Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů

Bc. Hana Freislebenová

Biokompatibilita porézních NCD vrstev s neurony

Biocompatibility of porous NCD layers with neurons

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Mgr. Veronika Benson, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 05.01.2021

Podpis

Poděkování

Děkuji hlavně své školitelce RNDr. Mgr. Veronice Benson, Ph.D. za cenné rady, ochotu a její čas během celého projektu, a hlavně za trpělivost při psaní mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Neuhöferové za její pomoc a rady v průběhu experimentů. Děkuji také své rodině a svým přátelům za jejich podporu během celého studia.

Abstrakt

Nanodiamant je v současné době jeden z nejvíce zkoumaných materiálů v oblasti regenerativní medicíny v rámci studia léčby neuro-degenerativních onemocnění. Vzhledem k tomu, že v rámci takovéto léčby použitý materiál interaguje přímo s nervovou tkání, je třeba, aby byl biokompatibilní s primárními neurony, aby podněcoval adhezi neurálních buněk ke svému povrchu a aby buňky adherované k jeho povrchu regenerovaly.

V rámci této práce jsme hodnotili biokompatibilitu porézních borem dopovaných diamantových vrstev s kulturou primárních neuronů. Porovnali jsme také, jaký vliv na adhezi a prosperitu primární neuronální kultury má úprava diamantového povrchu potažením poly-D-lysinem (PDL). Zjistili jsme, že použitý nanodiamant je biokompatibilní s primární neuronální kulturou. Dále jsme došli k závěru, že povrch potažený PDL mírně zvyšuje míru adheze buněk k povrchu, ale na druhou stranu navozuje ve větší míře adhezi u gliových buněk, než je tomu u povrchu bez potažení PDL.

Klíčová slova: nanodiamant, biokompatibilita, adheze, neurony

Abstract

Nanodiamond is currently one of the most researched materials in the field of regenerative medicine in the study of treatment of neurodegenerative diseases. Due to direct interaction of this material with nerve tissue, it needs to be biocompatible with primary neurons. Furthemore, it is desirable for the used material to induce cell adhesion and stimulate the adherent cells to regeneration.

This work evaluates the biocompatibility of porous boron-doped diamond layers with the culture of primary neurons. We compared the effect of diamond surface treatment by poly-D-lysine (PDL) coating on the adhesion and prosperity of the primary neuronal culture. We found that the tested nanodiamond layers are biocompatible with the primary neuronal culture. We further conclude that the PDL coating slightly increases the rate of cell adhesion to the surface but on the other hand induces greater adhesion of glial cells than the surface without PDL coating.

Key words: nanodiamond, biocompatibility, adhesion, neurons

Obsah

1 Úvod 10

2 Literární přehled 11

2.1 Borem dopované diamantové elektrody 11

2.1.1 Syntéza diamantových filmů 11

2.1.2 Dopování diamantu 13

2.1.3 Povrchové úpravy dopovaných diamantových vrstev 14

2.2 Buněčná Adheze 16

2.2.1 Povrchové modifikace usnadňující buněčnou adhezi 16

2.2.2 Navození adheze za pomoci povrchových vlastností diamantového filmu 16

2.2.3 Adheze pomocí fragmentů extracelulární matrix 17

2.2.4 Navození adheze pomocí elektrostatických sil 19

2.2.5 Mezibuněčné spoje 19

2.3 Biokompatibilita 22

3 Cíle práce 25

4 Materiály 26

4.1 Chemikálie 26

4.2 Příprava roztoků 28

4.3 Média 28

4.4 Přístroje 29

5 Metody 30

5.1 Experimentální zvířata 31

5.2 Příprava diamantových vrstev 30

5.3 Metody izolace primárních neuronů 31

5.3.1 Izolace neuronů pomocí OptiPrep™ 31

5.3.2 Izolace neuronů pomocí perfúze srdce 33

5.3.3 Izolace časně postnatálních neuronů 34

5.4 Testy metabolismu buněk 35

5.4.1 Test viability pomocí ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WST-1) 35

5.4.2 Měření cytotoxicity laktát dehydrogenázy 35

5.5 Stanovení apoptózy buněk 36

5.6 Vitální barvení neuronů 37

5.6.1 Vizualizace pomocí CellTracker™ fluorescenční sondy 37

5.6.2 Barvení vitálních buněk pomocí CellROX® Deep Red 37

5.6.3 Vizualizace jader pomocí Hoechst 33342 38

5.7 Fixace buněk 38
5.8 Barvení fixovaných buněk 39
5.8.1 Barvení F-aktinových vláken pomocí Phalloidinu 39
5.8.2 Vizualizace buněk pomocí intracelulárních markerů 39
5.9 Kvantitativní analýza pomocí průtokové cytometrie (FACS) 40
5.10 Molekulárně biologické metody 41
5.10.1 Izolace RNA 41
5.10.2 Reverzní transkripce 43
5.10.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 43
6 Výsledky 45
6.1 Optimalizace izolace primárních adultních neuronů 45
6.2 Exprese TUB3, MAP2 a GFAP v buněčné kultuře 50
6.2.1 Stanovení metodou průtokové cytometrie 50
6.2.2 Vizualizace buněk exprimujících TUB3, MAP2 a GFA 51
6.3 Pokrytí plochy vzorku buňkami – odhad regenerace a adheze kultury 53
6.4 Měření prosperity buněk 57
6.4.1 Stanovení metabolismu mitochondrií 57
6.4.2 Stanovení cytotoxicity 58
6.4.3 Stanovení apoptózy 58
6.4.4 Měření buněčného oxidativního stresu 59
6.5 Stanovení exprese genů pro NF200, NENO2 a GFAP 62
7 Diskuze 64
8 Závěr 68
9 Seznam použité literatury 69

Seznam zkratek

BSA	hovězí sérový albumin
CMFDA	5-chlormethyl fluorescein diacetát
CVD	chemická depozice z plynné fáze (Chemical Vapor Deposition)
DMEM/F12	Dulbecco´s Modified Eagle Medium F-12
dNTPs	deoxyribonukleotid trisfosfát
ECM	extracelulární matrix
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	fluorescein diacetát
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
GPI	glykosilfosfatidylinositol
H342	Hoechst 33342
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HFCVD	chemická depozice z plynné fáze pomocí žhavého vlákna
HPHT	za vysokého tlaku a teploty (High-Pressure High-Temperature)
LDH	laktát dehydrogenáza
MAP2	protein asociovaný s mikrotubuly 2
MWCVD	chemická depozice z plynné fáze pomocí mikrovlnné plazmy
NCAM	neurální buněčná adhezní molekula
NCD	nanokrystalické diamantové vrstvy
NENO2	neuron specifická enoláza 2
NF200	neurofilament 200
PBDD	porézní borem dopovaný diamant
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDL	poly-D-lysin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium iodid
PLL	poly-L-lysin
PO	polyornitin
PSA	polysialová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku

RT	reverzní transkripce
TAE	Tris acetát-EDTA pufr
TBP	TATA-vazebný protein
TGN	transGolgi
TUB3	beta-3 tubulin
WST-1	ve vodě rozpustné tetrazoliové soli 1

1 Úvod

Diamanty jsou jedním z nejvíce slibných biomateriálů ve výzkumu na poli regenerativní medicíny díky vlastnostem, jako je extrémní mechanická a chemická odolnost, vysoká tepelná vodivost, optická transparentnost a široké okno chemického potenciálu ve vodném prostředí. Díky těmto vlastnostem se zdají být slibným materiálem pro intracerebrální sondy pro hlubokou mozkovou stimulaci, které se využívají např. v léčbě Parkinsonovi choroby. Ačkoli diamant je sám o sobě nevodič, elektrické vlastnosti mu lze propůjčit takzvaným dopováním v průběhu jeho syntézy. Takto upravený (dopovaný) diamant lze deponovat ve formě planárních nebo porézních filmů na podkladový materiál např. sklo. Vzrušivé buňky kultivované na (nejčastěji borem či dusíkem) dopovaných diamantových površích lze poté stimulovat pomocí elektrického proudu, či z jejich povrchu lze detekovat elektrický signál.

Vzhledem k tomu, že neuronální buňky nemají tendence adherovat na samotný diamant, je třeba, aby byl jeho povrch upraven tak, aby došlo ke zlepšení podmínek pro buněčnou adhezi. Možností, jak toho dosáhnout je několik a je proto třeba předem přesně vědět, jaká z metod je pro zkoumaný buněčný typ nejvhodnější.

Ve rámci výzkumu léčby různých neurodegenerativních onemocnění, jako je například Parkinsonova choroba, je žádoucí, aby povrch navozoval adhezi spíše u neuronů než u gliových buněk. V případě, že by na elektrodu ve větším množství adherovaly spíše astroglie než neurony, může dojít k odstínění elektrického signálu z elektrody a ke vzniku gliové jizvy. V současné době je tedy věnováno velké úsilí tomu, aby byl vyvinut materiál, který by byl mechanicky a chemicky extrémně odolný, vykazoval by elektrické vlastnosti, byl naprosto biokompatibilní s nervovou tkání a navozoval adhezi a stimuloval regeneraci spíše u neuronů než u gliových buněk.

2 Literární přehled

2.1 Borem dopované diamantové elektrody

Biomateriály hrají zásadní roli na poli moderní regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství, přičemž diamant je díky svým výjimečným fyzikálním a chemickým vlastnostem jeden z nejvíce zkoumaných materiálů v této oblasti. Diamantové elektrody jsou syntetizovány ve formě tenkých filmů, kde se vyskytují uhlíky odpovídající hybridizaci sp^3 se čtyřmi rovnoměrně rozloženými valenčními elektrony. Na nich jsou pomocí kovalentní vazby navázány vždy další čtyři atomy uhlíku se stejnou hybridizací a vytváří tak pravidelné oktaedry. (Yang *et al.* 2019) Přes všechny výhodné vlastnosti, které diamanty vykazují, pro jejich použití pro elektrochemické účely je třeba je z důvodu jejich nevodivosti dopovat jiným atomem. K tomuto účelu je nejčastěji využíván bor. (Kowalska *et al.* 2014) Takto vytvořené elektrody se vyznačují extrémní mechanickou odolností a chemickou stabilitou, nízkou kapacitou elektrické dvojvrstvy a širokým potenciálovým oknem. Borem dopované diamantové elektrody jsou nejčastěji syntetizovány ve formě planárních filmů, avšak jejich potenciál pro využití v praxi se zvýší za předpokladu, že dojde k vyvinutí univerzální, jednoduché a reprodukovatelné metody, která povede ke změně morfologie povrchu a tím ke zvětšení využitelné plochy elektrody. Zvětšením plochy elektrody dojde ke zvýšení její senzitivity při detekci elektrické aktivity neuronů. (Krůšek *et al.* 2018)

2.1.1 Syntéza diamantových filmů

Dlouhá léta vědci usilovali o vytvoření metody, pomocí které by bylo možné v laboratorních podmínkách syntetizovat umělé diamanty. Jako první byla v roce 1955 popsána skupinou kolem Dr. F. P. Bundyho z výzkumné laboratoře General Electric Company metoda high-pressure high-temperature (HPHT) díky níž byl za působení vysokého tlaku a teploty grafit konvertován na diamant. (Bundy *et al.* 1955) Během této metody dochází v laboratorním prostředí k vytvoření podmínek, za kterých vznikají diamanty i v přírodě, tedy za vysokého tlaku a teploty. Grafit je vystaven tlaku dosahujícímu desítek tisíc atmosfér a zahřátý na teplotu přesahující 2000 kelvinů, vše se děje v přítomnosti vhodně zvoleného kovového katalyzátoru. Díky katalyzátoru je umožněno reakci provádět za nižších teplot a tlaku a také se tím výrazně urychluje celý proces přeměny. Tato metoda umožňuje syntézu

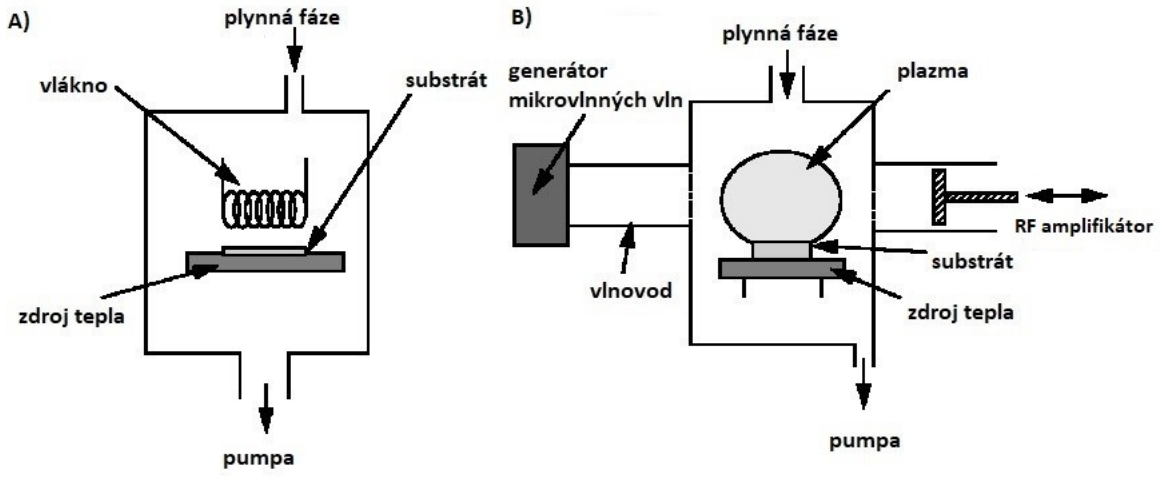
vysoce kvalitních diamantových krystalů bez příměsi nediamantových struktur jako je grafit nebo amorfní uhlík. Nicméně HPHT umožňuje syntézu diamantů pouze ve formě samostatných krystalů a nikoli ve formě v současnosti tolik žádaných filmů. (May 2000)

O dost slibnější, než HPHT je metoda chemické depozice z plynné fáze (CVD) (Obr.1). Během této metody je substrát vystaven působení směsi uhlovodíkových plynů. Vše probíhá v reakční komoře, kde je přesně kontrolovaný tlak a teplota. Aby se předešlo nežádoucímu vzniku vrstvy amorfního uhlíku na úkor diamantu, celý proces probíhá za vysoké teploty přesahující 700 °C. (May 2000) Výsledným produktem této metody je tenká vrstva diamantů na námi zvoleném substrátu. Podkladový substrát může být tvořený diamantem (přírodním anebo umělým) a jedná se tedy o homoepitaxiální růst diamantového filmu. V případě heteroepitaxiálního růstu je substrát nediamantového původu. Za tímto účelem se nejčastěji, vzhledem ke své strukturní podobnosti s diamantem a nízké ceně, používá křemík. (Musilova *et al.* 2009) Nicméně diamanty na nediamantovém substrátu spontánně nerostou, je proto potřeba na substrát nejdříve nanést nanodiamantové částice, které poslouží jako iniciační nukleační centra pro růst diamantového filmu. (Yang *et al.* 2019)

Plynná fáze pro CVD se skládá z uhlovodíku (nejčastěji metanu), který slouží jako zdroj uhlíku v nízké koncentraci s vodíkem. Před ukončením depozičního procesu dochází k zavádění vodíku do reakční komory, přičemž na povrchu filmu vzniká hydrofobní vodíková monovrstva. Tudíž povrch takzvaných *„as grown“* nanodiamantů je vždy H-terminovaný. Aby k reakci vůbec mohlo dojít, musí být na začátku procesu aktivována plynná fáze. Možností, jak aktivace plynné fáze dosáhnout je několik, nejčastěji se tak ovšem děje za pomoci plazmy (CVD pomocí mikrovlnné plazmy – MWCVD) či teploty (CVD pomocí žhavého vlákna – HFCVD). Aktivace par způsobí disociaci uhlíkových radikálů z prekurzorového plynu, které jsou poté důležité pro růst diamantu.

Během chemické depozice plynné fáze aktivované pomocí žhavého vlákna (HFCVD) dochází k zahřátí substrátu (nejběžněji tedy křemíku) pomocí zdroje tepla na teplotu přesahující 700°C. Několik milimetrů nad substrátem se nachází kovové vlákno, které je pomocí elektrického proudu rozžhaveno na teplotu vyšší než 2200°C. Tlak se pohybuje v rozmezí 1 až 5 kPa. Pomocí této metody lze vyprodukovat celkem kvalitní nanodiamantové filmy. Nicméně může dojít ke kontaminaci výsledného filmu materiálem kovového vlákna, což se poté může negativně projevit při jeho použití v elektrochemické praxi. (Pleskov 2002)

Chemická depozice plynné fáze pomocí mikrovlnné plazmy (MWCVD) dochází v reaktoru k vytvoření velmi podobných podmínek, jako tomu bylo u HFCVD s tím rozdílem, že plynná fáze je aktivována ne pomocí rozžhaveného vlákna, ale pomocí mikrovlnné energie. Mikrovlny, jejichž zdrojem je magnetron, jsou do reaktoru vedeny vlnovodem skrz dielektrické okénko za účelem vytvoření náboje. K dosažení vyšší efektivity slouží amplifikátor, jehož vhodným naladěním se nastavuje maximální amplituda mikrovln. (Laimer *et al.* 1994) Výhodou MWCVD je, že pomocí této metody lze dosáhnout vyššího výkonu a tím pádem i vyšší rychlosti růstu. Další velkou výhodou oproti metodě HFCVD je, že nepřítomnost kovového vlákna v reaktoru umožňuje použití široké škály směsí plynů včetně těch s vysokým obsahem kyslíku.



Obr. 1: Schéma CVD reakčních komor A) CVD pomocí žhavého vlákna B) CVD pomocí mikrovlnné plazmy. Upraveno podle May (2000)

2.1.2 Dopování diamantu

Vzhledem k tomu, že diamant je sám o sobě izolantem, je potřeba během jeho syntézy přistoupit k takzvanému dopování. Ke kontrolovanému dopování dochází po přidání příslušného prvku do plynné fáze během CVD růstu. Inzerce těchto specifických prvků – dopantů dodává jinak nevodivému materiálů na elektrické vodivosti. Míra vodivosti závisí na použitém dopantu a na úrovni dopování. Nižší úroveň procesu, tedy méně než 10^{19} atomů na cm^{-3} vytvoří p nebo n přechod v závislosti na použitém prvku. Vyšší úroveň dopování, tedy více jak 10^{20} atomů na cm^{-3}, materiálu propůjčí vlastnosti polokovu vyznačující se vysokou elektrickou vodivostí. (Kraft 2007) Jako dopanty lze využít např. fosfor, dusík, síru, anebo bor, avšak nejčastěji se využívá právě bor a dusík. Nicméně pouze bor může být do směsi přidán

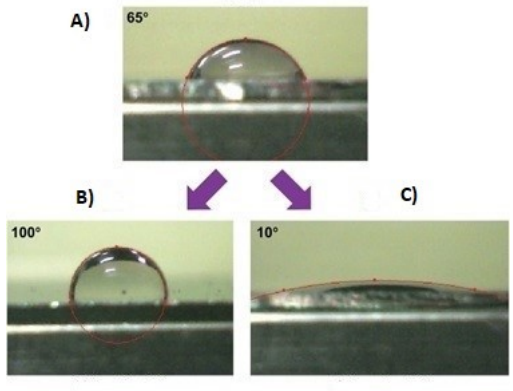
v natolik vysoké koncentraci, že film začne vykazovat podobné vodivé vlastnosti jako kovy. Jako zdroj boru v plynné fázi je používán buď diboran či trimethylboran.

2.1.3 Povrchové úpravy dopovaných diamantových vrstev

2.1.3.1 Terminace povrchu BDD

Terminace povrchu elektrody určuje její vlastnosti. Změnou terminace tedy můžeme dosáhnout potřebných vlastností.

Povrch diamantového filmu může být terminován různě, avšak nejčastěji se setkáme s H-terminací a O-terminací. Jakmile jsou na povrchu diamantu plně navázány atomy vodíku, povrch je H-terminován. Takto ošetřený povrch vykazuje hydrofobní vlastnosti, kdy kontaktní úhel s vodou je vyšší než 90° a je poměrně málo aktivní. (Yang *et al.* 2019) Ačkoli je H-terminovaný povrch stabilní na vzduchu i v roztoku po několik měsíců, po určité době dochází k oxidaci. (Vanhove *et al.* 2007) O-terminovaný povrch vykazuje opačné vlastnosti od H-terminovaného, je hydrofilní a jeho kontaktní úhel s vodou se pohybuje od 0,6°do 65°v závislosti na metodě oxidace, drsnosti povrchu a úrovni dopování (Obr. 2). (Yagi *et al.* 1999)



Obr. 2: Ukázka smáčivosti povrchu A) neošetřený povrch diamantu tzv „as-grown“, kontaktní úhel s vodou je 65° B) H-terminovaný povrch, je hydrofobní, kontaktní úhel s vodou je 100° C) O-terminovaný povrch, vykazuje hydrofobní vlastnosti, jeho kontaktní úhel s vodou je 10°. Upraveno podle Liskova *et al.* (2015)

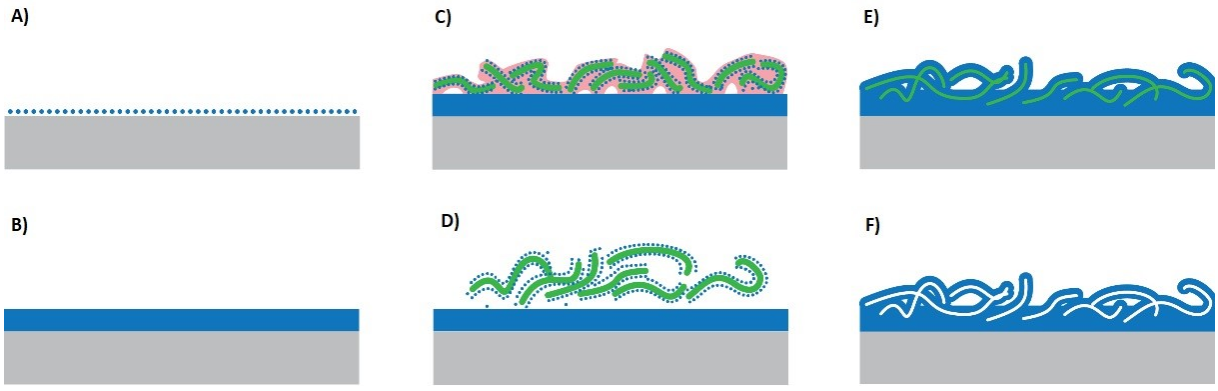
2.1.3.2 Poréznost povrchu

Tenké planární diamantové filmy mohou vykazovat relativně nízkou kapacitanci a vysokou impedanci, což vede ke snížení výkonu těchto elektrod využívaných pro stimulaci buněk navzdory jejich biokompatibilitě. Tento problém je možné překlenout vytvořením 3D

strukturovaného povrchu elektrody. (Hébert *et al.* 2014) Například povrchové struktury houbovitého tvaru signifikantně zvyšují výkon a citlivost neuroelektrod. Díky zvýšené citlivosti je možné pomocí takto upraveného povrchu měřit extracelulární elektrický potenciál se stejnou efektivitou, kterou vykazují intracelulární přístupy měření. (Hai *et al.* 2010)

Možností, jak zvýšit poréznost povrchu a tím zvětšit jeho plochu máme několik, buď leptání s použitím leptací masky *„mask assisted etching"*, nebo leptání bez použití leptací masky *„mask-less etching"* či depozice na porézní templát. Leptací maska během leptání slouží k ochraně oblastí, které by neměly být leptadlem ovlivněny, zároveň má i funkci šablony leptaného motivu. Nevýhodou této metody je její složitost a náročnost na vybavení. Zároveň může dojít k nežádoucímu přenosu kovových nečistot z leptací masky na konečné diamantové elektrody. (Yu *et al.* 2014) Během leptání bez použití leptací masky dochází k vytvoření porézní struktury žíháním materiálu za velmi vysokých teplot ve směsi argonu a vzduchu. (Kondo *et al.* 2014) Nicméně ani tato metoda není úplně vhodná ke komerčnímu využití vzhledem k náročnosti metody.

Poslední a nejvíce slibnou metodou je CVD na porézní substrát, jako je například membrána z křemíkových vláken. (Kondo *et al.* 2009) Tato metoda obvykle vede ke zvětšení využitelné plochy elektrody až o dva řády. Metoda je dále shrnuta v Obr.3.



Obr. 3: Syntéza porézního BDD A) Křemíkový substrát je nasazen společně s diamantovými nanočásticemi B) vytvoření planárního BDD filmu za MW CVD (C a D) nasazení templátu z křemíkových vláken E) MW CVD F) odstranění křemíkových vláken pomocí kyseliny fluorovodíkové za účelem zvětšení plochy povrchu. Upraveno podle Petrák *et al.* (2016)

2.2 Buněčná Adheze

Buněčná adheze hraje v mnoha biologických procesech významnou roli vzhledem k tomu, že adherované buňky vnímají extracelulární signály a poté je interpretují, integrují a reagují na ně. Přisednutí buněk a jejich adheze k povrchu tedy patří do první fáze interakcí mezi buňkou a materiálem a kvalita této fáze poté do značné míry ovlivňuje pozdější schopnost buněk proliferovat. Interakce buňka/materiál závisí ze všeho nejvíce na povrchových aspektech použitého materiálu. Chemické a fyzikální signály ze substrátu, jako je jeho smáčivost, povrchová energie, elektrostatický náboj či jeho topografie, jsou zásadní pro stimulaci buněk k adhezi a k ovlivnění buněčného růstu. Tyto povrchové charakteristiky určují, jak a jaké biologické molekuly přilnou k povrchu, určují orientaci přilnutých molekul a také chování buněk při kontaktu s povrchem. (Blau 2013)

2.2.1 Povrchové modifikace usnadňující buněčnou adhezi

Existuje několik možných způsobů, jak buněčné adheze docílit. Asi tou nejjednodušší možností je povrch ničím nepotahovat a nechat buňky volně adherovat pouze s využitím povrchových vlastností diamantové vrstvy. (Thalhammer *et al.* 2010) Dalším z možných způsobů, jak buňky přimět k adhezi je navázat na povrch diamantového filmu fragmenty extracelulární matrix (ECM). (Orr a Smith 1988) A v neposlední řade se k docílení adheze využívá působení elektrostatických sil potažením povrchu substrátu za pomoci nabitých molekul, jako jsou poly-D-lysin nebo poly-D-ornitin (poly-L-ornitin). (Kleinfeld *et al.* 1988)

2.2.1.1 Navození adheze za pomoci povrchových vlastností diamantového filmu

Thalhammer *et al.* (2010) ve své studii využili myších primárních neuronálních kultur k naočkování na čtyři různé materiály: sklo, polykrystalický diamant, nanokrystalický diamant a křemíkovou platformu. Všechny čtyři jimi použité substráty byly ošetřeny v ultrazvukové lázni monodispergovanými nanodiamanty, kdy došlo ke vzniku nanodiamantové monovrstvy na povrchu. Dle výsledků jejich výzkumu, takto upravené povrchy diamantových platforem poté podporovaly přisednutí primárních neuronů. Naproti tomu na površích substrátů, které nebyly nijak ošetřeny, k žádnému přisednutí buněk nedocházelo. V porovnání s povrchy potaženými bílkovinami extracelulární matrix, vykazovaly povrchy s nanesenými nanodiamanty slibnou

podobnost vzhledem k růstu neuritů buněk a k vytvoření funkční neuronové sítě. Neurony byly schopné růst v přímém kontaktu s materiálem potaženým vrstvou nanodiamantů a tudíž mohly být udržovány v kultuře po delší dobu, stejně jako u substrátů potažených proteiny. (Thalhammer *et al.* 2010)

I za předpokladu, že povrch není nijak upraven pomocí specifických molekul, může být diamantový film snadno funkcionalizován a to buď vodíkem, anebo kyslíkem. To, jakou molekulou bude povrch terminován, má klíčový vliv na jeho hydrofobní či hydrofilní vlastnosti, a tedy i na odlišnou vhodnost pro adhezi buněk. (Voss *et al.* 2012) Například u bipolárních neuronů se zdá, že mohou růst přímo na holých površích nanodiamantových filmů, zatímco u gliových buněk proteinový potah značně zvyšuje jejich schopnost přežití. (Bendali *et al.* 2014) Vzhledem k tomu, že vznik gliové jizvy kolem elektrod používaných v lékařské praxi omezuje jejich dlouhodobou účinnost a je tedy nežádoucí, použití nepotaženého O-terminovaného diamantu na jejich povrchu by mohlo zabránit růstu glií na jejich povrchu. Zároveň by došlo ke zprostředkování přímé interakce mezi neuronem a elektrodou. (Bendali *et al.* 2014) Co se přímého růstu neuronů na diamantech za vyloučení přítomnosti glií týče, ke stejnému výsledku dospěli již Thalhamer *et al.* (2010) v jejich pokusu popsaném o odstavec výše.

2.2.1.2 Adheze pomocí fragmentů extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) tvoří hmota, která se ukládá v mezibuněčných prostorách tkání a skládá se z proteinů (kolagen), glykosaminglykanů (proteoglykan) a glykoproteinů (fibronectin a laminin), které se poté skládají do fibril nebo jiných komplexních makromolekul. Část ECM tvoří takzvanou bazální laminu, na které poté „sedí“ buňky nervové tkáně. K molekulám glykoproteinů ECM se buňky přichycují pomocí určité skupiny transmembránových receptorů-integrinů. Díky tomu dochází k propojení extracelulární matrix s buněčným povrchem a na intracelulárním povrchu plazmatické membrány se receptory buněčné adheze sdružují s proteiny cytoplazmatického plaku. Pomocí cytoplazmatických plakových proteinů dochází k propojení s cytoskeletem a k regulaci funkce adhezních molekul. Proteiny cytoplazmatického plaku se také účastní přenosu signálů iniciovaných pomocí adhezních receptorů na buněčném povrchu.

Extracelulární matrix hraje důležitou roli, co se týče homeostázy, buněčné adheze, morfologie, proliferace a diferenciace, ale také polarizace a migrace. Narušení extracelulární matrix může vést až k anolis neboli programované buněčné smrti způsobené ztrátou buněčné adheze.

Extracelulární matrix v mozku ovlivňuje strukturální a funkční plasticitu neuronů. Jako příklad lze uvést její podporu tvorby dendritických filopodií a také podporu růstu dendritických trnů. Molekuly extracelulární matrix mají důležitou roli, i co se učení a paměti týče. Mají schopnost regulace rozličných aspektů synaptické plasticity a stabilizace synaptické konektivity. Kromě toho jsou klíčové pro růst axonů a regulaci vývoje neuroglií vytvářejících myelinové pochvy (v CNS tuto funkci plní oligodendrocyty). (Blau 2013)

Pro navození adheze neuronálních buněk k povrchu nanodiamantové platformy je základem znalost proteinů extracelulární matrix, které jsou pro daný typ buněk a pro zkoumaný účel těmi nejvhodnějšími. Jedním z nejvýznamnějších proteinů je laminin, jež tvoří hlavní složku bazální membrány. Díky tomu je nejčastěji volenou složkou extracelulární matrix používanou pro potažení povrchu. Důležitou rolí lamininu je jeho podpora růstu neuritů (Hammarback *et al.* 1985) v závislosti na integrinech. K jeho nanášení na povrch diamantových elektrod se využívá mikrokontaktního tisku, který umožnuje umístění molekul lamininu přesně na námi zvolené místo. (Specht *et al.* 2014)

K navázání buněk na povrch ECM dochází pomocí integrinových receptorů přes extracelulární ligand, kterým může být právě výše zmíněný laminin. Integrinové receptory jsou heterodimery skládající se z α a β podjednotky, které jsou spojeny nekovalentními vazbami. Vazebné místo pro extracelulární ligand nachází na β podjednotce. Integriny působí i jako přenašeče signálů, kdy jsou po aktivaci schopné regulovat rozličné intracelulární signální dráhy, buněčnou proliferaci či diferenciaci. S cytoskeletem, kinázami a receptory pro růstové faktory jsou integriny propojené přes adaptérové proteiny (např. vinkulin, talin, paxillin). Tento multimolekulový komplex se nazývá fokální adheze.

Aby bylo možné povrch potáhnout proteiny extracelulární matrix, je zapotřebí, aby vykazoval určité vlastnosti. Úspěšný coating je podstatně ovlivněn morfologií povrchu, jeho mechanickými a elektrickými vlastnostmi, smáčivostí a přítomností funkčních skupin. (Bacakova *et al.* 2011)

2.2.1.3 Navození adheze pomocí elektrostatických sil

Pro navození adheze pomocí elektrostatických sil se využívá skutečnosti, že extracelulární strana většiny buněčných membrán nese negativní náboj. V praxi je tento fakt využit pro vazbu kationtových polyaminokyselin jako je polylysin (PL) (Yavin a Yavin 1974), polyornitin (PO) (Eide a McMurray 2005), polyarginin a polyethylenimin (PEI) (Fischer *et al.* 2003) k povrchu buňky, díky čemuž dochází ke zprostředkování adheze k povrchu diamantového filmu.

Vhodnost použití kationtových polyaminokyselin se liší v závislosti na jejich chiralitě (L a D izomery) a molekulové hmotnosti. Nejen tyto vlastnosti, ale také jejich koncentrace, doba expozice, struktura a hustota kationtového náboje udává kromě síly adheze také rozsah buněčného poškození. (Fischer *et al.* 2003) Avšak toxicita a způsob, jakým tyto polymery působí na cílovou buňku, se liší podle jednotlivých buněčných typů.

Různé polymery a jejich enantiomery vykazují rozdílnou stabilitu v buněčné kultuře co se adheze týče. Všeobecně je toho zatím jen velmi málo známo o degradačních mechanismech navázaných polykationtů a o tom, jak jejich degradace závisí na typu substrátu, jeho topografii či poréznosti. Důležitou roli, co se stability polymeru týče jistě hraje i úprava povrchu substrátu, použitá buněčná kultura, složení kultivačního média a v neposlední řadě i protokol potahování.

Nevýhodou tohoto postupu při navození adheze je skutečnost, že molekuly polymerů zvětšují vzdálenost mezi buňkou a povrchem elektrody, což může být překážkou pro budoucí využití v medicíně. Dále je také možnost, že jejich vlastní náboj může mít vliv na konečný výsledek interakce mezi povrchem a buněčnou membránou. (Sorribas *et al.* 2001)

2.2.2 Mezibuněčné spoje

Propojení sousedních buněk a jejich vzájemná komunikace je základním předpokladem pro vytvoření funkční sítě neuronů. Kromě přilnutí buněk k povrchu platformy je proto třeba podpořit i mezibuněčné interakce, aby došlo k plynulému toku informací napříč neuronální sítí.

Mezibuněčné adhezní molekuly hrají klíčovou roli u kontaktů mezi neurony a gliemi. Na základě mnoha funkčních studií se došlo k závěru, že adhezní molekuly jsou zapojeny do mnoha aspektů tvorby neuronových sítí. Patří mezi ně vedení axonů a tvorba synapsí, regulace synaptické struktury a kontakty astrocytů na synapsích. Ačkoli základní aspekty vedoucí k sestavení komplexů propojujících mezi sebou neurony a gliové buňky jsou velmi podobné i u buněk epitelu, co se neuronů týče, tato spojení slouží k vykonávání neuronálně specifických funkcí jako je synaptický přenos a plasticita. (Togashi *et al.* 2009) Mezibuněčné komplexy vzájemně propojující nervové buňky obsahují řadu transmembránových proteinů, cytoskeletálních prvků a signalizačních komplexů. K molekulám účastnícím se mezibuněčných spojů patří neurální buněčná adhezní molekula (NCAM), kadheriny, protokadheriny, neurolignin/ β -neurexin a synCAM 1.

2.2.2.1 Neurální buněčná adhezní molekula (NCAM)

NCAM je vazebný glykoprotein patřící do imunoglobulinové CAM nadrodiny a je exprimovaný jak na povrchu neuronů, tak i na povrchu glií. NCAM se podílí na růstu neuritů, synaptické plasticitě a svoji roli má i v procesu učení a paměti.

NCAM je exprimován ve třech izoformách a to NCAM-A, NCAM-B a NCAM-C. Izoformy A a B jsou transmembránové proteiny jedenkrát procházející membránou s rozdílnými intracelulárními doménami, zatímco C je připojen extracelulárně k membráně za pomoci glykosylfosfatidylinositolové (GPI) kotvy. Extracelulární část všech izoforem NCAM se skládá z pěti N-terminálních imunoglobulinových domén (IgI – IgV) a dvou domén fibronektinu typu III. NCAM jsou poté upravovány pomocí alternativního sestřihu a posttranslačních modifikací. Nejvýznamnější z nich je glykosylace kyselinou polysialovou (PSA), což je důležitým regulačním procesem ve funkci NCAM a mnoho biologických funkcí NCAM je zprostředkováno právě pomocí negativně nabité polysialové kyseliny (PSA), což je struktura nesena výlučně molekulou NCAM. (Varoqueaux a Brose 2002) Komplex PSA-NCAM je syntetizován hlavně v průběhu neurálního vývoje a v dospělém mozku je jeho syntéza výrazně snížena. (Yanagisawa a Yu 2007)

Studie provedená na hipokampálních neuronech, které byly kultivovány po dobu 3 dnů ukázaly, že shluky NCAM v plazmatické membráně jsou spojeny s organelami odvozenými od transGolgi (TGN) pomocí spektrinu (Sytnyk *et al.* 2002). Tyto komplexy jsou translokovány

podél neuritů na místa kontaktů neurit-neurit během několika minut po vytvoření primárního kontaktu. Experimenty v probíhající v heterogenních kulturách neuronů s deficitem NCAM s *wild type* buňkami poskytují důkaz, že k ukotvení organel odvozených od TGN v nově vznikajících synapsích je nutný jak presynaptický, tak i postsynaptický NCAM. (Sytnyk *et al.* 2002)

2.2.2.2 Kadheriny

Kadheriny jsou nadrodina na vápníku závislých adhezních molekul rozdělených do podrodin sestávajících z klasických kadherinů a protokadherinů. (Takeichi 2006)

Kadheriny se skládají z velké N-terminální domény na extracelulární straně, která se skládá z pěti opakujících se subdomén (EC1 – EC5), z jedné transmembránové domény a z vysoce konzervované cytoplazmatické oblast na C-konci. Kadheriny interagují hlavně homotypicky, což znamená, že se přednostně vážou na proteiny stejného podtypu. Tato homotypická interakce a její specifičnost je zajištěna pomocí N-terminální domény. Intracelulárně kadheriny interagují s kateniny, což jsou proteiny vážící se na cytoplazmatickou doménu kadherinů a na aktinový cytoskelet a fungující jako intracelulární signální molekuly. (Wheelock a Johnson 2003)

V centrálním nervovém systému hrají kadheriny roli, co se růstu axonů týče. V dospělém mozku poté mají za úkol udržovat nervová spojení. Kromě role v synaptogenezi se tedy zdá, že adheze synaptických buněk zprostředkovaná kadheriny ovlivňuje také maturované synapse tím, že je posiluje a podílí se tak na tvorbě paměti. (Varoqueaux a Brose 2002)

2.2.2.3 Neurolignin/ β -neurexin

Neurolignin je protein lokalizovaný na postsynaptické membráně interagující heterotypicky s proteinem β-neurexinem, který je lokalizovaný na presynaptické membráně. (Togashi *et al.* 2009) Pomocí alternativního sestřihu je generováno více než 1000 odlišných neurexinových izoforem. Vzorce exprese odlišných izoforem neurexinu se liší v závislosti na jejich lokalizaci v mozku. Určitá neuronální subpopulace tedy exprimuje jedinečnou sadu neurexinů, což přispívá ke specifičnosti kontaktů neuronálních buněk v mozku. (Varoqueaux a Brose 2002)

2.3 Biokompatibilita

Biokompatibilitu lze charakterizovat jako snášenlivost materiálu v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál nevylučuje žádné toxické látky, nepodléhá korozi ani výraznému opotřebení a je tedy vhodný pro kultivaci buněk. Všeobecně se jako biokompatibilní přijímá takový materiál, který nejen že nevykazuje cytotoxické účinky, ale má také pozitivní účinky na biologické funkce zkoumané tkáně. (Kirkpatrick *et al.* 1998) Buňky kultivované na biokompatibilním materiálu tedy proliferují a jsou metabolicky aktivní. V případě vzrušivých buněk se sleduje i jejich schopnost tvořit funkční sítě. (Carabelli *et al.* 2016)

Na první pohled lze určit biokompatibilitu použitého materiálu pomocí makroskopických znaků jako je změna zbarvení použitého kultivačního média. Za předpokladu, že v kultuře buněk dochází ve zvýšené míře k apoptóze, sníží se pH kultivačního média, což se projeví změnou jeho barvy.

Dalšími makroskopickými znaky značícími biokompatibilitu použitého materiálu je schopnost adheze buněk k jeho povrchu a morfologie již adherovaných buněk. Za předpokladu, že povrch není pro kultivaci určitého typu buněk vhodný, dochází k tvorbě buněčných klastrů, kdy buňky upřednostňují interakci buňka-buňka před adhezí k povrchu. (Ojovan *et al.* 2014) Prosperující neurony kultivované na zkoumaném povrchu by měly být zploštělé a vzájemně tvořit funkční síť.

K hodnocení míry adheze buněk v kultuře lze využít barvení cytoplazmy viabilních buněk pomocí fluorescenčních sond jako je například 5-chlormethylfluorescein diacetát (CMFDA), kdy dojde k obarvení celé buňky, a nejen jejího cytoskeletu. (Taylor *et al.* 2015) Tyto fluorescenční sondy volně prochází do buňky, kde jsou transformovány na produkt (fluorofor), který se hromadí v cytoplazmě. Lze tak s jejich pomocí zjistit, jak velkou plochu povrchu buňky zabírají.

Adhezi buněk ke sledovanému materiálu lze také určit pomocí stanovení exprese buněčných adhezních molekul či proteinů účastnících se fokální adheze. (Kooten *et al.* 1997)

To, jak adherované buňky reagují na různé povrchy je možné zjistit pomocí barvení F-aktinu, což je složka buněčného cytoskeletu. Tvorba F-aktinu se mění v závislosti na stresu nebo na indukci programované buněčné smrti (Krůšek *et al.* 2018).

Míru biokompatibility použitého materiálu lze také zjistit pomocí analýzy poškození buněk. V odborné literatuře je jednou z nejvíce užívaných metod stanovení laktát dehydrogenázy z kultivačního média. Za předpokladu, že je v kultuře jen málo poškozených buněk, je hladina laktát dehydrogenázy nízká a naopak. Po své smrti buňky uvolňují mnoho enzymů, avšak pro detekci aktivity enzymu v supernatantu kultury musí vykazovat určité vlastnosti. Aby byl test reprodukovatelný, musí být stanovený enzym stabilní, odolný vůči rozkladu proteázami a musí se vyskytovat v dostatečném množství v cílových buňkách. Laktát dehydrogenáza všechny tyto vlastnosti má a je proto vhodným enzymem pro stanovení cytotoxicity. (Decker a Lohmann-Matthes, 1988)

Další možností, jak určit viabilitu buněčné kultury, je barvení methylenovou modří. Methylenová modř je barvivo, které vstupuje pouze do buněk s porušenou plazmatickou membránou a následně se uvnitř buňky hromadí. Buňky s intaktní plazmatickou membránou tedy zůstanou neobarvené, čímž lze určit poměr poškozených a nepoškozených buněk v populaci. (Taylor *et al.* 2015)

Barvením pomocí propidium iodidu (PI) lze taktéž od sebe oddělit buňky s poškozenou či nepoškozenou plazmatickou membránou, kdy propidium iodid vstupuje pouze do poškozených buněk, kde se interkaluje mezi báze DNA. Další možností je kombinované barvení kultury buněk PI a fluorescein diacetátem (FDA). FDA vstupuje do intaktních buněk, ve kterých je konvertován na fluorofor fluorescein. Fluorescein je zadržován v cytoplazmě intaktních buněk a lze ho detekovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. (Kirkpatrick *et al.* 1998)

Vlastnosti PI interkalovat se mezi báze DNA lze také využít ke stanovení fáze buněčného cyklu. Buňky v kultuře jsou nejprve permeabilizovány, obarveny pomocí PI a následně je hodnota PI v buňce kvantifikována pomocí průtokového cytometru. Podle obsahu PI v buňce (a tedy i obsahu DNA) lze určit, v jaké fázi buněčného cyklu se buňky nachází (Krůšek *et al.* 2018).

V neuronálních kulturách je třeba také zjistit, zda má zkoumaný povrch vliv na jejich schopnost tvořit funkční neuronální sítě vykazující synaptickou aktivitu. Toto lze sledovat pomocí indikátorů intracelulárního vápníku (Cameron *et al.* 2016), jako jsou fluorescenční sondy

FURA-2 či Fluo-4 AM. Sondy zpravidla volně projdou do buňky, kde se změní na produkt, který není schopný volného přechodu přes membránu. Za předpokladu, že dojde k navázání iontu vápníku, sonda začne vykazovat fluorescenci, kterou lze zachytit pomocí konfokální mikroskopie. Buňky v kultuře jsou následně stimulovány a sleduje se, zda dochází ke změnám ve fluorescenci, a tedy ke změnám v koncentraci intracelulárního vápníku.

3 Cíle práce

- Porovnat metody izolace adultních neuronů – izolaci gradientovou centrifugací a izolaci intrakardiální perfúzí – z hlediska výtěžku, čistoty a regenerativní schopnosti neuronů

- Odhadnout buněčné složení regenerovaných primárních kultur a jejich adhezi vzhledem k typu úpravy povrchu

- Popsat buněčnou prosperitu na studovaných površích

4 Materiály

4.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
65% kyselina dusičná	WVR	221430542100
Agaróza	SERVA	11404
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (sekundární protilátka)	Invitrogen	A11029
beta-3 Tubulin myší monoklonální protilátka	Thermo Fischer Scientific	2G10
B27 suplement	Gibco	A3582801
bovine albumin serum (BSA)	SIGMA-ALDRICH	A9056
CellROX Deep red	Invitrogen	C10422
CellTracker	Invitrogen	C10094
Dulbecco´s Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F12)	Gibco	21331020
Etanol	Merck (96%)	N/A
F-actin staining kit -Orange fluorescence-cytopainter	Abcam	ab112126
Fenol	SIGMA-ALDRICH	P4682
fetal bovine serum (FBS)	Gibco	10270
fosfátový pufr (PBS)	Namíchaný z IMG	N/A
gentamicin 44mg/ml	Sandoz	15/0278/91-CS
GFAP myší monoklonální protilátka (GA5), eFluor 570	eBioscience	41-9892-82
GlutaMAX-I (100x)	Gibco	35050-061
Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco	N/A

Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Hoechst 33258	Invitrogen	H1398
Chloroform	SERVA	45627
Isoamylalkohol	SERVA	39557
Izopropanol	SERVA	39557
MACS neuro medium	Miltenyi Biotec	130-093-570
MAP2 myší monoklonální protilátka	Thermofisher	13-1500
Narkamon 50 mg/ml (5% ketaminový roztok)	Bioveta, a.s.	N/A
Neurobasal A medium	Thermo Fischer Scientific	10888022
NeuroBrew21	Miltenyi Biotec	130-093-566
Neuronální izolační enzym s papainem	Thermo Fischer Scientific	88285
Octan sodný, 3M, pH: 5,2	SERVA	39572
OptiPrep	SIGMA-ALDRICH	D1556
Paraformaldehyd	SIGMA	158127
Poly-D-lysine hydrobromid	SIGMA-ALDRICH	P6407
Propidium iodid	SIGMA	N/A
Rometar 20mg/ml (xylazinový roztok)	Bioveta, a.s.	N/A
Tergazym	SIGMA	N/A
TRI Reagent solution	Ambion	AM 9738
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH	T9284
TWEEN20	SIGMA-ALDRICH	N/A

Komerční sady	**Výrobce**	**Katalogové číslo**
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 assay	Promega	G7792

FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche	4 738 381 001
High capacity cDNA reverse trancription kit	Thermo Fischer Scientific	4368814
LDH assay	Roche	11644793001
RNAeasy Micro kit	QIAGEN	74004
WST-1 assay	Roche	11 644 807 001

4.2 Příprava roztoků

Tris acetat EDTA pufr (10x koncentrovaný zásobní roztok)

- 48,46 g Tris-base
- 12,01 g Kyseliny octové (99,8%)
- 3,72 g Na_2-EDTA
- Rozpustit v destilované vodě a doplnit do 1000 ml

4.3 Média

Macs médium

- 43,3 ml MACS média
- 1 ml NeuroBrew 21
- 100 µl gentamycin (2 ml gentamycinu doplněný o 1,2 ml autoklavované vody)
- 500 µl GlutaMAX
- 5 ml FBS

Neurobasal médium

- 50 ml Neurobasal A média
- 1 ml B27 suplement
- 500 µl GlutaMAX
- 100 µl gentamycin (2ml gentamycinu doplněný o 1,2ml autoklavované vody)

4.4 Přístroje

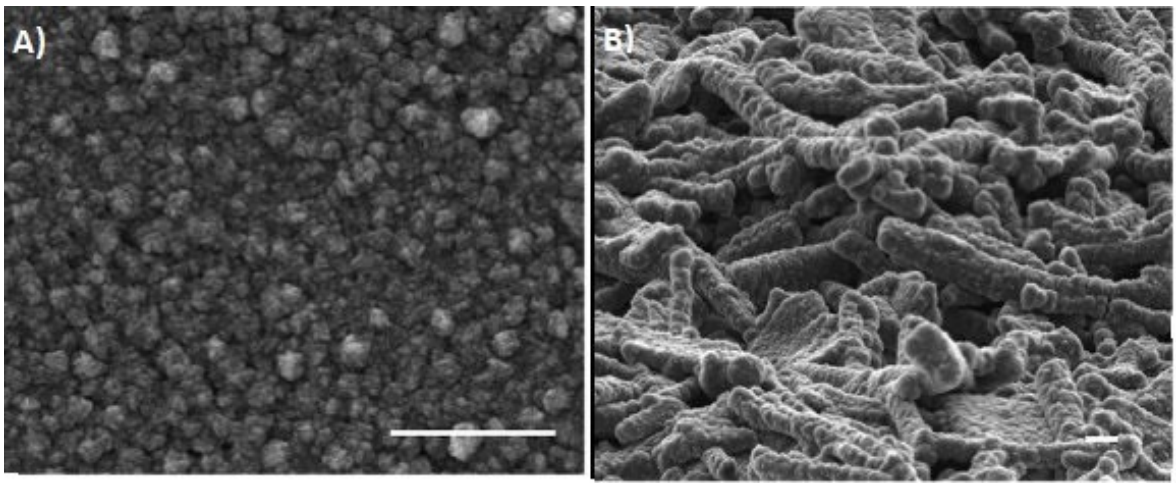
BD LSR II průtokový cytometr	BD Bioscience
Biologický laminární box BIO-II-A	Telstar
Centric 332A centrifuga	Tehtnica
FluoView FV1000 konfokální mikroskop	Olympus
Heracell 150 inkubátor	ThermoFischer Scientific
optický mikroskop	Meopta
spektrofotometr NanoDrop 2000/2000c	ThermoFischer Scientific
spektrofotometr Tecan	Schoeller Instruments
Xp teplotní cycler	Bioer Technology
Z 233 MK-2 centrifuga s chlazením	Hermle LaborTechnik
zdroj na elektroforézu E844	Consort

5 Metody

5.1 Příprava diamantových vrstev

Diamantové vrstvy byly připravovány výzkumnou skupinou Materiálů pro Nanosystémy a Biorozhraní z Oddělení funkčních materiálů z Fyzikálního ústavu Akademie věd České republiky pod vedením Dr. Vincent Mortet, PhD.

Používány byly dva druhy materiálu: planární nanokrystalické diamantové vrstvy (NCD) a porézní borem dopované diamantové vrstvy (PBDD). Příprava diamantových nosičů je detailněji popsána v článku výzkumné skupiny Krůšek *et al.* (2018).



Obr. 4: Fotografie morfologie povrchů platforem pořízené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu A) NCD vrstva a za B) vrstva tvořená PBDD. Meřítko použité na obrázku je 1µm. Upraveno podle Krůšek *et al*. (2018)

Diamantové vrstvy byly připraveny na nosičích (sklo Quartz) o velikosti 2x2 cm. Pro potřeby pokusu byly nosiče dále rozřezány tužkou s diamantovým hrotem na kousky o velikosti 1 cm^2. Jak NCD, tak PBDD byly před použitím na hodinu ponořeny do 96% etanolu. Následně byly 3x omyty destilovanou vodou a vysterilizovány na 15 minut po UV světlem.

Část sklíček s diamantovou vrstvou byla poté potažena poly-D-lysinem (PDL) a inkubována přes noc na třepačce. Poté byl PDL odmyt a sklíčka byla pětkrát omyta destilovanou vodu a vysterilizována na 15 minut pod UV světlem. V případě že se používaly postnatální neurony (během optimalizací metod), byl místo poly-D-lysinu použit vhodnější poly-L-lysin. Vhodnost různých látek na adhezi různých neuronů byla v laboratoři zjištěna empiricky při předchozích pokusech.

Vzhledem k náročnosti výroby NCD a PBDD vrstev, byly během dalších pokusů používány stejné vzorky, vyčištěné před recyklací od organických zbytků. Recyklované diamantové vzorky byly na hodinu ponořeny do roztoku 1 % tergazymu (roztok v autoklávované vodě), 1x promyty vodou a následně na přes noc ponořeny v 65 % kyselině dusičné. Poté byly vzorky 6x promyty destilovanou vodou, na 30 minut zality 96 % etanolem a následně 4x promyty destilovanou vodou. Před použitím byly vzorky sterilizované pod UV světlem na 15 minut a poté případně potáhnuty PDL. Vzorky NCD se ukázaly jako naprosto nevhodné pro regeneraci primárních neuronů a nejsou proto zahrnuty v kapitole Výsledky.

5.2 Experimentální zvířata

Pro získání dospělých neuronů byly používány myši (samci) kmene C57BJ/6 ve věku 16 týdnů. Pro získání časně postnatálních neuronů za účelem optimalizace metod byla použita mláďata myší kmene C57BJ/6 ve věku maximálně tří dnů.

Veškerá manipulace se zvířaty a pokusy na nich byly prováděny v souladu se zákonem č.246/1992Sb na ochranu zvířat proti týrání. Projekt pokusů byl schválen etickou komisí pod č.j. 82/2015.

5.3 Metody izolace primárních neuronů

V rámci experimentu byly použity dvě metody izolace primárních adultních neuronů, a to izolace pomocí hustotního gradientu OptiPrep™ a izolace neuronů pomocí intrakardiální perfúze. Časně postnatální neurony byly izolovány homogenizací tkáně.

5.3.1 Izolace neuronů pomocí OptiPrep™

Samec laboratorní myši kmene C57BJ/6 ve věku cca 16 týdnů byl uspán pomocí anestetik. Na 10 ml směsi anestetik bylo použito 2 ml ketaminu, 0,8 ml xylazinu a 7,2 ml sterilní vody. Na 10 g váhy zvířete bylo použito 0,1 ml směsi. Část směsi (50 μl) byla aplikována intraperitoneálně a zbytek intramuskulárně. Na uspaném zvířeti byla následně provedena dilatace krční páteře a dekapitace. Kůže na hlavičce zvířete přetažena až k čenichu a odhalená lebka byla otevřena pomocí nástřihu od týlního otvoru. Dále byly odklopeny temenní kosti

pomocí pinzety. Kortex byl vyjmut pomocí kopíčka a vložen do chlazeného média DMEM/F12 (4°C), kde byl sterilní žiletkou rozřezán na plátky o velikosti cca 0,5 cm. Plátky byly poté vloženy do 1 ml papainu v HBSS (37°C) a inkubovány 60 minut ve vlhké atmosféře obsahující 5% CO_2 37°C.

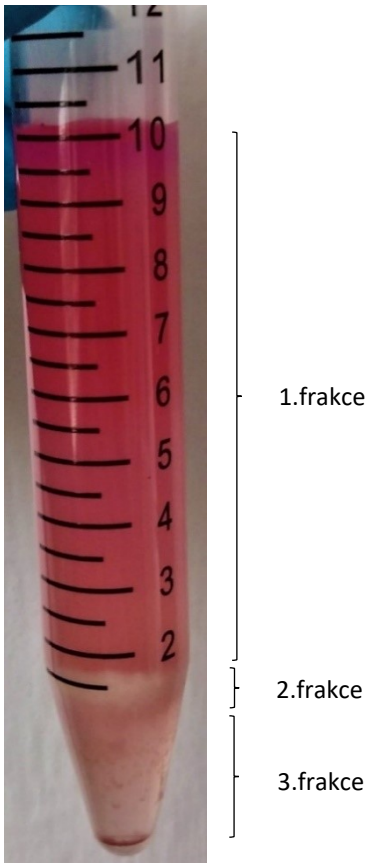
S vývojem metody byl v pozdějších pokusech kortex rozdělen na hemisféry a každá hemisféra byla rozřezána zvlášť a vložena do 0,5 ml předehřátého papainu.

Po hodinové inkubaci byl papain odstraněn odsátím a kortex byl promyt 2 ml DMEM/F12 (při pokojové teplotě). Poté bylo ke kortexu přidáno 2 ml DMEM/F12 a kortex byl homogenizován sterilní Pasteurovou pipetou. Suspenze byla ponechána 2 minuty, aby došlo k usazení nehomogenizovaných velkých celků a získaný supernatant se následně odsál do sterilní falkony. Tento krok (homogenizace zbytku tkáně a spontánní sedimentace) byl proveden celkem třikrát za účelem získání 6 ml supernatantu. Poté byl připraven hustotní gradient OptiPrep™ podle tabulky (Tab. 1).

Tab.1

Vrstva	**OptiPrep™ (µl)**	**MACS (µl)**	**Hustota (g/ml)**
1.	189	811	1.061
2.	132	868	1.045
3.	96	904	1.035
4.	81	919	1.031

Do sterilní falkony byly přeneseny předpřipravené vrstvy Optiprep™ s MACS médiem a následně byly převrstveny 6 ml získaného supernatantu. Vzorek byl poté centrifugován 15 minut při 1900rpm bez brzdy. Při centrifugaci došlo k rozdělení vzorku do frakcí v závislosti na jejich hustotě.



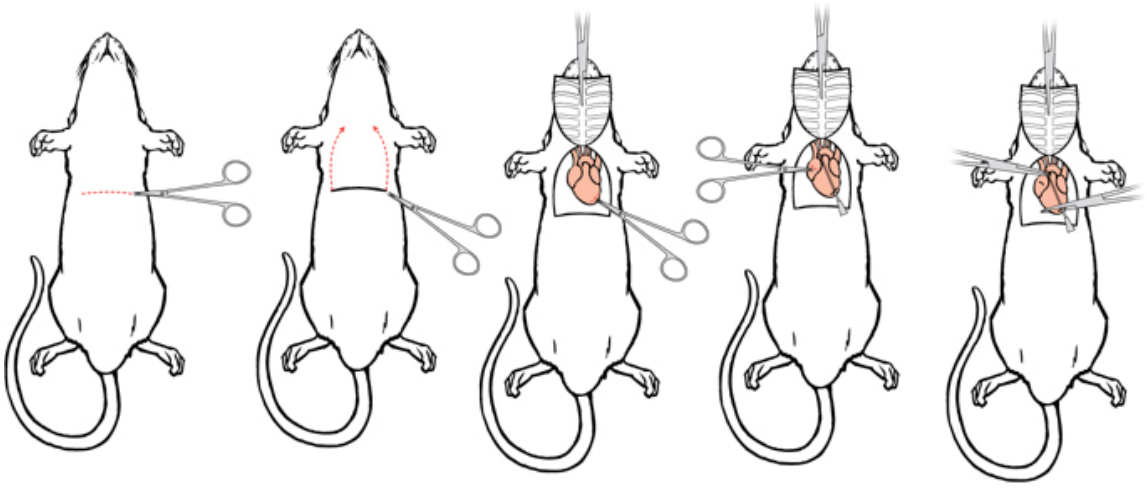
Obr. 5: Rozdělení suspenze z homogenizovaného kortexu na frakce. 1. frakce obsahuje hlavně debris a směrem k druhé frakci oligodendrocyty. 2. frakce (prstenec) je bohatá na neurony, stejně tak frakce 3., ve které směrem k peletu převládají mikroglie. Zdroj vlastní

Po rozdělení dle hustoty byly opatrně přeneseny frakce 2 a 3 do nové falkony a byly naředěny v 6 ml předehřátého MACS média (37°C). Počet buněk byl spočítán v Bürkerově komůrce a buňky byly nasazeny na připravené povrchy v množství 32 000 buněk na 100 µl média. Po hodinové inkubaci bylo vyměněno médium za nové v objemu 100 µl MACS média (37°C) v případě 96-ti jamkové destičky a 500 µl MACS média (37°C) v případě 12-ti jamkové destičky. Následně byly buňky vloženy do inkubátoru a kultivovány ve vlhké atmosféře obsahující 5% CO_2 při 37^0C.

5.3.2 Izolace neuronů pomocí perfúze srdce

Zvíře bylo uspáno směsí ketaminu s xylazinem (popsáno výše) a poté mu byl otevřen hrudní koš tak, aby se došlo k odhalení srdce. Po nastřižení žíly nad horním levým kvadrantem byla do apexu srdce zavedena injekční jehla. Poté bylo zvířeti do srdce pomocí injekční stříkačky

pomalu vpraveno vychlazené HBSS (4°C, 10-15 ml), dokud nedošlo k úplnému odbarvení kapaliny vytékající z nastřižené žíly (viz. Obr.6.).



Obr. 6. Postup při intrakardiální perfúzi převzato z Gage *et al.* (2012)

Následně bylo zvíře dekapitováno a vypreparovaný kortex byl přenesen do vychlazeného HBSS média (4°C) a nakrájen sterilní žiletkou na cca 0,5 cm velké kousky. Nakrájený kortex byl poté přenesen do 1 ml předehřátého papainu s HBSS (37°C) a inkubován 60 minut ve vlhké atmosféře obsahující 5% CO_2 při teplotě 37˚C.

Po inkubaci byl papain odsátý a kortex byl promyt 2 ml DMEM/F12 (při pokojové teplotě). Následně byla tkáň homogenizována sterilní Pasteurovou pipetou ve 2 ml DMEM/F12, suspenze se nechala 2 minuty usadit a supernatant byl poté přenesen do nové falkony. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován a získaných 6 ml bylo centrifugováno při 1100 rpm na 5 minut. Po centifugaci se supernatant odsál a pelet byl resuspendován v 6 ml předehřátého MACS média (37°C). Buňky byly poté spočítány v Bürkerově komůrce a nasazeny na připravené povrchy v objemu 32 000 buněk na 100 µl média. Buňky byly následně inkubovány ve vlhké atmosféře při 37°C. V případě potřeby byla suspenze doplněna předehřátým MACS médiem (37°C) do objemu 100 µl v případě 96-ti jamkové destičky a do objemu 500 µl v případě 12-ti jamkové destičky.

5.3.3 Izolace časně postnatálních neuronů

Během optimalizace metod byla používána mláďata od 1 do 3 dní po narození. Zvířata byla dekapitována, byl jim vyjmut mozek, který byl vložen na 15 minut do nahřátého papainu

(37°C). Poté byl papain odstraněn a k mozku byly přidány 2 ml předehřátého Neurobasal média (37°C). Mozek byl homogenizován pomocí Pasteurovy pipety a následný objem byl rozpipetován na diamantové vzorky potažené PLL.

5.4 Testy metabolismu buněk

V rámci testů metabolismu buněk bylo sledováno, jak buňky na sledovaných površích prosperují.

5.4.1 Test viability pomocí ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WST-1)

Efekt diamantových vrstev na mitochondriální aktivitu neuronálních buněk byl zkoumán pomocí testu WST-1, kdy se ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl (WST-1) využívá ke spektrofotometrické kvantifikaci viability populace buněk. Během této metody je WST-1 metabolizován pomocí mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk na rozpustný formazán a jeho množství tedy přímo koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kultuře.
Buňky byly nasazeny na PBDD a NCD vrstvy buď potažené, či nepotažené PDL, které byly vloženy do 96-ti jamkové destičky. Jako kontrola sloužily jamky potažené PDL bez diamantové vrstvy. Kultivace probíhala při teplotě 37°C a 5% CO_2 po dobu až 14 dnů. Měření probíhalo vždy v den 1, den 3, den 7 a den 14. Izolace buněk a jejich nasazení na diamantovou vrstvu byl den 0. Každý vzorek byl vždy v tripletu. Jako kontrola pozadí sloužilo médium bez buněk.
Měření probíhalo dle instrukcí výrobce. K buňkám v médium bylo přidáno WST-1 činidlo v poměru 1:10. Po přidání činidla byly buňky inkubovány 4 hodiny při teplotě 37°C a 5% CO_2. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky změřeny na spektrofotometru. Vlnová délka měření specifické absorbance byla nastavena na 450 nm a vlnová délka referenčního měření byla nastavena na 630 nm.

5.4.2 Měření cytotoxicity laktát dehydrogenázy

Test měření uvolněné laktát dehydrogenázy (LDH) je kolorimetrická metoda, která se používá pro kvantitativní stanovení úrovně buněčné cytotoxicity.
LDH je intracelulární oxidoredukční enzym, který se uvolňuje z poškozených buněk do extracelulárního prostoru. LDH katalyzuje oxidaci laktátu na pyruvát a redukci z NAD+ na

NADH+H+. Tuto enzymatickou aktivitu lze detekovat a kvantifikovat pomocí tetrazoliové soli, která se redukuje na sůl formazánu. Tento barevný produkt má absorpční maximum ve vlnové délce 490 nm, tudíž lze jeho přítomnost v médiu detekovat pomocí spektrofotometru.

Buňky byly nasazeny na 96-ti jamkovou destičku, kde na dně jamek byly vrstvy PBDD či NCD buď potažené či nepotažené PDL. Jako kontrola poté sloužily jamky pouze potažené PDL bez přítomnosti diamantů. Buňky byly kultivovány při teplotě 37°C a 5% CO_2 až po dobu 14 dnů. Jako pozitivní kontrola sloužily jamky s nasazenými buňkami, ke kterým byl 3 hodiny před koncem inkubace přidán komerční lyzační pufr za účelem docílení co největšího uvolnění LDH z kultivovaných buněk. Měření probíhalo vždy v den 1, den 3, den 7 a den 14. Den izolace neuronů byl počítán jako den 0.

Na konci inkubační doby byl z každé jamky odebrán supernatant (vzorky se odebíraly v tripletech), který byl poté inkubován s laktát dehydrogenázovým barvivem po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Jako negativní kontrola sloužilo médium bez buněk a barviva. Následně byla na spektrofotometru změřena absorbance při excitační vlnové délce 490 nm a referenční vlnové délce 630 nm.

Vzorky byly měřeny v tripletech, pro další analýzu bylo třeba spočítat průměrnou hodnotu trojice vzorků. Od získané průměrné hodnoty byla poté odečtena hodnota negativní kontroly a cytotoxicita byla následně vypočítaná dle rovnice:

$$cytotoxycita\ (\%) = 100x\ \frac{hodnota\ vzorku}{pozitivní\ kontrola}$$

5.5 Stanovení apoptózy buněk

Míra apoptózy buněk byl stanovena měřením aktivity kaspáz 3/7 pomocí komerčního kitu Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay. Součástí kitu je pufr, který permeabilizuje buňky a zároveň podporuje optimální enzymatickou aktivitu kaspáz 3/7 a profluorescentní substrát kaspáz 3/7 Z-DEVD-rhodamin 110. Substrát vykazuje fluorescenci poté, co je z něj činností kaspáz 3/7 odštěpen DEVD peptid.

Měření probíhalo vždy 7. a 14. den od izolace. Buňky byly pěstované na diamantových površích s a bez potažení PDL a na plastovém povrchu potaženém PDL. Den před měřením byl k pozitivní a negativní kontrole přidán paklitaxel za účelem stimulace aktivity kaspáz. Do negativní

kontroly s paklitaxelem byl před měřením přidán inhibitor kaspáz. Jako čistě negativní kontrola sloužily vzorky bez přidané Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 směsi a bez paklitaxelu. Vzorky byly měřeny vždy 4 a 6 hodin od přidání směsi komerčního pufru a substrátu. Míra fluorescence byla stanovena pomocí spektrofotometru při excitaci 499 nm, emisní maximum bylo nastaveno na 521 nm.

5.6 Vitální barvení neuronů

5.6.1 Vizualizace pomocí CellTracker™ fluorescenční sondy

CellTracker™ je fluorescenční sonda, která snadno prochází přes buněčnou membránu. V cytoplazmě je následně transformována na produkt, který schopnost volného průchodu přes membránu ztrácí a hromadí se v cytoplazmě. CellTracker™ obsahuje chlormethylovou skupinu, která reaguje s thiolovými skupinami, přičemž využívá reakci zprostředkovanou glutathion-S-transferázou. Ve většině buněk jsou hladiny glutathionu vysoké a glutathiontransferáza je všudypřítomná.

Buňky byly kultivovány v MACS médiu na 12-ti jamkové destičce na PBDD či NCD vrstvách potažených a nepotažených PDL. Kultivace probíhala při teplotě 37°C a 5% CO_2. Jako kontrola sloužily buňky kultivované pouze na PDL potaženém skle bez diamantů. Médium bylo odstraněno a k buňkám bylo přidáno 500 µl čerstvě namíchaného pracovního roztoku CellTracker™. Pracovní roztok byl namíchán v poměru 1:1000 CellTracker™ zásobní roztok (1mM) v MACS médiu. Buňky byly s pracovním roztokem inkubovány 1 hodinu ve 37°C a 5% CO_2. Poté byl pracovní roztok odstraněn a na buňky bylo přidáno nahřáté MACS médium (37°C). Pro pokus byl použit CellTracker™ Violet BMCQ, který má excitaci při vlnové délce 415 nm a emisi při vlnové délce 516 nm. Buňky byly poté vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie (objektiv 20×/NA 0.75 nebo 40×/NA 0.95). Měření probíhalo 7. a 14. den pokusu.

5.6.2 Barvení vitálních buněk pomocí CellROX® Deep Red

CellROX® Deep Red Reagent je sonda, která za určitých podmínek vykazuje fluorescenci a slouží pro měření buněčného oxidativního stresu. Barvivo začíná vykazovat silnou

fluorescenci až po oxidaci reaktivními formami kyslíku (ROS), v redukovaném stavu je barvivo velmi málo, anebo vůbec nefluorescentní.

Ke kultivovaným buňkám bylo do média přidáno CellROX® Deep Red činidlo do finální koncentrace 5μM. Buňky byly poté inkubovány 30 minut při teplotě 37°C. Jako negativní kontrola sloužily jamky bez přidaného činidla, kde se barvila pouze jádra pomocí Hoechst 33342. Kultivace probíhala na 12-ti jamkové destičce se skleněným dnem a měření probíhalo vždy 7. a 14. den pokusu. Buňky byly nasazeny buď na samotné PBDD bez potažení či na PBDD vrstvy potažené PDL. Jako kontrola sloužily buňky nasazené na PDL potažené sklo bez diamantu. Vzorky byly poté vizualizovány pod konfokálním mikroskopem (objektiv 20×/NA 0.75 nebo 40×/NA 0.95), kdy vlnová délka excitace byla 640 nm a emise 665 nm.

5.6.3 Vizualizace jader pomocí Hoechst 33342

Pro barvení buněčných jader bylo využíváno barvivo Hoechst 33342 (H342). H342 relativně snadno prochází přes intaktní buněčnou membránu a v buňce se poté váže na DNA, čímž umožňuje např. vizualizaci jader u vitálních buněk.

Buňky byly nejprve barveny pomocí CellTracker™ či CellROX® Deep Red a poté k nim byl přidán H342 30 minut před koncem kultivace, aby bylo dosaženo obarvení jader. Vzorky byly poté vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu (objektiv 20×/NA 0.75 nebo 40×/NA 0.95) při nastavení vlnové délky excitace 405 nm a vlnové délky emise 461 nm.

5.7 Fixace buněk

Kultivovaným adherentním buňkám bylo odebráno médium a následně byly promyty fosfátovým pufrem (PBS). Poté byly buňky 10 minut fixovány pomocí roztoku 4% paraformaldehydu (PFA) při pokojové teplotě. Následně byl PFA odebrán a fixované buňky byly třikrát promyty pomocí PBS. Do další manipulace byly buňky uloženy do lednice a uchovávány při teplotě 4°C. Aby se zabránilo samovolnému vyschnutí vzorků, byly destičky obaleny parafilmem.

5.8 Barvení fixovaných buněk

5.8.1 Barvení F-aktinových vláken pomocí Phalloidinu

Phalloidin je cyklický peptid, který se s vysokou afinitou váže na aktinová vlákna. Před samotným barvením bylo třeba PFA-fixované buňky permeabilizovat pomocí roztoku Triton X-100 (3 minuty) při pokojové teplotě. Pracovní roztok Phalloidinu byl připraven podle instrukcí výrobce naředěním 1:1000 s pufrem, který byl součástí komerčního balení. Na každou jamku bylo přidáno 200 µl naředěného roztoku Phalloidinu a poté bylo vše inkubováno po dobu 30 minut při pokojové teplotě a ve tmě. Patnáct minut před ukončením inkubace byl k buňkám přidán H342. Po uplynutí inkubace byly buňky pozorovány pod konfokálním mikroskopem (objektiv 20×/NA 0.75 nebo 40×/NA 0.95) při nastavení vlnové délky emise 550 nm a vlnové délky excitace 572 nm. Měření probíhalo vždy 7. a 14. den pokusu.

5.8.2 Vizualizace buněk pomocí intracelulárních markerů

Abychom zjistili, jaký je poměr neuronů a gliových buněk v kultuře, využili jsme barvení proteinů specifických pro určité buněčné populace. V případě neuronů jsme barvili beta-3 tubulin (TUB3) a protein asociovaný s mikrotubuly 2 (MAP2). TUB3 se vyskytuje hlavně v axonech, MAP2 je lokalizován v dendritech a v těle neuronů. Pro detekci gliových buněk jsme využili barvení gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). K expresi GFAP dochází hlavně v astrocytech.

Během barvení na TUB3 a MAP2 byly buňky nejprve fixovány pomocí 4% PFA a permeabilizovány 0,1% Tritonem X-100. Po permeabilizaci byly buňky promyty PBS a následně byly hodinu blokovány pomocí roztoku čerstvě připraveného 1% hovězího albuminového séra (BSA, v 0,1% Triton X-100) při pokojové teplotě. Poté byly buňky promyty pomocí PBS. Následně byla k buňkám přidána primární protilátka ředěná v 0,1% BSA TritonX-100 v poměru 1:150, inkubace probíhala přes noc při teplotě 4°C. Následující den byly buňky promyty PBS a byla k nim přidána sekundární protilátka Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG ředěná v 0,1%

Tween20 PBS v poměru 1:1000. Po hodinové inkubaci, která probíhala ve tmě a při pokojové teplotě, byly buňky promyty PBS a byl k nim na 15 minut přidán H342.

Pro barvení GFAP byly buňky nejprve fixovány pomocí 4% PFA a poté permeabilizovány pomocí roztoku 0,1% Triton X-100. Následně byly promyty PBS a 1 hodinu inkubovány v čerstvě připraveném roztoku 1% BSA při pokojové teplotě. Specifická anti-GFAP protilátka ve formě konjugátu s Alexa Fluor® 488 byla naředěna v poměru 1:100 v PBS a přidána k buňkám. Inkubace probíhala za pokojové teploty ve tmě po dobu 1 hodiny. Poté byl na 15 minut přidán H342. Po obarvení byly buňky vizualizovány pod konfokálním mikroskopem (objektiv 20×/NA 0.75 nebo 40×/NA 0.95).

Buňky byly kultivované na 12-ti jamkové destičce se skleněným dnem při teplotě 37°C a 5% CO_2. Pro každý marker byly buňky kultivované na PBDD potaženém PDL, samotném PBDD bez potažení PDL a na skle potaženém PDL. Markery se sledovaly v kultuře jak jednotlivě, tak kombinovaně. V případě TUB3 a GFAP bylo možné sledovat oba markery v jednom vzorku dohromady. MAP2 se ukázal jako nevhodný pro kombinované barvení. Signál z MAP2 byl příliš slabý oproti GFAP a také docházelo k přesvitu z GFAP kanálu.

Barvení pomocí H342 proběhlo ve všech jamkách. Buňky byly fixované vždy 7. a 14. den pokusu.

5.9 Kvantitativní analýza pomocí průtokové cytometrie (FACS)

Průtoková cytometrie je metoda umožňující analýzu mnoha chemických a fyzikálních vlastností jednotlivých buněk v populaci při jejich průchodu laserovým paprskem. Buňky mohou být barveny pomocí fluorescenčních barviv za účelem označení různých buněčných antigenů. V námi izolované kultuře jsme sledovali míru exprese intracelulárních markerů GFAP, TUB3 a MAP2.

Po izolaci buněk jsme odebrali 500 μl suspenze, buňky jsme promyly PBS a fixovali v 4% PFA. Následně jsme buňky převedli do 75% etanolu a skladovali v -20°C.

Před průtokovou cytometrií byly buňky permeabilizovány pomocí 0,1% Triton X-100 a poté promyté PBS. Následně byly 1 hodinu při pokojové teplotě inkubovány v čerstvě připraveném roztoku 1% BSA. Poté byly buňky promyty PBS, pelet byl resuspendován v 0,1% BSA a objem mikrozkumavky byl rozdělen na tři stejné části. K mikrozkumavkám, kde byly buňky pro určení expresi TUB3 a MAP2 byla přidána primární protilátka ředěná v PBS v poměru 1:150. Inkubace

s primární protilátkou probíhala přes noc v -4°C. Další den byly vzorky promyty PBS a 1 hodinu inkubovány se sekundární protilátkou ředěnou v 0,1% Tweenu s 0,1% BSA v poměru 1:2000. Do třetí zkumavky byl na 1 hodinu přidán konjugát protilátky proti GFAP ředěný v poměru 1:1000 v PBS. Po inkubaci byly buňky dvakrát promyty PBS.

Před samotným měřením na FACSu byl ke každému vzorku přidán propidium iodid v poměru 1:10.

Později během pokusu kromě odebrání části izolátu hned na začátku a jeho okamžitému fixování, byla také provedena kultivace buněk v jamce s plastovým dnem, kdy byly buňky po 7. a po 14. dnech jemně odděleny od povrchu pomocí ledového PBS a poté fixovány a zpracovány, jak již bylo popsáno výše.

5.10 Molekulárně biologické metody

5.10.1 Izolace RNA

RNA byla v rámci optimalizace metody izolována dvěma způsoby, a to pomocí centrifugačních RNA vazebných kolonek (Qiagen) a pomocí metody fenol-chloroform. Metody byly následně porovnány na základě množství a čistoty získané RNA.

5.10.1.1 Izolace RNA pomocí centrifugačních RNA vazebných kolonek

Po izolaci buněk bylo odebráno 500 μl suspenze, která byla centrifugována a pelet byl resuspendován ve 350 μl lyzačního RLT pufru a poté skladován v -20°C. Dále jsme postupovali dle návodu výrobce komerční sady kolonek Qiagen. Veškerý materiál, který byl používán v rámci této metody byl součástí komerčního kitu, s výjimkou etanolu.

K lyzátu byl v poměru 1:1 přidán 70% etanol a směs byla promíchána pipetou. Následně byl celý objem přenesen na RNA vazebnou kolonku, která byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky a vzorek byl centrifugován 15 sekund na 8000 g při teplotě 4°C. Následovalo promývání pomocí přidání 700 μl RW1 pufru na kolonku. Centrifugace proběhla za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Do kolonky bylo poté přidáno 500 μl RPE pufru a vše bylo znovu centrifugováno za stejných podmínek. Následně bylo znovu přidáno 500 μl RPE pufru a poté centrifugováno na 2 minuty při 8000 g a teplotě 4°C. Poté byla kolonka přenesena do nové sběrné zkumavky o objemu 1,5 ml. Na kolonku bylo přidáno 30 μl vody bez RNáz/DNáz a vše

bylo centrifugováno 1 minutu na 8000 g při 4°C za účelem uvolnění RNA z kolonky. Výsledná koncentrace RNA bylo změřena na NanoDropu.

5.10.1.2 Izolace RNA pomocí fenol-chloroformu

Po izolaci buněk bylo odebráno 500 μl suspenze, která byla centrifugována a pelet byl následně resuspendován v 500 μl lyzačního RLT pufru. Později během pokusu byly vzorky inkubovány po dobu 7 a 14. dnů a poté byly opatrně pomocí ledového PBS uvolněny od povrchu, stočeny a pelet byl taktéž resuspendován v 500 μl lyzačního RLT pufru. Vzorky byly skladovány v -20°C.

Ke vzorku bylo přidáno 50 μl octanu sodného, 450 μl fenolu a 125 μl směsi chloroformu s izoamylalkoholem (směs byla namíchána v poměru 49:1). Vzhledem k tomu, že chloroform je organické rozpouštědlo, které se nemísí s buněčným lyzátem, dochází k rozdělení směsi na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Směs se důkladně zvortexovala a nechala stát v -4°C po dobu deseti minut, kdy se začaly oddělovat fáze. Vortexováním se promísí fáze a proteiny přítomné v buněčném lyzátu jsou působením fenolu vysráženy. Po skončení protřepávání dochází k přechodu fenolu do chloroformové fáze, a to díky izoamylalkoholu, který zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Vzorek byl následně centrifugován 15 minut na 10 000 g při teplotě 4°C. Centrifugací jsou fáze rozděleny na horní vodnou fázi obsahující RNA, kterou od spodní fáze obsahující proteiny odděluje prstenec DNA.

Následně byla horní vodná fáze obsahující RNA přenesena do nové zkumavky, kde k ní byl přidán ledový 96% izopropanol v poměru 1:1. Směs byla poté důkladně promíchána a uložena přes noc do -20°C. Další den byl vzorek stočen na 15 minut při 10 000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 500 μl 75% ledového etanolu. Následně byl vzorek centrifugován 15 minut při 10 000 g a teplotě 4°C. Poté byl supernatant odsátý a pelet byl resuspendován v 500 μl 75% ledového etanolu a znovu centrifugován za stejných podmínek. Poté byl ethanol odstraněn a k peletu bylo přidáno 20 μl vody bez RNáz/DNáz. Vzorek byl poté umístěn na 10 minut do termobloku vyhřátého na 55°C. Po vyndání z termobloku byl vzorek ponechán 15 minut při pokojové teplotě a následně byla koncentrace RNA změřena na NanoDropu.

5.10.2 Reverzní transkripce

Všechny chemikálie použité na reverzní transkripci (RT) byly součástí komerční sady od Thermo Fischer Scientific. Vzhledem k tomu, že byla výtěžnost RNA vždy velmi nízká (21,6 - 55,4 ng/µl v případě fenol-chlorofomu), vzorek se neředil a do reakce se použilo 10 µl RNA. Do reakční směsi (v objemu na 1 reakci) bylo dáno 2 µl RT pufru (10x koncentrovaný), 0.8 µl nukleosid trifosfátů (dNTPs) (100mM, 25x koncentrovaný), 2 µl RT náhodných primerů (10x koncentrovaný), 4.2 µl vody bez RNáz/DNáz a 1 µl reverzní transkriptázy (50 U/µl). Jako kontrola falešné pozitivity bylo místo RNA přidáno 10 µl vody bez RNáz/DNáz. Dále byly vzorky vloženy do teplotního cykleru. Program cyklování – 10 minut 25°C, 120 minut 36°C, 5 minut 85°C, následně zchlazení vzorku na 4°C. Vytvořená komplementární cDNA byla poté skladována ve -4°C.

5.10.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Komplementární DNA byla amplifikována pomocí metody PCR, za účelem sledování exprese genů pro neurofilament 200 (NF200), neuron specifickou enolázu 2 (NENO2) a GFAP. Jako kontrolní gen nám sloužil TATA-vazebný protein (TBP). NF200 se vyskytuje u primárních neuronů hlavně v maturovaných axonech, NENO2 je taktéž marker primárních neuronů, oproti tomu GFAP se vyskytuje v gliových buňkách. TBP se vyskytuje u všech buněk, a proto je zde využit jako kontrolní gen. Do reakční směsi (v objemu na jednu reakci) bylo přidáno 14,64 µl vody, 2 µl pufru s hořčíkem (20 mM $MgCl_2$, 10x koncentrovaný), 0,4 µl dNTPs (10 mM), 0,8 µl příslušného primeru, 0,16 µl taq polymerázy (5 U/µl) a 2 µl vzorku. Mix byl vložen do teplotního cykleru. Pro každý primer byla na základě testování zvolena odlišná teplota annealingu: 50°C pro primer pro TBP, 55°C pro primery pro NENO2 a NF200, a 60°C pro primer pro GFAP. Program cyklování byl následující: 95°C 10 minut, 95°C 30 sekund, 50°C/55°C/60°C 30 sekund, 72°C 1 minuta, 72°C 7 minut, zchlazení na 4°C. Kroky dva až čtyři proběhly ve 40 cyklech.
Úspěšnost amplifikace byla poté ověřena pomocí metody elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Jako pufr pro elektroforézu byl použit 1x Tris acetát-EDTA pufr (1xTAE). Pro detekci DNA v agarózovém gelu byl použit GelRed. GelRed je interkalační barva, která pod UV světlem fluoreskuje a její fluorescence je zesílena za předpokladu, že je navázána na DNA. Ke vzorkům byl přidán nanášecí pufr v poměru 1:5. Vzorky byly naneseny na gel v objemu 16 µl na jamku

a aparatura byla připojena ke zdroji napětí nastaveného na 85 V. Po 30 minutách byla separovaná DNA vizualizována pod UV lampou.

Tab. 2: Použité primery

Gen	Orientace	Sekvence
NF200	Forward	CCTCCATATCCACGCACATAAA
	Reverse	CTCTTCTGTCTGTCCTTCTACAATC
NENO2	Forward	GAACTGGATGGGACTGAGAATAA
	Reverse	CTGAGCAATGTGGCGATAGA
GFAP	Forward	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
	Reverse	GACACAGCACACACACAAATAC
TBP	Forward	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG
	Reverse	TGACTGCAGCAAATCGCTTGG

Všechny primery byly syntetizovány firmou IDT a přečištěny odsolením. Zásobní roztok rozpuštěn ve vodě na koncentraci 100μM.

6 Výsledky

6.1 Optimalizace izolace primárních adultních neuronů

Během této práce jsme porovnávaly dva postupy získání primárních adultních neuronů, kdy bylo naším cílem získat co nejčistší primární neuronální kulturu. Jako první postup sloužila intrakardiální perfúze a jako druhý separace buněk pomocí hustotního gradientu.

V průběhu optimalizace jsme vyzkoušeli tři různé možnosti hustotních gradientů za účelem získat co nejčistší kulturu.

Tab. 3: Gradient č. 1 byl vypočítán dle (35).

Vrstva	Optiprep™ (µl)	MACS medium (µl)	Hustota (g/ml)
1.	173	827	1,057
2.	124	876	1,043
3.	99	901	1,036
4.	74	926	1,029

Tab. 4: Gradient č. 2 byl vypočítán dle (36)

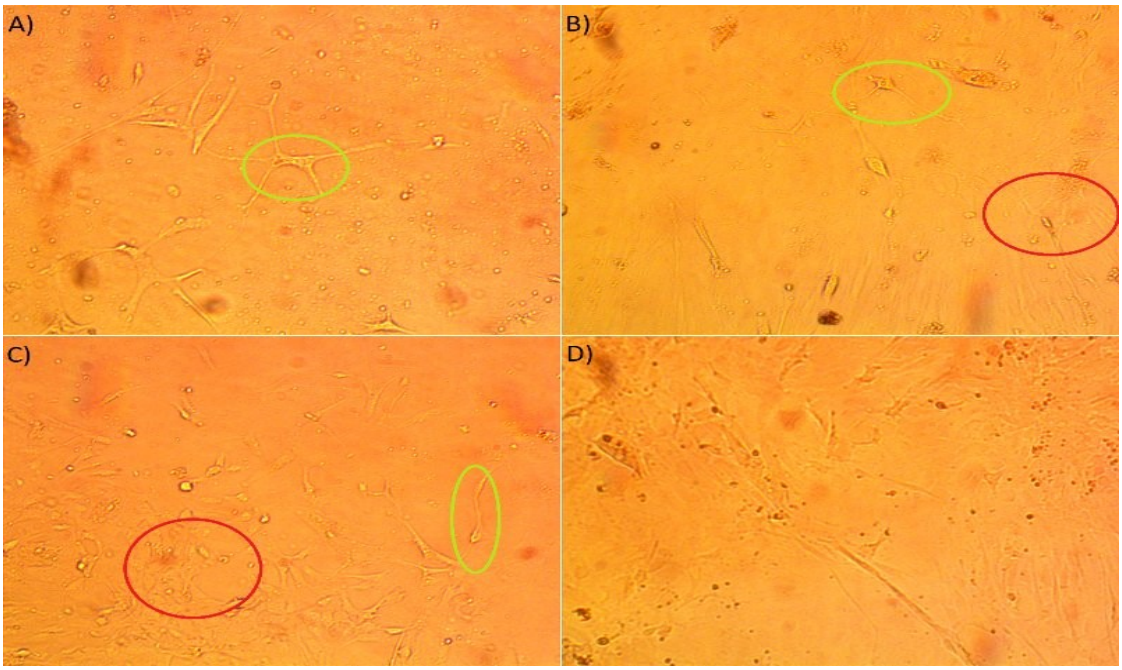
Vrstva	Optiprep™ (µl)	MACS medium (µl)	Hustota (g/ml)
1.	167	833	1,055
2.	131	869	1,045
3.	95	905	1,035
4.	63	937	1,026

Tab. 5: Gradient č. 3 - vlastní výpočet

Vrstva	Optiprep™ (µl)	MACS medium (µl)	Hustota (g/ml)
1.	188	812	1,061
2.	131	869	1,045
3.	95	905	1,035
4.	81	919	1,031

Po izolaci jsme v Bürkerově komůrce spočítali množství neuronů v suspenzi a následně jsme 100 µl z každé suspenze (perfúze či Optiprep™) nasadili na krycí sklíčko potažené poly-D-lysinem a vložené do 12-ti jamkové destičky a vzorky inkubovali při 37°C v 5% CO_2. Vzorky jsme pozorovali pod světelným mikroskopem 1., 3., 7. a 14. den. Na základě toho, jak kultura při každém měření vypadala jsme se rozhodli, že nejlépe pro náš pokus funguje gradient č. 3. Díky tomuto gradientu se nám podařilo vyizolovat největší množství buněk.

Abychom porovnali, která metoda izolace je pro náš experiment lepší, zda intrakardiální perfúze či izolace pomocí hustotního gradientu, buňky jsme vyizolovali pomocí každé z metod a poté jsme z každého izolátu nasadili 100 µl na krycí sklíčko potažené PDL a inkubovali při 37°C v 5% CO_2. Následně jsme pozorovali změny v kulturách po 7. a 14. dnech od izolace viz. Obr. 7.

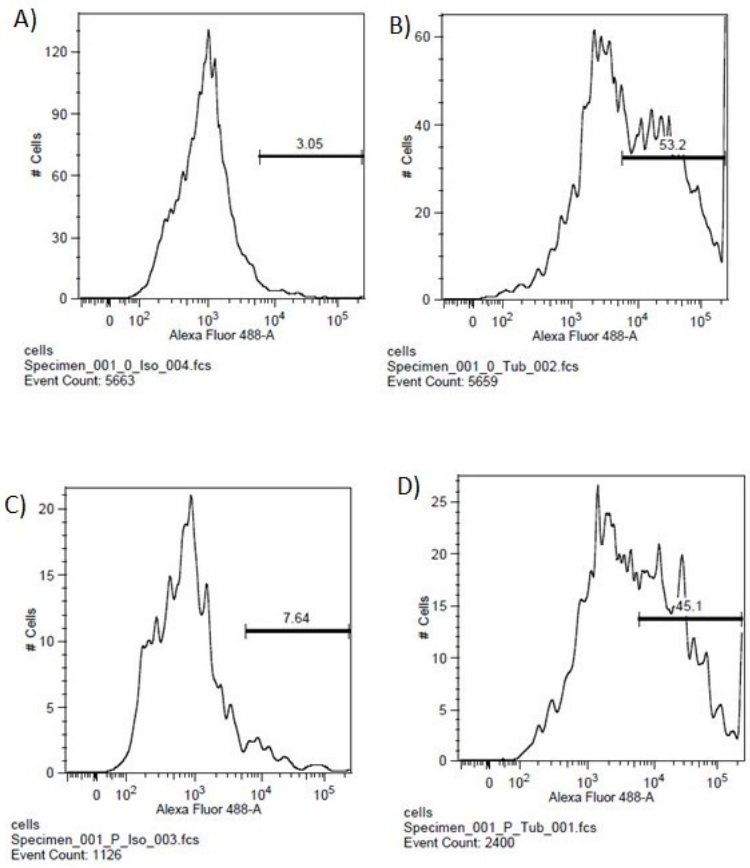


Obr. 7: Na obrázku můžeme porovnat vzhled kultur po izolaci pomocí hustotního gradientu a pomocí intrakardiální perfúze. Zároveň můžeme i pozorovat změny v kultuře v závislosti na čase (měřeno 7. a 14. den kultivace). Zdroj vlastní

Na obrázku 7-A) vidíme kulturu 7. den po izolaci pomocí hustotního gradientu, kde můžeme pozorovat primární neurony (v zeleném kroužku) a v porovnání s ostatními obrázky také relativně málo glií. Na obrázku 7-B) máme kulturu po 14 dnech od izolace pomocí hustotního gradientu. Stále můžeme pozorovat primární neurony (zelený kroužek), zároveň zde již můžeme pozorovat v porovnáním se 7. dnem zvyšující se počet gliových buněk (červený kroužek). Na obrázku 7-C) lze vidět kulturu 7. den po izolaci pomocí intrakardiální perfúze,

pozorujeme zde velké množství gliových buněk (červený kroužek), oproti tomu nižší počet primárních neuronů (zelený kroužek). Na obrázku D) je kultura 14. den po izolaci pomocí intrakardiální perfúze, zde pozorujeme prakticky jen gliové buňky, které porůstají téměř celý povrch.

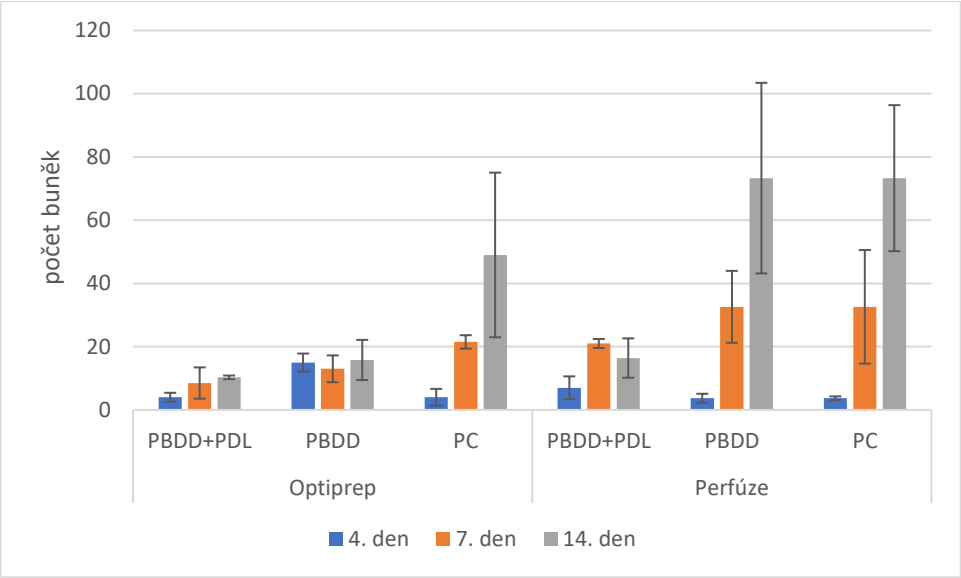
Abychom ověřili data získaná na základě pozorování buněk pod světelným mikroskopem, otestovali jsme obě buněčné kultury na přítomnost beta-3 tubulinu. Fixované buňky jsme obarvili specifickou monoklonální protilátkou proti TUB3. Jako negativní kontrolu jsme použili buňky paralelně barvené IgG2a izotypem, abychom byli schopní odlišit nespecifickou vazbu. Navázanou primární protilátku jsme detekovali sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488. Vzorky jsme měřili na průtokovém cytometru a data byla analyzována pomocí programu FlowJo. Před vlastním měřením jsme ještě dobarvili buňky propidium iodidem. Tento krok nám umožnil odlišit pozitivní události (buňky) od nebuněčného debris. Abychom zjistili procentuální zastoupení buněk pozitivních na TUB3 v kultuře, odečetli jsme události pozitivní na izotypovou kontrolu (tedy falešně pozitivní buňky) od celkového počtu pozitivních událostí.



Obr. 8: Na obrázku A) máme histogram pro izotypovou kontrolu buněk izolovaných metodou hustotního gradientu a na obrázku B) je histogram buněk pozitivních na TUB3 izolovaných pomocí hustotního gradientu. Na obrázku C) vidíme histogram pro izotypovou kontrolu buněk izolovaných pomocí perfúze a na obrázku D) máme histogram pro buňky izolované pomocí perfúze, které byly testované na přítomnost TUB3. Zdroj vlastní

Po odečtení izotypové kontroly od pozitivně testovaných vzorků nám vyšlo, že v kultuře izolované pomocí hustotního gradientu máme 50,15% buněk pozitivních na TUB3 a v kultuře izolované pomocí intrakardiální perfúze máme jen 37,46% buněk pozitivně testovaných na TUB3.

Dále jsme porovnávali, jaké množství buněk jsme schopní pomocí obou metod získat a jak jsou tyto buňky schopné regenerovat. Buňky jsme obarvili pomocí CellTracker a H(342). Data jsme získali vždy z 20 oblastí z různých typů povrchů, a nakonec jsme je vzájemně porovnali (Obr.9). Porovnávali jsme tyto povrchy: PBDD pokrytý PDL, PBDD bez další úpravy povrchu a krycí sklíčko pokryté PDL, které sloužilo jako pozitivní kontrola růstu (PC).



Obr. 9: Počet buněk získaných pomocí hustotního gradientu porovnaný s počtem buněk získaných pomocí intrakardialná perfúze. Měřeno 4., 7. a 14. den. Zdroj vlastní

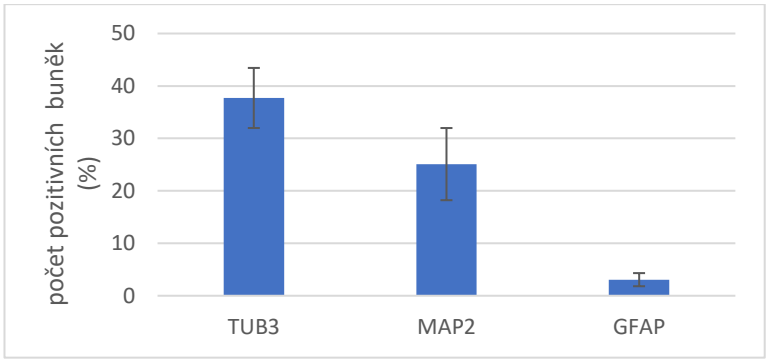
Z Obr. 9 je patrné, že pomocí perfúze jsme schopni získat větší počet buněk než pomocí metody hustotního gradientu. Dle toho, že nárůst počtu buněk získaných perfúzí pěstovaných na PBDD (a u pozitivní kontroly) je exponenciální, usuzujeme, že máme v kultuře vysoký podíl gliových buněk. Toto pozorování je v souladu s pozorováním kultur ve světelném mikroskopu (Obr. 7).

Na základě pozorování a měření popsaných výše jsme došli k závěru, že pro porovnání vhodnosti různých nanodiamantových vrstev v následujících pokusech vhodnější buňky izolovat pomocí hustotního gradientu.

6.2 Exprese TUB3, MAP2 a GFAP v buněčné kultuře

6.2.1 Stanovení metodou průtokové cytometrie

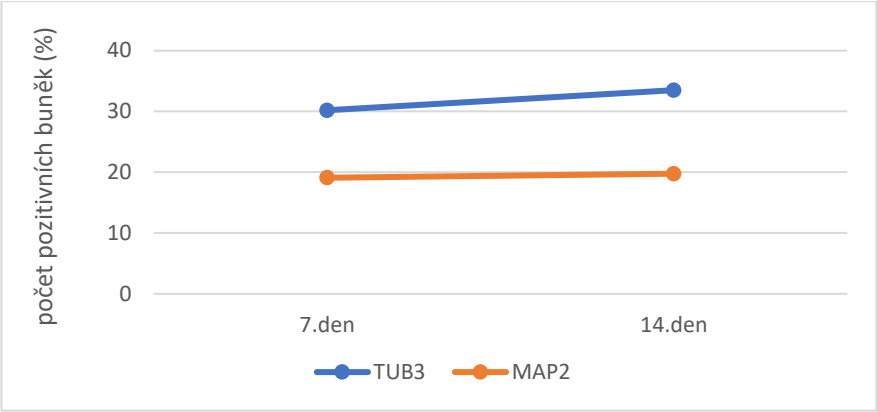
Abychom charakterizovali naší primární buněčnou kulturu, kvantifikovali jsme množství buněk exprimující TUB3, MAP2 a GFAP. Měření probíhalo pomocí průtokového cytometru a výsledky byly analyzovány v programu FlowJo (Obr. 10).



Obr. 10: Míra expreseTUB3, MAP2 a GFAP ve sledované populaci buněk. Zdroj vlastní

V grafu můžeme pozorovat procentuální zastoupení buněk v kultuře rozdělených podle markerů, které exprimují. Buňky byly fixovány ihned po izolaci. Vidíme, že míra exprese TUB3 a MAP2 je relativně vysoká. Míra exprese TUB3 se průměrně pohybovala v oblasti 37,71% a míra exprese MAP2 v oblasti 25,1%. Naproti tomu míra exprese GFAP je velmi nízká (3,07%). Výsledky jsme kompenzovali izotypovou kontrolou pro příslušnou primární protilátku. Odchylky v rámci jednotlivých měření pro každý marker byly minimální (standardní odchylka byla nízká).

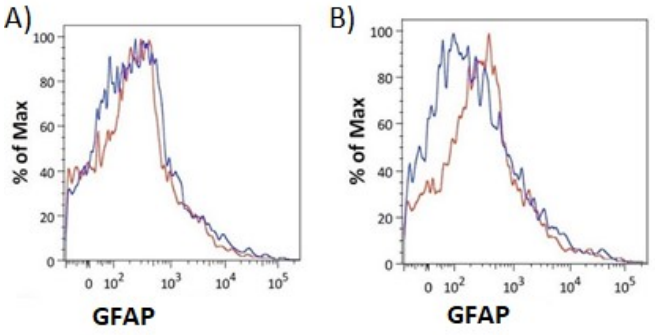
Dále jsme buňky kultivovali po dobu 7 a 14 dnů a poté jsme buňky fixovali. Naším záměrem bylo zjistit, zda se míra exprese jednotlivých markerů v čase mění či ne (Obr. 11). Buňky byly označeny pro jednotlivé markery pomocí protilátek (proti TUB3, MAP2 a GFAP) a následně analyzovány na průtokovém cytometru.



Obr. 11: změna míry exprese TUB3 a MAP2 v čase. Zdroj vlastní

V Obr. 11 můžeme pozorovat, že míra exprese neuronálních markerů TUB3 a MAP2 téměř nevzrostla.

Míra exprese GFAP byla v průběhu pokusu rovněž měřena, bohužel, výsledky podle nás nebyly průkazné. Po odečtení negativní kontroly od vzorku nám vychází prakticky nulová exprese GFAP (Obr. 12).



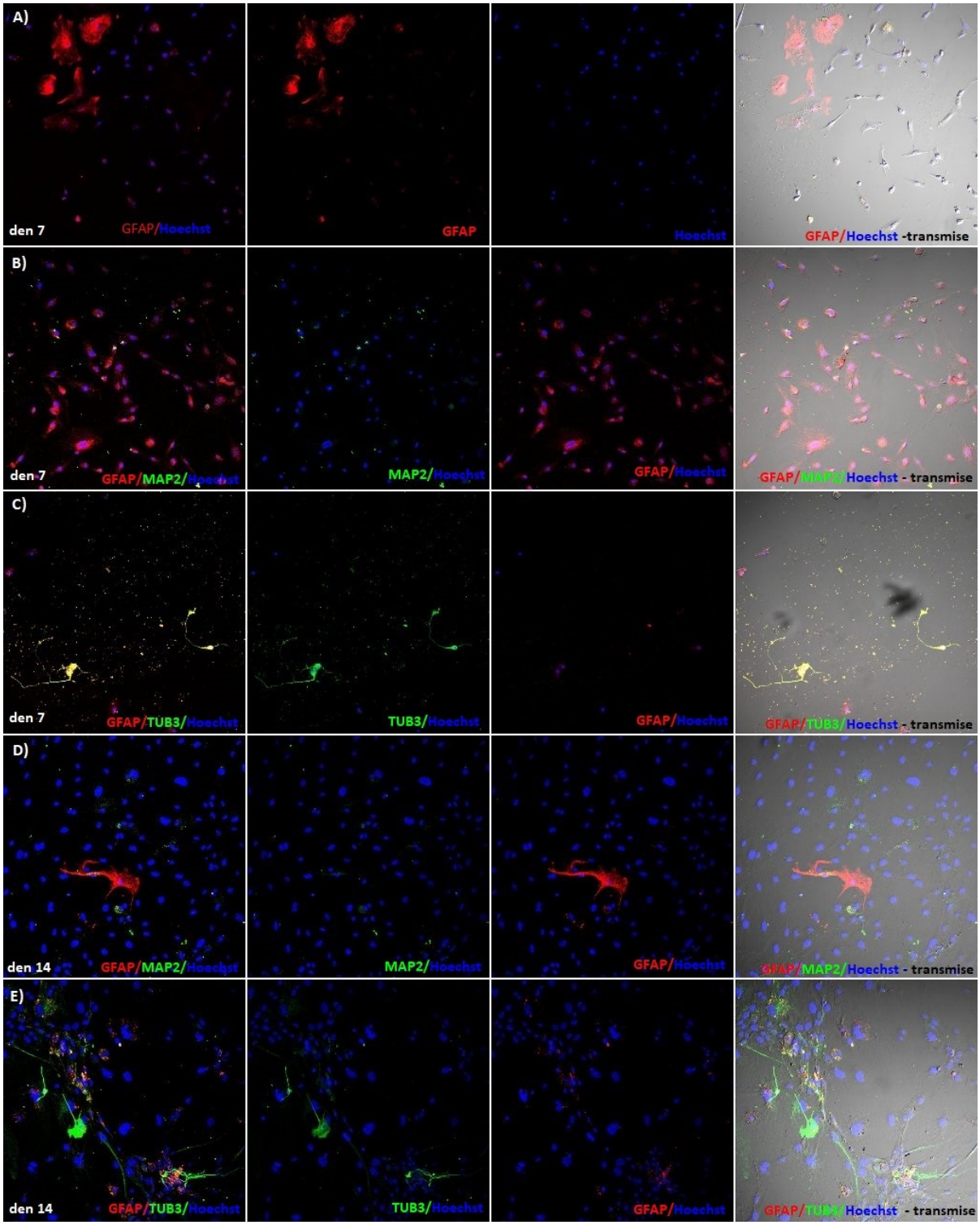
Obr. 12: Na obrázku A) i B) pozorujeme buňky barvené na GFAP červeně a negativní kontrolu modře. Zdroj vlastní

Ve vzorku měřeném po sedmi dnech od izolace A) je vidět, že všechny buňky barvené na GFAP vykazují intenzitu stejnou, jakou negativní kontrola. Ve vzorku měřeném po 14 dnech B) můžeme pozorovat mírný posun intenzity fluorescence u buněk barvených na GFAP vůči kontrole.

6.2.2 Vizualizace buněk exprimujících TUB3, MAP2 a GFA

Buňky byly nasazeny na jamky se skleněným dnem potaženým PDL. Fixace probíhala 7. a 14. den od izolace, abychom mohli sledovat změny v populaci buněk exprimujících námi sledované markery. Protilátkou proti GFAP byly barveny všechny vzorky, a to buď samostatně

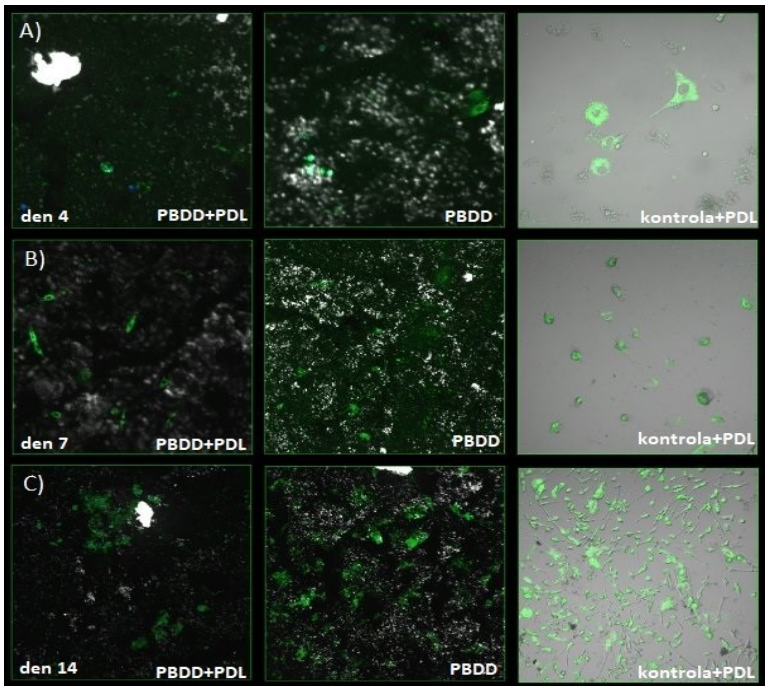
či dohromady s TUB3 případně MAP2 (Obr. 13 A – E). TUB3 a MAP2 nemohly být detekovány současně, protože sdílely stejnou sekundární protilátku a nebylo tedy možné je od sebe odlišit.



Obr 13: Vizualizace buněk exprimujících GFAP, TUB3 a MAP2. Na obrázku 13-A) pozorujeme kulturu buněk barvených na GFAP (červeně), kde můžeme vidět několik pozitivních buněk v horním levém rohu. Na obrázku 13-B) a 13-D) můžeme pozorovat buňky pozitivní na MAP2 (zelený signál) a GFAP (červený signál). 10-B) ukazuje kulturu po 7 dnech a 13-D) po 14 dnech od izolace. Na obrázku 13-C) a 13-E) pozorujeme buňky pozitivní na TUB3 (zelený signál) a GFAP (červený signál). Kultura po sedmi dnech od izolace je na obrázku 13-C) a po 14 dnech na obrázku 13-E). Jádra jsou barvena pomocí H342 (modrý signál). Zdroj vlastní

6.3 Pokrytí plochy vzorku buňkami – odhad regenerace a adheze kultury

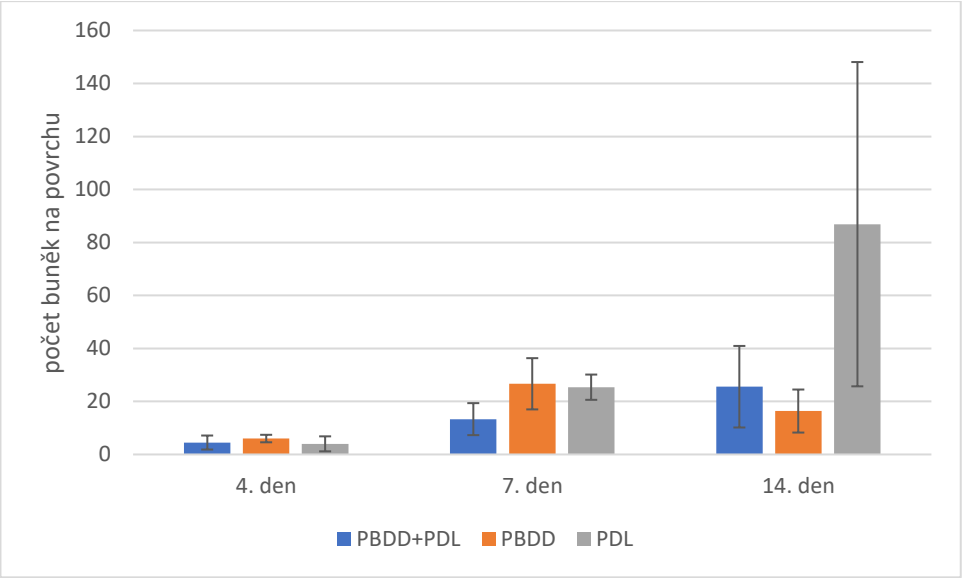
Buňky byly nasazeny na diamantové povrchy buď potažené či nepotažené PDL, jako kontrola sloužily jamky se skleněným dnem potaženým PDL. Vzorky se měřily bez fixace pomocí barvy CellTracker (zelený signál) vždy 4., 7. a 14. den po izolaci (Obr. 14). Jádra byla barvena pomocí H342 (modrý signál).



Obr. 14: Vzorky jsou v řadách řazeny v pořadí PBDD potažené PDL, PBDD bez potažení a kontrola potažená PDL. V řadě A) jsou buňky měřené 4. den po izolace, v řadě B) 7. den od izolace a v řadě C) 14. den po izolace. Zdroj vlastní

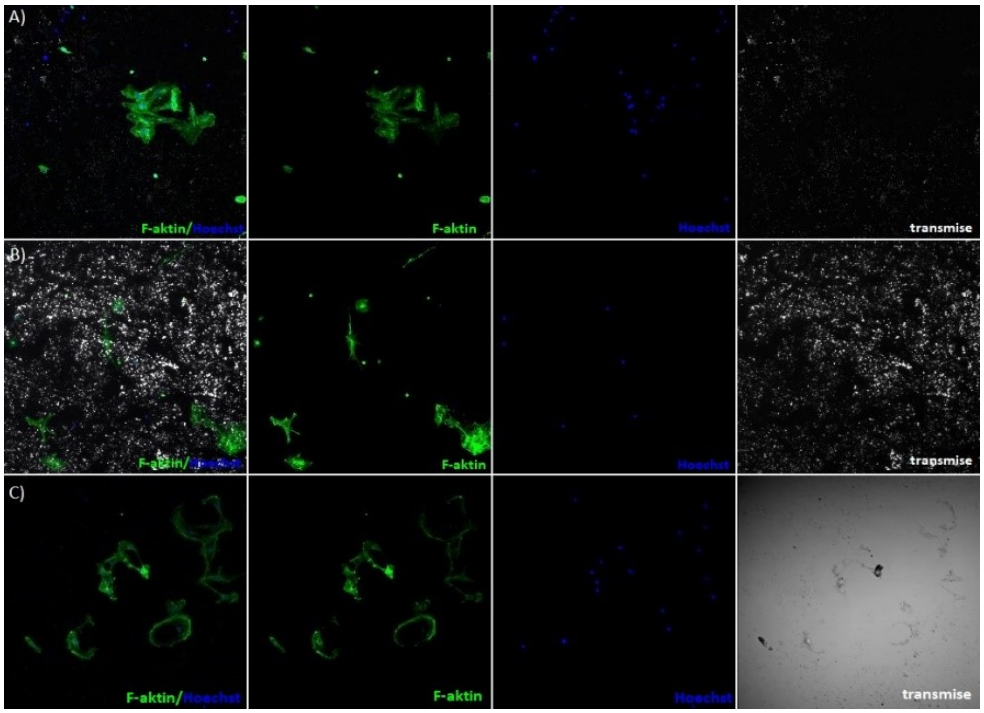
Buňky se nachází na porézních diamantech ve více úrovních, tudíž není možné je zachytit do jednoho obrázku všechny. Vzhledem k tomu, že CellTracker barvení poskytovalo poměrně slabý signál, než aby se dalo použít na odhad pokrytí povrchu buňkami, následně bylo použito barvení pomocí Phalloidinu.

Buněčná jádra byla barvena pomocí H342 a proto jsme byli schopní spočítat počet buněk na povrchu. Výsledky byly získány pomocí tří na sobě nezávislých měření. V následujícím grafu (Graf 4) můžeme porovnat, jak se počty buněk lišily na jednotlivých površích.

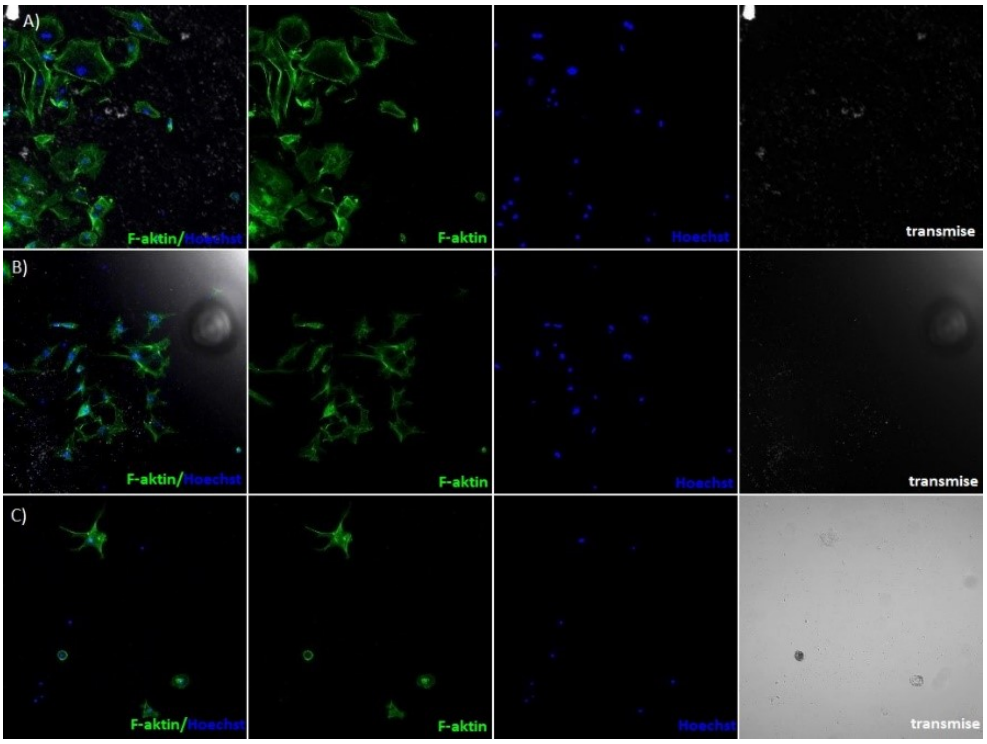


Obr. 15: počet buněk na zkoumaných površích během měření 4., 7. a 14. den od izolace. Zdroj vlastní

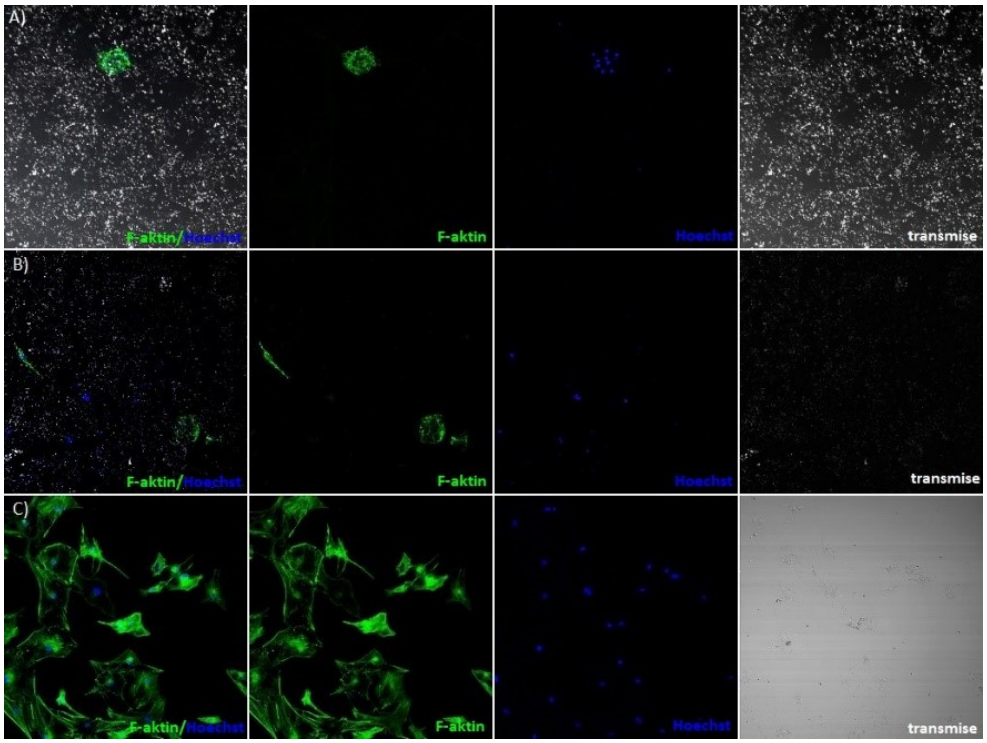
Abychom zjistili, jak velkou plochu vzorku máme porostlou buňkami, obarvili jsme F-aktinová vlákna pomocí Phalloidinu. Barvení Phalloidinem předcházela fixace buněk vždy 4., 7. a 14. den od počátku kultivace. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu ImageJ (Obr. 16- Obr. 18). Plocha pokrytí byla určena z kanálu zobrazujícího F-aktinová vlákna (zelený signál).



Obr. 16: Buňky fixované po čtyřech dnech od izolace. Na obrázku A) buňky pokrývající PBDD potažené PDL. Na obrázku B) pozorujeme buňky přisedlé na samotné PBDD. C) slouží jako kontrola. Jádra buněk jsou barvené pomocí H342 (modrý signál), F-aktinová vlákna jsou barvena Phalloidinem (zelený signál). Zdroj vlastní

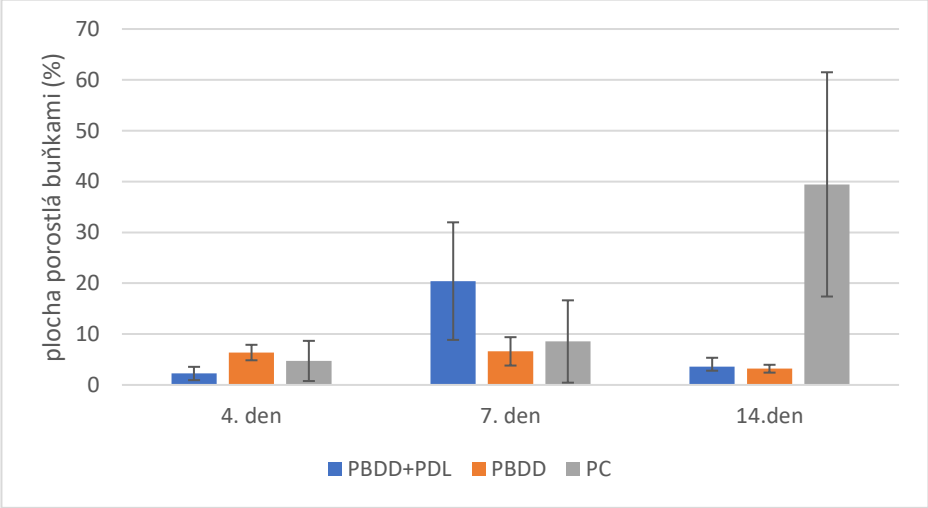


Obr. 17: Zde pozorujeme buňky fixované po sedmi dnech od izolace. Vzorky jsou řazeny ve stejné pořadí jako výše, tudíž A) PBDD potažené PDL, B) PBDD bez PDL a C) kontrola – sklíčko potažené PDL. Zdroj vlastní



Obr. 18: Buňky fixované po 14. dnech od izolace. A) PBDD potažené PDL, B) samotné PBDD bez PDL, C) kontrola – sklo potažené PDL. Zdroj vlastní

Výsledné hodnoty získané ze tří měření byly zprůměrovány a vyneseny do grafu (Obr. 19). Z každého vzorku v rámci jednotlivých na sobě nezávislých měření byla data sbírána ze čtyř až šesti náhodně vybraných míst. Standardní odchylky jsou relativně vysoké, což je způsobeno tím, že buňky neporůstají povrch kontinuálně, ale mají tendence tvořit shluky. Povrch PBDD je navíc 3D struktura, kterou buňky porůstají všemi směry. Oproti tomu obraz, ze kterého bylo měřeno pokrytí povrchu je 2D – zaostřen dle jader. Buňky, které jsou v dané oblasti, ale rostou výrazně níže či výše, nejsou v obraze zohledněny. Aby mělo měření co nejvyšší výpovědní hodnotu, bylo potřeba změřit jak oblasti s hustým pokryvem buněk, tak i oblasti, které byly pokryté jen minimálním množstvím buněk. Přesto je interpretace výsledků poměrně složitá a je pouze hrubým odhadem situace na daném povrchu.



Obr. 19: plocha (v %) zkoumaných povrchů porostlá buňkami během měření 4., 7. a 14. den od izolace. Zdroj vlastní

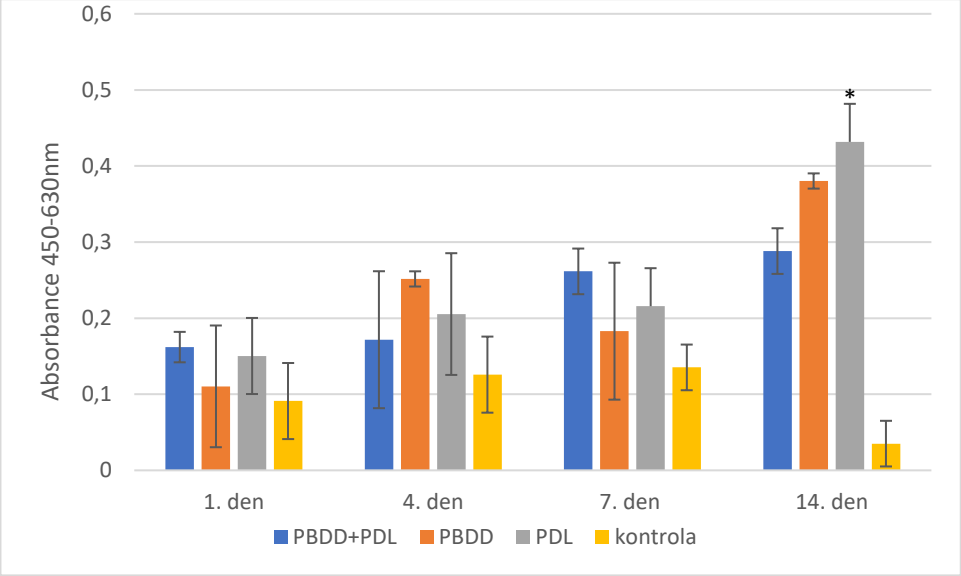
6.4 Měření prosperity buněk

Buňky byly pro účely měření vitality nasazeny na 96-ti jamkovou destičku se vzorky a to vždy v tripletech. Výsledky nezávislých měření byly zprůměrovány a byla z nich odečtena standardní odchylka. Každé měření bylo alespoň třikrát nezávisle na sobě zopakováno. Výsledky byly zpracovány ve statistickém programu ANOVA.

6.4.1 Stanovení metabolismu mitochondrií

K analýze metabolismu mitochondrií buněk, jsme použili WST-1 test, kdy dochází k redukci WST-1 činidla pomocí NAD(P)H dependentních mitochondriálních enzymů v živých buňkách.

Buňky byly nasazeny na PBDD s PDL, na samotné PBDD, do jamky potažené PDL a poté do jamky bez jakéhokoli potažení. Měření na spektrofotometru probíhalo vždy 1., 4., 7. a 14. den kultivace. Výsledky měření byly následně vyneseny do grafu (Obr. 20).



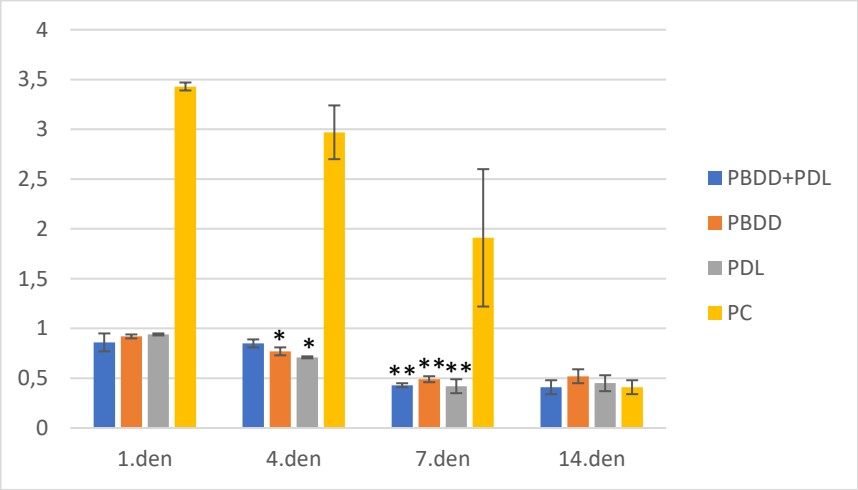
Obr. 20: Výsledné hodnoty měření WST-1 na zkoumaných površích 1., 4., 7. a 14 den od izolace. Zdroj vlastní

V Obr. 20 můžeme pozorovat pozvolné zvýšení mitochondriální aktivity v průběhu experimentu. Po vyhodnocení testem ANOVA vyšel statisticky významný rozdíl ($p < 0.05$, označeno *) pouze u vzorku kultivovaném v jamce potažené PDL bez diamantů po dobu 14 dnů. Ostatní vzorky vykazovaly nesignifikantní změny.

6.4.2 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita v kultuře byla stanoveno pomocí měření množství enzymu laktát dehydrogenázy, který je poškozenými buňkami uvolňován do extracelulárního prostoru. Množství LDH bylo stanoveno z média buněk nasazených na PBDD potaženém PDL, na samotném PDBB bez potažení a pouze na plastiku potaženém PDL. Jako pozitivní kontrola (PC) nám sloužily buňky pěstované na plastiku potaženém PDL, které byly 3 hodiny před začátkem měření inkubovány lyzačním pufrem. Měření probíhalo vždy 1., 4., 7. a 14. den od izolace. Absorbance byla měřena při vlnové délce 490nm, referenční vlnová délka byla 630nm.

Na Obr. 21 můžeme pozorovat, že hodnoty produkce LDH v buněčné kultuře byly v rámci jednotlivých dní měření podobné. Hodnoty získané v průběhu jednotlivých nezávislých měření byly velmi podobné (standardní odchylka byla velmi nízká). Funkčnost metody byla ověřena pomocí pozitivní kontroly. Ve 14. den kultivace byly změřeny hodnoty, které ovšem nemají žádnou vypovídající hodnotu.

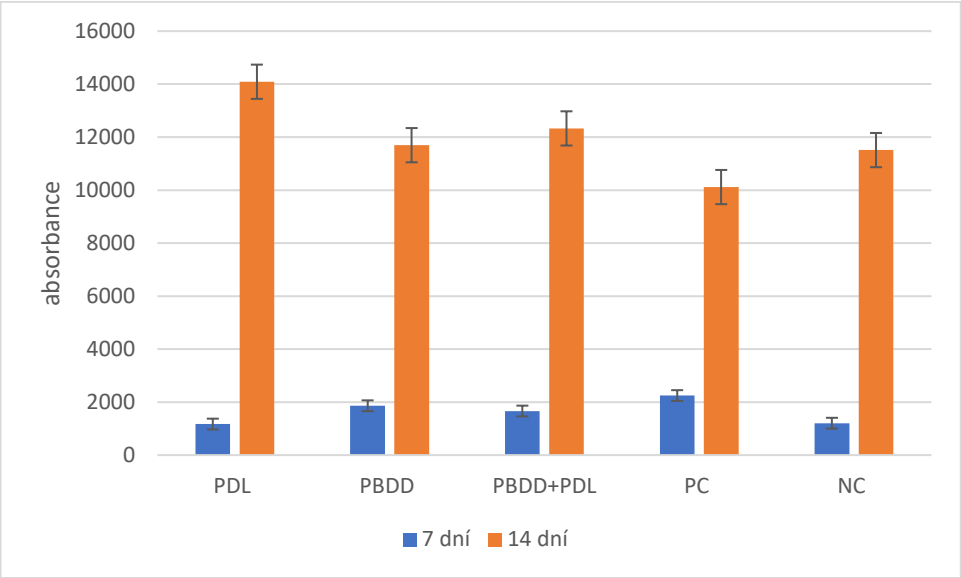


Obr. 21: Průměrné hodnoty LDH měření z kultivačního média pro každý povrch ve dnech 1, 4, 7 a 14. P hodnoty nižší než 0.05 jsou označeny * a p hodnoty nižší než 0,01 jsou označeny **. Zdroj vlastní

6.4.3 Stanovení apoptózy

Míra apoptózy buněk v kultuře byla stanovena z média měřením aktivity kaspáz 3/7. Buňky byly pěstovány po dobu 7 a 14 dní na PBDD potažených PDL, PBDD bez PDL nebo na PDL potaženém plastové dně jamky. Jako pozitivní kontrola sloužily jamky s buňkami stimulovanými paklitaxelem. Jako negativní kontrola sloužily jamky s buňkami stimulovanými paklitaxelem, ke kterým byl před měřením přidán inhibitor kaspáz. Po přidaní směsi

komerčního pufru se substrátem ke všem vzorkům (s výjimkou buněk sloužících jako kontrola) byly vzorky inkubovány 4 a 6 hodin a poté změřeny na spektrofotometru. Hodnoty změřené po šesti hodinách ale byly nad hranicí citlivosti. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a byla od nich odečtena hodnota kontroly bez přidané Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 směsi (Obr. 22). Na výsledném grafu lze pozorovat určité zvýšení aktivity kaspáz 3 a 7 u vzorků PBDD a PBDD+PDL po 7 dnech. Po 14 dnech byly naměřené hodnoty výrazně vyšší, leží na horní hranici citlivost metody a hodnocení není věrohodné.



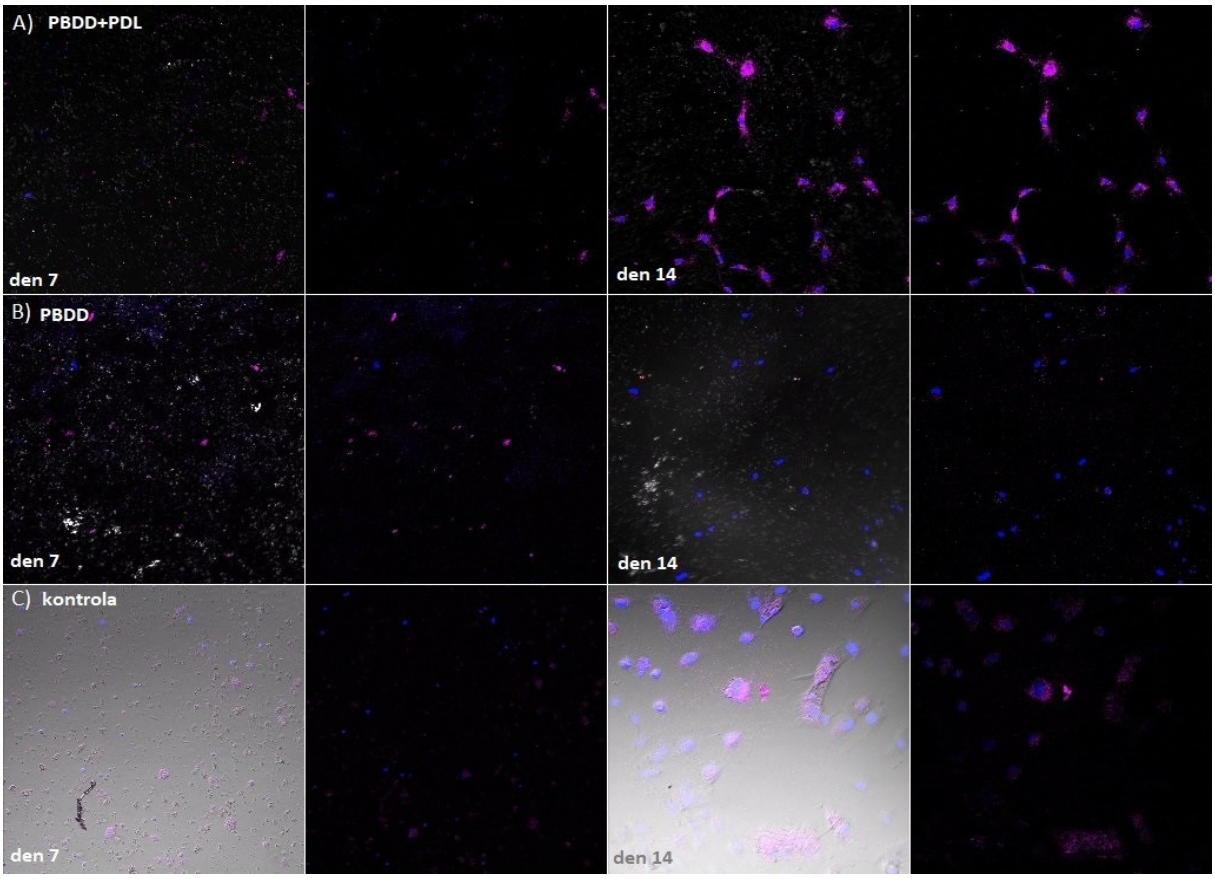
Obr. 22: Aktivita kaspáz detekována z média po 7 a 14 dnech od kultivace. Zdroj vlastní

6.4.4 Měření buněčného oxidativního stresu

Míra oxidativního stresu v kultuře byla stanovena pomocí fluorescenční sondy CellROX® Deep Red Reagent. Po oxidaci sondy reaktivními formami kyslíku, začne sonda vykazovat fluorescenci, kterou lze detekovat pomocí spektrofotometru.

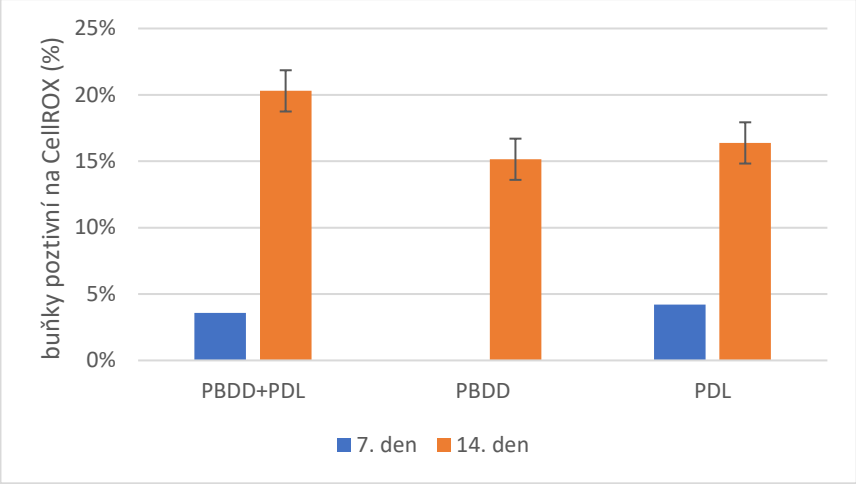
Po izolaci byly buňky nasazeny jak na samostatné diamantové vrstvy, tak i na PBDD potažené PDL. Jako kontrola nám sloužily skleněné jamky pouze potažené PDL. Měření probíhalo vždy 7. a 14. den od izolace. Data byla sbírána vždy z pěti náhodně vybraných míst na každém vzorku, v rámci jednoho měření byly od každého různě upraveného povrchu tři vzorky (celkem tedy 15 náhodně zvolených míst na každý typ vzorku). Jako negativní kontrola pak sloužily jamky bez přidaného činidla CellROX® Deep Red. U všech vzorků (i negativní kontroly) byla barvena jádra pomocí H342. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí konfokálního

mikroskopu a data byla následně zpracována pomocí programu ImageJ (Obr 23). Výsledné hodnoty byly získány ze dvou na sobě nezávislých měření, zprůměrovány a vyneseny do grafu (Obr. 24).



Obr. 23: V řadě A) jsou buňky pěstované na PBDD potaženém PDL, první dva obrázky byly foceny během prvního měření po 7 dnech a druhé dva obrázky během měření po 14. dnech. V řadě B) jsou buňky pěstované na PBDD, první dva obrázky jsou focené po 7 dnech, další dva po 14 dnech od izolace. V řadě C) jsou kontrolní vzorky pěstované na skleněných jamkách potažených PDL. První dva obrázky byly získány během prvního focení po 7 dnech a další dva po 14 dnech od izolace. Zdroj vlastní

Na Obr. 23 můžeme pozorovat, jak se změnila míra buněčného oxidativního stresu mezi 7. a 14. dnem od izolace. Pro ukázku byla záměrně vybrána místa, kde buňky vykazovaly vysokou míru oxidativního stresu (fialová barva signálu). Na jednotlivých obrázcích můžeme pozorovat mnoho nespecifického signálu, který následně nebyl zahrnut do výsledných hodnot vynesených do grafu. Buněčná jádra jsou barvena pomocí H342 – modrý signál.



Obr. 24: míra pozitivity buněk v kultuře na ROS, měřeno 7. a 14. den od izolace. Zdroj vlastní

V grafu (Obr. 24) vidíme, že po sedmi dnech od izolace na PBDD potaženým PDL bylo 3,57% buněk a u kontrolního sklíčka potaženého PDL 4,2% buněk pozitivních na produkci ROS. V kultuře pěstované na PBDD bez potažení jsme žádnou pozitivitu nezaznamenaly. Při měření 14. den od izolace bylo pozitivních 20,3% buněk pěstovaných na PBDD potaženém PDL, 15,15% buněk pěstovaných na PBDD bez potažení a 16,38% buněk na kontrolním sklíčku potaženém PDL.

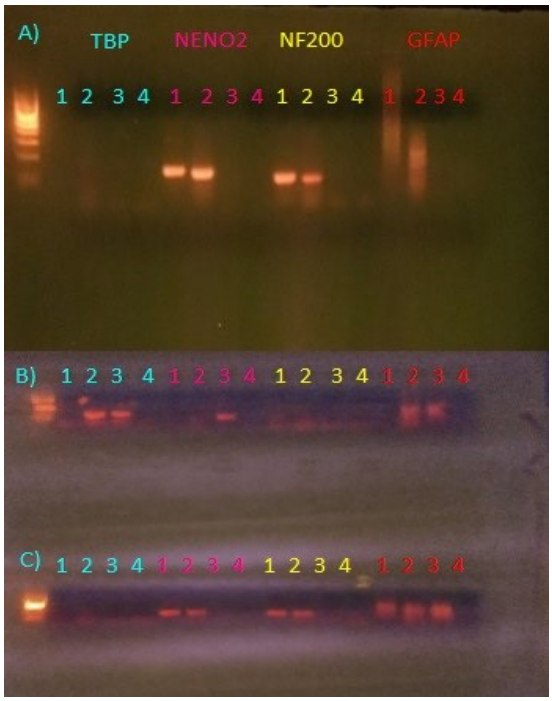
6.5 Stanovení exprese genů pro NF200, NENO2 a GFAP

Jedním ze způsobů, jak zjistit typové zastoupení buněk, které zregenerovaly po izolaci by byla detekce specifických markerů pomocí PCR. Plánovali jsme zjistit přítomnost mRNA pro NF200, který je exprimován hlavně u maturovaných neuronů, NENO2, který je spíše exprimován během neuronálního vývoje a pro GFAP, který se vyskytuje hlavně u astroglií. Jako kontrola nám sloužil gen pro TATA vazebný protein (TBP).

Izolace RNA ze vzorků probíhala dvojím způsobem, pomocí komerčního RNAeasy Micro kitu a pomocí metody fenol-chloroform. RNA byla izolována z buněk ihned po separaci neuronů z dospělých zvířat (stáří 18 týdnů) a mláďat (staří 1-3 dny). Později během optimalizace byla používána RNA z buněk linie 3T3 (linie imortalizovaných myších fibroblastů). Koncentrace RNA ve vzorku byla po izolaci změřena na NanoDropu. Na základě výsledků z NanoDropu jsme se rozhodli dále využívat pro izolaci RNA fenol-chloroform metodu z důvodu vyššího výtěžku totální RNA. Kvalita RNA izolované z dospělé tkáně byla výrazně horší, než kvalita RNA izolované z 3T3 buněk a postnatálních neuronů. Postnatální neurony jsme zde použili jako kontrolní RNA izolované z primárních buněk – tzn. systém bližší RNA izolované z dospělých neuronů než RNA z buněčné linie 3T3.

Po izolaci RNA následoval její přepis do cDNA pomocí reverzní transkripce. cDNA byla dále amplifikována pomocí metody konvenční PCR, úspěšnost amplifikace a přítomnost sledovaných genů byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy.

Teplota nasednutí primerů (Tab. 1) pro NF200, NEN02, GFAP a TBP byla optimalizována vytvořením teplotního gradientu od 50°C do 60°C.



Obr. 25: Vzorky jsou vždy poskládané po čtveřicích za sebou 1 - izolace přes RNAeasy Micro kit (adultní neurony), 2 - izolace přes fenol-chloroform (adultní neurony), 3 - izolace přes RNAeasy Micro kit (postnatální neurony), 4 - negativní kontrola. Vzorky popsané modrou barvou jsou sledovány na expresi TBP, vzorky popsané růžovou barvou jsou sledovány na expresi NENO2, vzorky popsané žlutou barvou na expresi NF200 a vzorky popsané červenou barvou na expresi GFAP. Pro PCR reakci A) byla použita teplota annealingu 55°C, pro reakci B) byla teplota annealingu 50°C a pro reakci C) 60°C. Cyklů proběhlo 40. Zdroj vlastní

Na základě výše uvedených výsledků (Obr. 25) jsme se rozhodli používat pro primery NENO2 a NF200 teplotu annealingu 55°C, pro GFAP 60°C a pro TBP 50°C. Při detekci mRNA zmíněných genů v experimentálních vzorcích jsme narazili na problém s nízkým výtěžkem a velmi špatnou kvalitou izolované RNA. Z těchto důvodů nebylo zatím možné získat věrohodné závěry a studie bude pokračovat další optimalizací izolace z malého množství buněk.

7 Diskuze

V mnoha odborných studiích lze nalézt informace o tom, jak úspěšně izolovat a následně kultivovat primární embryonální či časně postnatální neurony. Vzhledem k tomu, že se v této časné fázi vývoje v mozku vyskytuje jen omezené množství gliových buněk, lze získat téměř čistě neuronální kulturu pouhou homogenizací tkáně. Nicméně embryonální neuronální kultury nejsou příliš vhodný model pro studium s věkem souvisejících fyziologických změn, či pro studium jevů souvisejících s neurodegenerativními chorobami projevujícími se až v pozdějším věku. Pro tyto studie je vhodnější zvolit neurony izolované z dospělých zvířat. Izolace adultních neuronů je problematická vzhledem k tomu, že při ní dochází k narušení bohaté a rozvětvené neuronální sítě a během kultivace je poté obtížné pro neurony regenerovat. Zároveň je složité či takřka nemožné získat čistou neuronální kulturu bez přítomnosti glií a části debris. Jejich přítomnost v kultuře má poté negativní vliv na viabilitu neuronů.

V této práci jsme porovnávali dvě metody izolace primárních adultních neuronů, a to izolaci intrakardiální perfúzí a izolaci pomocí hustotního gradientu.

Pomocí intrakardiální perfúze jsme získali velké množství vitálních neuronů a zároveň se nám podařilo eliminovat debris, na druhou stranu kultura obsahovala mnoho gliových buněk. Buněk se nám tedy touto metodou podařilo vyizolovat více než pomocí hustotního gradientu (Obr. 9), avšak TUB3 pozitivních buněk (tedy neuronů) jsme zde měli méně (Obr. 8).

Pomocí hustotního gradientu se nám podařilo získat sice méne buněk (Obr. 9), o to čistější ovšem neuronální kultura byla (Obr. 8). Sledování kultury v čase (Obr. 7) tyto naše závěry potvrdilo.

Ačkoli u obou kultur (jak získané pomocí intrakardiální perfúze, tak pomocí hustotního gradientu) došlo mezi 7. a 14. dnem kultivace k nárůstu počtu gliových buněk, tak u kultury získané pomocí hustotního gradientu byl celkový poměr gliových buněk ku neuronům nižší než v případě intrakardiální perfúze. Z těchto námi získaných poznatků jsme usoudili, že pro porovnání vhodnosti různých nanodiamantových vrstev bude lepší využít izolaci neuronů pomocí hustotního gradientu.

K odhadnutí buněčného složení primárních kultur jsme kvantifikovali množství buněk exprimujících TUB3, MAP2 a GFAP, což nám mělo pomoci odhadnout, jaký je v kultuře poměr neuronů (TUB3 a MAP2 pozitivních buněk), astrocytů (GFAP pozitivních buněk) a gliových buněk negativních na GFAP (tedy ostatních typů gliových buněk). Z námi získaných výsledků vyvozujeme, že máme v kultuře relativně vysoké množství neuronů, kdy máme buněk pozitivních na TUB3 37,71% a buněk pozitivních na MAP2 25,1% (Obr. 10). Míra exprese TUB3 a MAP2 se v čase prakticky nemění (Obr. 11), což byl výsledek, který jsme očekávali, vzhledem k tomu, že v dospělém mozku nedochází k nárůstu počtu neuronů. Jelikož běžně neurony tvoří 10% dospělého mozku, můžeme z těchto výsledků vyvodit, že námi zvolený typ izolace pomocí hustotního gradientu byl úspěšný.

Na druhou stranu počet buněk pozitivních na GFAP je velmi nízký a zdá se nepravděpodobné, že bychom jich v kultuře měli jen 3,07% vzhledem k tomu, že GFAP všeobecně patří k jednomu z nejvíce syntetizovaných proteinů v mozku (astrocyty tvoří až 30% celkového objemu mozku). Ačkoli jsme pozorováním kultury pod světelným mikroskopem (Obr. 7) došli k závěru, že metoda izolace neuronů pomocí gradientové centrifugace obohacuje získaný izolát o neuronální buňky na úkor glií, není příliš pravděpodobné, že v kultuře nemáme prakticky žádné astrocyty. Na Obr. 13 pozorujeme velký rozdíl v počtu buněk mezi dnem 7 a dnem 14, což by ukazovalo na vysoký počet astrocytů v kultuře, nicméně tyto buňky nebyly pozitivně barveny na GFAP. Domníváme se proto, že GFAP pozitivních buněk v kultuře bude větší množství, než vychází na základě námi získaných dat a je třeba měření zopakovat.

Při vizualizace buněk exprimujících TUB3, MAP2 a GFAP nám vyšla velmi nízká pozitivita nejen na GFAP, ale i na MAP2, což bylo nejspíše způsobenou chybou v postupu. Data získaná pomocí průtokové cytometrie ukazují, že v kultuře máme průměrně 25% MAP2 pozitivních buněk (Obr. 10). Domníváme se tedy, že námi použitá protilátka není příliš vhodná pro konfokální mikroskopii, měření třeba zopakovat s využitím vhodnější protilátky.

Při pokusu o stanovení typového zastoupení buněk v naší primární kultuře pomocí exprese genů pro NF200, NENO2 a GFAP jsme narazili na problém s nízkým výtěžkem a velmi špatnou kvalitou izolované RNA. Z tohoto důvodu jsme nebyli schopní z námi získaných výsledků vyvodit věrohodné závěry a je třeba v rámci studie optimalizovat izolaci RNA.

Z výše uvedených důvodů tedy nelze určit přesné buněčné složení námi vyizolované primární kultury. Z výsledků jsme ovšem vyvodili, že přibližně 40% kultury tvoří buňky neuronálního původu.

Zjistit přesně, jak velkou plochu zabírají buňky na porézním diamantu, bylo vzhledem k tomu, že ho buňky porůstají ve více úrovních, prakticky nemožné. Interpretace výsledků je tedy poměrně složitá, a proto jsou námi prezentované závěry pouze odhad. Je možné, že jsme podstatnou část buněk na PBDD nezachytili, jelikož nebyly v hladině ostrosti, kterou jsme pod mikroskopem pozorovali. Během měření jsme také empiricky ověřili, že buňky mají tendence pokrývat spíše oblasti se zvýšeným profilem.

Z námi prezentovaných výsledků (Obr. 19) lze odhadnout, že buňky nasazené na PBDD potažené PDL regenerovaly (proliferovaly v případě glií) nejvíce v průběhu prvního týdne. Je možné, že pokud se jednalo o růst gliových buněk, došlo časem k vyčerpání jejich proliferační schopnosti a buňky postupně odumřely, což by vysvětlovalo snížení pokrytí sledované po 14 dnech kultivace. Jiným vysvětlením tohoto snížení by mohlo být odlepení buněk z důvodu dělení, nicméně toto vysvětlení nám přišlo málo pravděpodobné. Buňky nasazené na kontrolní sklíčko s PDL narůstaly v průběhu celého experimentu, což může být opět způsobeno proliferací případných gliových buněk. Tento závěr potvrzují i výsledky prezentované v Obr. 15, kde sledujeme vysoký nárůst počtu buněk na kontrolním sklíčku v průběhu celého experimentu. U PBDD bez pokrytí PDL se hodnoty pokrytí výrazně neměnily, i když 14. den kultivace lze sledovat určité snížení. Z toho usuzujeme, že máme v kultuře více neuronálních a méně gliových buněk než u kontrolního sklíčka pokrytého PDL. V průběhu celého experimentu jsme zaznamenali, že dva týdny jsou zřejmě hraniční hodnota pro přežití dospělých primárních neuronálních kultur na diamantových površích.

Výsledky z testů, kdy jsme měřili prosperitu primární kultury ukazují, že po dvou týdnech kultivace už začíná být buněčná kultura přestárlá a buňky začínají umírat nezávisle na typu povrchu. Během vyhodnocení míry apoptózy buněk (Obr. 22) pomocí aktivity exekučních kaspáz 3 a 7 pozorujeme její zvýšení v buňkách kultivovaných na PBDD bez PDL po dobu 7 dní. K určitému zvýšení jejich aktivity došlo i v kultuře PBDD potažených PDL. V kultuře po 14. dnech byly měřeny velmi vysoké hodnoty, které jsou na horní hranici citlivosti. Příčinou může být velmi vysoké množství buněk, které hromadně aktivovaly apoptózu z nedostatku prostoru/nutrientů, nebo i případná kontaminace v primární kultuře.

Tento závěr potvrzuje i měření oxidativního buněčného stresu, kdy pozorujeme mezi 7. a 14. dnem kultivace výrazný nárůst buněk produkujících ROS. Zároveň pozorujeme více pokrytý povrch, což by ukazovalo na to, že proliferací gliových buněk došlo k vyčerpání živin z média a tím pádem dochází ve vysoké míře ke zvýšení oxidativního stresu v buňkách a k jejich následnému úhynu.

8 Závěr

Cílem této práce bylo porovnat různé metody izolace primárních neuronálních kultur a jejich optimalizace. Dále si práce kladla za cíl zjistit, jaké jsou poměry buněčných typů v námi izolované primární kultuře a zhodnotit míru adheze a pokrytí sledovaných povrchů buňkami. Posledním cílem, který si tato práce kladla bylo zhodnocení prosperity izolované primární kultury v průběhu kultivace.

V práci jsme porovnávali dvě metody izolace primárních kultur, a to pomocí intrakardiální perfúze a pomocí hustotního gradientu. Na základě získaných výsledků jsme vyhodnotili, že pro potřeby našeho experimentu je vhodnější použít metodu izolace pomocí hustotního gradientu, kdy se nám podařilo získat čistší neuronální kulturu s nižším obsahem gliových buněk než v případě intrakardiální perfúze.

Naše výsledky ukazují na úspěšnou izolaci dospělých vitálních neuronů. Zhruba lze také odhadnout jejich zastoupení v kultuře. Podle našich měření kultura (izolovaná gradientem) obsahovala průměrně 37% buněk neuronálního původu (pozitivních na TUB3) a zastoupení primárních neuronů (pozitivních na MAP2) bylo průměrně 25%. Obsah astrocytů v naší kultuře byl pouze 3% v průměru, což je velmi nízká hodnota a bude dále verifikována.

Na diamantovém povrchu pokrytém PDL bylo v kultuře pozorováno větší množství buněk (a tedy i celková plocha povrchu pokrytá buňkami byla větší), avšak z toho, že v průběhu dvou týdnů se počet buněk na povrchu zvyšoval, soudíme, že PDL indukoval adhezi u většího množství gliových buněk, než tomu bylo v případě diamantového povrchu bez potažení PDL.

Prosperita sledované kultury rostla v průběhu prvního týdne prakticky u všech sledovaných povrchů. V průběhu druhého týdně ovšem v kulturách docházelo ve zvýšené míře k úhynu buněk, což bylo pravděpodobně způsobeno vyčerpáním živin z média.

Z námi získaných výsledků jsme došli k závěru, že potažení či nepotažení diamantového povrchu PDL nemá na buněčnou prosperitu kultury signifikantní vliv, ovšem na povrchu potaženém PDL jsou více přítomné gliové buňky schopné proliferovat, než na povrchu bez potažení. Z hlediska budoucího použití v regenerativní medicíně neurodegenerativních onemocnění se jeví jako vhodnější povrch bez povrchové úpravy PDL.

9 Seznam použité literatury

Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 739–767.

Bendali, A., Agnès, C., Meffert, S., Forster, V., Bongrain, A., Arnault, J. C., Sahel, J. A., Offenhäusser, A., Bergonzo, P., & Picaud, S. (2014). Distinctive glial and neuronal interfacing on nanocrystalline diamond. *PLoS ONE*, *9*(3). e92562

Blau, A. (2013). Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *18*(5), 481–492.

Brewer, G. J. (1997). Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, *71*(2), 143–155.

Bundy, F. P., Hall, H. T., Strong, H. M., & Wentorf, R. H. (1955). Man-Made diamonds. *Nature*, *176*(4471), 51–55.

Cameron, M., Kekesi, O., Morley, J. W., Tapson, J., Breen, P. P., van Schaik, A., & Buskila, Y. (2016). Calcium imaging of am dyes following prolonged incubation in acute neuronal tissue. *PLoS ONE*, *11*(5), 1–13.

Carabelli, V., Marcantoni, A., Picollo, F., Battiato, A., Bernardi, E., Pasquarelli, A., Olivero, P., & Carbone, E. (2017). Planar Diamond-Based Multiarrays to Monitor Neurotransmitter Release and Action Potential Firing: New Perspectives in Cellular Neuroscience. *ACS Chemical Neuroscience*, *8*(2), 252–264.

Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, *115*(1), 61–69.

Eide, L., & McMurray, C. T. (2005). Culture of adult mouse neurons. *BioTechniques*, *38*(1), 99–104.

Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). *Fischer-2003-In vitro cytotoxicit.pdf*. *24*, 1121–1131.

Gage, G. J., Kipke, D. R., & Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *65*, 1–9.

Graham, J. M. (2002). Isolation of rat and human hippocampal neuron fractions in a discontinuous density gradient. *TheScientificWorldJournal*, *2*, 1634–1637.

Hai, A., Shappir, J., & Spira, M. E. (2010). In-cell recordings by extracellular microelectrodes. *Nature Methods*, *7*(3), 200–202.

Hammarback, J. A., Palm, S. L., Furcht, L. T., & Letourneau, P. C. (1985). *Guidance of Neurite Outgrowth by Pathways of Su bst rat u m-Adsorbed Lami ni n*. *220*, 213–220.

Hébert, C., Mazellier, J. P., Scorsone, E., Mermoux, M., & Bergonzo, P. (2014). Boosting the electrochemical properties of diamond electrodes using carbon nanotube scaffolds. *Carbon*, *71*, 27–33.

Kirkpatrick, C. J., Bittinger, F., Wagner, M., Kohler, H., van Kooten, T. G., Klein, C. L., & Otto, M. (1998). Current trends in biocompatibility testing. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *212*(2), 75–84.

Kleinfeld, D., Kahler, K. H., Hockberger, P.E. (1988). Controlled Outgrowth of Dissociated Neurons on Patterned Substrates. *The Jounral of Neuroscience*, 8(11), 4098-4120.

Kondo, T., Kodama, Y., Ikezoe, S., Yajima, K., Aikawa, T., & Yuasa, M. (2014). Porous boron-doped diamond electrodes fabricated via two-step thermal treatment. *Carbon*, *77*, 783–789.

Kondo, T., Lee, S., Honda, K., & Kawai, T. (2009). Conductive diamond hollow fiber membranes. *Electrochemistry Communications*, *11*(8), 1688–1691.

Kowalska, M., Fabisiak, K., Wrzyszczyński, A., Banaszak, A., Szybowicz, M., Paprocki, K., Bała, W., & Bylicki, F. (2014). CVD diamond layers for electrochemistry. *Materials Science- Poland*, *32*(3), 475–480.

Kraft, A. (2007). Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. *International Journal of Electrochemical Science*, *2*(5), 355–385.

Krůšek, J., Dittert, I., Smejkalová, T., Kořínek, M., Gottfriedová, K., Freislebenová, H., Neuhöferová, E., Klimša, L., Sedláková, S., Taylor, A., Mortet, V., Petrák, V., Benson, V., & Petráková, V. (2019). Molecular Functionalization of Planar Nanocrystalline and Porous Nanostructured Diamond to Form an Interface with Newborn and Adult Neurons. *Physica Status Solidi (B) Basic Research*, *256*(3), 1–9.

Laimer, J., & Shimokawa, M. (1994). *Growth of diamond in a pulsed microwave discharge*. *3*, 231–238.

Liskova, J., Babchenko, O., Varga, M., Kromka, A., Hadraba, D., Svindrych, Z., Burdikova, Z., & Bacakova, L. (2015). Osteogenic cell differentiation on H-terminated and O-terminated nanocrystalline diamond films. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 869–884.

May, P. W. (2000). Diamond thin films: A 21st-century material. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *358*(1766), 473–495.

Musilová, J., Barek, J., & Pecková, K. (2009). Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. *Chemicke Listy*, *103*(6), 469–478.

Ojovan, S. M., McDonald, M., Rabieh, N., Shmuel, N., Erez, H., Nesladek, M., & Spira, M. E. (2014). Nanocrystalline diamond surfaces for adhesion and growth of primary neurons, conflicting results and rational explanation. *Frontiers in Neuroengineering*, *7*(JUN), 1–9.

Orr, D. J., & Smith, R. A. (1988). Neuronal maintenance and neurite extension of adult mouse neurones in non-neuronal cell-reduced cultures is dependent on substratum coating. *Journal of Cell Science*, *91*(4), 555–561.

Petrák, V., Vlčková Živcová, Z., Krýsová, H., Frank, O., Zukal, A., Klimša, L., Kopeček, J., Taylor, A., Kavan, L., & Mortet, V. (2017). Fabrication of porous boron-doped diamond on SiO2 fiber templates. *Carbon*, *114*, 457–464.

Sorribas, H., Braun, D., Leder, L., Sonderegger, P., & Tiefenauer, L. (2001). Adhesion proteins for a tight neuron-electrode contact. *Journal of Neuroscience Methods*, *104*(2), 133–141.

Specht, C. G., Williams, O. A., Jackman, R. B., & Schoepfer, R. (2004). Ordered growth of neurons on diamond. *Biomaterials*, *25*(18), 4073–4078.

Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Delling, M., Dityateva, G., Dityatev, A., & Schachner, M. (2002). Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *Journal of Cell Biology*, *159*(4), 649–661.

Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(1), 11–20.

Taylor, A. C., Vagaska, B., Edgington, R., Hébert, C., Ferretti, P., Bergonzo, P., & Jackman, R. B. (2015). Biocompatibility of nanostructured boron doped diamond for the attachment and proliferation of human neural stem cells. *Journal of Neural Engineering*, *12*(6), 66016.

Thalhammer, A., Edgington, R. J., Cingolani, L. A., Schoepfer, R., & Jackman, R. B. (2010). The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks. *Biomaterials*, *31*(8), 2097–2104.

Togashi, H., Sakisaka, T., & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhesion and Migration*, *3*(1), 29–35.

van Kooten, T. G., Klein, C. L., Köhler, H., Kirkpatrick, C. J., Williams, D. F., & Eloy, R. (1997). From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: Cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *8*(12), 835–841.

Vanhove, E., de Sanoit, J., Arnault, J. C., Saada, S., Mer, C., Mailley, P., Bergonzo, P., & Nesladek, M. (2007). Stability of H-terminated BDD electrodes: An insight into the influence of the surface preparation. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, *204*(9), 2931-2939.

Varoqueaux, F., & Brose, N. (2002). *Encyclopedia of the human brain*. *4*, Elsevier, 531–544.

Voss, A., Wei, H., Müller, C., Popov, C., Kulisch, W., Ceccone, G., Ziegler, C., Stengl, M., & Reithmaier, J. P. (2012). Influence of the surface termination of ultrananocrystalline diamond/amorphous carbon composite films on their interaction with neurons. *Diamond and Related Materials*, *26*, 60–65.

Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherins as Modulators of Cellular Phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *19*, 207–235.

Yagi, I., Notsu, H., Kondo, T., Tryk, D. A., & Fujishima, A. (1999). Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *473*(1), 173–178.

Yanagisawa, M., & Yu, R. K. (2007). The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology*, *17*(7). 57-74.

Yang, N., Yu, S., MacPherson, J. v., Einaga, Y., Zhao, H., Zhao, G., Swain, G. M., & Jiang, X. (2019). Conductive diamond: Synthesis, properties, and electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, *48*(1), 157–204.

Yavin, E., & Yavin, Z. (1974). Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on poly lysine-coated surface. *Journal of Cell Biology*, *62*(2), 540–546.

Yu, Y., Wu, L., & Zhi, J. (2014). Diamond nanowires: Fabrication, structure, properties, and applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, *53*(52), 14326–14351.