

МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНИКА

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

Выходит 6 раз в год

№ 6 (288) 2014

НОЯБРЬ–ДЕКАБРЬ

Издается с 1967 г., г. Москва

В настоящем выпуске журнала «Медицинская техника» представлены работы сотрудников кафедры биомедицинских систем Национального исследовательского университета «МИЭТ».

В обзорных статьях рассмотрены: использование аппаратов вспомогательного кровообращения для терапии острой сердечной недостаточности, современное состояние и перспективы развития аппаратуры для искусственного очищения крови, возможности создания новых материалов медицинского назначения с применением углеродных нанотрубок, современные подходы к использованию датчиков магнитного поля для создания новой диагностической аппаратуры.

Экспериментальные работы посвящены разработке средств беспроводной передачи энергии к имплантируемым медицинским приборам, проблемам создания и применения материалов на основе углеродных нанотрубок. Также представлены результаты исследований в области разработки методов анализа сердечного ритма при проведении сердечно-легочной реанимации, включающие в себя разработку математического аппарата и схемотехнические решения для аппаратной реализации предложенных алгоритмов.

В теоретических работах рассмотрены методы моделирования динамики концентрации глюкозы в крови, проанализированы изменения динамики кровотока при использовании систем механической поддержки кровообращения; представлен новый математический аппарат для использования в эмиссионной томографии.

*Сергей Васильевич Селищев,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой биомедицинских систем МИЭТ,
e-mail: sersel@miee.ru*

ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

*А.С. Селезнев, И.А. Суетина, В.А. Петухов, Л.И. Руссу, А.Ю. Герасименко,
М.В. Мезенцева, И.И. Бобринецкий*

Системы локального электрофизиологического воздействия на основе однослойных углеродных нанотрубок для исследования клеточных культур

Аннотация

В статье рассматриваются конструкции и принципы работы электрофизиологических систем, разработанных для изучения воздействия электрического поля на культивируемые клетки. Электроды на основе однослойных углеродных нанотрубок обеспечивают локализацию электрического поля, что позволяет использовать их для изучения отдельных клеток в задачах стимулирования роста и создания электронных интерфейсов к клеткам. Исследована пролиферативная и электрохимическая активность при культивировании различных линий клеток на электродах из углеродных нанотрубок. Выявлено наличие усиления электрохимической активности в области контакта углеродных нанотрубок и нервных клеток.

Введение

Проведение экспериментов *in vitro* по исследованию свойств живых тканей обычно не дает полной информации о том, как биологическая система будет вести себя в составе реального организма. Для устранения данного недостатка разрабатываются, в частности, имитирующие системы, позволяющие более точно воспроизвести среду обитания живых организмов. Широко известны системы, имитирующие электрическое взаимодействие между культивированными тканями и системами подвода и снятия электрического потенциала, которые используют в своей основе микроэлектродные матрицы (МЭМ), на поверхности которых в дальнейшем выращивается нервная ткань [1]. Преимуществом таких систем является компактность, благодаря которой систему можно поместить на столик микроскопа (оптического, атомно-силового или конфокального)

для исследования и контроля поведения и получения сенсорных откликов в течение нескольких месяцев на микронном уровне, что не было раньше возможно при использовании нервной системы живых организмов.

В стандартных МЭМ применяют платиновые или ИТО (оксид индия-олова) электроды на стеклянном основании [2], [3]. При этом возникает проблема, связанная с различием уровней сигнала возбуждения и сигнала, снимаемого с выходных электродов. Их отношение может достигать 10^5 . Решение данной проблемы связывают с уменьшением стимулирующего потенциала за счет разработки микроэлектродных массивов, генерирующих большие локальные напряженности электрического поля. Такими электродами могут быть наноразмерные контакты на основе углеродных нанотрубок (наноэлектроды) [4]. Нанотрубки, благодаря своим малым размерам (диаметр 1 нм), формируют распределенную область контакта с клетками, что

повышает коэффициент передачи стимулирующего потенциала с внеклеточного электрода [5]. В целом использование нанотрубок позволяет создавать биосовместимые электроды, обеспечивающие надежный контакт с клетками, низкую электрическую емкость, а также возможность управления и отслеживания поведения субклеточных компонентов, что в итоге позволяет управлять метаболизмом клеток на нанометровом уровне локализации [6].

В статье описаны результаты разработки и испытания нанозлектродных систем электрического стимулирования и изучения активности перевиваемых линий клеток. В качестве материала электродов предложены однослойные углеродные нанотрубки, электрически соединенные с макроэлектродами и электрической стимулирующей системой. Изучена пролиферативная активность перевиваемых линий клеток, а также предложены методы контроля взаимодействия нервных клеток и углеродных нанотрубок в составе мультиэлектродных матриц.

Материалы и методы

В качестве рабочего слоя были использованы однослойные углеродные нанотрубки 99,5 % мас. (ОСНТ) (предоставлены д.ф.-м.н. А.В. Крестининым, Институт проблем химической физики РАН), полученные электродуговым методом [7]. ОСНТ диспергировались в ультразвуковой ванне «Branson B300» («Branson Ultrasonics», США) в течение 24 ч для создания коллоидного раствора. Для повышения стабильности раствора использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) [8].

В качестве подложек для электрической стимуляции использовались покровные стекла толщиной 150 мкм. По краям подложек методом магнетронного распыления («Emitech K575X», «Quorum Technologies», Великобритания) через маску формировались золотые электроды толщиной 30 нм. Электроды, после формирования пленки нанотрубок, наносились на поверхности подложки. В качестве структур МЭМ золотые электроды формировались на поверхности кварцевого стекла с использованием изолирующего слоя из плазмохимически осажденного SiO₂.

Длина нанотрубок и их расположение определялись методами атомно-силовой микроскопии (АСМ). Спектроскопия

комбинационного рассеяния света (КРС) проводилась на конфокальном микроскопе/спектрометре, совмещенном с «АСМ Centaur U HR» (ООО «Нано Скан Технология»).

В качестве клеточных линий использовались фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ-Т), нейроны хорька (Mrf) и клетки нейробластомы мыши (Neuro-2a) из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России. Для изучения пролиферативной активности клеток применяли МТТ-тест.

Экспрессия генов интерлейкина, фактора некроза опухоли, интерферона (ИФН) и факторов апоптоза, регулирующих иммунитет, оценивалась по активности их мРНК. Определенные активности мРНК цитокинов и факторов апоптоза в клетках проводили с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции [9]. Выделение мРНК проводили методом кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы «Promega» (J1758).

Модифицированная система электрической стимуляции роста клеток

Была предложена система локальной электрической стимуляции роста клеток на основе установки «Spiritus ESS 1.4» (ООО «Ниобис», Россия). Установка предназначена для *in vitro* электрического управления процессом роста клеток живых организмов при приложении к тканям и клеткам электрического поля или тока.

Система электрической стимуляции содержит шестилуночный культуральный планшет и печатную плату с пружинящими контактными электродами, прикрепленную к крышке планшета. Плата с электродами размещается на крышке планшета, при этом электроды через отверстия в крышке погружаются в питательную среду до контакта с подложками, размещенными на дне лунок, на каждую лунку приходится по два электрода (рис. 1). Электроды соединены попарно с дорожками на печатной плате, через которые к ним прикладывается напряже-

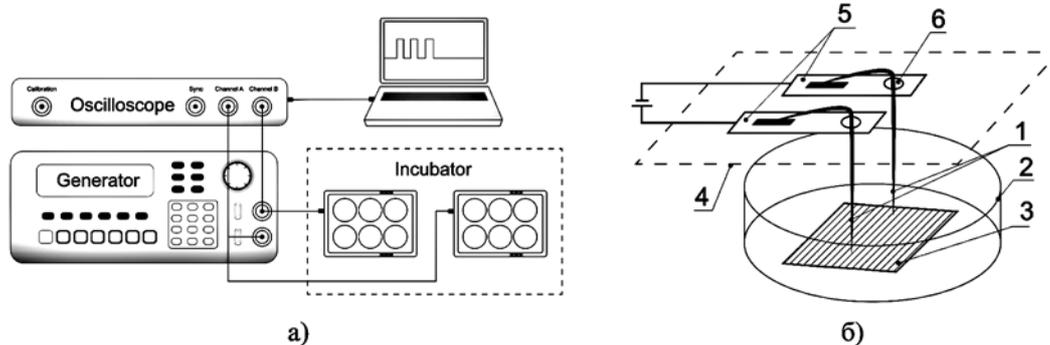


Рис. 1. Схема установки электрического стимулирования роста клеток и тканей (а) и схема устройства для проведения электрической стимуляции через ОСНТ-электроды: 1 – электроды; 2 – лунка; 3 – покровное стекло с ОСНТ/БСА; 4 – печатная плата; 5 – электрические шины; 6 – отверстие для электрода

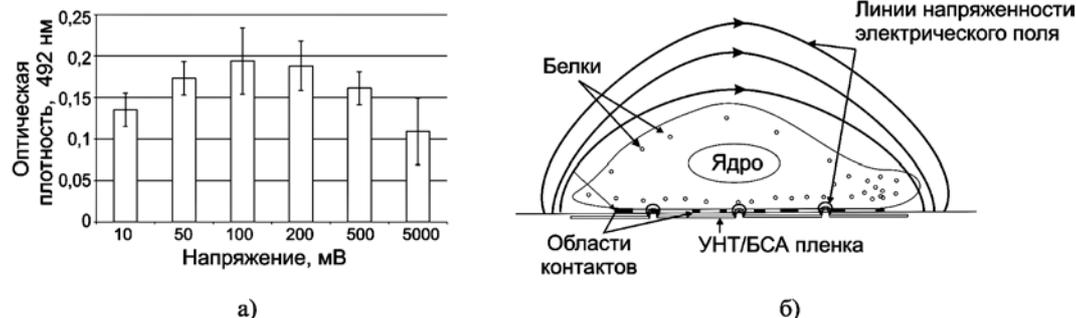


Рис. 2. Зависимость коэффициента пролиферации клеток ФЭЧ от амплитуды стимулирующего напряжения (а) и схема взаимодействия клетки и нанотрубок (б)

ние. Параметры подаваемого сигнала контролируются осциллографом, подключенным к ПК (рис. 1а). На дно лунки помещается модифицированное пленкой ОСНТ/БСА покровное стекло, на поверхности которого осуществляется культивирование клеток (рис. 1б).

Клетки ФЭЧ-Т выращивали на модифицированных с помощью углеродных нанотрубок покровных стеклах с подведенными электродами, находящимися в 6-луночных планшетах в культуральной среде без антибиотиков с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки. Культивирование и электрическое стимулирование клеток проводили в CO₂-термостате при 37 °С (5 % CO₂ в течение 72 ч). Через электроды к проводящему основанию подводили разность потенциалов от 10 мВ до 5 В. Через 24 ч после посадки клеток и инкубации их без приложенного напряжения подавали сигнал из 5 импульсов с длиной одного импульса 5 мс, скважностью 5 мс и периодом между сериями импульсов 1 с в течение 48 ч.

Результат измерения пролиферативной активности по данным МТТ-теста представлен на рис. 2а. Клеточная пролиферация начинает изменяться уже при напряжениях 50 мВ, и максимальное увеличение пролиферации наблюдается при разности потенциалов 100 мВ, что соответствует потребляемой мощности ~1 мкВт. Предложенная конструкция позволяет локализовать электрическое поле непосредственно вблизи клеток, что приводит к снижению потребляемой мощности в процессе электростимулированного роста (рис. 2б).

Отмечено, что после воздействия электрического поля и нанотрубок на клетки ФЭЧ при разности потенциалов 100 мВ наблюдалась активация экспрессии генов ИФН III-типа ИФН-λ и одного из факторов апоптоза Fas ligand (непосредственно вызывает апоптоз). При этом уровень транскрипции остальных исследованных цитокинов и факторов апоптоза под действием нанотрубок не изменялся. Возможно электрическая стимуляция через нанотрубки не оказывает принципиального влияния на основные параметры иммунитета, и поэтому нанотрубки могут быть использованы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Увеличение пролиферативной активности клеток при приложении слабого электрического поля может быть связано с увеличением синтеза белков и ДНК и влиянием внешнего элек-

трического поля на внутренние функциональные механизмы в клетке. Низкочастотная электрическая стимуляция увеличивает клеточную пролиферацию за счет процессов, определяемых вторичными посредниками. Внеклеточные сигнальные молекулы при связывании с белками рецепторов на поверхности клеток передают сигналы посредством молекулярных переключателей к внутриклеточным транспортным белкам. За счет стандартного механизма передачи информации внутри клетки обеспечивается передача информации к необходимым белкам. Согласно полученным результатам, подобный механизм на молекулярном уровне становится наиболее эффективным при приложенных напряжениях в диапазоне величины трансмембранного потенциала [10].

Величина в ~100 мВ является характерной для клеток покровных и соединительных тканей и соответствует разности потенциалов на внешней и внутренней поверхностях клеточной мембраны при осуществлении работы натрий-калиевого (Na⁺-K⁺) насоса [11]. В малых полях короткие электрические импульсы приводят к увеличению коэффициента пролиферации КП на 20 %.

В отличие от ряда работ, где электростимуляция идет дистанционно, за счет приложения внешнего электрического поля или введения электродов в ростовую среду, использование пленки из углеродных нанотрубок позволяет прикладывать непосредственно электрический сигнал к клеточному носителю на основе нанотрубок. В данном случае необходимо учитывать и импульсные токи, протекающие в системе в процессе эксперимента. Увеличение КП наблюдается на токах менее 10 нА. При силе тока выше 10 нА и вплоть до величины 0,1 мА наблюдается стабилизация ингибирования роста клеток на уровне 80 % от индекса пролиферации клеток без приложенного напряжения.

Модифицированная система исследования внеклеточной активности

Для исследования влияния нанотрубок на пролиферацию и взаимодействие с нейрональными клетками методами традиционной микроэлектронной технологии была разработана МЭМ на основе монокристаллической кварцевой подложки

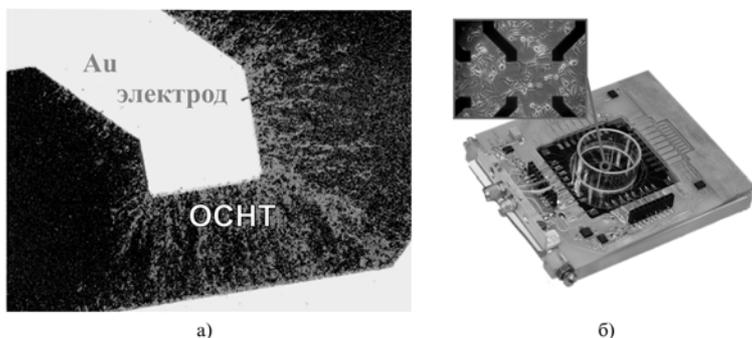


Рис. 3. Мультиэлектродная матрица (МЭМ) на основе монокристаллического кварца: а) увеличенное изображение одного электрода с электрофоретически нанесенными ОСНТ («Olympus», x500); б) 32-электродная МЭМ в держателе с интегрированной системой предусилителей (на вставке – культивированный на электродах монослой клеток линии MPF)

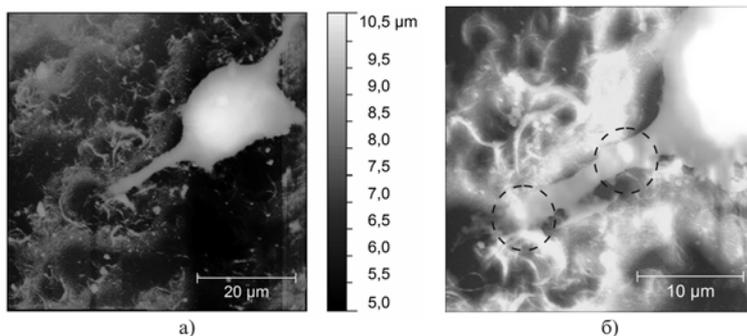


Рис. 4. АСМ-изображение клетки линии Neuro-2a на поверхности нанотрубок: а) топография; б) комбинированное с картой распределения интенсивности сигнала КРС на частоте 2D-пика нанотрубок

диаметром 100 нм. В пластине методом плазмохимического травления формировались щели глубиной 200 нм, в которые напылялись золотые электроды толщиной 200 нм. Для изоляции электродов от среды использовали бислои $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ общей толщиной 600 нм, в котором последующим жидкостным травлением формировались контактные окна. Для увеличения контактной площади с клеткой и усиления потенциала за счет локализации электрического поля в области контакта методом электрофореза наносили однослойные углеродные нанотрубки, которые формировали сетку из нитей и тяжей длиной до 5 мкм каждая и диаметром до 10 нм (рис. 3а).

Был разработан держатель МЭМ-структуры с интегрированной системой измерения (рис. 3б). Основной отличительной конструктивной особенностью держателя является то, что печатная плата с микросхемами одновременно является крепежным механизмом МЭМ-кристалла, что обеспечивает свободное перемещение структуры с питательной средой в процессе культивирования клеток. Сама система усиления сигнала состоит из предусилителя и выходного каскада усилителей, соединенных кабелями произвольной длины. Схема предусилителя была размещена на минимально возможном расстоянии от контактных электродов до МЭМ для уменьшения влияния внешних шумов. Возможность культивирования и функционального совмещения клеток с модифицированными электродами была исследована на двух клеточных линиях: Mpf и Neuro-2a.

Однозначно известно на данный момент, что нанотрубки (ОСНТ или МСНТ) увеличивают активность нейрональной сети, а следовательно, электрическая проводимость нанотрубок может отвечать за усиление электрофизиологического эффекта, в частности за усиление генерации внутриклеточного кальция в области дендритных окончаний в присутствии нанотрубок [12]. Благодаря образованию таких связей возможно создание устройств сопряжения нервных клеток с элементами электроники через токопроводящие биосовместимые наноразмерные волокна. На рис. 4 представлено АСМ-изображение нейрональных клеток на поверхности ОСНТ пленки, а также показан результат измерения карты распределения интенсивности колебаний углеродной решетки в КРС, определяемого ионно-связанным химическим усилением сигнала в области контакта нанотрубок с нейроном. Усиление интенсивности сигнала комбинационного рассеяния света может быть следствием наличия большого количества ионов в области формирования электрического контакта между нанотрубками и отростками нейробластом.

Заключение

Разработаны электрофизиологические интерфейсы на основе углеродных нанотрубок, обеспечивающие улучшение электрохимической связи и повышение эффективности передачи электрических потенциалов к культивируемым клеткам. Продемонстрировано контролируемое управление пролиферативной активностью клеток за счет варьирования прикладываемого к нанотрубкам потенциала. Также выявлено усиление электрохимической активности в области контакта углеродных нанотрубок и нервных клеток.

Таким образом, при взаимодействии между клетками и нанотрубками происходят сложные электрохимические процессы. Понимание данных процессов позволит как расширить знания о функционировании биологических систем, так и создать новые системы передачи информации между биологическими объектами и устройствами обработки информации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-19-01308, МИЭТ) и гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых – докторов наук № МД-170.2014.8.

Список литературы:

1. Taketani M., Baudry M. Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays. – Springer, 2006. XVIII. 478 p.
2. Merrill D.R., Bikson M., Jefferys J.G.R. // J. Neuros Meth. 2005. Vol. 141. PP. 171-198.
3. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаснеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. // Совр. техн. мед. 2009. № 1. С. 8-15.
4. Voge C.M., Stegemann J.P. // J. Neural Eng. 2011. Vol. 8. 011001.
5. Wang K., Fishman H.A., Dai H., Harris J.S. // Nano Lett. 2006. Vol. 6. PP. 2043-2048.
6. Cellot G., Cilia E., Cipollone S., Rancic V., Sucapane A., Giordani S., Gambazzi L., Markram H., Grandolfo M., Scaini D., Gelain F., Casalis L., Prato M., Giugliano M., Ballerini L. // Nat. Nanotech. 2009. Vol. 4. PP. 126-133.
7. Krestinin A.V., Kiselev N.A., Raevskii A.V., Ryabenko A.G. // Eurasian Chem. Tech. J. 2003. Vol. 5. PP. 7-18.
8. Podgaetsky V.M., Selishchev S.V., Bobrinetskii I.I., Nevolin V.K. // Opt. Mem. & Neur. Net. 2008. Vol. 17. PP. 147-151.
9. Хабриев П.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. 832 с.
10. Bobrinetskiy I.I., Seleznev A.S., Morozov R.A., Lopatina O.A., Podchernyaeva R.Y., Suetina I.A. // J. Biomat. Nanobiotech. 2012. Vol. 3. PP. 377-384.
11. Hosoi S., Slayman C.L. // J. Physiol. 1985. Vol. 367. PP. 267-290.
12. Бобринецкий И.И., Неволин В.К., Ромашкин А.В., Селезнев А.С. // Нанотехника. 2012. № 3. С. 63-68.

*Алексей Сергеевич Селезнев,
технический директор,
ООО «НИОБИС»,*

*Ирина Александровна Суетина,
канд. биолог. наук, ведущий научный сотрудник,
лаборатория культур тканей,*

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт
вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ,*

*Владимир Александрович Петухов,
инженер,*

*Научно-образовательный центр «Зондовая
микроскопия и нанотехнология»,*

*Леонид Иванович Руссу,
научный сотрудник,*

лаборатория культур тканей,

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт
вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России,*

*Александр Юрьевич Герасименко,
канд. физ.-мат. наук, доцент,*

кафедра биомедицинских систем,

*Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
Марина Владимировна Мезенцева,*

*д-р биолог. наук, руководитель,
лаборатория культур тканей,*

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт
вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России,*

*Иван Иванович Бобринецкий,
д-р техн. наук, профессор,*

кафедра квантовой физики и нанoeлектроники,

*Национальный исследовательский университет «МИЭТ»,
г. Москва, г. Зеленоград,*

e-mail: bobrinet@gmail.com