

10. Overchuk K.V., Uvarov A.A., Lezhnina I.A. Anti-jamming algorithm for detection of QRS and ST segments on electrocardiogram / MATEC Web of Conferences. 2016. Vol. 7. № 01029.
11. Plessey MicroLEDs Clifford / ibme.ox.ac.uk/research/biomedical-signal-processing-instrumentation/prof-l-tarassenko/publications/pdf/gdcliffordthesis.pdf. (дата обращения: 03.06.2019).
12. Интерфейс API (Application Programming Interface) / <https://habr.com/ru/sandbox/52599/> (дата обращения: 03.06.2019).
13. Lezhnina I.A., Boyakhchyan A.A., Overchuk K.V., Uvarov A.A. Clinical trials of a personal electrocardiograph / JOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2017. Vol. 881. № 01204. PP. 1-6.

Инна Алексеевна Лежнина,
канд. техн. наук, доцент,
Инженерная школа неразрушающего контроля,
Национальный исследовательский
Томский политехнический университет,
г. Томск,
Александр Андреевич Уваров,
руководитель проектов,
Центр инноваций ПАО МТС,
г. Москва,
Кирилл Вячеславович Оверчук,
инженер,
DI-lab,
Арман Артурович Бояхчян,
аспирант,

Инженерная школа неразрушающего контроля,
Национальный исследовательский
Томский политехнический университет,
ассистент,
медико-биологический факультет,
Сибирский государственный
медицинский университет,
Станислав Николаевич Торгаев,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
радиофизический факультет,
Томский государственный университет,
доцент,
Инженерная школа неразрушающего контроля,
Национальный исследовательский
Томский политехнический университет,
г. Томск,
Геннадий Сергеевич Евтушенко,
д-р техн. наук, гл. научный сотрудник,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт –
Республиканский исследовательский научно-
консультационный центр экспертизы»
Министерства науки и высшего образования,
г. Москва,
профессор,
Инженерная школа неразрушающего контроля,
Национальный исследовательский
Томский политехнический университет,
г. Томск,
e-mail: bojahchyan@yandex.ru

А.Ю. Герасименко, Е.П. Кицюк, П.Ю. Привалова, И.А. Суетина, Н.А. Демиденко,
Р.М. Рязанов, С.И. Джалилов, Л.И. Руссу, М.В. Мезенцева

Влияние лазерного структурирования углеродных нанотрубок на пролиферацию хондробластов и стволовых клеток

Аннотация

Продемонстрирована наибольшая плотность пролифериовавших клеток хрящевой ткани (хондробластов) на поверхности вертикально ориентированных массивов многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), синтезированных на кремниевой подложке, по сравнению с чистой подложкой. При помощи электронной микроскопии показано изменение вертикального положения нанотрубок в массиве под действием клеток в питательной среде. Разработан метод структурирования массивов МУНТ посредством сканирования лазерными импульсами (100 нс) и жидкостной обработки на планарных подложках. За счет структурирования МУНТ обеспечена стойкость массива к изгибанию под влиянием питательной среды с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Продемонстрировано отсутствие токсического действия и патологического влияния на жизнеспособность и морфологию стволовых клеток структурированного массива МУНТ. На основе таких материалов могут быть сформированы адгезивные для клеток элементы биомедицинских устройств.

Введение

Углеродные наноматериалы, такие как фуллерены, графен и углеродные нанотрубки (УНТ), обладают уникальными структурными, механическими и электрическими свойствами, которые открывают широкие возможности для их биологических применений. На основе таких материалов могут быть сформированы функциональные элементы биомедицинских устройств, например для систем «органы на чипе», биосенсоров, платформ для мониторинга активности клеток, устройств адресной доставки лекарств и др. [1]. В настоящее время актуальной задачей является поиск биосовместимых материалов с развитой поверхностью, которые могут обеспечить необходимую степень адгезии высаженных на них клеток. В таком случае будет достигаться заполнение клетками заданных подложек за счет их пролиферации. Максимальная степень адгезии

может быть достигнута при соответствии размеров латеральных отростков клеток размерам структурных элементов подложек. В связи с этим для модуляции процесса роста клеток каркасы для клеточной инженерии в первую очередь должны обладать заданной шероховатостью и контролируемым химическим составом. Углеродные нанотрубки считаются искусственными аналогами компонентов внеклеточного матрикса, так как обладают высокой удельной поверхностью и структурой, подобной волокнам коллагена (основной белок соединительной ткани). Таким образом, нанотрубки являются привлекательными наполнителями для клеточно- и тканеинженерных скэффолдов, которые способствуют прикреплению, пролиферации и дифференцировке клеток [2].

Цитотоксичность нанотрубок систематически исследовалась на многих линиях клеток млекопитающих или на животных моделях, в результате был сделан вывод о том, что мате-

риалы являются нетоксичными при достижении приемлемых доз и заданной функционализации поверхности трубок [3], [4]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека, полученные из жировой ткани, показали хорошую жизнеспособность, прикрепление, пролиферацию и инфильтрацию на скэффолдах из многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) по сравнению с традиционными скэффолдами из полилактид-коглицолевой кислоты [5]. Исследования показали, что массивы МУНТ благодаря своей электропроводности способны стимулировать рост хондроцитов, зрелых клеток хрящевой ткани, особенно при стимуляции электрическими сигналами [6], [7]. Ориентированные массивы нанотрубок поддерживают рост и пролиферацию кардиомиоцитов и способствуют регулярным и синхронным сокращениям культивируемых клеток, а также вытягиванию клеток вдоль нанотрубок в массиве [8].

В настоящей статье приведены результаты исследования пролиферации клеток хрящевой ткани (хондробластов) и МСК на поверхности синтезированных массивов МУНТ. Проведено сравнение роста хондробластов на чистом кремнии и массиве МУНТ, которое позволило сделать вывод об отсутствии токсического влияния на жизнеспособность клеток и проявлении патологических изменений в морфологии. Микроскопически продемонстрирована стойкость структурированных массивов углеродных нанотрубок к изгибу под действием клеток в питательной среде.

Материалы и методы

Массивы МУНТ синтезировали методом каталитического плазменно-химического осаждения из газовой фазы на установке «Oxford PlasmaLab System 100». В качестве исходных подложек использовали сильно легированные монокристаллические кремниевые пластины с электропроводностью электронного типа. Для очистки и подготовки кремниевых пластин их обрабатывали в растворе Пираньи. Затем каталитическую пару Ti (10 нм) и Ni (2 нм) напыляли на подложки методом электронно-лучевого испарения. Далее синтезировали нанотрубки. Процесс синтеза включал в себя три стадии. Первая стадия – окисление в присутствии газов O₂, Ar, He при температуре 280 °С. Вторая стадия – восстановление в присутствии газов NH₃/H₂, Ar, He. Третья стадия – рост МУНТ в присутствии углеводорода C₂H₂, газов NH₃/H₂, Ar, He и плазмы при температуре T = 500...800 °С. Полученные массивы изображены на рис. 1а.

Для исследования жизнедеятельности клеток на поверхности синтезированных массивов МУНТ использовались хондробласты, выделенные из суставного гиалинового хряща человека (рис. 1б), и мезенхимальные стволовые клетки лошади (рис. 1в). Клетки предоставлялись лабораторией культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Для получения суспензии клеток в необходимой посадочной дозе клетки культивировали в культуральной питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Перед инкубацией образцы, размещенные в культуральных планшетах,

обрабатывали ультрафиолетом в течение 30 мин и промывали в культуральной среде для улучшения адгезии клеток к поверхности образцов. Далее клетки высевали на массивы МУНТ, как показано на рис. 1г. После посева клетки инкубировали в течение 24 и 72 ч в инкубаторе («SANYO Electric Co.») при температуре 37 °С в среде углекислого газа 5 %. После инкубации для проведения исследований методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) клетки фиксировали в 2,5%-ном глютаральдегиде и дегидрировали выдерживанием в растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией (50, 70 и 96 %).

Массив МУНТ проходил жидкостную обработку и подвергался лазерному воздействию с помощью наносекундного итербиевого волоконного лазера с длиной волны 1064 нм, длительностью импульса 100 нс, частотой следования импульсов 100 кГц и мощностью излучения 0,7 Вт [9]. Схема лазерной установки представлена на рис. 2. Лазер 1 был оснащен гальванометрическим сканатором с двумя зеркалами 2, с помощью которого производилось позиционирование лазерного луча по поверхности массива нанотрубок 6 на кремниевой подложке 5. Оптическая установка была оборудована датчиком расстояния 7 для обеспечения равномерного облучения всей поверхности образцов. Излучение от источника попадало на объектив 3 с фокусным расстоянием 210 мм, и лазерное излучение фокусировалось в пятно 4 диаметром 20 мкм. Плотность энергии была в диапазоне от 3,6 до 4 Дж/см². Траектория движения лазерного луча представляла собой квадрат. Был выбран вариант заполнения квадрата параллельными линиями длиной 5 мм с небольшим наложением лазерных пятен друг на друга, чтобы компенсировать интенсивности гауссового профиля лазерного пучка. Луч двигался по траектории со скоростью 500 мм/с.

В результате жидкостной обработки и лазерного сканирования углеродные нанотрубки слипались у вершин в островки и их концы были ориентированы вертикально (рис. 2б). Данная технология формирования структурированных массивов МУНТ является масштабируемой и позволяет получать планарные образцы заданных размеров. В настоящем эксперименте образцы формировались с размерами от 5 × 5 до 20 × 20 мм.

После структурирования массивов МУНТ проводилось исследование их взаимодействия с МСК. Протоколы проведения исследований с хондробластами и МСК были аналогичны.

Результаты

На рис. 3 представлены СЭМ-изображения хондробластов, выращенных на чистом кремнии и на массиве МУНТ после 24 ч культивации. Отчетливо наблюдается, что клетки адгезировали к поверхности образцов и вступили в активную фазу пролиферации. При этом количественный анализ показал, что на образцах массивов МУНТ выросло большее количество клеток по сравнению с чистым кремнием.

Исследование роста хондробластов в динамике показало увеличение количества клеток с течением времени. После 72 ч

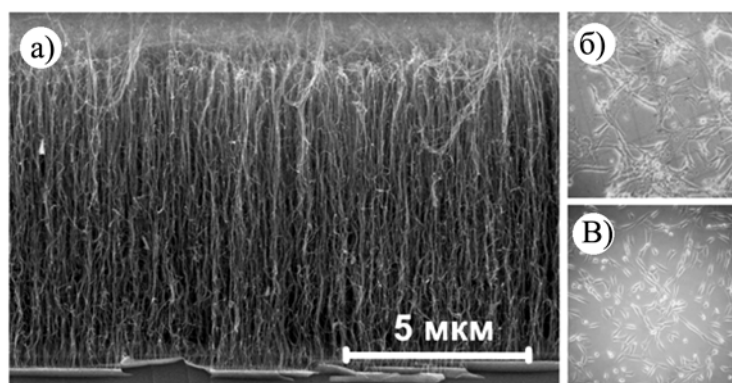


Рис. 1. Изображения СЭМ массива нанотрубок (а) и оптической микроскопии клеток хондробластов (б) и МСК (в) на дне культурального планшета

инкубации образовались области плотного однородного клеточного монослоя (рис. 3в, г). Наблюдалась более активная пролиферация клеток, высаженных на массивах МУНТ, по сравнению с клетками на чистом кремнии. При детальном сравнении морфологии хондробластов, выросших на чистой подложке из кремния и массиве МУНТ, получено, что основные органеллы клеток имели схожие размеры и структуру по истечении двух временных интервалов. Это позволяет сделать вывод об отсутствии цитотоксического действия, негативного влияния на жизнеспособность клеток и патологических изменений в клетках на массиве нанотрубок.

Таким образом, через 24 и 72 ч после начала инкубации хондробластов на массивах МУНТ в питательной среде было заметно более плотное заселение клетками подложки с нанотрубками (рис. 3г, е), при этом массивы МУНТ прижимались к субстрату и нанотрубки были представлены в виде неупорядоченных структурных элементов подложки.

На начальных стадиях культивации адгезионное взаимодействие между клетками и массивом МУНТ зависит в основном от топографии поверхности субстрата. На электронных изображениях видны отростки, с помощью которых клетки закрепляются к поверхности массивов. Наблюдался контакт сцепления латеральных отростков с поверхностью массивов нанотрубок. Полученный эффект сцепления можно объяснить соответствием размеров отростков в разных областях (близких и удаленных от тела клетки) и размеров структурных элементов массива МУНТ. Поперечное сечение среднестатистического отростка составило от 1...2 мкм (у основания в области ответвления от клетки) до 50 нм (в периферийной области). Размер конгломератов из нанотрубок, слипшихся под действием сил Ван-дер-Ваальса, составлял от 30 до 300 нм.

Исследование взаимодействия структурированных массивов с клетками проводилось с использованием МСК. На рис. 4 представлены изображения СЭМ стволовых клеток, выращен-

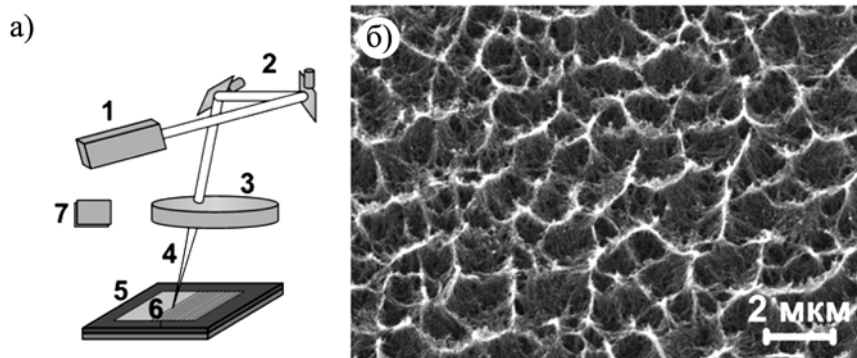


Рис. 2. Схема лазерной установки (а) и изображение СЭМ структурированного массива МУНТ (б)

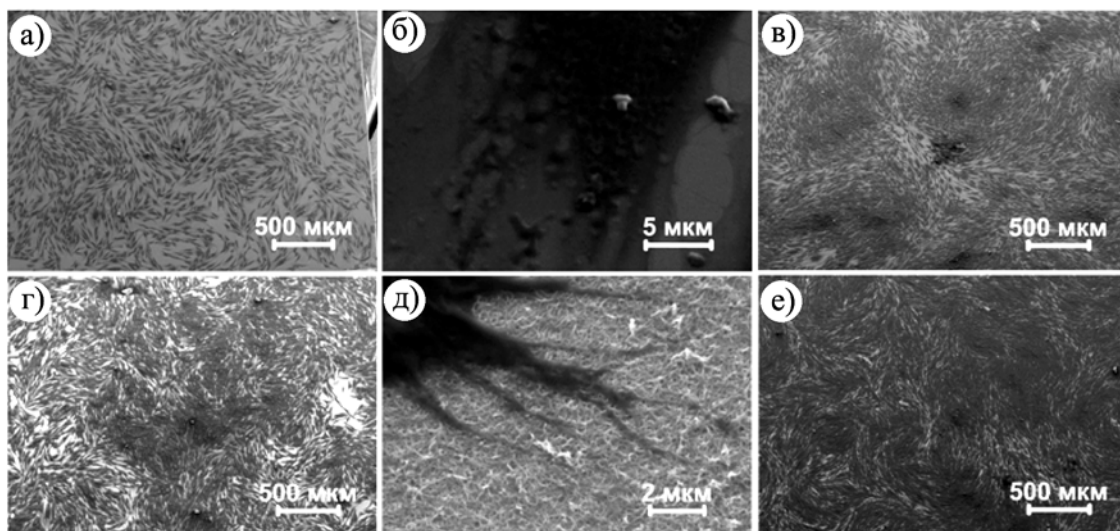


Рис. 3. Вид хондробластов через 24 (а, б, г, д) и 72 ч (в, е) после начала инкубации на поверхности чистого кремния (а-в) и массивов МУНТ (г-е)

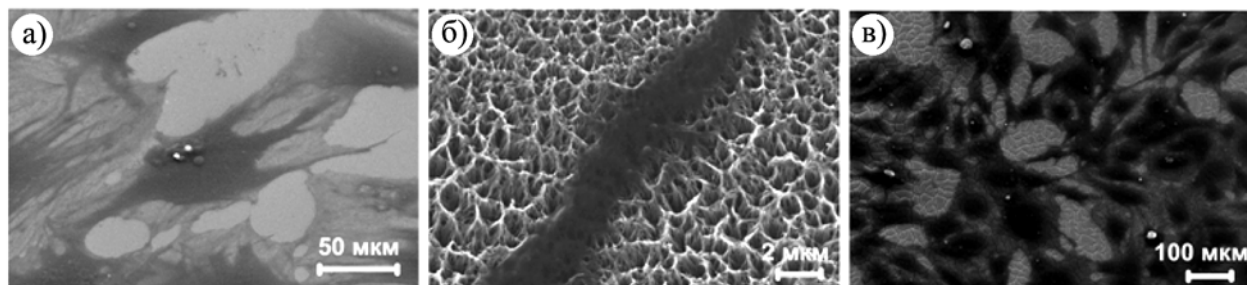


Рис. 4. Изображение СЭМ стволовых клеток на чистой кремниевой подложке (а) и структурированном массиве МУНТ (б, в) через 72 ч после начала инкубации

ных на чистом кремнии и структурированном массиве МУНТ. За счет структурирования МУНТ обеспечивалась стойкость массива к изгибанию под влиянием питательной среды со стволовыми клетками. Через 72 ч после начала инкубации растянутая форма клеток свидетельствует об их адгезии к поверхности массивов. Размеры клеток достигали 100 мкм. При этом размеры клеток на чистой подложке без нанотрубок были на 30...40 мкм меньше и достигали 60...70 мкм через тот же временной интервал инкубации. Ширина поперечного размера латеральных отростков в несколько раз превышала размеры ячеек, образованных из МУНТ. Размер ячеек варьировал от 1 до 1,5 мкм (рис. 4б).

На изображениях СЭМ виден контакт между нанотрубками и клетками, который проявляется в характере приращения клеток к поверхности массивов и в их дальнейшей пролиферации. Было обнаружено, что массив МУНТ способствовал образованию межклеточных взаимодействий и формированию клеточных конгломератов (рис. 4в).

Заключение

В рассматриваемой работе был исследован рост клеток на массивах МУНТ, синтезированных на кремниевой подложке методом каталитического плазменно-химического осаждения из газовой фазы. Продемонстрирована наибольшая плотность пролифериовавших клеток хрящевой ткани на поверхности вертикально ориентированных массивов МУНТ по сравнению с чистой подложкой. Разработан метод лазерного структурирования массивов МУНТ на планарных подложках, за счет которых обеспечена стойкость нанотрубок к изгибанию под влиянием питательной среды с мезенхимальными стволовыми клетками. Сравнение роста хондробластов и стволовых клеток на чистом кремнии и неструктурированном и структурированном массивах МУНТ позволяет сделать вывод об отсутствии токсического действия нанотрубок и патологического влияния на жизнеспособность и морфологию обоих типов клеток. Полученный эффект устойчивости морфологии структурированного массива МУНТ к инкубации клеток на нем можно использовать для дозирования лекарственных средств нанотрубками. На основе полученных закономерностей взаимодействия массивов нанотрубок и клеток могут быть сформированы функциональные элементы органов на чипе, биосенсоров, платформ для мониторинга активности клеток, устройств адресной доставки лекарств и др.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 0N59-2019-0017.

Список литературы:

1. *Nakanishi W. et al.* Bioactive nanocarbon assemblies: Nanoarchitectonics and applications // *Nano Today*. 2014. Vol. 9 (3). PP. 378-394.
2. *Ku S.H., Lee M., Park C.B.* Carbon based nanomaterials for tissue engineering // *Advanced healthcare materials*. 2013. Vol. 2 (2). PP. 244-260.
3. *Tao Z. et al.* Carbon Nanotube Thin Film-Supported Fibroblast and Pluripotent Stem Cell Growth // *BioNanoScience*. 2014. Vol. 4 (3). PP. 288-300.
4. *Gerasimenko A. et al.* Laser structuring of carbon nanotubes in the albumin matrix for the creation of composite biostructures // *Journal of Biomedical Optics*. 2017. Vol. 22 (6). PP. 065003-1-8.

5. *Lalwani G. et al.* Three dimensional carbon nanotube scaffolds for long-term maintenance and expansion of human mesenchymal stem cells // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017. Vol. 105 (7). PP. 1927-1939.
6. *Alice A.K. et al.* Pristine carbon nanotube scaffolds for the growth of chondrocytes // *Journal of Materials Chemistry B*. 2017. Vol. 5 (41). PP. 8178-8182.
7. *Privalova P. et al.* Biocompatible Nanomaterial for Electrical Stimulation of Human Connective Tissue Cells on Layers of Composite Structures with a Nanocarbon Framework // *Biomedical Engineering*. 2019. Vol. 52 (5). PP. 301-304.
8. *Ren J. et al.* Superaligned carbon nanotubes guide oriented cell growth and promote electrophysiological homogeneity for synthetic cardiac tissues // *Advanced Materials*. 2017. Vol. 29 (44). P. 1702713.
9. *Gerasimenko A. et al.* Influence of laser structuring and barium nitrate treatment on morphology and electrophysical characteristics of vertically aligned carbon nanotube arrays // *Diamond & Related Materials*. 2019. Vol. 96. PP. 104-111.

Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, доцент,
начальник лаборатории,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ,
Евгений Павлович Кицюк,
канд. тех. наук, начальник лаборатории,
НПК «Технологический центр»,
Полина Юрьевна Привалова,
инженер,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
Ирина Александровна Суетина,
канд. биолог. наук, ведущий научный сотрудник,
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
Наталья Андреевна Демиденко,
инженер,
ФГБОУ ВПО «НИУ «МИЭТ»,
Роман Михайлович Рязанов,
мл. научный сотрудник,
НПК «Технологический центр»,
Сирадж Интизарович Джалилов,
студент,
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения РФ,
Леонид Иванович Руссу,
научный сотрудник,
Марина Владимировна Мезенцева,
д-р биолог. наук, руководитель,
лаборатория культур тканей,
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
г. Москва,
e-mail: gerasimenko@bms.zone