



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra přírodovědných oborů

**Vliv aplikace nanodiamantů
na nervové buňky**

**Effect of nanodiamond particles
on neuronal tissue**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce: Bc. Veronika Šimková
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Veronika Benson, PhD.

Kladno 2019



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Šimková** Jméno: **Veronika** Osobní číslo: **474937**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra přírodovědných oborů**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Přístroje a metody pro biomedicínu**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Vliv aplikace nanodiamantů na nervové buňky

Název diplomové práce anglicky:

Effect of nanodiamond particles on neuronal tissue

Pokyny pro vypracování:

Náplní práce bude izolace primárních neuronů a jejich charakterizace (vitalita, regenerace, signalizace) při interakci s povrchově upravenými nanodiamantovými částicemi. Student bude pracovat v biologické laboratoři a seznámí se s molekulárně-biologickými a imunologickými technikami pro charakterizaci buněčných populací odvozených ze specializované savčí tkáně.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Tsai LW et al., Nanodiamonds for Medical Applications: Interaction with Blood in Vitro and in Vivo., Int J Mol Sci., 2016 Jul 12 17(7), pii: E1111. doi: 10.3390/ijms17071111.
- [2] Yi Y, Park J, Lim J, Lee CJ, Lee SH., Central Nervous System and its Disease Models on a Chip., Trends Biotechnol. Oct 20., 2015, pii: S0167-7799(15)00193-6.
- [3] Petráková, V., Benson, V., Buncek, M., Fiserova, A., Ledvina, M., Stursa, J., Cigler, P., Nesladek, M., Nanoscale 2016, 8, 12002-12012 s.
- [4] Kurantowicz et al., Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model., Int J Nanomedicine., 2017 Apr 7;12:, 2887-2898 s., doi: 10.2147/IJN.S131960.


Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

RNDr. Veronika Benson, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Datum zadání diplomové práce: **19.02.2019**

Platnost zadání diplomové práce: **18.09.2020**


doc. Ing. Lenka Lhotská, CSc.
podpis vedoucí(ho) katedry


prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Vliv aplikace nanodiamantů na nervové buňky“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 16. 5. 2019

.....

Bc. Veronika Šimková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce RNDr. Veronice Benson, Ph.D., za odborné posouzení práce a za cenné rady a náměty pro dokončení této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Evě Neuhöferové za její ochotu, trpělivost a pomoc při zpracování této práce.

ABSTRAKT

Název práce: Vliv aplikace nanodiamantů na nervové buňky

Nanočástice, vzniklé za vysokého tlaku a teploty, jsou považovány za vysoce biologicky kompatibilní, což je činí vhodnými nosiči pro biomedicínské aplikace. Nicméně, vedle interakce s buněčnou membránou, nanorozměr dovolí částicím proniknout do plazmatické membrány a dokonce se akumulovat v buněčné cytoplazmě. Nedávno vznikly otázky, které se týkají udržitelného používání nanočástic *in vivo* a možných rizik toxicity spojené s tímto používáním.

Při systémové aplikaci nanočástic může dojít k jejich přechodu přes hematoencefalickou bariéru do mozkové tkáně. Jak tato přímá interakce s nervovými buňkami, tak i nepřímá interakce, kdy nanočástice v krvi indukují tvorbu signálních molekul putujících do mozku, mohou vyvolat patologické změny v nervové tkáni.

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda nanodiamanty 1) ovlivňují buňky nervové tkáně při přímém kontaktu *ex vivo* a 2) projdou hematoencefalickou bariérou, když jsou aplikovány intravenózně jako nosič léčiv. Aplikovali jsme různé formy nanodiamantového nosiče na kokulturu primárních neuronů a gliových buněk *ex vivo*. Analyzovali jsme jejich mitochondriální aktivitu, viabilitu a produkci cytokinů, které by mohly ukazovat na patologickou reakci. Jedna forma nosiče byla aplikována *in vivo*. Po *in vivo* aplikaci jsme sledovali přítomnost nanočástic v mozku a odpověď glií na aplikaci nosiče. Ani *ex vivo* ani *in vivo* experimenty nepotvrdily toxicitu nanodiamantového nosiče obaleného nukleovou kyselinou na nervovou tkáň.

Klíčová slova

nanodiamanty, nervové buňky, nanočástice, mozek, neurony, gliové buňky, interakce

ABSTRACT

The title of the Thesis: Effect of nanodiamond particles on neuronal tissue

Nanoparticles formed under high pressure and temperature are considered highly biocompatible, making them suitable carriers for biomedical applications. However, in addition to cell membrane interaction, the nanoscale allows particles to penetrate the plasma membrane and even accumulate in the cellular cytoplasm. Questions have recently been raised about the sustainable use of nanoparticles *in vivo* and the potential risks of toxicity associated with this use.

Systemic application of nanoparticles can cross the blood-brain barrier to brain tissue. The direct interaction with neuronal cells, as well as the indirect interaction when nanoparticles in the peripheral blood induce the secretion of signaling molecules traveling to the brain, can cause pathological changes in neuronal tissue.

The aim of this thesis was to find out whether nanodiamonds 1) affect neuronal tissue cells in direct contact *ex vivo* and 2) pass the blood-brain barrier when administered intravenously as a drug carrier. We applied various forms of nanodiamond carriers to the co-culture of primary neurons and glial cells *ex vivo*. We analyzed the mitochondrial activity, viability, and cytokine production that could indicate a pathological response. One carrier combination was administered *in vivo*. Following *in vivo* application, we observed the presence of nanoparticles in the brain and the glial cells response. Neither *ex vivo* nor *in vivo* experiments suggested the toxicity of the nanodiamond carrier coated with nucleic acid to neuronal tissue.

Keywords

nanodiamonds, neuronal cells, nanoparticles, brain, neurons, glial cells, interaction

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	9
1 Úvod	10
1.1 Nanodiamanty	10
1.1.1 Nanodiamanty jako fluorescenční sondy	12
1.1.2 Výroba nanodiamantů.....	13
1.2 Mozek a neurony.....	14
1.2.1 Glie a cytokiny	15
1.2.2 Interakce nanočástic s mozkovou tkání	17
1.3 Cíle práce	19
1.4 Hypotézy.....	19
2 Metody	20
2.1 Kultivace buněk	20
2.2 Pasážování permanentní kultury 3T3	21
2.3 Příprava komplexu nanodiamantů.....	22
2.4 Metoda izolace dospělých neuronů z myši BL6	24
2.5 Příprava Optiprepu	25
2.6 Počítání buněk.....	26
2.7 Barvení jader s Hoechst	28
2.8 Barvení aktinových vláken Phalloidinem.....	29
2.9 Konfokální mikroskopie	29
2.10 Příprava jamek pro kultivaci neuronů	30
2.11 Příprava sfér	31
2.12 Průtoková cytometrie (FACS) pro měření hladin cytokinů.....	32
2.13 Celotělové zobrazování	34
2.14 Metabolismus buněk – test WST-1	35
3 Výsledky	36
3.1 Optimalizace barvení a vizualizace intracelulárních markerů	36
3.2 Optimalizace izolace dospělých neuronů	37
3.3 Vliv nanodiamantových komplexů na morfologii shluků neuronální tkáně	41
3.4 Sledování internalizace ND komplexu v kultuře adherentních neuronů.....	43

3.5	Test metabolismu -WST-1	44
3.6	Sekrece cytokinů po interakci nervové tkáně s různými ND komplexy	46
3.7	Vizualizace vstřebávání a akumulace ND komplexu po aplikaci do tělního oběhu myši	54
3.8	Detekce komplexu ND v homogenizované mozkové tkáni	60
3.9	Detekce cytokinů v plazmě po aplikaci ND komplexu	61
3.10	Interakce nanodiamantů s adherentní kulturou nervových buněk.....	62
4	Diskuse	65
5	Závěr	69
	Seznam použité literatury	71
	Seznam obrázků	78
	Seznam grafů	80
	Seznam tabulek.....	81
	Příloha 1.....	82

Seznam symbolů a zkratek

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
PDGF	růstový faktor z destiček
FGF	fibroblastový růstový faktor
FTS	fetální hovězí sérum
PBS	fyziologický roztok
PEI	polyethylenimin
NK	nukleová kyselina
ND	nanodiamanty
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselinaethylendiamintetraoctová
Ex	excitace
Em	emise

1 Úvod

V této práci se zaměřujeme na nanodiamanty jako nosiče léčiv, protože je známa jejich vysoká kompatibilita, chemická stabilita a luminiscence. V předchozích experimentech byly tyto diamanty úspěšně použity k přenosu inhibiční RNA do nádoru systémovou aplikací. Při systémové aplikaci kolují nanočástice v tělním oběhu a mohou přímo nebo nepřímo ovlivnit nervovou tkáň. Aby se zjistilo, zda je toto ovlivnění patologické anebo zda jsou diamanty vůči nervové tkáni biokompatibilní, tak je potřeba sledovat interakci nanodiamantů s nervovou tkání *ex vivo*. Pro zjištění přechodu případného patologického signálu přes hematoencefalickou bariéru je nutné sledovat chování nervové tkáně po aplikaci nanodiamantů *in vivo*.

Motivací této práce s názvem Vliv aplikace nanodiamantů na nervové buňky je možnost využití nanodiamantů jako nosičů léčiv. Pro bezpečné použití nosiče musíme znát jeho pohyb v mnohobuněčném organismu, včetně možnosti vstupu do mozku. Neuronální tkáň se skládá z neuronů a gliových buněk a je chráněna před volným vstupem buněk a makromolekul hematoencefalickou bariérou.

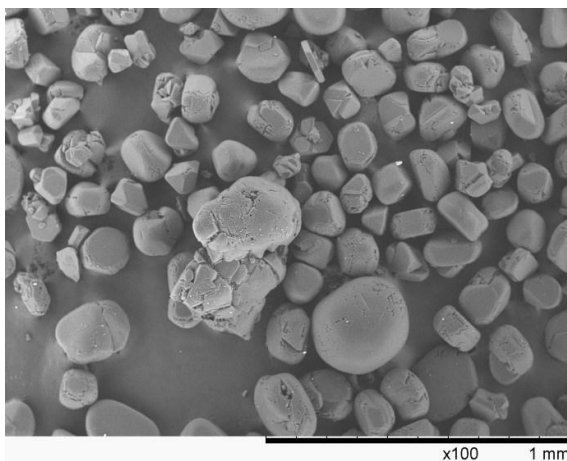
1.1 Nanodiamanty

Už na přelomu 4. a 5. století před naším letopočtem se objevila první zmínka o nanočásticích pocházejících ze starověkého Egypta a Číny. Tehdy se přišlo na objev rozpustného zlata, které se dále využívalo jak na výrobu rubínového skla nebo barvení keramiky, tak pro estetické účely, nebo také pro účely léčebné. Jednalo se o léčbu srdečních a sexuálních problémů, úplavice, epilepsie a pro léčbu nádorů. Tato oblast nanotechnologií si ale musela na rozkvět ještě chvíli počkat. Až koncem 20. století už vědci věděli, jak zacházet s atomy a molekulami na površích materiálů. Postupem času se vyvíjely technologie a postupy, jak vyvinout strukturu v řádech nanometrů. Vznikly tak nanočástice, které svými unikátními vlastnostmi mohou pomoci v léčbě řady nemocí. [1] Diamantové nanočástice existují v přírodě už několik miliard let. Lidmi byly objeveny před více než padesáti lety, ještě před výrobou syntetických diamantů v roce 1955. [2]

Nanodiamanty (obr. 1.1) patří mezi uhlíkové nanomateriály, které se řadí mezi velmi nadějně v použití pro terapeutické aplikace. [3] K jejich nejvýznamnějším

vlastnostem patří vysoká tvrdost (svoji tvrdostí se v Mohsově stupnici tvrdosti řadí na 10. místo), velký index lomu a velká tepelná vodivost. Pokud je necháme při pokojové teplotě, tak mnohokrát převyšují vodivost mědi. Jsou to diamanty s rozměrem v nanoškále tzn. 1-100 nm. Mají také výborné biochemické a optické vlastnosti. Jejich biochemické vlastnosti jsou chemická stabilita, biokompatibilita a velmi široká možnost modifikace povrchu pro navázání specifických molekul, například léčiv. [5]

Velkou výhodou nanodiamantů je, že je lidský organismus přijímá jako svoji přirozenou součást. Doposud nejsou známy žádné negativní účinky spojené všeobecně s nanodiamanty. Naopak u některých jiných nanostruktur jsou známy jejich karcinogenní účinky na lidský organismus. [5] Protože jsou nanodiamanty netoxické, jsou vhodným materiálem pro biomedicínské použití. [4]



Obr.1.1: Mikroskopický snímek nanodiamantů HPHT [6]

Částice nanodiamantů připravené za vysokého tlaku a teploty se začaly využívat jako fluorescenční netoxická značka pro biomedicínské zobrazování. [4] Oproti standardním fluoroforům mají nanodiamanty výhody, že jsou chemicky stabilní, rozpustné a netoxické. Mezi standardně používané fluorescenční značky řadíme například fluorescenční proteiny, organická barviva anebo nanokrystaly polovodičů, dále organická barviva, jako jsou například fluoresceiny, rhodaminy nebo cyaninová barviva. Jejich nevýhodou je nestabilní fluorescence, která podléhá fotodegradaci, a případná toxicita. [7]

Abychom mohli v lidském organismu nanodiamanty sledovat, musíme využít různé mikroskopické metody, které nám umožní sledovat buňku po dlouhý čas při

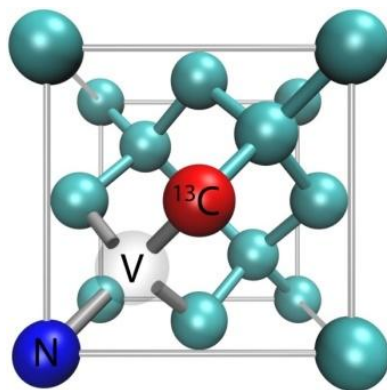
intenzivním osvětlení. Pro takovéto pozorování je velmi vhodný tzv. konfokální mikroskop, který nám umožňuje sledovat obarvené objekty fluorescenčními barvivy s vysokým rozlišením v laserovém svazku. To je výhodné například pro výzkum rakoviny nebo buněčného metabolismu. [5]

Zájem o použití nanodiamantů jako netoxických částic, které by se daly použít pro zobrazování, snímání, ale i distribuci léků, se rychle rozšiřuje. Tento zájem je vyvolán hlavně pro jejich jedinečné optické vlastnosti. [8]

1.1.1 Nanodiamanty jako fluorescenční sondy

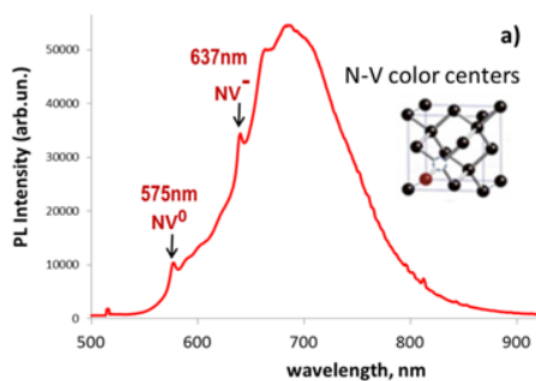
Nanodiamanty vyrobené za vysokého tlaku a teploty, které obsahují fluorescenční centra, mají stále větší popularitu. Takovéto nanodiamanty se totiž dají použít jako sondy v mikroskopii biologických objektů. Tento zájem vyplývá hlavně z toho, že jsou velice odolné proti fotosnímání a umožňují prodlouženou dobu pozorování fluorescence. Jedná se o unikátní sondy pro kombinování a korelaci různých typů mikroskopie, od fluorescenčního zobrazování až po elektronovou mikroskopii. [9] Fluorescence nanodiamantů pochází z příměsí v krystalu.

Nejčastější nečistotou v diamantu je dusík, který je začleněn do krystalové mřížky. Jedná se o opticky aktivní defekty. Centrum dusík-vakance (NV) je defekt, který je vytvořený v diamantu jedním substitučním atomem dusíku a sousedním volným prostorem (obr. 1.2). Volná místa jsou produkována ozařováním nanodiamantu částicemi s vysokou energií. [11] NV centrum emituje fluorescenci v červené oblasti po excitaci zeleným laserem.



Obr.1.2: Repräsentace atomové struktury nanodiamantu s N-V centrem [12]

V uplynulých desetiletích se výzkum zaměřil především na vývoj fluorescenčních nanočástic pro analýzu komplexních biologických procesů a sledování a lokalizaci jednotlivých proteinů, nukleových kyselin a malých molekul. Fluorescenční nanodiamanty vykazují nejvyšší emise vlnové délky v 575 nm a 635 nm (obr. 1.3). Většina fluorescenčních markerů nemá úplně ideální vlastnosti, ale důležité je, aby splňovaly podmínku nepřítomnosti blikání a fotobělení pro zobrazování v reálném čase, dále biokompatibilitu a nízkou toxicitu. Fluorescenční nanodiamanty jsou kvůli svým optickým a chemickým vlastnostem navrženy jako nejlepší alternativní sondy, které splňují ideální podmínky fluorescenčního markeru. [13]



Obr. 1.3: Fotoluminiscenční emisní spektrum ND částic obsahující NV a NVN centra [14]

1.1.2 Výroba nanodiamantů

Nanočástice mohou vznikat jako důsledek řízené nebo neřízené lidské činnosti, ale i přírodními procesy. Při vzniku nanočástic přírodní cestou, jsou pak nanočástice velmi různorodé. Mohou vznikat sopečnou činností, nacházejí se i v prachu, písku a půdních koloidech. Viry, DNA, proteiny, pyly a podobně můžeme také zařadit mezi přírodní nanočástice. Mezi lépe definované a více uniformní patří nanočástice, které vznikly řízenou lidskou činností. Velmi variabilní nanočástice vznikají také náhodným procesem jako produkt neřízené lidské činnosti (svařování, důlní činnost nebo spalování v dieselových motorech). [15]

Při výrobě prvních umělých nanodiamantů byla použita technika detonace výbušnin s obsahem uhlíku. Vše se odehrává v prostředí, kde je nedostatek kyslíku, a to z toho důvodu, aby se zabránilo oxidaci uhlíku. Takto vyrobený nanodiamant se nazývá

detonační nanodiamant (DND). Postupem času se přišlo na další způsoby metody syntézy nanodiamantů, například laserové ablace, pěstování při vysokém statickém tlaku a vysoké teplotě (HPHT ND) nebo chemické depozice plynné fáze. Avšak detonační syntéza zůstává primárním zdrojem nanodiamantových částic. [16]

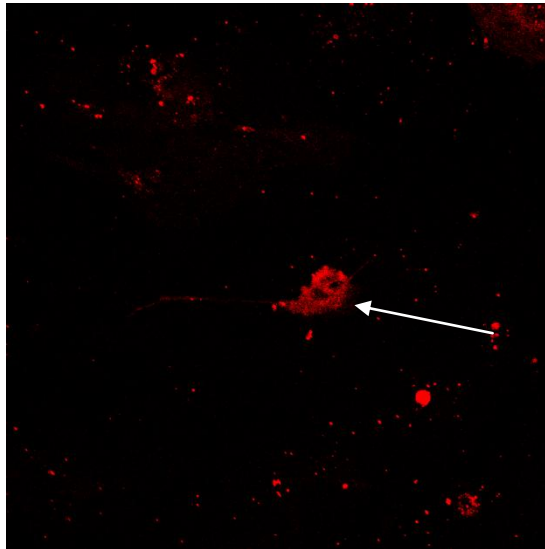
Různé způsoby výroby, podmínky pro zpracování a také způsob, jakým jsou nanodiamanty zpracovány, vedou k různým typům nanodiamantů. Ty se pak liší velikostí, tvarem, strukturou a dokonce i povrchovou chemií. To vše vytváří důležité povrchové vlastnosti, které pak tvoří podklad pro potenciální použití. Například detonační nanodiamanty (DND) nejsou příliš biokompatibilní, mají vysoké procento sp^2 konformace, která je pro buňky toxická. Nanodiamanty pěstované při vysokém statickém tlaku a vysoké teplotě (HPHT ND) také obsahují sp^2 , ale při následné oxidaci se sp^2 odbourá a tyto částice jsou pak vysoce biokompatibilní. [17]

1.2 Mozek a neurony

Mozek zaujímá malé procento hmotnosti těla (2%), ale jde o velice mimořádný orgán svou složitostí. Tvoří ho řádově miliarda nervových buněk, které se vzájemně propojují a jejich spojení je tvořeno biliardami tzv. synapsí. [19]

Přestože nervové buňky, neurony, patří k „běžným“ buňkám lidského těla, mají mnoho výjimečných vlastností. [20] Neurony jsou zvláštní tím, že se během svého života neobnovují a nedělí se na nové buňky. [21] Zralé lidské neurony sice schopnost množení ztrácejí a jejich počet s postupujícím věkem zpravidla klesá, nicméně, v lidském mozku existují kmenové buňky, které se i ve stáří mohou dělit a diferencovat ve zralé neurony. Tím pádem nové neurony mohou ve velmi omezeném množství vznikat i v mozku dospělého jedince. [20]

Neuron (obr. 1.4) je specializovaná buňka, která je schopna přijímat určité signály a na tyto signály také určitým způsobem odpovídat. [21] „*Všechny neurony mají velmi vysoké nároky na dostatečné a stálé zásobení kyslíkem a živinami.*“ [22]



Obr. 1.4: Foto z konfokálního mikroskopu, neuron obarvený tubulinem 3 (šipka)
Zdroj: vlastní foto

Neuron se skládá z těla (soma), které tvoří centrální část neuronu, a z výběžků (neuritů). Tělo může mít různý tvar, například oválný, kulatý apod. Také obsahuje jádro a další buněčné organely. Výběžky, které vedou elektrické impulsy směrem k buněčnému tělu, se nazývají dendrity. Jedná se o stromečkovité, větvcí se výběžky, které vedou impuls dostředivě. Mohou být hladké, ale obvykle je jejich plocha zvětšena výčnělky, tzv. dendritickými trny. To, jakou má dendritický strom rozlohu, podobu a orientaci, je jedním ze základních rozlišovacích znaků neuronů, aby bylo patrné, o jaký typ nervových buněk se jedná. Axon je jediný, dlouhý výběžek neuronu. Na těle neuronu se nachází tzv. axonový hrbolík a právě z něj axon odstupuje od těla. Elektrické impulsy vede axon směrem od těla, tj. odstředivě. [20] Může vést podráždění nebo vytvářet kontakty s jinými neurony. Jde o mikroskopický útvar, pouhým okem neviditelný, ale na délku může měřit klidně až jeden metr. [21]

1.2.1 Glie a cytokiny

Nervovou soustavu tvoří dva základní druhy buněk. Jsou to neurony, které zastupují funkce základní strukturální a funkční jednotky, a neuroglie, které mají funkci podpůrnou a metabolickou. [23] Jde o populaci velmi homogenních buněk, které jsou distribuované v celém centrálním nervovém systému a jsou nezbytné pro normální funkci mozku. Jejich cílem je udržení homeostázy nervové tkáně, a hlavně kontrola, ochrana a podpora neuronální funkce. Pokud je centrální nervová soustava nějakým

způsobem poraněna, glie mohou působit jako obranný mechanismus, ale pokud jsou samy nefunkční, mohou být dokonce i primárními patogeny. Pokud nastane situace, jako například neurální poškození, nemoc nebo i stárnutí, glie mohou reagovat morfologickými a funkčními změnami, které jsou doprovázené produkcí prozánětlivých cytokinů. Tato reakce glií v dospělém mozku se nazývá reaktivní glióza. [24] Objemově zauímají glie více než polovinu celkové nervové tkáně a svým počtem mnohonásobně převyšují neurony. [25]

Jako cytokiny označujeme proteiny nebo glykoproteiny, které mají nízkou molekulovou hmotnost. [26] Už pikomolové koncentrace cytokinů dokáží navodit biologický efekt. Tyto biologické účinky se poté projevují ve třech oblastech. Řídí vývoj a také homeostázu imunitního systému, kontrolují systém tvorby krvinek a také se podílejí na nespecifické imunitní odpovědi, jako ovlivnění zánětlivých procesů, srážení krve a krevního tlaku. [27] V současnosti je známo přes 200 cytokinů, ale celkově se odhaduje jejich počet až na 300. [26] Cytokiny jsou produkovány různými typy buněk, jako jsou monocyty, makrofágy, lymfocyty [28], ale i gliovými buňkami.

Cytokiny syntetizované buňkami nervového systému působí celou řadou účinků na centrální nervovou soustavu. Tyto účinky mohou být buď fyziologické, nebo patologické. [29] Cytokiny mohou také ovlivňovat průchod látek přes hematoencefalickou bariéru, což dále ovlivňuje funkce centrální nervové soustavy (CNS). I mnoho samotných cytokinů je transportováno přes hematoencefalickou bariéru. [30]

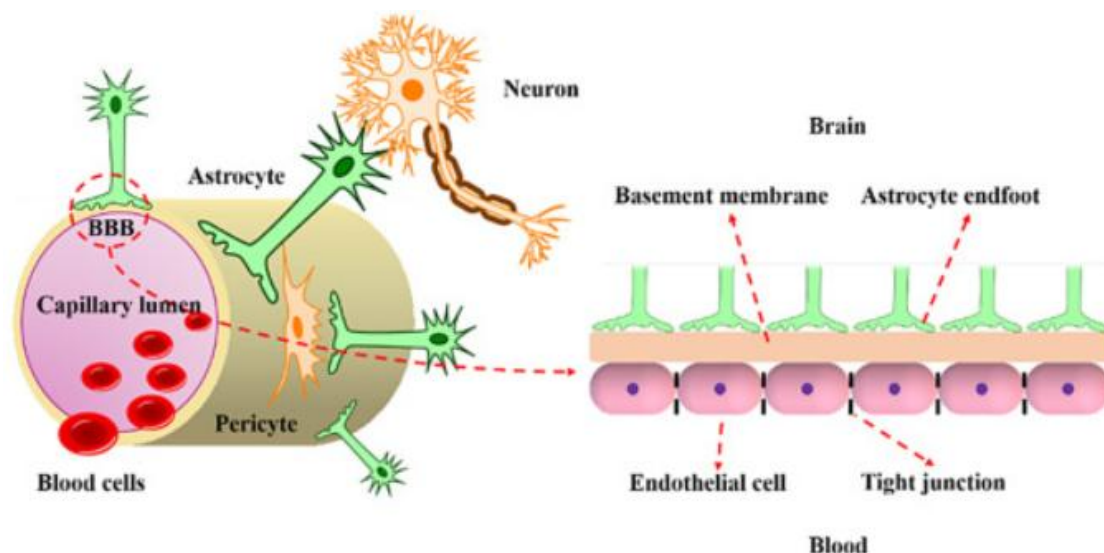
K tomuto transportu existují jedinečné přenašeče pro cytokiny, které umožňují pohyb z krve do mozku. Hematoencefalická bariéra se snaží zabránit nebo alespoň ztížit výměnu rozpustných látek mezi centrálním nervovým systémem a krví a také přispívá k rozdělení imunitního systému a centrální nervové soustavy. Mohou nastat i extrémní případy, kdy cytokiny způsobí narušení hematoencefalické bariéry, to je pak považováno za patologickou událost. [30] Změna v expresi cytokinů gliovými buňkami může být indikátorem poškození neuronů. [24] Základní hladiny cytokinů v zdravém dospělém mozku jsou v rozmezí femtomolárním-pikomolárním. [29]

Některé cytokiny přispívají k obousměrné komunikaci mezi centrálním nervovým systémem a imunitním systémem. Ačkoli zůstává kontroverzní, zda cytokiny mohou vstoupit do mozku tím, že překročí hematoencefalickou bariéru (blood-brain-barrier; BBB), existuje důkaz, že určité okolní komorové orgány v mozku rozpoznávají cirkulující cytokiny. Bylo zjištěno, že cirkulující interleukin-1 (IL-1 alfa) vyvolává

horečku. Stejně tak i interleukin-6 (IL-6), tumor nekrotizující faktor (TNF) a interferony (INF) beta a gama. Neurony a glie mohou nejen reagovat na cytokiny, ale také je produkovat. Cytokiny mohou tedy zprostředkovávat autokrinní nebo parakrinní komunikaci v rámci CNS. Takové cytokiny zahrnují interleukin-1 (IL-1) až interleukin-8 (IL-8), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa), tumor nekrotizující faktor beta (TNF-beta), transformující růstový faktor beta (TGF-beta), interferon gama (IFN-gama), faktor stimulující kolonie granulocytů/makrofágů (GM-CSF) a faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF). Tyto cytokiny regulují neuronální a gliální funkci, ale také přispívají k patogenezi ischemie, Alzheimerovy choroby a encefalopatie HIV. [31] Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF-alfa) podporují přežití neuronů. [24]

1.2.2 Interakce nanočástic s mozkovou tkání

Hematoencefalická bariéra je jedním z nejdůležitějších mechanismů ochrany v centrálním nervovém systému. Selektivně dovoluje jednotlivým molekulám, jako jsou malé molekuly rozpustné v lipidech, procházet kapilární endotelovou membránou, zatímco omezuje průchod patogenů nebo toxinů. Objev BBB můžeme vysledovat až do roku 1885, kdy německý bakteriolog Pavel Ehrlich zbarvoval zvířecí orgány tak, že vstříkoval voděrozpustné anilinové barvivo do periferního oběhu, ale selhal v mozku a mozkomíšním moku. Stejný jev byl následně pozorován v dalším experimentu v roce 1913, kdy Edwin Goldman (Ehrlichův student) opakovал stejný experiment. Provedl další test s injekcí Trypanové modři. Zjistil, že pouze CNS včetně mozku a míchy se neobarvily. Ve stejném roce byl název „hematoencefalická bariéra“ předložen Edwinem Goldmanem na základě jeho pozorování. Goldman tvrdil, že musí existovat bariéra, která brání přesunu barviv mezi krví a mozkiem. Nicméně skutečná membránová bariéra nebyla pozorována, dokud nebyla v roce 1937 vynalezena skenovací elektronová mikroskopie (SEM). BBB se skládá z pěti základních částí: pericyty, astrocyty, neurony, bazální membrána a spojovací komplexy (obr. 1.5). Pericyty pokrývají 20% vnějšího povrchu a jsou zodpovědné za regulaci průtoku krve. Astrocyty jsou gliové buňky, které propojují kapiláry a neurony v mozku. Zachovávají funkci BBB tím, že poskytují živiny neuronům a chrání mozek před oxidačním stresem a toxicitou kovů. [32]



Obr. 1.5: Strukturální ilustrace hematoencefalické bariéry [32]

BBB ochranný mechanismus je však hlavní překážkou v léčbě nemocí, neboť dramaticky brání transportu léků. [33]

Nanočástice jsou považovány za všestranný systém pro podávání léků do nepřístupných oblastí jako je mozek. Pokud jsou nanočástice modifikovány povrchově aktivními látkami nebo ligandy, mohou tak překročit BBB. Hematoencefalická bariéra (BBB) je nejrozsáhlejší a nejvýkonnější membrána a je složena převážně z těsně spojených endotelových buněk. I přesto, že existuje silný soudržný systém, který udržuje endotelové buňky pevně spojeny, BBB dohlíží na selektivní průchod buněk a malých molekul do mozku. [34] Mechanismus průchodu mezi endotelovými buňkami se nazývá paracelulární a je využíván pro ionty a látky rozpuštěné v závislosti na gradientu koncentrace. [35]

Nanočástice mají schopnost 1) stimulovat neuronové buňky k proliferaci, růstu axonů a adhezi a 2) neuroprotektce. [36] Nanočástice se používají samostatně nebo v kombinaci s jinými molekulami za účelem dosažení lepší odpovědi na neuronálních buňkách. [37] Navzdory mnoha výhodným vlastnostem, ale mohou představovat zdravotní rizika. Mohou být potenciálně toxické na lidské buňky, protože mohou procházet biologickými membránami. [38]

Aby se dosáhlo optimální odpovědi nervové buňky, používají se různé velikosti a tvary nanočástic. Nanočástice aplikovány do krve by mohly procházet i přes BBB do mozku. Záleží na tvarech, velikosti i povrchové modifikaci nanočástice, což jsou

vlastnosti, které určují, jakým způsobem nanočástice s okolním prostředím interagují. [40] O přestupu BBB u nanočástic, které jsou podávány do krve, se sice diskutuje, ale publikací na toto téma je zatím velmi málo. Mechanismus přestupu i fakt, že nanočástice mohou působit na nervovou tkáň nepřímou – aktivací cytokinů, které přejdou BBB – zatím není v literatuře popsán. Protože se ale nanočástice plánují používat (nebo se již experimentálně používají) pro intravenózní aplikaci léčiv, je zapotřebí každý nanosystém otestovat vzhledem k potenciální neurotoxicitě a schopnosti přechodu přes BBB.

1.3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda nanodiamanty ovlivňují buňky nervové tkáně při přímém kontaktu *ex vivo* a projdou hematoencefalickou bariérou, když jsou aplikovány intravenózně jako nosič léčiv. Motivací této práce s názvem Vliv nanodiamantů na nervové buňky je možnost využití nanodiamantů jako nosičů léčiv. Pro bezpečné použití nosiče musíme znát jeho pohyb v mnohobuněčném organismu, včetně možnosti vstupu do mozku.

V této práci se zaměřujeme na nanodiamanty jako nosiče léčiv, protože je známa jejich vysoká kompatibilita, chemická stabilita a luminiscence. V předchozích experimentech byly tyto diamanty úspěšně použity k přenosu inhibiční RNA do nádoru systémovou aplikací. Při systémové aplikaci kolují nanočástice v tělním oběhu a mohou přímo nebo nepřímou ovlivnit nervovou tkáň. Aby se zjistilo, zda je toto ovlivnění patologické anebo zda jsou diamanty vůči nervové tkáni biokompatibilní, tak je potřeba sledovat interakci nanodiamantů s nervovou tkání *ex vivo*. Pro zjištění přechodu případného patologického signálu přes hematoencefalickou bariéru je nutné sledovat chování nervové tkáně po aplikaci nanodiamantů *in vivo*.

1.4 Hypotézy

V této práci jsme definovali dvě hypotézy. 1) Nanodiamanty s různou povrchovou modifikací interagují s buňkami nervové tkáně 2) Nanodiamantový nosič aplikovaný do periferní krve může přejít BBB nebo nepřímou vyvolat reakci nervové tkáně.

2 Metody

2.1 Kultivace buněk

Kultivace buněčné kultury je nutná, abychom mohli studovat účinky nanodiamantů a nanodiamantových komplexů na živé systémy. Pracovala jsem se dvěma typy buněčných kultur, které rostly ve 2D kultuře na Petriho misce a ve 3D sférách pěstovaných na agaróze nebo ve visacích kapkách na víčku Petriho misky. Všechny buněčné kultury byly umístěny v inkubátoru při teplotě 37°C a 5% CO₂.

Kontrolním modelem byly buňky 3T3. Jedná se o buněčnou permanentní linii myších fibroblastů, které jsou imortalizované a vykazují vysokou míru citlivosti na kontaktní inhibici. Tyto buňky rostou adherentně ve 2D kultuře. Médium DMEM (tab. 2.1) bylo buňkám měněno 3x týdně, kvůli tomu, že buňky vylučují odpad z jejich metabolismu a tím pádem potřebují médium nové, které má i nové živiny. Používali jsme je pro optimalizaci metod, protože se s nimi pracuje mnohem jednodušeji než s primární kulturou, zvláště neurony.

Tab. 2.1: Složení plného DMEM média

Látka	Objem [ml]
Sérum	10
Gentamycin	0,1
DMEM	90

Zdroj: vlastní

Primární kultury neuronů a glií byly kultivovány na Petriho miskách (obr. 2.1), v médiu s přídavkem růstových faktorů PDGF a FGF. Pro adherentní primární neurony byl plast misky povrchově upraven poly-D-lysinem. Použito bylo MACS Neuro Medium od firmy MiltenyiBiotec. Toto médium podporuje optimální růst a dlouhodobé přežívání buněk z centrálního nervového systému myši, potkana a člověka. Pokud médium doplníme růstovými faktory PDGF a FGF, je také vhodné pro tvorbu neurosfér. Dále byl použit Gentamycin od firmy Sandoz, jsou to širokospektrá antibiotika, účinná pro gram-pozitivní a gram-negativní bakterie; Glutamax od firmy Fisherscientific, látka zlepšující zdraví a stabilitu buněk; FTS, fetální hovězí sérum od firmy GibcoLife

Technologies a NeuroBrew NB-21 pro optimální růst a dlouhodobou životaschopnost nervových buněk.

Tabulka 2.2 nám ukazuje přípravu MACS média pro dospělé neurony.

Tab. 2.2: Příprava plného MACS média pro dospělé neurony

Látka	Objem [ml]
MACS médium	43,4
NB 21	1
Gentamycin	0,1
Glutamax	0,5
FTS	5

Zdroj: vlastní

Na 6 ml MACS média bylo přidáno 0,4 μ l PDGF a 0,4 μ l FGF (0,1 mg/ml).



Obr. 2.1: Miska se skleněným dnem, která umožňuje vizualizaci buněk pod konfokálním mikroskopem (průměr misky 3,5 cm; průměr skla 1,3 cm)

Zdroj: vlastní foto

2.2 Pasážování permanentní kultury 3T3

Při výměně média byly buňky promývány fyziologickým roztokem (PBS). Roztok PBS byl následně odsát a k buňkám bylo doplněno čisté kultivační médium. Petriho misky od společnosti ThermoScientific TM Nunclon TM jsou upraveny tak, aby adheze buněk byla co největší.

2.3 Příprava komplexu nanodiamantů

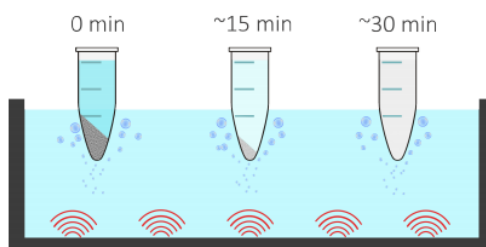
Nanodiamanty jsme získali z FBMI ČVUT od Ing. V. Petrákové, Ph.D. Abychom získali homogenní roztok nanodiamantů, nejprve jsme dali nanodiamanty do sonikační lázně. Nanodiamanty před sonikací vytvářejí na dně zkumavky tmavou peletu, jako je vidět na obrázku 2.2.



Obr. 2.2: Nanodiamanty před sonikací s viditelnou tmavou peletou na dně zkumavky
Zdroj: vlastní

Sonikační lázeň je přístroj, který slouží například pro homogenizaci vzorků, přípravu buněčných a tkáňových kultur. Lázeň jsme naplnili ledem, destilovanou vodou a volně vložili nanodiamanty na plovací desce.

Nanodiamanty by po úspěšné sonikaci měly být homogenní, bez viditelného sedimentu jako je vidět na obrázku 2.3 a 2.4.



Obr. 2.3: Nanodiamanty: sedimentace na dně, po 30 minutách obvykle žádná sedimentace [42]



Obr. 2.4: Nanodiamanty bez viditelného sedimentu
Zdroj: vlastní

Homogenizované nanodiamanty (ND) lze povrchově upravit:

- a) vazbou proteinu - 200 μ l nanodiamantů jsme smíchali s 200 μ l proteinu (5 mg/ml). Výsledná koncentrace nanodiamantů je 1 mg/ml. Směs jsme 60 minut vortexovali při pokojové teplotě a případně následovalo přidání polymeru (viz b). Tabulka 2.3 nám ukazuje přípravu proteinu, transferinu (TF).

Tab.2.3: Příprava transferinu

Látka	Objem [μ l]	Koncentrace [mg/ml]
Transferin	8	5
Voda	192	-

Zdroj: vlastní

- b) vazbou polymerů polyethyleniminu 800 (PEI) – k nanodiamantům (1mg/ml) nebo ND – TF (koncentrace ND 1mg/ml) v objemu 100 μ l jsme přidali 100 μ l PEI (0,9 mg/ml) a nechali jsme tuto směs vortexovat přes noc, aby se molekuly PEI zachytili na nanodiamantech. Polyethylenimin (PEI) je polymer s opakující se jednotkou složenou z aminové skupiny a dvou uhlíkových alifatických skupin. Snadno vytváří komplexy s nukleovými kyselinami a je výborný nosič pro transfekci nukleových kyselin (NK) in vitro.

Centrifugací na 9000 g po dobu 60 minut jsme z roztoku získali komplex ND-PEI (nebo ND-TF-PEI). Na dně mikrozkušavky bychom měli vidět peletu. Veškerý

supernatant, který obsahuje nenavázaný polymer, odsajeme. Peleta (ND-PEI nebo ND-TF-PEI) je zředěna ve 200 μ l vody a rozsuspendována pipetou. Tato směs byla dána opět do sonikační lázně na 30 minut.

- c) vazba nukleové kyseliny (NK) – na 200 μ l komplexů s ND-PEI (koncentrace ND 1mg/ml) přidáme 40 μ l RNA v koncentraci 100 μ M. Komplexy se 60 minut inkubují při pokojové teplotě. Při inkubaci buněk s komplexy ND *in vitro* používáme jednotně finální koncentraci ND v médiu s buňkami 25 μ g/ml.

Pro vlastní pokus jsem připravovala 8 komplexů nanodiamantů.

1. ND (nanodiamanty)
2. ND-PEI (nanodiamanty – polyethylenimin)
3. ND-PEI-RNA (nanodiamanty – polyethylenimin – ribonukleová kyselina)
4. ND-PEI-RNA-TF-Alexa (nanodiamanty–polyethylenimin – ribonukleová kyselina– transferin Alexa Fluor 488)
5. ND-TF-Alexa (nanodiamanty – transferin Alexa Fluor 488)
6. ND-PEI-TF-Alexa (nanodiamanty – polyethylenimin – transferin Alexa Fluor 488)
7. ND-PEI-RNA-TF-Alexa (nanodiamanty – polyethylenimin – ribonukleová kyselina – transferin Alexa Fluor 488)
8. ND-PEI-RNA-TF-Texas Red (nanodiamanty – polyethylenimin – ribonukleová kyselina – transferin Texas Red); tento komplex jsem připravila k porovnání jeho toxicity (*ex vivo*) vzhledem ke komplexu s Alexa Fluor 488, který se v laboratoři běžně používá.

2.4 Metoda izolace dospělých neuronů z myši BL6

Pro vlastní pokus byly použity černé myši kmene C57BL/6 (samci), s váhou okolo 30,2 g, stáří kolem 3 měsíců. Zvířata byla uspána anestetiky 300 μ l. Následně byla provedena dilatace krční páteře a oddělení hlavy od těla. Pro vyseparování samotného mozku byla kůže přetáhnuta z hlavy k čumáku, nastříhnuta lebka po obou stranách týlního otvoru k čumáku, pomocí pinzety odklopena kost a pomocí kopíčka vyndán mozek. Následně jsem pracovala s dvěma mozkovými hemisférami, které jsem vložila do nachlazené Petriho misky. Mozek jsem rychle nakrájela sterilní žiletkou na plátky cca 0,5 mm. Poté jsem je přenesla do eppendorfky s předeřtým papainem (500 μ l). Papain s mozkovou tkání jsem dala na 45 minut do termostatu.

Po 45 minutách a vyndání z termostatu jsem papain opatrně odsála. K tkáni jsem přidala 1 ml MACS média na promytí, médium jsem odsála a toto jsem 3x opakovala. Do takto promyté tkáně jsem přidala 1 ml MACS média. Následně jsem vše sterilní Pasteurovou pipetou opatrně homogenizovala (10x nabrat a vypustit). Je velmi důležité dávat pozor, aby se nevytvořily bubliny, a také se musí pracovat pomalu, abychom nepoškodili buňky. Vše necháme minutu ustát, aby si velké kusy tkáně znovu sedly na dno. Do připravené 15ti ml falkony jsem také dala 1 ml MACS média a opatrně jsem do ní přenesla 1 ml supernatantu z homogenizované tkáně. Sediment jsem dále rozsuspendovala ve 2 ml MACS média a znovu nechala 1 minutu sednout. Tento proces zopakujeme ještě jednou a celkem získáme 6 ml supernatantu.

2.5 Příprava Optiprepu

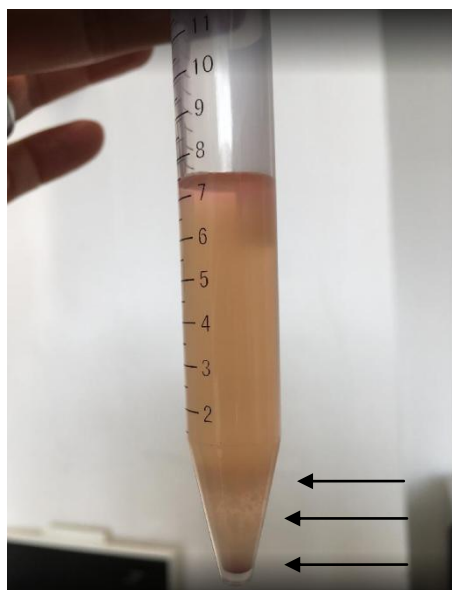
K oddělení neuronů a gliových buněk od dalších buněčných složek bylo potřeba připravit separační roztok Optiprep. Tento roztok je vhodný pro oddělení různých buněčných typů z krve nebo z tkáně. Dále se používá k oddělování životaschopných buněk od neživotaschopných. Optiprep jsem použila pro oddělení neuronů od jiných mozkových buněk, připravila jsem ho podle tabulky 2.4.

Tab. 2.4: Příprava Optiprepu

Vrstva	Optiprep[μ l]	Tkáňová voda [μ l]
1	63	270
2	44	289
3	32	301
4	27	306

Zdroj: vlastní

Do 15 ml falkony jsem začala vrstvit připravený Optiprep, nejprve vrstvu 1, na ni pak opatrně vrstvu 2, aby se nesmíchaly. Poté vrstvu 3 a nakonec vrstvu 4 (obr. 2.4). Na takto připravený roztok jsme opatrně převrstvili 6 ml buněk z mozkové tkáně myši a centrifugovali na 1900 otáček na 15 minut. Po centrifugaci se nám buňky oddělily do frakcí.



Obr. 2.5: Buňky oddělené do viditelných frakcí
(šipky shora: neurony, mikroglie, debris)
Zdroj: vlastní

Vrchní část jsme odsáli k prstenci. Prstenec a zbytek obsahu nad debris odsajeme, dáme do nové falkony a doředíme do 10 ml MACS médiem.

Takto připravenou novou falkonu stočíme na 1100 otáček 2 minuty. Po stočení vrchní část odlijeme a k peletě přidáme médium do 10 ml, opět stočíme. Po tomto stočení vytvořený pelet rozsuspendujeme ve 3 ml média a spočítáme buňky.

2.6 Počítání buněk

Pokud by byl počet buněk příliš vysoký, buňky by dlouho nepřežily z důvodů kontaminace prostředí, ve kterém žijí a nedostatku živin. Adherentní buňky se oddělují od podkladu pomocí Trypsinu. Trypsin štěpí peptidové řetězce, kterým jsou buňky adherovány ke dnu Petriho misky. Po odsátí starého média a promytí buněk PBS, nalijeme 1 ml Trypsinu opatrně ke straně Petriho misky tak, aby rozložení Trypsinu bylo po celé misce. Takto připravené buňky se dají na 10 minut do inkubátoru. Poté se Trypsin odsaje a buňky se spočítají pomocí Bürkerovy komůrky následujícím vztahem:

$$x = \frac{Y}{2,5*4} * \text{ředění} * 10^5 \quad (1.1)$$

V rovnici (1.1) znázorňuje X počet buněk na 1 ml, Y značí počet buněk v 25 polích Bürkerovy komůrky a ředění je objem buněčné suspenze. Dále potřebujeme zjistit, kolik

buněk budeme potřebovat pro experiment. Obvykle pro pozorování konfokálním mikroskopem potřebujeme 500 000 buněk v Petriho misce o průměru 3,5 cm.

Počet buněk, které máme, je obvykle větší, než kolik potřebujeme. Výpočet se provádí pomocí tzv. faktoru ředění.

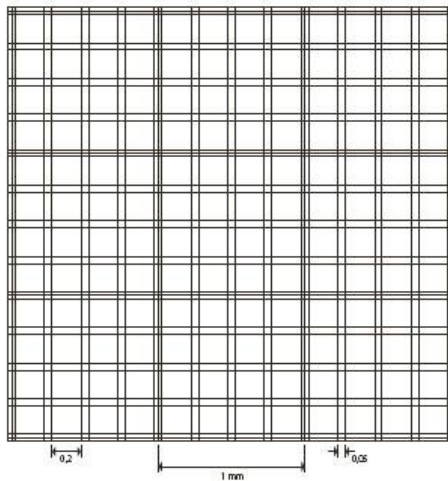
$$DF = \frac{X}{XD} \quad (1.2)$$

V rovnici (1.2) znázorňuje DF faktor ředění, X je výpočet počtu buněk v ml a XD je požadovaný počet buněk na ml. Dále byl využit faktor ředění pro počítání objemu buněk, které by měly být nasazeny do nových Petriho misek:

$$V = \frac{1}{DF} \quad (1.3)$$

Podle vzorce (1.1) jsme zjistili, že 3 ml média obsahují přibližně $3 \cdot 10^7$ buněk. Proto v 96ti jamkové destičce bude finální koncentrace $5 \cdot 10^4$ buněk a ve 12ti jamkové destičce bude finální koncentrace $5 \cdot 10^5$ buněk.

Na obrázku 2.6 můžeme vidět Bürkerovu komůrku.

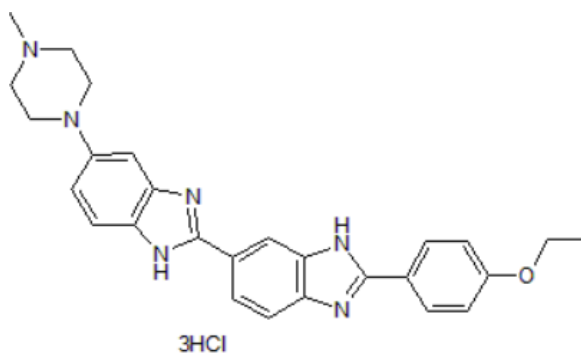


Obr. 2.6: Bürkerova komůrka [43]

Pro některé analýzy se buňky fixují. Postup fixace probíhá tak, že se z Petriho misky (průměr misky: 2 cm) od buněk odsaje PBS, které se ještě jednou přidá a znovu odsaje. Na 15 minut je k buňkám přidán 4% paraformaldehyd. Po inkubaci se buňky opět promyjí v PBS, přidá se nově 500 μ l PBS a buňky se v něm skladují ve 4°C. Takto fixované je můžeme skladovat i několik týdnů.

2.7 Barvení jader s Hoechst

Buněčná jádra byla pro vizualizaci barvena Hoechst 33342. Fluorescenční bisbenzimidazolové barvivo Hoechst 33342 obsahuje dva po sobě jdoucí benzimidazolové kruhy s koncovým N-methylpiperazinem a fenolickými prodlouženými skupinami. Hoechst 33342 (obr. 2.7) je mírně rozpustný ve vodě a relativně netoxický. Existuje i Hoechst 33258, který se také využívá pro vizualizaci jader a mitochondrií. Rozdíl mezi Hoechst 33342 a 33258 spočívá v tom, že 33342 má na benzenovém kruhu ethylovou skupinu místo hydroxylové skupiny. Tato substituce činí z Hoechst 33258 relativně nepropustný přes buněčné membrány a je užitečný při detekci poškozených nebo mrtvých buněk. Hoechst barviva, 33342 a 33258 se váží na dvouvláknovou DNA téměř stejným způsobem. [35,34]



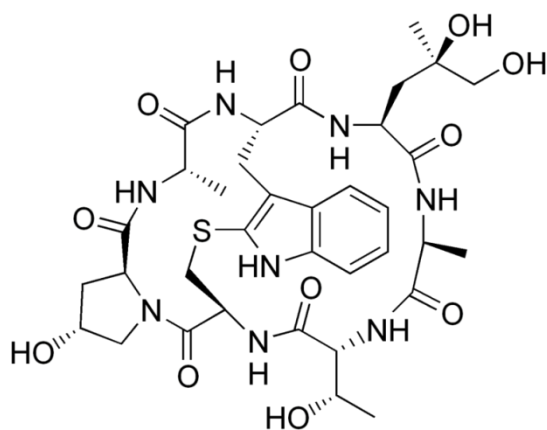
Obr. 2.7: Barvivo Hoechst 33342 [44]

Požadované množství Hoechst (1 mg/ml) bylo ředěno 1:100 do každé misky o velikosti 35 mm s 20 mm skleněným dnem. Asi 20 minut trvá, než se jádra obarví.

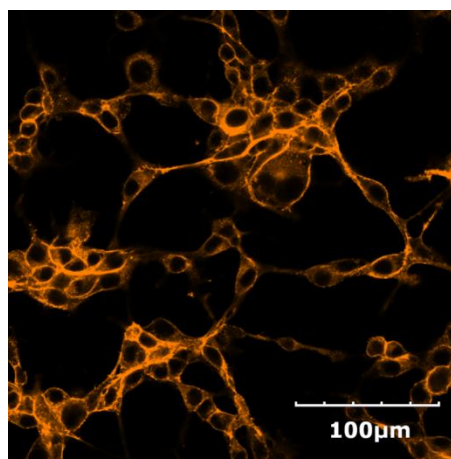
2.8 Barvení aktinových vláken Phalloidinem

Phalloidin je cyklický peptid, který byl izolovaný z houby *Amanitaphalloides*. Tento peptid se váže na F-aktinová vlákna s vysokou afinitou. [37] Phalloidin (obr. 2.8) jsem používala od společnosti Abcam. K přípravě Phalloidinu jsem smíchala 0,2 μl Phalloidinu s 200 μl ředícího pufru B (dle výrobce je doporučený poměr ředění 1:1000).

Do Petriho misky o průměru 35 mm (s 20 mm skleněným dnem) bylo přidáno 200 μl směsi, vše se zakrylo alobalem a inkubovalo se na třepačce 60 minut při pokojové teplotě. Následně byly buňky promyty PBS a případně dobarveny Hoechst. Poté jsme již buňky mohli pozorovat konfokálním mikroskopem.



Obr. 2.8: Použitý Phalloidin Orange [45]



Obr. 2.9: Aktin 3T3 buněk barvený Phalloidinem
Zdroj: vlastní foto

2.9 Konfokální mikroskopie

Pro vizualizaci stimulovaných a nestimulovaných buněk byla použita konfokální mikroskopie.

Mikroskopie je nezbytnou součástí výzkumu buněčné biologie. Konfokální mikroskopy sbírají světlo z jedné roviny a eliminují signály mimo ohnisko. Sběr fluorescence z více rovin v celém objektu vytváří dvourozměrné (2D) obrazy. Každá tato rovina může být zobrazena jednotlivě. Tento proces lze opakovat s použitím odlišné excitace světla. [33,32]

Konfokální mikroskop nám umožňuje zkoumat struktury hustých vzorků biologické tkáně ve třech rozměrech. Využívá skenovací přístup společně s konfokálním systémem. [34,33]

K měření jsem používala Olympus FluoView FV1000 (obr. 2.10), konfokální laserový biologický mikroskop. Pro vizualizaci nanodiamantů jsem použila excitační laser 559 nm a detekci emise v rozmezí 655-755 nm. Jakoukoli nespecifickou fluorescenci je možné odstranit pomocí bělení laserem 405 nm, protože ND nezhásejí. Pro buněčná jádra, která byla barvena Hoechst 33342, jsem použila nastavení Ex/Em 405/461 nm, pro F-aktin vlákna cytoskeletu, která byla obarvena Phalloidinem nastavení Ex/Em 559/574 nm a pro vizualizaci Alexa Fluor 488 nastavení 473/520 nm.



Obr. 2.10: Konfokální laserový biologický mikroskop Olympus FluoView FV1000 Zdroj: vlastní foto

2.10 Příprava jamek pro kultivaci neuronů

Než budeme na Petriho misky nanášet neurony, musíme si nejprve jamku potáhnout Poly-lysinem. Existují 2 typy: Poly-L-lysin, který se používá pro neonatální neurony a Poly-D-lysin, který se využívá pro dospělé neurony, proto jsem použila tento. Naopak gliové buňky nepotřebují potah Poly-lysinu, protože rostou pouze na plastovém dně jamky. Pokud jsou neurony na vrstvě glií, také nepotřebují potah plastu Poly-lysinem. V našich experimentech používáme misky se skleněným dnem, potažené Poly-D-lysinem. Pro potažení jamek jsem do každé jamky dala 100 μ l Poly-D-lysinu. Poly-D-lysin se někdy velmi špatně rozprostírá po celé ploše jamky, proto jsem misky dala

na 1 hodinu na třepačku. Po 1 hodině se jamka musí promýt 1 ml tkáňové vody. Tento proces se zopakuje 3x. Jamky se nechají na vzduchu vyschnout.

2.11 Příprava sfér

Sféry jsem připravovala různými způsoby:

1) v agarózových mikrokavitách (MicroTissues Inc.)

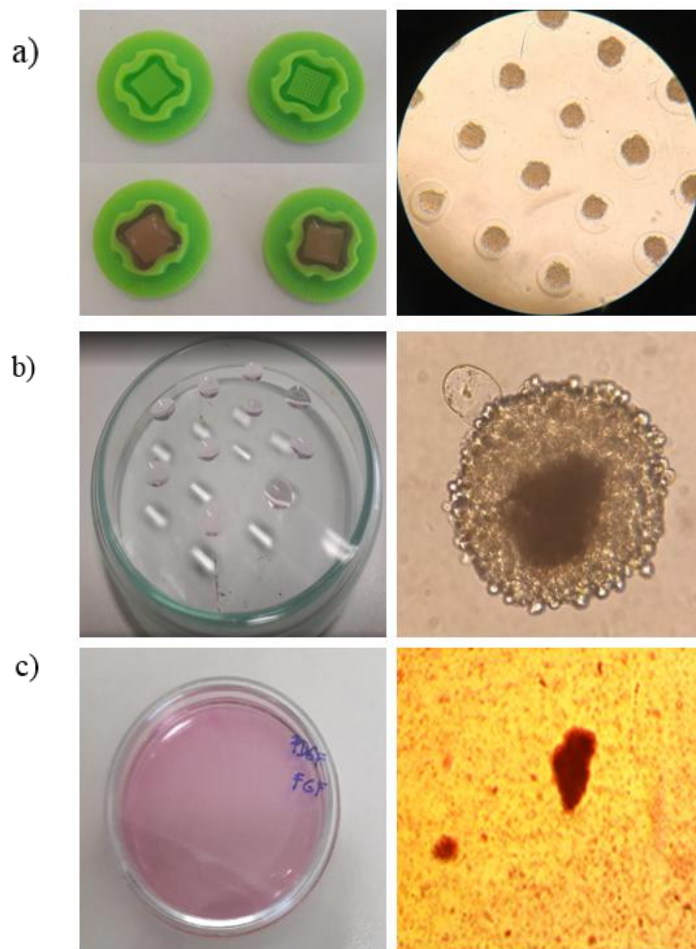
Při přípravě jamek pro sféry si nejprve musíme v mikrovlnné troubě rozeřtát 2% agarózu. Musíme s ní následně pracovat velmi rychle, protože rychle tuhne. Do silikonové formy nalijeme 190 μ l agarózy tak, aby vzniklo co nejméně bublin, poté se nechá forma přes noc ztuhnout. Tuhá agaróza se z formičky vyloupne, sterilně se přenese do kultivační jamky, naplní se médiem a buňkami (40000 buněk na 75 μ l média) (obr. 2.11a). Mikrokavity nutí buňky k blízkému kontaktu a podporují tak mezibuněčné interakce. Buňky navíc nemohou adherovat k povrchu, protože agaróza to neumožní.

2) ve visací kapce

Buňky (2000 buněk/40 μ l) byly nakapány opatrně na víčko Petriho misky a víčko se obrátilo. Buňky tak díky gravitaci spadly na dno kapky a díky blízkému kontaktu a absenci povrchu k adherenci vytvářely mezibuněčné spoje a formovaly sférám podobné shluky (obr. 2.11b).

3) v Petriho misce s přidáním faktorů, které umožňují tvorbu sfér anebo znesnadňují adherenci k podkladu.

Pro tvorbu neurosfér jsem přidávala PDGF a FGF. Spolu s absencí polymeru, který by umožnil adherenci neuronů k povrchu misky, došlo k upřednostnění mezibuněčných interakcí a tvorbě shluků (obr. 2.11c). Neurosféry vznikají dělením nervových kmenových buněk, kterých je u dospělé myši velmi málo, v naší kultuře máme tedy shluky neuronů, které se drží v útvarech podobných sférám, ale dle definice se nejedná o neurosféry.



Obr. 2.11: a) prázdné mikrokavity a po naplnění agarózou, sféry v kavitě
 b) visací kapky na víčku Petriho misky, sféra v kapce
 c) Petriho miska s médiem a růstovými faktory, kolonie neuronů

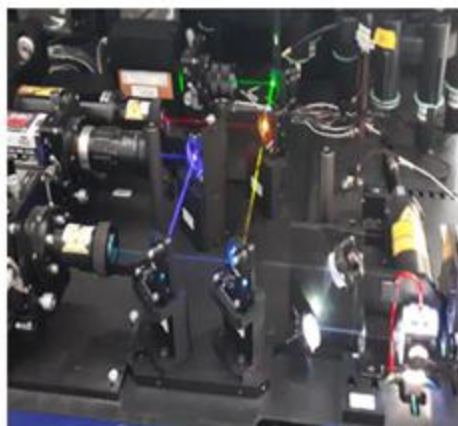
Zdroj: vlastní

2.12 Průtoková cytometrie (FACS) pro měření hladin cytokinů

Průtoková cytometrie (obr. 2.12, 2.13) je laserová nebo impedanční metoda, která má vysokou propustnost a umožňuje velmi rychlou analýzu mnoha chemických a fyzikálních vlastností jednotlivých buněk v populaci. Živé nebo pevné buňky mohou být barveny širokým rozsahem fluorescenčních barev, aby bylo možné označit různé buněčné antigeny nebo měřit různé fyziologické procesy. Průtoková cytometrie je také vhodná pro měření velikosti, interakci, agregaci nebo tvaru buněk za použití vlastního rozptylu světla. [39]

Velikou výhodou analýzy buněk průtokovou cytometrií je rychlost analýzy – tisíce buněk mohou být analyzovány za sekundu, nebo rozděleny během několika minut. Nevýhodou je sledování konkrétní buňky v čase a také chybí prostorová informace týkající se jednotlivých buněk. [39]

Na průtokovém cytometru jsem měřila fluorescenci speciálních kuliček tzv. Cytometric Bead Array. Tímto způsobem jsem získala kvantitativní informace o množství sekretovaných cytokinů. K detekci cytokinů (TNF-alfa, IFN-gamma, interleukin-6) jsem použila kuličky značky Legendplex-Biolegend. Jde o testovací panel myších cytokinů na bázi kuliček fluorescenčně značených pro detekci na průtokovém cytometru. Kuličky se rozlišují velikostí a intenzitou fluorescence. Každá kulička je konjugovaná se specifickou protilátkou na povrchu a slouží jako záchytná kulička pro tento analyt. Když se vybraný panel smísí a inkubuje se vzorkem obsahující cílové analyty, každý analyt se bude vázat na své specifické kuličky. [46] Kuličky jsem nechala 1 minutu sonikovat v sonikační lázni a 30 sekund vortexovat. Kit obsahuje 3 druhy kuliček. Z každého druhu jsem odpipetovala 16 μ l a doplnila do 200 μ l komerčním pufrem. Následně jsem do každého 25 μ l vzorku v duplikátu přidala 25 μ l kuliček a 25 μ l protilátky. Takto připravený komplex jsem pod alobalem dala na 2 hodiny na třepačku. Po sundání z třepačky jsem do každého komplexu přidala 25 μ l SA-PE, nechala 30 minut inkubovat a poté jsem měřila na průtokovém cytometru. Jako pozitivní kontrolu detekce cytokinů jsem používala vzorek periferních mononukleárních buněk, které byly odebrané ze zvířat stimulovaných intraperitoneálně lipopolysacharidem (LPS: 10mg/kg váhy) po dobu 24 hodin.



Obr. 2.12: Průtokový cytometr. Analýza vnitrobuněčných markerů (tubulin a Hoechst) a viability buněk (propidium iodide). (Takto byla zjištěna i přítomnost fluorescenčně značeného komplexu nanodiamantů podávaného *in vivo*).

Obr. 2.13: Průchod laserů průtokovým cytometrem

Zdroj: vlastní

2.13 Celotělové zobrazování

Abych mohla zobrazit komplex nanodiamantů v krevním řečišti myši, bylo nutné nejdříve připravit komplex nanodiamantů, injekční stříkačky, anestézii (1000 μ l Narkamon (ketamin) a 400 μ l Rometar (xylozin) a 50 ml sterilní vody), eppendorfky s EDTA (100 μ l a více), falkonu s PBS (cca 20 μ l), Petriho misky, alobal, USB, nůžky a pinzetu.

Nejprve jsem vyfotila komplex ve zkumavce, zda bude pod mikroskopem celotělového zobrazování možné detekovat komplex. Poté jsem myš uspala vpíchem 300 μ l anestezie. Myš jsem vložila pod mikroskop celotělového zobrazování a vyfotila jsem ocásek. Poté jsem myši aplikovala komplex (ND-TF-PEI-RNA; TF značen Alexa Fluor 488) do ocasní žíly a ocásek vyfotila. Následně jsem myši odebrala krev a smíchala ji s roztokem EDTA. Krev byla odebrána ze srdce (cca 250 μ l). Poté následovala dislokace krční páteře, otevření myši a vyndání mozku do PBS na mističku, také vyndání jater a sleziny do PBS. Játra a slinivku jsem vyndala z toho důvodu, že jde o klíčové orgány, kde je možná kumulace komplexu nanodiamantu. Ocásek i orgány byly vyfoceny v transmisi a fluorescenci (nastavení Ex/Em 473/520 nm).

K získání neuronů jsem mozek homogenizovala přes sítko do čistého roztoku PBS a vše stočila 1500 otáček na 5 minut. Po stočení jsem k peletě přidala 10 ml PBS a znovu stočila na 1500 na 5 minut. Po stočení jsem přidala k peletě 1 ml PBS a přes filtr (20 μ m) přefiltrovala do nové falkony. Poté jsem vše rozdělila do dvou eppendorfek po 500 μ l s přidáním komplexu nanodiamantů do jedné z těchto eppendorfek. Následně jsou tyto vzorky změřeny na průtokovém cytometru (nastavení Ex/Em 473/ 520 nm).

Následně se pracuje s krví. Krev jsem dala stočit na 2500 otáček na 20 minut. Po stočení jsem supernatant (plazmu) zamrazila na teplotu -20°C , kde bude plazma skladována do měření cytokinů.

2.14 Metabolismus buněk – test WST-1

Metoda WST-1 je metoda, při které jsou tetrazoliové soli živých buněk metabolizovány mitochondriálními dehydrogenázami na formazan. Buňky nejprve nasadíme na 96ti jamkovou destičku s komplexy nanodiamantů a následně přidáme roztok WST-1 s kterým byly buňky po dobu 4 hodin inkubovány v 37°C a 5% CO_2 .

Použila jsem následující komplexy nanodiamantů: ND, ND-PEI, ND-PEI-RNA-TF-Alexa, ND-TF-Alexa, ND-PEI-TF-Alexa, ND-PEI-RNA, FTS a Glutamax. FTS (20%) je k buňkám přidáno z důvodu stimulace jejich proliferace, naopak Glutamax ke snížení metabolismu u starší kultury. Finální koncentrace Glutamazu v jamce byla 8 mM.

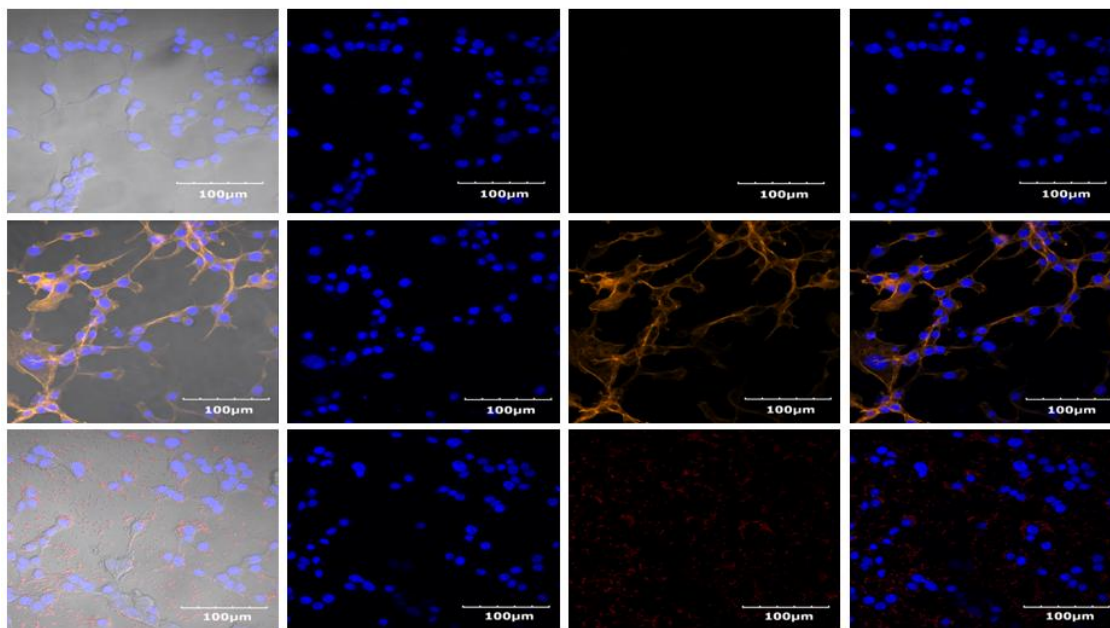
3 Výsledky

V jednotlivých podkapitolách uvádíme výsledky zjištění, jak nanodiamanty ovlivňují buňky nervové tkáně. Analyzovali jsme jejich mitochondriální aktivitu, morfologii a produkci cytokinů, které by mohly ukazovat na patologickou reakci. Náš výzkum jsme provedli na modelech *ex vivo* a *in vivo*.

3.1 Optimalizace barvení a vizualizace intracelulárních markerů

Pro optimalizaci barvení jader a cytoskeletu jsem použila permanentní buněčnou linii NIH/3T3 (myši immortalizované fibroblasty). Fotografie byly pořízeny konfokálním mikroskopem při zvětšení 40x. Buněčná jádra byla barvena Hoechst 33342 a dále byla barvena aktinová vlákna Phalloidinem. K vizualizaci byly použity nanodiamanty o velikosti 35-50 nm.

Na obrázku 3.1 lze v prvním řádku vidět kontrolu – buňky, které nebyly stimulovány ND komplexy a jsou u nich barvena jen jádra. Ve druhém řádku jsou kontrolní buňky s obarvenými aktinovými vlákny (oranžová barva) a jádry. Třetí řádek reprezentuje buňky, které byly inkubovány s ND a zde jsou zobrazeny nanodiamanty a jádra. Protože při detekci Phalloidinu dochází k interferenci jeho emise se snímáním emise nanodiamantů, dohromady jsme je nedetekovali.



Obr. 3.1: NIH/3T3 foto buněk z konfokálního mikroskopu; buňky neinkubované s nanodiamanty (1. a 2. řádek), buňky inkubované s nanodiamanty (3. řádek), zvětšení 40x (v prvním sloupci je zobrazena transmise spolu se všemi fluorescenčními kanály, ve druhém sloupci fluorescence z kanálu jader, třetí sloupec fluorescence z kanálu aktinových vláken a čtvrtý sloupec fluorescence z kanálu jader a aktinových vláken)

Zdroj: vlastní

3.2 Optimalizace izolace dospělých neuronů

Izolace neuronů z dospělé myši je poměrně problematická vzhledem k vytvořené a bohatě rozvětvené neuronální síti. Během izolace tak často dochází k porušení neuritů, které dospělé neurony často nemohou zregenerovat. V izolátech je velké množství debris z mozkových blan a cév. Tento debris zhoršuje kvalitu kultury primárních neuronů a snižuje její viabilitu a výtěžnost. Zatímco při izolaci embryonálních nebo časně postnatálních neuronů získáme poměrně čisté a vitální neurony pouhou homogenizací mozkové tkáně, izolace dospělých neuronů vyžaduje vícekový postup a optimalizaci.

V této diplomové práci jsem optimalizovala purifikaci primárních neuronů pomocí gradientové separace. V laboratoři byla používána metoda intrakardiální perfúze, která umožnila vyměnit periferní krev zvířete za fyziologický roztok. Tím byl eliminován debris z cévního zásobení mozkové tkáně a získaná mozková tkáň obsahovala dostatek vitálních neuronů. Takto získaná kultura obsahovala vedle primárních neuronů i gliové buňky. Nicméně pro další výzkum bylo zapotřebí izolovat kulturu s menším množstvím glií (aby při delší době kultivace nedošlo k přerůstání neuronální kultury gliemi). Pro

purifikaci primárních neuronů jsme použili gradientovou separaci centrifugací v gradientu Opti-prep (Density gradient medium, 1,319-1,321 g/ml). Hustotu gradientu jsem optimalizovala pro náš modelový systém.

Pro vhodnou izolaci neuronů gradientovou separací jsme optimalizovali protokol následujícím způsobem. Vytvořili jsme tři různé možnosti koncentrací ředění.

Tab. 3.1: Ředění Optiprepu pro separaci neuronů

1

Vrstva	Optiprep (μl)	MACS medium (μl)	Hustota
1.	58	275	1,057
2.	41	295	1,043
3.	33	300	1,036
4.	25	308	1,029

2

Vrstva	Optiprep (μl)	MACS medium (μl)	Hustota
1.	56	277	1,055
2.	44	284	1,045
3.	32	301	1,035
4.	21	312	1,026

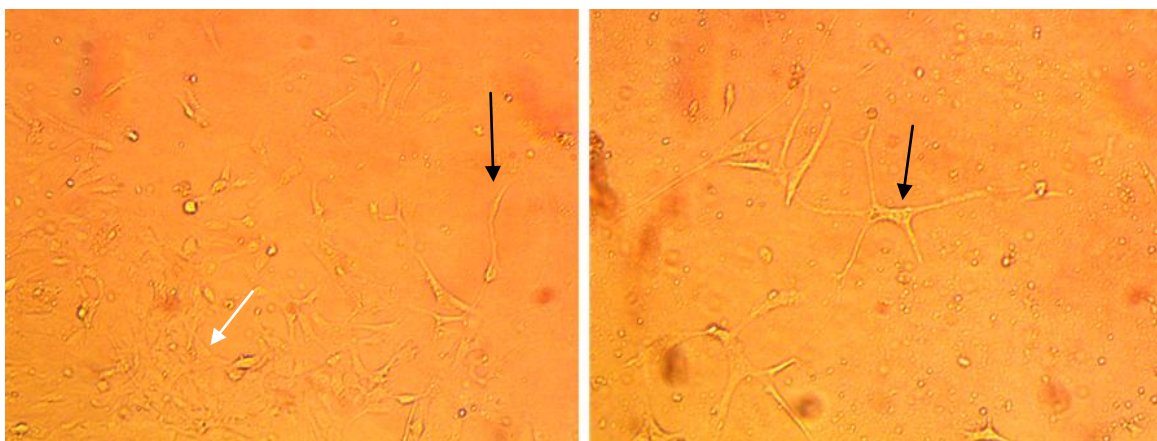
3

Vrstva	Optiprep (μl)	MACS medium (μl)	Hustota
1.	63	270	1,061
2.	44	289	1,045
3.	32	301	1,035
4.	27	306	1,031

Zdroj: vlastní

V tabulkách vidíme různé koncentrace ředění. Jako nejvhodnější koncentrace jsme využili ředění v tabulce 3, díky které jsme získali velké množství neuronů.

V kultuře izolované po intrakardiální perfúzi jsou vidět primární neurony i velké množství gliových buněk (obr.3.2,vlevo). Zde bylo také důležité načasovat vhodně propláchnutí kultury čerstvým médiem, čímž jsem získala velmi čistou kulturu (obr. 3.3). V kultuře po purifikaci primárních neuronů jsou více vidět morfologicky definované primární neurony (vpravo).

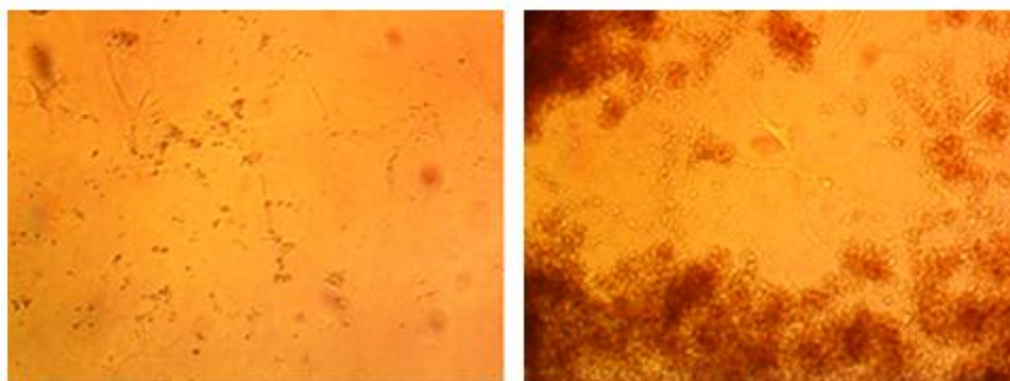


Obr. 3.2: Kultura primárních neuronů 7 dní po izolaci

Zdroj: vlastní

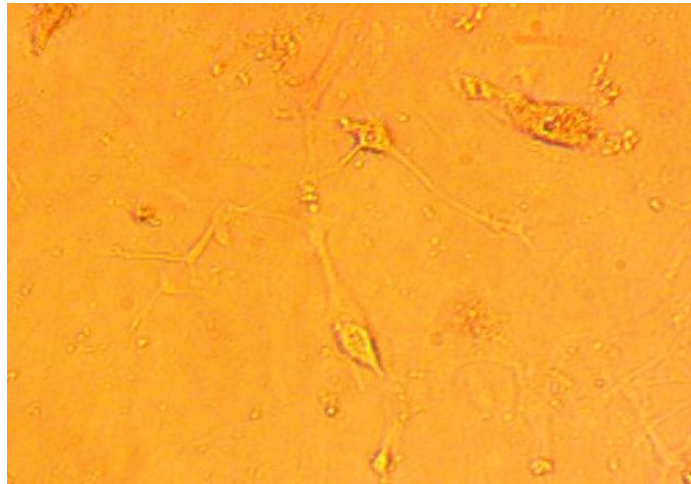
Vlevo je kultura izolovaná po intrakardiální perfúzi (bílá šipka – gliové buňky, černá šipka – neurony) a vpravo je kultura po gradientové separaci primárních neuronů (šipka – neurony).

Na obrázku 3.3 vlevo je kultura promytá čerstvým médiem po 60 minutách po nasazení izolovaných neuronů do kultury. Naopak vpravo vidíme nejen neuronové a gliové buňky, ale jsou zde velmi zřetelně vidět i nečistoty, které zde zůstaly po izolaci a mrtvé buňky, protože tato kultura nebyla po izolaci promyta čistým médiem.



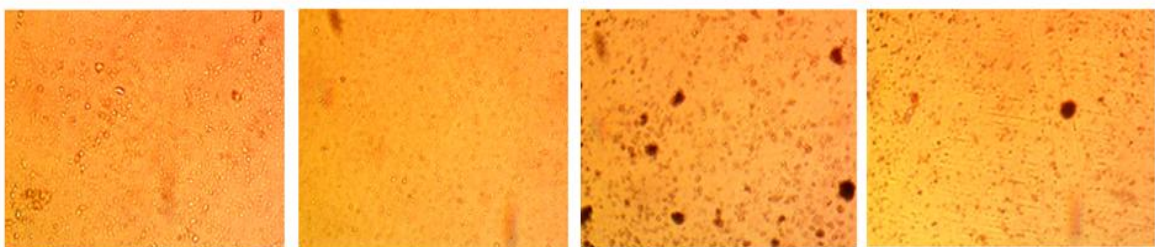
Obr. 3.3: Kultura nervové tkáně po perfúzi po promytí vlevo a bez promytí vpravo.
Fotografie nervové tkáně po 14tidenní kultivaci

Zdroj: vlastní



Obr. 3.4: Fotografie neuronu po 14ti denní kultivaci v detailu
Zdroj: vlastní

Pro zjištění interakce nervové tkáně s nanodiamanty jsem potřebovala neurony, které se nepřichytí k podkladu a budou preferovat mezibuněčné interakce (zůstanou ve shluku). Lze toho docílit pěstováním izolátu na povrchu (bez polymerního pokrytí), který znemožní přisednutí a bude buňky nutit k vytvoření mezibuněčné interakce. Aby se neuronům v takové kultuře dařilo, přidala jsem do kultivačního média růstové faktory FGF a PDGF. Tyto faktory také umožní přežití a proliferaci nervových kmenových buněk, které jsou v dospělé mozkové tkáni zastoupeny ve velmi malém počtu. Pokud by se mi podařilo vyizolovat nervové kmenové buňky a došlo by k jejich proliferaci, získala bych kulturu neurosfér. V mém izolátu bylo těchto buněk velmi málo a tvorbu pravých neurosfér jsem nepozorovala. Získala jsem ale suspenzní kulturu se shluky nervových buněk, které zůstaly vitální po celou dobu trvání pokusu (3 týdny). Tyto shluky byly tvořeny jak primárními neurony, tak i určitým procentem glií, což dobře imituje situaci ve fyziologické mozkové tkáni.



Obr. 3.5: Tvorba shluků v primární kultuře neuronů 0, 2, 7 a 14 dní po izolaci

Zdroj: vlastní

Na první fotografii 3.5 vidíme buňky nervové tkáně, které byly pořízeny optickým mikroskopem první den po jejich kultivaci. Na samém počátku pokusu zatím nelze vidět ani neuronové ani gliové buňky. Druhá fotografie je pořízena po dvou dnech sledování buněk mozkové tkáně optickým mikroskopem, ani zde nelze vysledovat neuronové ani gliové buňky. Na třetím obrázku vidíme kulturu buněk po sedmi dnech, zde je patrná tvorba shluků. Poslední čtvrtý obrázek je kultura po čtrnácti dnech kultivace, kultura zde obsahuje shluky, ale méně, zřejmě byla již přestárlá.

3.3 Vliv nanodiamantových komplexů na morfologii shluků neuronální tkáně

Když jsem tyto shluky inkubovala s nanodiamanty, tak jsem neviděla žádné morfologické změny, které by nasvědčovaly tomu, že nanodiamanty mění sílu vazby mezi buňkami přítomnými ve shluku - například rozpadání shluků. V tomto experimentu byly buňky mozkové tkáně (myš kmene C57BL/6) nasazeny na 12ti jamkovou destičku a následně (inkubace zahájena 24 hodin po izolaci) byly nastimulované komplexy ND tak, jak to vidíme v tabulce 3.2.

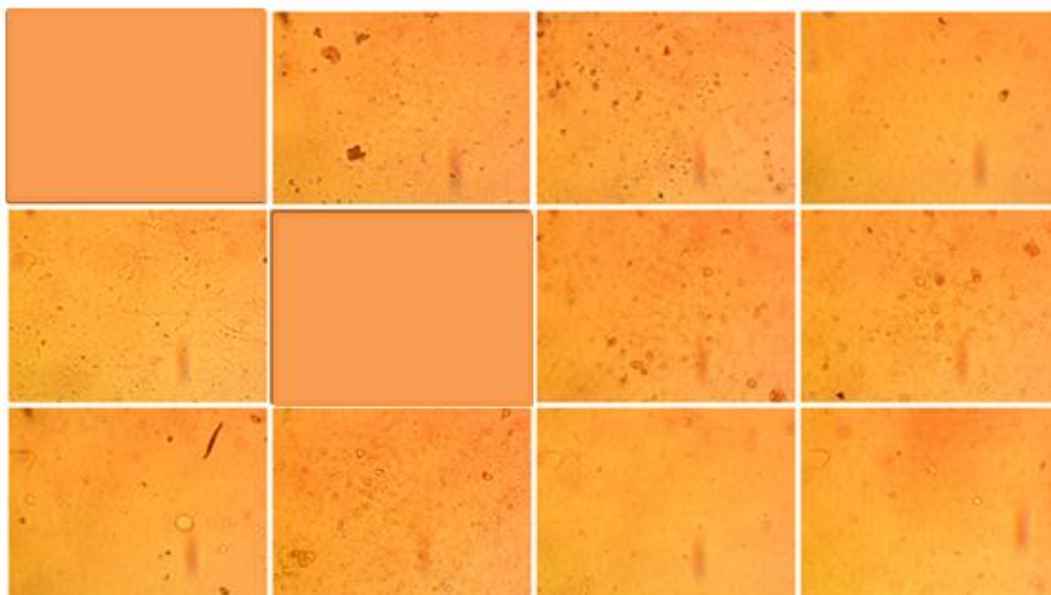
Tab.3.2: 12ti jamková destička s rozpisem umístění buněk a komplexů ND

	1	2	3	4
A	Médium	ND	ND, PEI	ND, PEI, RNA
B	Buňky	Médium	ND, PEI, RNA, TF TexasRed	ND, TF Alexa
C	FTS	Glutamax	ND, PEI, TF Alexa	ND, PEI, RNA, TF Alexa

Zdroj: vlastní

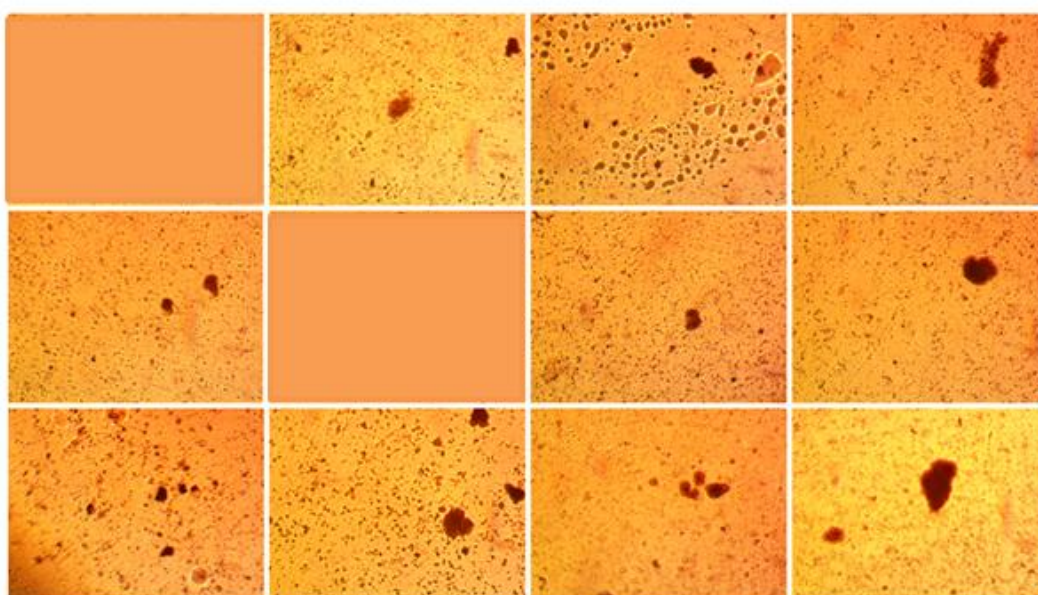
Pro stimulaci proliferace jsme použili FTS. Aby neurony zpočátku dobře prosperovaly, je důležité k nim přidat glutamát (Glutamax). Po určité době už je ale glutamát pro neurony nepotřebný, případně toxický. Zvláště, když nejsou přítomny gliové buňky, aby zbytky Glutamazu odstranily, dochází k úmrtí neuronů.

Buňky pro 12ti jamkovou destičku byly izolovány z mozku myši C57BL/6, samce. K těmto buňkám byly přidány komplexy nanodiamantů podle rozpisu v tabulce 3.2. Fotografie byly pořízeny optickým mikroskopem v jednodenním, dvoudenním, sedmidenním a čtrnáctidenním cyklu. Rozložení buněk je stejné jako vidíme v tab.3.2



Obr. 3.6: Fotografie buněk nervové tkáně optickým mikroskopem 24 hodin po izolaci
Zdroj: vlastní

Na fotografiích 3.6 vidíme buňky nervové tkáně, které byly pořízeny optickým mikroskopem první den po jejich kultivaci. Na samém počátku pokusu zatím nelze vidět ani neuronové ani gliové buňky v žádném z dílčích čtverců (jamek).

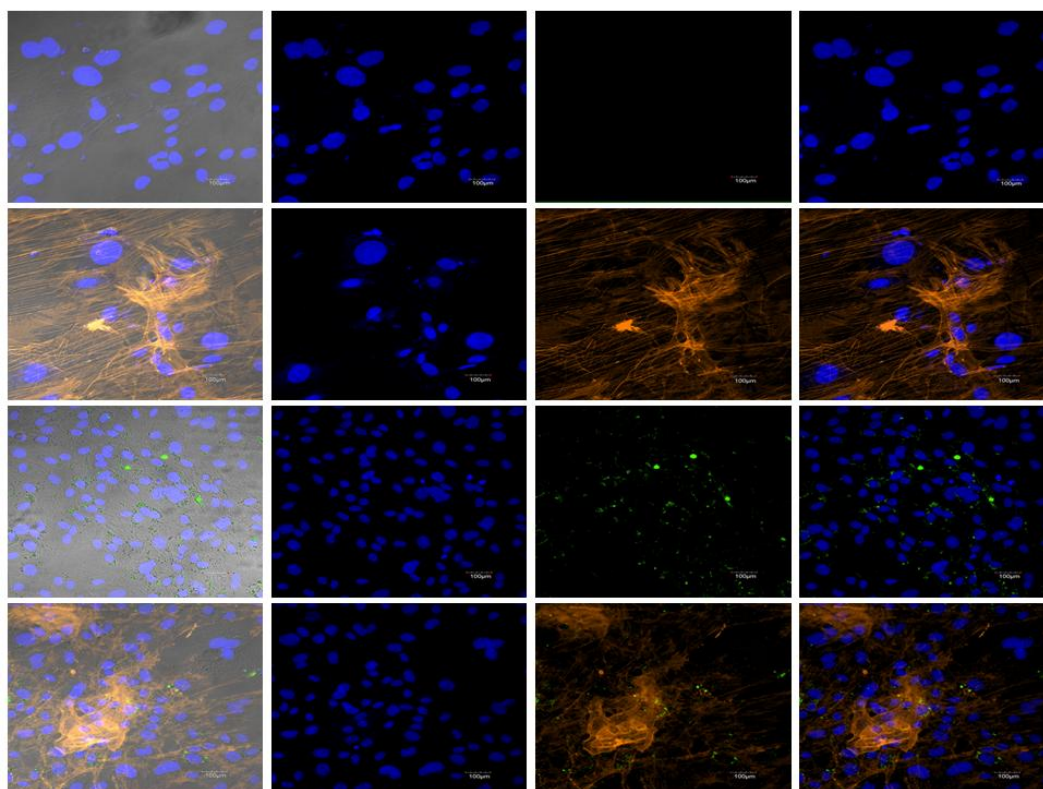


Obr. 3.7: Morfologie kultury primárních neuronů rostoucích ve shlucích. Fotografie byly pořízeny optickým mikroskopem po 14ti dnech inkubace s nanodiamantovými komplexy
Zdroj: vlastní

Na fotografiích 3.7 můžeme vidět kultury primárních neuronů, které rostou ve shlucích, pořízené optickým mikroskopem 14 dní po jejich kultivaci.

3.4 Sledování internalizace ND komplexu v kultuře adherentních neuronů

Protože vizualizace shluků nervové tkáně je problematická, sledovala jsem internalizaci nanodiamantových komplexů na kultuře adherentních neuronů. Jednalo se o směsnou ko-kulturu primárních neuronů a glií, která více imituje přirozené prostředí nervové tkáně.



Obr. 3.8: Neuronální buňky, foto z konfokálního mikroskopu, zvětšení 40x (v prvním sloupci je zobrazena transmise spolu se všemi fluorescenčními kanály, ve druhém sloupci fluorescence z kanálu jader, třetí sloupec fluorescence z kanálu aktinových vláken/ND a čtvrtý sloupec fluorescence z kanálu jader a aktinových vláken/ND; první a druhý řádek: kontrolní buňky bez stimulace nanodiamanty; třetí a čtvrtý řádek: buňky stimulované ND. První řádek – kontrola barvení, barvena pouze jádra; druhý řádek - obarvená aktinová vlákna a jádra; třetí řádek - zobrazeny nanodiamanty a barvena jádra; čtvrtý řádek – barvena jádra a aktin a zobrazeny nanodiamanty. Ve čtvrtém řádku bylo možné detekovat nanodiamantové komplexy dohromady s Phalloidinem, protože nanodiamanty byly ještě navíc spojeny s konjugátem transferinu – Alexa Fluor 488.

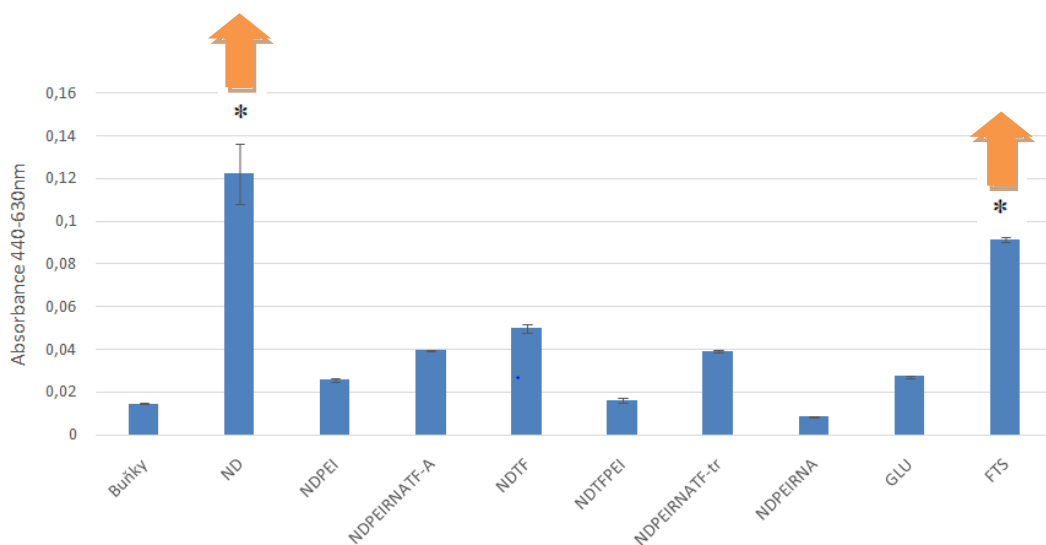
Zdroj: vlastní

3.5 Test metabolismu -WST-1

Pro test metabolismu primárních neuronů jsme použili činidlo WST-1. Test využívá redukci WST-1 pro měření buněčné mitochondriální aktivity, kdy prosperující buňky obsahují NAD(P)H dependentní oxidoreduktázové enzymy, které redukují WST-1 činidlo.

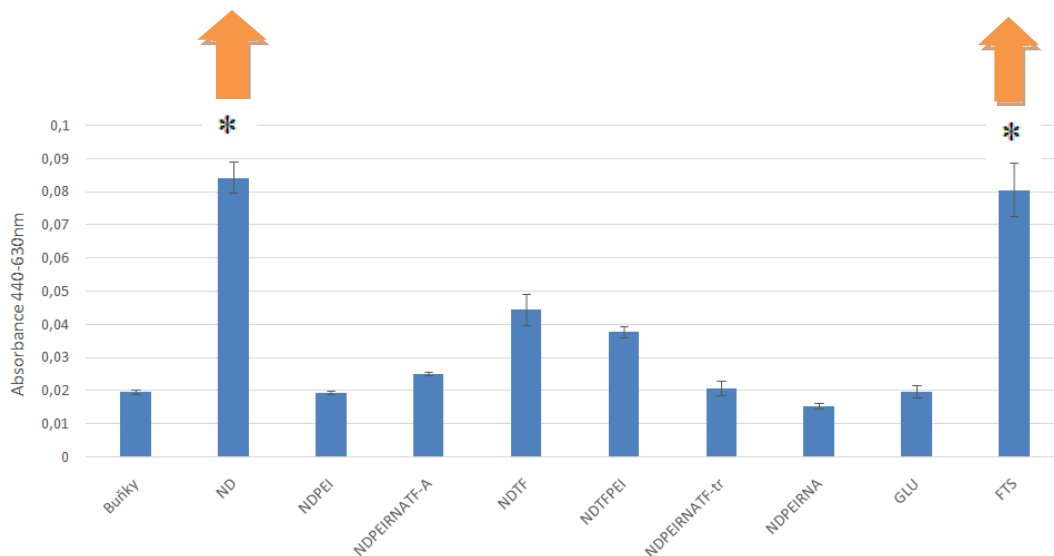
Buňky byly ve 12ti jamkových destičkách stimulovány komplexy: ND, ND-PEI, ND-PEI-RNA-TF-Alexa, ND-TF-Alexa, ND-TFAlexa-PEI, ND-PEI-RNA-TF-TexasRed, ND-PEI-RNA, Glutamax a FTS. Jako kontrola byly použity vzorky stimulové PBS. Pro stimulaci metabolismu jsme použili 20% FTS.

Vzorky byly měřeny po 1, 2, 7 a 14 dnech. Na konci inkubační doby byly buňky inkubovány činidlem WST-1 4 hodiny při 37°C a 5% CO₂. Následně proběhla analýza ve spektrofotometru. Absorbanci jsme měřili při 440 nm, referenční měření proběhlo na 630 nm. Následně jsme výsledky ze spektrofotometru vyhodnotili ve statistickém programu ANOVA (graf 3.1-3.4).

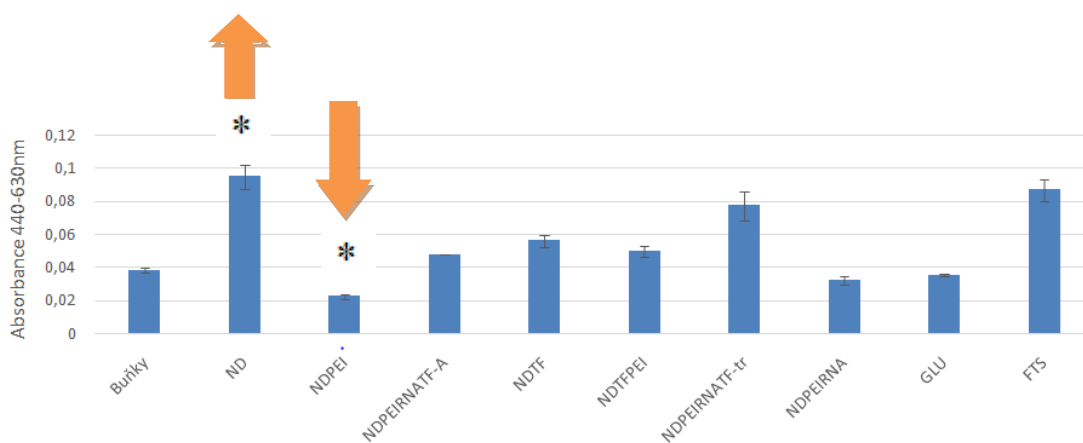


Graf 3.1: WST-1 test, ND stimulace primárních neuronů po 1 dnu.

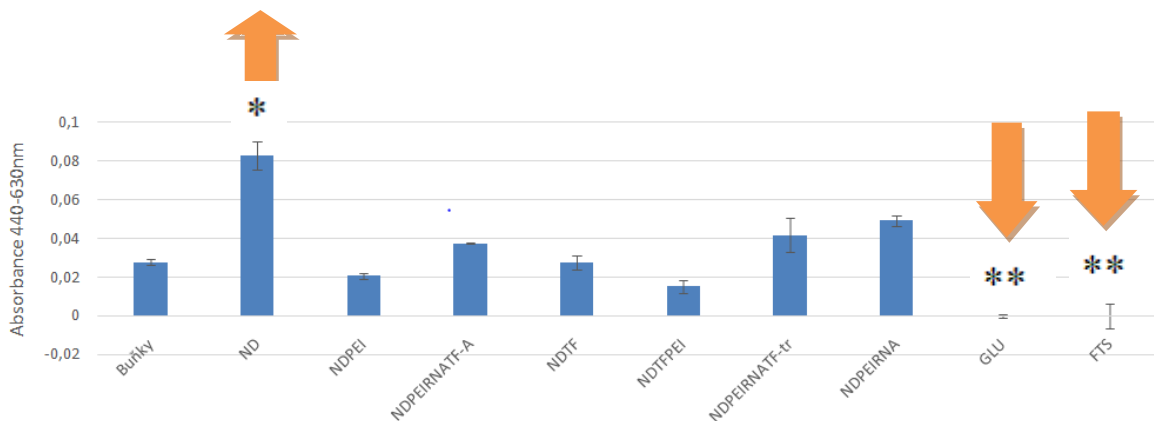
Zdroj: vlastní



Graf 3.2: WST-1 test, ND stimulace primárních neuronů po 2 dnech.
Zdroj: vlastní



Graf 3.3: WST-1 test, ND stimulace primárních neuronů po 7 dnech.
Zdroj: vlastní



Graf 3.4: WST-1 test, ND stimulace primárních neuronů po 14 dnech.
Zdroj: vlastní

Grafy 3.1-3.4: TF-A značí Transferin Alexa Fluor 488, TF-tr značí Transferin Texas Red. Hodnoty byly měřeny spektrometrem a zpracovány ve statistickém programu ANOVA.

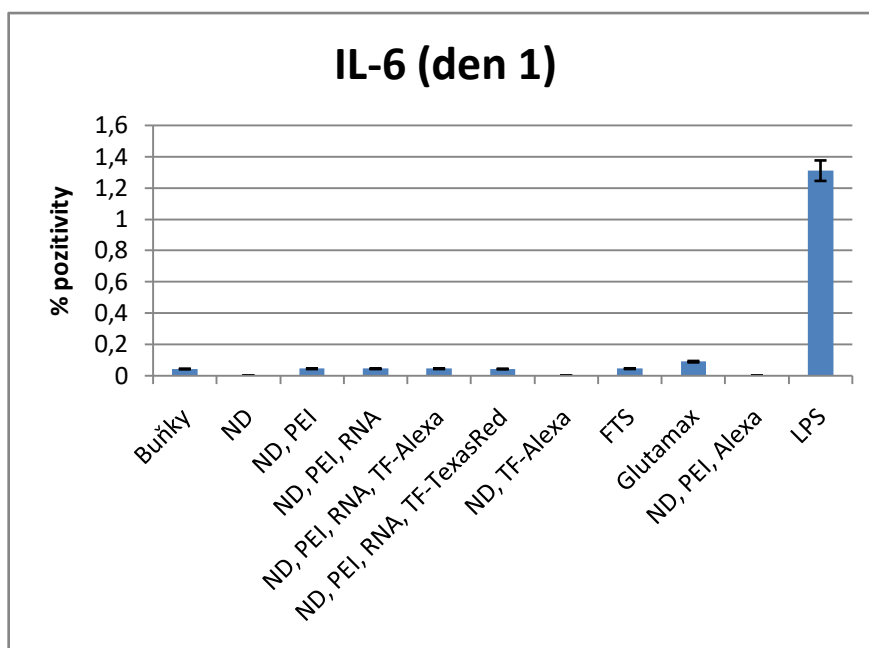
V grafu 3.1 je patrné, že nedošlo k signifikantnímu snížení ani zvýšení žádného z komplexu, ale ke statistickému zvýšení metabolické aktivity došlo u pozitivní kontroly FTS a samotných ND. V grafu 3.2 byla zvýšená absorbance po stimulaci buněk ND a stejně tak i po přidání FTS k buňkám. V grafu 3.3 byla zvýšená absorbance u buněk po stimulaci ND, naopak po stimulaci buněk ND-PEI došlo k signifikantnímu snížení absorbance. V grafu 3.4 vidíme, že po stimulaci buněk ND došlo ke zvýšení absorbance, naopak u stimulace Glutamaxu a FTS došlo k signifikantnímu snížení.

3.6 Sekrece cytokinů po interakci nervové tkáně s různými ND komplexy

Cytokiny jsou proteiny produkované různými buňkami, které se vážou na specifické receptory. Mají v organismu řadu funkcí, např. mohou ovlivňovat průběh zánětlivého procesu a buněčného cyklu. Jde o zánětlivé markery. Mezi nejznámější cytokiny patří interleukiny, TNF a interferony. Nacházejí se v těle buď sekretované (plazma, tkáňová tekutina) nebo jsou vázané na membránu.

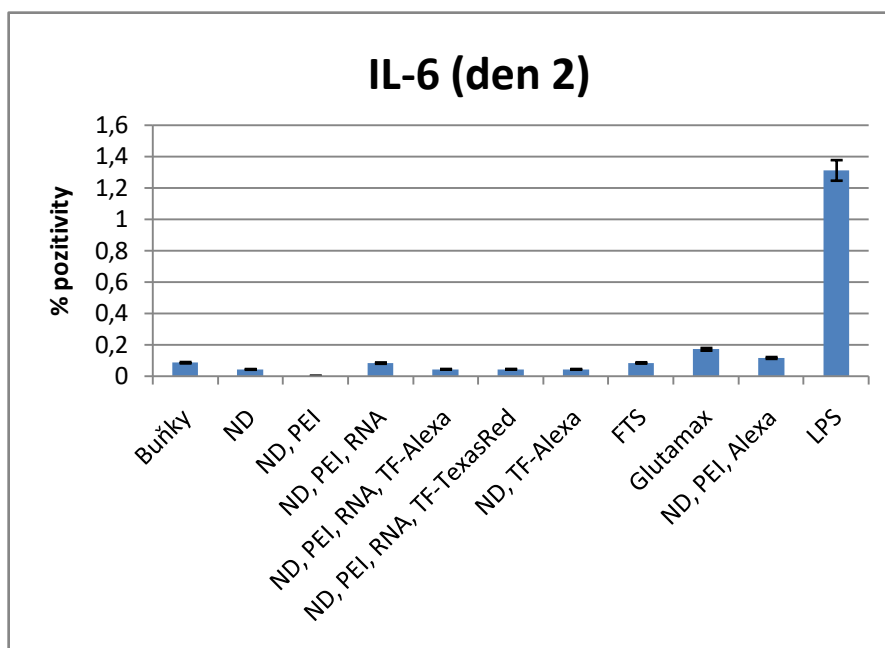
K detekci cytokinů jsme použili kuličky značky Legendplex-Biolegend. Tyto kuličky byly přidány do média, které bylo odebrané od buněk. Tyto buňky byly stimulovány sedmi komplexy: ND, ND-PEI, ND-PEI-RNA-TF-Alexa, ND-TF-Alexa, ND-TF-Alexa-PEI, ND-PEI-RNA-TF-TexasRed, ND-PEI-RNA, glutamátem (Glutamax) a FTS. Jako kontrola byly použity buňky stimulové PBS. Cytokiny uvolněné z buněk do média jsme detekovali na průtokovém cytometru.

Detekce cytokinů byla provedena jednodenním, dvoudenním, sedmidenním a čtrnáctidenním intervalu. Výsledky analýzy uvádíme v následujících grafech (3.5-3.16).

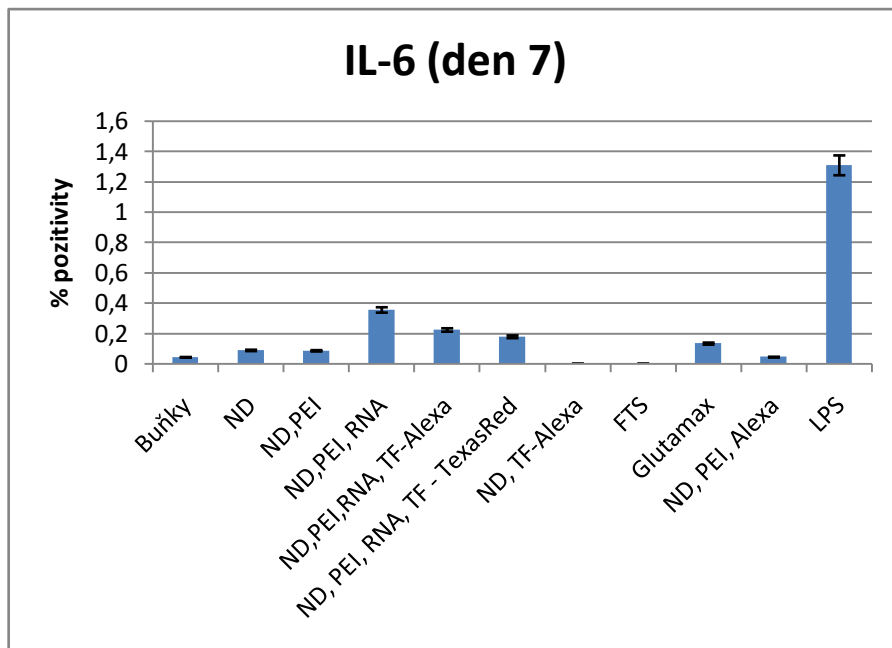


Graf 3.5: Detekce hladin sekretovaného interleukinu-6 (IL-6) v neuronálních buňkách stimulovaných různými ND komplexy 1 den.

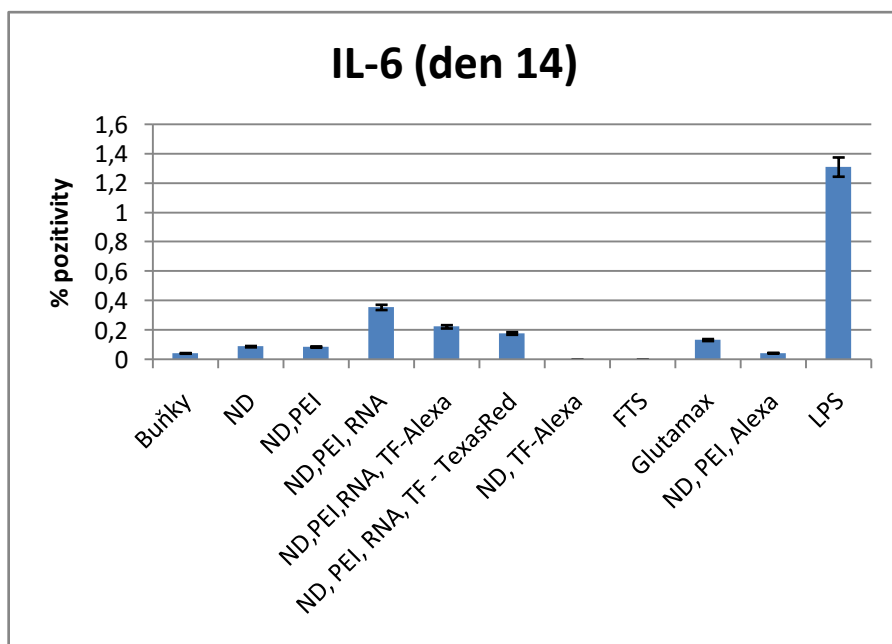
Zdroj: vlastní



Graf 3.6: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 2 dny. Zdroj: vlastní

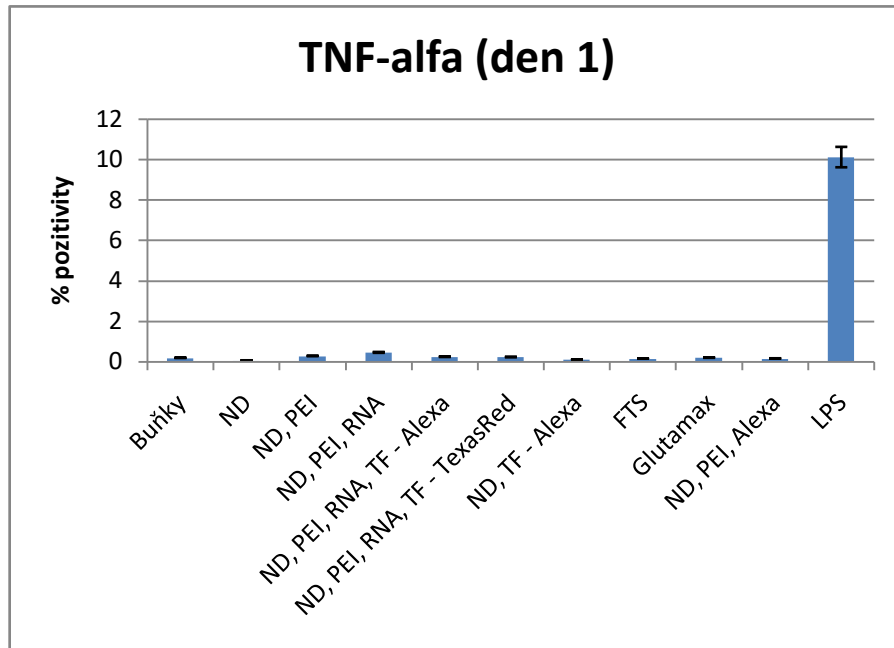


Graf 3.7: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 7 dní Zdroj: vlastní

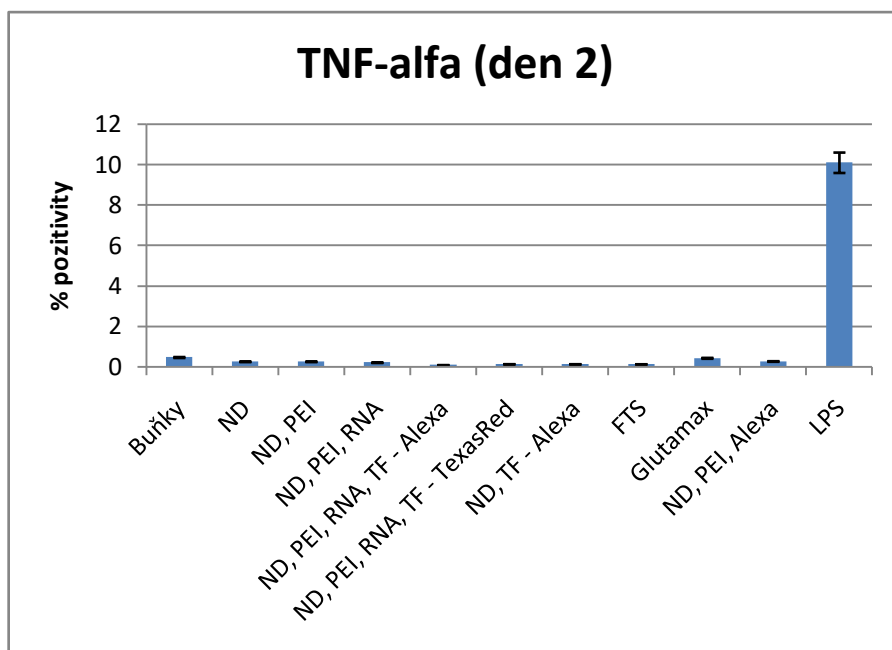


Graf 3.8: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 14 dní. Zdroj: vlastní

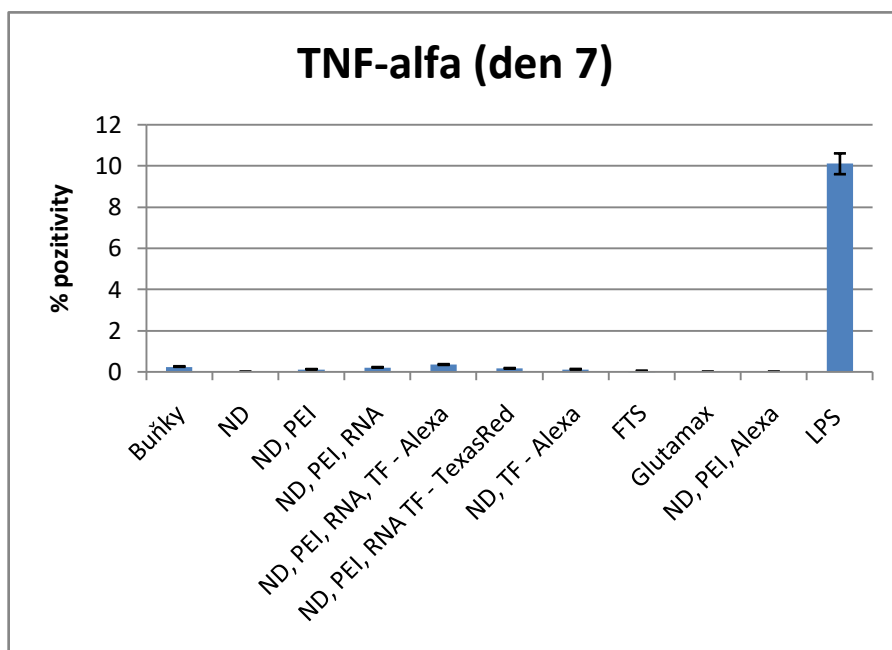
Po jednom a dvou dnech od stimulace buněk nanodiamantovými komplexy vidíme lehce zvýšenou hladinu IL-6 pouze u vzorků stimulovaných Glutamaxem. Jiný nárůst positivity nebyl zaznamenán. Oproti počátečnímu období inkubace, u buněk stimulovaných 7 a 14 dní jsem pozorovala zvýšenou hladinu IL-6 u ND-PEI-RNA a ND-PEI-RNA-TF- (konjugáty s Alexa Fluor 488 i TexasRed).



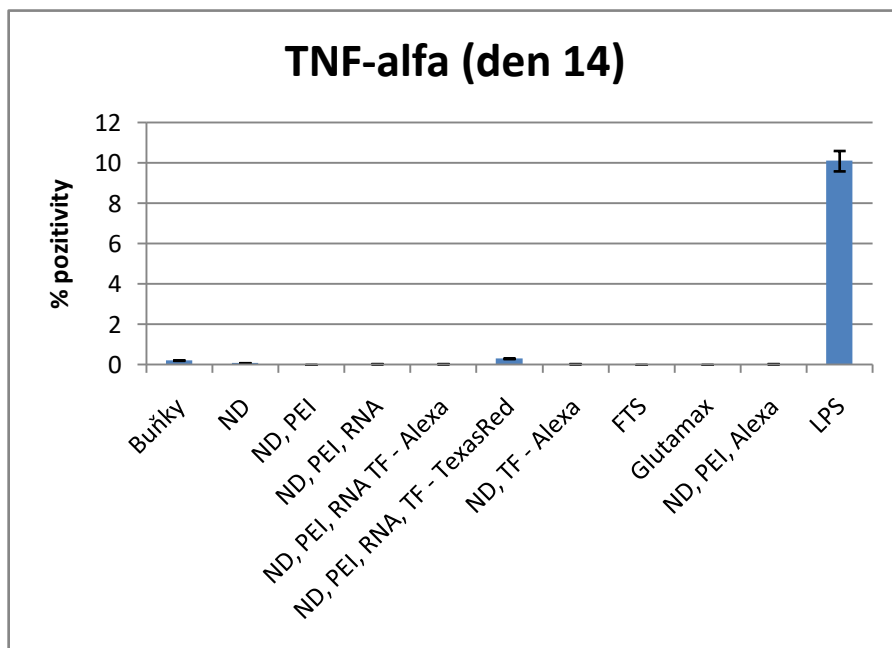
Graf 3.9: Detekce hladin sekretovaného TNF-alfa v neuronálních buňkách stimulovaných různými ND komplexy 1 den.
Zdroj: vlastní



Graf 3.10: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 2 dny. Zdroj: vlastní

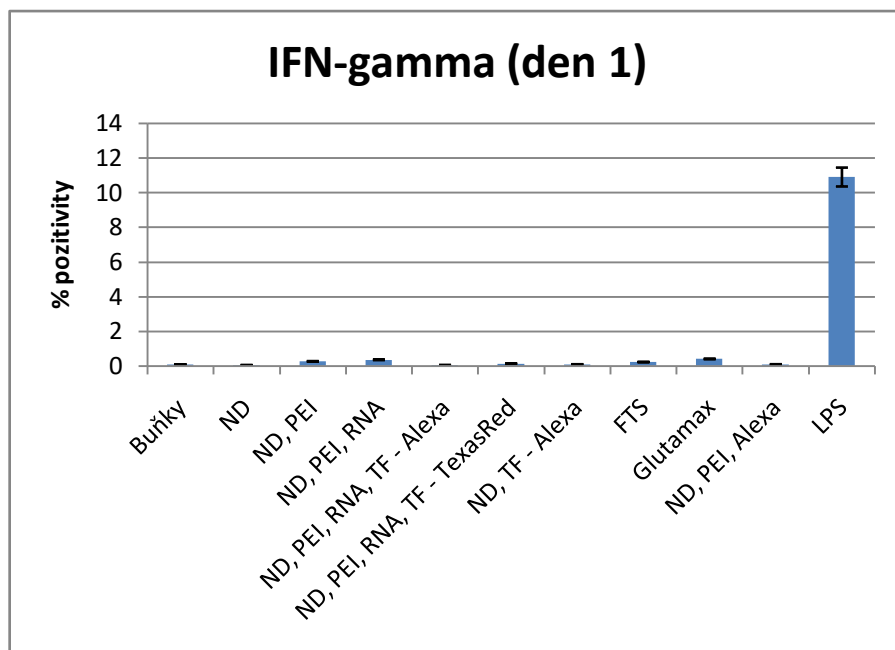


Graf: 3.11: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 7 dní. Zdroj: vlastní

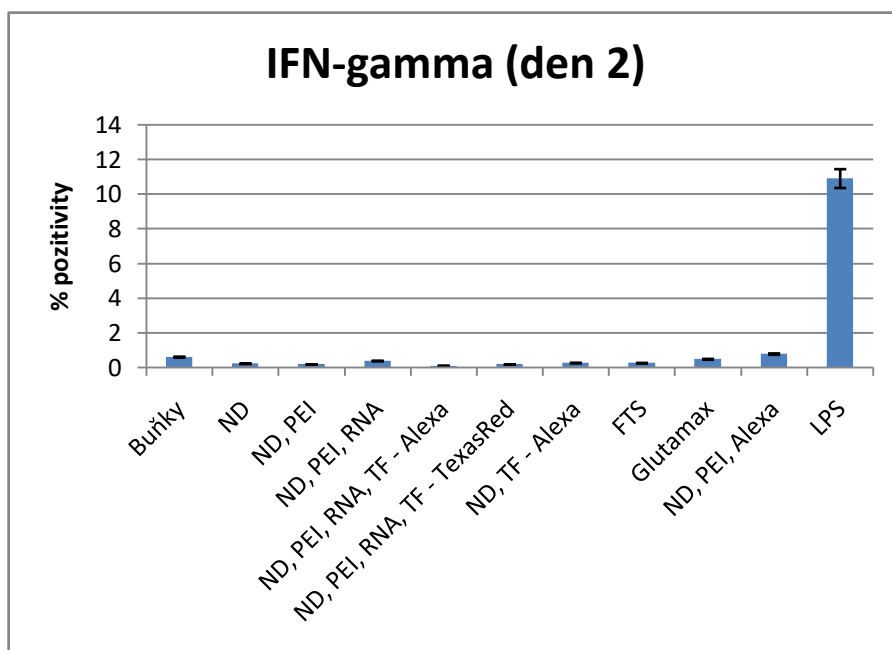


Graf 3.12: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 14 dní. Zdroj: vlastní

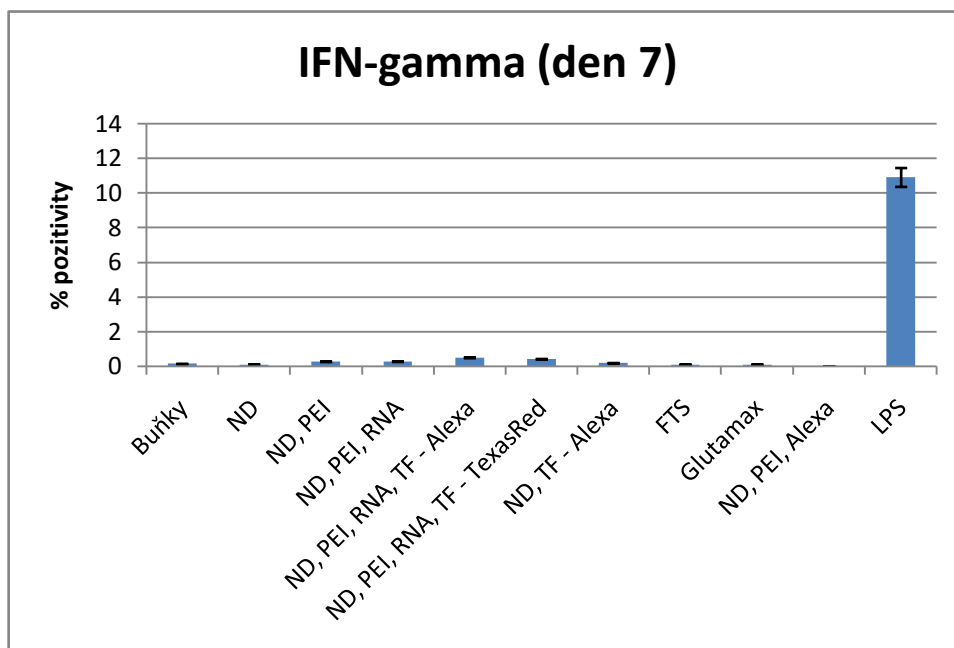
Po jednom dni od stimulace buněk nanodiamantovými komplexy vidíme lehce zvýšenou hladinu TNF-alfa pouze u vzorku stimulovaném ND-PEI-RNA. Po dvou dnech od stimulace buněk je vidět lehce zvýšená hladina TNF-alfa u vzorku stimulovaného Glutamaxem. Jiný nárůst positivity nebyl zaznamenán. U buněk stimulovaných 7 dní jsem pozorovala zvýšenou hladinu TNF-alfa u ND-PEI-RNA-TF Alexa. 14 dní po stimulaci jsem pozorovala zvýšenou hladinu TNF-alfa u buněk stimulovaných ND-PEI-RNA-TF-TexasRed.



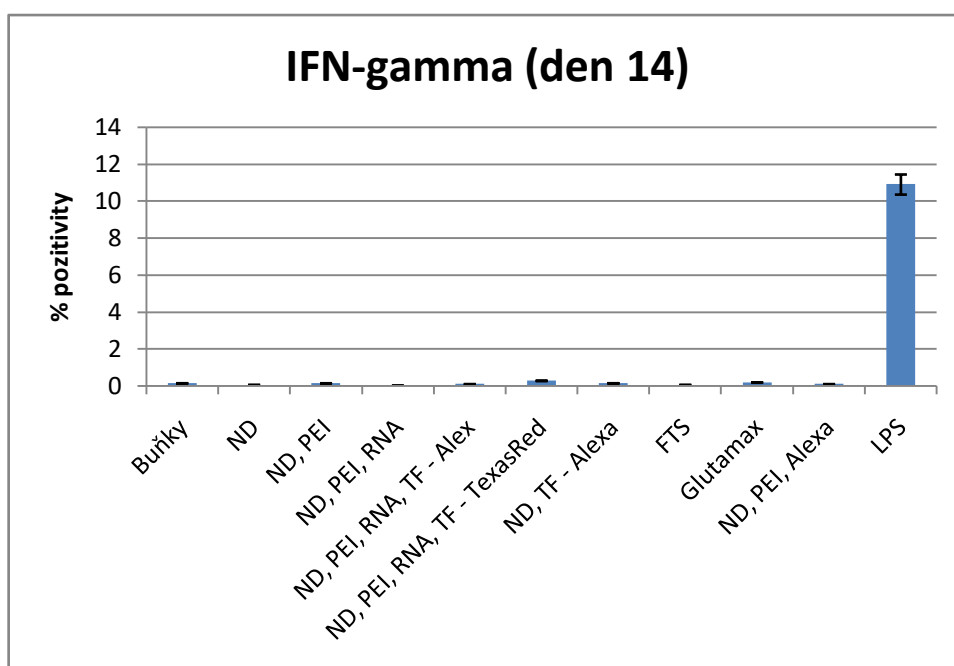
Graf: 3.13: Detekce hladin sekretovaného interferonu-gamma (IFN-gamma) v neuronálních buňkách ND komplexu 1 den. Zdroj: vlastní



Graf: 3.14: Neuronální buňky stimulovány ND komplexu 2 dny. Zdroj: vlastní



Graf 3.15: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 7 dní. Zdroj: vlastní



Graf 3.16: Neuronální buňky stimulovány ND komplexy 14 dní. Zdroj: vlastní

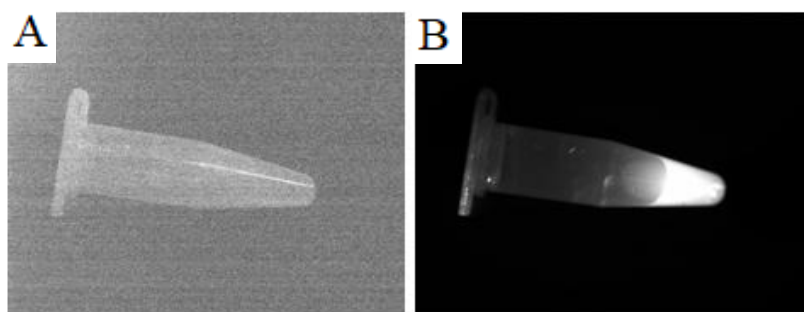
Po jednom dni od stimulace buněk nanodiamantovými komplexy vidíme lehce zvýšenou hladinu IFN-gamma u vzorků stimulovaných ND-PEI-RNA a Glutamaxem. Dále jsem pozorovala po dvou dnech od stimulace buněk nanodiamantovými komplexy zvýšenou hladinu IFN-gamma u vzorku stimulovaného ND-PEI-TF-Alexa. Jiný nárůst

pozitivity nebyl zaznamenán. Oproti počátečnímu období inkubace u buněk stimulovaných 7 a 14 dní jsem pozorovala zvýšenou hladinu IFN-gamma u ND-PEI-RNA-TF-TexasRed. Po 7 dnu stimulace byla navíc zaznamenána zvýšená hladina IFN-gamma u ND-PEI-RNA-TF-Alexa.

3.7 Vizualizace vstřebávání a akumulace ND komplexu po aplikaci do tělního oběhu myši

Nadcházející obrázky byly pořízeny celotělovým mikroskopem 0, 3, 7 a 14 dní po aplikaci ND komplexu. K pokusu byl použit myší model C57BL/6 samci, samotná aplikace komplexu ND byla do ocasní žíly myši v objemu 30 μ l (koncentrace ND 1 μ g/ μ l). Aplikován byl komplex ND-PEI-RNA-TF-Alexa. Tento komplex jsme zvolili právě proto, protože při předchozích pokusech byl po aplikaci detekován v krevním řečišti, proto by mohla být pravděpodobnost jeho přestupu přes BBB. Fluorescenční barva Alexa Fluor 488 je v komplexu přítomna vedle fluorescenčních nanodiamantů z toho důvodu, že nanodiamanty nemůžeme v celotělovém mikroskopu detekovat.

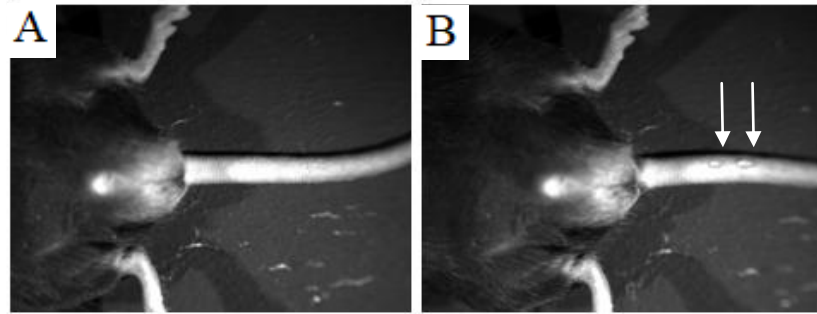
Abychom mohli potvrdit fluorescenci komplexu, vizualizovali jsme ho nejprve samotný. To nám posloužilo i jako pozitivní kontrola. Na obrázku 3.9A lze vidět vizualizaci komplexu nanodiamantů ND-PEI-RNA-TF-Alexa transmisí v eppendorfci, na obrázku 3.9B vidíme fluorescenční vizualizaci komplexu nanodiamantů ND-PEI-RNA-TF-Alexa (excitace: 473 nm, emise: 520 nm).



Obr. 3.9: Vizualizace komplexu nanodiamantů ND-PEI-RNA-TF-Alexa.
A:transmise; B: fluorescence
Zdroj: vlastní

Vizualizace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa po aplikaci do ocasní žíly

Pro kontrolu bylo vždy provedeno snímání v transmisi a ve stejné pozici snímání fluorescence. Aby bylo možné porovnat vstřebávání komplexu do oběhu, bylo snímání fluorescence komplexu opakováno po několik dní.

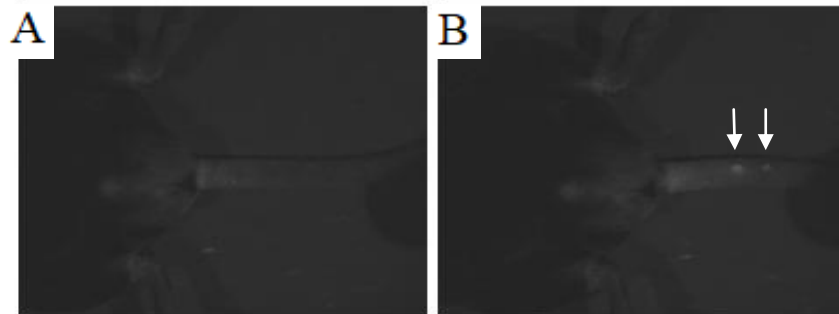


Obr. 3.10: Vizualizace spodní části myši před a co nejdříve po vpichu (den 0).

A: transmise; B: transmise po aplikaci komplexu

ND-PEI-RNA-TF-Alexa

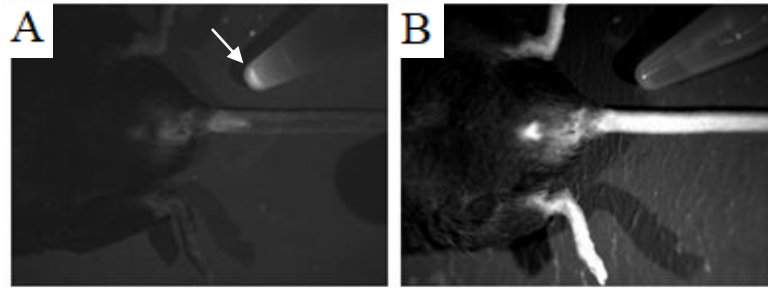
Zdroj: vlastní



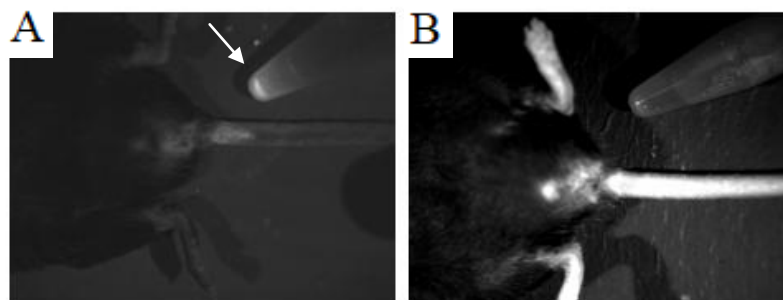
Obr. 3.11: Vizualizace spodní části myši před a co nejdříve po vpichu (den 0).

A: fluorescence; B: fluorescence po píchnutí komplexu

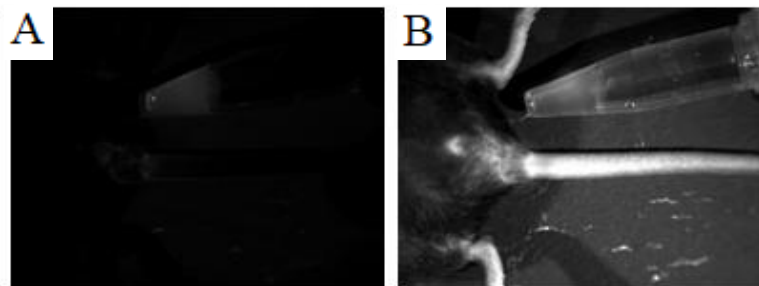
Zdroj: vlastní



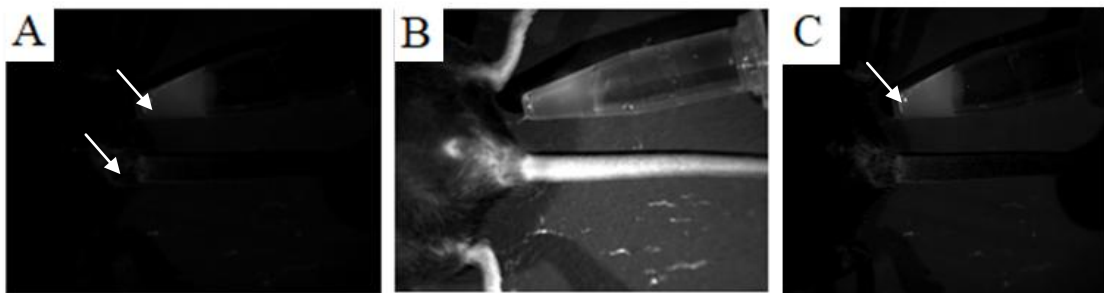
Obr. 3.12: Vizualizace spodní části myši s komplexem ND 72 hodin po aplikaci komplexu (den 3). A: fluorescence; B: transmise
Zdroj: vlastní



Obr. 3.13: Vizualizace spodní části myši s komplexem ND-PEI-RNA-TF-Alexa 168 hodin po aplikaci komplexu (den 7). A: fluorescence; B: transmise
Zdroj: vlastní



Obr. 3.14: Vizualizace spodní části myši s komplexem ND-PEI-RNA-TF-Alexa po 336 hodinách od aplikace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (14. den)
A: fluorescence; B: transmise
Zdroj: vlastní

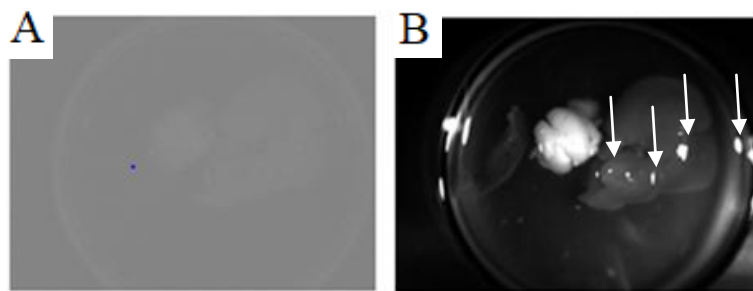


Obr.3.15: Vizualizace spodní části myši s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách (14. den) od aplikace komplexu. A: fluorescence focena na 50 ms; B: transmise; C: fluorescence focena na 100 ms
Zdroj: vlastní

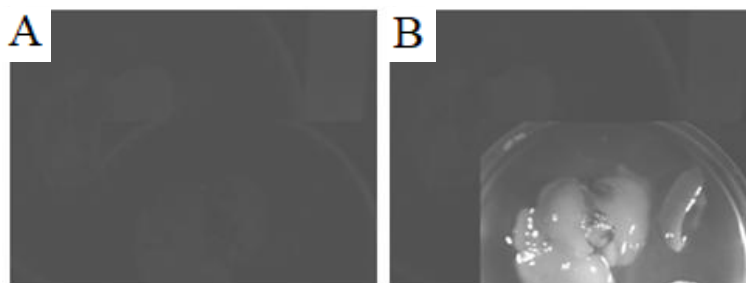
Obrázek 3.10 byl pořízen v den 0. Vidíme transmisi před vpichem komplexu (3.10A), transmisi po aplikaci komplexu (3.10B), místa jsou označena šipkami. Obrázek 3.11 byl pořízen také v den 0. Vidíme fluorescenci před vpichem komplexu (3.11A), fluorescenci po aplikaci komplexu, místa jsou označena šipkami (3.11B). Po 3 dnech aplikace komplexu (3.12), vizualizace fluorescence s komplexem (3.12A), transmise s komplexem (3.12B). Eppendorfka je s nesonikovaným komplexem pro porovnání intenzit fluorescence. Po 7 dnech od aplikace komplexu (3.13), fluorescence (3.13A) a transmise (3.13B) s nesonikovaným komplexem. Snímek (3.14) zobrazuje 14 dní po aplikaci komplexu, fluorescence (3.14A), transmise (3.14B). Na obrázcích (3.15) vidíme vizualizaci po 14 dnech. Fluorescence (3.15A) označeno šipkou, transmise (3.15B) foceno na 50 ms, fluorescence (3.15C) foceno na 100 ms abychom si byli opravdu jisti, že zde komplex ND-PEI-RNA-TF-Alexa není přítomen.

Detekce ND komplexu v klíčových orgánech

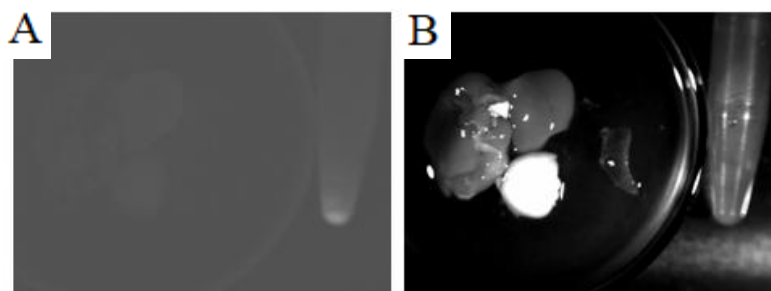
Po vizualizaci komplexu v oblasti vpichu byla zvířata usmrcena a byly vypreparovány klíčové orgány, kde by mohlo dojít k akumulaci. Přítomnost komplexu ND byla ve všech vzorcích analyzována vizualizací celého orgánu při nastavení na detekci Alexa Fluor 488. Detailní analýza přítomnosti komplexu byla provedena u homogenizované mozkové tkáň průtokovou cytometrií.



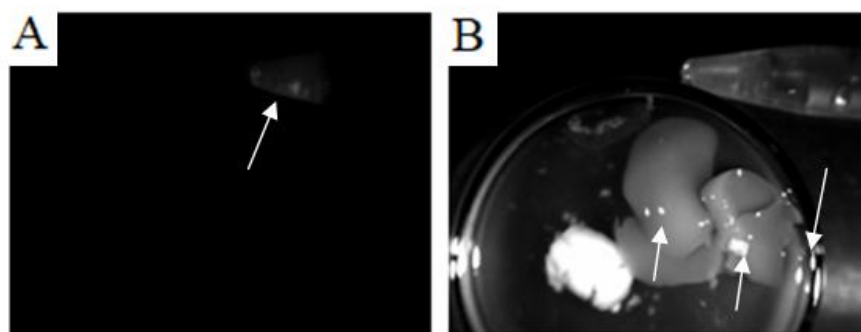
Obr. 3.16: Vizualizace orgánů v den 0 (zleva: slezina, mozek, játra) co nejdříve po vpichu komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa. A: fluorescence; B: transmise Zdroj: vlastní



Obr. 3.17: Vizualizace orgánů (zleva mozek, játra, slezina) 72 hodin po aplikaci komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (3. den). A: fluorescence; B: transmise Zdroj: vlastní



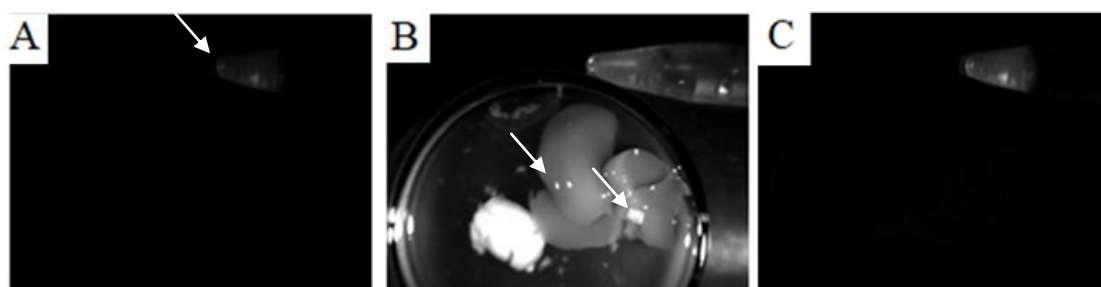
Obr. 3.18: Vizualizace orgánů (zleva játra, mozek, slezina) s komplexem ND-PEI-RNA-TF-Alexa 168 hodin po aplikaci komplexu ND (7. den). A: fluorescence; B: transmise Zdroj: vlastní



Obr. 3.19: Vizualizace orgánů s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách od aplikace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (14. den).

A: fluorescence; B: transmise

Zdroj: vlastní



Obr. 3.20: Vizualizace orgánů s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách od aplikace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (14 den). A: fluorescence (foceno na 50 ms);

B: transmise; C: fluorescence (foceno na 100 ms)

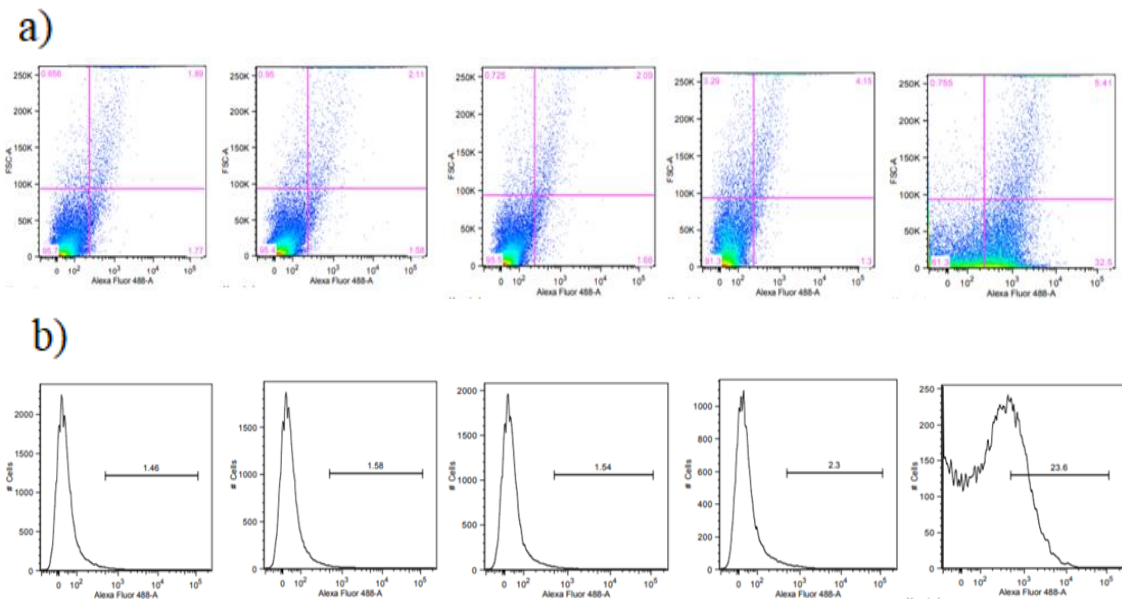
Zdroj: vlastní

Obrázek 3.16 zobrazuje orgány myši (slezina, játra a mozek) v den 0. Všechny orgány byly uloženy v PBS z důvodu nevysychání tkání. Transmise s odlesky PBS (označeno šipkami) (3.16A), fluorescence (3.16B). 3 dny po aplikaci komplexu (3.17), fluorescence (3.17A), transmise (3.17B). Na obrázku (3.18) vidíme orgány myši 7 dní po aplikaci komplexu, transmise (3.18A), transmise (3.18B) společně s nesonikovaným komplexem v eppendorfci. Vizualizace orgánů 14 dní po aplikaci (3.19), fluorescence (3.19A) s velmi slabě rozeznatelnými nesonikovanými nanodiamanty, transmise (3.19B) s odlesky PBS (označeno šipkami). Zobrazení orgánů s komplexem nanodiamantů po 14 dnech od aplikace komplexu (3.20), fluorescence (3.20A) foceno na 50 ms, transmise (3.20B), fluorescence (3.20C) foceno na 100 ms, abychom se ujistili, že zde komplex ND-PEI-RNA-TF-Alexa není přítomen.

Vizualizace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa neprokázala, že by se komplex kumuloval v nějakém z testovaných orgánů po *in vivo* aplikaci ocasní žilou. Ale zároveň po 14 dnech nebyla vidět téměř žádná fluorescence v místě vpichu, což značí, že komplexy se efektivně dostaly do krevního oběhu zvířete.

3.8 Detekce komplexu ND v homogenizované mozkové tkáni

Proto, abychom mohli komplexy nanodiamantů detekovat v mozkové tkáni, museli jsme mozek nejprve homogenizovat přes sítko a centrifugovat. Tímto způsobem jsme získali různé nervové buňky - neurony a glie, které jsme následně analyzovali na průtokovém cytometru a zjišťovali přítomnost nanodiamantových komplexů (pomocí signálu Alexa Fluor 488). Pokus byl prováděn 0, 3, 7 a 14 dní od aplikace komplexu nanodiamantů do ocasní žíly myši. Jako pozitivní kontrolu a pro nastavení detekce komplexů průtokovým cytometrem jsem použila vzorek homogenizované mozkové tkáně smíchaný s 5 μ l ND komplexu, což odpovídá 16% dávky aplikované ocasní žílou.

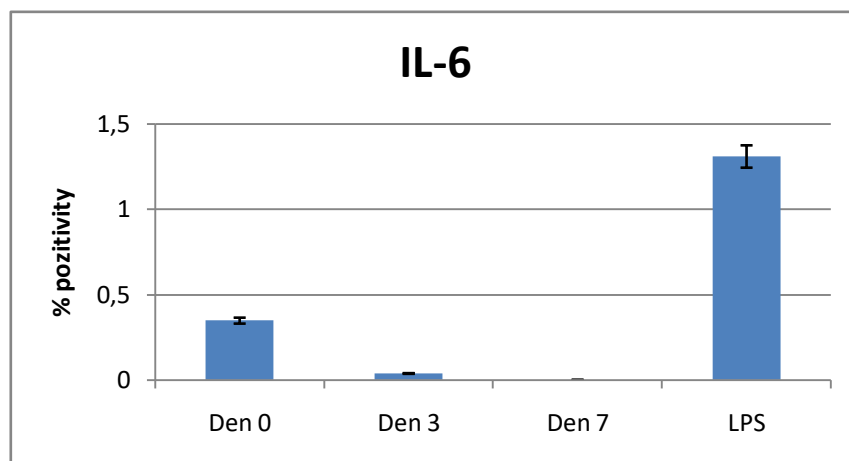


Obr. 3.21: Detekce komplexu nanodiamantu v homogenizované mozkové tkáni po systémové aplikaci do ocasní žíly 0,3,7 a 14 dní po aplikaci; sloupečky zleva: den 0, den 3, den 7, den 14, pozitivní kontrola. a) Dot plot graf s posunem intenzity Alexa Fluor 488 včetně pozitivní kontroly v posledním sloupci; b) stejné vyjádření ve formě histogramu s uvedenými procenty pozitivity Alexa Fluor 488. Zdroj: vlastní

Z výsledků průtokové cytometrie vyplývá, že ND komplex nebyl zjištěn v žádném z testovaných vzorků.

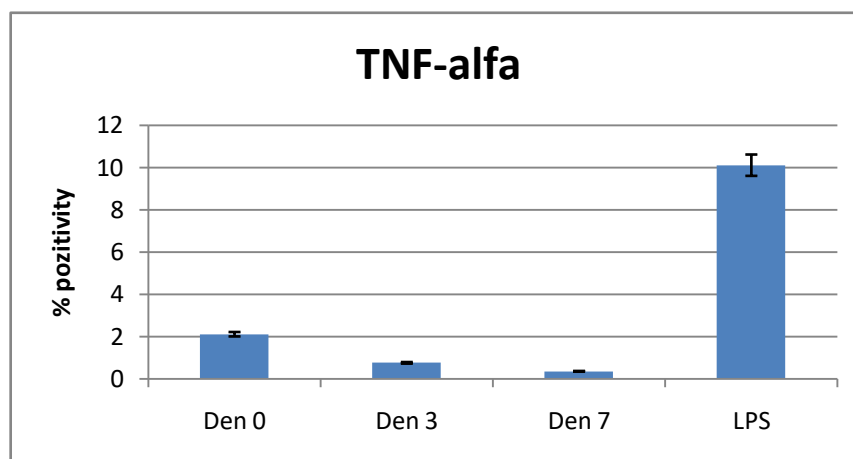
3.9 Detekce cytokinů v plazmě po aplikaci ND komplexu

U zvířat, kterým byl aplikován komplex ND (ND-PEI-RNA-TF-Alexa) jsem odebírala periferní krev, ze které jsem získala plazmu. V plazmě jsem detekovala hladinu sekretovaných cytokinů TNF-alfa, IFN-gamma a interleukinu-6 průtokovou cytometrií (3.17-3.19). Jako pozitivní kontrolu jsem použila buňky stimulované LPS (viz. kapitola 2.12).



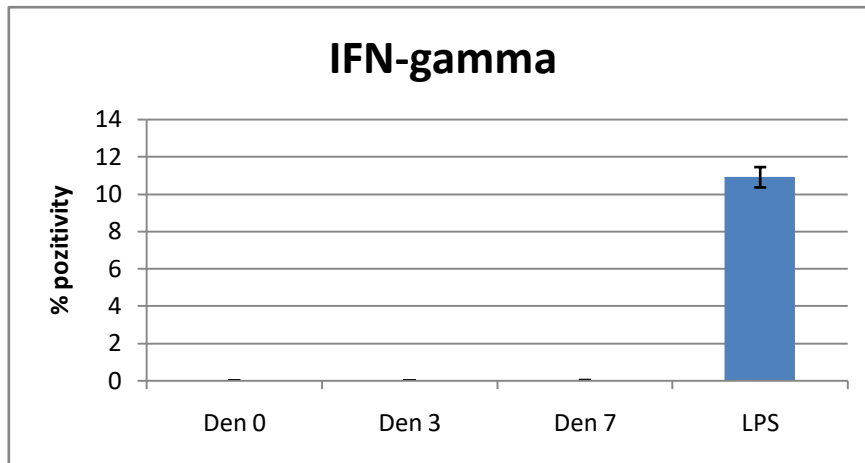
Graf 3.17: Detekce cytokinu IL-6 sekretovaného do periferní krve po systematické aplikaci komplexu nanodiamantů.

Zdroj: vlastní



Graf 3.18: Detekce cytokinu TNF-alfa sekretovaného do periferní krve po systematické aplikaci komplexu nanodiamantů.

Zdroj: vlastní



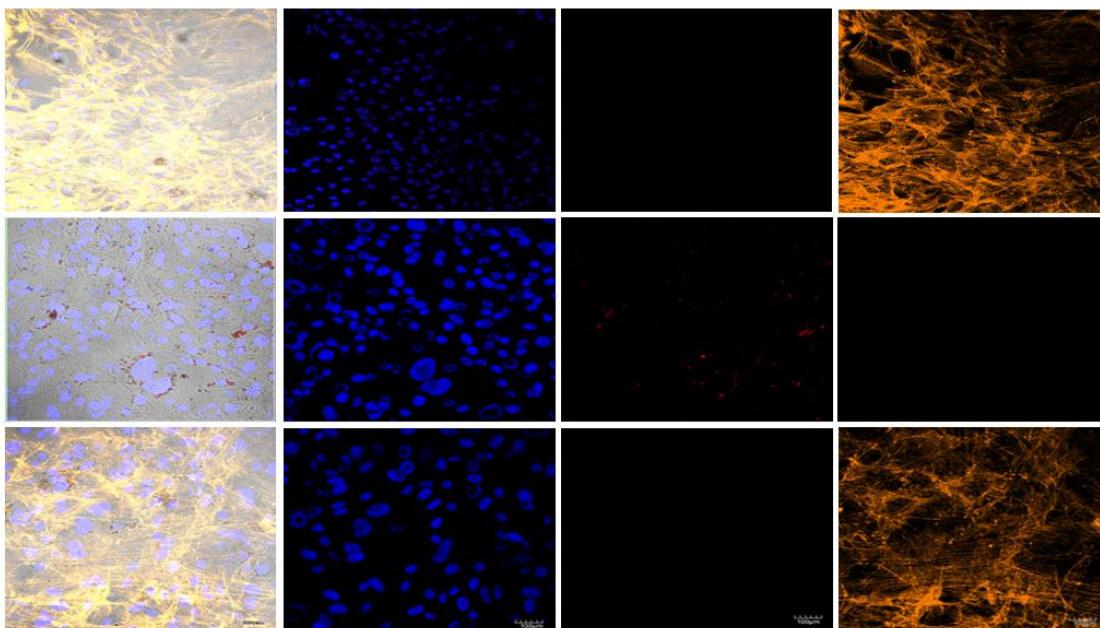
Graf 3.19: Detekce cytokinu IFN-gamma sekretovaného do periferní krve po systemické aplikaci komplexu nanodiamantů.

Zdroj: vlastní

Na grafu 3.17 můžeme vidět pokles hladiny cytokinů IL-6 ve 3. a 7. dnu po aplikaci. Na grafu 3.18 vidíme také pokles ve 3. a 7. dnu, naopak graf 3.19 ukazuje nízké hodnoty ve všech dnech po aplikaci. Tyto hodnoty jsou ale měřeny na detekčním limitu metody a jde pouze o fluktuaci hladin cytokinů vzhledem k nízkému množství analytu.

3.10 Interakce nanodiamantů s adherentní kulturou nervových buněk

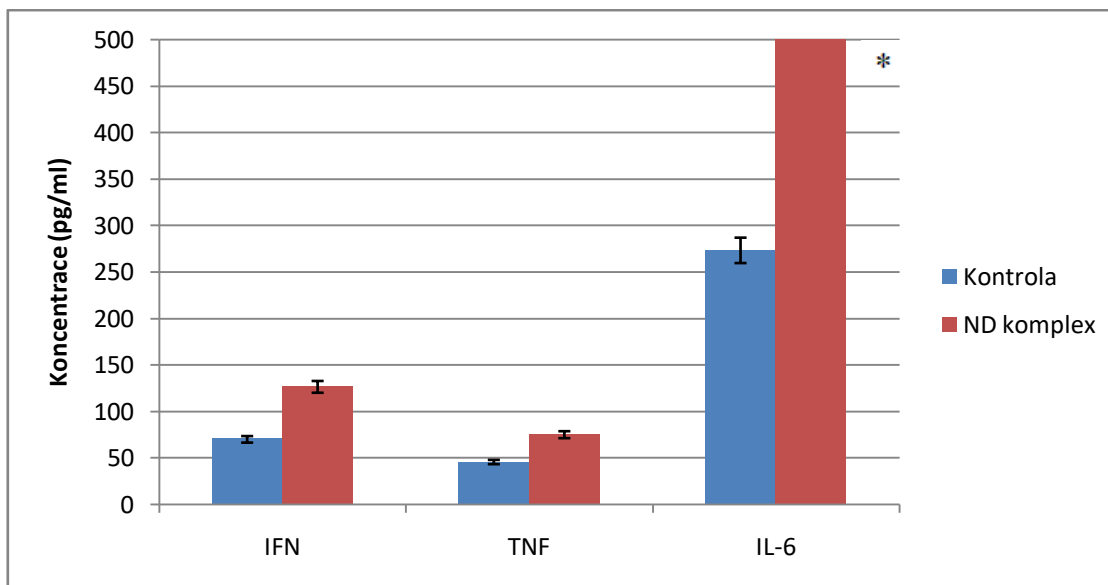
Na obrázku 3.22 můžeme vidět adherentní neurony. Jedná se o předběžný pokus, kdy byly neurony kultivovány na Petriho misce potažené poly-D-lysinem. Takto zde byly neurony ponechány 24 dní. Po 10 dnech jim bylo vyměněno médium za nové a na konci této doby tj. 23. den byly neurony stimulovány nanodiamanty. 24 den následně proběhla fixace a bylo jim odsáto médium, ve kterém byly detekovány cytokiny na průtokovém cytometru. Koncentrace cytokinů byla vypočtena na základě kalibrační křivky příslušných standardů.



Obr. 3.22: Adherentní neurony foto buněk z konfokálního mikroskopu, zvětšení 40x, měřítko 100 μm (v prvním sloupci je zobrazena transmise spolu se všemi fluorescenčními kanály, ve druhém sloupci fluorescence z kanálu jader, které byly barveny Hoechst, třetí sloupec je zobrazen kanál s nanodiamanty a čtvrtý sloupec je zobrazen kanál s aktinovými vlákny, které byly barveny Phalloidinem; první řádek kontrola bez stimulace nanodiamanty, střední a dolní řádek jsou buňky stimulované 24 hodin komplexem ND-PEI-RNA – v prostředním řádku jsou snímány nanodiamanty, v dolním řádku je snímán Phalloidin u kterého nešlo snímat dohromady s nanodiamanty z důvodu interference signálů

Zdroj: vlastní

Z výsledků konfokální mikroskopie je patrné, že některé neuronální buňky internalizují ND komplexy do buněčné cytoplazmy. Nepozorovala jsem průnik ND do jader. V dalším pokusu zjistím, které neuronální buňky – neurony nebo glie internalizovaly ND komplexy.



Graf. 3.1: Detekce cytokinů IFN-gamma, TNF-alfa a interleukin-6 sekretovaných adherentní kulturou neuronální tkáně. Kontrola značí nestimulované neurony a glie. ND komplex značí kulturu stimulovanou komplexem ND-PEI-RNA po 24 hodin.
 * = 50 000 Zdroj: vlastní

Z předběžných výsledků aplikaci ND komplexu na adherentní kulturu je vidět rozdíl v hladině cytokinů zvláště IL-6. Je několik hypotéz, kterými lze toto pozorování vysvětlit a tyto výsledky budeme v budoucnu opakovat s širším panelem ND komplexů a kontrol. Jedním z faktorů, které výsledek mohly ovlivnit, je, že tato kultura byla přibližně o dva týdny starší než suspenzní kultura. Dále tyto buňky rostly adherentně a měly tedy vyšší předpoklad kontaktu s ND částicemi než suspenzní kultura. Protože se jedná o adherentní kultury, je zde také vyšší množství gliových buněk schopných produkovat cytokiny a v neposlední řadě adherentní buňky mohou odpovídat na interakci s ND komplexy jiným způsobem než buňky suspenzní (aktivace jiných signálních drah a jiná finální odpověď).

4 Diskuse

Cílem této práce bylo zjistit, zda nanodiamanty ovlivňují buňky nervové tkáně při přímém kontaktu *ex vivo* a projdou hematoencefalickou bariérou, když jsou aplikovány intravenózně jako nosič léčiv. Použity byly nanodiamanty o velikosti 35-50 nm a z nich připravené komplexy. Jako biologické modely byly vybrány 3T3 embryonální fibroblasty (*in vitro*), primární neuronální kultury (*ex vivo*) a myši kmene C57BL/6 (*in vivo*).

3T3 fibroblasty byly použity pro optimalizace metodik. U primárních kultur neuronů izolovaných ze zdravých experimentálních zvířat jsme zjišťovali základní parametry interakce nanodiamantů s buňkami. Zvýšení mitochondriální aktivity po aplikaci FTS bylo očekávané v prvních dnech kultivace, protože FTS aktivuje proliferaci zbylých gliových buněk a s jejich proliferací souvisí i zvýšená mitochondriální aktivita. Po určité době (zde 7 dní) již gliové buňky přerůstají a kultura stárne, což se projeví její smrtí a prudkým poklesem mitochondriální aktivity (den 14). Po aplikaci holých ND je vidět podobná stimulace proliferace, ale ND budou zřejmě aktivovat jiné dráhy a nevedou k masivnímu přerůstání a smrti kultury. Protože zvyšují mitochondriální aktivitu, je možné, že holé nanočástice ovlivňují tvorbu kyslíkových radikálů a provokují tak mitochondrie ke zvýšené aktivitě. Tato hypotéza se bude v laboratoři ověřovat v dalším období. Po aplikaci glutamátu do kultury nervové tkáně dochází k jeho využití neurony pouze v prvních dnech, není pro ně v té době toxický. Po delší době kultivace by ale způsobil smrt neuronů, pokud by v kultuře nebyly přítomné glie. Toto je pěkně vidět z grafu 7. a 14. dne. Po sedmi dnech byly glie v kultuře ve velkém počtu a spotřebovaly tedy zřejmě všechny glutamát a ke smrti neuronů nedošlo. Nicméně po 14 dnech byly již glie přerostlé případně mrtvé a glutamát tedy způsobil smrt i primárních neuronů. Nanodiamanty obalené PEI obvykle způsobují snížení viability adherentních buněk a jejich smrt během 48 hodin. Snížení mitochondriální aktivity po stimulaci ND-PEI je v grafech na hranici významnosti a spíše se jedná o oscilaci v rámci biologického materiálu.

Abychom mohli optimalizovat barvení jader a cytoskeletu, použili jsme permanentní buněčnou linii NIH/3T3 z důvodu jednodušší manipulace. Pro barvení jsme použili Phalloidin, který slouží jako ukazatel rozložení cytoskeletu a Hoechst 33342 pro barvení jader. Nanodiamanty byly použity velikosti 35-50 nm. U Phalloidinu

a nanodiamantů dochází k interferenci jejich emise, proto jsme je nesníмали dohromady. Tato optimalizace se osvědčila, proto jsme tímto způsobem barvili i neurony.

Izolace dospělých neuronů je poměrně složitá. Při izolaci dochází občas k jejich porušení a takovéto neurony nejsou schopny regenerovat. Navíc se v izolátu nachází velké množství debris, který následně zhoršují kvalitu kultury. Proto jsem se pokusila o získání relativně čistých neuronů optimalizací gradientové separace. Zde jsem optimalizovala hustotu gradientu. Uvádím tři vyzkoušené možnosti ředění. Jako nejvhodnější se osvědčilo ředění v tabulce 3, díky kterému jsme získali velké množství neuronových buněk. Výsledek byl také ovlivněn správně načasovaným propláchnutím kultury čerstvým médiem. Je zřetelné, že na nepromytých buňkách jsou neurony velmi špatně viditelné, je zde velké množství debris a kultura prospívá méně.

Abych mohla sledovat interakci nervové tkáně s nanodiamanty, bylo nutné vykultivovat neurony, které se nepřichytí k podkladu a zůstanou ve shluku. Toho jsem docílila právě kultivací bez polymerního podkladu, ten buňkám znemožní přisednout, tím pádem budou buňky tvořit shluky. Ke kultuře jsem přidala ještě růstové faktory, abych podpořila jejich přežití a proliferaci. Tímto způsobem se mi podařilo získat suspenzní kulturu se shluky nervových buněk, které zůstali vitální po celou dobu trvání pokusu.

Shluky neuronů, které jsem získala, jsem inkubovala s nanodiamanty. Nebyly zaznamenány žádné morfologické změny, které by vypovídaly, že nanodiamanty mění sílu vazby mezi buňkami přítomnými ve shluku. Ke každé jamce s buňkami byl přidán jiný komplex nanodiamantů proto, abychom mohli následně porovnat jaké komplexy nanodiamantů na buňky působí a jaké nikoliv.

Vizualizace internalizace ND do shluků nervové tkáně, které se nám povedli vypěstovat, je obtížné. Z toho důvodu jsem vizualizovala internalizaci nanodiamantových komplexů na kultuře adherentních neuronů.

Zde není možné odhadnout, ve kterých nervových buňkách se ND objevují, zda je nějaká preference. Pro rozlišení typu neuronů (a glií) bude zapotřebí použít kombinace specifických protilátek.

V předchozím projektu jsme zjistili, že systémová aplikace ND komplexů může vyvolat zvýšení hladin mRNA pro některé cytokiny. Zajímalo nás tedy, jestli po inkubaci neuronální tkáně s ND komplexy dojde také k sekreci cytokinů, které by poukazovali na odpověď neuronálních buněk na diamantový komplex. V předchozích pokusech nebyla nikdy zvýšená hladina mRNA ani u TNF ani IFN, ale byla zvýšená u

IL-1. Z literatury víme, že gliové buňky by mohly ještě produkovat IL-6 jako odpověď na zánětlivou reakci. V této práci jsme se zaměřili na detekci proteinů IL-1 a IL-6, TNF-alfa a IFN-gamma, protože to jsou na rozdíl od mRNA efektorové molekuly. IL-1 (alfa i beta) se nám ale nepodařilo optimalizovat, protože množství sekretovaného proteinu bylo velmi nízké a naše metodika nemá dostatečnou citlivost. Zjistili jsme, že nedochází k žádným výrazným změnám v sekreci TNF-alfa a IFN-gamma po aplikaci žádného z našich komplexů. U neadherentních vzorků nervové tkáně jsme také nedetkovali změny IL-6.

Změny, které jsme u suspenzních nervových buněk pozorovali, jsou výkyvy převážně u TNF-alfa a IFN-gamma v rámci oscilací metodiky. Vše bylo ovlivněno pravděpodobně tím, že jsme měli málo buněk produkujících cytokiny, a tím pádem nízkou koncentraci cytokinů.

Průchod ND nosičů přes hematoencefalickou bariéru jsme zjišťovali aplikací nosiče *in vivo*. Abychom mohli pozorovat vstřebávání a akumulaci ND komplexu po aplikaci do tělního oběhu myši, zvolili jsme komplex ND-PEI-RNA-TF-Alexa. Tento komplex byl při předchozích pokusech po systémové aplikaci detekován v krevním řečišti. Proto by se zde mohla objevit pravděpodobnost jeho přestupu přes BBB. Následná vizualizace klíčových orgánů včetně mozku nepotvrdila, že by se komplex kumulovat v některých z testovaných orgánů. Zároveň nebyla po 14 dnech vidět žádná fluorescence v místě vpichu, což značí, že se komplexy dostaly do krevního oběhu zvířete.

Při detailní detekci komplexu nanodiamantů v homogenizované mozkové tkáni pomocí průtokové cytometrie, jsme rovněž neprokázali přítomnost ND komplexu v mozku. Při interakci ND komplexu s nervovou tkání mohlo dojít i k nepřímému ovlivnění například gliových buněk, které bychom mohli vysledovat sekrecí specifických cytokinů do krve (interleukiny 1 a 6, TNF alfa a IFN gamma). V tomto případě se také neprokázalo zvýšení u jednotlivých cytokinů.

U neuronální kultury rostoucí v suspenzi jsme nedetkovali velmi výrazné změny po interakci s ND komplexy, zajímalo nás tedy, zda budou tyto výsledky jiné při použití adherentní kultury neuronů a provedli jsme předběžný pokus. Dospělé neurony dobře adherovaly na Petriho misce, která byla potažena poly-D-lysinem. Za těchto podmínek byly kultivovány 24 dní, krátce (24 hodin) stimulovány ND-PEI-RNA komplexem a cytokiny sekretované do média byly analyzovány na průtokovém cytometru. Z předběžných výsledků je vidět určitý rozdíl v sekreci INF-gamma a zřetelný rozdíl

v sekreci IL-6 po aplikaci ND komplexů. Tento je výrazně jiný než původní výsledek získaný u buněk rostoucích v suspenzní kultuře. Tyto rozdíly mohly být způsobeny tím, že kultura byla přibližně o dva týdny starší než suspenzní kultura. Jelikož se jedná o adherentní buňky, je vyšší přítomnost gliových buněk, které jsou právě producenty IL-6. Adherentní buňky mohou také jinak interagovat s ND částicemi. Toto pozorování vyvolává zajímavou otázku k řešení v dalším projektu.

5 Závěr

Tato práce se věnovala interakci nanodiamantů s mozkovou tkání. Cílem práce bylo zjistit, jestli nanodiamanty ovlivňují nějakým způsobem nervové tkáně při přímém kontaktu *ex vivo* a také, zda projdou přes hematoencefalickou bariéru do mozku, pokud jsou aplikovány intravenózně jako nosiče léčiv. K tomu sloužily nanodiamanty o velikosti 35-50 nm a jejich komplexy, a dva typy buněk (3T3, neurony). Optimalizace barvení buněk pro následné použití na neuronech byla provedena na 3T3 embryonálních fibroblastech. Optimalizace izolačních postupů primárních buněk pro *ex vivo* experimenty, vliv nanodiamantových komplexů na metabolismus buněk a sekreci cytokinů byly prováděny na neuronech a gliových buňkách. Dále bylo vizualizováno vstřebávání a akumulace ND komplexu po aplikaci do tělního oběhu myši včetně mozkové tkáně a také byla detekována sekrece cytokinů do periferní krve.

Při pokusech *ex vivo* nebylo prokázáno, že by nanodiamanty nějakým způsobem ovlivňovaly nervové tkáně. Při izolaci neuronálních buněk byla použita metoda gradientové separace pro rozdělení buněk nervové tkáně a buněk ostatních. Hustotu gradientu jsme optimalizovali pro náš model a získali jsme tak čistou suspenzní kulturu neuronů dále rostoucí ve shlukách. Když jsme zjišťovali vliv nanodiamantových komplexů na morfologii shluků neuronální tkáně, inkubovali jsme tyto shluky s nanodiamanty. Nebyly prokázány žádné morfologické změny, které by nasvědčovaly tomu, že nanodiamanty některým způsobem ovlivňují sílu vazby mezi buňkami, které se ve shluku nacházejí. Abychom určili aktivitu primárních neuronů, testovali jsme metabolismus mitochondrií. Dále byla zjišťována produkce cytokinů, která by značila odpověď neuronálních buněk na nanodiamantový komplex. Změny, které jsme u nervových buněk zaznamenali, jsou převážně vrámci oscilací metodiky, což bylo ovlivněno pravděpodobně malým množstvím buněk a tím i nižší koncentrací cytokinů. Pro *in vivo* experimenty byl použit pouze plně funkcionalizovaný ND komplex (ND-PEI-RNA-TF). Při vizualizaci tohoto komplexu v tělním oběhu myši a klíčových orgánech jsem nepotvrdila, že by se komplex kumuloval v testovaných orgánech. Nebyla zaznamenána ani žádná fluorescence v místě vpichu, což značí, že se komplexy dostaly do krevního oběhu zvířete. Při detekci komplexu nanodiamantů v homogenizované mozkové tkáni pomocí průtokové cytometrie nebyla prokázána přítomnost ND komplexu v mozku. Při sekreci cytokinů do krve se také neprokázalo zvýšení hladin jednotlivých cytokinů.

Prvním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda různě funkcionalizované nanočástice interagují s kulturou suspenzních neuronálních buněk a mění jejich metabolickou aktivitu nebo sekreci cytokinů. Z výsledků mojí práce vyplývá, že suspenzní neuronální kultura odpovídá na holé ND zvýšením metabolické aktivity mitochondrií, ale u funkcionalizovaných ND k tomuto jevu nedochází. Naopak u ND obalených PEI-RNA nebo PEI-RNA-TF dochází po delší době působení k sekreci interleukinu-6. Lze tedy usuzovat, že různě funkcionalizované ND komplexy vedou k různému typu interakce s nervovou tkání a různé odpovědi. V budoucnu bude rozšířen panel cytokinů o interleukin-1alfa a-1beta. Stejně tak bude vhodné se zaměřit na interakci adherentně rostoucích neuronálních buněk, které na ND-PEI-RNA komplex odpovídají výraznou sekrecí interleukinu-6, jak jsem v závěru své práce zjistila u předběžného experimentu.

Druhým cílem mojí práce bylo zjistit zda nanodiamanty, které kolují v tělním oběhu, mohou přestoupit hematoencefalickou bariéru a být vůči nervové tkáni přímo patologické (nebo zda mohou vyvolat signály přestupující tuto bariéru a tak nepřímo ovlivnit neuronální buňky). Z výsledků této práce vyplývá, že plně obalené ND komplexy (ND-PEI-RNA-TF) zřejmě nepřecházejí hematoencefalickou bariéru a neindukují sekreci zánětlivých cytokinů do periferní krve.

Seznam použité literatury

[1] ŘEZANKA, P., ZÁRUBA, K., KRÁL, V. Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii. *Chemické listy* [online]. 2007, (101), [cit. 2018-10-14]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: https://old.vscht.cz/chem_listy/docs/full/2007_11_881-885.pdf

[2] NUNN, N., TORELLI, M., MCGUIRE, G., SHENDEROVA, O. Nanodiamond: A high impact nanomaterial. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2017, 21(1), 1-9 [cit. 2018-10-21]. ISSN 13590286. DOI: 10.1016/j.cossms.2016.06.008. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028616300717>

[3] HUANG, Y., KAO, CH., LIU, K., et al. The effect of fluorescent nanodiamonds on neuronal survival and morphogenesis. *Scientific Reports* [online]. 2015, 4(1) [cit. 2018-10-14]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep06919. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep06919>

[4] MOCHALIN, V. N., SHENDEROVA, O., HO, D., GOGOTSI, Y. The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology* [online]. 2012, 7(1), [cit. 2018-10-16]. ISSN 1748-3387. DOI: 10.1038/nnano.2011.209. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nnano.2011.209>

[5] PŘIBYL, V. Nanodiamanty. *Aldebaran Bulletin* [online]. 2015, 13(30), 1 [cit. 2018-10-14]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: https://www.aldebaran.cz/bulletin/2015_30_dia.php

[6] Better Diamond Initiative. [online]. [cit. 2019-01-03]. Dostupné z: <https://betterdiamondinitiative.org/can-nano-diamonds-help-cancer-patients/>

[7]ŠLEGEROVÁ, J., CÍGLER, P. Nanodiamanty - fluorescenční a zobrazovací nanosondy. *Chemické listy* [online]. 2014, (108), [cit. 2018-10-14]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_04_387-393.pdf

[8] NEBURKOVA, J., VAVRA, J., CIGLER, P. Coating nanodiamonds with biocompatible shells for applications in biology and medicine. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2017, 21(1), [cit. 2018-10-23]. ISSN 13590286. DOI: 10.1016/j.cossms.2016.05.008. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028616300407>

[9] HEMELAAR, S. R., DE BOER, P., CHIPAUX, M., et al. Nanodiamonds as multi-purpose labels for microscopy. *Scientific Reports* [online]. 2017, 7(1) [cit. 2018-10-16]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-00797-2. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-00797-2>

[10] STURSA, J., HAVLIK, J., PETRAKOVA, V., et al. Mass production of fluorescent nanodiamonds with a narrow emission intensity distribution. *Carbon* [online]. 2016, 96, [cit. 2018-10-23]. ISSN 00086223. DOI: 10.1016/j.carbon.2015.09.111. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622315303304>

[11]DOHERTY, M., MANSON, N., DELANEY, P., JELEZKO, F., WRACHTRUP, J., Hollenberg, L. C.L. Fluorescent Nanodiamond Particles Containing Color Centers: Properties and Applications. *Sigma-Aldrich* [online].2013, 528[cit. 2018-10-16].Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/fluorescent-nanodiamond-particles.html#ref>

[12] Berkeley Lab Researchers Increase NMR/MRI Sensitivity through Hyperpolarization of Nuclei in Diamond | Berkeley Lab. *News Center*(2015). Available at: <http://newscenter.lbl.gov/2013/05/hyper-polarized-nuclei-in-diamond/>. (Accessed: 14th May 2018)

[13] ALKAHTANI, M., ALGHANNAM, F., JIANG, L., et al. Fluorescent nanodiamonds: past, present, and future. *Nanophotonics* [online]. 2018, 7(8), [cit. 2018-10-23]. ISSN 2192-8614. DOI:10.1515/nanoph-2018-0025. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/nanoph.2018.7.issue-8/nanoph-2018-0025/nanoph-2018-0025.xml>

[14] SHENDEROVA, O. A. Fluorescenční nanodiamantové částice obsahující barevná centra: Vlastnosti a aplikace. *Merck* [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/fluorescent-nanodiamond-particles.html>

[15] DOHNALOVÁ, L., DOHNAL, V. Nanočástice a jejich toxicita. *Chemické listy* [online]. 2015, (109), [cit. 2018-10-14]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_06_444-450.pdf

[16] NUNN, N., TORELLI, M. MCGUIRE, G., SHENDEROVA, O. Nanodiamond: A high impact nanomaterial. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2017, 21(1), [cit. 2018-10-21]. ISSN 13590286. DOI: 10.1016/j.cossms.2016.06.008. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028616300717>

[17] DAEGON, L., PRIM, R., KIM, K., KANG, E., PARK, K., JEONG, S. Combinatorial nanodiamond in pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, 514(1), [cit. 2018-10-23]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731630480X>

[18] ROSALES-REYNOSO, M.A., JUÁREZ-VÁZQUEZ, C.I., BARROS-NÚÑEZ, P. Evolution and genomics of the human brain. *Neurología (English Edition)* [online]. 2018, 33(4), [cit. 2018-10-28]. ISSN 21735808. DOI: 10.1016/j.nrleng.2015.06.020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173580818300026>

[19] OREL, M., PROCHÁZKA, R. *Vyšetření a výzkum mozku: pro psychology, pedagogy a další lékařské obory*. 1. vydání. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-247-5539-7

[20] OREL, M., FACOVÁ, V. *Člověk, jeho mozek a svět*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2617-5

[21] PFEIFFER, J. *Neurologie v rehabilitaci: pro studium a praxi*. 1. vydání. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1135-5

[22] MERKUNOVÁ, A., OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6

[23] ROKYTA, R. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1. vydání. Praha: GradaPublishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2

[24] FERNÁNDEZ-ALBARRAL, J. A., SALOBRAR-GARCÍA, E., MARTÍNEZ-PÁRAMO, R., I. RAMÍREZ, A., DE HOZ, R., M. RAMÍREZ, J., SALAZAR, J. J. Retinal glial changes in Alzheimer's disease – A review. *Journal of Optometry*[online]. 2018. [cit. 2018-11-04]. ISSN 18884296. DOI: 10.1016/j.optom.2018.07.001. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1888429618300803>

[25] MERKUNOVÁ, A., OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1521-6

[26] MLADOSIEVIČOVÁ, B. *Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání*. 2. vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4838-2

[27] KOOLMAN, J., RÖHM, K. *Barevný atlas biochemie*. 4. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0

[28] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vydání. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-80-247-1562-9

[29]CONTI, B., TABAREAN, I., SANCHEZ-ALAVEZ, M., DAVIS, CH., BROWNELL, S., BEHRENS, M., BARTFAI, T. Cytokine Receptors in the Brain. *NeuroImmune Biology* [online]. 2008, 19, [cit. 2018-10-31]. ISBN 9780444530417. DOI: 10.1016/S1567-7443(07)10002-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567744307100028>

[30] BANKS, W. Blood–Brain Barrier Transport of Cytokines. *NeuroImmune Biology* [online]. 2008, [cit. 2018-10-31]. ISBN 9780444530417. DOI: 10.1016/S1567-7443(07)10006-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567744307100065>

[31]SEI, Y., VITKOVIČ, L., YOKOYAMA, M. Cytokines in the Central Nervous System: Regulatory Roles in Neuronal Function, Cell Death and Repair. *Neuro immunomodulation* [online]. 2004, 2(3), [cit. 2019-01-03]. ISSN 1021-7401. DOI: 10.1159/000096881. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/96881>

[32] ZHOU, Y., PENG, Z., SEVEN, E. S., LEBLANC, R. M., Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release* [online]. 2018, 270, [cit. 2018-12-30]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.12.015. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917310829>

[33]ZHOU, Y., PENG, Z., SEVEN, E. S., LEBLANC, R. M., Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release* [online]. 2018, 270, [cit. 2018-12-30]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.12.015. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917310829>

[34]SARAIVA, C., PRAÇA, C., FERREIRA, R., SANTOS, T., FERREIRA, L., BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Over coming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 235, [cit. 2019-01-03]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.044. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303236>

[35]WOLBURG, H., LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood–brain barrier. *VascularPharmacology* [online]. 2002, 38(6), [cit. 2019-01-03]. ISSN 15371891. DOI: 10.1016/S1537-1891(02)00200-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189102002008>

[36]FRANCA E, JAO, P., FANG, S., et al. Scale of carbon nanomaterials affects neural out growth and adhesion. *IEEE Trans Nanobioscience* [online]. 2016, 15(1), [cit. 2019-01-03]. ISSN 15803118. DOI: 10.1109/TNB.2016.2519505. Dostupné z: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/7390279/authors#authors>

[37] SATISH A., KORRAPATI, P.S. Tailored release of triiodothyronine and retinoic acid from a spatio-temporally fabricated nanofiber composite in stigating neuronal differentiation. *Nanoscale*. [online]. 2017, 9(38), [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.1039/C7NR05918C. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/319343158_Tailored_release_of_Triiodothyronine_and_Retinoic_acid_from_spatio-temporally_fabricated_nanofiber_composite_instigating_neuronal_differentiation

[38]BROOKING, J., DAVIS, S.S., ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the ratnasalmucosa. *Journal of Drug Targeting*. [online]. 2001, 9, [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.3109/10611860108997935. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10611860108997935>

[39] HONG, F., SHENG, L., ZE, Y., et al. Suppression of neurite outgrowth of primary cultured hippocampal neurons is involved in impairment of glutamatemetabolism and NMDA receptor function caused by nanoparticulate TiO₂. *Biomaterials*. [online]. 2015, 53, [cit. 2019-01-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.067. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/273480611_Suppression_of_neurite_outgrowth_of_primary_cultured_hippocampal_neurons_is_involved_in_impairment_of_glutamate_metabolism_and_NMDA_receptor_function_caused_by_nanoparticulate_TiO2

[40]KHAN, F., ALMOHAZEY, D., ALOMARI, M., ALMOFTY, S. Impact of nanoparticles on neuron biology: current research trends. *International Journal of*

Nanomedicine [online]. 2018, 13, [cit. 2019-01-03].ISSN 1178-2013. DOI: 10.2147/IJN.S165675. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/impact-of-nanoparticles-on-neuron-biology-current-research-trends-peer-reviewed-article-IJN>

[41] KARMAKAR, A., ZHANG, Q., ZHANG, Y. Neuro toxicity of nanoscale materials. *Journal of Drug Targetting* [online]. 2014, 22, [cit. 2019-01-03].DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.012. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949814000131>

[42] NEUHÖFEROVÁ, E., Monitoring of RNA interference by luminescent nanoparticles. Kladno 2015, Diplomová práce.

[43] Počítací komůrka dle Bürkera. Brand GmbH+CO. *Fisher scientific*. [online].[cit. 2019-01-03].Dostupné z: <http://www.thermofisher.cz/produkty/pocitaci-komurka-dle-burkera-bez-svorek>

[44] Hoechst 33342. R&D Systems a Bio-Techne brand. [online].[cit. 2019-01-03].Dostupné z: https://www.rndsystems.com/products/hoechst-33342_5117

[45] Phalloidin. Wikipedia. [online].[cit. 2019-01-03].Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phalloidin>

[46] BioLegend[®]. Enabling Legendary Discovery[™]. [online].[cit. 2019-01-03].Dostupné z: <https://www.biolegend.com>

Seznam obrázků

Obr. 1.1: Mikroskopický snímek nanodiamantů HPHT.....	11
Obr. 1.2: Reprezentace atomové struktury nanodiamantu s N-V centrem.....	12
Obr. 1.3: Fotoluminiscenční emisní spektrum ND částic obsahující NV a NVN centra.....	13
Obr. 1.4: Foto z konfokálního mikroskopu, neuron obarvený tubulinem 3.....	15
Obr. 1.5: Strukturální ilustrace hematoencefalické bariéry.....	18
Obr. 2.1: Miska se skleněným dnem, která umožňuje vizualizaci buněk pod konfokálním mikroskopem.....	21
Obr. 2.2: Nanodiamanty před sonikací s viditelnou tmavou peletou na dně zkumavky.....	22
Obr. 2.3: Nanodiamanty: sedimentace na dně, po 30 minutách obvykle žádná sedimentace.....	22
Obr. 2.4: Nanodiamanty bez viditelného sedimentu.....	23
Obr. 2.5: Buňky oddělené do viditelných frakcí.....	26
Obr. 2.6: Bürkerova komůrka.....	27
Obr. 2.7: Barvivo Hoechst 33342.....	28
Obr. 2.8: Použitý Phalloidin Orange.....	29
Obr. 2.9: Aktin 3T3 buněk barvený Phalloidinem.....	29
Obr. 2.10: Konfokální laserový biologický mikroskop.....	30
Obr. 2.11: Prázdné mikrokavity a po naplnění agarózou, sféry v kavitě.....	32
Obr. 2.12: Průtokový cytometr.....	34
Obr. 2.13: Průchod laserů průtokovým cytometrem.....	34
Obr. 3.1: NIH/3T3 foto buněk z konfokálního mikroskopu buňky neinkubované s nanodiamanty.....	37
Obr. 3.2: Kultura primárních neuronů 7 dní po izolaci.....	39
Obr. 3.3: Fotografie nervové tkáně po 14ti denní kultivaci.....	39
Obr. 3.4: Fotografie neuronu po 14ti denní kultivaci v detailu.....	40
Obr. 3.5: Tvorba shluků v primární kultuře neuronů 0-14 dní po izolaci.....	40
Obr. 3.6: Fotografie buněk nervové tkáně optickým mikroskopem 24 hodin po izolaci.....	42

Obr. 3.7: Morfologie kultury primárních neuronů rostoucích ve shlucích.....	42
Obr. 3.8: Neuronální buňky foto buněk z konfokálního mikroskopu.....	43
Obr. 3.9: Vizualizace komplexu nanodiamantů ND-PEI-RNA-TF-Alexa.....	54
Obr. 3.10: Vizualizace spodní části myši před a co nejdříve po vpichu (den 0).....	55
Obr. 3.11: Vizualizace spodní části myši před a co nejdříve po vpichu (den 0).....	55
Obr. 3.12: Vizualizace spodní části myši s komplexem ND 72 hodin po aplikaci komplexu (den 3).....	56
Obr. 3.13: Vizualizace spodní části myši s komplexem ND-PEI-RNA-TF-Alexa 168 hodin po aplikaci komplexu (den 7).....	56
Obr. 3.14: Vizualizace spodní části myši s komplexem.....	56
Obr. 3.15: Vizualizace spodní části myši s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách.....	57
Obr. 3.16: Vizualizace orgánů v den 0 co nejdříve po vpichu komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa.....	58
Obr. 3.17: Vizualizace orgánů 72 hodin po aplikaci komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (3.den).....	58
Obr. 3.18: Vizualizace orgánů s komplexem.....	58
Obr. 3.19: Vizualizace orgánů s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách od aplikace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (14.den).....	59
Obr. 3.20: Vizualizace orgánů s komplexem nanodiamantů po 336 hodinách od aplikace komplexu ND-PEI-RNA-TF-Alexa (14 den).....	59
Obr. 3.21: Detekce komplexu nanodiamantu v homogenizované mozkové tkáni...60	
Obr. 3.22: Adherentní neurony foto buněk z konfokálního mikroskopu.....	63

Seznam grafů

3.1: WST-1 stimulace primárních neuronů po 1 dnu.....	44
3.2: WST-1 stimulace primárních neuronů po 2 dnech.....	45
3.3: WST-1 stimulace primárních neuronů po 7 dnech.....	45
3.4: WST-1 stimulace primárních neuronů po 14 dnech.....	45
3.5: Detekce hladin sekretovaného interleukinu-6 po 1 dnu.....	47
3.6: Detekce hladin sekretovaného interleukinu-6 po 2 dnech.....	47
3.7: Detekce hladin sekretovaného interleukinu-6 po 7 dnech.....	48
3.8: Detekce hladin sekretovaného interleukinu-6 po 14ti dnech.....	48
3.9: Detekce hladin sekretovaného TNF-alfa po 1 dnu.....	49
3.10: Detekce hladin sekretovaného TNF-alfa po 2 dnech.....	50
3.11: Detekce hladin sekretovaného TNF-alfa po 7 dnech.....	50
3.12: Detekce hladin sekretovaného TNF-alfa po 14ti dnech.....	51
3.13: Detekce hladin sekretovaného IFN-gamma po 1 dnu.....	52
3.14: Detekce hladin sekretovaného IFN-gamma po 2 dnech.....	52
3.15: Detekce hladin sekretovaného IFN-gamma po 7 dnech.....	53
3.16: Detekce hladin sekretovaného IFN-gamma po 14ti dnech.....	53
3.17: Detekce cytokinů sekretovaných do periferní krve interleukin-6.....	61
3.18: Detekce cytokinů sekretovaných do periferní krve TNF-alfa.....	61
3.19: Detekce cytokinů sekretovaných do periferní krve IFN-gamma.....	62
3.20: Detekce cytokinů IFN-gamma, TNF-alfa a interleukin-6 sekretovaných adherentní kulturou neuronální tkáně.....	64

Seznam tabulek

Tab. 2.1: Složení plného DMEM média.....	20
Tab. 2.2: Příprava plného MACS média pro dospělé neurony.....	21
Tab. 2.3: Příprava transferinu.....	23
Tab. 2.4: Příprava Optiprepu.....	25
Tab. 3.1: Ředění Optiprepu pro separaci neuronů.....	38
Tab. 3.2: 12ti jamková destička s rozpisem umístění buněk a komplexů ND.....	41

Příloha 1

Test životaschopnosti buněk – WST-1

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	0.0941	0.8999947	insignificant
A vs C	0.0326	0.8999947	insignificant
A vs D	0.0145	0.8999947	insignificant
A vs E	0.0009	0.8999947	insignificant
A vs F	0.0449	0.8999947	insignificant
A vs G	0.0149	0.8999947	insignificant
A vs H	4.7250	0.0772219	insignificant
A vs I	0.0304	0.8999947	insignificant
A vs J	0.0536	0.8999947	insignificant

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	5.9657	0.0120311	* p<0.05
A vs C	3.0153	0.5248624	insignificant
A vs D	2.2214	0.8284693	insignificant
A vs E	0.4415	0.8999947	insignificant
A vs F	0.4722	0.8999947	insignificant
A vs G	2.8260	0.5972414	insignificant
A vs H	3.5644	0.3152481	insignificant
A vs I	2.9599	0.5460413	insignificant
A vs J	5.4580	0.0258770	* p<0.05

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	5.5967	0.0210340	* p<0.05
A vs C	5.1454	0.0410186	* p<0.05
A vs D	1.4247	0.8999947	insignificant
A vs E	0.1637	0.8999947	insignificant
A vs F	1.0886	0.8999947	insignificant
A vs G	2.9631	0.5448231	insignificant
A vs H	3.6878	0.2759343	insignificant
A vs I	3.2677	0.4263542	insignificant
A vs J	4.3960	0.1165570	insignificant

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	5.3427	0.0307093	* p<0.05
A vs C	3.7040	0.2709792	insignificant
A vs D	1.2460	0.8999947	insignificant
A vs E	2.6763	0.6544848	insignificant
A vs F	4.4992	0.1014278	insignificant
A vs G	0.6303	0.8999947	insignificant
A vs H	0.4533	0.8999947	insignificant
A vs I	6.7050	0.0038519	** p<0.01
A vs J	6.7050	0.0038519	** p<0.01

A= kontrola, ke které se měření vztahovalo; B=ND; C=ND-PEI; D=ND-PEI-RNA; E=ND-PEI-RNA-TF-Alexa; F=ND-PEI-RNA-TF-TexasRed; G=ND-TF-Alexa; H=FTS; I= Glutamax; J=ND-PEI-TF-Alexa; p= míra významnosti

