

НЕЙРОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ЛИНИИ PC12 И НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ НА ПЛЕНКАХ ИЗ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

© Г. А. Посыпанова,¹ И. А. Гайдученко, Е. Ю. Москалева, Г. Е. Федоров

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098;

¹ электронный адрес: galinapo@gmail.com

При разработке методов стимуляции регенерации нервных тканей, а также для создания биоэлектронных устройств нового поколения необходимым этапом является изучение взаимодействия нервных клеток со специально разработанными подложками (матрицами) с различными характеристиками поверхности в нанометровом диапазоне. Перспективным материалом для создания таких подложек могут служить углеродные нанотрубки (УНТ), представляющие собой гибкие пленки графена, свернутые в виде наноразмерных трубочек цилиндрической формы. УНТ получали химическим осаждением из газовой фазы. В результате проведенного анализа клеток линии PC12, культивируемых на кварцевых стеклах, покрытых пленками УНТ, с использованием электронной и оптической микроскопии показано, что УНТ стимулируют пролиферацию и не ингибируют нейрональную дифференцировку клеток PC12. Показана возможность получения дифференцированных нейронов на кварцевых стеклах, покрытых пленками УНТ, из нейральных стволовых клеток мыши. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования пленок из УНТ, полученных путем химического осаждения из газовой фазы на кварцевые стекла, в качестве электропроводящей подложки для получения и исследования функций клеток нейронального происхождения и, возможно, зрелых нейронов.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, цитотоксичность, линия PC12, нейрональная дифференцировка, нейральные стволовые клетки.

Принятые сокращения: КРС — комбинационное рассеяние света (Рамановская спектроскопия), СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, УНТ — углеродные нанотрубки, BDNF — нейротрофический фактор мозга, bFGF — фактор роста фибробластов 2, EGF — эпидермальный фактор роста, FBS — фетальная бычья сыворотка, NGF — фактор роста нервов, NSC — нейральные стволовые клетки, NT-3 — нейротрофин 3, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Исследование взаимодействия нервных клеток со специально разработанными подложками (матрицами) с различными характеристиками поверхности в нанометровом диапазоне является перспективным направлением клеточной инженерии и биологии. Изучение взаимодействия нервных клеток с внешними источниками возбуждения и соседними клетками необходимо как для лучшего понимания деятельности центральной нервной системы, так и для создания биоэлектронных устройств нового поколения (Voge, Stegemann, 2011). С другой стороны, в настоящее время ведется активный поиск биосовместимых материалов для терапевтического применения, необходимых для стимуляции регенерации нервных тканей при лечении последствий таких заболеваний, как ишемия, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (Olkowska et al., 2010; Yang et al., 2010).

Перспективным материалом для создания таких подложек могут служить углеродные нанотрубки (УНТ). УНТ представляют собой гибкие пленки графена (монослоя графита), свернутые в виде наноразмерных трубочек цилиндрической формы. Они обладают такими уникальными свойствами, как высокая электро- и теплопровод-

ность, большая механическая прочность и химическая стабильность (Veetil, Ye, 2009). В настоящее время ведутся исследования по созданию на основе УНТ биосовместимых подложек и трехмерных (3D) матриц для клеток разных типов. Полагают, что такие подложки смогут ускорять рост, дифференцировку и выживаемость нейронов и модифицировать их электрофизиологические свойства. Эти особенности позволяют рассматривать УНТ в качестве материала для создания нанобиогибридных систем, способных управлять поведением клеток нейронных сетей в культуре и стимулировать активность нейронов (Jan, Kotov, 2007; Matsumoto et al., 2007; Fabbro et al., 2011).

Наличие электропроводности у УНТ позволяет не только регистрировать электрические сигналы клеток, но и индуцировать рост клеток в заданном направлении (Chao et al., 2009). Ранее была показана биосовместимость УНТ и живых тканей при регенерации хрящевых участков после введения биодеградируемых имплантов на основе нанотрубок и альбумина (Podgaetsky et al., 2008). Показана перспективность использования композитных материалов на основе УНТ в биоинженерии, в ча-

стности для стимуляции регенерации хрящевой ткани (Yuen et al., 2008; Ageeva et al., 2009; Dvir et al., 2011).

Аналізу токсичности УНТ для клеток млекопитающих посвящены многочисленные исследования, но полученные результаты остаются противоречивыми, что может быть связано с разными методиками получения и разной степенью очистки УНТ (Veetil, Ye, 2009; Wang et al., 2011; Бобринецкий и др., 2012, 2013; Alarifi et al., 2014; Ramon-Azcon et al., 2014; Dong, Ma, 2015).

В связи с этим целью работы явилось исследование влияния УНТ на жизнеспособность и процесс нейрональной дифференцировки нейроэндокринных клеток феохромоцитомы крысы линии PC12 и нейральных стволовых клеток мыши.

Материал и методика

Реактивы. В работе использовали культуральные среды DMEM и DMEM/F12 (1 : 1), гентамицин, аккутазу и бессывороточную добавку B27 (Invitrogen, США); лошадиную сыворотку и бычью фетальную сыворотку (FBS; HyClone, США); bFGF, EGF, NGF, BDNF и NT-3 (PeproTech, Великобритания); моноклональные антитела к β -тубулину III (Abscam, США); флуоресцентномеченные (Alexa Fluor 555) моноклональные антитела к NeuN (Merck Millipore, Германия); F(ab')₂-фрагменты овечьих антител к Ig мыши, меченные ФИТЦ («Сорбент», Россия). Все остальные реактивы были производства Sigma-Aldrich (США).

Синтез и исследование тонких проводящих пленок УНТ. Синтез однослойных УНТ проводили методом химического осаждения из газовой фазы на кварцевых подложках, как описано ранее (Lamura et al., 2007). В качестве катализатора использовали трехкомпонентный раствор наночастиц $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{MoO}_2(\text{acac})_2$ и Al_2O_3 в изопропанол. Концентрация компонентов составляла: 0.08 мг/мл $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.025 мг/мл $\text{MoO}_2(\text{acac})_2$ и 0.75 мг/мл Al_2O_3 . Перед нанесением раствор наночастиц подвергали ультразвуковой обработке в течение 16 ч, после чего на каждое стекло нанесли по 20 мкл катализатора. Катализатор высушивали в течение 40—60 с на воздухе, остатки катализатора удаляли потоком азота под давлением 2.5 атм.

Кварцевые стекла, покрытые слоем катализатора, помещали в кварцевую трубу внутри трубчатой печи. Стекла нагревали до 1000 °С в атмосфере аргона в течение 1.5 ч. После этого пластины отжигали в течение 10 мин в атмосфере водорода для восстановления катализатора. Рост нанотрубок происходил из метано-водородной смеси (объемное соотношение 3.6 : 1) при 1000 °С. Время синтеза составляло 30 мин. Затем реактор остывал до комнатной температуры в атмосфере аргона.

Морфологию синтезированных пленок УНТ исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Nanolab, FEI, США). Характеристику дефектности и диаметры нанотрубок исследовали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС или Рамановской спектроскопии) (Centaaur HR, ООО «Нано скан технология»).

Культивирование клеток. В качестве объектов исследования использовали линию клеток феохромоцитомы крысы PC12, любезно предоставленную д-ром G. Guroff (NIH, США), и нейральные стволовые клетки (NSC) мыши. Клетки PC12 культивировали в среде

DMEM, содержащей 7.5 % FBS, 7.5 % инактивированной лошадиной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, в пластиковых культуральных флаконах (Corning-Costar, Нидерланды) в CO_2 -инкубаторе при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO_2 . Клетки рассевали 1 раз в 5 сут в соотношении 1 : 5 без использования диссоциирующих агентов путем несильного встряхивания культурального флакона с последующим ресуспендированием клеток.

NSC выделяли из головного мозга мышей линии C57/BL6 раннего постнатального возраста (1—5 сут). Мышат декапитировали, извлекали мозг, измельчали скальпелем в дезагрегирующем растворе (среда DMEM/F12, содержащая 10 ед./мл папаина, 0.5 мМ глутамакса и 0.16 мг/мл ДНКазы) и инкубировали 15—20 мин в CO_2 -инкубаторе. Далее ресуспендировали, добавляли трипсин до концентрации 0.125 % и опять помещали в CO_2 -инкубатор на 15—20 мин. После окончания инкубации клетки осаждали с помощью центрифугирования (700 об/мин, 5 мин). Осторожно удаляли супернатант, ресуспендировали в 1 мл среды DMEM/F12, добавляли еще 10 мл той же среды, перемешивали и осаждали с помощью центрифугирования (2000 об/мин, 5 мин). Повторяли процедуру еще 1 раз. Осадок ресуспендировали в ростовой среде (DMEM/F12, содержащей NEPEPES, в которую добавляли 2.4 мг/мл NaHCO_3 , 0.6 % глюкозы, 5 мМ NEPEPES, 60 нг/мл прогестерона, 9.6 мкг/мл путресцина, 4.2 мкг/мл инсулина, 3.8 мкг/мл трансферрина, 1 мкг/мл селенита натрия, 1.8 мкг/мл гепарина, 20 нг/мл EGF, 10 нг/мл bFGF и 2 % B27). Аликвоту клеточной суспензии (10 мкл) смешивали с равным объемом 0.5%-ного раствора трипанового синего и считали количество живых клеток в камере Горяева. Далее клетки рассевали в 6-луночные культуральные планшеты или в чашки Петри с плотностью $(1—2) \cdot 10^4$ кл./см² и помещали в CO_2 -инкубатор.

После формирования нейросфер размером 150—200 мкм в диаметре (5—7 сут) их осаждали центрифугированием (500 об/мин, 5 мин), осадок диссоциировали с помощью аккутазы, осаждали клетки центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин), ресуспендировали в ростовой среде и перенесли в низкоадгезивные 6-луночные планшеты (Corning-Costar) или в чашки Петри диаметром 100 мм при плотности 10—20 кл./мкл.

Анализ роста клеток на УНТ. Кварцевые стекла, покрытые пленками УНТ, обезжировали в смеси ацетона и этанола (1 : 1), промывали раствором PBS, помещали в 24-луночные полистирольные планшеты (Corning-Costar) и стерилизовали в 96%-ном этаноле при УФ-облучении. Часть стекол дополнительно покрывали L-полилизинном. Клетки PC12 высевали на стекла в стандартной культуральной среде при плотности $4 \cdot 10^4$ кл./лунка. Через 1—6 сут культивирования стекла переносили в новые 24-луночные планшеты со свежей культуральной средой, клетки снимали с помощью пипетирования и подсчитывали в камере Горяева. Для оценки количества погибших клеток использовали краситель трипановый синий. Количество клеток нормировали на площадь стекла. Время удвоения популяции (TD) определяли по формуле $\text{TD} = (\log_2 2) \cdot t / [\log_2 (N/N_0)]$, где t — время прироста популяции, N — число клеток через время t , N_0 — исходное число клеток.

Индукция нейрональной дифференцировки. Клетки PC12 высевали на стекла с пленками УНТ в стандартной культуральной среде. Через 1 сут сре-

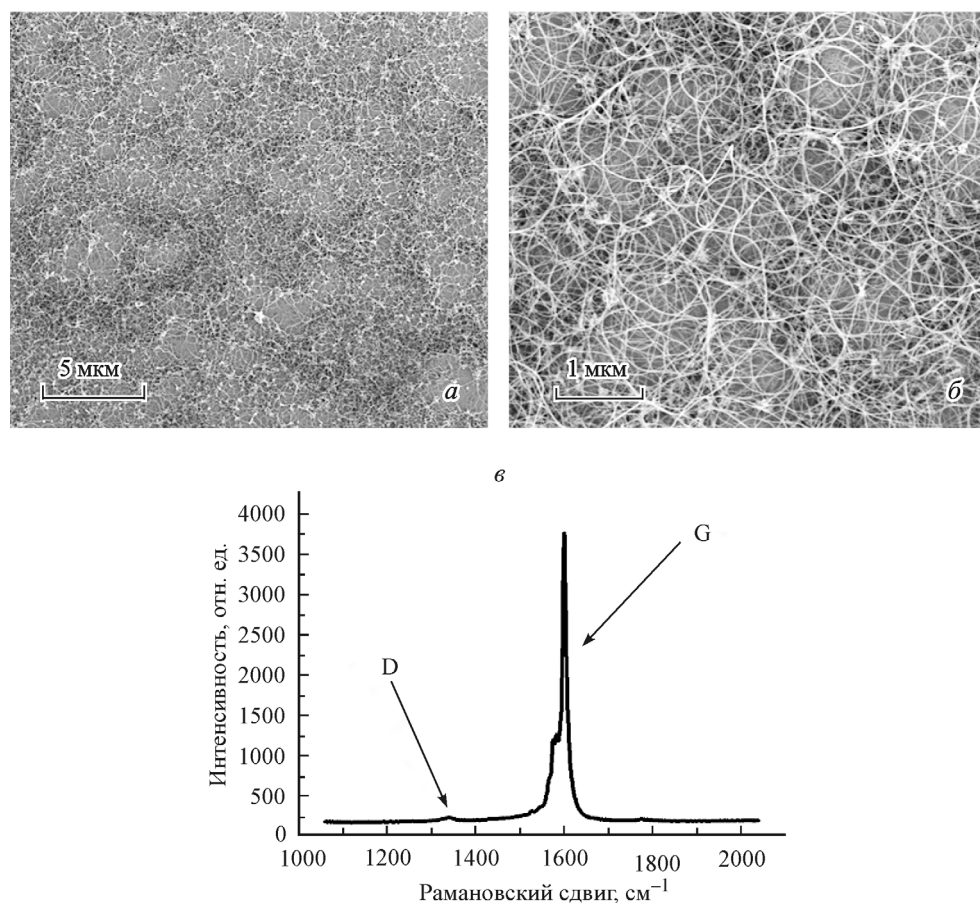


Рис. 1. Фотографии препаратов тонких пленок углеродных нанотрубок (УНТ) на кварцевых стеклах при разном увеличении (*а, б*) и Рамановский спектр пленок УНТ (*в*).

а, б — сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

ду заменяли на DMEM, содержащую 2 % FBS. Дифференцировку индуцировали добавлением 50 нг/мл фактора роста нервов (NGF). Каждые 3 сут среду меняли и добавляли свежий NGF.

Для индукции прикрепления диссоциированные NSC мыши высевали на стекла с УНТ, покрытые L-полилизинном, коллагеном или без дополнительного покрытия, в ростовой среде, не содержащей факторов роста (EGF и bFGF) и ростовой бессывороточной добавки B27, но с добавлением 10 % FBS. Для исследования дифференцировочного потенциала NSC через 1 сут среду заменяли на аналогичную, но содержащую 1 % FBS, и добавляли факторы дифференцировки — NGF, BDNF и NT-3 (все в концентрации 50 нг/мл). Среду с факторами меняли каждые 2—3 сут в течение 12 сут.

Микроскопия. Эффективность прикрепления, роста и дифференцировки анализировали с помощью световой фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Nikon Diaphot, Япония). Клетки фотографировали прижизненно или после фиксации 4%-ным параформальдегидом с помощью цифровой камеры DXM 1200, совмещенной с микроскопом Opton IM35. Морфологию фиксированных параформальдегидом клеток PC12 на пленках УНТ исследовали с помощью СЭМ.

Иммуноцитохимия. Дифференцированные NSC фиксировали 4%-ным параформальдегидом, пермеабелизовывали 0.5%-ным сапонином, блокировали неспецифическое связывание 2%-ным бычьим сывороточным

альбумином, инкубировали с моноклональными антителами к специфическому маркеру нейронов бета-тубулину III в разведении 1 : 100 в течение 1 ч, отмывали, затем инкубировали с флуоресцентномеченными F(ab')₂-фрагментами к мышинным иммуноглобулинам (1 : 100, 30 мин), заключали в мовиол и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия). Для окрашивания клеток флуоресцентномеченными антителами к маркеру зрелых нейронов NeuN клетки предварительно пермеабелизовывали 0.2%-ным Тритоном X-100. Антитела использовали в разведении 1 : 100.

Результаты

Анализ полученных УНТ. Пленки УНТ исследовали с помощью СЭМ, а также с помощью КРС (Рамановской спектроскопии). На рис. 1, *а, б* представлены электронные фотографии типичной пленки УНТ при разном увеличении. УНТ образуют плотную проводящую сетку на поверхности кварца. Длина индивидуальных трубок в сетке достигает 50 мкм. Анализ Рамановских спектров (рис. 1, *в*) показывает, что пленки образованы преимущественно однослойными нанотрубками с низким количеством дефектов, о чем свидетельствуют расщепление узкого пика G на G⁺ и G⁻ и практическое отсутствие пика D. Средний диаметр УНТ составлял 1—2.5 нм. Удельное сопротивление синтезированных пленок, изме-

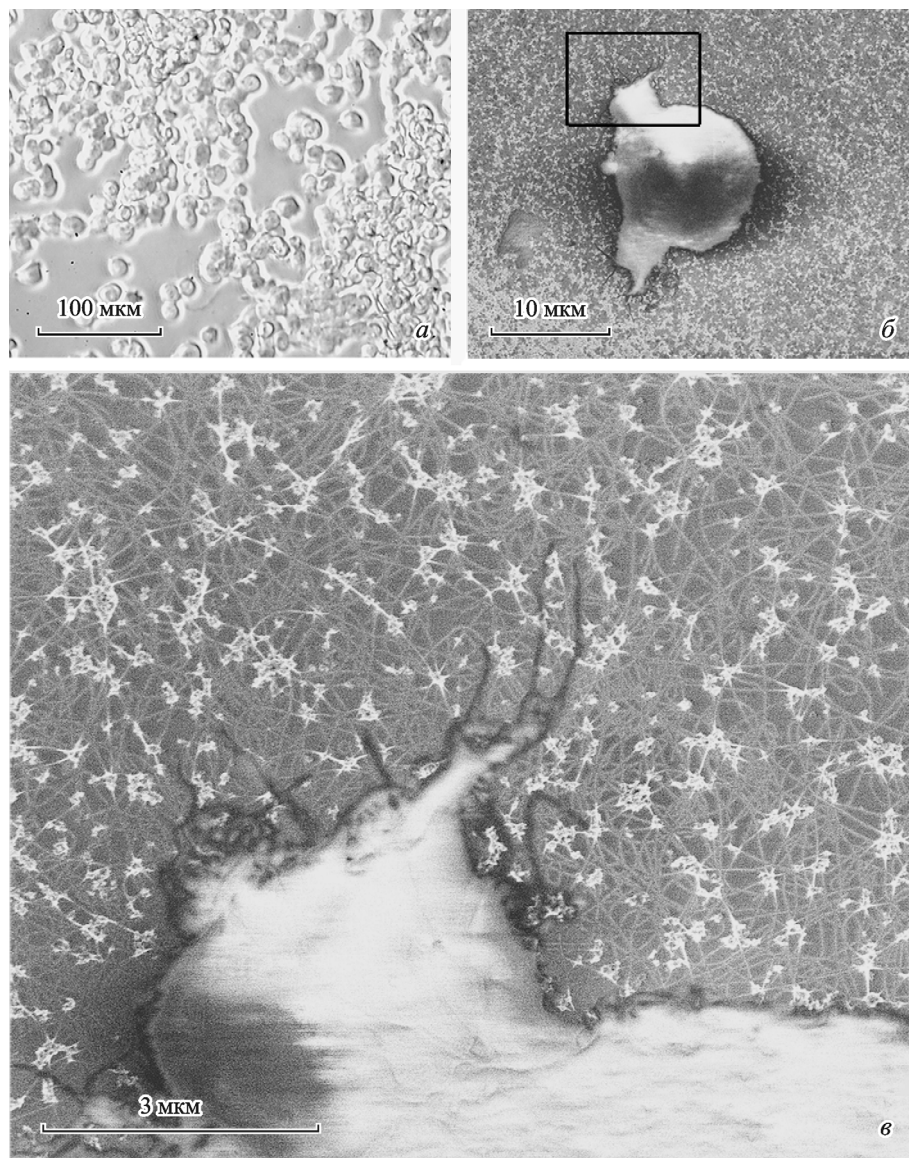


Рис. 2. Морфология клеток линии PC12 на пленках УНТ.

a — прижизненная микрофотография клеток (фазовый контраст); *b* — СЭМ; *в* — фрагмент фото *b* при большем увеличении; видно, что микрошпицы ориентированы вдоль нанотрубок. Масштабные отрезки — 100 (*a*), 10 (*b*), 3 (*в*) мкм.

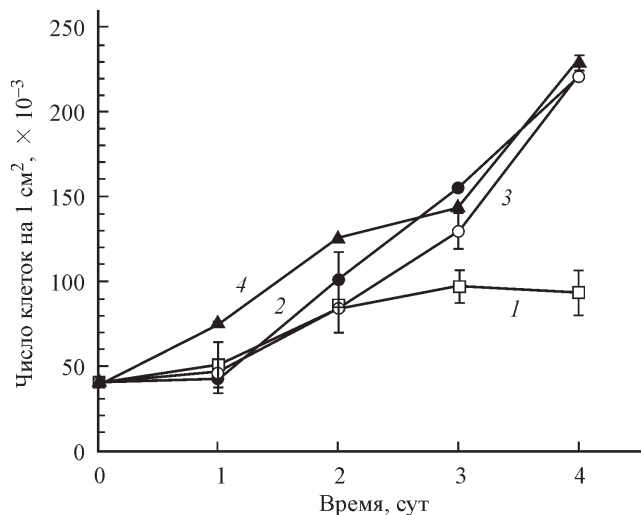


Рис. 3. Динамика изменения числа клеток PC12 при их культивировании на различных подложках: на кварцевых стеклах без покрытия (1), кварцевых стеклах, покрытых пленками УНТ (2), кварцевых стеклах, покрытых пленками УНТ и L-полилизинном (3), и пластиковой поверхности культурального планшета (4).

Вертикальные отрезки — стандартная ошибка среднего.

ренное четырехзондовым методом Ван-дер-Пау, достигало 1 кОм, что свидетельствует о том, что синтезированное покрытие является проводящим, т. е. позволяет регистрировать сигнал от клеток (например, изменение синаптической активности) или стимулировать клетки с помощью электрических импульсов.

Анализ роста клеток PC12 на пленках УНТ. На рис. 2, а представлена прижизненная микрофотография клеток линии PC12, растущих на кварцевых стеклах с пленками УНТ. Обнаружено, что клетки PC12 прикрепляются к кварцевым стеклам с пленками УНТ несколько медленнее, чем к пластиковой поверхности планшета. Обработка кварцевых пластин с УНТ раствором L-полилизина приводила к значительному ускорению адгезии клеток. Тем не менее в течение 24 ч во всех трех случаях 95—100 % клеток полностью сорбировались на подложке. Морфология клеток на пленках УНТ не отличалась от морфологии клеток, растущих на пластиковой поверхности планшета. В течение 7 сут культивирования клеток на пленках УНТ погибших клеток обнаружено не было.

Исследование динамики прироста роста клеток PC12 на пленках УНТ показало, что скорость роста клеток на УНТ-пленках сравнима со скоростью их роста на пластике стандартного культурального планшета. Кривые роста представлены на рис. 3. В таблице приведены данные по

Пролиферация клеток линии PC12, культивируемых на разных подложках

Подложка	Время удвоения, ч
УНТ	31.4 ± 3.2
УНТ + L-полилизин	33.1 ± 4.1
Полистирольный планшет	43.5 ± 4.8

зависимости времени удвоения популяции от характера подложки. Обнаружено, что время удвоения клеток PC12, культивируемых на пленках УНТ, меньше (более чем на 10 ч).

Нейрональная дифференцировка клеток на пленках УНТ. Эффективность нейрональной дифференцировки клеток PC12, культивируемых на пленках УНТ (рис. 4), была сравнима с эффективностью дифференцировки этих клеток на пластиковой поверхности планшетов для культивирования, покрытых L-полилизин. Дополнительное покрытие L-полилизином стекол с пленками УНТ не влияло на эффективность дифференцировки.

Характер прикрепления и роста NSC мыши на УНТ не зависел от присутствия дополнительного покрытия основы коллагеном. Покрытие как пластин с УНТ, так и покровных стекол L-полилизин способствовало более

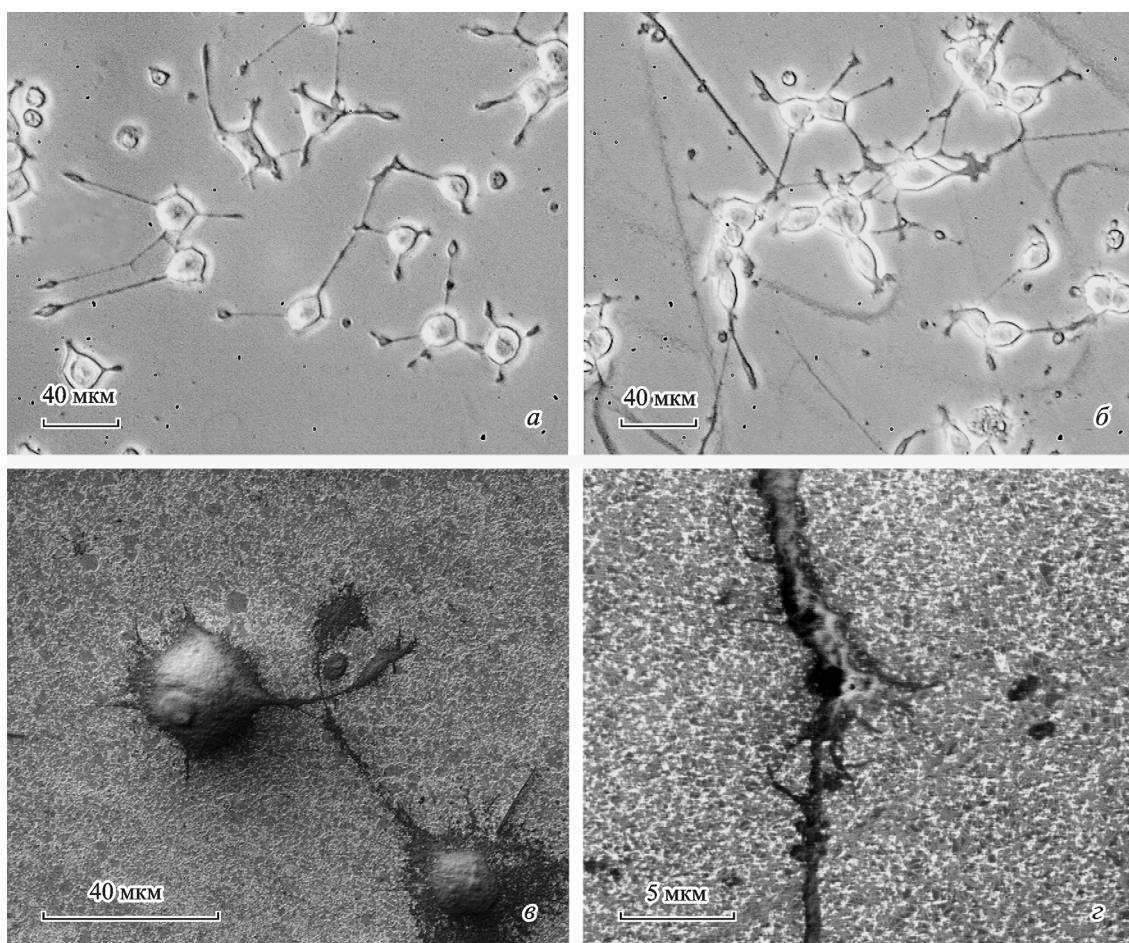


Рис. 4. Нейрональная дифференцировка клеток линии PC12 на пластике культурального планшета, покрытого L-полилизин (а), и на пленках УНТ (б—д).

а, б — прижизненная микрофотография клеток (фазовый контраст); в, д — СЭМ (д — фрагмент нейрита). Масштабные отрезки — 40 (а—в) и 5 (д) мкм.

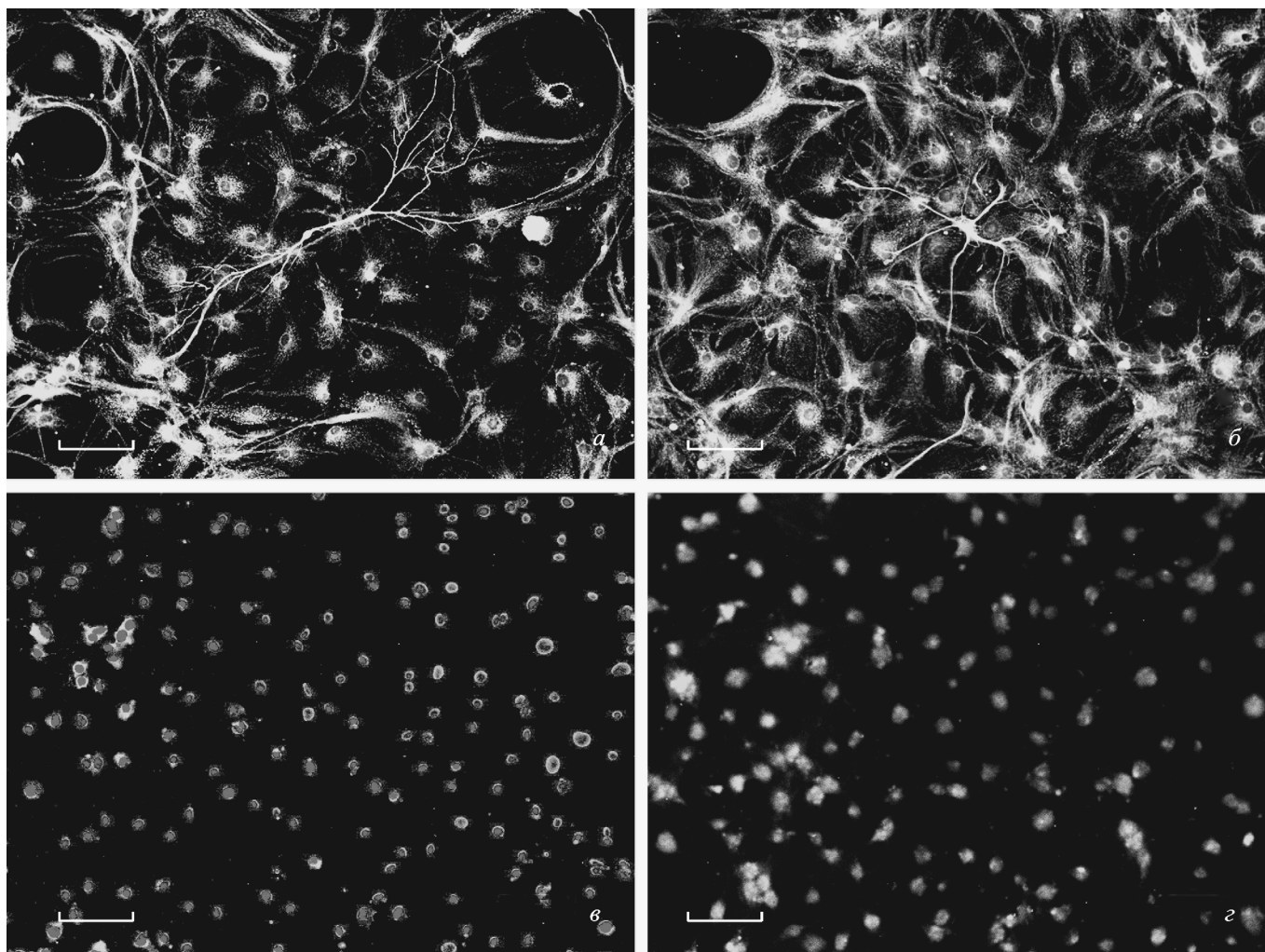


Рис. 5. Нейронная дифференцировка нейральных стволовых клеток мыши на кварцевых стеклах, покрытых пленками УНТ (*а, б*), в сравнении с дифференцировкой на покровных стеклах, покрытых коллагеном (*б, з*).

а, б — антитела к β -тубулину III; *в, з* — антитела к NeuN с одновременным окрашиванием ядер Hoechst 33342. Масштабные отрезки — 100 мкм.

быстрому и равномерному прикреплению NSC, но не влияло на рост и выживаемость клеток. NSC, так же как и клетки PC12, через 24 ч после посева были в прикрепленном состоянии вне зависимости от подложки. Добавление трех нейротрофинов (NGF, BDNF и NT-3) приводило к индукции нейронной дифференцировки NSC. Это выражалось в изменении морфологии клеток и экспрессии нейрон-специфичных антигенов — бета-тубулина III (рис. 5, *а, б*) и ядерного белка NeuN (рис. 5, *в, з*). Обнаружено, что эффективность дифференцировки NSC на пленках УНТ с коллагеновым покрытием практически не отличалась от дифференцировки этих клеток на покровных стеклах, покрытых коллагеном.

Обсуждение

Клетки феохромоцитомы крысы линии PC12 — классическая модель для исследования нейронной дифференцировки. Эту линию получили из опухоли хромаффинных клеток надпочечников (Greene, Tischler, 1976), которые в эмбриогенезе происходят из нервного гребня, дающего начало различным отделам центральной и симпатической нервной системы. Клетки отличаются сфери-

ческой морфологией, слабо адгезивны и при пересеве не нуждаются в диссоциирующих агентах. Поэтому при работе с этой линией (особенно если исследуется их нейронная дифференцировка) часто используют подложки с покрытием, повышающим адгезию клеток, таким как L-или D-полилизин, коллаген или ламинин. Под действием индукторов нейронной дифференцировки (например, NGF) клетки PC12 приобретают нейроподобную морфологию и свойства симпатических нейронов, такие как экспрессия нейронных маркеров, секреция нейротрансмиттеров и формирование потенциал-чувствительных натриевых каналов (Fujita et al., 1989). Эти свойства делают линию клеток PC12 удобной моделью для разработки систем регистрации электрических импульсов. Поэтому УНТ, обладающие электропроводностью, могут оказаться перспективным материалом для изучения электрофизиологии нервных клеток.

В исследованиях, проводимых с использованием клеток PC12, важную роль играет качество подложки. Мы показали, что клетки линии PC12 успешно прикрепляются и пролиферируют на кварцевых пластинах, покрытых пленками УНТ (рис. 2). Обнаружено, что для прикрепления клеток PC12 к стеклам с пленками УНТ необходимо более длительное время, чем для прикрепления к пласти-

ковой поверхности стандартного полистиролового культурального планшета. Дополнительное покрытие кварцевых стекол с пленками УНТ поликатионом L-полилизинном значительно ускоряет процесс прикрепления клеток к подложке. Окрасивание трипановым синим не выявило погибших клеток на пленках УНТ. Окрасивание клеток ДНК-тропным флуоресцентным красителем Hoechst 33342 не выявило апоптотических ядер. Это позволяет заключить, что пленки УНТ, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, не оказывают на исследованные клетки цитотоксического действия. По данным из литературы, токсичность углеродных нанотрубок проявляется при их добавлении к культуре клеток в виде суспензии (Dong, Ma, 2015). Токсичность УНТ исследователи связывают со способностью УНТ проникать в клетки и повреждать их. Однако УНТ были успешно использованы в качестве компонентов матрицы для структурной поддержки клеток (Gabay et al., 2005; MacDonald et al., 2005). Показано, что такие подложки нетоксичны, обладают проводимостью и способствуют прикреплению и активации роста клеток как *in vitro*, так и *in vivo* (Lewitus et al., 2011), что совпадает с нашими результатами.

Исследование динамики роста клеток PC12 на пленках УНТ показало, что в отличие от контрольных кварцевых стекол (рис. 3) клетки активно пролиферируют на таких стеклах, покрытых пленками УНТ. При этом время удвоения популяции сокращается с 43.5 до 31.4 ч. Таким образом, показано, что пленки УНТ не только не ингибируют рост клеток линии PC12, но даже стимулируют их пролиферацию.

Это важно, так как до последнего времени в литературе встречаются противоречивые сообщения. Так, были обнаружены более высокая скорость пролиферации клеток нейробластомы мыши Neuro2a и формирование большего количества нейритов на УНТ, чем на подложке из SiO₂ (Beduer et al., 2012). Авторы обнаружили способность УНТ сорбировать белковые компоненты культуральной среды, как губка. Поэтому более высокая скорость пролиферации клеток на пленках УНТ может определяться более высокой концентрацией трофических факторов среды в поверхностном слое такой подложки. В то же время другие исследователи сообщают о том, что пленки УНТ ингибируют пролиферацию, снижают выживаемость и образование нейритов у клеток линии PC12, а также ингибируют пролиферацию остеобластов (Agarwal et al., 2010). По-видимому, для взаимодействия с клетками крайне важна степень очистки УНТ-покрытия от примеси катализатора, в частности от ионов железа, поскольку показано, что именно такие примеси, а не пленки УНТ токсичны для клеток линии PC12 (Meng et al., 2013).

Анализ нейрональной дифференцировки клеток PC12, индуцируемой добавлением фактора роста нервов, показал, что пленки УНТ не оказывают негативного влияния на этот процесс. Дополнительное покрытие стекол с пленками УНТ L-полилизинном не влияет на эффективность нейрональной дифференцировки. Аналогичные данные были получены и при индукции дифференцировки нейральных стволовых клеток мыши (рис. 5).

В настоящее время крайне важным является изучение влияния последствий токсических воздействий на NSC для нейронов, которые дифференцируются из таких NSC. Полученные нами данные свидетельствуют о возможности получать и изучать нейроны с помощью дифференцировки NSC с использованием коктейля ней-

ротрофинов. Дифференцированные на УНТ клетки экспрессировали специфические маркеры нейронов β-тубулин III и ядерный антиген NeuN — маркер зрелых нейронов (рис. 5).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования однослойных углеродных нанотрубок, полученных путем химического осаждения из газовой фазы, в качестве электропроводящей подложки для исследования клеток нейронального происхождения и, возможно, зрелых нейронов.

Список литературы

Бобринецкий И. И., Морозов Р. А., Селезнев А. С., Подчерняева Р. Я., Лопатина О. А. 2012. Исследования пролиферативной активности и жизнеспособности клеток фибробласта и глиобластомы на различных типах углеродных нанотрубок. Бюл. эксперим. биол. мед. 153 (2) : 227—232. (Bobrinetskii I. I., Morozov R. A., Seleznev A. S., Podchernyaeva R. Ya., Lopatina O. A. 2012. Proliferative activity and viability of fibroblast and glioblastoma cell on various types of carbon nanotubes. Bull. Exp. Biol. Med. 153 (2) : 259—262.)

Бобринецкий И. И., Селезнев А. С., Гайдученко И. А., Федоров Г. Е., Домантовский А. Г., Пресняков М. Ю., Подчерняева Р. Я., Михайлова Г. Р., Суетина И. А. 2013. Исследование взаимодействия нервных клеток с сетками углеродных нанотрубок, полученными при химическом осаждении из газовой фазы. Биофизика. 58 (3) : 524—530. (Bobrinetskii I. I., Seleznev A. S., Gayduchenko I. A., Fedorov G. E., Domantovskiy A. G., Presnyakov M. Y., Podchernyaeva R. Y., Mikhailova G. R., Suetina I. A. 2013. The interaction between nerve cells and carbon nanotube networks made by CVD process investigation. Biophysics. 58 (3) : 409—414.)

Agarwal S., Zhou X., Ye F., He Q., Chen G. C., Soo J., Boey F., Zhang H., Chen P. 2010. Interfacing live cells with nanocarbon substrates. Langmuir. 26 : 2244—2247.

Ageeva S. A., Bobrinetskii I. I., Nevolin V. K., Podgaetskii V. M., Selishchev S. V., Simunin M. M., Konov V. I., Savranskii V. V. 2009. Nanotube-based three-dimensional albumin composite obtained using continuous laser radiation. Semiconductors. 43 : 1714—1718.

Alarifi S., Ali D., Verma A., Almajhdi F. N., Al-Qahtani A. A. 2014. Single-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity and DNA damage via reactive oxygen species in human hepatocarcinoma cells. In Vitro Cell Develop. Biol. Anim. 50 : 714—722.

Beduer A., Seichepine F., Flahaut E., Loubinoux I., Vaysse L., Vieu C. 2012. Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells. Langmuir. 28 : 17 363—17 371.

Chao T. I., Xiang S., Chen C. S., Chin W. C., Nelson A. J., Wang C., Lu J. 2009. Carbon nanotubes promote neuron differentiation from human embryonic stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 384 : 426—430.

Dong J., Ma Q. 2015. Advances in mechanisms and signaling pathways of carbon nanotube toxicity. Nanotoxicology. 9 : 658—676.

Dvir T., Timko B. P., Kohane D. S., Langer R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. Nat. Nanotechnol. 6 : 13—22.

Fabbro A., Cellot G., Prato M., Ballerini L. 2011. Interfacing neurons with carbon nanotubes: (re)engineering neuronal signaling. Prog. Brain Res. 194 : 241—252.

Fujita K., Lazarovici P., Guroff G. 1989. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. Environ Health Perspect. 80 : 127—142.

Gabay T., Jakobs E., Ben-Jacob E., Hanein Y. 2005. Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters. Physica. A. 350 : 611—621.

Greene L. A., Tischler A. S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which

respond to nerve growth factor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73 : 2424—2428.

Jan E., Kotov N. A. 2007. Successful differentiation of mouse neural stem cells on layer-by-layer assembled single-walled carbon nanotube composite. Nano Lett. 7 : 1123—1128.

Lamura G., Andreone A., Yang Y., Barbara P., Vigolo B., Hérold C., Mareché J. F., Lagrange P., Cazayous M., Sacuto A., Passacantando M., Bussolotti F., Nardone M. 2007. High-crystalline single- and double-walled carbon nanotube mats grown by chemical vapor deposition. J. Phys. Chem. C. 111 : 15 154—15 159.

Lewitus D. Y., Landers J., Branch J., Smith K. L., Callegari G., Kohn J., Neimark A. V. 2011. Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering. Adv. Funct. Mater. 21 : 2624—2632.

MacDonald R. A., Laurenzi B. F., Viswanathan G., Ajayan P. M., Stegemann J. P. 2005. Collagen—carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. J. Biomed. Mater. Res. 74A : 489—496.

Matsumoto K., Sato C., Naka Y., Kitazawa A., Whitby R. L., Shimizu N. 2007. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. J. Biosci. Bioeng. 103 : 216—220.

Meng L., Jiang A., Chen R., Li C. Z., Wang L., Qu Y., Wang P., Zhao Y., Chen C. 2013. Inhibitory effects of multiwall carbon nanotubes with high iron impurity on viability and neuronal differentiation in cultured PC12 cells. Toxicology. 313 : 49—58.

Olakowska E., Woszczycka-Korczynska I., Jedrzejowska-Szy-pulka H., Lewin-Kowalik J. 2010. Application of nanotubes and nanofibres in nerve repair. A review. Folia Neuropathol. 48 : 231—237.

Ramon-Azcon J., Ahadian S., Obregon R., Shiku H., Ramalingam M., Matsue T. 2014. Applications of carbon nanotubes in stem cell research. J. Biomed. Nanotechnol. 10 : 2539—2561.

Voge C. M., Stegemann J. P. 2011. Carbon nanotubes in neural interfacing applications. J. Neural. Eng. 8 : 011001. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/1741-2560/8/1/011001>.

Veetil J. V., Ye K. 2009. Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications. Biotechnol. Prog. 25 : 709—721.

Wang J., Sun P., Bao Y., Liu J., An L. 2011. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. Toxicol. In Vitro. 25 : 242—250.

Yang Z., Zhang Y., Yang Y., Sun L., Han D., Li H., Wang C. 2010. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. Nanomed. 6 : 427—441.

Yuen F. L., Zak G., Waldman S. D., Docoslis A. 2008. Morphology of fibroblasts grown on substrates formed by dielectrophoretically aligned carbon nanotubes. Cytotechnology. 56 : 9—17.

Поступила 27 X 2015

NEURONAL DIFFERENTIATION OF PC12 CELL LINE AND MURINE NEURAL STEM CELLS ON THE CARBON NANOTUBES FILMS

G. A. Posypanova,¹ A. I. Gaiduchenko, E. Yu. Moskaleva, G. E. Fedorov

National research centre «Kurchatov Institute», Moscow, 123098;

¹ e-mail: galinapo@gmail.com

The study of the interaction of nerve cells with specially designed substrates (scaffolds) with different surface characteristics at the nanoscale is a necessary step in the development of methods of stimulation of regeneration of nervous tissues, as well as to create next generation of bioelectronic devices. A promising material for such scaffolds may be carbon nanotubes (CNT) that are flexible films of graphene rolled into nano-sized cylindrical tubes. CNT were produced by chemical deposition from the gas phase. The analysis of the PC12 cells cultivated on quartz glass coated by carbon nanotubes films using electron and light microscopy has shown that CNT stimulate the proliferation and do not inhibit neuronal differentiation of PC12 cells. We have found that it is possible to obtain differentiated neurons from murine neural stem cells on the quartz glasses covered with CNT films. The data obtained indicate that the CNT films produced by chemical deposition from the gas phase onto quartz glass may be used as the electro conductive scaffold to obtain and study the functions of neural cells and possibly of mature neurons.

Key words: carbon nanotubes, cytotoxicity, PC12 cell line, neuronal differentiation, neural stem cells.