

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ

**Т.А. Кулагова¹, Н.И. Вольнец¹, О.Г. Поддубская¹, А.В. Богданова^{1,2},
С.В. Корень³, Е.Г. Фомина³**

*¹Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем»
Белорусского государственного университета, Минск, tatyana_kulagova@tut.by*

²Белорусский государственный университет, Минск

³Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск

Нанобиоматериалы применяются для создания сенсорных поверхностей с целью осуществления диагностики, для тераностики и адресной доставки лекарственных препаратов, в регенеративной медицине в качестве субстратов и скаффолдов. Интеграция клеток с сенсорными субстратами необходима для обеспечения таких функций как адгезия, пролиферация и дифференцировка и предъявляет жесткие требования к качеству и физико-химическим свойствам материалов. Такие материалы должны обладать рядом специфических свойств: биосовместимостью (не оказывать токсического действия, сохранять стерильность), неиммуногенностью, устойчивостью к продуктам жизнедеятельности клеток, имитировать внеклеточный матрикс (нанотопологически и механически) для формирования фокальных адгезионных контактов [Burnstine-Townley]. Биосовместимые материалы для нейронов должны содержать функциональные группы на поверхности, обеспечивающие специфическую адгезию белков клеточной мембраны [Farrukh]. Наличие нано- и микронеровностей на поверхности сенсоров и скаффолдов способствует прикреплению нейронов, росту и развитию функциональных нейритных отростков.

Применение проводящих материалов особенно актуально для реализации интерфейса с электрически активными клетками. Присутствие проводящих биосовместимых материалов на поверхности сенсоров и скаффолдов позволяет регулировать физиологические и моделировать патологические процессы в растущих на них клетках (нейронах, кардиомиоцитах, стволовых клетках).

Было показано, что углеродные наноматериалы являются биосовместимыми и обеспечивают адгезию нейрональных клеток. Улучшение прикрепления нейронов и их электрической активности зарегистрировано для поверхностей с добавлением наноалмазов [Thalhammer], оксида акрилата графена [Liu], углеродных нанотрубок [Lee], а также кристаллического графена [Pampaloni]. Присутствие на подложках положительно заряженных многостенных углеродных нанотрубок приводит к образованию более длинных нейритов и их более сложному ветвлению [Hu, Lee]. Показано, что на пленках из протеинов, легированных графеном, происходит дифференцировка стволовых клеток крысы в нейроны без внешней стимуляции [Niu]. Использование в качестве покрытия микроэлектродов углеродных наноматериалов позволяет достигать наилучших характеристик при регистрации электрических характеристик и стимуляции клеток.

Рельеф углеродных материалов можно варьировать, создавая в процессе синтеза нано- и микроструктурированные поверхности, что позволяет разрабатывать на их основе интерфейсные материалы с различными свойствами. Так, существуют методики синтеза слоев графена на подложке, расположенных вертикально, при помощи методов плазменно-химического осаждения из газовой фазы. Такая поверхность обладает развитым рельефом, что должно способствовать прикреплению клеток. Более того, формирование упорядоченных складок на листе графена приводит к изменению его электронной структуры и появлению новых свойств. Вместе с тем, высокая гидрофобность графена, углеродных нанотрубок затрудняет их использование в качестве субстрата для культивирования нейронов. Одним из вариантов улучшения нейросовместимости поверхности с сохранением высокой электропроводности может быть нанесение полимерного электропроводящего материала, например, полиэтилендиоксифена. С другой стороны, иногда требуется изоли-

ровать часть поверхности сенсора и для этого перспективным является полидиметилсилоксан (ПДМС), активно используемый для микрофлюидики. Эластичность ПДМС делает его эффективным материалом для разработки гибких малотравматичных имплантатов со встроенными электродами.

Одним из перспективных материалов для сенсоров электрически активных клеток является пиролитический углерод, который синтезируется химическим осаждением из газовой фазы или отжигом органических материалов. Он является электропроводящим и полупрозрачным в тонких пленках, имеет наноразмерную шероховатость поверхности, зависящую от процесса синтеза, и, таким образом, обладает потенциалом для модуляции характеристик адгезивности поверхности при росте клеток. Пиролитический углерод находит применения в качестве материала для имплантов [Loir], электродов для электрохимического обнаружения биологических веществ [Vasudevan, Sainio].

Пиролитический углерод, углеродные нанотрубки, графеновые нанопластины являются перспективными проводящими материалами для разработки на их основе новых композитных материалов. При этом, высокое аспектное отношение таких структур позволяет, с одной стороны, существенно снизить порог перкаляции композитов на их основе, с другой стороны, существенно улучшить их механические свойства, что важно при разработке гибких электрически активных поверхностей и скаффолдов для клеток.

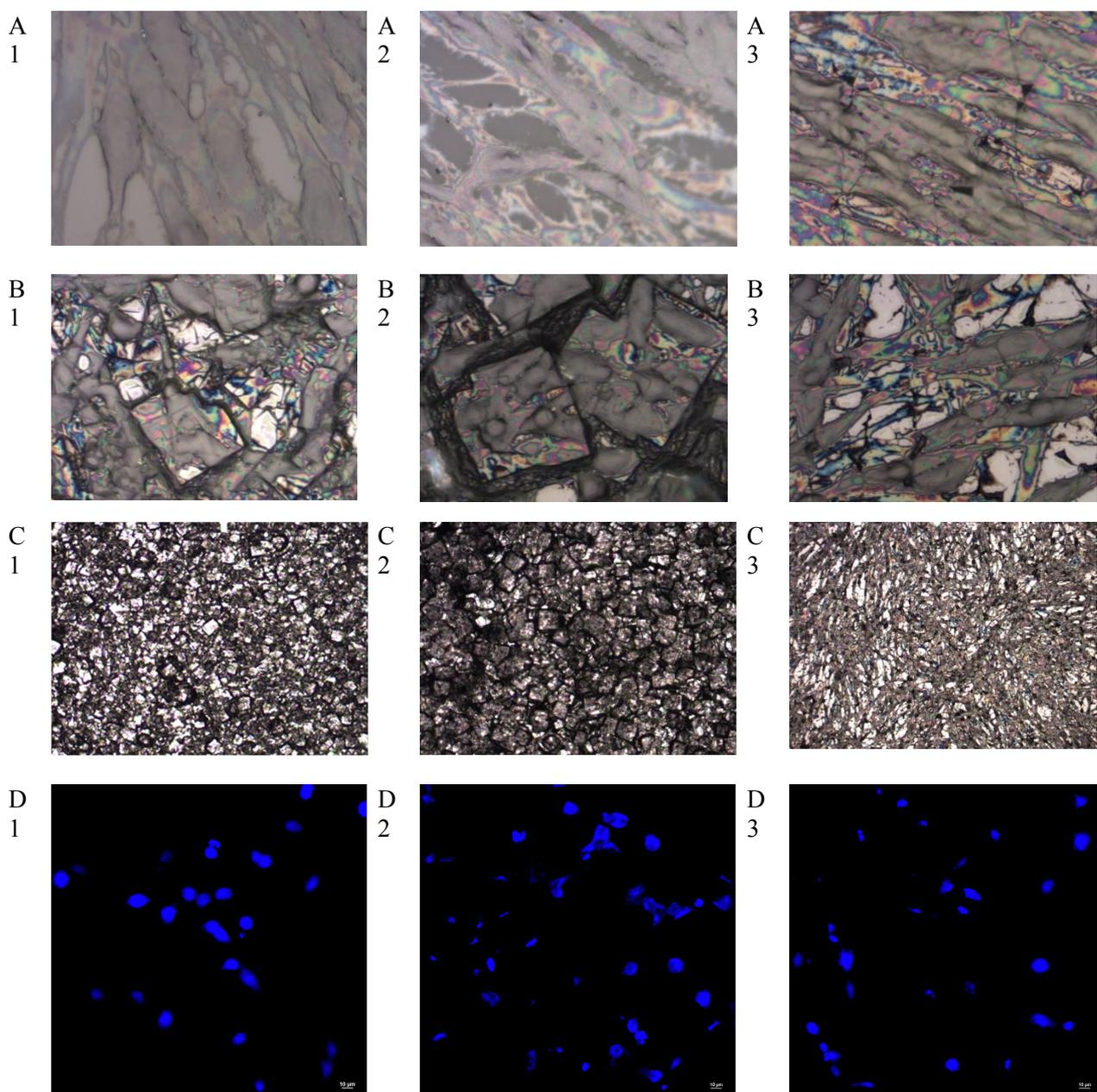
Углеродные наноразмерные материалы и композиты на их основе являются биосовместимыми, обладают электропроводностью и рядом других свойств, делающими их подходящими компонентами для интерфейса с электрически активными клетками. Данная работа нацелена на разработку новых перспективных композитных материалов, содержащих пиролитический углерод, углеродные нанотрубки, графеновые нанопластины, нанодиамазы, которые будут применены в области биологии и медицины для создания функциональных поверхностей, сенсоров и трехмерных скаффолдов.

Клетки глиомы крысы линии С6 получены из коллекции культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Клетки культивировали в среде Игла DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и $1 \cdot 10^4$ г/л гентамицина. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Алмазные мембраны выращивали на кремниевых подложках. Образцы мембран отмывали в спирте, затем прожгли при 120°C 1 ч. Синтез тонких пленок пиролитического углерода на кварцевых подложках (толщина 0,5 мм) выполняли методом химического осаждения из газовой фазы в атмосфере метана и водорода при температуре 1050°C. Затем пленки переносили на полидиметилсилоксан. На образцы посадили клетки глиомы линии С6 (200 тыс в мл, 3 мл на чашку Петри). Через двое суток роста клетки на образцах промыли и зафиксировали 4% глутаровым альдегидом. Биосовместимость исследовали методом световой микроскопии в отраженном свете.

Синтезированы массивы многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) разной высоты по технологии CCVD (catalytic chemical vapor deposition, каталитическое осаждение из газовой фазы) на кремниевой подложке при участии сотрудников ИХ СО РАН. Массивы промывали в спирте, перекладывали в чашки Петри и высевали клетки глиомы крысы линии С6 (250 тыс. на чашку). Через сутки роста клетки фиксировали в спирте. Для оценки количества клеток глиомы на различных подложках проводили окрашивание ДНК-красителем DAPI. Готовые препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония).

Из представленных данных на рисунке видно, что все исследуемые углеродсодержащие поверхности являются биосовместимыми. Не смотря на присутствующие перепады высот в образцах алмазных мембран (ряд В1, В2, В3), клетки глиомы хорошо адгезируют к поверхности, митотически делятся и формируют плотный монослой. При этом наблюдаются выросшие клетки не только на плоских горизонтальных поверхностях алмазоподобных кристаллов, но и частично на боковых, то есть клетки частично прикреплены на одной горизонтальной плоскости, а частично на другой, и сползают как бы по ступеньке. Клеточные тела покрывают все неровности.



A – микроскопия в отраженном свете клеток на поверхности пластиковой чашки Петри (A1), на полидиметилсилоксане (A2) и на пиролитическом углероде (A3), x100

B, C – клетки на алмазных мембранах с увеличением в 100 (B) и 10 (C) раз.

D – флуоресцентная микроскопия клеток на массивах МУНТ разной толщины:

D1-300 мкм, D2-100 мкм, D3-30 мкм.

Рисунок – Визуализация роста клеток глиомы крысы линии С6 на углеродсодержащих функциональных поверхностях

Образцы пиролитического углерода, нанесенного на полидиметилсилоксан при переносе на предметные стекла для микроскопии подвергаются растяжению и на поверхности пленки появляются трещины-разрывы. Однако клетки глиомы крысы линии С6 формируют плотный монослой на этих образцах. Биосовместимость показана на рисунке, ряд А.

Массивы МУНТ в растворах частично откреплялись от кремниевой подложки и формировались трещины, которые визуализировались невооруженным глазом. Клетки глиомы крысы прикреплялись к поверхности МУНТ и росли на ней, как показано на рисунке, ряд D. Однако пролиферативная активность клеток была снижена по сравнению с пластиковой поверхностью. При снятии массива МУНТ с подложки он не держал форму и при высыхании сворачивался в цилиндрическую структуру.

Таким образом, углеродные нано- и микроструктурированные функциональные поверхности являются биосовместимыми, клетки формируют на них монослой. Массивы из вертикально стоящих МУНТ обладают наннотруктурированностью, что, вероятно, снижает адгезию клеток к ним.

Список использованных источников

1. Burnstine-Townley A. et al. Conductive scaffolds for cardiac and neuronal tissue engineering: governing factors and mechanisms // *Adv Funct Materials*. 2019, 1901369.
2. Farrukh A. et al. Microenvironments designed to support growth and function of neuronal cells // *Front. Mater*. 2018, 5, 1–22.
3. Thalhammer A. et al. The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks // *Biomaterials*. 2010, 31(8), 2097e2104.
4. Liu X. et al. Functionalized carbon nanotube and graphene oxide embedded electrically conductive hydrogel synergistically stimulates nerve cell differentiation // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017, 9, 14677.
5. Lee W. et al. The brain cells on the carbon nanotubes: morphological and functional changes in neurons and glia // *J Nanomater Mol Nanotechnol*. 2018, 7, 2.
6. Pampaloni N.P. et al. Single-layer graphene modulates neuronal communication and augments membrane ion currents // *Nature Nanotechnology*. 2018, 13, 755-764.
7. Hu H. et al. Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth // *Nano Lett*. 2004, 4, 507-511.
8. Niu Y. et al. Enhancing neural differentiation of induced pluripotent stem cells by conductive graphene/silk fibroin films // *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2018, 106, 2973-2983.
9. Loir A.S. et al. Deposition of tetrahedral diamond-like carbon thin films by femtosecond laser ablation for applications of hip joints // *Thin Solid Films*. 2004, 453, 531–536.
10. Vasudevan Sh. Et al. Leaky optoelectrical fiber for optogenetic stimulation and electrochemical detection of dopamine exocytosis from human dopaminergic neurons // *Adv Sci*. 2019, 6, 1902011.
11. Sainio S. et al. Integrating carbon nanomaterials with metals for bio-sensing applications // *Mol Neurobiol*. 2019