

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Gottfriedová

Biokompatibilita platformy tvořené diamantovými nanokrystaly s nervovými buňkami.

Biocompatibility of diamond-based platforms with neuronal cells.

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Mgr. Veronika Benson, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Cesta k listům papíru, které držíte v rukou, byla hodně dlouhá a náročná. A neprošla bych ji, kdybych neměla okolo sebe lidi, kteří mi ukazovali směr a drželi mapu. Je Vás hodně. Takže to vezmu jmenovitě, děkuji mojí školitelce Verče, která se mnou má trpělivost a akceptovala, že jsem na tom svém výletě měla chvílky, kdy jsem jen tak seděla na kameni u cesty. Děkuji svému příteli Martinovi, on mi držel tu pomyslnou mapu, a když jsem ji roztrhala, vytiskl mi novou. Pak dvěma ženám, které mi dělají horskou službu při cestě životem, děkuji Lenko a Jano. A rodině, která mě k tomu dokopala a řekla, ať už zapnu čelovku a hledám závěr své bakalářské práce i ve chvíli, kdy jsem myslela, že je to nemožné.

Prohlášení

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

V Praze, 09.05.2018

Podpis

Abstrakt

Existuje mnoho typů platform, které jako povrch, bezprostředně interagující s buňkami, využívají diamant. Hlavní rozdíly jsou v typu použitých diamantů. Jedná se o nanodiamanty a ultrananokrystalické diamanty, které mohou být různě strukturované a také dopované o atomy boru.

Ačkoli by pravděpodobně bylo hezké, kdyby na platformách nemusela být žádná povrchová úprava. Podle výsledků výzkumů to nevypadá jako lehký úkol, výzkum v tomto směru probíhá, ale zatím bez významných úspěchů. Nejlepších výsledků se při kultivaci buněk na platformách dosahuje, když je povrch potažen alespoň částčkami molekul extracelulární matrix. Jako o trošku méně účinné se jeví využití molekul, které na základě elektrostatických sil navodí adhezi buňky. Jedná se například o molekulu lysinu.

Dalším krokem ve výzkumu je ověření, zda povrchy, které se v první fázi zkoumání jeví jako biokompatibilní, budou i po dopování stále optimální pro růst buněk. Z níže uvedených výzkumů zatím vyplývá, že například dopování nanodiamantu borem nemá významný vliv na prosperitu buněk.

Klíčová slova

nanodiamant, nervová buňka, biokompatibilita, mikroelektroodové pole

Abstract

In these days exists few types of platforms, which have on surface diamond. The main difference of these platforms is in types of diamonds, which are uses. It can be nanodiamonds and ultrananodiamonds. These crystals can make various structure and also can be doped with boron atoms.

Although it would be propably great, if there were no coating molecule, it isn't easy. Best results came from researches, where on platform were at least fragments of extracellular matrix molecules. Not so great outcomes are when on platform is molecule, which induce adhesion of cell only on the base of electrostatic interactions. Like electrostatic induction molecule is mostly use lysine.

Next step in research is verified, if surfaces are after doping still biocompatible. From articles cited bellow outcome, that it looks like doping with atoms of boron have no significant influence on prosperity of cells.

Keywords

nanodiamond, neuronal cell, biocompatibility, microelectrode array

Seznam zkratek

Zkratka	Celý název
CAM	Cell adhesion molekule
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetate
CSPGs	Chondroitin sulfate proteoglycan
CVD	Chemical vapour deposition
DND	Detonation nano diamonds
ECM	Extra cellular matrix
GAG	Glykosaminoglykany
GFAP	
HPHT	High pressure high temperature
LDH	Laktát dehydrogenáza
MEA	Micro electrode array
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NCD	Nanocrystalline diamid
ND	Nanodiamond
OMO	Homoepitaxiální
UNCD	Ultra nanocrystalline diamond
EGF	Epidermální růstový faktor
FGF2	Základní růstový fibroblastový faktor

Obsah

1. Úvod	1
2. Co to vlastně je Parkinsonova choroba	2
3. Buňky CNS.....	3
3.1. Neurony.....	3
3.2. Neurální kmenové buňky – NSC neural stem cells.....	3
3.2.1. Původ neurálních kmenových buněk	4
3.2.2. Neurosféry.....	4
3.3. Gliové buňky.....	4
3.4. Makroskopické znaky napovídající o viabilitě buněk	4
3.5. Bazální ganglia	5
4. Buňky a adheze.....	6
4.1. Mezibuněčná adheze.....	6
4.2. Cell adhesion molecules – CAMs.....	6
4.2.1. CAM závislé na Ca^{2+}	7
4.2.2. CAM nezávislé na Ca^{2+}	8
5. Extracelulární matrix – ECM	9
5.1. Extracelulární matrix v CNS	9
6. Platformy – obecně	9
6.1. Diamant, hlavní složka platforem.....	9
6.1.1. Jak se vyrábí diamanty pro tvorbu platforem	10
6.2. Nanodiamant.....	10
6.3. Typy diamantových platforem	11
6.4. Dělení NCD platforem podle povrchové úpravy	11
6.4.1. Platformy s fragmenty ECM nanesenými na povrchu platformy	11
6.4.2. Platformy potažené molekulou, která navozuje adhezi buňky k povrchu na základě elektrostatických sil.....	12
6.4.3. Platformy, jejichž struktura materiálu sama o sobě navozuje adhezi buněk.....	12
6.5. NCD platformy	13
6.5.1. Jak se daří buňkám na NCD platformách?.....	13
6.5.2. NCD platformy s uhlíkovými nanotrubičkami.....	15
6.5.3. Dopované nanodiamantové destičky	16
6.6. Často používaná média a suplementy.....	16
6.7. Měření viability buněk na NCD destičkách.....	16

6.8.	Typy buněk diferencovaných na NCD hodnocení jejich přichycení	17
7.	Studie biokompatibility platforem	18
7.1.	Z nanokrystalických diamantů NCD.....	18
7.1.1.	Bez povrchové úpravy pouze s úpravami hydrofobicity	18
7.1.2.	S povrchovou úpravou.....	18
7.2.	Studie biokompatibility platforem z ultra nanokrystalických diamantů UNCD	18
7.3.	Studie biokompatibility platforem z polykrystalických diamantů PCD	18
8.	Diskuze.....	19
	Citovaná literatura	20

1. Úvod

Otázkou posledních let, se stávají neurodegenerativní onemocnění, která postihují populaci středního a vyššího věku. Ačkoli se vyvíjí farmakoterapeutická léčba, neopominutelná je i terapie pomocí mozkových sond, které do budoucna mohou těmto pacientům pomoci.

Ve své bakalářské práci se zaměřím zejména na vývoj nanodiamantových platforem, které snad do budoucna budou mít své uplatnění při hloubkové stimulaci mozku v rámci Parkinsonovy choroby.

2. Co to vlastně je Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je onemocnění, které obecně vzato postihuje centrální nervovou soustavu. Primárním projevem této nemoci je pozvolná neschopnost ovládat pohyb těla.

Za řízení pohybu jsou z velké části zodpovědná bazální ganglia, která jsou regulována dopaminem. A právě dopaminu je při této chorobě nedostatek, z důvodu pozvolné ztráty neuronů v oblasti *Substantia nigra*, které dopamin tvoří.

Stav člověka s Parkinsonovou chorobou je proměnlivý a jeho potíže se mohou v určitých fázích dne mírnit. Jedná se o onemocnění, na které v současné době není léčba, která by zaručovala úplné uzdravení, existuje pouze léčba udržovací, která mírní příznaky. Jedná se o aminokyselinu L dihydroxy-fenylalanin, která funguje jako prekurzor dopaminu, který se v mozku přemění na dopamin. Nevýhoda této léčby je jednak v nutnosti postupně navyšovat dávky léku, vedlejší účinky a také to, že nelze účinek této léčby upravovat dle aktuálních potřeb uživatele. Jinak řečeno, když má pacient fázi, kdy jsou příznaky minimální, nelze utlumit účinek léku.

K chirurgickým zákrokům se samozřejmě přistupuje jen v nejkrajnějších případech, kdy nezabírá medikamentózní léčba. Jednou z chirurgických možností léčby je zavedení elektrod do mozku. Tyto elektrody pak mají tu schopnost, že stimulují bazální ganglia.

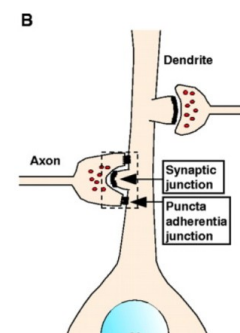
3. Buňky CNS

3.1. Neurony

Při testování elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku, je největší důraz kladen na neurony. Protože právě s neurony by platformy pravděpodobně měly být primárně ve spojení. Neurony jsou plně diferencované buňky, které již nemají schopnost proliferace. Neuron se skládá z těla, kterému se říká také *soma*, dendritů, které vedou signál směrem do buňky a axonů, které vedou signál z buňky, a někdy se jim říká neurity.

Výše zmíněné dendrity se větví do dendritických trnů, které přijímají postsynaptický signál. Axony mají na svém začátku tzv. axonový hrbol, kterým je axon propojen s tělem neuronu. V tomto místě vzniká akční potenciál, který se axonem vede k efektorové jednotce – ať už je to jiný neuron nebo svalová buňka. Axony mají po téměř celé délce gliové buňky, které tvoří Schwannovy pochvy. Schwannovy pochvy jsou zásadní pro rychlé vedení vzruchu, ale přesto se u některých neuronů přirozeně nevyskytují.

Jednotlivé neurony jsou propojeny pomocí speciálních mezibuněčných spojů, kterým se říká synapse. Synapse se utváří spojením axonu a dendritického trnu, kdy počáteční interakce axonu a dendritu navodí signalizaci na základě, které se začnou specializovat membrány v tvořící se synapsi a začne se spojení upevňovat (1). Synapse je držena pospolu díky dvěma typům adhezních struktur. Jsou to synaptické spoje a puncta adherentia junctions (1). Synaptický spoj je spojen s presynaptickou zónou, kde je uloženo mnoho váček obsahujících neurotransmitery. Presynaptická zóna je také bohatá na vápníkové kanály (1).



Obrázek 1
spojení synaptická a spojení
puncta adherentia (77)

? Při kultivaci neurálních buněk, ne jen neuronů mohou vycházet nepříznivé výsledky kvůli lyzi buněk, což má za následek okyselení media anebo uvolnění cytotoxického glutamátu (2).

3.2. Neurální kmenové buňky – NSC neural stem cells

Při vývoji a testování nanodiamantových platforem *in vitro* se většinou využívá neurálních kmenových buněk, ačkoli tyto buňky s vysokou pravděpodobností, v případě biokompatibility *in vivo* s elektrodou ve styku nebudou. Neurální kmenové buňky jsou nediferencované sebeobnovující se a tripotentní. NSC mají schopnost dát vznik neuronům, astrocytům a oligodendrocytům, čemuž se říká asymetrické dělení. Mohou se také dělit symetricky, kdy z jedné kmenové buňky vzniknou dvě.

Diferenciace probíhá zejména během embryonální fáze a v malém množství i během následujícího života. Neurální kmenové buňky jsou po embryonální fázi po většinu času v takzvané spící formě (3). V případě lokálního poranění jsou schopné proliferace a následné diferenciace.

? Jedna z možností, jak využívat elektrody je kultivace kmenových buněk na elektrodě a indukce diferenciace do neuronů a gliových buněk, které se po implantaci integrují do hostitelské tkáně (4).

3.2.1. Původ neurálních kmenových buněk

Pro účel výzkumu biokompatibility nanodiamantových platforem se získávají neurální kmenové buňky z fetálního nebo dospělého myšího centrálního nervového systému a následně se kultivují.

U vyvíjejícího se mozku se kmenové buňky nacházejí v takzvané ventrikulární zóně (3). V mozku, který je již vyvinutý vznikají nové neurální kmenové buňky v oblasti *gyrus dentatus* v hippocampu a v subventrikulární zóně, která se táhne podél první a druhé komory mozkové. Právě z *gyrus dentatus* dochází k obnově nervové tkáně například při neurodegenerativních onemocněních u hlodavců, buňky z něj migrují k místu poranění (5). V případě kultury hlodavčích NSC pocházejících ze subventrikulární zóny dospělého jedince, je pro jejich úspěšné pasážování a udržení jejich schopnosti sebeobnovy je nutné do média přidávat buď epidermální růstový faktor EGF anebo základní růstový fibroblastový faktor FGF2. Na diferenciaci NSC do astrocytů se významně podílí glykoprotein GP130 někdy v literatuře označovaný jako CD130. Problémem ale je, že většina neurodegenerativních onemocnění se projevuje u starších jedinců, u kterých se vlivem stárnutí snižuje schopnost neurogeneze v této oblasti a tudíž i schopnost obnovy postižené tkáně (6).

3.2.2. Neurosféry

Neurosféry jsou neurální kmenové buňky, které *in vitro* rostou ve sférovitých útvech, které se vznášejí. U buněk, které jsou schopné neurosféry tvořit se prokázala produkce GFAP (7).

3.3. Gliové buňky

Gliové buňky jsou několika typů. Jsou to mikroglie, astrocyty, kterým se někdy říká makroglie a oligodendrocyty. Jsou schopné pouze velmi pomalé proliferace. Mikroglie jsou velmi pohyblivé a mají schopnost fagocytózy. Astrocyty mají hvězdicovitý tvar a mají schopnost vychytávat neurotransmitery ze synaptické štěrbin (1). Tento typ gliových buněk je také důležitý při utváření synapsí (1). Astrocytů jsou minimálně tři typy a to vláknité, které jsou lokalizované v bílé hmotě, protoplazmatické, které jsou v šedé hmotě (8) a radiální glie, což jsou bipolární buňky. Ačkoliv radiální glie mají na svém povrchu receptory pro neuropřenašeče, metabotropní receptory a iontové kanály nevytváří akční potenciály (9). Při testování biokompatibility NCD elektrod, jsou v kulturách gliové buňky také. Je ale důležité, aby po nasazení *in vitro* na platformu nepřerůstaly neurony, které se nedělí.

3.4. Makroskopické znaky napovídající o viabilitě buněk

V souvislosti se stanovováním biokompatibility mě napadá, jestli se dá už od pohledu na buňky mikroskopem říct, v jakém stavu se nachází. Jestli se jim v rámci možností daří nebo nikoli.

Každý typ z výše zmíněných buněk se ve stejných podmínkách chová jinak, což vychází z jejich odlišného funkčního určení. Například v médiu bez séra se podpoří růst neuronálních buněk, ale gliovým buňkám toto prostředí vyhovovat nebude. Zde je pak na místě otázka, jak udržovat kulturu například s gliovými buňkami a zároveň neurony tak, aby oba typy buněk mohly fungovat co nejpodobněji podmínkám *in vivo*. Samozřejmě napodobit přesně podmínky, ve kterých by se potenciálně platforma nacházela *in vivo* je nemožné, ale alespoň základní prostřední napodobení je podmínkou.

? Při testování biokompatibility neuronů s NCD platformami se používá médium bez séra, které potlačuje růst gliových buněk. Dělá se to tak z toho důvodu, aby dělicí se gliové buňky nepřerůstaly neurony, kterým nepřítomnost séra nevádí z důvodu obsaženého suplementu – například B27.

Zpět ale k první otázce, zda se dá odhadnout stav kultury pouhým pohledem. První bez mikroskopu viditelná věc je, že v případě, že v kultuře dochází k mohutné apoptóze projeví se to už na barvě média. Médium se na základě nízkého pH v cytoplazmě okyselí a mírně změní zabarvení. Při pohledu na neuronální buňky se soustředíme na jejich adhezi k povrchu. V případě, že povrch platformy není pro buňky vhodný, začnou tvořit takzvané klastry. Jedná se o uskupení mnoha neuronů, které dávají přednost mezibuněčnému kontaktu před adhezí k povrchu. Tyto struktury jsou snadno pozorovatelné ve světelném mikroskopu díky jejich velikosti. Klastry mohou být vzájemně propojené a tvořit jednoduchou neurální síť. Dalším projevem nepříliš vhodného prostředí je v případě kultury gliových buněk a neuronů navrstvení neuronálních buněk na buňky gliové. Ačkoli buňky tvoří síť na platformě, gliové buňky tvoří „odstínění“ proti impulzům, které by pocházeli z platformy. Je to podobné, jako v případě současně používaných elektrod, které jsou postupně obalované gliovými buňkami, které tvoří gliovou jizvu.

Jestliže se neuronům na platformě daří, jsou zploštělé, mají mnoho výběžků, kterými se vzájemně propojují a tvoří tak neuronální síť. Nicméně takto viditelná síť pravděpodobně ještě nezaručuje její funkčnost. Může se stát, že buňky budou vzájemně propojené, ale nebudou schopné si vzájemně předávat vzruchy, což by byl zásadní problém. V optimálních podmínkách se nebudou v médiu vznášet apoptické buňky. Už apoptóza části buněčné populace může spustit řetězovou reakci, na základě snížení pH kultivačního roztoku.

3.5. Bazální ganglia

Bazální ganglia jsou struktury (uzliny) v šedé kůře koncového mozku, která se uplatňuje primárně při řízení pohybu. Mezi bazální ganglia patří oblasti *nucleus caudatus*, *putamen* a *globus pallidus* v širším pojetí mezi bazální ganglia lze řadit i *substantia innominata Reicherti*, *nucleus subthalamicus* a *substantia nigra*, dělí se dále na dvě jádra, a to *pars compacta*, která je v souvislosti s Parkinsonovou chorobou zásadní pro její schopnost produkovat dopamin a *pars reticularis* (10). Neurony *pars compacta* dopamin přenášejí axonálním prouděním do *nucleus caudatus* a *putamen* (11).

Bazální ganglia pravděpodobně pohyb pouze neřídí, ale také tento pohyb plánují, jelikož jejich aktivace začíná ještě před začátkem samotného pohybu. Právě do oblasti bazálních ganglií jsou stimulovány při hloubkové stimulaci mozku, jedná se o *globus pallidus* nebo subthalamická jádra a v případě pouze tremoru ventrálního intermediální jádra.

4. Buňky a adheze

V průběhu testování platform se výzkumné týmy snaží navodit adhezi neuronů. Někdy se přilnutí buněk daří i bez speciálních povrchových molekul, a někdy neuronální buňky nepřilnou ani tak, jako je tomu v případě, kde myši dospělé neuronální buňky se při růstu v kultuře raději nedostávají do kontaktu s povrchem platformy, ačkoli je potažen poly-L-ornitinem a vrství se na gliové buňky, které jsou v kontaktu s povrchem (12).

Zásadní pro růst buněk je také přítomnost extracelulární matrix, jejíž lokální narušení způsobuje programovanou buněčnou smrt přilehlých buněk. Tento případ apoptózy se nazývá anoikis (deattachment induced apoptosis). Při testování této teorie s cévními epiteliálními buňkami *in vivo* se ukázalo, že apoptizující buňky jsou v kontaktu částicemi extracelulární matrix, a tedy k vyvolání apoptózy stačí rozrušení ECM (13). Je tedy pravděpodobné, že stejný princip funguje i u neuronálních buněk.

Za jak dlouho buňky adherují k povrchu?

U myších neuronálních buněk *in vitro* je pro adhezi zásadních prvních 10 minut po nasazení do média, pokud k adhezi nedojde během této doby, pravděpodobnost, že se buňky následně přichytí je nízká (12).

? Při testování adheze dospělých neuronů by se mělo brát v potaz, že mají obecně tendenci místo samostatného růstu se shlukovat. Je pravděpodobné, že je to dáno nutností signálu od sousedních buněk (12). Tento fakt lze zmírnit použitím menšího množství média z důvodu menšího zředění exkretovaných faktorů a zároveň většího množství buněk v kultuře (12).

4.1. Mezibuněčná adheze

Kromě přichycení buněk k podkladu, je také důležitá mezibuněčná adheze. Aby buňky mezi sebou komunikovaly a byly schopné tvořit funkční neuronální síť. Při výzkumu je snaha, tuto adhezi mezi neurony podpořit a aby tato podpora byla možná, musí se alespoň trochu pochopit mechanismus tohoto typu adheze. Tímto směrem tedy jde výzkum také. Například v jednom z výzkumů zjistili, že v případě kultury progenitorových buněk krysího hipokampu, NCAM inhibují proliferaci a zvyšují množství vzniklých neuronů (14). Zároveň kontinuální přítomnost FGF2 spolu s N-CAM nebo neurotrofním faktorem odvozeným z mozku, které působí více než 12 dnů na kulturu, značně zvyšují množství jak progenitorových buněk, tak neuronů (14). Důležité je ale hlavně zjištění, že takto vzniklé neurony, pak tvoří neurotransmitery, neurotransmitterové receptory a synaptické proteiny, které jsou stejné jako ty, které produkují maturované neurony hipokampu (14). Lze tedy takto *in vitro* nasimulovat prostředí, ve kterém by se mohly elektrody vyskytovat a následně teoreticky takto osazené elektrody implantovat, což by mohlo zvýšit šance na přijetí implantátu. Ačkoli elektrody pro terapii Parkinsonovy choroby se umisťují do jiných oblastí mozku, tato analogie by mohla fungovat i pro bazální ganglia.

4.2. Cell adhesion molecules – CAMs

Když člověk poprvé vidí mikroskopem buňky, jak jsou přilnuté k podkladu v Petriho misce, jednou z otázek, které ho napadnou je, jakým způsobem se k povrchu přichycují. Odpovědět na tuhle úplně jednoduchou otázku, není vůbec lehké a dodnes asi neznáme všechny mechanismy, jak buňky k povrchu adherují.

Dnes už je známo, že na adhezi buněk k podkladu účastní takzvané CAM molekuly, které jsou umístěné na buněčném povrchu. Aby v nich nebyl chaos, dělí se na CAM, které jsou závislé na vápníku a na CAM nezávislé na vápníku.

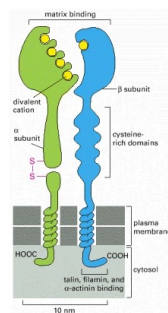
4.2.1. CAM závislé na Ca^{2+}

Cadheriny

Mezi tyto molekuly patří například cadheriny, které pro navázání se na ligand potřebují kation vápníku. V případě, že vápník nemají, „sbalí“ se do konformace, která je rozštěpena protézami. Na svém N konci, který vyčnívá ven z buňky, mají vazebnou sekvenci pro ligand. Cadheriny jsou CAM, které zprostředkovávají spojení buňka-buňka a jsou lokalizované v oblasti puncta adherentia junctions a ve spojení neuron – gliová buňka (1). Jen u obratlovců je známo přes 100 druhů cadherinů (15). Pro cadheriny je typické pět opakování cadherinových domén a jeden průchod membránou. Cateniny jsou intracelulárně spojeny s cytoskeletem pomocí proteinů, kterým se říká kateniny a jejich funkcí je regulace polymerizace aktinu (1).

Integriny

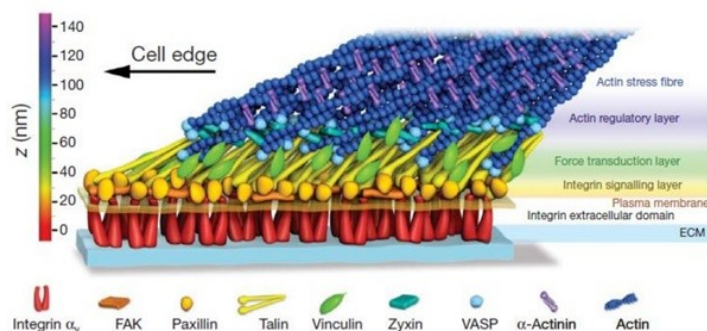
Dalším zástupcem CAM jsou integriny, které jsou transmembránové a buňka je používá k navázání sebe sama na ECM nebo na jinou buňku a tím udržují celistvost tkání. Z pohledu vývoje nanodiamantových platform jsou zásadní pro přisednutí buněk k povrchu. Integriny po navázání ligandu mohou regulovat organizaci cytoskeletu, buněčný cyklus nebo distribuci receptorů na membráně spolu s receptory pro růstové faktory. Integriny aktivují tyrosin kinázy, které jsou vnitrobuněčnými přenašeči signálu.



Obrázek 2
Integrinový receptor (16)

Integriny mají běžně β a α podjednotky. Každá z těchto dvou podjednotek se vyskytuje v různých pevně daných modifikacích. Konkrétně u savců se α podjednotka nachází ve 24 modifikacích a β podjednotka v devíti (16). Výsledkem je mnoho druhů integrinových receptorů podle kombinace podjednotek.

V případě, že se buňka chce navázat na ECM, ligandem jejího integrinového receptoru může být laminin, kolagen, vitronektin nebo fibronektin. Integriny patří mezi CAM receptory, které pro svou funkci vyžadují přítomnost dvojmocných iontů, podle toho o jaký integrin se jedná jsou to buď Ca^{2+} nebo Mg^{2+} kationty. Tuto buněčnou adhezi pomocí integrinů nazýváme fokální a spolu s integriny se jí účastní další cytoplazmatické proteiny jako vinkulin, talin, nebo paxillin a celá tato struktura (integrin, ligand intergrinu a plakový protein) je pospojovaná s aktinovým cytoskeletem.



Obrázek 3
Komplex integrinů a dalších proteinů účastnících se fokální adheze (76)

Proč by nás měly integriny zajímat?

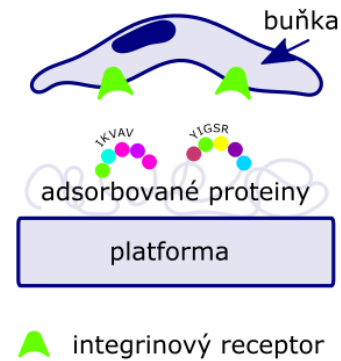
Z toho důvodu, že se účastní adheze buněk nervové tkáně a ECM (17) a následného přenosu informace z ECM do buňky.

4.2.2. CAM nezávislé na Ca^{2+}

Jedná se o členy rodiny imunoglobulinů. Můžeme zmínit nectiny, které zprostředkovávají interakci buňka-buňka a s aktinovým cytoskeletem jsou propojeny pomocí proteinu afadinu a nebo neurogliny, které se nacházejí v postsynaptické části a tvoří spojení s β neurxinem a podílí se tak *in vitro* na formování synapse (1). Dalšími CAM tohoto typu jsou například nectin-like molecules, NCAM, Syg-1, Syg-2 a Sidekicks (1).

? Jaké proteiny ECM preferují neuronální buňky

V případě, že je potřeba platformy potáhnout proteiny ECM, je zásadní vědět, které aminokyselinové skupiny jsou pro jejich adhezi zásadní. Neuronální buňky preferují sekvence YIGSR a IKVAV lamininu, na které se navazují integrinovými $\alpha_6 \beta_1$ a $\alpha_7 \beta_1$ receptory (18). Pro nanášení molekul například zmiňovaného lamininu přesně na dané místo lze použít metodu mikrokontaktního tisku.



Obrázek 4
interakce mezi neuronální
buňkou s integriny a lamininem -
překresleno podle (78)

5. Extracelulární matrix – ECM

Jak jsem zmínila výše, pro úspěšný růst buněk je také důležitá extracelulární matrix. Ale co to vlastně je za hmotu? Je to hmota, ukládající se v mezibuněčných prostorech tkání a tvoří bazální laminu. Skládá se z molekul glykosaminoglykanů a glykoproteinů. A k molekulám glykoproteinů se buňky přichycují pomocí integrinových receptorů umístěných buněčném povrchu. Ale funkcí ECM není pouze to, že pakliže se naruší, způsobí to apoptózu. Extracelulární matrix je pro tkáň důležitá z mnoha důvodů, podílí se na homeostáze, přichycení buněk, jejich růstu proliferaci a diferenciaci, polarizaci, migraci a rozmístění (19).

5.1. Extracelulární matrix v CNS

V mozku ECM ovlivňuje strukturní a funkční plasticitu a funguje jako degradovatelný stabilizátor neuronů. Může například podporovat růst dendritických filopodií a trnů (20). ECM je také důležitá v rámci učení a paměti, protože reguluje a stabilizuje synaptickou plasticitu a vývoj myelinových buněk (20).

Aby šlo bazální laminu na platformách „nasimulovat“, je potřeba vědět, které proteiny extracelulární matrix jsou pro daný účel nejvhodnější. Extracelulární matrix je tvořena molekulami dvou tříd. Jedná se o glykosaminoglykany (GAG) a vláknité proteiny. GAG se dále dělí do několika skupin podle typu cukru, počtu vazeb mezi nimi a lokalizace a počtu sulfátových skupin. Hlavní typy GAG jsou hyaluronan, který neobsahuje sulfát, chondroitin sulfát, dermatan sulfát, heparan sulfát a keratin sulfát (21). A mezi vláknité proteiny patří laminin, fibronectin, kolagen a elastin (22). A mezi posledními zmíněnými je molekula, která se pro účely testování platform často používá. Molekula, o které mluvím, je laminin, který je hlavní složkou bazální laminy. Ale to, že je hlavní složkou by nemuselo být tak zásadní jako to, že *in vitro* podporuje expanzi, migraci a diferenciaci neurálních kmenových buněk (23). Také způsobují růst neuritů na základě aktivace integrinových receptorů (24).

6. Platformy – obecně

Neurální implantáty (elektrody) se používají pro přemostění postižené nervové tkáně, zároveň ale také pro modifikaci a obnovení neurologické funkce pomocí elektrické stimulace reagující na vstupující podněty z tkáně (25). Jinak řečeno, přístroje umí zaznamenávat elektrickou aktivitu buněk a také buňky elektricky stimulovat, což umožňuje omezení projevů nemoci (26).

Při vývoji elektrod, které budou kooperovat v lidském těle s neurony, je důležité, aby materiál byl elektricky aktivní a zároveň biokompatibilní (27). V dnešní době se implantáty vyrábějí z ušlechtilých kovů a jejich slitin, což jim propůjčuje dlouhou životnost a odolnost proti korozi (28). Nevýhodou těchto současných elektrod, je jejich obalování astrocyty, z důvodu lokálního zánětu (29). Napojení na neuronální buňky se pak stává velmi obtížné. Zároveň zde velmi často vzniká tzv. gliová jizva, která také velmi omezuje vedení signálu z elektrody (30).

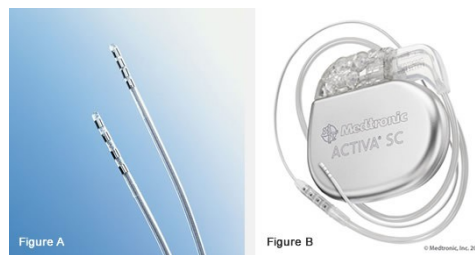
Na obrázku vpravo jsou v části A vlákna, která mají na svém konci každá čtyři elektrody, které stimulují požadovanou oblast v mozku. V části B je samotný stimulátor s baterií, která neumožňuje opětovné dobíjení. Konkrétně v tomto případě se jedná o model, který se používá jak pro stimulaci u pacientů s Parkinsonovou chorobou, tremorem, dystonií a také výrobce uvádí použití při obsedantně kompulzivní poruše (31).

Budeme-li mluvit obecně, tak se materiály pro jakékoli implantáty dělí na dvě skupiny: na materiály bioinertní, které nepodporují adhezi buněk (například nitrooční čočky) a materiály bioaktivní, které se pokoušejí napodobovat například strukturu ECM, jinými slovy buňka mohou navést k proliferaci, diferenciaci nebo apoptóze (32) (18). U elektrod se tedy snažíme o materiál bioaktivní. Tyto bioaktivní materiály na sobě ale nemusejí vždy mít molekuly ECM, k adhezi buněk lze používat například i polylysin, který je nabitý kladně a na sebe přitahuje negativně nabitou membránu buňky, která pak k povrchu platformy adheruje.

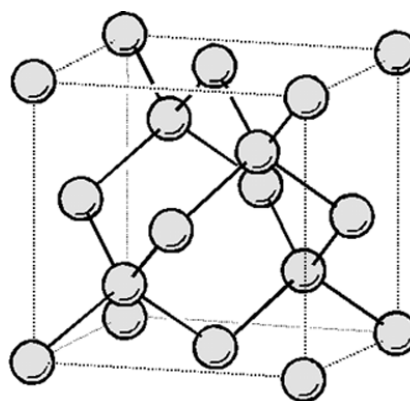
6.1. Diamant, hlavní složka platform

V minulém odstavci jsem obecně uvedla, co si představit pod pojmem platformy pro buněčnou stimulaci. A teď by se hodilo říct, z čeho se tyto platformy, o kterých v této práci bude řeč vlastně skládají. Hlavní složkou je uhlík, ve své krystalické podobě – diamantu.

Diamant je nerost, který se skládá pouze z krystalického uhlíku uspořádaného do kubické soustavy. Velmi pravděpodobně diamanty v přírodě vznikají za velmi vysokých teplot – a když říkám velmi vysokých, myslím tím 900 až 1300°C. Také tlak není při růstu krystalu zanedbatelný a pohybuje mezi 4,5 – 6 GPa. Ačkoliv v přírodě a v průmyslové výrobě vznikají za velmi extrémních podmínek, jejich výroba není nijak významně finančně náročná.



Obrázek 5
Jeden z typů elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku (75)



Obrázek 6
Kubická soustava (79)

O diamantu by se s trochou nadsázky dalo říct, že je to takový „super nerost“. Je chemicky inertní, velmi mechanicky odolný což se odráží už v původu jeho názvu, který pochází z řeckého slova *adámas*, což znamená nezničitelný. Další vítanou vlastností je jeho propustnost pro IČ až po UV záření. Ptáte se, proč je propustnost pro fotony těchto vlnových délek užitečná? Například z toho důvodu, že pokud je potřeba *in vitro* fluorescenčně značit buňky například pro zjišťování závislosti elektrických vlastností na biochemické aktivitě na takovémto povrchu, nepotká nás problém s optickými vlastnostmi. Nejde zapomenout ani na možnost upravit povrch diamantu k obrazu vědce a diamantový povrch obohatit například o H zakončení, které mu propůjčí vodivost a hydrofobicitu anebo o O zakončení, které způsobí, že diamant bude hydrofóbní a bude mít vysoký elektrický odpor. A jako poslední bych neměla zapomenout na jeho bioinertnost.

Právě kvůli těmto vlastnostem se diamant začal testovat jako vhodný materiál pro tvorbu mikroelektrod MEA, které by mohly zaznamenávat akční potenciály neuronálních buněk bez nutnosti invaze do buňky (33). Některé vědecké týmy by chtěly, aby jejich výzkum vedl k čipům použitelným *in vivo* jako retinální implantát a některé se soustředí na neurodegenerativní onemocnění, nicméně společně těmto výzkumným týmům je, fascinace diamantovými vlastnostmi.

6.1.1. Jak se vyrábí diamanty pro tvorbu platforem

Existuje několik možností jak základní krystalky pro tvorbu platforem vyrábět. Uvedu zde tři, se kterými jsem se v článcích setkávala.

Jako první uvedu detonation nanodiamonds DND, které se vyrábějí z větších krystalů pomocí trinitrotoluenu a hexogenu, přičemž v závislosti na tom, zda je přítomno chladicí medium, které je oxidující nebo není, může na povrchu nanodiamantů vznikat povlak grafitu (34). Grafit lze následně odstranit oxidací na vzduchu při vysokých teplotách (35). DND ale nelze zformovat do kompaktních vrstev – nemohou být použity pro ploché nebo 3D elektrody (36).

High-pressure high-temperature HPHT diamanty se vyrábějí, jak už název napovídá za vysokých teplot a tlaků a následným drcením (35). Tyto diamanty mají na svém povrchu větší množství sp^2 uhlíku než DND (37).

Poslední varianta, kterou zde uvedu, jsou NCD vznikající pomocí chemical vapour deposition – depozice z plynné fáze (CVD), která poskytuje širší užití mimo jiné kvůli tomu, že se nanodiamanty mohou nasyntetizovat na rozličné druhy materiálů (38) jako například skleněné nebo křemíkové matrice. Typů CVD je mnoho a liší metodou aktivace plynů, ze kterých se následně vytváří NCD. Aktivace probíhá tak, že dochází k rozkladu směsi methanu a vodíku, při sníženém tlaku a teplotě destičky 700-1000°C (39). Přijde mi, že právě CVD NCD jsou používány pro výrobu potenciálních elektrod nejčastěji. Nedovedu ale říct, z jakého důvodu jsou pro výzkumné týmy výhodnější.

6.2. Nanodiamant

Jednou z mnoha přínosných vlastností diamantu je jeho dlouhá životnost, která umožňuje představu elektrody, kterou nebude potřeba měnit. Zároveň je diamant je vysoce rezistentní proti bakteriální kolonizaci (40). Tato rezistence je velmi cennou vlastností a je další výhodou tohoto materiálu.

Pro lepší přehlednost existuje systém označování diamantových filmů, podle velikosti zrn diamantu.

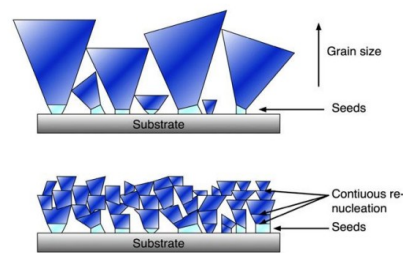


Fig 2.2: Top: Schematic of NCD morphology. Bottom: Schematic of UNCD morphology. [4]

Obrázek 7
Schéma NCD a UNCD platformy (80)

Velikostně mezi nanodiamanty patří ultra-nanocrystalline diamond UNCD, kde s velikost jednotlivých zrn pohybuje kolem 5nm (tento typ zrn ale dle definice diamantu není typický diamant, protože je amorfní, tedy nevytváří krystalky a spadá do kategorie diamond-like carbons (DLC)) a nanocrystalline diamond NCD, kde je většina zrn o rozměrech 5 -100nm (38).

6.3. Typy diamantových platform

Platformy se dají různými postupy povrchově upravovat, aby například měly H nebo O zakončení. Dělá se to z toho důvodu, že zakončení diamantu vodíkem nebo kyslíkem mění jeho povrchovou vodivost (39) a zároveň se touto úpravou mění hydrofobicita vzorku. Vzorky s H zakončením se chovají jako hydrofobní (41). Ale i poréznost vzorku má vliv na hydrofobicitu a pravděpodobnost adheze neuronu k platformě NCD (41).

Jaký je rozdíl mezi HOMOEPITAXIÁLNÍM a HETEROEPITAXIÁLNÍM růstem krystalků?

Homoepitaxiální je růst krystalků na podložce stejného materiálu
Heteroepitaxiální je naopak růst na podložce z jiného materiálu, než jsou krystalky – například růst NCD na Si podložce.

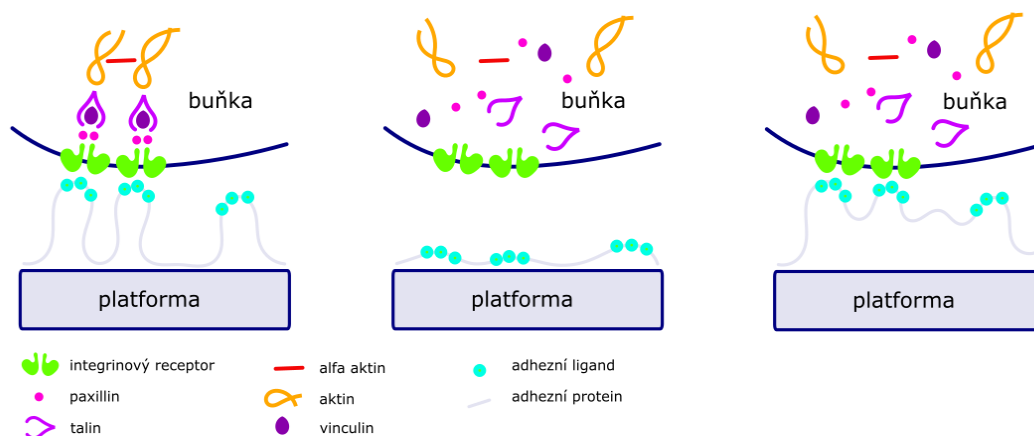
6.4. Dělení NCD platform podle povrchové úpravy

Elektrody s NCD filmy by se tedy podle způsobu povrchové úpravy daly rozřadit takto

- Platformy s fragmenty ECM nanesenými na povrchu platformy
- Platformy s molekulami nanesenými na povrchu, které navozují adhezi buňky k povrchu na základě elektrostatických sil
- Platformy, jejichž povrchová struktura sama o sobě navozuje adhezi buněk

6.4.1. Platformy s fragmenty ECM nanesenými na povrchu platformy

V případě, že se materiál snaží o imitaci extracelulární matrix ECM, na platformu jsou naadsorbované molekuly, které jsou obsaženy v ECM a buňka se svými receptory na tyto molekuly váže. Nemusí to být ani celé proteiny ECM, ale pouze klíčové sekvence aminokyselin. To, jestli se platformu podaří potáhnout proteiny ECM, nebo jejich částí je významně ovlivněno přítomností funkčních skupin (OH, NH₂), smáčivostí povrchu, morfologií povrchu, mechanickými vlastnostmi (například tuhost) a elektrickými vlastnostmi (vodivost, náboj). Hydrofobicita platformy není ideální v případě, že se povrch potahuje, protože na takovýto povrch nelze naadsorbovat potřebné molekuly ve vhodném postavení. Ale ani opačný extrém není vhodný. V případě, že je povrch extrémně hydrofilní, nanesené



Obrázek 8
mírně hydrofilní povrch
překresleno podle (42)

hydrofóbní povrch

extrémně hydrofilní povrch

proteiny nejsou přilnuty stabilně a spojení mezi buňkou a proteinem není odolné (42).

6.4.2. Platformy potažené molekulou, která navozuje adhezi buňky k povrchu na základě elektrostatických sil

V tomto případě se, jak je v nadpise uvedeno využívá elektrostatických sil, kdy buněčná membrána je záporně nabitá a molekula na platformě je nabitá kladně. Je to poměrně jednoduchý nenáročný postup, jak v buňkách podnítit adhezi k povrchu. Při vývoji elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku je ale snaha se takto přidaným látkám vyvarovat. Důvodem je potenciální vliv těchto molekul na elektrickou interakci mezi diamantovým povrchem a neuronální membránou, nebo může jednoduše vadit prostor, který tyto exogenní molekuly zabírají mezi destičkou diamantu a buňkou (43).

Ve výzkumu biokompatibility elektrod se tedy takovýchto molekul využívá. Jako příklad lze uvést molekulu polylysinu, který funguje jako kontrola pro ověření schopnosti buněk adherovat k povrchu. Jamky se většinou potahují pomocí roztoku poly-D-lysinu v PBS a tento roztok se po době v rámci jedné až dvou hodin v 36°C odsaje a usuší (44).

P W May et al (30) konstatuje, že platformy s CVD diamanty s O zakončením, které jsou potažené poly- lysinem se jeví jako velmi dobrý povrch pro kultury neuronů, nicméně pouze po tu dobu, kdy je na povrchu poly-lysin. V případě, že na platformě není poly-lysin, není pozorovatelný žádný růst neuronů (30).

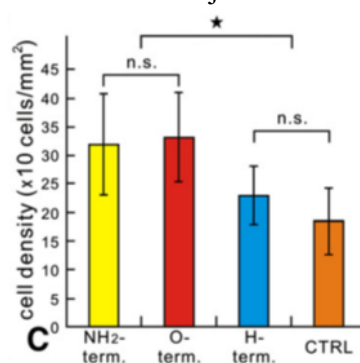
6.4.3. Platformy, jejichž struktura materiálu sama o sobě navozuje adhezi buněk

Obecně buňky špatně interagují s cizorodými materiály, proto je potřeba myslet na to, aby použitý materiál co nejlépe mimikoval buňkám přirozené prostředí (20). Výzkum A. Vosse et al (45) se zabývá právě růstem neuronálních buněk na ND platformách, které na sobě nemají žádnou molekulu ECM. Výstupem z jejich práce je zjištění, že buňky, které jsou na ND platformách zakončených NH₂ skupinou nebo kyslíkem podporují růst buněk více než kontrola (45). Zároveň si v tomto pokusu ani ND platformy s H zakončením nevedly špatně a neurony na nich rostly srovnatelně jako na kontrole (45) viz obrázek 9. Dokazuje to i pokus s GT1-7 proliferující buněčnou linií myšího hipokampu, kde neurony adherovaly jak k NCD se zakončením pomocí vodíku, tak s kyslíku (41). Důvodem

snahy pěstovat neurony na NCD bez dalších přidaných látek na povrchu jako je například laminin je fakt, že tyto molekuly díky své velikosti vytváří relativně velký prostor mezi elektrodou a buňkou, což může mít vliv na elektrické interakce mezi povrchem elektrody a membránou neuronu (41).

Opravdu je laminin tak „úžasný“?

Ve studii Christiana G. Spechta 2004 (44) byl diamantový povrch potištěn pomocí mikro-kontaktního tisku myším lamininem. Laminin na povrchu diamantu tvořil mřížku a po nasazení fetálních neuronů na tyto destičky se ve výsledku neurony uchytily z většiny na potištěných místech. Ale nejsem si jistá, jak s touto informací naložit, protože na to zda se neurony na povrch přichytí má vliv z nezanedbatelné části i poréznost povrchu, která v tomto článku uvedená není. Lze zde tedy pouze vyvodit, že laminin nanesený mikrokontaktním tiskem opravdu umožňuje adhezi neuronálních buněk a lze ho využívat jako pozitivní kontroly.



Obrázek 9
porovnání koncentrace buněk na jednotlivých površích (45)
interakce mezi povrchem elektrody

6.5. NCD platformy

Souslovím NCD platformy v tomto textu označují destičky, které se vyvíjejí pro použití při hloubkové stimulaci mozku. Nanodiamantové destičky, jsou složeny z matrice, která může být rozmanitého složení, zrněk diamantu nanoskopických rozměrů, která slouží jako nukleační centra pro růst diamantových krystalků, které tvoří nejsvrchnější vrstvu sondy. NCD jsou vhodným materiálem pro biotechnologické užití z důvodu jejich chemické a biochemické odolnosti, odolnosti vůči naleptání, výborným mechanicko-optickým vlastnostem a poréznímu povrchu (46). A jejich optická transparentnost (od IR do UV) umožňuje pozorování fluorescenčně barvených buněk *in vitro* (41).

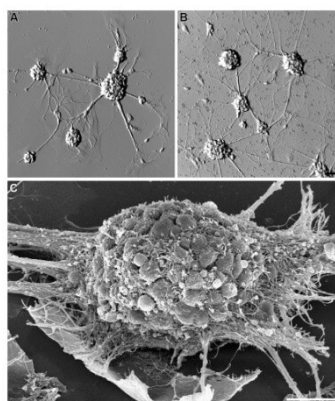
V roce 1995 vědci ze skupiny L Tanga udělaly první srovnávací analýzu nanodiamantového filmu vytvořeného metodou CVD. Nejednalo se o testování biokompatibility se specifickým typem buněk. Výzkum byl obecný a zaměřený na to, zda je možné tento typ materiálu použít jako implantát (47). Vzorek byl implantován do peritoneální dutiny myši a následně po vyjmutí z byl zkoumán elektronovým mikroskopem (47). Autoři článku se domnívají, že buňky, které se dostaly do kontaktu s implantátem, raději než aby adherovaly k NCD jako takovému, raději preferovaly místa, kde byla vrstva proteinů (47). Míra biokompatibility byla určována dle produkce fibrinogenu, který by se v případě nepřijetí implantátu produkoval na povrch buněk. CVD diamant se projevil jako velmi dobrý materiál, který je biokompatibilní.

Výroba NCD s H a O zakončením

Pro vznik NCD s vodíkovým zakončením je potřeba na čistý (čištění vede k oxidaci povrchu NCD a odstranění karbidů nebo grafitových formací) NCD vzorek nechat působit vodíkové plazma po dobu 60 minut při teplotě 2270K (41) což je pro představu přibližně 1997°C. NCD s kyslíkovým zakončením se vyrábějí tak, že se NCD vzorek nechá ozařovat UV světlem z deuteriové lampy (má vlnovou délku 160 – 400nm) po dobu jednoho nebo více dnů na vzduchu při pokojové teplotě (41).

6.5.1. Jak se daří buňkám na NCD platformách?

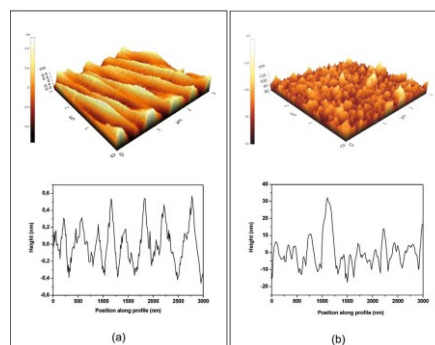
Kultura primárních embryonálních (E17) buněk hipokampu a buněk hipokampu čerstvě narozených krys (neurony, glie) při pěstování na neošetřeném NCD a neošetřeném skle velmi špatně adherovaly a tvořili buněčné shluky (36). Při pěstování stejných kultur na NCD a skle ošetřeném PLD-lamininem buňky adherovaly dostatečně a tvořili síť neuritů (36) Shlukování buněk (buňky se přednostně váží na buňky ve svém okolí) je problém z důvodu malého kontaktního povrchu mezi buňkami a destičkou (36). Jinak řečeno, buňky raději než aby adherovaly k povrchu platformy dají přednost mezibuněčné adhezi. Někdy se tomuto stavu říká klastry, a jak mohou vypadat je vidět na obrázku 10. V pokusech, kde se zjišťuje schopnost nervových buněk adherovat k NCD se často využívá právě buněčné linie GT1-7 což jsou myší neurony hypothalamu, které jsou diferencované a elektricky excitovatelné (41).



Obrázek 10
dva obrázky z optického a jeden elektronového mikroskopu zobrazující tvoření shluků neuronálními buňkami (81)

Ke kyslíkem zakončeným NCD a vodíkem zakončeným NCD, které nejsou potažené žádnou chemickou látkou GT1-7 buňky adherují se stejnou intenzitou a tato intenzita je porovnatelná s růstem na plastu (41) – polystyrenu. Oproti tomu GT1-7 buňky na OMO destičkách (homoepitaxiální diamant) s H nebo O zakončením rostou hůře než na plastu a NCD (41). Nicméně i na OMO mohou neurony GT1-7 prosperovat, jestliže se povrch ošetří poly-L-lysinem, který zlepšuje buněčnou adhezi (48).

U OMO destiček bez povrchového ošetření hodně záleží na tom, jak moc je povrch hydrofilní, tedy čím víc hydrofilní je, tím raději na něm buňky rostou (41). Na obrázku 11 je 3D model homoepitaxiální a heteroepitaxiální platformy, kde je vidět, rozdílnost takto připravovaných povrchů.



Obrázek 11
a – OMO b – NCD drsnost (41)

Většina studií se zabývá možnostmi, jak chemicky upravit povrch nanodiamantových destiček, aby na ně neurony ochotně adherovaly. Jedna ze studií se ale zabývala i výrobou prototypů MEA na skelněné matrici, která by byla použitelná pro *ex-vivo* experimenty, byla tedy dostatečně kompaktní a byla vyhotovena z materiálů, které pozitivně korelují s ochotou neuronů adherovat. Podařilo se vytvořit MEA s 264 elektrodami na povrchu o rozměrech 28,8mm² (49).

Aida Vaitkuvienė et al prováděli testování NCD jak s vodíkovým, tak s kyslíkovým zakončením a borem dopovaným NCD. Jako vzorové buňky měli SH-SY5Y, což jsou lidské buňky neuroblastomu. Tyto buňky s NCD povrchy pravděpodobně neměly problém, protože skupina všechny vzorky (O-NCD, H-NCD, BNCD-O, BNCD-H) označila jako biokompatibilní (50). Buňky vykazovaly na všech vzorcích přibližně stejnou hodnotu aktivity dýchacího řetězce, která byla stanovována MTT reakcí (50). Tato skupina také zjistila, že v případě, že v médiu není přidáno sérum, adheze a růstový potenciál buněk je závislý na množství buněk, které byly na jamku nasazeny. Když nasadili větší množství buněk, adheze byla pozorovatelně vyšší (50). Tento stav vysvětlují tak, že buňky v případě větší hustoty raději tvoří mezibuněčná spojení (50).

M Amaral et al také testoval biokompatibilitu NCD platform. Jako vzorové buňky byly použity L929 a HG [human gingival] fibroblasty (51). Ačkoli byly obě kultury udržovány ve stejných podmínkách, L929 po celou dobu vykazovaly vysokou hodnotu proliferace na rozdíl od gingiválních buněk, které byly týden po vysazení v lag fázi (51). Následně se začaly exponenciálně množit, nicméně ne s takovou intenzitou jako L929 buňky (51). Výsledkem je, že na NCD platformách obě buněčné kultury prosperovaly o malinko lépe než na kontrolních vzorcích (51), ale každá z kultur v jiném měřítku.

Srovnávací tabulka 1

Typ platformy	Typ buněk	Biokompatibilita	Adheze	Vedení vzruchů	Morfologie	Coating
✗ NCD	E17 Hipokampus - Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ NCD	E17 Hipokampus – Rat	Ano	Ano	-	Sítě	PLD-laminin (37)
✗ Sklo	E17 Hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✗ NCD	N1 Hipokampus - Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ NCD	N1 Hipokampus - Rat	Ano	Ano	-	Sítě	PLD-laminin (37)
✗ Sklo	N1 Hipokampus – Rat	Ne	Velmi špatná	-	Shluky	Ne (37)
✓ O-NCD	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (41)
✓ H-NCD	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (41)
✓ Plast	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Ne (41)
✗ O-OMO	GT1-7	Ne	Špatná	-	-	Ne (41)
✗ H-OMO	GT1-7	Ne	Špatná	-	-	Ne (41)
✓ OMO	GT1-7	Ano	Ano	-	-	Poly-L-lysine (48)
✓ O-NCD	SH-SY5Y	Ano	Ano	-	-	Ne (50)
✓ H-NCD	SH-SY5Y	Ano	Ano	-	-	Ne (50)
✓ BNCD-O	SH-SY5Y	Ano	Ano	-	-	Ne (50)
✓ BNCD-H	SH-SY5Y	Ano	Ano	-	-	Ne (50)
✓ NCD	L929 – mouse	Ano	Ano	-	-	Ne (51)
✓ NCD	HG fibroblasts	Ano	Ano	-	-	Ne (51)

✓ - biokompatibilní ✗ - nebiokompatibilní „-“ – neznámá hodnota

6.5.2. NCD platformy s uhlíkovými nanotrubičkami

Jedním z přístupů k vytvoření výraznějšího reliéfu je depozice nanokrystalického diamantu NCD na uhlíkových nanotrubičkách. Výroba probíhá tak, že se na matrici nanese pomocí elektronového paprsku 7 nm tenká vrstva niklu při teplotě 700 °C po dobu tří minut. A následně se na niklovém základu nechají vyrůst uhlíkové nanotrubičky, které se v dalším kroku pokryjí nanodiamantovými částicemi (27). Nanodiamantové částičky se většinou používají vytvořené detonační metodou.



Obrázek 12

Schéma NCD platformy s nanotrubičkami úplně nahoře je znázorněn NCD, pod ním jsou uhlíkové nanotrubičky, následuje vrstva niklu a vespod je matrice (82)

6.5.3. Dopované nanodiamantové destičky

Samotný diamant ale nesplňuje pro aplikaci jeden zásadní požadavek, a to vodivost. Proto se NCD takzvaně dopují nebo jinak řečeno obohacují o atomy boru, které NCD tuto vlastnost propůjčují. U boru stačí koncentrace $2 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ (52) díky němuž se z nanodiamantu stává p-přechod nebo ve vyšších koncentracích ($>10^{20} \text{ cm}^{-3}$) polovodič (27). Na bor je ale dobré dát si pozor, protože pro mnoho buněk je potenciálně jedovatý (30). Nicméně dvě práce uvádějí, že NCD dopovaný borem nemá žádný pozorovatelný vliv na přichycení, proliferaci a životaschopnost buněk (27) (30). Ačkoli NCD dopované borem nemají prokazatelný vliv na růst neuronů, k lepšímu prospívání buněk na NCD platformách s nanotubičkami vede zvýšení nanostruktury (27). S výrobou mikroelektrodeového pole založeného na BNCD, již má zkušenosti výzkumný tým Piret et al, jejichž BNCD MEA schopna zaznamenávat i buněčné impulzy o malé amplitudě (26). Právě tento výzkumný tým vytvořil 3D nanostrukturovaný BDD povrch, který propojil s MEA technologií a biokompatibilitu testoval na hipokampálních a míšních buňkách myších embryí (26). Výsledky tohoto testu biokompatibility byly uspokojivé, protože byly srovnatelné s jinými BDD, u kterých je jejich vhodnost pro buňky ověřená (26).

Jak se vyrábí borem dopované nanodiamantové platformy BNCD?

Postup výroby dopovaného nanodiamantu (BNCD) je téměř stejný jako bez příměsy boru. Rozdílem v syntéze NCD a BNCD je přítomnost trimethylboranu ($\text{B}(\text{CH}_3)_3$) v plynné fázi.

6.6. Často používaná média a suplementy

Aby mohly výzkumné týmy vůbec testovat biokompatibilitu platform, je nejdříve nutné, aby kultura buněk byla vitální i mimo testování samotné. Existují různé možnosti složení kultivačních látek, které do určité míry zaručují prospívání kultury *in vitro*. Ačkoli se každé buňky chovají trochu jinak, níže zmíněné komponenty jim poskytují co nejoptimálnější živiny a látky potřebné k růstu.

Často se používá neurobazální médium a umožňuje dlouhodobou kultivaci prenatalních a embryonálních neuronálních buněk (53).

Další významnou látkou, která je v článcích často skloňovaná je B27 suplement, který se používá jako doplněk k neurobazálnímu médiu a podporuje růst neuritů, elektrofyziální vlastnosti neuronů a zvyšuje podíl buněk, které přežijí (54).

6.7. Měření viability buněk na NCD destičkách

Pro posuzování míry viability buněk na NCD se dá využít barvení methylnodří, která umožňuje pozorovat a kvantifikovat buňky, které jsou živé, tedy neobarvené (barvivo se do buněk dostává kvůli zvýšené propustnosti cytoplazmatické membrány) (27). Z důvodu toxicity methylové modři se počítání buněk musí provádět ihned po barvení. Nevýhodou této metody je, že počítání obarvených buněk může být výrazně ovlivněnou chybou osoby, která buňky analyzuje.

Co je to VIABILITA?

Viabilita je schopnost buněk se množit a být metabolicky aktivní.

Další možností je měření laktátdehydrogenázy LDH obsažené v médiu. Pokud by kultura byla zdravá, obsah LDH by byl nízký, protože se jedná o cytoplazmatický enzym, který se dostane ven z buňky pouze při jejím porušení. LDH je obsažen ve všech buňkách, protože je součástí laktátového cyklu, kde katalyzuje oxidaci L-laktátu na pyruvát. Testování probíhá tak, že se odebírají supernatanty z jamek, kde je NCD destička a LDH se označí a následně je spektrofotometricky určena hodnota LDH. Metoda LDH ani barvení methylnodří nevypovídá o schopnosti buněk množit se.

Také lze viabilitu měřit pomocí propidium iodidu PI. PI prostoupí pouze do buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou a následně je hodnota buněk, které obsahují PI kvantifikována na průtokovém cytometru.

Pomocí PI se dá také dělat analýza buněčného cyklu. Protože PI je molekula, která se váže na DNA, pokud se membrána buňky permeabilizuje, PI může prostoupit do buňky a na DNA se navázat. Pomocí průtokového cytometru se pak určí podle hodnoty fluorescence buňky, v jaké fázi buněčného cyklu je. A to na základě toho, že se v buňce mění množství DNA – například před dělením buňka syntetizuje novou DNA, a tudíž je v tuto chvíli v dané buňce dvakrát více DNA než po buněčném dělení (55). Existuje mnoho dalších metod, kterými lze zjišťovat, jestli buňky rostou, jestli jsou metabolicky aktivní nebo jestli se množí. Například pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) se zjišťuje metabolická aktivita.

Ani jedna z metod není specifická, a tak nelze zjistit, kterým buňkám se na povrchu nedaří.

Specificky lze barvit buňky podle markerů, které produkují. Barvivo je fluorescenční, takže platformy se následně fotí na fluorescenčním mikroskopu. Specifických markerů je spousta a je nutno si uvědomit, jaké buněčné typy je potřeba fluorescenčně označit. Například β -III-tubulin je marker pro nematurované neurony (56). Neurony, které jsou již plně diferencované nebo neurální progenitorové buňky takto odlišit nelze.

6.8. Typy buněk diferencovaných na NCD hodnocení jejich přichycení

Pro budoucí použití destiček jako elektrod je také důležité hodnotit, zda se buňky ochotně přichycují k povrchu NCD a jakou mají morfologii (zda tvoří nepřirozené struktury napovídající o špatném stavu buněk).

Buňky, které se nepřichytily se odmyjí a při barvení jsou vidět pouze adherované buňky. Na fluorescenční značení lze použít například CMFDA, který lze použít například, když je potřeba označit celou buňku, ne například jen její cytoskelet (27) (přibližné hodnoty excitace 492nm, fluorescence 517nm (57)), Hoechst pro barvení jádra (přibližné hodnoty excitace 350nm, fluorescence 461nm (58)) a Phalloidin pro značení F-aktinu (přibližné hodnoty excitace 495nm, fluorescence 518nm (59)). Existují i specifické protilátky pro molekuly, které se vyskytují pouze u neuronů. Tímto způsobem lze například zjistit, jaké procento buněk přichycených k NCD platformě jsou neurony. To je důležité, protože výzkum NCD platformě směřuje k tomu, aby mezi NCD platformou a neurony bylo co nejméně gliových buněk, které by neurony izolovaly.

Další podstatnou věcí, která se musí ověřit při kultivaci mozkových buněk na NCD je, jaké je zastoupení buněk od každého typu. Například jaké procento přichycených buněk tvoří gliové buňky v porovnání s neurony. Vzhledem k tomu, do jakých podmínek jsou elektrody vyvíjeny, je důležité, aby rostly na NCD destičkách buňky co nejpodobněji jako *in vivo*.

Buněčná linie myších neuronů hypotalamu GT1-7 adhezuje na platformy bez jakékoli další povrchové úpravy kromě H- a O- zakončení na NCD platformě

7. Studie biokompatibility platforem

7.1. Z nanokrystalických diamantů NCD

7.1.1. Bez povrchové úpravy pouze s úpravami hydrofobicity

Jeden z výzkumů se také zaměřoval na růst neuronálních buněk [krysích embryonálních buněk hippocampu E17] na NCD s H- nebo O- povrchovým zakončením. Jejich hipokampální buňky se na těchto substrátech shlukovaly a upřednostňovaly mezibuněčný kontakt před adhezí k NCD povrchu. Kontakt s povrchem NCD měly primárně gliové buňky (36). Zde se tedy NCD povrch nechoval jako biokompatibilní. Jako kontrola byl používán PLD-laminin na NCD. Jak píše (36) tak jedním z vysvětlení proč v některých studiích se na nanodiamantové platformy neuronální buňky adherují a v například jejich případě to tak není, by mohl být rozdíl mezi platformami složenými z nanokrystalického diamantu a diamantu, který je vytvořený detonační metodou.

Jaký je rozdíl mezi nanokrystalickými diamanty NCD a diamanty tvořenými detonační metodou?

Každá z těchto metod výroby produkuje částičky o jiných vlastnostech. Krystalky NCD nemají tak ostré hrany jako při výrobě nanodiamantů detonační metodou (36)

7.1.2. S povrchovou úpravou

Thalammer et al studoval adhezi neuronálních buněk [myší hipokampální neuronální buňky, E18, Neurobasal, B27, GlutaMAX-I] na NCD povrch, který byl ještě povrchově upraven druhou vrstvou nanodiamantů, ve srovnání s NCD bez povrchové úpravy se dařilo lépe buňkám na platformách se dvěma vrstvami ND (60). Na základě vyhodnocení stejnoměrného růstu jak neuronů tak gliových buněk Thalammer et al usuzuje, že by zde byl potenciál pro adhezi a růst neuronů přímo na ND vrstvě a ne na vrstvě gliových buněk (60). Ve stejném případě byl také testován růst neuritů a měření, zda jsou neurony elektricky aktivní. Výsledkem bylo, že růst neuritů je srovnatelný a neurony jsou elektricky funkční a neuronální síť je propojená (60)

7.2. Studie biokompatibility platforem z ultra nanokrystalických diamantů UNCD

Vývoj probíhá i na platformách UNCD. Y C Chen et al poukazuje na to, že pravděpodobně už samotná morfologie povrchu UNCD platformy, může mít vliv na diferenciaci buněk. Výzkum probíhal na H- UNCD platformách, na kterých byla kultura neurálních kmenových buněk

Výzkum, který testoval UNCD povrch s H-zakončením, dospěl ke zjištění, že neurální kmenové buňky na tomto povrchu se bez přidání běžně používaných cytokinů diferencovaly do neuronů (61).

7.3. Studie biokompatibility platforem z polykrystalických diamantů PCD

PCD platformy, které byly před použitím povrchově ošetřeny nanodiamanty pro zvýšení poréznosti povrchu neuronálním buňkám [myší hipokampální neurony, E18, Neurobasal, B27, GlutaMAX- I] pravděpodobně vyhovovaly, protože jejich adheze byla srovnatelná jako adheze na skle potaženém lamininem a poly-DL-ornitinem (60).

8. Diskuze

Každý z výzkumů zabývající se těmito platformami jde trochu jiným směrem, některé publikace se zaměřují na vývoj implantátů pro hloubkovou stimulaci mozku jako pomoc lidem postiženým Parkinsonovou chorobou, někteří se zaměřují na snižování bolestivých vjemů při chronické bolesti, dle mého názoru velmi rozporuplný je výzkum ohledně obsedantně kompulzivní poruchy, také existují výzkumy zabývající se možnostmi aplikace NCD elektrod do postižené sítnice a nahrazení její funkce. Je tedy možné, že jednou se budou používat NCD elektrody jako pomoc při nejrůznějších handicapech. Tato rozmanitost v tom, pro jaký problém by NCD platformy mohly být používány s sebou nese to, že v každém z výzkumů se využívá trochu jiných buněk. Je to logické ale zároveň výsledky výzkumných skupin se těžko porovnávají, protože se tyto buňky nechovají stejně.

Hodně testů se dělá na myších neurálních kmenových buňkách, což je otázkou, jestli pro výzkum nanodiamantových elektrod pro hloubkovou stimulaci mozku má nějaký hlubší význam. Parkinsonovu chorobu mají hlavně starší lidé a jejich kmenové buňky již nejsou přítomny v takovém množství. Zároveň při testech se používají kmenové buňky z myších embryí, a jak píše V. Balasumbamaniyan et al například buňky E14, které se *in vitro* diferencovaly do neuronů, nebyly v diferencované podobě plně funkční. Je u nich problém s excitací. Zároveň tedy pokud je problém s excitací, je otázkou, v jaké ohledu se tyto buňky ještě chovají jinak.

Zároveň elektrody pro hloubkovou stimulaci mozku se při Parkinsonově chorobě umísťují do *globus pallidus* nebo subthalamického jádra a v případě pouze tremoru do ventrálního intermediální jádra, kde se vyskytuje morfologicky a funkčně jiný typ buněk. A je obtížné tyto buňky nasadit do experimentu.

Ohledně kultivace buněk může mít na výsledky testů vliv také to, že při pasážování buněk pro experiment, se buňky odmývají z povrchu a dá se říct, že ty nejvitálnější buňky, které se při standardní době tripsinizace neodmyjí se do experimentu nedostanou.

Další otázkou je, zda se z nanodiamantových platform v průběhu času nebudou uvolňovat částičky, které by mohly způsobovat zdravotní problémy. U nanočástic je například prokázáno, že mohou vnikat do buněk a následně se usazovat v organelách (62). Zároveň DND mohou ovlivňovat životnost buněk, menší měrou životnost ovlivňují HPHT diamanty (35).

Jinak je dle mého názoru cesta k elektrodám pomáhajícím tlumit projevy některých nemocí určitě přínosem. Zároveň, a to už je ale mimo výše zmíněné výzkumy, by se dalo elektrody pro hloubkovou stimulaci mozku ještě dále zlepšovat z technického hlediska. Například aby šly baterie ve zdrojích pulzů dobíjet pravděpodobně indukčně a měly delší životnost než uváděné tři roky (výrobce Medtronic), ale i když se v elektrotechnice nepohybují myslím, že než bude dostupná baterie požadované kapacity a rozměrů, která by vydržela dostatek nabíjecích cyklů a měla certifikaci pro použití v lékařství, že to bude ještě chvíli trvat.

Podle mě je také možnost vylepšovat v rámci kompatibility těchto přístrojů a magnetické rezonance. Vzhledem k tomu, že magnetická rezonance je z důvodu své šetrnosti k tkáním často využívanou vyšetřovací metodou, bylo by optimální, kdyby pacienti s přístroji pro hloubkovou stimulaci mozku měli plnohodnotnou možnost magnetickou rezonanci podstupovat. V některých případech pacienti s implantovanou sondou nelze vyšetřit. V případech, kdy pacienta magnetickou rezonancí vyšetřit lze, musejí být splněny podmínky udávané výrobcem, ale obecně se jedná například o intenzitu elektromagnetického pole, které většinou nesmí přesáhnout 1,5 Tesla (63). Pravděpodobně hlavním důvodem proč jsou zde tato omezení je potenciální zahřátí součástek přístroje (63).

Citovaná literatura

1. Hideru Togashi, Toshiaki Sakisaka, Yoshimi Takai. Cell adhesion molecules in central nervous system. *Cell adhesion and migration*. 2009. sekundární citace.
2. J. Brewer G. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods*. 1997.
3. Stanislav Filip, Jaroslav Mokřý, Ivan Hruška. *KMENOVÉ BUŇKY*. místo neznámé : Galén, 2006.
4. Darsalia V, Kallur T and Kokaia Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke – damaged rat striatum. *European journal of neuroscience*. 2007 .
5. Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research*. 2002.
6. Taupin, P. *Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system*. 2006.
7. Tamara Glaser, Steven M. Pollard, Austin Smith, Oliver Brüstle. Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *Plos one*. 2007.
8. [Online] <http://psych.lf1.cuni.cz/bp/1.4.htm>.
9. <http://www.avcr.cz/cs/pro-media/aktuality/Glove-bunky-zname-i-nezname>. [Online]
10. GRIM, Miloš a Rastislav DRUGA. *Základy anatomie : 5. Anatomie krajiny těla*. místo neznámé : Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-179-8.
11. [Online] https://is.muni.cz/el/1411/jaro2011/VSNV041p/13542700/14_Bazalni_ganglia.pdf.
12. Lars Eide, Cynthia T McMurray. Culture of adult mouse neurons. *BioTechniques*.
13. FOLKMAN, D. E. INGBER J. A. MADRI J. A Possible Mechanism for Inhibition of Angiogenesis by Angiostatic Steroids: Induction of Capillary Basement Membrane Dissolution. *Endocrinology*. 1986, Sv. 119, 4.
14. Sanjay K. Mistry, Edward W. Keefer, Bruce A. Cunnigham, Gerald M. Edelman, Katryn L. Crossin. Cultured rat hippocampal neural progenitors generate spontaneously active neural networks. *pnas*. 2002, Sv. 99, 3, stránky 1621-1626.
15. M, Takeichi. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. 2002.
17. Giancotti, Filippo G. a Ruoslahti, Erkki. Integrin Signaling. *Science*. 1999, Sv. 285, 5430.
18. [Online] http://www.beckman.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf.

19. BM, Gubiner. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996.
20. Blau, Axel. Cell adhesion promotion strategies for signal transduction enhancement in microelectrode array in vitro electrophysiology: An introductory overview and critical discussion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2013, stránky 481-492.
21. [Online] (e)
[http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/24%20extracelularni%20matrix,\(50852961cb115\).pdf](http://nas.lf3.cuni.cz/materialy/CVSE1M0001/24%20extracelularni%20matrix,(50852961cb115).pdf).
22. [Online] <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2009/Bi7070/Celljunctioncelladhesion.txt>.
23. Silva A, Pereira J, Oliveira CR, Relvas JB, Rego AC. BDNF and extracellular matrix regulate differentiation of mice neurosphere-derived cells into a GABAergic neuronal phenotype. *Journal of Neuroscience Research* . 2009.
24. Claudia S. Barros, Santos J. Franco, and Ulrich Müller. Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System . *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011.
25. S, Cogan F. Neural Stimulation and recording electrodes. *Ann. Rev. Biomed Eng* . 2008.
26. Gaelle Piret, Clement Hebert, Jean-Paul Mazellier, Lionel Rousseau, Emmanuel Scorsone, Myline Cottance, Gaelle Lissorgues, Marc O. Heuschkel, Serge Picaud, Philippe Bergonzo, , Blaise Yvert. 3D-nanostructured boron-doped diamond for microelectrode array neural interfacing. *Biomaterials*. 2015.
27. Taylor AC, Vagaska B, Edgington R, Hébert C, Ferretti P, Bergonzo P, Jackman RB. Biocompatibility of nanostructured boron doped diamond for the attachment and proliferation of human neural stem cells. *J Neural Eng*. 2015.
28. Merrill D R, Bikson M and Jefferys J G. Electricfal etimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J. Neuroscience Methods*. 141, stránky 171-98.
29. Winslow B D, Christensen M B, Yang W K, Solzbacher F and Fresco P A. A comparison of the tissue response to chronically implanted Parylene-C-coated and uncoated planar silicon microelectrode arrays in rat cortex. *Biomaterials*. 2010, stránky 9163-9172.
30. P W May, E M Regan, A Taylor, J Uney, A D Dick, J McGeehan. Spatially controlling neuronal adhesion on CVD diamond. *Diamond and Related Materials*. 2012, stránky 100-104.
31. Medtronic. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/neurological/deep-brain-stimulation-systems/activa-sc.html>.
32. Beckman. [Online] www.beckman.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf.
33. W G Gross, B K Rhoades, H M E Azzazy, M Wu. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and bioelectronic*. 1995.
34. Mochalin V N, Shenderova O, Ho D, Gogotsi Y. Nature Nanotechnology. 2012.

35. Šlegerová Jitka, Cígler Petr. Nanodiamanty - Fluorescenční a zobrazovací nanosondy. *Chemické Listy*. 2014.
36. Silviya M. Ojovan, Mathew McDOnals, Notha Rabieh, Nama Shmuel, Hadas Erez, Milos Nesladek and Micha E. Spira. Nanocrystalline diamond surfaces for adhesion and growth of primary neurons, conflicting results and rational explanation. *frontiers in neuroengineering*. 2014, Sv. 7.
37. A, Kreuger. *Journal of material chemistry*. 2011.
38. Williams, O. A. Nanocrystalline diamond. *Diamond and Related Materials*. 2011, 20, stránky 621-640.
39. Milan Vaněček, Jan Kočka. CVD diamant a nanodiamant, aneb jak vzniká a co umí. *Technický týdeník*. 2005.
40. Laube N, Kleinen L, Bradenahl J, Meissner A. Diamond-like carbon coatings on ureteral stents – a new strategy for decreasing the formation of crystalline bacterial biofilms? *J. Urol.* 177, stránky 1923-7.
41. Ariano P., Budnyk O., Dalmazzo S., Lovisolo D., Manfredotti C., Rivolo P., et al. On diamond surface properties and interactions with neurons. *Eur Phys J E Soft Matter*. 2009, 30, stránky 149-156.
42. Lucie Bacakova, Elena Filova, Martin Parizek, Tomáš Ruml, Valcav Svorcik. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011.
43. H Sorribas, D Braun, L Leder, P Sonderegger, L Tiefenauer. Adhesion proteins for a tight neuron-electrode contact. *Journal of neuroscience methods*. 2001.
44. Christian G. Specht, Oliver A. Williams, Richard B. Jackman, Ralf Schoepfer. Ordered growth of neurons on diamond. *Biomaterials*. November 8, 2003, 25 (2004), pp. 4073 - 4078.
45. A. Voss, H. Wei, C. Müller, C. Popov, W. Kulisch, G. Ceccone, C. Ziegler, M. Stengl, J.P. Reithmaier. Influence of the surface termination of ultrananocrystalline diamond/amorphous carbon composite films on their interaction with neurons. *Diamond & Related Materials*. 2012.
46. Fendrych F., Taylor A., Peksa L., Kratochvilova I., Vlcek J., Rezacova V., Petrak V., Kluber Z., Fekete L., Liehr M. Growth and characterization of nanodiamond layers prepared using the plasma-enhanced linear antennas microwave CVD system. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2010, Sv. 43, 37.
47. L. Tang, C. Tsai, W.W. Gerberich, L. Kruckebein, D.R. Kania. Biocompatibility of chemical-vapour-deposited diamond. *Biomaterials*. 1995.
48. Paolo Ariano, Alessandro Lo Giudice, Andrea Marcantoni, Ettore Vittone, Emilio Carbone, Davide Lovisolo. A diamond-based biosensor for the recording of neural activity. *Biosensors and bioelectronics*. 2008, 24, stránky 2046-2050.

49. M. Bonnauron, S. Saada, C. Mer, C. Gesset, O. A. Williams, L. Rousseau, E. Scorsone, P. Mailley, M. Nesladek, J.-C. Arnault, P. Bergonzo. Transparent diamond-on-glass micro-electrode arrays for ex-vivo neuronal study. *Physica status solidi applications and materials science*. 2008, 9, stránky 2126-2129.
50. Aida Vaitkuvienė, Matthew McDonald, Farnoosh Vahidpour, Jean-Paul Noben, Kathleen Sanen, Marcel Ameloot, Vilma Ratautaite, Vytautas Kasetas, Gene Biziulevičienė, Almira Ramanavičienė, Milos Nesladek, Arunas Ramanavicius. Impact of differently modified nanocrystalline diamond on the growth of neuroblastoma cells. *New Biotechnology*. 2015.
51. M. Amaral, P.S. Gomes, M.A. Lopes, J.D. Santos, R.F. Silva, M.H. Fernandes. Cytotoxicity evaluation of nanocrystalline diamond coatings by fibroblast cell cultures. *Acta Biomaterialia*. 2009.
52. E. Vanhove, J. de Sanoit, P. Mailley, M.-A. Pinault, F. Jomard, P. Bergonzo. High reactivity and stability of diamond electrodes: The influence of the B-doping concentration. *Physical Status Solidi*. 2009, stránky 2063-9.
53. [Online] [Citace: 12. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21103049>.
54. [Online] [Citace: 12. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/gibco/gibco-b-27-supplement.html>.
55. [Online] [Citace: 7. 3 2018.] <https://www.med.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2012/10/pi.pdf>.
56. [Online] <http://docs.abcam.com/pdf/neuroscience/neural-lineage-markers-web.pdf>.
57. ThermoFisher SCIENTIFIC. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A12379>.
58. Wikipedia. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] https://cs.wikipedia.org/wiki/Hoechstovo_barvivo.
59. ThermoFisher SCIENTIFIC. [Online] [Citace: 13. 3 2018.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V12883?SID=srch-srp-V12883>.
60. Thalammer A, Edington R. J., Cingolani L. a., Schoepfer R., and Jackman R. B. The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks. *Biomaterials*. 2010, 31, stránky 2097-2104.
61. Chen YC, Lee DC, Hsiao CY, Chung YF, Chen HC, Thomas JP, et al. The effect of ultra-nanocrystalline diamond films on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials*. 2009.
62. Amanda M. Schrand, Suzanne A. Ciftan Hens & Olga A. Shenderova International Technolo. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2009.
63. [Online] http://manuals.medtronic.com/content/dam/emanuals/neuro/CONTRIB_217935.pdf.
64. Daenen M., Zhang L., Erni R., Williams O. A., Hardy A., Van Bael M. K., et al. Diamond nucleation by carbon transport from buried nanodiamond TiO₂ sol-gel composites. *Advanced Materials*. 2009, 21, stránky 670-673.

65. Ferrari A. C., and Robertson J. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. *Philosophical transactions of the royal society a mathematical, physical and engineering sciences*. 2004, 362, stránky 2477-2512.
66. W., May P. Diamond thin films: a 21st-century material. *Philosophical transactions of the royal society a mathematical, physical and engineering sciences*. 2000, Sv. 258, 1776.
67. Christopher S. Chen, Milan Mrksich, Sui Huang, George M. Whiteside, Donald E. Ingber. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*. 1997, Sv. 276.
68. Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW. Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *Journal of Cell Science*. 1995.
69. neurons, Culture of adult mouse. Lars Eide, Cynthia T McMurray. *BioTechniques*. 2005.
70. Jitka Šlegerová, Petr Cígler. Nanodiamanty - Fluorescenční a zobrazovací nanosondy. *Chemická Listy*. 2014.
71. ThermoFisher scientific. [Online] [Citace: 13. 3 2018.]
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V12883?SID=srch-srp-V12883>.
72. Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *Journal of the Neurological Sciences*. 1978.
73. Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Research*. 1980.
74. Luisa Pinto, Magdalena Götz. Radial glial cell heterogeneity—The source of diverse progeny in the CNS. *Progress in Neurobiology*. 2007.
75. [Online] <http://cabellhuntington.org/services/neuroscience/deep-brain-stimulation/>.
76. Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesion. *Nature*. 2010, 468.
77. [Online] <http://jcs.biologists.org/content/116/1/17>.
78. <http://www.beckmancoulter.cz>. [Online]
http://www.beckmancoulter.cz/Media/Default/Dokumenty/DNAXI-presentations/1230-Bacakova_tkanove_inzenyrstvi_Beckman%20s.pdf.
79. [Online] <https://web.natur.cuni.cz/ugmnz/mineral/tvary.html>.
80. O.A. Williams, M. Nesladek, M. Daenen, S. Michaelson, A. Hoffman, E. Osawa, K. Haenen, R.B. Jackman. Growth, electronic properties and applications of nanodiamond. *Diamond & Related Materials*. 2008, 17.
81. [Online] https://www.frontiersin.org/files/Articles/94788/fneng-07-00017-HTML/image_m/fneng-07-00017-g002.jpg.

82. Gottfriedová, Kristýna.