

14. Sturm-Ramirez K. M., Hulse-Post D. J., Govorkova E. A. et al. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia. *J. Virol.* 2005; 79 (17). 1269—1279.
15. Veen J., Yurlov A. K., Delany S. N. et al. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds. Wetlands International, Wageningen, The Netherlands, 2005; 60.

16. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 19; 56: P. 152—179.
17. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization (WHO), 2002.

Поступила 03.08.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 576.3.08:008

*Р. Я. Подчерняева¹, И. А. Сутина¹, Г. Р. Михайлова¹, О. А. Лопатина¹, И. И. Бобринецкий²,
Р. А. Морозов², А. С. Селезнев²*

Культивирование перевиваемых клеточных линий на подложках из углеродных нанотрубок и влияние электростимуляции на пролиферацию клеток

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России;
²ФГБОУ ВПО Национальный исследовательский университет «МИЭТ»

Данное исследование показало, что 3 изученных образца углеродных нанотрубок отечественного производства, закреплённые на поверхности подложки, не обладают токсичными свойствами и могут быть использованы для культивирования клеток. Создано биосовместимое электропроводящее покрытие на основе углеродных нанотрубок и бычьего сывороточного альбумина и продемонстрирована его эффективность при культивировании клеток *in vitro*. Для электрической стимуляции клеток разработано устройство для локального подведения электрического потенциала к клеткам через наноразмерные электроды. Приведены результаты культивирования фибробластов эмбриона человека в импульсном электрическом поле на проводящих нанокompозитных подложках. Показано увеличение пролиферативной активности клеток на 26% при потенциалах до 100 мВ.

Ключевые слова: *нанокompозитные подложки, углеродные нанотрубки, перевиваемые клетки фибробластов эмбриона человека, пролиферация*

Cultivation of Continuous Cell Lines on the Substrate of Carbon Nanotubes and the Effect of Electric Stimulation on Cell Proliferation

R. Y. Podchernyaeva¹, I. A. Suetina¹, G. R. Michailova¹, O. A. Lopatina¹, I. I. Bobrinetskiy², R. A. Morozov², and A. S. Seleznev²

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;
² National Research University of Electronic Technology, Zelenograd, Moscow, Russia

It was demonstrated that the three studied samples of carbon nanotubes of domestic production fixed on the substrate surface did not have toxic effect and could be used for cell cultivation. A biocompatible conductive coating based on carbon nanotubes and bovine serum albumin was developed. The efficacy of the coating for growing *in vitro* cell cultures was tested. A device was developed for electric stimulation of the cells. Local electric potential was applied to the cells using nanoscale electrodes. The results of human embryonic fibroblast cultivation in a pulsed electric field on conductive nanocomposite substrates were presented. An 26% increase in the proliferative activity of cells was observed at potentials up to 100 mV.

Key words: *nanocomposite substrates, carbon nanotubes, transplanted cells, human embryonic fibroblasts, proliferation*

Перспективность нанотехнологии для медицины, биологии и биоинженерии требует изучения ее разработок на клеточном уровне. Углеродные нанотрубки, обладая уникальными электронными свойствами, высокой механической прочностью, высокой гибкостью и высокой удельной поверхностью, являются одним из таких перспективных продуктов нанотехнологии [6, 10]. Имея структуру, геометрически близкую к основному белку соединительной ткани животных — коллагену, углеродные нанотрубки создают соответствующее микроокружение клеток, обеспечивающее их пролиферацию и дифференциацию [8]. С помощью углеродных нанотрубок также можно достичь направленного роста клеток [6—8]. Так, в ряде работ, посвященных созданию новых биосовместимых композитных материалов для биоинженерии, регенерации хрящевых тканей, исследованию

роста фибробластов и применению в нейрохирургии, показано, что дополнительное подведение электрического сигнала к клеткам приводит к увеличению их пролиферативной активности и способствует пространственной организации тканей [4, 9, 11, 12]. Поэтому существенным вопросом в дальнейших разработках в области интеграции углеродных нанотрубок и культур тканей является повышение биосовместимости нанотрубок, в частности за счет создания композитов на основе белковых матриц [5, 9] и изучения влияния электростимуляции на рост и развитие клеток на проводящих подложках из нанотрубок.

Объяснение физических механизмов, регулирующих адгезию и ориентацию клеток в электрическом поле на трехмерной подложке, позволит развить новые подходы к управлению культивированием клеток.

Контактная информация:

Подчерняева Раиса Яковлевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. культур тканей; e-mail: cell@rambler.ru

В связи с этим, целью данной работы являлось исследование биологической совместимости перевиваемых культур клеток и 3 типов углеродных нанотрубок отечественного производства, а также изучение морфологии и пролиферативной активности клеток фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), культивируемых на проводящих подложках из нанотрубок под действием локального электрического поля.

Материалы и методы

Нанотрубки. В качестве каркасообразующего материала были использованы однослойные углеродные нанотрубки (ОСНТ) отечественного производства от Института проблем химической физики РАН и многослойные углеродные нанотрубки (МСНТ): образец МСНТ №1 от ООО «НТЦ «ГраНаТ» и образец МСНТ №2 от ООО «НаноТехЦентр».

Культуры клеток и питательные среды. Для экспериментов по культивированию из коллекции культур тканей НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского были выбраны нормальные клетки ФЭЧ, клетки почки зеленой марьшиски (Vero) и опухолевые клетки глиобластомы человека (GL6).

Клеточные линии в посевной дозе 10^5 кл/мл культивировали на покровных стеклах с нанесенным на них слоем нанотрубок в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО НПО «ПанЭко», Москва) в термостате при 37°C в течение 72 ч.

Для визуального контроля морфологии клеток в микроскопе клетки фиксировали и окрашивали азур-эозином по Романовскому по модифицированной методике [1]. Окрашенные препараты для изучения морфологии клеток исследовали в световом микроскопе (ок. 10 х об. 40).

Электрическая стимуляция. Для опытов по электрической стимуляции клеток было разработано устройство для локального подведения электрического потенциала к клеткам через наноразмерные электроды. Эта система подведения электрических сигналов состояла из 6-лучного планшета, генератора сигналов и осциллографа. Благодаря такой конструкции модифицированный культуральный планшет («Linbro», США) с клетками находился в течение всего опыта в CO_2 -инкубаторе, а система позволяла подавать электрический сигнал непосредственно к клеткам через однослойные нанотрубки, покрытые альбумином.

При электрической стимуляции клеток использовали напряжение амплитудой от 10 до 5 В. После 24 ч инкубации без приложенного напряжения на установку подавался сигнал из 5 импульсов с длиной импульса 5 мс, расстоянием между импульсами 5 мс и периодом между сериями импульсов 1 с. Электрическая стимуляция продолжалась 48 ч.

Клетки ФЭЧ культивировали в этой установке на покровных стеклах со сформированной электропроводящей тонкой пленкой из ОСНТ и бычьим сывороточным альбумином (ОСНТ/БСА-покрытием).

Непосредственно перед инкубацией образцы покровных стекол стерилизовали в растворе 70° этанола с последующей обработкой ультрафиолетом в течение 20 мин и промывали в среде Игла. После удаления среды клетки ФЭЧ в концентрации 10^5 кл/мл добавляли в каждую лунку в объеме 1 мл среды Игла с 10% ЭТС и инкубировали в течение 24 ч в термостате с CO_2 («SANYO Electric Co. Ltd.», Япония) с 5% CO_2 при 37°C , после чего в течение 48 ч на лунки планшета подавался импульсный сигнал.

Коэффициент пролиферации (КП) определяли с помощью модифицированного МТТ-метода [2, 3].

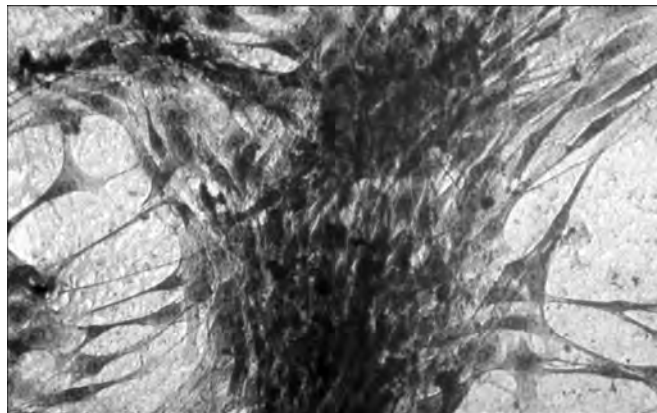


Рис. 2. Расположение клеток ФЭЧ, зафиксированных на 3-й день после посева на покровных стеклах, модифицированных ОСНТ/БСА-пленкой. Ув. 400.

Для атомно-силовой микроскопии (АСМ) стекла с клетками извлекали из питательной среды, клетки фиксировали в течение 30 мин в 2,5% глутаральдегиде и промывали в фосфатном буфере 2—3 раза по 2 мин, а затем дегидрировали выдерживанием в растворе 50, 70 и 96% этилового спирта в течение 2 мин в каждом.

Результаты

В процессе исследования 3 образцов углеродных нанотрубок отечественного производства, закреплённых на поверхности подложки, было показано, что изученные ОСНТ, МСНТ № 1, МСНТ № 2, не обладают токсичными свойствами и могут быть использованы для культивирования клеток.

При использовании клеточной линии Vero отмечен более активный рост клеток с образованием полного монослоя клеток на стеклах, покрытых ОСНТ, в отличие от МСНТ. Подобную морфологическую картину отмечали при использовании изучаемых видов нанотрубок в ходе культивирования клеток ФЭЧ. Линия клеток GL6 на покровных стеклах, покрытых ОСНТ и МСНТ, создавала структуру монослоя с беспорядочным расположением и формой клеток (рис. 1; см. 3-ю полосу обложки).

Исходя из полученных данных, для проведения дальнейших исследований по электростимуляции клеток и формирования биосовместимого проводящего слоя из ОСНТ на покровном стекле, а также для улучшения адгезии клеток применяли БСА.

Нами была изучена пролиферация клеток на пленках ОСНТ/БСА на покровных стеклах для различных величин импульсов электрической стимуляции (10, 50, 100, 200, 500, 5000 мВ). Величина тока варьировала от 1 нА до 100 мкА.

Результаты изучения морфологии клеток ФЭЧ, выросших на стеклах с ОСНТ, после электростимуляции 10, 50 мВ в наших экспериментах показали, что культура состоит из фибробластоподобных клеток с овальными ядрами, ядрышки крупные, по 1—4 в ядре, цитоплазма мелкосетчатая, наблюдаются черные скопления нанотрубок разной величины и формы (рис. 2). При напряжениях выше 100 мВ происходит изменение морфологии клеток, а именно увеличение их размеров. В основном с увеличением тока наблюдаются скопление клеток в местах с повышенной толщиной пленки нанотрубок и их характерная ориентация вдоль линий электрического поля при напряжениях выше 100 мВ (токах 10 нА).

При проведении атомно-силовых исследований обнаружено, что клетки покрыты нанотрубками сверху, особенно в области формирования отростков. На изо-

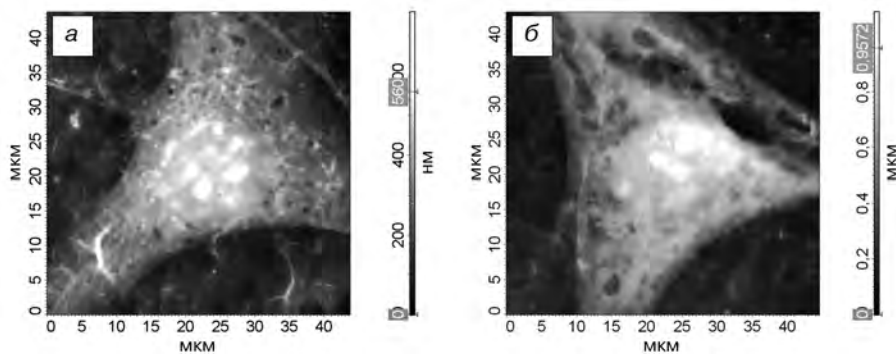


Рис. 3. АСМ-изображения клеток ФЭЧ на ОСНТ/БСА-модифицированном покровном стекле после 48 ч электростимуляции при напряжении 10 мВ (а) и 50 мВ (б). Ув. 1000.

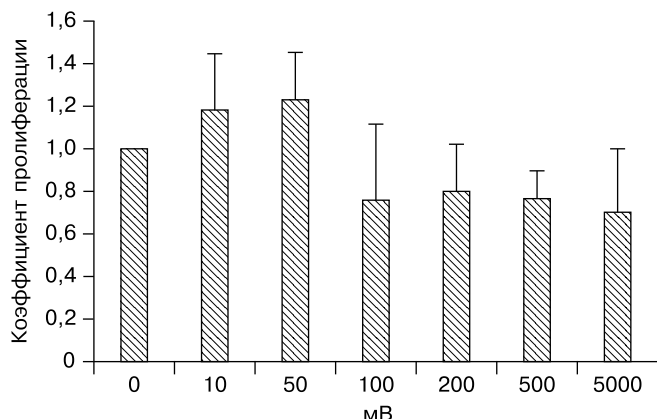


Рис. 4. Коэффициент пролиферации ФЭЧ, культивируемых в течение 72 ч на ОСНТ/БСА-модифицированных покровных стеклах, в зависимости от приложенных импульсов.

бражениях видно, что клетка находится под слоем нанотрубок, что свидетельствует о высокой биосовместимости полученного материала подложки (рис. 3).

Данный факт свидетельствует о том, что в процессе роста клетки не просто развиваются на поверхности композита из нанотрубок, но или проникают в него, или обволакивают их, обеспечивая лучшее соединение. В целом АСМ-топография демонстрирует достаточно хорошую адгезию клеток на поверхности пленки, что подтверждает ее биологическую совместимость.

Зависимость КП клеток, определенного с помощью МТТ-метода, от величины прикладываемых импульсов напряжения приведена на рис. 4, на котором видно, что при низких значениях прикладываемого напряжения происходит повышение пролиферативной активности клеток ФЭЧ. С увеличением напряжения пролиферативная активность замедляется.

Таким образом, нами впервые показано, что при использовании электрической стимуляции клеток через наноразмерные электроды при малых амплитудах напряженности электрического поля и небольших частотах генерации сигнала можно наблюдать увеличение пролиферативной активности клеток ФЭЧ на 26%.

Обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что 3 изученных образца углеродных нанотрубок отечественного производства, закрепленных на поверхности подложки, не обладают токсичными свойствами и могут быть использованы для культивирования клеток. Разработаны электропроводящие подложки на основе ОСНТ и БСА, которые можно применять при культивировании кле-

ток и регенерации тканей. Структура является биосовместимой и обеспечивает хороший контакт при культивировании клеток. Для проведения опытов по электрической стимуляции клеток было разработано устройство для локального подведения электрического потенциала к клеткам через наноразмерные электроды. Показано, что приложение напряжения до 50 мВ (токи до 10 нА) повышает индекс пролиферации клеток ФЭЧ (до 26%), не оказывая заметного влияния на их морфологию. С увеличением напряжения пролиферативная активность

клеток снижается и изменяется их морфология. При этом происходили направленное движение клеток фибробластов вдоль линии поля и организация их в крупные конгломераты, что, вероятно, связано с ориентирующим действием локальных потенциалов в области контактов перколированных в сетки нанотрубок. Транспортный механизм, сопровождаемый увеличением синтеза белков и их полимеризации, может являться возможной причиной повышения пролиферативной активности клеток при низких напряжениях.

Понимание и управление механизмами движения клеток и увеличения их пролиферативной активности на электропроводящих биосовместимых подложках позволяет разработать методы электростимулированного роста клеток для тканевой инженерии.

Поскольку электростимуляция на таких подложках способствует увеличению клеточной биомассы, это даст возможность увеличить продукцию вирусных антигенов, необходимых для получения различных медико-биологических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлова Г. П., Мазуркова Н. А., Подчерняева Р. Я. и др. Морфологическая и кариологическая характеристики клеток MDCK и Vero(B) при культивировании в питательных средах на основе растительных гидролизатов. *Вопр. вирусол.* 2011; 2: 9—14.
2. Сутина И. А., Подчерняева Р. Я., Лопатина О. А., Остроумов С. А. Токсикология наноматериалов: оценки токсичности наночастиц оксидов меди и железа на культуре клеток. В кн.: *Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина.* М.: РОСНАНО; 2011; 91.
3. Хабриев П. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005.
4. Ageeva S. A., Bobrinetskii I. I., Nevolin V. K. et al. Nanotube-based three-dimensional albumin composite obtained using continuous laser radiation. *Semiconductors.* 2009; 43 (13).
5. Bobrinetskii I. I., Morozov R. A., Podgaetskii V. M. et al. A study of bulky nanotube composites based on albumin by high-resolution microscopy. *Biophysics.* 2011; 56 (2): 194—199.
6. Dviro T., Timko B. P., Kohane D. S., Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* 2011; 6 (1): 13—22.
7. Harrison B. S., Atala A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials.* 2007; 28 (2): 344—353.
8. Ma P. X. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60 (2): 184—198.
9. Podgaetskii V. M., Selishchev S. V., Bobrinetskii I. I., Nevolin V. K. Volumetric nanodesign by new laser method. Application for medical purposes. *Opt. Mem. Neural Networks.* 2008; 17 (2): 147—151.
10. Voge C. M., Siegemann J. P. Carbon nanotubes in neural interfacing applications. *J. Neural Engineer.* 2011; 8 (1): 011001.
11. Yuen F. L.-Y., Zak G., Waldman S. D., Docolis A. Morphology of fibroblasts grown on substrates formed by dielectrophoretically aligned carbon nanotubes. *Cytotechnology.* 2008; 56 (1): 9—17.
12. Zanello L. P., Zhao B., Hu H. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett.* 2006; 2 (2): 562—567.

Поступила 22.03.12

К статье Л. В. Урываева с соавторами.

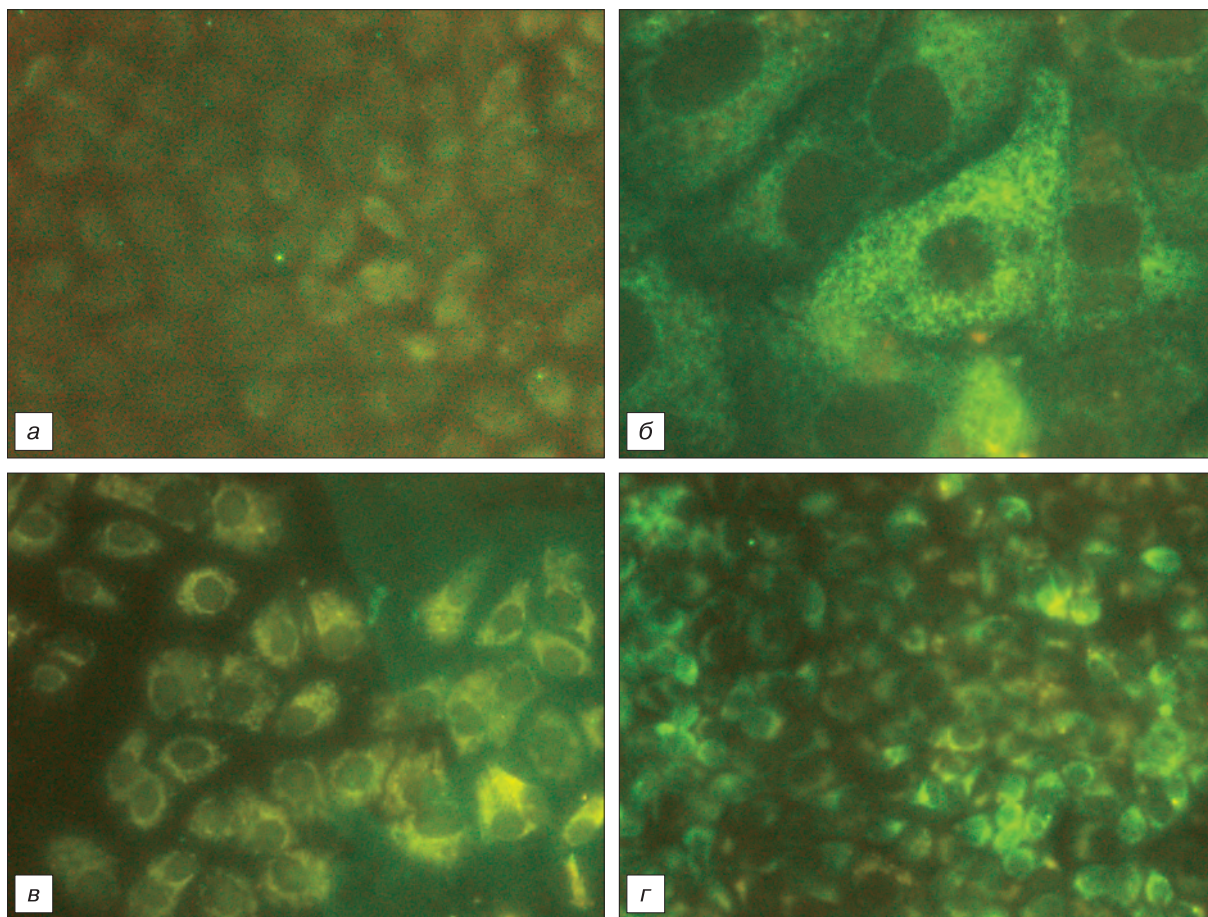


Рис.2. Реакция непрямо́й иммунофлюоресценции — свечение вирусного гликопротеина в цитоплазме различных линий клеток. *а* — неконтаминированные клетки MDCK (контроль). $\times 40$; *б* — клетки Vero E6*. $\times 100$; *в* — клетки CaCo*. $\times 40$; *г* — клетки BALB/C*. $\times 40$.

К статье Р. Я. Подчерняевой с соавторами.

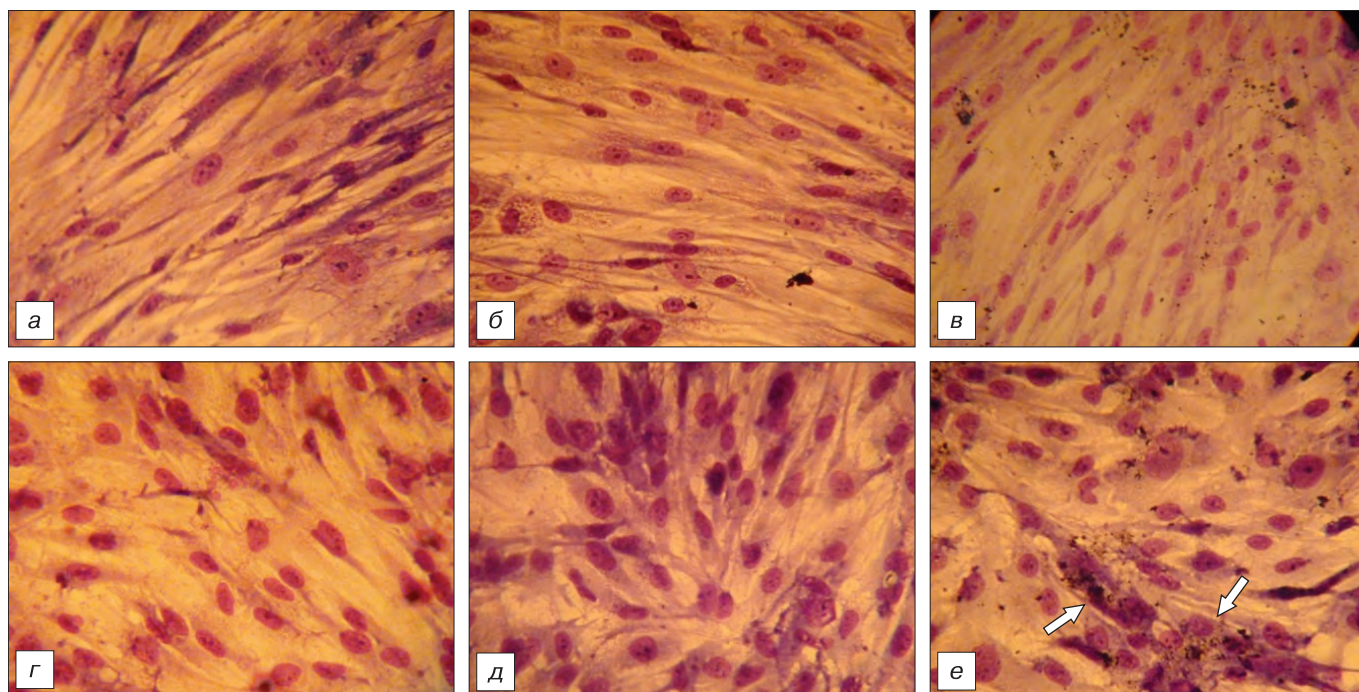


Рис. 1. Фотография клеток ФЭЧ (*а, б, в*) и GL6 (*г, д, е*): контрольных (*а, г*); культивированных на ОСНТ (*б, д*) и МСНТ (*в, е*). Стрелки указывают на скопления нанотрубок. Ув. 400.