce kolmým na směr proudu, vzniká napětí. Toto napětí se nazývá Hallovo napětí (viz Obrázek 4).

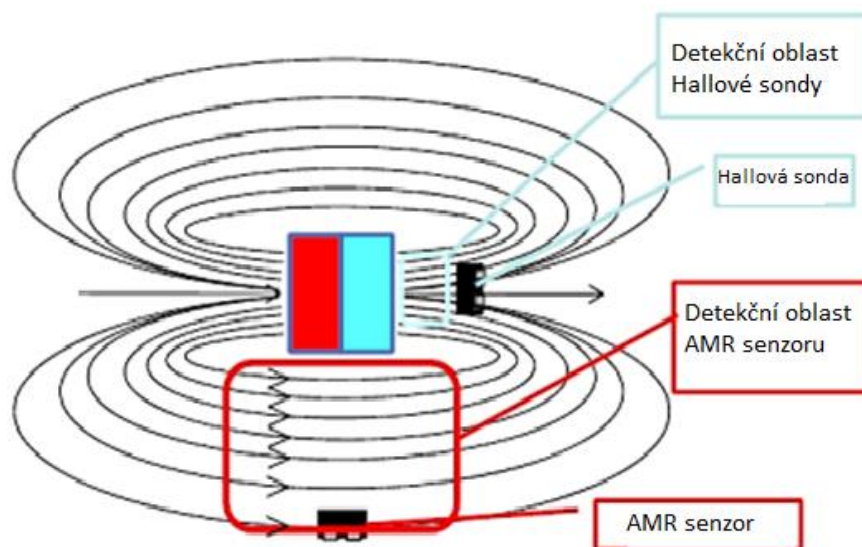


Obrázek 4: Princip Hallova senzoru. Upraveno s využitím [12]

Senzory s Hallovým jevem se používají pro bezkontaktní snímání elektrického proudu, detekci přítomnosti magnetických materiálů a pro měření vzdálenosti magnetu od snímače. Výhody tohoto typu senzoru jsou: malé rozměry, citlivost, bezdotykové měření, výstup s nízkým šumem, teplotní rozsah -40 až $+150$ °C. [13, 14, 15, 16]

2.2. AMR senzory

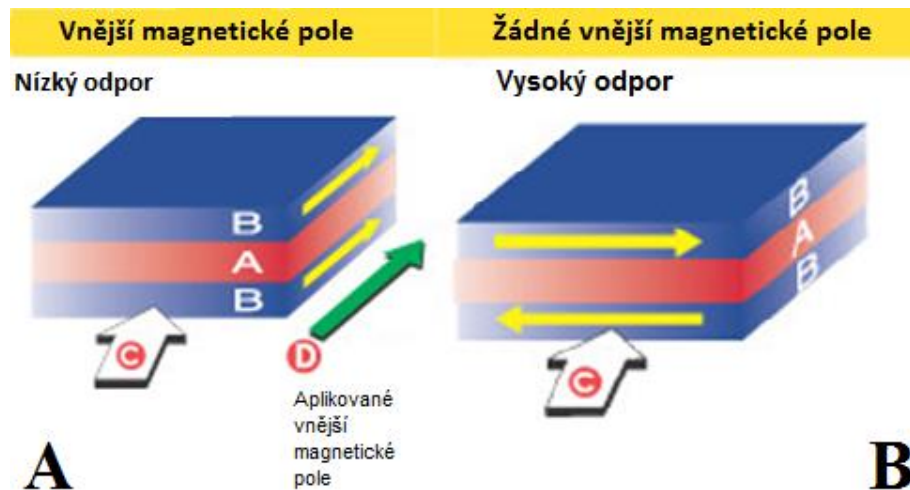
AMR senzory pracují na principu Anisotropické Magnetické Resistance nebo závislosti elektrického odporu některých materiálů na intenzitě magnetického pole. Elektrický odpor tenké vrstvy slitiny železa a niklu se mění při vložení do podélného magnetického pole. S rostoucí hodnotou magnetické indukce odpor klesá lineárně. Již při velmi malých hodnotách magnetické indukce nastává změna odporu. Na rozdíl od senzorů založených na Hallově jevu reaguje citlivý AMR efekt jenom na podélné horizontální siločáry, a nerozlišuje jejich směr (viz Obrázek 5). [17]



Obrázek 5: Porovnávání detekční oblasti AMR senzoru s detekční oblastí senzoru s Hallowým jevem. Černé čáry znázorňují siločáry magnetu. Upraveno s využitím [17]

2.3. GMR senzory

GMR (Giant MagnetoResistive effect) jako se u AMR získává závislost elektrického proudu na velikosti magnetického pole, které na senzor působí. Výhodou je, že ke GMR jevu dochází již při velmi slabém magnetickém poli. GMR senzory pracují na úrovni nanovrstev a jednotlivých atomů. GMR senzory jsou mnohem citlivější než AMR. Senzor se skládá ze dvou feromagnetických vrstev s tloušťkou několik nanometrů. Mezi tyto dvě vrstvy se vkládá ještě tenčí nemagnetická vodivá vrstva. Střední vrstva je měděná a kvůli tomu, že měď je výborným vodičem a vrstva je tenká, dochází k rychlému nárůstu elektrického odporu. Odpor se mění v závislosti na spinu procházejících elektronů. Spin udává, jakým směrem se elektron otáčí. Ve feromagnetických materiálech se mohou volně pohybovat elektrony, spin, kterých souhlasí s magnetickým momentem materiálu. Feromagnetickou vrstvou projde z celkového počtu jenom polovina elektronů se spinem shodným s magnetizací vrstvy. Následně elektrony procházejí druhou feromagnetickou vrstvou, a pokud tato vrstva má stejný směr magnetizace, tak jí projdou všechny elektrony a elektrický odpor struktury bude nízký (viz Obrázek 6). Pokud druhá feromagnetická vrstva má opačnou orientaci magnetického pole než první, tak elektrony, které projdou první vrstvou (50 % elektronů), druhou už neprojdou a struktura bude mít velmi vysoký odpor (viz Obrázek 6). [18]

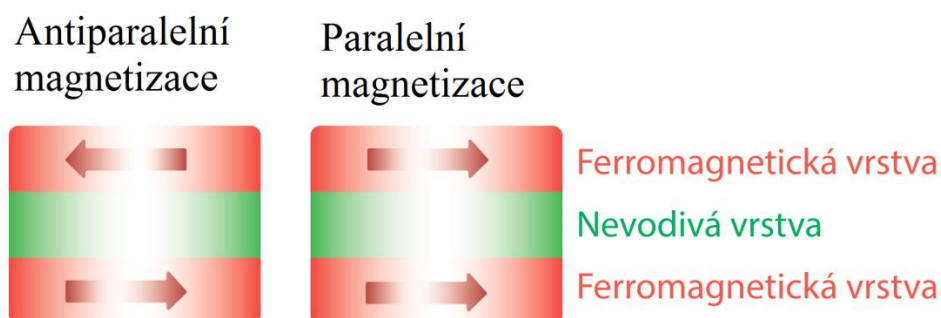


Obrázek 6: Princip funkce běžně vyráběných GMR sensorů (A = vodivá nemagnetická vrstva, B = vodivá magnetická vrstva, C = směr vstupu el. proudu, D = směr externího snímaného magnetického pole). Upraveno s využitím [18]

2.4. TMR senzory

TMR (Tunelová MagnetoRezistence) senzory v porovnání s předchozími, které jsou založené na AMR a GMR jevech, jsou nejcitlivější, ale přesto nejsou ideální (linearita, změna vlastností s teplotou), a proto se stále vyrábějí AMR a GMR.

TMR senzory se skládají ze dvou ferromagnetických vrstev, mezi které je vložena tenká nevodivá vrstva (jednotky nanometrů) a za určitých podmínek může elektrický proud procházet danou vrstvou (viz Obrázek 7).



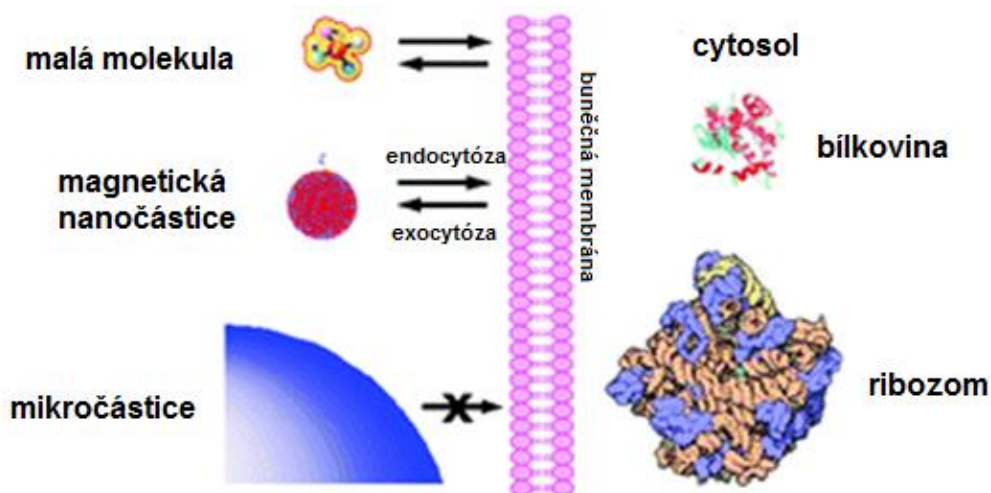
Obrázek 7: Směry magnetizace (paralelní, antiparalelní) u TMR sensorů.

Jev se jmenuje tunelový a popisuje ho kvantová fyzika. Pokud je vrstva izolantu velmi slabá a za ní je další vrstva s dostatkem volných energetických hladin, kam se elektrony mohou přemístit, stačí i málo dodané energie, aby elektrony mohly proniknout vrstvou izolantu. Důležité je, aby za izolační vrstvou byl dostatek volných energetických hladin.

Záleží také i na spinu elektronů, pokud jsou magnetické vrstvy na obou stranách vrstvy izolantu zmagnetovány stejně, tak elektrony, se spinem natočeným souhlasně s magnetickým polem, mohou procházet tunelem přes vrstvu izolantu. Danou strukturou bude protékat proud a odpor bude malý. Pokud jedna magnetická vrstva je zmagnetovaná opačně, existuje malá pravděpodobnost, že dojde k tunelovému jevu, a tudíž odpor celé struktury bude velký. [19]

3. Magnetické nanočástice a jejich inkorporace do buněk

Rozvoj magnetických nanočástic nabízí možnosti pro manipulaci s buňkami *in vitro* a *in vivo*. Magnetické nanočástice (Magnetic NanoParticles; MNPs) se mohou použít pro detekci a zachycení patogenů, třídění buněk, dálkové ovládání buněčného chování, ničení buněk, magneticky ovládanou migraci buněk a jiné další aplikace. MNPs je kategorie nanočástic, které vykazují supermagnetismus a reagují na magnetické pole. Důležitou vlastností MNPs je to, že mají malou velikost (jednotky až desítky nanometru) a toho se využívá ve studiích k optimalizaci jejich velikosti a vlastností tak, aby odpovídaly účelu použití. Další výhodou spočívá v tom, že se snadno s nimi manipuluje pomocí vnější magnetické síly. Tyto vlastnosti MNPs rozšiřují rozvoj nových technologií pro výrobu MNPs ($FePt$, Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , $CoFe_2O_4$). MNPs mají velikost několik nanometrů a díky tomu jsou schopné zúčastnit se procesu endocytózy a vstoupit do buňky (viz Obrázek 8), na rozdíl od mikročástic poskytují jedinečnou možnost manipulace subcelulárních organel nebo jiných buněčných struktur uvnitř buňky. [1]

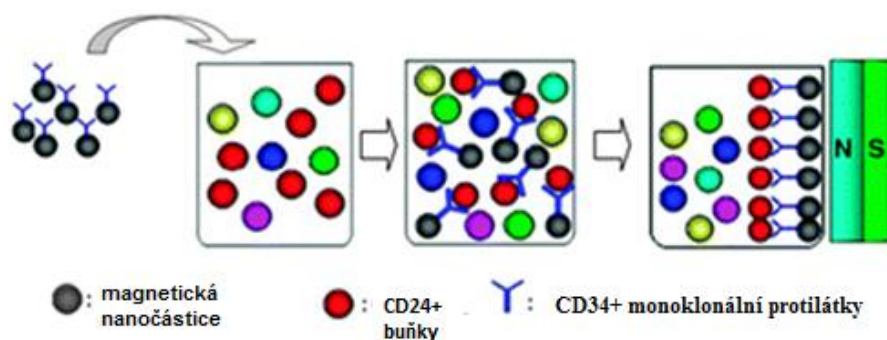


Obrázek 8: Rozdíl ve velikosti nanočástic a mikročástic. Nanočástice mohou vstoupit do buňky a mikročástice nemohou (nebo velmi složitě). Upraveno s využitím [1]

3.1. Využití magnetických nanočástic v diagnostice

Ve využití MNPs pro manipulaci se savčími buňkami existuje problém biokompatibility z MNPs. Tento požadavek omezuje další typy MNPs, které mohou být použité. Většina MNPs používaných pro manipulaci se savčími buňkami jsou z oxidu železa.

Jako příklad využití MNPs v diagnostice je možné uvést separaci krvetvorných kmenových buněk od krve. Xu a jeho spolupracovníci použili N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane pro modifikaci železitých nanočástic, které měly průměr přibližně 60 nm pro uchycení anti-CD34⁺ monoklonální protilátky. Použili postup, který je znázorněn na Obrázek 9. Podařilo se zvýšit podíl buněk CD34⁺ z přibližně 1% před oddělením na 75 % po oddělení z lidské pupečnickové krve.

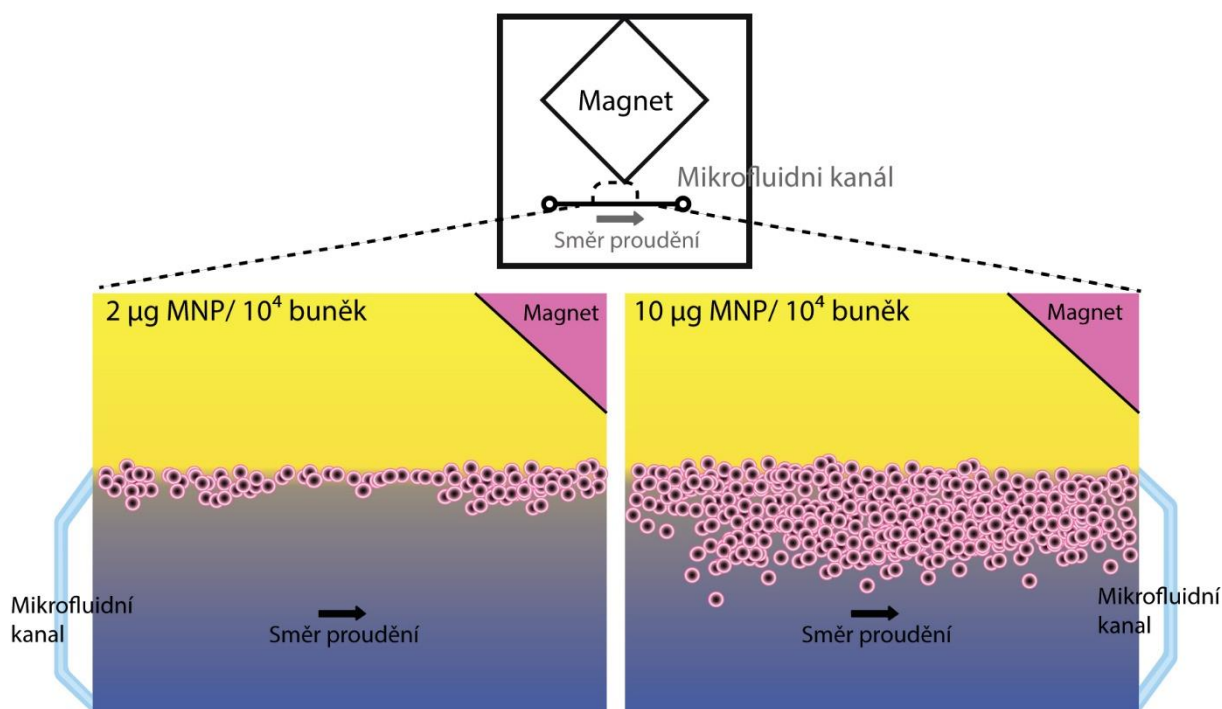


Obrázek 9: Imunomagnetická separace CD34⁺ hemopoetických kmenových buněk.

Magnetické nanočástice se navazují na buňky CD34⁺ a po vložení magnetu se tak separují od ostatních buněk. Upraveno s využitím [1]

Jejich úspěch ukazuje, že správné imunogenetické nanočástice jsou schopné oddělit kmenové buňky pro další analýzy. [1, 20]

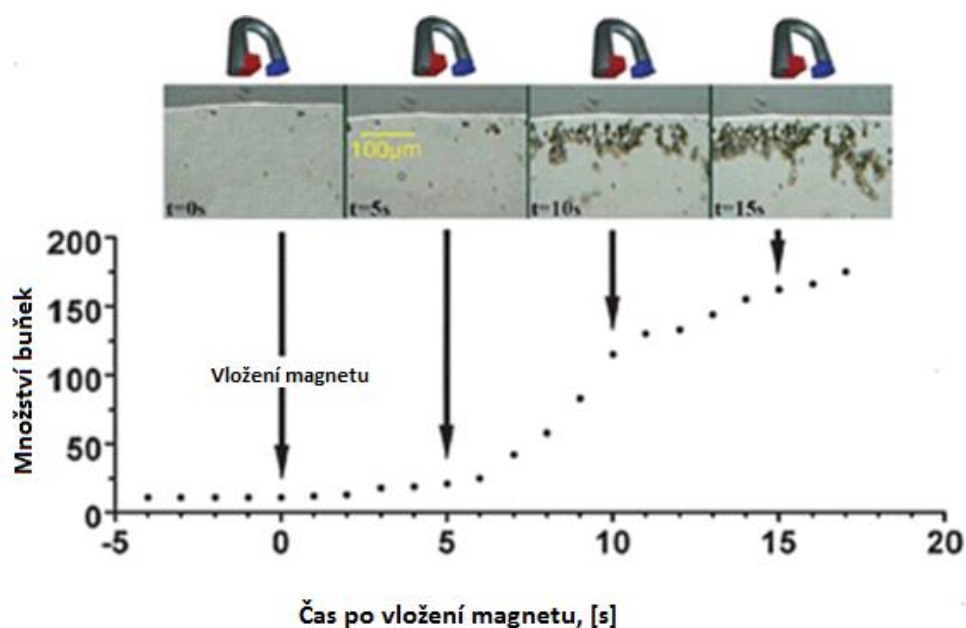
Dalším příkladem využití MNPs je použití bakteriálních magnetických nanočástic pro experiment s endoteliálními progenitorovými buňkami (EPCs) v mikrofluidním kanálu. MNPs inkubovali s EPCs v koncentračním rozmezí 2 μg na 10^4 buněk až po 20 μg na 10^4 buněk. Celkem jedna třetina MNPs byla přijata EPCs. Na Obrázek 10 je ukázáno, že při větším počtu MNPs (10 μg na 10^4 buněk), se více buněk přitahuje k magnetu (o síle 400 mT). Asi 40% EPCs zůstalo na místě s průtokovou rychlostí 5 $\mu\text{l min}^{-1}$ a koncentrací 10 μg MNP na 10^4 buněk. Autoři uvádějí, že při vyšší průtokové rychlosti 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ (ekvivalent k lineární rychlosti 7 mm s^{-1}) se mnoho buněk stále drželo stěny kapiláry. [1, 21]



Obrázek 10: Mikrofluidní kanál s buňkami zanícenými magnetickými nanočásticemi uvnitř mikrofluidního kanálu. Po přiložení magnetu se buňky začínají shromažďovat v místě působení magnetu. [1]

3.2. Využití MNPs *in vivo*

Důležité je využití MNPs pro manipulaci a monitorování polohy buněk *in vivo*. Vzhledem k tomu, že EPCs se podílejí na vaskulární re-endotelializaci a post-ischemické neovaskularizaci, Lythgoe a spolupracovníci označili lidské EPCs nanočásticemi z oxidů železa (Feridex). Na Obrázek 11 je sumární záznam z videosekvence pořízené mikroskopem, buňky označené MNP se akumulují během 15 s ke stěně průtokové cely, kde je magnet. Umístěním magnetu vně těla potkana, autoři úspěšně zvýšili počet EPC v místě poranění krkavice. Tento výsledek ukázal potenciál využití magnetického zařízení umístěného mimo tělo pro přivádění buněk k cílovému orgánu. [1, 22]



Obrázek 11: Lidské EPCs označené nanočásticemi se začínají časem hromadit v místě přiložení magnetu. Upraveno s využitím [22]

4. Optické systémy pro detekci pohybu buněk

4.1. Mikroskopy vhodné pro snímání buněk Pro sledování objektů velikosti jednotky až desítky mikrometru je nejvhodnějším typem mikroskopu invertovaný mikroskop se zvětšením 10–40x. Příkladem tohoto mikroskopu je Olympus IX-73 (viz Obrázek 12). Tento typ mikroskopu se liší od klasického tím, že objektivy jsou pod pozorovaným objektem a zdroj světla nad ním.



Obrázek 12: Invertovaný mikroskop Olympus IX-73 [23]

4.2. Optické materiály pro průtokové cely

Elastické silikony jsou dnes nejpoužívanějším materiálem pro průtokové cely. Materiály na bázi silikonu jsou upřednostňované díky své průhlednosti, elasticitě a také cenové dostupnosti. Silikon svou elasticitou umožňuje instalaci pump a dalších zařízení, která slouží k pohybu kapaliny uvnitř mikrofluidního zařízení. Jeho výhodami, oproti sklu a křemíku, jsou propustnost pro plyny, nízká chemická reaktivita a nízká toxicita. Mezi další výhody patří také jednoduchost jeho přípravy. Zatímco sklo a křemík vyžadují výrobu v čistých prostorách a výroba mikrofluidních zařízení z těchto materiálů je časově náročná, PDMS se dnes často zpracovává litografií. [24, 25]

4.3. Kamery kompatibilní s invertovaným mikroskopem

Kamery kompatibilních je dnes velké množství, na pracovišti (UBMI, laboratoř biofyziky) jsou k dispozici Andor iXon 897, Andor Zyla 5.5 a PixeLINK PL-A662.

Kamera Andor iXon 897 (viz Obrázek 13) má maximální frekvenci snímání 17 MHz s rozlišením 512 x 512 pixelů a frekvenci snímání 56 (při plném rozlišení) až 11074 snímků za sekundu. Velikost pixelů je 16 x 16 μm . Vysoká rychlost snímání umožňuje využití této kamery tam, kde je potřeba vysokého časového rozlišení se slabým osvětlením, například v mikroskopii s vysokým rozlišením, pro detekci a sledování jednotlivých molekul a ionů v astronomii. [26]



Obrázek 13: Kamera Andor iXon 897 [26]

Andor Zyla 5.5 (viz Obrázek 14) je vysokorychlostní kamera s vysokým rozlišením. S využitím rozhraní Camera Link má rychlost snímání 100 snímků za sekundu a s využitím rozhraní USB 3.0 je rychlost snímání 40 snímků za sekundu. Kamera má rozlišení 2560 x 2160 (5,5 megapixelů). Tato kamera je vhodná k použití v mikroskopii a ve fyzikálním výzkumu. [27]



Obrázek 14: Kamera Andor Zyla 5.5 [27]

Kamera PixeLINK PL-A662 umožňuje snímání statických obrazů a také videozáznamů, má rozlišení 1,3 megapixel (1280 × 1024 pixelu). Při nastaveném rozlišení 1280 × 1024 je rychlost snímání 12,7 snímku za sekundu a při rozlišení 640 × 480 se rychlost zvyšuje na 60 snímků za sekundu (viz Obrázek 15). Kamera může být využita v mikroskopii a pro medicínské účely. [28]



Obrázek 15: Kamera PixeLINK PL-A662 [28]

5. Vliv elektromagnetického pole na buňky

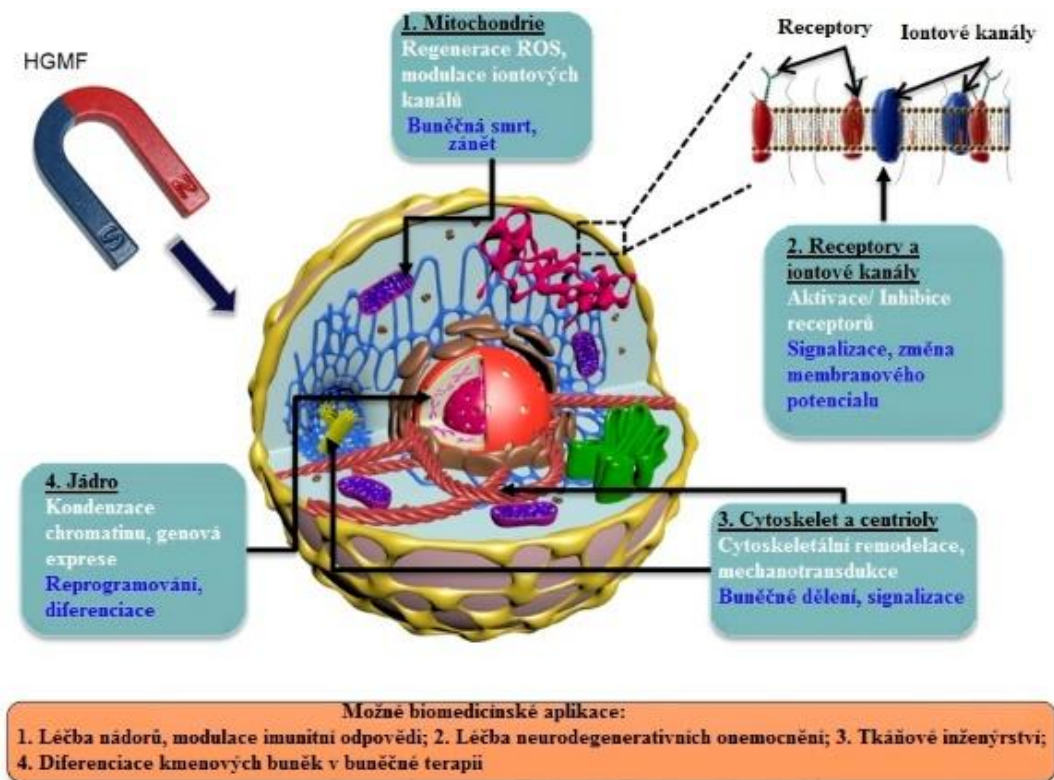
5.1. Vliv elektromagnetického pole na přirozenou strukturu

buňky

Elektromagnetické pole (EMP) má velký vliv na naše tělo (viz Obrázek 16). Využívá se toho ve fyzioterapii pro léčbu kostních poruch a osteoartritidy, pro regeneraci chrupavky nebo snížení bolesti. V poslední době bylo EMP použito v experimentech *in vitro* na buněčných kulturách.

Mechanismus vlivu sinusového a pulsního EMP stále zůstává nejasný. EMP ovlivňuje řadu biologických procesů, jejichž funkce úzce souvisejí s vlastnostmi buněčné membrány. EMP může působit na iontové kanály a způsobit změny v rozložení membránového potenciálu (může nastat hyperpolarizace nebo depolarizace). Mechanismus působení na kanály a membránové vrstvy není zatím dobře prozkoumán, pravděpodobně hraje roli v přeorientování některých molekul, způsobuje deformaci iontových kanálů a změnu toku iontů, zejména Ca^{2+} . EMP může také ovlivňovat přenos signálu a mezibuněčnou komunikaci. Předpokládá se, že jeden z možných mechanismů vlivu EMP na buňky zahrnuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) v buňce. Nadměrná koncentrace ROS, jako jsou superoxidové anionty (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2), je považována za destruktivní buňky a vede k inhibici genové exprese. Naproti tomu malé množství ROS funguje jako intracelulární druhý posel a aktivuje signalizační kaskády, které se podílejí na růstu a diferenciaci mnoha buněčných typů.

Parametry EMP (frekvence, magnetická indukce) a doby expozice používané různými výzkumnými skupinami jsou poměrně rozmanité a nemají jasné důvody, proč jsou zvoleny konkrétní parametry. Úspěšné použití sinusového EMP ve studiích se týkalo především elektromagnetického pole s parametry 1–5 mT, 10–50 Hz. Jedna z mála publikovaných studií o použití sinusového EMP [30], ve kterém byla použita vyšší intenzita EMP (20 mT), neprokázala významný vliv na diferenciaci osteogenu. [31]

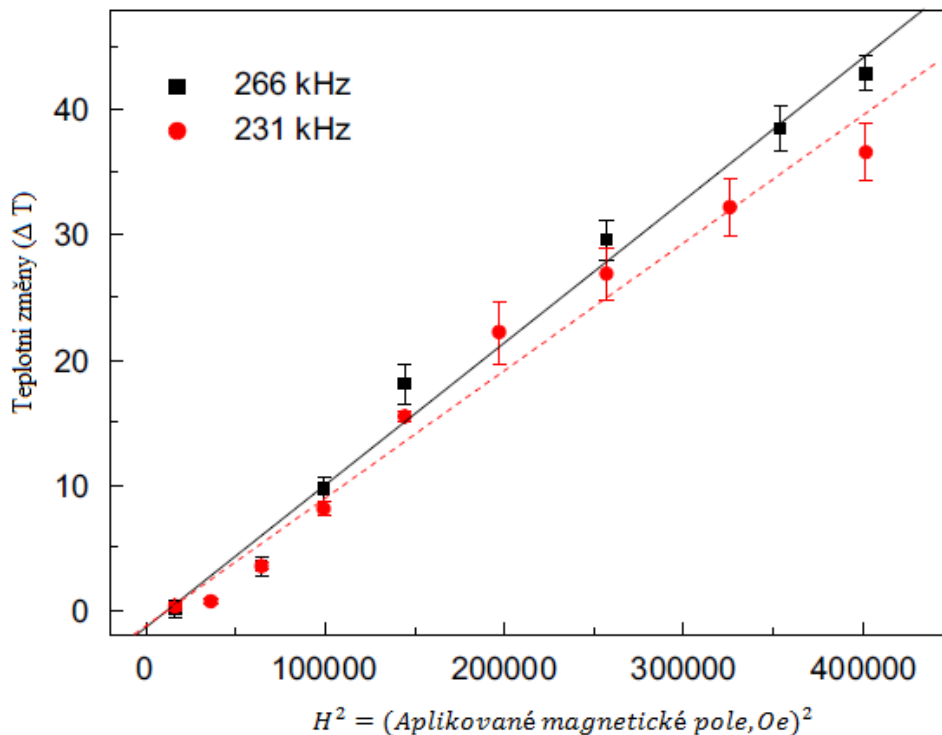


Obrázek 16: Schematické znázornění možných aplikací HGMF a intracelulárních efektorů. HGMF - magnetické pole s vysokým gradientem. Upraveno s využitím [41].

5.2. Vliv elektromagnetického pole na buňku s obsahem kovových nebo magnetických nanočástic

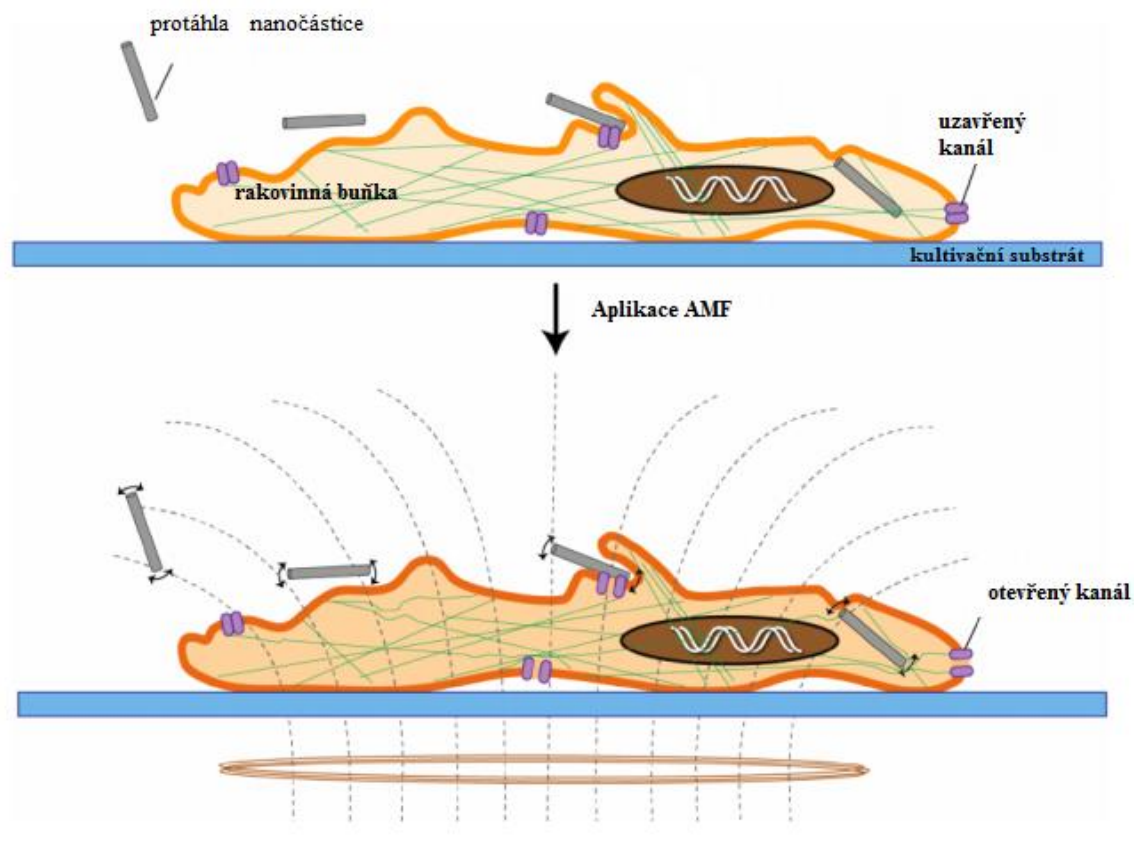
Fenomény indukčního ohřevu feromagnetických a vodivých materiálů se objevují, když jsou tyto materiály vystaveny střídavému elektromagnetickému poli pracujícímu v kmitočtovém rozsahu kilohertz (kHz) až megahertz (MHz), jsou založeny na indukovaných vířivých proudech a magnetických polarizačních účincích. [32]

Teplu vytvářené aplikací střídavého magnetického pole závisí na vlastnostech magnetických nanočástic (složení, velikosti, krystalové struktury), stejně jako na frekvenci a amplitudě magnetického pole. Ve studii [33] byly nanočástice $CoFe_2O_4$ syntetizovány, dispergovány ve vodě a zkoumány jako zahřívací prostředky. Během experimentů s ohřevem dosáhly všechny roztoky nanočástic $CoFe_2O_4$ v ustáleném stavu, kdy teplota vzrostla 0,1 až 42,9 °C nad okolní podmínky, když bylo aplikováno magnetické pole 127–634 Oe (12,7–63,4 mT) při 231 nebo 266 kHz (viz Obrázek 17). Bylo zjištěno, že generování tepla závisí na intenzitě střídavého magnetického pole a použité frekvenci.



Obrázek 17: Celkové zvýšení teploty během 15 minut při tvorbě tepla nanočásticemi $CoFe_2O_4$ na různých magnetických polích (634, 507, 380, 254 a 127 Oe) při 266 a 231 kHz. Chybové úsečky představují standardní odchylku pro tři experimenty. Upraveno s využitím [40]

V příspěvku [34] je ukázáno že, protáhlé magnetické nanočástice se slabými magnetickými poli a nízkými frekvencemi mohou indukovat buněčnou smrt mechanismem, který nespočívá v produkci tepla. Rakovinové buňky tlustého střeva byly inkubované o dvou koncentracích (2,4 a 12 $\mu\text{g/ml}$) niklových nanočástic o průměru 35 nm a buňky s nanočásticemi byly vystaveny střídavému magnetickému poli (0,5 mT a 1 Hz nebo 1 kHz) po dobu 10 nebo 30 minut. Toto pole s nízkým výkonem působilo na magnetické nanočástice, vyvolalo jejich rychlý pohyb, což způsobilo mechanické narušení buněk (viz Obrázek 18). Obrázky transmisního elektronového mikroskopu ukázaly, že nanostruktury byly internalizovány do buněk do 1 hodiny po inkubaci. Studie životaschopnosti buněk ukázaly, že magnetické pole a nanočástice odděleně měly malý škodlivý účinek na buňky; avšak při jejich kombinování magnetické pole a nanočástice způsobily, že hodnoty životaschopnosti buněk poklesly až o 39%, v závislosti na síle magnetického pole a koncentraci nanočástic.



Obrázek 18: Schéma možného mechanismu buněčné smrti v důsledku interakce nádorových buněk s protáhlými nanočásticemi a následná aplikace nízkofrekvenčního magnetického pole. AMF – střídavé magnetické pole. Upraveno s využitím [41].

6. Praktická část

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo realizovat statické a pulzní magnetické pole a pomocí mikroskopu bezkontaktně detekovat pohyb a zastavení značených buněk vlivem magnetického pole. Dále bylo potřeba otestovat na modelových kapilárách techniky vizualizace protékajících buněk a jejich zachycení s využitím generovaného magnetického pole, sledovat migraci buněk, navrhnout vhodné řešení zpracování získaných dat.

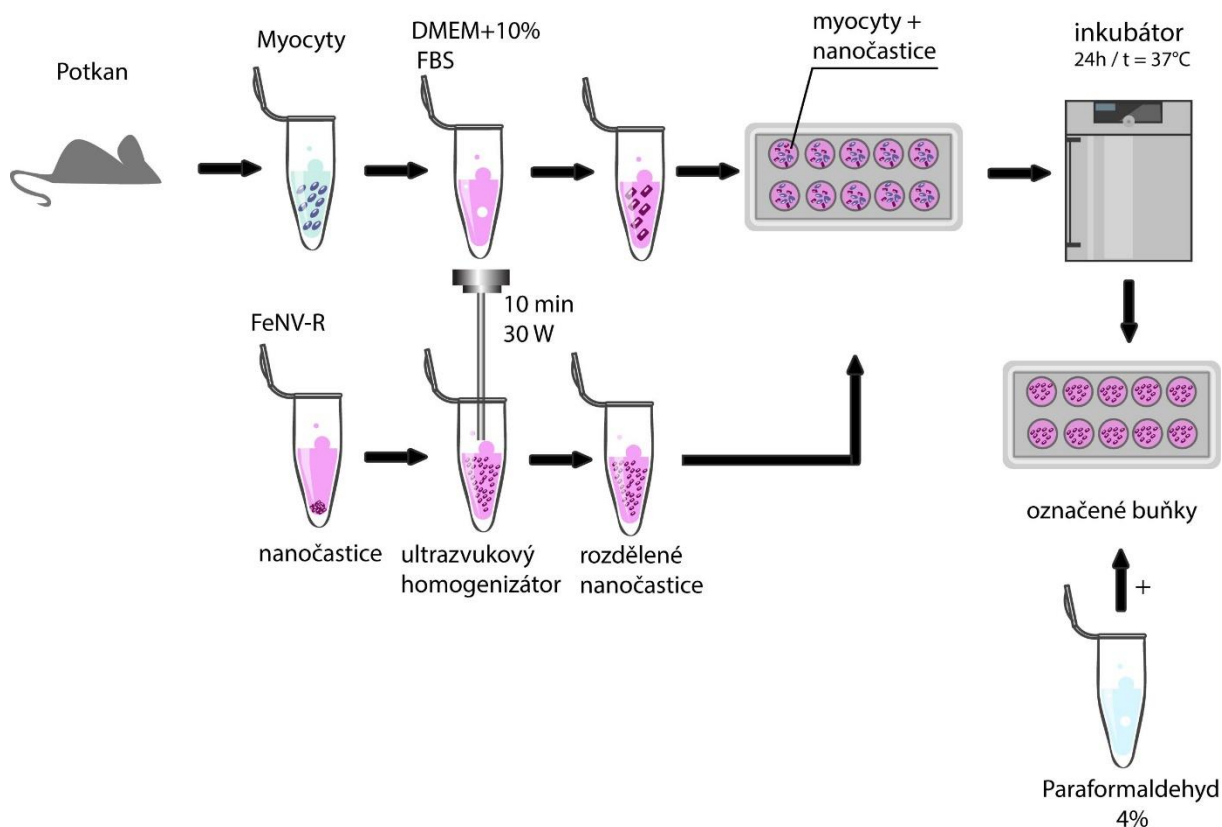
Praktická část je rozdělena do 8 kapitol. V kapitole 6.1 bylo značení buněk vyzkoušeno na největších buňkách, které byly na pracovišti k dispozici (kardiomyocytů s velikostí cca 120 x 30 x 30 μm). Tyto velké buňky lze totiž snadno vizualizovat a velmi dobře sledovat jejich pohyb. U dalších měření byly použity fibroblasty. Fibroblasty jsou základní buňky vazivové tkáně, produkují extracelulární matrix a jsou velikostí a dalšími vlastnostmi podobné progenitorovým buňkám a imunomodulativním buňkám [35], o jejichž

transplantaci do krevního oběhu a zkoncentrování v místě patologie se uvažuje v blízké budoucnosti. Dále v kapitole 6.2 byly kardiomyocyty označené magnetickými nanočásticemi byly umístěny v blízkosti neodýmového magnetu a byl sledován jejich pohyb. V následujících technických kapitolách 6.3 a 6.4 bylo charakterizováno magnetické pole neodýmového magnetu a elektromagnetu. Byly navrženy způsoby regulace elektromagnetu. V následující kapitole 6.5 byl sledován vliv elektromagnetického pole na fibroblasty. Kapitola 6.6 se zabývá aspekty optimální metodiky inkorporace částic do buněk, konkrétně vlivem koncentrace nanočástic v cytoplasmě na jejich schopnost reagovat na magnetické pole. V kapitole 6.7 je popsán postup výroby průtokové komory, která bude simulovat tenkou cévu s možností regulovat rychlost průtoku srdce. Do této průtokové komory jsou pak injektovány nanočásticemi značené buňky a poslední kapitola 6.8 popisuje analýzu pohybu těchto buněk v mikrofluidním systému a jejich záchyt v různě nastaveném magnetickém poli.

6.1. Značení buněk magnetickými částicemi

V praktické části této práce bylo použito více typů buněk, přičemž nejdříve byly použité kardiomyocyty získané z potkana. Důvodem je jejich velikost, a proto snadné zaostření mikroskopu a snímání pohybujících se buněk při zkušebních experimentech a nastavení aparatury. Kardiomyocyty jsou základní stavební jednotkou srdeční přičně pruhované svalové tkáně. Kardiomyocyty byly rozdělené do 10 jamek a ponořeny do média DMEM s 10% FBS.

Byly použity nanočástice FeNV-R (kulovitý tvar o velikosti 20 nm, syntetizované a charakterizované elektronovým mikroskopem v laboratoři Katedry fyzikální chemie UP Olomouc, chemické složení Fe_2O_3), zakoupený zásobní roztok částic v deionizované vodě měl koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$, shluky nanočástic byly rozmělněny pomocí ultrazvukového homogenizátoru firmy Bandelin (10 minut s nastaveným výkonem 30 W, po uplynutí 5 minut byly MNPs protřepány pro dosažení lepšího výsledku). Značení probíhalo tak, že pomocí stříkačky MNPs se přidaly do živného média (byla použita koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, která se osvědčila již při experimentech na našem ústavu v minulých letech), částice relativně volně plavou v médiu a postupně přilnou k povrchu buněk. Během dalších 24 hodin následovalo jejich proniknutí přes membránu do buňky v inkubátoru. Dále buňky označené nanočásticemi byly fixované pomocí 4 % roztoku paraformaldehydu (viz Obrázek 19), aby buňky při dlouhých experimentech neodumíraly a nepraskaly. V dalších navazujících experimentech budou již použity buňky živé (viz další kapitoly 6.5 až 6.8).



Obrázek 19 : Postup značení kardiomyocytů magnetickými nanočásticemi FeNV-R a následná fixace paraformaldehydem.

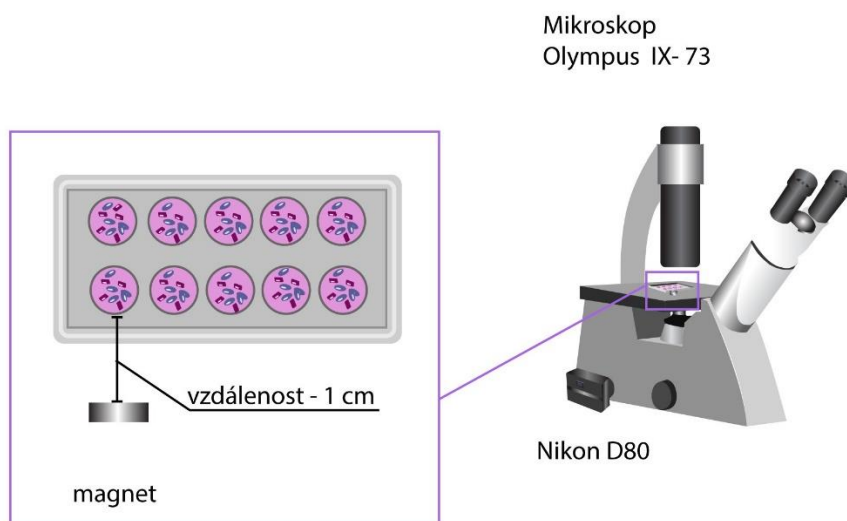
6.2. Kontrola inkorporace částic

Kontrola inkorporace částic spočívala v tom, že buňky označené magnetickými částicemi byly vloženy do magnetického pole. Jejich pozorování bylo provedeno pomocí mikroskopu Olympus IX-73 při nastaveném zvětšení 20x, obrázky byly získané pomocí kamery Nikon D80 a uložené prostřednictvím softwaru Nikontrol 3K (viz Obrázek 20).



Obrázek 20: Označené buňky před aplikací magnetu (t_0). Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.

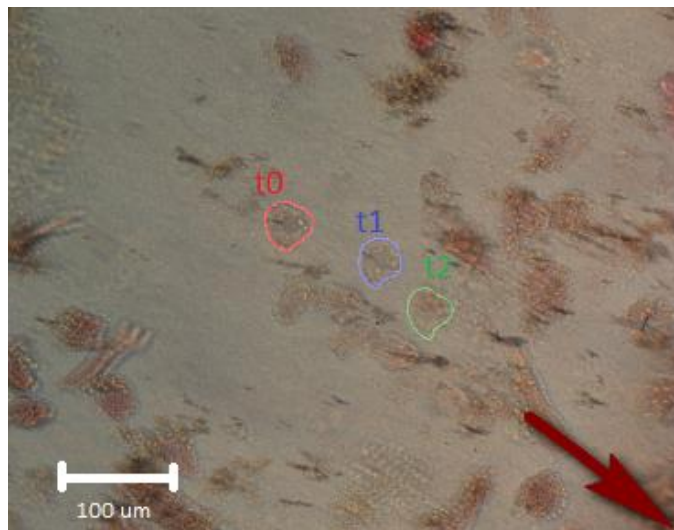
Ve vzdálenosti 10 mm od označených buněk v aktuálním zorném poli mikroskopu byl vložen neodymový magnet (viz Obrázek 21), intenzita magnetického pole použitého magnetu ve vzdálenosti 10 mm je 20 mT (viz kapitola 6.3.1).



Obrázek 21: Schematické znázornění kontroly inkorporace částic.

Pomocí programového prostředí Matlab byly získané snímky sjednoceny do jednoho obrázku. Na začátku byly obrázky načtené pomocí funkce *imread* a následně zkombinované do jednoho pomocí funkce *imlincmb* (viz Příloha). Před sjednocením byla pro názornost na každém ze snímků stejná buňka označena barevně. Červená barva odpovídá času t_0 , kdy jsou

buňky před aplikací magnetu. Modré barvě odpovídají buňky v momentu aplikace magnetu a zelené po uplynutí 30 s. Z Obrázek 22 je vidět, že kardiomyocyty označené magnetickými nanočásticemi se pohybují s časem v magnetickém poli směrem k magnetu.



Obrázek 22: Snímky kardiomyocytů v čase t_0 - před vložením magnetu (červená barva), t_1 - aplikace magnetu (modrá barva) a t_2 - 30 sekund po aplikaci magnetu (zelená barva), šipka ukazuje směr pohybu buněk v magnetickém poli. Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73. Dodatečné přeložení obrazů pomocí softwaru Matlab

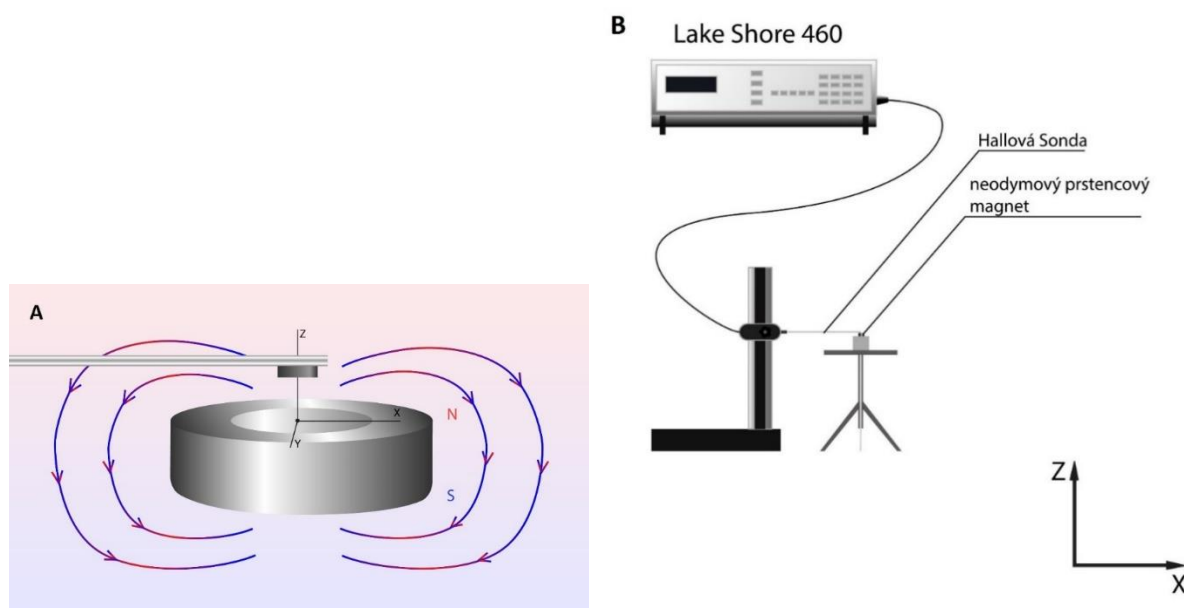
6.3. Charakteristika magnetického pole

Měření magnetického pole je důležité zejména ve vzdálenosti 5 až 10 mm severní stěnou magnetu, neboť právě takto bude vzdálen od stěny magnetu průtokový tunel s buňkami (odhad na základě experimentů s přitahováním a manipulací buněk), případně v těchto vzdálenostech pod povrchem reálné tkáně se předpokládají cévy s buňkami, se kterými by mělo být magneticky manipulováno. Pro měření magnetického pole v tomto prostoru byla použita Hallova sonda firmy Lake Shore model 460. Před začátkem měření Hallova byla vynulována pomocí „zero Gauss chamber“ tím, že Hallova sonda byla vložena dovnitř.

6.3.1. Permanentní magnet

Pro naše experimenty byl zakoupen neodymový magnet. Měření magnetického pole magnetu v rovině Z se provádělo tak, že Hallova sonda byla daná nad centrální otvor magnetu ve výšce 0,5 mm od horního okraje a postupně po 0,5 mm se posouvala nahoru do výšky 10,5 mm od horního okraje (viz Obrázek 23). Měření v rovině X probíhalo, tak že sonda zase byla daná do centra magnetu ve výšce 5 mm a posouvala se po 1 mm doprava a doleva do

vzdálenosti 6 mm v obou směrech a na konci pro kontrolu bod ve vzdálenosti 0 mm byl změřen ještě jednou. Na Obrázek 23B je schematicky znázorněná celá aparatura s mikroposuvným držákem, tak jak probíhalo měření síly magnetického pole magnetu.



Obrázek 23: *A:* Měření magnetického pole neodymového magnetu pomocí přístroje Lake Shore 460 a Hallových sond. *B:* Schematické znázornění celé aparatury s mikroposuvným držákem.

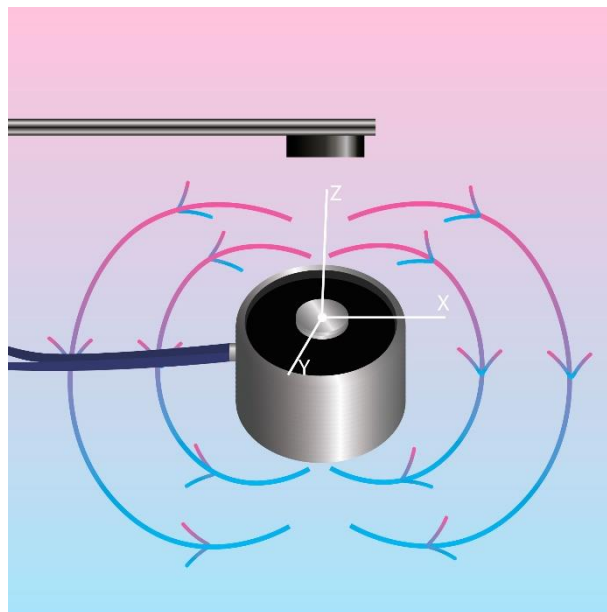
6.3.2. Elektromagnet

Pro experimenty byl zakoupen elektromagnet (viz Obrázek 24) se jmenovitým napětím 12 V, průměrem 30 mm, délkou 25 mm a přitažnou silou 100 N [36]. Základním cílem tohoto experimentu bylo nastavit podobné pole které se osvědčilo u permanentního magnetu v kapitole 6.3.1.



Obrázek 24: Elektromagnet [34]

Měření intenzity magnetického pole se provádělo ve stejných podmínkách a stejným přístrojem jako měření magnetického pole neodmagnetizovaného magnetu (viz popis experimentu kapitola 6.3.1). Na rozdíl od permanentního magnetu má elektromagnet tu výhodu, že se u něj dá modulovat hodnota magnetického pole (například místo na kůži pacienta, kam bude aplikováno magnetické pole přesně v určitý časový interval, můžeme takto ošetřit velmi jednoduše a přesně a za pomoci stisku tlačítek a stejně jednoduše pak vypnout). Při měření byla nastavována taková hodnota napětí, aby výsledné magnetické pole přibližně odpovídalo hodnotě permanentního magnetu ve stejné vzdálenosti. Na obrázku 25 je schematicky znázorněno, jak probíhalo měření síly magnetického pole elektromagnetu.



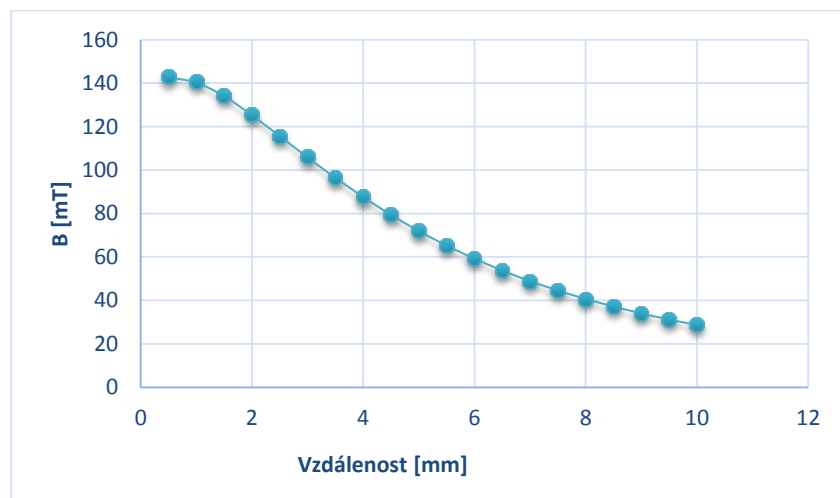
Obrázek 25: Měření magnetického pole elektromagnetu pomocí přístroje Lake Shore 460 a Hallovy sondy.

Magnet byl nastaven na maximální protékající proud (napětí 22,8 V) intenzita magnetického pole v tomto bodě byla 24 mT. Následně byla intenzita magnetického pole změřena ve stejné výšce a ve dvou bodech doleva v rozpětí 4–8 mm a ve dvou bodech doprava v rozpětí 4–8 mm. Stejně měření bylo provedeno ve výšce 5 mm od centra magnetu. Potom byl výkon magnetu snížen na 50 % (napětí 11,5 V) a byly naměřeny hodnoty magnetického pole ve výšce 10 mm, kde je intenzita magnetického pole tvoří 12 mT a ve výšce 5 mm – 32 mT.

6.3.3. Výsledky

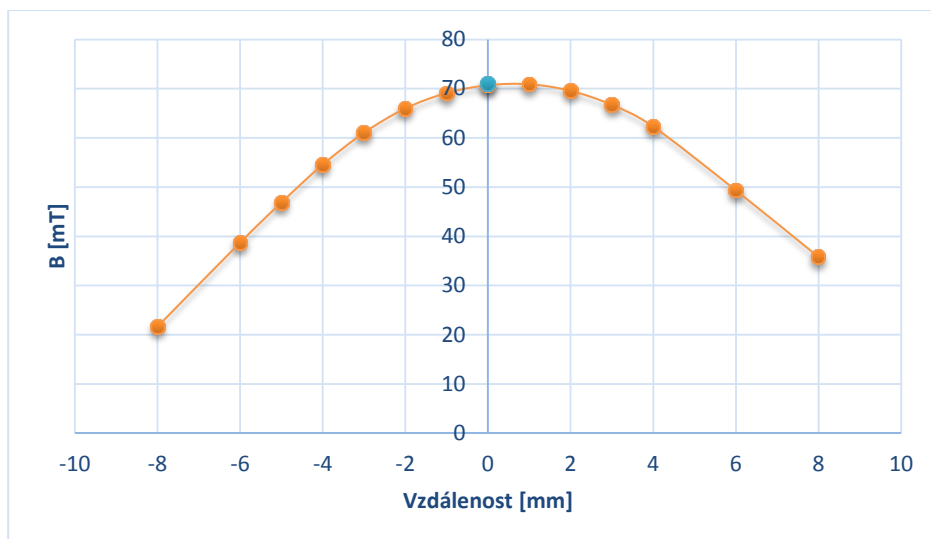
Bylo provedeno měření magnetického pole dvou magnetů: permanentního neodymového magnetu a elektromagnetu. Měření se provádělo pomocí Hallovy sondy firmy Lake Shore model 460.

V případě permanentního magnetu byly nasnímány dva typy dat, a to v rovině X a Z (viz Obrázek 23). V rovině X bylo naměřeno celkem 20 hodnot síly magnetického pole v rozsahu 0,5–10 mm. Výsledky jsou znázorněny na Obrázek 26.



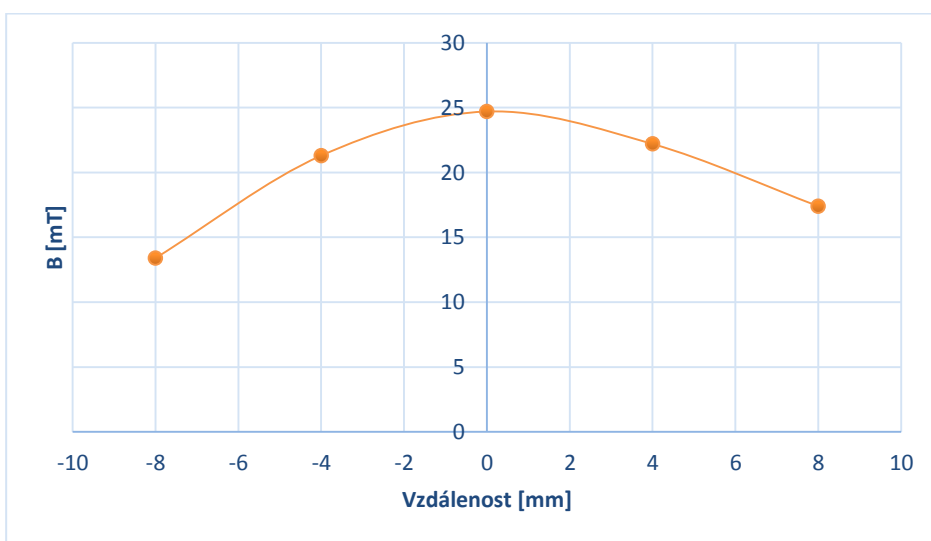
Obrázek 26: Měření síly magnetického pole neodymového magnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina Z)

V rovině Z (viz Obrázek 23) bylo měřeno celkem 13 hodnot – 7 hodnot doleva v rozsahu 1–8 mm a 6 hodnot doprava v rozsahu 1–8 mm. V bodě 0 byla hodnota intenzity magnetického pole změřena dvakrát, na začátku a na konci měření, pro zjištění přesnosti. Obrázek 27 znázorňuje výsledky měření magnetického pole neodymového magnetu, modrá tečka znázorňuje druhé měření ve vzdálenosti 0 mm od magnetu a překrývá se s první hodnotou, což ukazuje, že měření bylo provedeno správně a hodnoty ve stejném bodě na začátku a na konci experimentu se shodují.

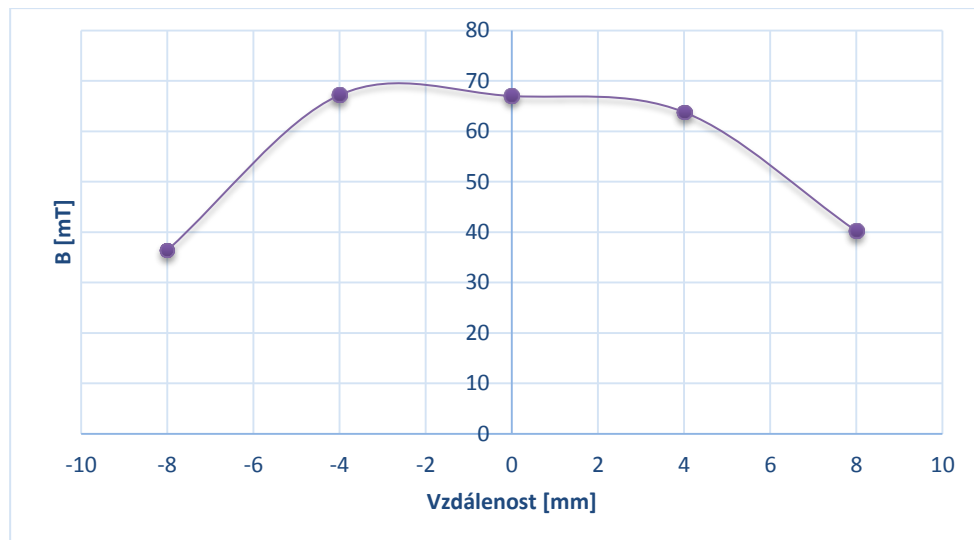


Obrázek 27: Měření síly magnetického pole v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda umístěna ve výšce 5 mm od centra magnetu. Modrá tečka znázorňuje hodnotu ve vzdálenosti 0 mm po opakovaném měření.

Následně bylo provedeno měření elektromagnetu. Jelikož cílem bylo dosáhnout hodnot přibližně odpovídajících permanentnímu magnetu a ve výšce 10 mm rozdíl činil 4 mT, nebylo potřeba měřit velké množství dat, stačilo změřit jen několik hodnot pro porovnání výsledku s permanentním magnetem. Celkem bylo změřeno 5 hodnot ve výšce 10 mm (viz Obrázek 28) a 5 hodnot ve výšce 5 mm (viz Obrázek 29). Poté, co výkon magnetu byl snižen na 50 % ve výšce 10 mm intenzita magnetického pole klesla z 24 mT na 12 mT a ve výšce 5 mm z 67 mT na 32 mT.



Obrázek 28: Měření síly magnetického pole elektromagnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda umístěna ve výšce 10 mm od centra magnetu.



Obrázek 29: Měření síly magnetického pole elektromagnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda umístěna ve výšce 5 mm od centra magnetu.

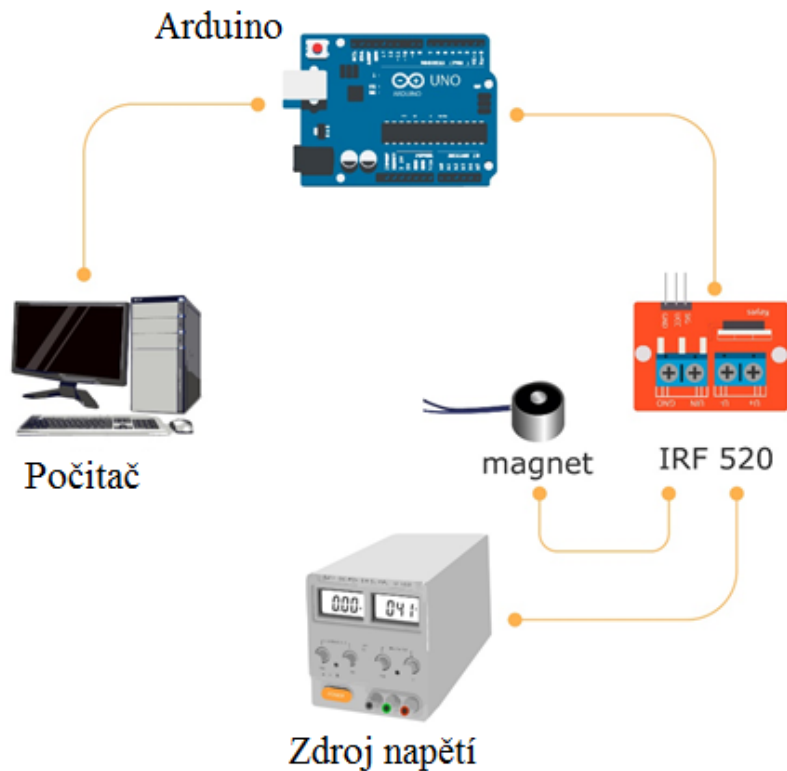
Z výsledku lze vyčíst, že intenzita magnetického pole klesá se vzdáleností. V případě permanentního magnetu je možné intenzitu magnetického pole regulovat vzdáleností od objektu, ale u elektromagnetu ji lze regulovat nastavením magnetu.

6.4. Regulace elektromagnetu

6.4.1. Elektromagnet s pulzní regulací

K realizaci elektromagnetu s pulzní regulací bylo využito těchto komponentů: Arduino, modul IRF520 a elektromagnet (viz Obrázek 30). Arduino je otevřená elektronická platforma, založená na uživatelsky jednoduchém hardware a software. Softwarová část se skládá z bezplatného programového prostředí (IDE), které se skládá z textového editoru pro psaní kódu, prostoru pro zprávy, textové konzole, lišty s příkazy pro běžné funkce a řadu nabídek. Připojením na hardware umožňuje nahrávání programů a komunikaci s nimi. Hardware představuje jednoduchá počítačová deska. [37, 38]

Tranzistor MOSFET modul IRF520 umožňuje řízení zařízení s větším napětím a proudem, než zvládne Arduino. Má řídicí napájení: 3,3 / 5 V, maximální proud menší než 5 A (od 1 A je nutné použít chladič), napětí 0–24 V [39].

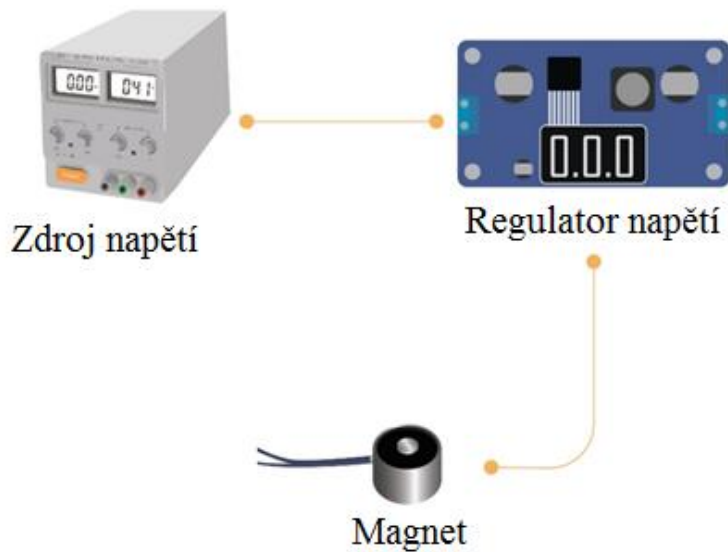


Obrázek 30: Schéma zapojení elektromagnetu s pulzní regulací

Tento typ regulace elektromagnetů slouží pro generování střídavého magnetického pole. Bylo použito vstupní napětí 22,8 V, frekvence 9,6 kHz.

6.4.2. Elektromagnet s potenciometrickou regulací

Magnetický aplikátor se skládá z regulátoru napětí s digitálním displejem a elektromagnetu (viz Obrázek 31). Regulátor napětí umožňuje regulovat napětí na výstupu a tím měnit velikost magnetického pole.



Obrázek 31: Schéma zapojení elektromagnetu a regulátoru napětí.

Pomocí osciloskopu byl změřen výstupní proud a magnetické pole, na základě získaných výsledků bylo stanoveno, že magnetické pole je statické. V dalších experimentech se používalo dvou typů vstupních napětí 22,8 V (maximum) a 11,5 V (poloviční výkon).

6.5. Vliv elektromagnetického pole na fibroblasty

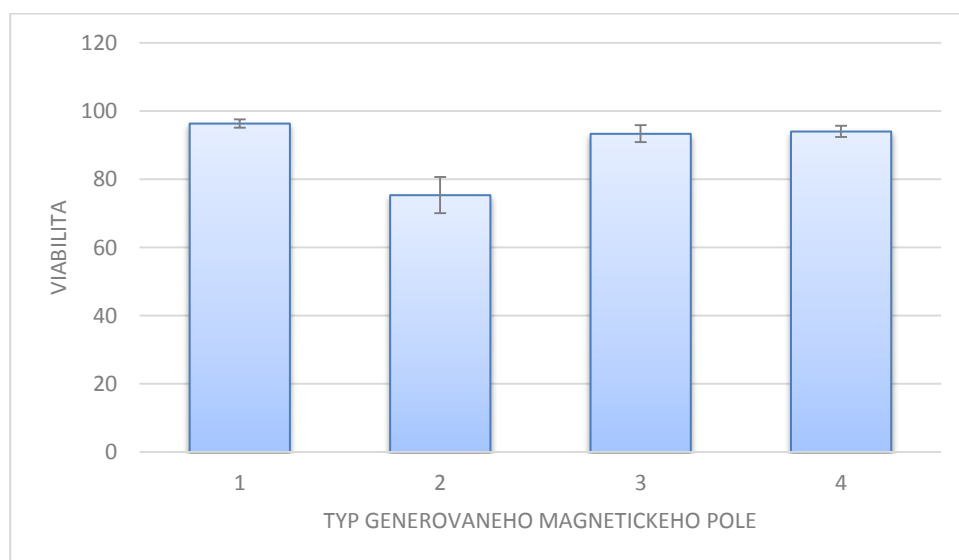
Fibroblasty byly označeny železitými nanočásticemi o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Dále byly na označené buňky aplikovány tyto typy polí: magnetické pole neodymového magnetu (viz kapitola 6.3.1, statické magnetické pole velikosti 29 mT), magnetické pole elektromagnetu (řízení pomocí vysokofrekvenční střídavy viz kapitola 6.4.1, střídavé magnetické pole velikosti 25 mT, vstupní napětí 22,8 V, frekvence 9,6 kHz, střída 50%), magnetické pole elektromagnetu (řízení regulátorem napětí na maximálním výkonu viz kapitola 6.4.2, statické magnetické pole velikosti 25 mT, vstupní napětí 22,8), magnetické pole elektromagnetu (řízení regulátorem napětí na polovičním výkonu viz kapitola 6.4.2, statické magnetické pole velikosti 12 mT, vstupní napětí 11,5 V). Následně byla na fibroblasty použita fluorescenční sonda Calcein AM za účelem, krátkodobého označení a detekce viability buněk. Používá se v mikroskopii a fluorometrii a poskytuje morfologické i funkční informace o životaschopných buňkách. Calcein AM se dobře udržuje v živých buňkách a začíná vyzařovat intenzivní světlo zelené barvy (495 nm / 515 nm). Pokud má buňka poškozenou membránu, Calcein AM se přesouvá zpátky do extracelulárního prostoru a buňka nebude schopna vyzařovat světlo [40]. Po pěti minutové expozici magnetickému poli byla spočítána viabilita buněk pomocí Bürkerovy komůrky a mikroskopu Olympus IX-73.

6.5.1. Výsledky

U každého typu pole byly spočítány tři hodnoty viability (procento zelených buněk z celkového počtu), následně získán průměr těchto hodnot. Výsledky jsou znázorněny v Tabulka 1 a na Obrázek 32.

Tabulka 1: Viabilita buněk po aplikaci různých typů magnetického pole

Číslo experimentu	Typ magnetického pole	Viabilita			Průměr
1	Magnetické pole neodýmového magnetu	96	95	98	96
2	Magnetické pole elektromagnetu (řízení pomocí vysokofrekvenční střídý)	75	69	82	75
3	Magnetické pole elektromagnetu (řízení regulátorem napětí na polovičním výkonu)	90	94	96	93
4	Magnetické pole elektromagnetu (řízení regulátorem napětí na maximálním výkonu)	94	96	92	94



Obrázek 32: Viabilita buněk v závislosti na generovaném magnetickém poli. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.

Na Obrázek 32 lze vidět, že při použití magnetického pole elektromagnetu (řízení pomocí vysokofrekvenční střídavy) zůstává nejmenší počet živých buněk.

6.6. Test značení buněk

Test značení buněk spočíval v tom, že na začátku byly fibroblasty rozděleny do dvou jamek. V první jamce byly označené magnetickými nanočásticemi FeNV-R o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, druhá jamka obsahovala buňky, které byly označeny magnetickými nanočásticemi FeNV-R o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$. Pro manipulaci s označenými buňkami bylo využito dvou typu magnetů: neodymový magnet a elektromagnet. S využitím kamery PixeLINK PL-A662 a mikroskopu Olympus IX-73 se zvětšením 10x byly nasnímané videozáznamy experimentů.

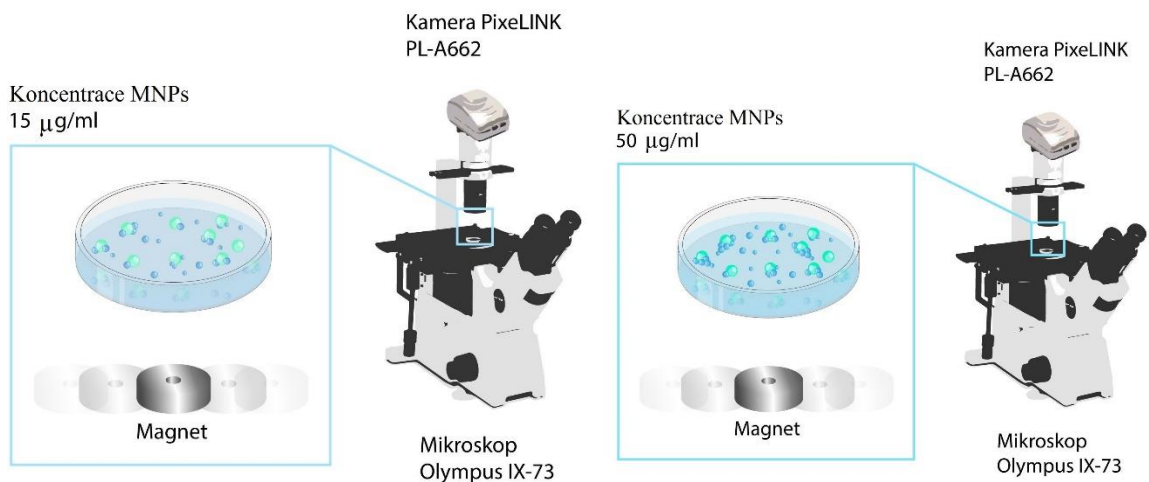
6.6.1. Permanentní neodymový magnet

Kmitavý permanentní magnet

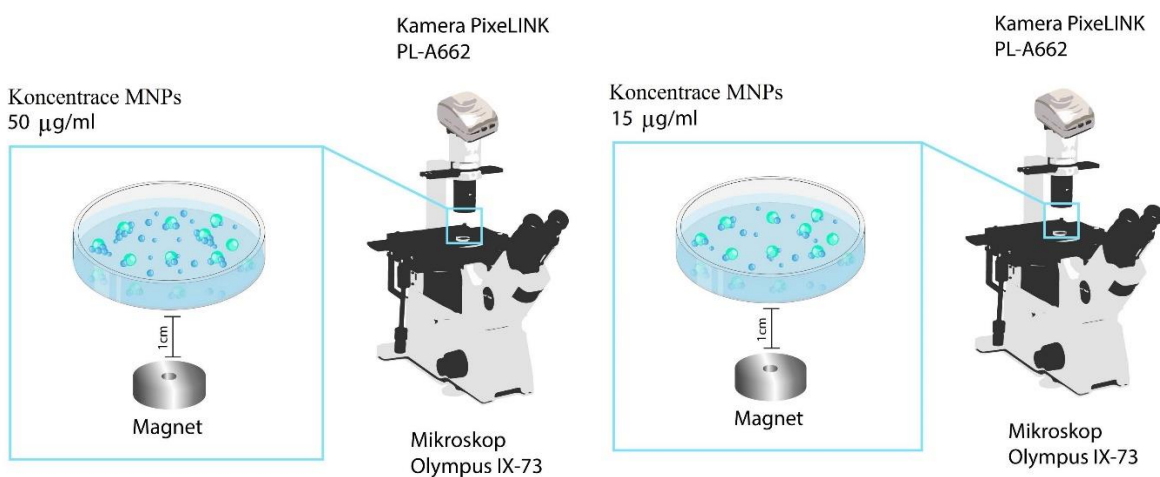
Před jamkou, která obsahovala fibroblasty s MNPs o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$, jsme pohybovali neodymovým magnetem (doleva a doprava ve vzdálenosti 10 mm od jamky s buňkami), stejný postup byl proveden s fibroblasty, které byly označené MNPs o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ (viz Obrázek 33). Experiment byl zapakován 6 krát na různých zorných polích, pro získání přesnějších hodnot.

Statický permanentní magnet

Před jamku, která obsahovala fibroblasty označené MNPs o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$, byl ve vzdálenosti 10 mm vložen neodymový magnet. Intenzita magnetického pole tohoto magnetu ve vzdálenosti 10 mm je 20 mT (viz kapitola 6.3.1). Následně se tento experiment zapakovali pro fibroblasty, které byly označeny MNPs o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ (viz Obrázek 34). Měření bylo zapakováno 6 krát na různých zorných polích.

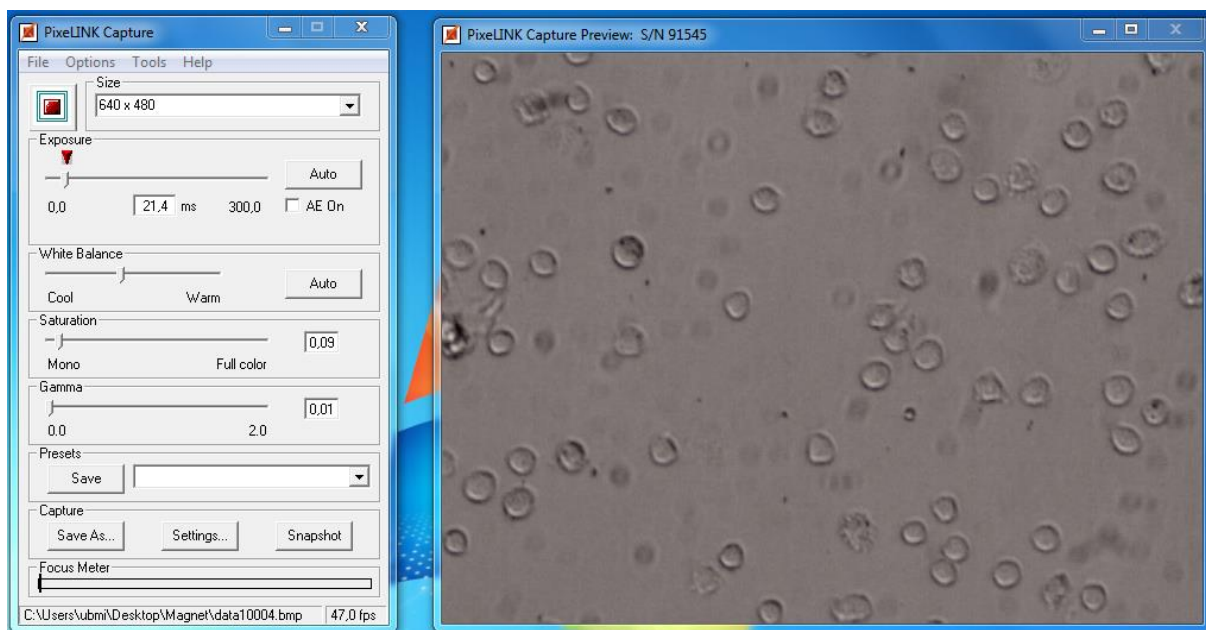


Obrázek 33: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na pohybující se magnet. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml



Obrázek 34: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na magnet vzdálený 10 mm. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml

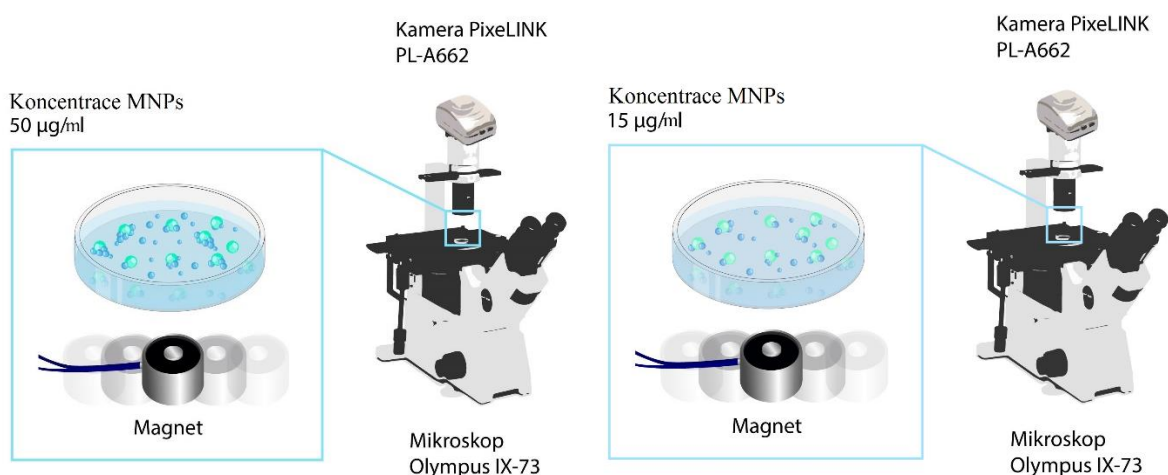
Během těchto experimentů se nastavení kamery PixelINK PL-A662 a výsledných vlastností videozáznamů provádělo pomocí aplikace PixelINK Capture (viz Obrázek 35).



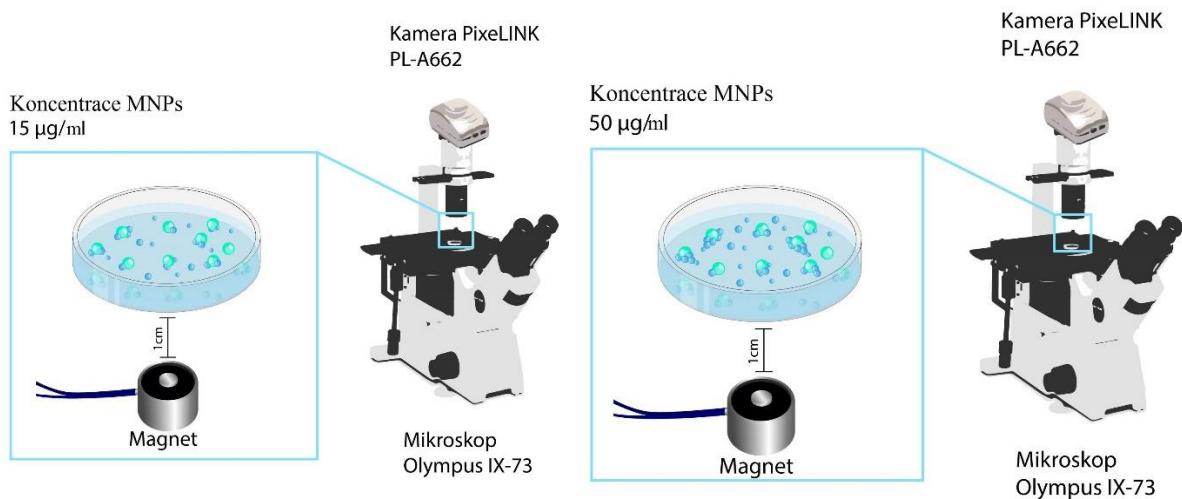
Obrázek 35: Nastavení kamery PixeLINK PL-A662 během testu značení buněk. Na obrázku vpravo kruhové útvary jsou plovoucí fibroblasty.

6.6.2. Elektromagnet

Stejně jako v předchozím experimentu s permanentním magnetem byly provedeny dva typy testů: kmitavý magnet a statický magnet (podrobnější popis viz kapitola 6.6.1), přičemž elektromagnet byl požit na maximálním výkonu (intenzita magnetického pole 25 mT) a na 50% výkonu intenzita magnetického pole činila 12 mT (viz Obrázek 36, Obrázek 37). Každý test byl zapakován 6 krát na různých zorných polích pro získání přesnějších výsledků.



Obrázek 36: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na magnet vzdálený 10 mm. Vpravo koncentrace MNPs 15 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 50 µg/ml



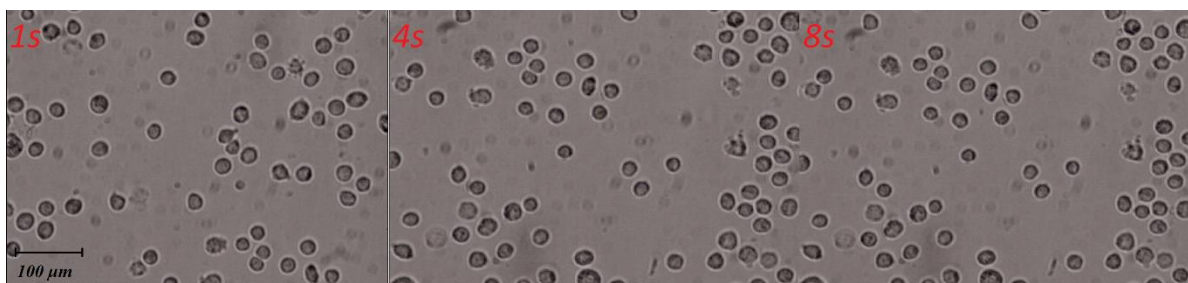
Obrázek 37: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na pohybující se magnet. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml

6.6.3. Výsledky

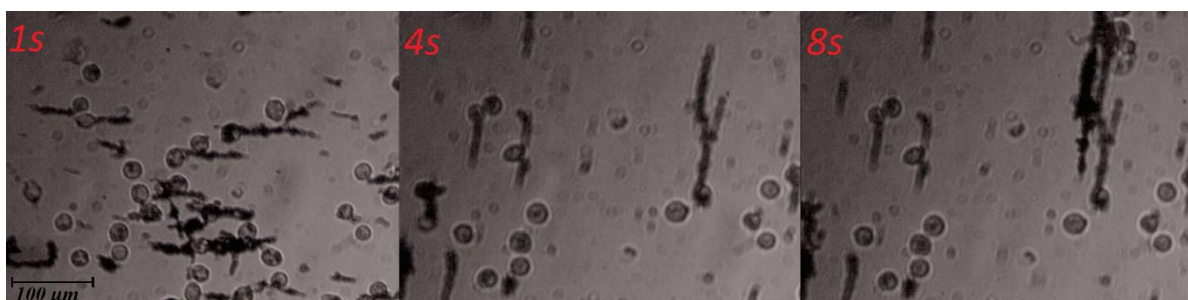
Celkem bylo provedeno dvanáct měření, u každého bylo změřeno šest zorných polí. Byl spočítán celkový počet buněk v každém zorném poli a počet buněk, které reagovaly na vložení magnetu, následně bylo vypočítáno procento buněk reagujících na magnet. Z šesti hodnot byl získán průměr. Výsledky jsou znázorněny v Tabulka 2. Obrázek 38 a Obrázek 39 znázorňuje tři časové okamžiky dvou experimentů „statický magnet“ o různých koncentracích. Na obrázcích lze vidět rozdíl v koncentracích nanočástic. Během experimentu se ukázalo, že koncentrace 15 µg/ml je příliš malá pro použitou intenzitu magnetů (28, 24 mT) ve vzdálenosti 10 mm. U permanentního magnetu ve vzdálenosti 10 mm je intenzita magnetického pole je 28,7 mT (viz kapitola 6.3.1) „statického magnetu“ je průměr reagujících buněk 5 %, u „kmitavého magnetu“ 22,3 %. V případě koncentrace 50 µg/ml reagoval větší počet buněk na „statický magnet“ – 70,2 %, na „kmitavý magnet“ – 99,3 %.

U elektromagnetu byly zkoušeny nejenom různé koncentrace ale i nastavení výkonu magnetu. Na začátku byl jeho výkon nastaven na maximum (napětí 22,8 V) a stejně jako u permanentního magnetu byly provedeny dva testy („statický magnet“ „kmitavý magnet“). Očekávalo se, že výsledky budou podobné výsledkům permanentního magnetu, protože ve vzdálenosti 10 mm intenzita elektromagnetu na maximálním výkonu podobná intenzitě permanentního magnetu a činí 24,7 mT (rozdíl 4 mT). Ukázalo se ale, že u elektromagnetu jsou buňky přitahovány mnohem hůře Při použité koncentraci 15 µg/ml u testu „statický magnet“ – 0,34 %, „kmitavý magnet“ – 0,17%, a když koncentrace nanočástic v buňkách byla 50 µg/ml u „statického magnetu“ – 21,8 %, u „kmitavého magnetu“ – 60,8 %. Následně byl

výkon magnetu snižen na 50 % (napětí 11,5 V) a měření se zapakovalo. Podle předpokladu byly výsledné hodnoty nižší než při maximálním výkonu. Všechny výsledky jsou znázorněny v Tabulka 2, sloupec „počet senzitivních buněk“ znázorňuje průměrný počet buněk, které zareagovaly na permanentní magnet nebo elektromagnet.



Obrázek 38: Fibroblasty označené MNPs o koncentraci 15 µg/ml po vložení permanentního magnetu ve vzdálenosti 10 mm od jamky s buňkami. Zvětšení 10x. Kamera PixeLINK PL-A662. Mikroskop Olympus IX-73.

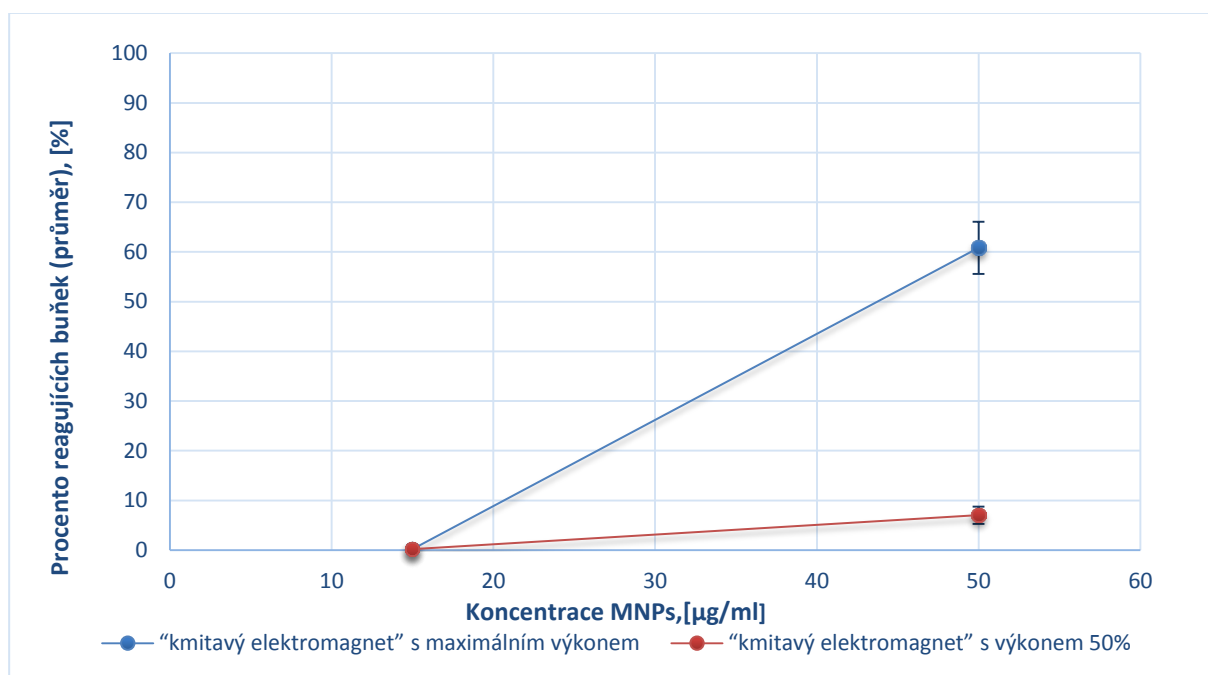


Obrázek 39: Fibroblasty označené MNPs o koncentraci 50 µg/ml po vložení permanentního magnetu ve vzdálenosti 10 mm od jamky s buňkami. Zvětšení 10x. Kamera PixeLINK PL-A662. Mikroskop Olympus IX-73.

Tabulka 2: Odezva označených buněk na magnetické pole

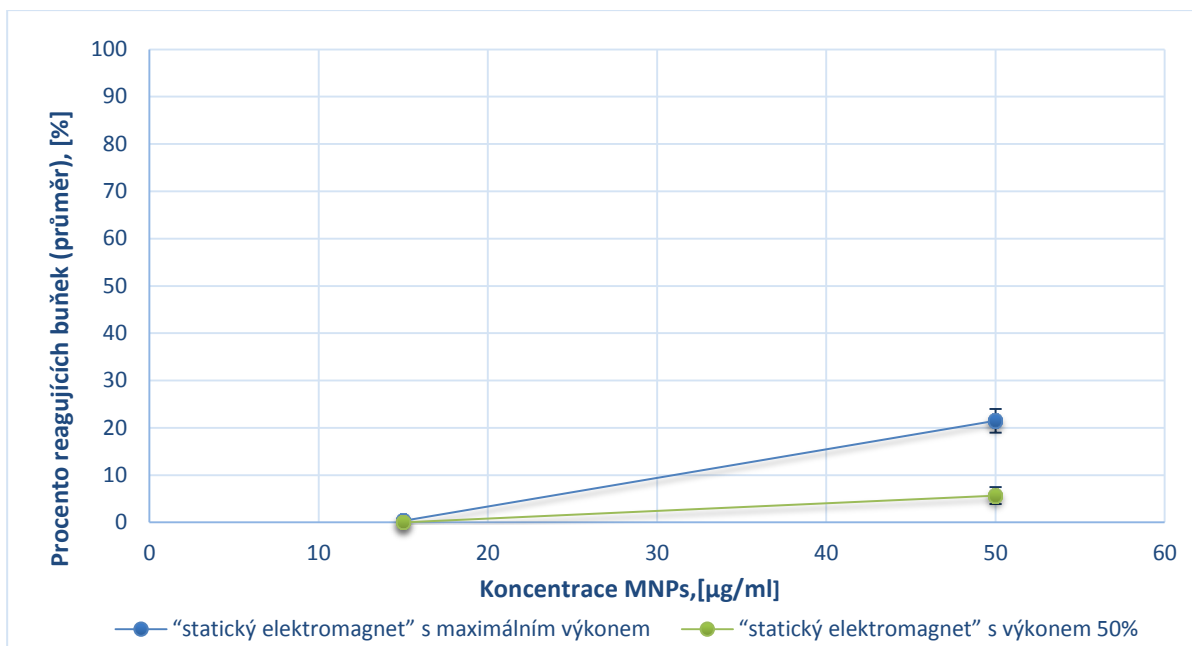
	Neodymový magnet		Elektromagnet			
	Počet senzitivních buněk		Počet senzitivních buněk (maximální výkon magnetu)		Počet senzitivních buněk (50% výkon magnetu)	
Koncentrace MNPs, [µg/ml]	50	15	50	15	50	15
„Statický magnet“	70	5	21	0	5	0
„Kmitavý magnet“	99	22	60	0	7	0

Bylo provedeno statistické hodnocení získaných výsledků. Byly porovnávány hodnoty: „statický elektromagnet” s maximálním výkonem a „statický elektromagnet” s výkonem 50 % (viz Obrázek 41), „kmitavý elektromagnet” s maximálním výkonem a „kmitavý elektromagnet” s výkonem 50 % (viz Obrázek 40), „kmitavý permanentní magnet” a „kmitavý elektromagnet” s maximálním výkonem (viz Obrázek 42), „statický permanentní magnet” a „statický elektromagnet” s maximálním výkonem (viz Obrázek 43). Z výsledků je vidět, že v případě koncentrace 15 $\mu\text{g/ml}$ reagoval na magnet velmi malý počet buněk, a proto statistický test v Microsoft Excel byl počítán na buňkách označených nanočásticemi o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, byl zvolen t-test (Studentův t-test). Ukázalo se, že u všech porovnaných hodnot je významný rozdíl. Při porovnání výsledků: „kmitavý elektromagnet” s maximálním výkonem a „kmitavý elektromagnet” s výkonem 50 % je p-hodnota menší než 0,0001 a rozdíl je považován za statisticky vysoce významný.



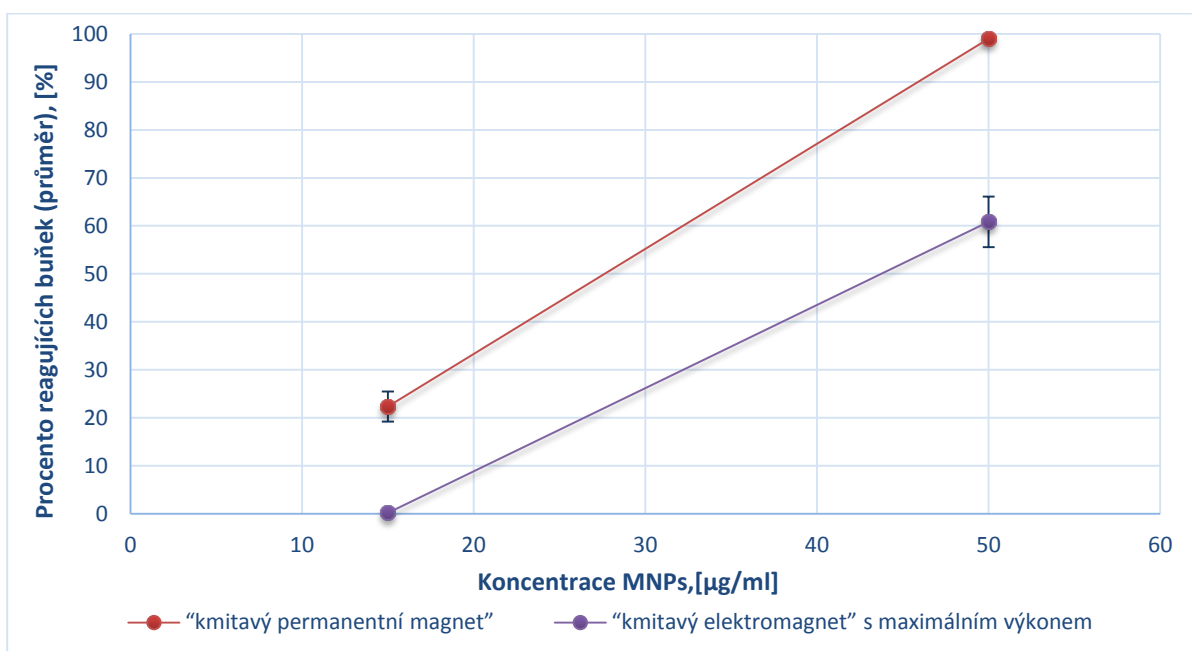
Obrázek 40: Procento reagujících buněk při použití „kmitavého elektromagnetu” s maximálním výkonem a polovičním. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p < 0,0001$

U testu „statický elektromagnet” s maximálním výkonem a „statický elektromagnet” s výkonem 50 % je p-hodnota 0,0002 a rozdíl je považován za statisticky vysoce významný.



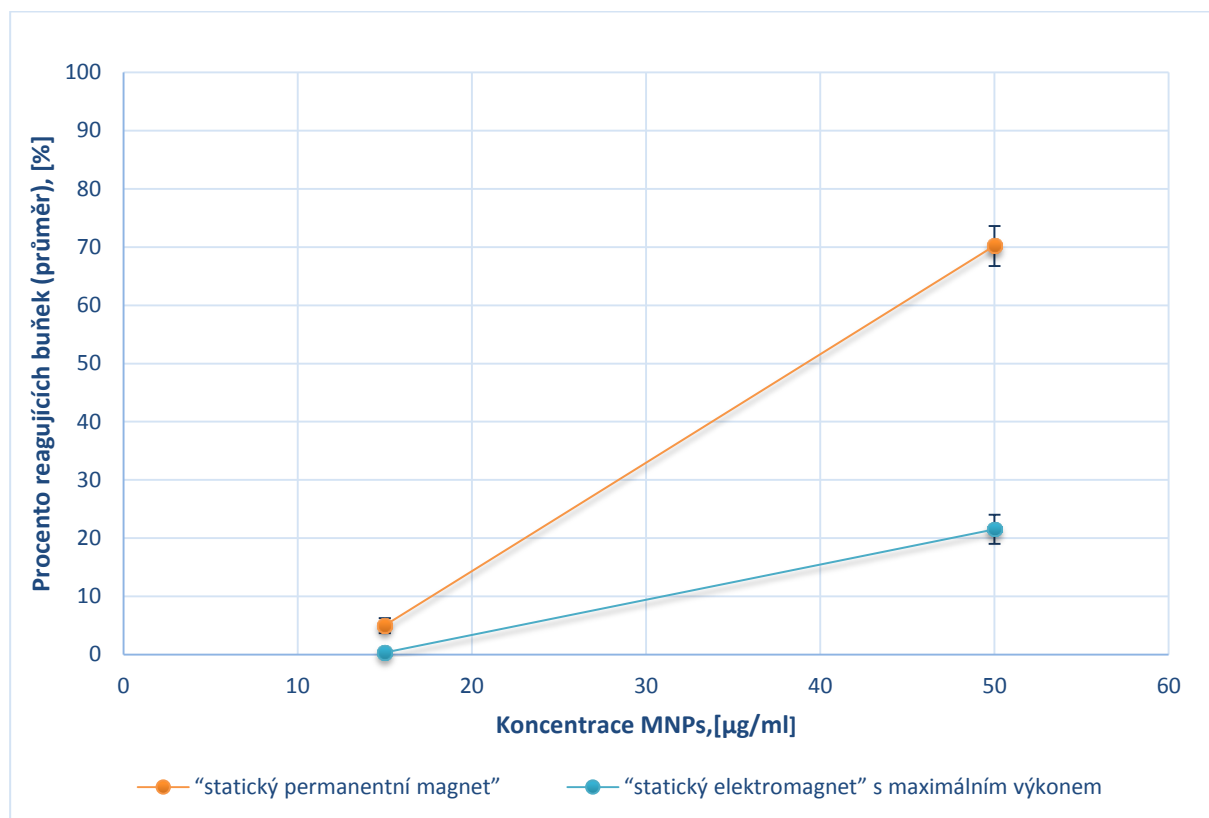
Obrázek 41: Procento reagujících buněk při použití „statického elektromagnetu“ s maximálním výkonem a polovičním. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p=0,0002$

Porovnání výsledků: „kmitavý permanentní magnet“ a „kmitavý elektromagnet“ s maximálním výkonem, p-hodnota je menší než 0,0001 – rozdíl je považován za statisticky vysoce významný.



Obrázek 42: Procento reagujících buněk při použití „kmitavého permanentního magnetu“ a „kmitavého elektromagnetu“ s maximálním výkonem. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p<0,0001$

U výsledků „statický permanentní magnet“ a „statický elektromagnet“ s maximálním výkonem je p-hodnota menší než 0,0001 a tento rozdíl je považován za statisticky vysoce významný.



Obrázek 43: Procento reagujících buněk při použití „statického permanentního magnetu“ a „statického elektromagnetu“ s maximálním výkonem. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p < 0,0001$

6.7. Příprava průtokové komory

Pro experiment bylo potřeba připravit: vodní lázeň pro uchování buněk, optickou techniku pro záznam přežívání a pohybů buněk, magnet respektive elektromagnet (u elektromagnetu byly postupně vyvíjeny a testovány dva typy elektronických regulátorů).

Pro přípravu průtokové komory byly testovány dva typy komerčních, pomalu tuhoucích silikonových polymerů: Lukopren N 1000 a Sylgard 184.

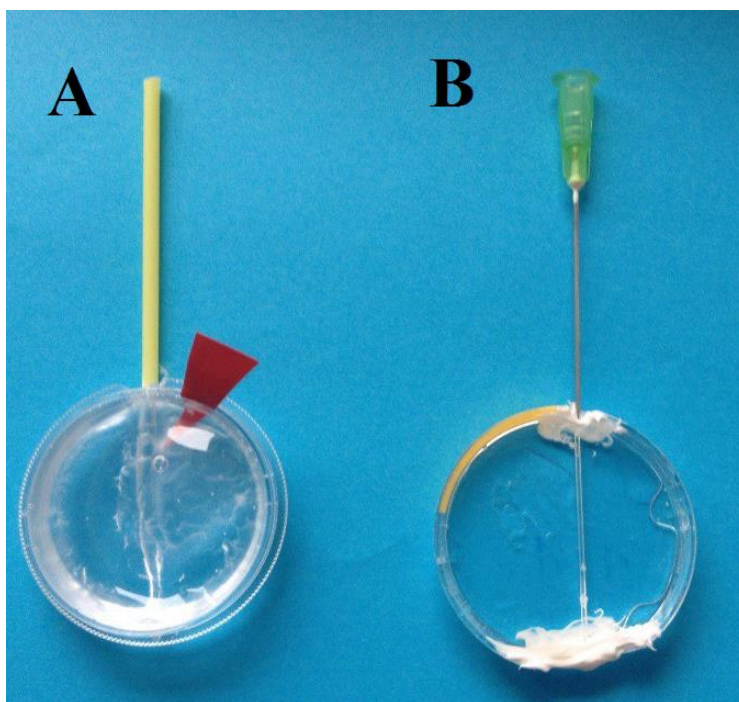
Příprava polymeru 1 spočívala v tom, že do zkumavky byl namíchán prepolymer Lukopren N 1000 a katalyzátor Lukopren N v poměru 7:1. Polymer byl zamíchán a zalit (tloušťkou 4 mm) do plastové misky s vloženou tyčinkou o tloušťce tyčinky 3 mm. Vytvrzení směsi probíhalo dle doporučení výrobce při pokojové teplotě 24 hodiny.

Polymer 2, tj. Sylgard 184, se skládá ze dvou složek: prepolymer a vytvrzovacího

činidla. Tyto dvě složky byly smíchané v objemovém poměru 10:1 a pečlivě promíchané. Připravená směs byla odlita do formy s vloženou jehlou o tloušťce 0,8 mm. Forma s polymerem 2 byla dle doporučení výrobce vložena na 10 hodin do sušičky s teplotou 37 °C.

6.7.1. Výsledky

Po vytvrdnutí byly oba odlitky porovnány a otestovány jejich optické vlastnosti. Polymer 1 má špatné optické vlastnosti již při prvním pohledu bez mikroskopu, obsahuje bubliny. Materiál není ideálně tuhý, ve vnitřní části zůstává téměř tekutý a vnitřní tunel je po vytažení insertu nerovný a bortí se (viz Obrázek 44A). Polymer 2 má neporušený tunel po vytažení insertu (jehly), materiál je homogenní, nedeformuje optický svazek (viz Obrázek 44B).



Obrázek 44: *A: Ukázka průtokové komory z polymeru Leukopren. B: Ukázka průtokové komory z polymeru Sylgard.*

Pro detailnější kontrolu optických vlastností polymeru 2 byly do průtokové komory pomocí jehly přidány buňky a bylo testováno jejich zobrazení mikroskopem (Olympus IX 73). Nejprve bylo ověřeno, že tloušťka polymeru je vyhovující a buňky uvnitř tunelu lze zaostřit jak objektivem 10x tak objektivem 20x. Na Obrázek 45 lze vidět, že tunel není porušen a materiál je homogenní, plně transparentní a obraz pravoúhlých buněk není deformován oproti obrazu na planárním mikroskopickém sklíčku.

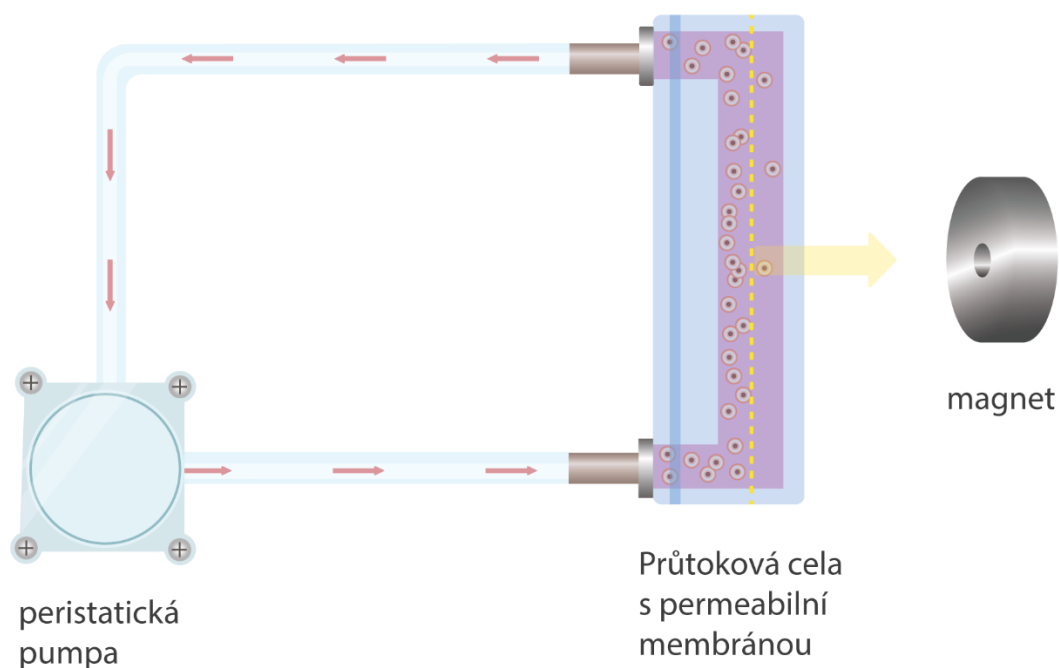


Obrázek 45: Mikrokapilára vytvořená v transparentním bločku z materiálu Sylgard. Na fotografii je mikrokapilára naplněná tekutinou s plovoucími buňkami (použity kardiomyocyty – obdélníkový tvar o průměrné velikosti 150 μm). Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.

Následně byla otestována i propustnost polymeru 2 pro specifické vlnové délky (excitační paprsek 490 nm a fluorescenční světlo 520 nm emitované barvivem Calcein).

6.8. Test migrace buněk z fluidní komory

Pomocí polymeru Sylgard 184 byla odlita speciální průtoková komora (příprava viz kapitola 6.7), do jejíž blízkosti lze umístit magnet nebo elektromagnet (viz Obrázek 46). Komora má 3 cm dlouhý tunel, jehož stěna ve střední části není nepropustná, ale tvoří ji permeabilní silikonová membrána (sítka s otvory 100 μm). Buňky protékají komorou danou nastavenou rychlostí a při protékání v okolí severního pólu magnetu jsou vychylovány směrem k němu. Část buněk je natolik vychýlena, že dochází k jejich přechodu za membránu. Celkový objem kapaliny v průtokové cele a ve spojovacích hadičkách je 3 ml, což přibližně představuje objem krevního řečiště potkana. Do nosné kapaliny (médiu DMEM) bylo před spuštěním pumpy injektováno 2000 buněk označených nanočásticemi. Pumpa byla spuštěna s rychlostí 0,4 RPM (otáček/min), rychlost v proudění v průtokové cele byla 1,0 cm/s, což je srovnatelná rychlost s reálným stavem v kapilárách savců nebo člověka. Pumpa byla zastavena po 10 cyklech (přepumpování 10x3 ml kapaliny) a následně po 50 cyklech. V těchto časech bylo spočítáno množství buněk, které prošly permeabilní membránou směrem k magnetu. Počítání se provádělo pomocí Bürkerovy komůrky a mikroskopu Olympus IX-73.



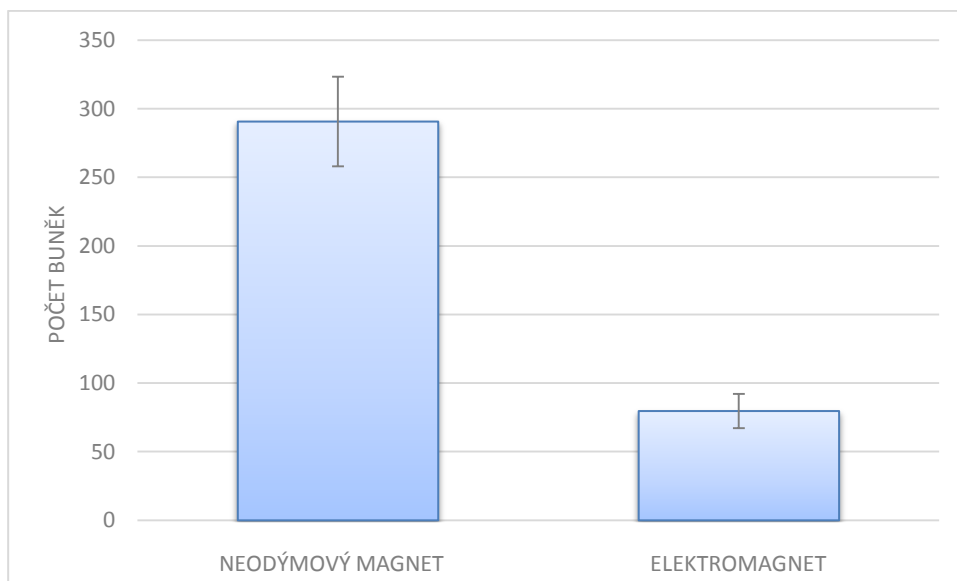
Obrázek 46: Migrace buněk fluidní komorou s permeabilní membránou.

6.8.1. Výsledky

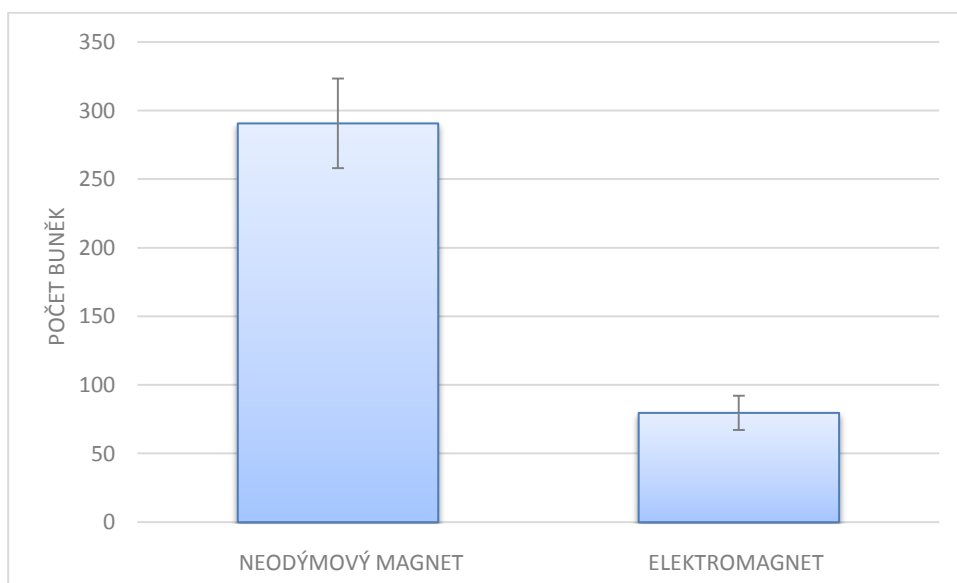
Bylo využito dvou magnetů – permanentního magnetu a elektromagnetu s potenciometrickou regulací na maximálním výkonu (vstupní napětí 22,8 V). U každého z magnetů bylo provedeno šest měření: tři po deseti cyklech a tři po padesáti cyklech. V Tabulka 3, na Obrázek 47 a Obrázek 48 jsou znázorněny výsledky experimentů.

Tabulka 3: Počet buněk, které vlivem magnetického pole prošly permeabilní membránou směrem k magnetu

	Neodymový magnet		Elektromagnet	
Počet cyklů	10	50	10	50
Počet buněk	320	835	74	210
	245	748	68	140
	307	817	97	190
Průměr	290	800	79	180
Směrodatná odchylka	± 32	± 37	± 12	± 29



Obrázek 47: Porovnání množství buněk, které vlivem magnetického pole prošly permeabilní membránou po 10 cyklech. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.



Obrázek 48: Porovnání množství buněk, které vlivem magnetického pole prošly permeabilní membránou po 50 cyklech. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.

Během experimentů bylo zjištěno, že při používání permanentního neodymového magnetu prošlo mnohem více buněk permeabilní membránou (10 cyklů – 14 %, 50 cyklů – 40 %) než při použití elektromagnetu (10 cyklů – 3,95 %, 50 cyklů – 9 %).

Diskuze

Literární rešerše ukázala, že magnetické přitahování transplantovaných buněk nacházejících se uvnitř krevního oběhu pacienta, je poměrně nová a málo prozkoumaná metoda, která může mít velký klinický přínos. Pokud chceme z transplantované buňky vytvořit buňku, která bude dobře reagovat na magnetické pole a bude ji možno nasměrovat a udržet v určitých částech těla, pak je nutno do buňky vpravit určité množství feromagnetické látky. V této bakalářské práci byly využity zakoupené částice oxidu železa, typ FeNV-R o velikosti 20 nm.

Hlavní problémy, které zatím zpomalují aplikaci těchto metod pro zefektivnění transplantací a uchycení buněk jsou:

- 1) nedořešená biokompatibilita a sterilita většiny feromagnetických nanočástic,
- 2) možný negativní vliv částice na vitalitu buňky, pokud je rozkmitána nebo zahřáta magnetickým polem,
- 3) velmi málo kvantitativních informací o celkových silách přitahujících jednotlivé buňky při průtoku kolem magnetu nebo elektromagnetu.

K vyjasnění těchto problémů měly směřovat i cíle bakalářské práce, které byly zaměřeny zejména na detekci pohybu buněk označených magnetickými nanočásticemi vlivem magnetického pole generovaného dvěma typy magnetů: permanentním neodymovým magnetem a elektromagnetem. Nejprve bylo nutné odladit měřicí soustavu, jejímž základem byla kultivační miska obsahující buňky a mikroskop s kamerou. Pak bylo kvantifikováno kolik procent buněk je vůbec možno mírně vychýlit, pokud jsou ve statickém stavu v misce s kapalinou, a až závěrečná měření se u vybraných buněk soustředila na simulaci průtoku buněk tenkou kapilárou a měření počtu buněk, které je schopen magnet z tohoto proudu buněk vychýlit a protlačit za hranici cévy (simulace tzv. magnetem indukované migrace buněk do tkáně, která by výrazně měla zefektivnit některé buněčné a protinádorové terapie) [42].

Byla změřena intenzita magnetického pole těchto magnetů. Měření intenzity magnetického pole ve vzdálenosti kolem 10 mm, je důležité kvůli tomu, že pod povrchem reálné tkáně se zhruba v této hloubce se předpokládají cévy s buňkami, se kterými by mělo být magneticky manipulováno. U takové vzdálenosti intenzita magnetického pole permanentního magnetu i navrženého elektromagnetu činila 25–28 mT. Naproti tomu publikované parametry EMP (frekvence, magnetická indukce) a doba expozice používaná různými výzkumnými skupinami při simulaci záchytu buněk magnetem jsou poměrně rozmanité a nemají jasné důvody, proč jsou tyto konkrétní parametry zvoleny. Efektivní

záchyt buněk vždy závisí nejen na samotné intenzitě, ale též na množství magnetických částic v buňce. U testu značení buněk (viz kapitola 6.6) bylo stanoveno, že koncentrace 15 $\mu\text{g/ml}$ je příliš malá pro magnetické pole 20–30 mT. Buňky označené MNPs o takovéto koncentraci se nebyly schopny pohybovat směrem k magnetu. Avšak koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ postačuje k tomu, aby buňky označené MNPs byly přitahované magnetickým polem o síle 25–28 mT.

Úspěšné použití sinusového EMP se týkalo především elektromagnetického pole s parametry 1–5 mT, 10–50 Hz. Jediná studie s použitím sinusového EMP [32], ve kterém byla použita vyšší intenzita EMP (20 mT), neprokázala významný vliv na buňky. Nízkofrekvenční elektromagnetické pole a pulzní elektromagnetické pole mohou modifikovat iontové kanály. EMP může také ovlivňovat přenos signálu a mezibuněčnou komunikaci. Předpokládá se, že jeden z možných mechanismů vlivu EMP na buňky zahrnuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) v buňce. Nadměrná koncentrace ROS, jako jsou superoxidové anionty (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2), je považována za destruktivní buňky a vede k inhibici genové exprese. [31]

Aby tedy bylo možné sílu magnetického pole elektromagnetu regulovat byly sestaveny dva typy regulace: pulzní regulace (viz kapitola 6.4.1) a potenciometrická regulace (viz kapitola 6.4.2).

a. **Elektromagnet s pulzní regulací (střídavé magnetické pole)** se projevil jako méně vhodný k účelům použití na živých buňkách. Na fibroblastech byly testované různé typy magnetického pole a při použití elektromagnetu s pulzní regulací byla viabilita menší než u ostatních. To může být způsobeno tím, že na kovových nanočásticích se při zapínání a vypínání magnetického pole mohou indukovat vířivé proudy, které teoreticky mohou nanočástice hodně zahřát a následně toto teplo může buňku poškodit. Fenomény indukčního ohřevu feromagnetických a vodivých materiálů se objevují, když jsou tyto materiály vystaveny střídavému elektromagnetickému poli pracujícímu v kmitočtovém rozsahu kilohertz (kHz) až megahertz (MHz), a jsou založeny na indukovaných vířivých proudech a magnetických polarizačních účincích [32].

b. **Elektromagnet s potenciometrickou regulací (statické magnetické pole)** se projevil jako vhodnější. Viabilita se pohybovala kolem 94 %. Procentuální výsledky záchytu byly však i při stejné intenzitě 25 mT, nižší než u permanentního magnetu (94 % versus 96 %).

U testu migrace buněk, když buňky byly umístěny ve fluidní komoře a byly vychytávané magnetickým polem přes permeabilní membránu. Permanentní magnet opět způsobil vyšší záchyt než elektromagnet (elektromagnet po 50 cyklech přitáhl 9 % buněk, permanentní magnet po 50 cyklech přitáhl 40 % buněk).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo přinést stručný souhrn publikací z oblasti magnetem regulované adheze buněk a na experimentální aparatuře sledovat pohyb buněk označených magnetickými nanočásticemi vlivem magnetického pole, následně zhodnotit, zda navržená metodika (typ buněk a nanočástic, koncentrace použitá pro značení) a nastavení magnetů bude možno principiálně použít pro atrakci a zkoncentrování buněk v reálném organismu. Bylo nutné nejdříve otestovat, zda jsou vůbec buňky označené magnetickými nanočásticemi přitahovány magnetickou silou magnetu. Při počátečních experimentech byl použit neodymový magnet a kardiomyocyty. Tyto velké buňky lze snadno vizualizovat a velmi dobře sledovat jejich pohyb. Na začátku byly buňky označeny magnetickými částicemi FeNV-R. Následně ve vzdálenosti 10 mm od označených buněk byl vložen neodymový magnet. Testováním bylo zjištěno, že označené buňky jsou přitahovány magnetickým polem magnetu (viz kapitola 6.2). V následujících experimentech jsme se zaměřili na značení buněk menších, reálně používaných pro transplantace.

Další část práce se zaměřila na charakteristiku magnetického pole neodymového magnetu a elektromagnetu. Nejprve byla změřena intenzita magnetického pole neodymového magnetu. Měření se provádělo ve vzdálenosti 5 až 10 mm. Ve vzdálenosti 10 mm je intenzita magnetického pole neodymového magnetu je 28,7 mT a ve vzdálenosti 5 mm – 71 mT. Dále následovalo měření intenzity magnetického pole elektromagnetu. Cílem bylo dosáhnout podobných hodnot, jakých bylo dosaženo u permanentního magnetu. Magnet byl nastaven na maximální protékající proud a intenzita magnetického pole ve vzdálenosti 10 mm činila 24,7 mT, což skoro odpovídá intenzitě magnetického pole permanentního magnetu ve stejné vzdálenosti. Tímto byly splněny body č. 1 a 2 ze zadání práce.

Následovalo splnění bodu č. 3 bakalářské práce tj. seznámení se s vhodnými kamerami kompatibilními s používaným mikroskopem a finalizace aparatury pro záznam polohy buněk a jejich vychýlení po aplikaci magnetického pole. Bylo zjištěno, že nanočásticemi značené buňky jsou poměrně kontrastní a postačuje k jejich snímání kamera, která má také výhodu poměrně dobrého datového toku (bit rate, množství digitálních dat, které byli přenesené za jednotku času). Buňky byly připravené ve dvou variantách, u nichž se lišil obsah železitých částic v cytoplazmě, první varianta buněk byla připravena inkubací buněk v kultivačním médiu s přídavkem 15 μg nanočástic na 1 ml média, druhá varianta byla připravena inkubací buněk v kultivačním médiu s přídavkem 50 μg nanočástic na 1 ml média. Po 12h inkubaci a opláchnutí buněk se sledovalo kolik buněk zareaguje na magnetické

pole. K tomuto účelu byl použit permanentní magnet, elektromagnet s maximálním výkonem a se sníženým výkonem na 50 %. Bylo zjištěno, že při téměř stejné intenzitě magnetického pole permanentního magnetu a elektromagnetu se reakce buněk liší. V případě neodymového magnetu reagovalo mnohem více označených buněk na magnet (výsledky pro koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$ byly u neodymového „kmitavého magnetu“ – 99 %, elektromagnetu – 60 %).

V rámci realizace bodu č. 4 zadání bakalářské práce následoval pokus o výrobu průtokové mikrokapiláry ze silikonového polymeru tak, aby bylo možno průtok buněk dobře snímat mikroskopem a zaznamenat na kameru. Postupně byly použity dva materiály. Lukopren N 1000 se ukázal jako nepříliš vhodný, jako alternativa předchozího polymeru byl zvolen silikonový polymer Sylgard 184. Ve výsledku měl dobré optické vlastnosti, neobsahoval bubliny a byl homogenní. Z tohoto polymeru byla vytvořena fluidní komora, která ve střední části měla permeabilní membránu. Na této komoře bylo testováno zachycení buněk magnetickým polem neodymového magnetu a elektromagnetu. Označené buňky zase byly mnohem lépe přitahované neodymovým magnetem. Dle bodu zadání 4 a 5 měly být k numeraci zachycených buněk použity kamery a počet měl být vyhodnocován na základě analýzy obrazu trajektorií buněk. Při praktických testech se však kamery a zejména dostupné objektivy ukázaly, jako nevhodné pro zachycení těchto dějů v trojrozměrné kapiláře a zachycené buňky byly proto počítány ne průběžně z videozáznamu ale jako suma pomocí zaostření objektivu na kanál „za membránou“ po určitém počtu fluidních cyklů a kontrolní spočítání proběhlo následně i pomocí Bürkerovy komůrky.

Další analýzy a modifikace elektromagnetu před testy *in vivo* budou tedy nezbytné. Každopádně ale tato data naznačují, že principiálně je metoda magnetického vychylování buněk reálně použitelná. Testovaná metodika a parametry magnetického pole se ukázaly jako vhodné: použité částice a metoda značení se ukázala jako bezpečná pro viabilitu buněk a nejméně u jednoho typu magnetu došlo k významnému zachycení transplantovaných buněk protékajících ve vzdálenosti 10 mm pod povrchem tkáně.

Literatura

- [1] PAN, Yue, Xuewen DU, Fan ZHAO a Bing XU. Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells. *Chemical Society Reviews* [online]. 2012, 41(7), 2912- [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1039/c2cs15315g. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs15315g>
- [2] LU, An-Hui, E. L. SALABAS a Ferdi SCHÜTH. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, 46(8), 1222-1244 [cit. 2016-12-26]. DOI: 10.1002/anie.200602866. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>
- [3] CONTRERAS, Maria, Rachid SOUGRAT, Amir ZAHER, Timothy RAVASI a Jurgen KOSEL. Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 2141- [cit. 2017-05-23]. DOI: 10.2147/IJN.S77081. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/non-chemotoxic-induction-of-cancer-cell-death-using-magnetic-nanowires-peer-reviewed-article-IJN>
- [4] WALKER, Jearl a David HALLIDAY. *Fundamentals of physics*. 9th ed., extended. Hoboken, NJ: Wiley, c2011. Chapter 28. ISBN 9780470564738.
- [5] GRIFFITHS, David J. *Introduction to electrodynamics*. 3rd ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, c1999. Chapter 6.1. ISBN 013805326X.
- [6] National high magnetic field laboratory: Permanent Magnet [online]. [cit. 2016-11-04]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/about/maglab-dictionary/permanent-magnet>
- [7] MYERS, H. P. *Introductory solid state physics*. 2nd ed. London: Taylor & Francis, 1997, p. 405-420. ISBN 0-7484-0659-x.
- [8] HyperPhysics: Electromagnet [online]. [cit. 2016-11-04]. Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/magnetic/elemag.html#c5>
- [9] Encyclopedia Britannica: Solenoid [online]. [cit. 2016-11-04]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/solenoid-electronics>
- [10] Elektro časopis pro elektrotechniku: Umíme správně spočítat solenoid s jádrem? [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://www.odbornecasopisy.cz/elektro/casopis/tema/umime-spravne-spocitat-solenoid-s-jadrem--13125>
- [11] JILES, David. *Introduction to magnetism and magnetic materials*. 2nd ed. London: Chapman and Hall/CRC, 1998. ISBN 0412798603.

- [12]** LEPIL, Oldřich a Přemysl ŠEDIVÝ. Fyzika pro gymnázia. 6. vyd. Praha: Prometheus, 2010. ISBN 978-80-7196-385-1.
- [13]** Electronics Tutorials: Hall Effect Sensor [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z: <http://www.electronics-tutorials.ws/electromagnetism/hall-effect.html>
- [14]** POPOVIĆ, R. S. Hall effect devices. 2nd ed. Philadelphia: Institute of Physics Pub., c2004. Sensors series. ISBN 0750308559.
- [15]** Haddab, Y., Mosser V., Lysowec M., Suski J., Demeus L., Renaux C., Adriensen S., Flandre D.: Low-noise SOI Hall devices, Proc. SPIE. Vol. SPIE-5115, pp. 196- 203. May 2003
- [16]** National Institute of Standards and Technology: The Hall Effect [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <https://www.nist.gov/pml/engineering-physics-division/hall-effect>
- [17]** HALL EFFECT SENSING AND APPLICATION: Hall Effect Sensing [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: http://sensing.honeywell.com/index.php?ci_id=50371
- [18]** Automatizace: Integrované AMR senzory magnetického pole [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://automatizace.hw.cz/integrované-amr-senzory-magnetického-pole>
- [19]** Automatizace: GMR senzory mag. pole - 1. díl - princip a struktura [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://automatizace.hw.cz/gmr-senzory-mag-pole-1-díl-princip-a-struktura>
- [20]** Automatizace: TMR – Tunelová magnetoresistence – 1. díl - princip [online]. [cit. 2016-11-05]. Dostupné z: <http://automatizace.hw.cz/tmr-tunelová-magnetoresistence-1-díl-princip>
- [21]** WEI, CHEN, Hebai SHEN, Xingyu LI, Nengqin JIA a Jianming XU. Synthesis of immunomagnetic nanoparticles and their application in the separation and purification of CD34+ hematopoietic stem cells. Applied Surface Science [online]. 2006, 2006(4), 1762–1769 [cit. 2016-11-22]. ISSN 0169-4332. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433206002571>
- [22]** KIM, Jeong Ah, Hong Jai LEE, Hyun-Jae KANG a Tai Hyun PARK. The targeting of endothelial progenitor cells to a specific location within a microfluidic channel using magnetic nanoparticles. Biomedical Microdevices [online]. 2009, 11(1), 287-296 [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1007/s10544-008-9235-y. ISSN 1387-2176. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10544-008-9235-y>
- [23]** KYRTATOS, Panagiotis G, Pauliina LEHTOLAINEN, Manfred JUNEMANN-RAMIREZ, et al. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury. JACC: Cardiovascular Interventions [online]. 2009(8), 794–802 [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936879809003525>
- [24]** Scientifica: Olympus IX73 [online]. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:

<http://www.scientifica.uk.com/products/olympus-ix73>

[25] SACKMANN, Eric K., Anna L. FULTON a David J. BEEBE. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* [online]. 2014-3-12, 507(7491), 181-189 [cit. 2016-12-25]. DOI: 10.1038/nature13118. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature13118>

[26] WONG, leong a Chih-Ming HO. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics* [online]. 2009, 7(3), 291-306 [cit. 2016-12-25]. DOI: 10.1007/s10404-009-0443-4. ISSN 1613-4982. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10404-009-0443-4>

[27] Andor: iXon Ultra 897 [online]. [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <http://www.andor.com/scientific-cameras/ixon-emccd-camera-series/ixon-ultra-897>

[28] Andor: Zyla 5.5 sCMOS [online]. [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <http://www.andor.com/scientific-cameras/neo-and-zyla-scmos-cameras/zyla-55-scmos>

[29] PixeLINK: PL-A662 [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://pixelink.com/product/pl-a662/>

[30] ELECTRONICS PROJECTS FOCUS: What is MOSFET with Working? MOSFET as a Switch [online]. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <https://www.elprocus.com/mosfet-as-a-switch-circuit-diagram-free-circuits/>

[31] J, Yan, Dong L, Zhang B a Qi N. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. DOI: 10.3109/01676830.2010.505490.

[32] MAZIARZ, Aleksandra, Beata KOCAN, Mariusz BESTER, Sylwia BUDZIK, Marian CHOLEWA, Takahiro OCHIYA a Agnieszka BANAS. How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. , 1-10. DOI: 10.1186/s13287-016-0312-5.

[33] BAYERL, Thomas, Miro DUHOVIC, Peter MITSCHANG a Debes BHATTACHARYYA. The heating of polymer composites by electromagnetic induction – A review. DOI: 10.1016/j.compositesa.2013.10.024. ISBN 10.1016/j.compositesa.2013.10.024. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359835X13002996>

[34] KIM, Dong-Hyun, David E. NIKLES, Duane T. JOHNSON a Christopher S. BRAZEL. Heat generation of aqueously dispersed CoFe₂O₄ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2008, **320**(19), 2390-2396 [cit. 2017-05-23]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2008.05.023. ISSN 03048853. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885308006288>

[35] Molecular Biology of the Cell: Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family. 4th edition. New York: Garland Science. ISBN 0-8153-4072-9.

[36] Conrad [online]. [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.conrad.cz/elektromagnet-intertec-its-ms-3025-100-n-3-8-w.k502332>

[37] Arduino: ARDUINO IDE [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <https://arduino.cz/arduino-ide/>

[38] Arduino: CO JE TO ARDUINO? [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <https://arduino.cz/co-je-to-arduino/>

[39] MOSFET Driver Řadič 24V 5A (IRF520) [online]. [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: <http://www.santy.cz/data/file/schemata/SA0269-irf520.pdf>

[40] UGGERI, Jacopo, Rita GATTI, Silvana BELLETTI, Renato SCANDROGLIO, Roberto CORRADINI, Bianca MARIA ROTOLI a Guido ORLANDINI. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology*. 2004, 2000(122), 499–505. DOI: 10.1007/s00418-004-0712-y. ISSN 1432-119X.

[41] ZABLOTSKII, Vitalii, Tatyana POLYAKOVA, Oleg LUNOV a Alexandr DEJNEKA. How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), - [cit. 2017-05-23]. DOI: 10.1038/srep37407. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep37407>

[42] Klabusay, Martin, Josef Skopalík, and Jaroslav Meluzín CSc. "Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu." *Interní medicína pro praxi* 11.10 (2009): 452-457.

Seznam symbolů, veličin a zkratk

B – magnetická indukce

Tesla, [T] – jednotka magnetické indukce

AMR – Anisotropická Magnetická Resistance

GMR – Velká Magnetická Resistance

TNR – Tunelová Magnetická Resistance

MNP – Magnetická Nanočástice

EPC – Endoteliální progenitorová buňka

DMEM – médium

FBS – Fetální Bovinní Sérum

PDMS – Polydimethylsiloxan

EMP – Elektromagnetické pole

ROS – Reaktivní forma kyslíku

HGMF – magnetické pole s vysokým gradientem

Oersted, [Oe] – Jednotka intenzity magnetického pole

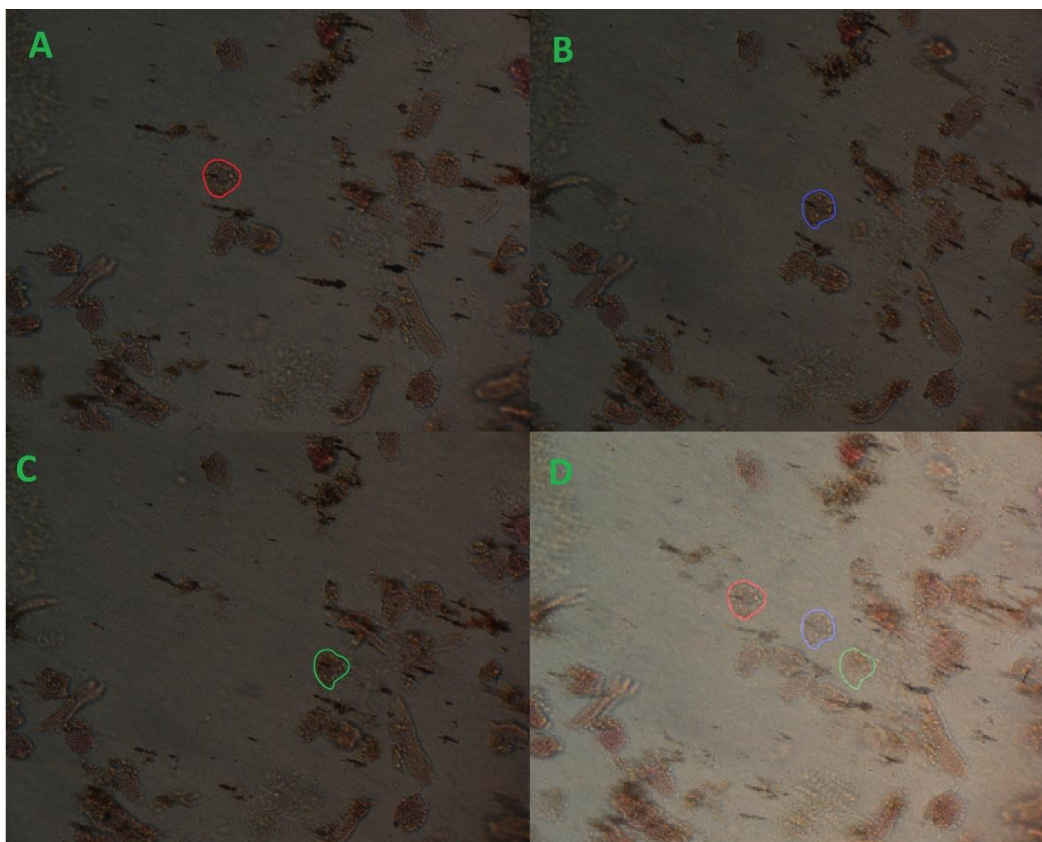
AMF – Střídavé magnetické pole

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zobrazení permanentního tyčového magnetu, kde S - jižní pól, N - severní pól a modré čáry - siločáry [1].....	2
Obrázek 2: Změna rozložení pólů při zlomení tyčového magnetu. S – severní pól, J – jižní pol.	3
Obrázek 3: Schéma solenoidu. Modré čáry – siločáry. B – magnetická indukce, l – délka solenoidu, I – proud procházející solenoidem, n – počet závitů [9]	4
Obrázek 4: Princip Hallova senzoru. Upraveno s využitím [12]	5
Obrázek 5: Porovnávání detekční oblasti AMR senzoru s detekční oblasti senzoru s Hallovým jevem. Černé čáry znázorňují siločáry magnetu. Upraveno s využitím [17].....	6
Obrázek 6: Princip funkce běžně vyráběných GMR senzorů (A = vodivá nemagnetická vrstva, B = vodivá magnetická vrstva, C = směr vstupu el. proudu, D = směr externího snímaného magnetického pole). Upraveno s využitím [18]	7
Obrázek 7: Směry magnetizace (paralelní, antiparalelní) u TMR senzorů.....	7
Obrázek 8: Rozdíl ve velikosti nanočástic a mikročástic. Nanočástice mohou vstoupit do buňky a mikročástice nemohou (nebo velmi složitě). Upraveno s využitím [1]	8
Obrázek 9: Imunomagnetická separace CD34 + hemopoetických kmenových buněk. Magnetické nanočástice se navazují na buňky CD34 + a po vložení magnetu se tak separují od ostatních buněk. Upraveno s využitím [1]	9
Obrázek 10: Mikrofluidní kanál s buňkami zanícenými magnetickými nanočásticemi uvnitř mikrofluidního kanálu. Po přiložení magnetu se buňky začínají shromažďovat v místě působení magnetu. [1].....	10
Obrázek 11: Lidské EPCs označené nanočásticemi se začínají časem hromadit v místě přiložení magnetu. Upraveno s využitím [22].....	11
Obrázek 12: Invertovaný mikroskop Olympus IX-73 [23].....	11
Obrázek 13: Kamera Andor iXon 897 [26]	12
Obrázek 14: Kamera Andor Zyla 5.5 [27].....	13
Obrázek 15: Kamera PixelINK PL-A662 [28].....	13
Obrázek 16: Schematické znázornění možných aplikací HGMP a intracelulárních efektorů. HGMP - magnetické pole s vysokým gradientem. Upraveno s využitím [41].....	15
Obrázek 17: Celkové zvýšení teploty během 15 minut při tvorbě tepla nanočásticemi CoFe ₂ O ₄ na různých magnetických polích (634, 507, 380, 254 a 127 Oe) při 266 a 231 kHz. Chybové úsečky představují standardní odchylku pro tři experimenty. Upraveno s využitím [40]	16
Obrázek 18: Schéma možného mechanismu buněčné smrti v důsledku interakce nádorových buněk s protáhlými nanočásticemi a následná aplikace nízkofrekvenčního magnetického pole. AMF – střídavé magnetické pole. Upraveno s využitím [41].....	17
Obrázek 19 : Postup značení kardiomyocytů magnetickými nanočásticemi FeNV-R a následná fixace paraformaldehydem.....	19
Obrázek 20: Označené buňky před aplikací magnetu (t ₀). Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.	20
Obrázek 21: Schematické znázornění kontroly inkorporace částic.....	20
Obrázek 22: Snímky kardiomyocytů v čase t ₀ - před vložení magnetu (červená barva), t ₁ - aplikace magnetu (modrá barva) a t ₂ - 30 sekund po aplikaci magnetu (zelená barva), šipka ukazuje směr pohybu buněk v magnetickém poli. Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73. Dodatečné přeložení obrazů pomocí softwaru Matlab.....	21
Obrázek 23: A: Měření magnetického pole neodymového magnetu pomocí přístroje Lake Shore 460 a Hallovy sondy. B: Schematické znázornění celé aparatury s mikroposuvným držákem.....	22
Obrázek 24: Elektromagnet [34].....	22
Obrázek 25: Měření magnetického pole elektromagnetu pomocí přístroje Lake Shore 460 a Hallovy sondy.	23
Obrázek 26: Měření síly magnetického pole neodymového magnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina Z)	24
Obrázek 27: Měření síly magnetického pole v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda	

umístěna ve výšce 5 mm od centra magnetu. Modrá tečka znázorňuje hodnotu ve vzdálenosti 0 mm po opakovaném měření.	25
Obrázek 28: Měření síly magnetického pole elektromagnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda umístěna ve výšce 10 mm od centra magnetu.	25
Obrázek 29: Měření síly magnetického pole elektromagnetu v závislosti na vzdálenosti (rovina X). Hallova sonda umístěna ve výšce 5 mm od centra magnetu.	26
Obrázek 30: Schéma zapojení elektromagnetu s pulzní regulací	27
Obrázek 31: Schéma zapojení elektromagnetu a regulátoru napětí.	28
Obrázek 32: Viabilita buněk v závislosti na generovaném magnetickém poli. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.	29
Obrázek 33: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na pohybující se magnet. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml	31
Obrázek 34: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na magnet vzdálený 10 mm. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml	31
Obrázek 35: Nastavení kamery PixeLINK PL-A662 během testu značení buněk. Na obrázku vpravo kruhovitě útvary jsou plovoucí fibroblasty.	32
Obrázek 36: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na magnet vzdálený 10 mm. Vpravo koncentrace MNPs 15 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 50 µg/ml	32
Obrázek 37: Schéma experimentu. Kontrola reakce buněk na pohybující se magnet. Vpravo koncentrace MNPs 50 µg/ml. Vlevo koncentrace MNPs 15 µg/ml	33
Obrázek 38: Fibroblasty označené MNPs o koncentraci 15 µg/ml po vložení permanentního magnetu ve vzdálenosti 10 mm od jamky s buňkami. Zvětšení 10x. Kamera PixeLINK PL-A662. Mikroskop Olympus IX-73.....	34
Obrázek 39: Fibroblasty označené MNPs o koncentraci 50 µg/ml po vložení permanentního magnetu ve vzdálenosti 10 mm od jamky s buňkami. Zvětšení 10x. Kamera PixeLINK PL-A662. Mikroskop Olympus IX-73.....	34
Obrázek 40: Procento reagujících buněk při použití „kmitavého elektromagnetu” s maximálním výkonem a polovičním. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p < 0,0001$	35
Obrázek 41: Procento reagujících buněk při použití „statického elektromagnetu” s maximálním výkonem a polovičním. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p = 0,0002$	36
Obrázek 42: Procento reagujících buněk při použití „kmitavého permanentního magnetu” a „kmitavého elektromagnetu” s maximálním výkonem. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p < 0,0001$	36
Obrázek 43: Procento reagujících buněk při použití „statického permanentního magnetu” a „statického elektromagnetu” s maximálním výkonem. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 6 experimentů. $p < 0,0001$	37
Obrázek 44: A: Ukázka průtokové komory z polymeru Leukopren. B: Ukázka průtokové komory z polymeru Sylgard.	38
Obrázek 45: Mikrokapilára vytvořená v transparentním bločku z materiálu Sylgard. Na fotografii je mikrokapilára naplněná tekutinou s plovoucími buňkami (použity kardiomyocyty – obdélníkový tvar o průměrné velikosti 150 µm). Zvětšení 20x. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.	39
Obrázek 46: Migrace buněk fluidní komorou s permeabilní membránou.....	40
Obrázek 47: Porovnání množství buněk, které vlivem magnetického pole prošly permeabilní membránou po 10 cyklech Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.	41
Obrázek 48: Porovnání množství buněk, které vlivem magnetického pole prošly permeabilní membránou po 50 cyklech. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku pro 3 experimenty.	41
Obrázek 49: A Kardiomyocyty pod mikroskopem před tím, než byl vložen magnet. B Kardiomyocyty v okamžiku vložení magnetu. C Kardiomyocyty po 30 s po vložení magnetu. D Kombinace snímků A, B, C pro znázornění pohybu buněk v čase v magnetickém poli neodymového magnetu. Zvětšení 20X. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.	53

Příloha



Obrázek 49: **A** Kardiomyocyty pod mikroskopem před tím, než byl vložen magnet. **B** Kardiomyocyty v okamžiku vložení magnetu. **C** Kardiomyocyty po 30 s po vložení magnetu. **D** Kombinace snímků A, B, C pro znázornění pohybu buněk v čase v magnetickém poli neodymového magnetu. Zvětšení 20X. Kamera Nikon D80. Mikroskop Olympus IX-73.