

**ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА НА ОСНОВЕ ПИРОЛИТИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА
С НАНОРАЗМЕРНЫМ РЕЛЬЕФОМ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙРОННОЙ СЕТИ**

**А.А. Денисов^{1,3}, О.Г. Поддубская², Н.И. Волынец², Т.А. Кулагова², П.П. Кужир²,
Ю.П. Токальчик³, С.Г. Пашкевич³, С.В. Губкин³**

¹Белорусский государственный университет, Минск

²НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск

³Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

При проведении научных исследований в области биомедицины часто возникают задачи, связанные с анализом взаимодействия клеток и тканей с различными материалами. В частности, при исследовании механизмов функционирования клеток распространенной является методика культивирования *in vitro*, позволяющая исследовать клеточные процессы в контролируемых условиях. При этом, наряду с традиционными подходами по культивированию клеток в чашках Петри в настоящее время используются и устройства класса «лаборатория-на-чипе», позволяющие проводить мониторинг с помощью встроенных датчиков. Кроме того, в различных областях медицины разработка многих современных высокотехнологичных методов сопровождается применением имплантов различного типа. Поверхность импланта не должна вызывать отторжения и оказывать отрицательного влияния на организм. В этой связи актуальной становится задача поиска новых биосовместимых материалов, которые пригодны для изготовления такого рода устройств.

Особые требования предъявляются к материалам, контактирующим с нервными клетками. Поскольку нейроны являются электрически активными, основным методом изучения их функционирования является регистрация и стимуляция их электрической активности с использованием микроэлектродных сенсоров, которые непосредственно взаимодействуют с клетками и могут быть имплантированы в структуру центральной нервной системы. Сочетание методов биоинженерии нейронных сетей и устройств класса «лаборатория-на-чипе» открывает возможности для воссоздания и регистрации ряда функциональных процессов в нейронных сетях *in vitro*, в более простых и контролируемых условиях, нежели *in vivo*. Данный подход позволяет проводить эффективный фармакологический скрининг при моделировании различных форм нейродегенеративных заболеваний, таких как ишемия, травма, инсульт, эпилепсия, болезнь Альцгеймера и т. д. [1, 2], что, в свою очередь, подчеркивает актуальность исследований, направленных на разработку новых методов инженерии нейронных сетей и реализацию интерфейса с клетками нервной ткани.

Интеграция клеток с сенсорными субстратами предъявляет жесткие требования к качеству и физико-химическим свойствам материалов, из которых они изготавливаются [3, 4]. В частности,

для реализации интерфейса с нейронами материал должен быть биосовместимым, долговечным, неиммуногенным, электропроводящим, обладать нано- и микроструктурированной поверхностью, которую можно химически функционализировать; его нужно наносить на разные типы подложек и включать в структуру скаффолдов. В этой связи, уникальные физические свойства и высокая биосовместимость углеродных наноматериалов, к которым можно отнести наноалмазы, луковичные структуры углерода, углеродные нанотрубки, графен, фуллерены и т.д., позволяет рассматривать такие структуры и композиты на их основе в качестве перспективных материалов, подходящих для разработки компонентов интерфейса не только с нейронами, но и другими электрически активными клетками [5]. Так, высокая мобильность носителей заряда, большая удельная площадь поверхности, механическая гибкость, оптическая прозрачность и химическая инертность делают графен чрезвычайно привлекательным для нейроинженерии, и, в частности, для создания инвазивных имплантов, биосенсоров и микроэлектродов [5]. При этом, на поверхность графена можно эффективно иммобилизовать ДНК, ферменты, антитела, лиганды к рецепторам [6]. Однако, несмотря на большое количество работ, понимание взаимодействия графена с тканями мозга все еще ограничено, особенно в том, что касается воздействия структуры атомов углерода на потоки ионов в непосредственной близости от нейрональной мембраны в биологической среде.

Вместе с тем, с практической точки зрения работа с графеном может быть методически сложной, что прежде всего связано с необходимостью применения специальных подложек для синтеза такого материала (так «классический» CVD синтез проводится на медных или никелевых подложках), что в свою очередь приводит к дополнительным шагам по его переносу и т.д. Наряду с графеном, перспективным является исследование нейросовместимости тонких пленок на основе пиролитического углерода. В отличие от графена, такие структуры легко синтезировать на различных диэлектрических подложках с дополнительной возможностью контроля как толщины получаемого покрытия, так и рельефа на наноуровне. Данное обстоятельство делает пиролитический углерод особенно многообещающим материалом для выращивания нервных клеток, поскольку наличие неровностей может существенно менять поведение нейронов на поверхности.

Целью данной работы было создание субстрата, покрытого пленкой пиролитического углерода и изучение особенностей культивирования нейронов на нем. Синтез тонких пленок пиролитического углерода (в работе использовались пленки толщиной 20 и 40 нм) проводили методом химического осаждения из газовой фазы (CVD) в атмосфере метана и водорода (соотношение H_2/CH_4 20:5) при температуре 1050 °С. В качестве подложек использовались кварцевые пластинки толщиной 0.5 мм. Образцы помещали в чашки Петри в среде культивирования нейронов и осуществляли посев диссоциированных нейронов коры головного мозга крысы как непосредственно на субстрат с углеродной пленкой, так и с дополнительным покрытием фактором адгезии – поли-D-лизином. Образцы с клетками культивировали в пластиковых чашках Петри в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °С в течение 14 дней.

Как показано на рис. 1а, после высевания нейроны прикреплялись к подложке в виде одиночных клеток и небольших кластеров из нескольких клеток и начинали формировать отростки (нейриты). Вид культуры нейронов через 14 дней культивирования на поверхности чашки Петри, покрытой поли-D-лизином и на пиролитическом углеродном субстрате, покрытом поли-D-лизином, показан на рисунках 1б и 1в, соответственно. Анализируя полученные изображения можно сделать вывод, что нейроны в процессе культивирования равномерно покрывали поверхность и образовывали сеть с развитой системой нейритов. Как следует из рис. 1г, на аналогичном субстрате без дополнительного покрытия через 14 дней культивирования нейроны образовывали крупные трехмерные кластеры, которые соединялись длинными прямыми пучками нейритов с низкой степенью ветвления. Связи между некоторыми кластерами на поздних этапах культивирования располагались над поверхностью подложки. В целом, на более толстом покрытии из пиролитического углерода (40 нм) нейроны образовывали более плотную и развитую сеть. На более тонком покрытии (20 нм) прослеживалась тенденция к постепенному откреплению клеток.

Сформировавшаяся на покрытых поли-D-лизином поверхностях однородная нейронная сеть соответствует типичной культуре нейронов, растущих на покрытии, к которому клетки обладают высокой адгезией. Клетки при этом имеют «распластанный» вид и равномерно распределяются по поверхности. В случае же роста на пиролитическом углероде (без дополнительного покрытия) адгезия клеток к поверхности ниже и происходит образование клеточных агрегатов. Таким образом, нейроны обладают достаточной адгезией к синтезированному углеродному покрытию для роста и формирования нейронной сети. В то же время, адгезия клеток непосредственно к пиролитическому

му углероду ниже, чем к поли-D-лизину, что объясняет наблюдаемую тенденцию к образованию кластеров клеток.

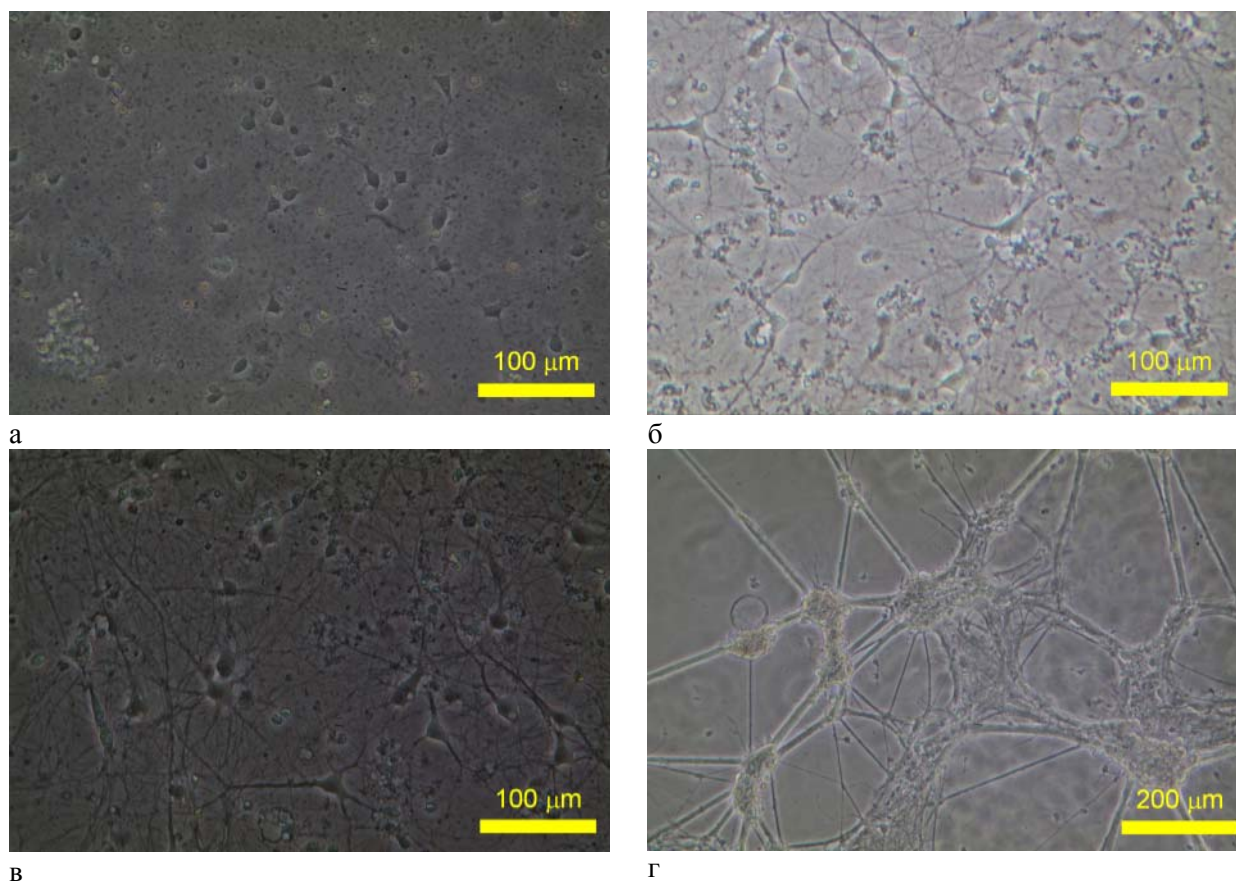


Рисунок – Рост нейронов на поверхности пиролитического углерода на второй день культивирования (а), на поверхности чашки Петри, покрытой поли-D-лизином, на 14-й день культивирования (б), на поверхности пиролитического углерода, покрытого поли-D-лизином, на 14-й день культивирования (в) и на поверхности пиролитического углерода без дополнительного покрытия на 14-й день культивирования (г).

Таким образом, в данной работе продемонстрирована биосовместимость покрытия на основе пиролитического углерода по отношению к нейронам, что открывает дополнительные возможности применения этого материала как в качестве покрытия рабочих компонентов микроэлектродов, так и в других приложениях, требующих создания интерфейса с нервными клетками. Одним из факторов, который влияет на сродство нейронов к поверхности, является рельеф. Путем изменения условий синтеза пиролитического углерода можно варьировать степень шероховатости получаемой поверхности. Дальнейшие исследования углеродных покрытий с различным рельефом являются перспективными для разработки методов биоинженерии нейронных сетей с различной топологией. Так, нейронная сеть, состоящая из крупных кластеров с небольшим числом связей должна обладать более предсказуемым ответом на внешние стимулирующие воздействия.

Список использованных источников

1. Kilic O. et al. Brain-on-a-chip model enables analysis of human neuronal differentiation and chemotaxis // *Lab Chip*. 2016, 16(21), 4152-4162.
2. Jahromi MA. Et al. Microfluidic Brain-on-a-Chip: perspectives for mimicking neural system disorders // *Mol Neurobiol*. 2019, 56(12), 8489-8512.
3. Burnstine, Townley A. et al. Conductive scaffolds for cardiac and neuronal tissue engineering: governing factors and mechanisms // *Adv Funct Materials*. 2019, 1901369.
4. Farrukh A. et al. Microenvironments designed to support growth and function of neuronal cells // *Front. Mater*. 2018, 5, 1–22.

5. Huang H. et al. Graphene-based sensors for human health monitoring // *Front. Chem.* 2019, 7, 399-415.