

06
Углеродные каркасные наноматериалы для стимуляции клеток нервных тканей

© Д.Т. Мурашко,¹ У.Е. Курилова,^{1,2} И.А. Суетина,³ Л.И. Руссу,³ А.В. Куксин,¹ М.В. Мезенцева,³ Е.П. Кицюк,⁴ А.Г. Марков,² Д.В. Телышев,^{1,2} А.Ю. Герасименко^{1,2}

¹ Институт биомедицинских систем, Национальный исследовательский университет „МИЭТ“, 124498 Москва, Зеленоград, Россия

² Институт бионических технологий и инжиниринга, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098 Москва, Россия

⁴ Научно производственный комплекс „Технологический центр“, 124498 Москва, Россия
e-mail: gerasimenko@bms.zone

Поступило в Редакцию 1 ноября 2024 г.
В окончательной редакции 1 ноября 2024 г.
Принято к публикации 1 ноября 2024 г.

Представлена технология формирования углеродных каркасных наноматериалов для создания нейроинтерфейсов между электронными стимулирующими приборами и клетками нервной ткани. Наноматериалы сформированы методами спрей-осаждения и лазерного структурирования слоев из одностенных углеродных нанотрубок и восстановленного оксида графена. Излучение первой гармоники наносекундного иттербиевого волоконного лазера с длиной волны 1064 nm и мощностью 0.07 W обеспечило формирование электропроводящего каркаса из нанотрубок, восстановленного оксида графена и их гибридных структур, что было продемонстрировано с помощью растровой электронной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света. Показано, что лазерное воздействие обеспечило увеличение электропроводности от 1.2 до 3.5 раз (до 37.8 ± 1.2 mS для гибридных структур из одностенных углеродных нанотрубок и восстановленного оксида графена). Сформированы заданные топологии из углеродных каркасных наноматериалов для их использования в качестве нейроинтерфейсов с генератором электрических импульсов на базе планшета для культивирования клеток. Электрическая стимуляция в процессе культивирования обеспечивает увеличение количества клеток. Получено увеличение количества клеток в 4.3 раза для фибробластов и в 2.9 раза для клеток нервной ткани, выращенных на углеродных каркасных наноматериалах, по сравнению с клетками, выращенными в обычных условиях. Сформированные углеродные каркасные наноматериалы перспективны для передачи электрических сигналов в устройствах для культивирования клеток и других имплантируемых приборах, в том числе нейроинтерфейсах.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, восстановленный оксид графена, биоэлектроника, нейроинтерфейсы, электростимуляция.

DOI: 10.61011/JTF.2025.02.59735.368-24

Введение

В настоящее время биоэлектроника является активно развивающейся областью науки. Принцип работы биоэлектронных устройств зачастую связан с передачей электрических сигналов биотканям от электронных схем через интерфейсы с различными топологиями на макро-, микро- и наноуровнях. При этом интерфейсы биоэлектронных устройств, взаимодействующие с биотканями, должны иметь высокую биосовместимость и передавать электронные импульсы с максимально высоким разрешением и отношением сигнал/шум. Биоэлектронные устройства, сопряженные с электропроводящими клетками, такими как нейроны или кардиомиоциты, могут записывать и/или стимулировать биоэлектриче-

скую активность в клетках или соответствующих тканях (например, мозге, сердце или мышцах) путем взаимного преобразования ионных и электронных токов на границе раздела устройство–клетка. В этом случае особый интерес представляют биоэлектронные интерфейсы для электрической стимуляции клеточной адгезии, выравнивания, пролиферации и дифференцировки, способствующие регенерации поврежденных тканей, таких как кожа, кости, нервы, ткани миокарда и другие.

Перспективными материалами для создания биоэлектронных интерфейсов, оказывающих стимулирующее воздействие на рост клеток, являются углеродные наноматериалы за счет сочетания их физических и биологических свойств. Углеродные нанотрубки и графен способны демонстрировать высокую механическую

прочность и стабильность за счет sp^2 -гибридизованной структуры при высоком аспектном соотношении размеров, что влияет на гибкость протяженных структур. При этом углеродные наноматериалы обладают высокой тепло- и электропроводностью, а их размеры и структура сопоставимы с размерами и структурой основных белков внеклеточного матрикса [1]. При этом с помощью внешних воздействий электрическим полем, электронным пучком или плазмой возможно создавать каркасные структуры с соединениями, которые характеризуются sp^3 -гибридизацией [2–5]. В результате внешних воздействий наблюдается тенденция к изгибу наноструктур, в том числе одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ). Изгиб графенового слоя нанотрубок приводит к образованию таких дефектов, как пяти- или семиугольники [6]. При положительной кривизне графенового слоя с sp^3 -гибридизацией образуются пятиугольные кольца, при отрицательной кривизне графенового слоя формируются семиугольные кольца. За счет внешнего воздействия возможно добиться управляемости структурными, механическими и электрофизическими свойствами.

Углеродные нанотрубки часто применяются в области создания устройств для регистрации потенциала поля и электростимуляции клеток благодаря высокой механической гибкости, высокой площади поверхности, хорошей передаче заряда и электрохимическим свойствам [7]. Для данных применений создаваемые электроды должны соответствовать ряду требований, а именно быть электропроводящими, иметь низкий импеданс, высокую емкость, а также быть биосовместимыми. При электростимуляции важно доставлять заряд таким образом, чтобы активировать потенциал действия без негативного воздействия на клетки. Известно о возможностях применения углеродных нанотрубок для создания биоэлектронных компонентов, применяемых для электрофизиологических сенсоров [8]. Для таких целей необходимо обеспечение определенного уровня чувствительности при измерении биосигналов, что способствует более точной диагностике заболеваний. По этой причине важно обеспечивать близкий и тесный контакт между биоэлектронным интерфейсом и биологической тканью соответствием структур обеих сторон.

Для создания биоэлектронных компонентов также возможно применение графена, поскольку этот двумерный материал обладает высокой подвижностью электронов при высокой площади поверхности [9]. С помощью графена обеспечивается уровень чувствительности биоэлектронных компонентов для измерения электрофизиологических свойств человека при долгосрочном мониторинге [10]. Применение лазерного облучения может обеспечить улучшение механических и электропроводящих свойств углеродных нанотрубок и оксида графена. Например, используя наносекундное лазерное воздействие, возможно создать электропроводящие сети из одностенных углеродных нанотрубок [11], обеспечивающие улучшение механических и электрических

свойств образцов. Также была показана возможность создания электропроводящих композитных наноструктур на основе восстановленного оксида графена и бычьего сывороточного альбумина при помощи фемтосекундного лазерного излучения [12]. Аналогичным образом при помощи лазерного излучения возможно создание электропроводящих композитных наноструктур на основе углеродных нанотрубок и восстановленного оксида графена [13]. Подобные устройства могут быть использованы как для стимулирующего воздействия для передачи электрических импульсов в клетки, так и для считывания сигналов с поверхности тканей.

Известно, что электрическая стимуляция улучшает дифференцировку и пролиферацию клеток. Ионные токи и электрические потенциалы внутри клеток влияют на функцию и развитие клеток и тканей. Нарушение или изменение ионных градиентов или поверхностных зарядов клеток с помощью приложенного электрического поля может привести к изменениям в клеточных сигнальных путях и экспрессии генов, что приводит к положительным изменениям в дифференцировке, пролиферации и подвижности клеток. Электрическая стимуляция клеток приводит к ускорению роста клеток, улучшению клеточной адгезии, усилению взаимодействия между клетками и повышению их жизнеспособности.

В настоящей работе рассмотрена технология изготовления образцов углеродных каркасных наноматериалов с использованием методов спрей-осаждения слоев и лазерного структурирования. Получены результаты исследований структуры и электропроводности образцов слоев наноматериалов. Исследована электрическая стимуляция клеток на образцах углеродных каркасных наноматериалов с использованием разработанной установки на основе культурального планшета для улучшения роста клеток соединительной и нервной тканей.

1. Материалы и методы исследований

1.1. Формирование углеродных каркасных наноматериалов для стимуляции роста клеток

Для формирования образцов углеродных каркасных наноматериалов, используемых в качестве интерфейсов для стимуляции клеток соединительной и нервной ткани, были использованы n -допированные 4.5 Ω -см, (100) ориентированные кремниевые 4-дюймовые пластины (Si-Mat, Ландсберг-на-Лехе, Германия), которые были нарезаны на прямоугольные пластины размером 10 \times 5 mm. Каталитическая пара Ti (10 nm) и Ni (2 nm) была осаждена на подложку, обработанную в растворе Piranha методом электронно-лучевого осаждения. Далее были сформированы гомогенные дисперсные среды, включавшие в состав ОУНТ (ООО „Универсальные добавки“, г. Новосибирск, Россия), восстановленный оксид графена (ВОГ) (ООО „Графенокс“, г. Черноголовка, Россия), а также гибридные структуры ОУНТ и ВОГ с

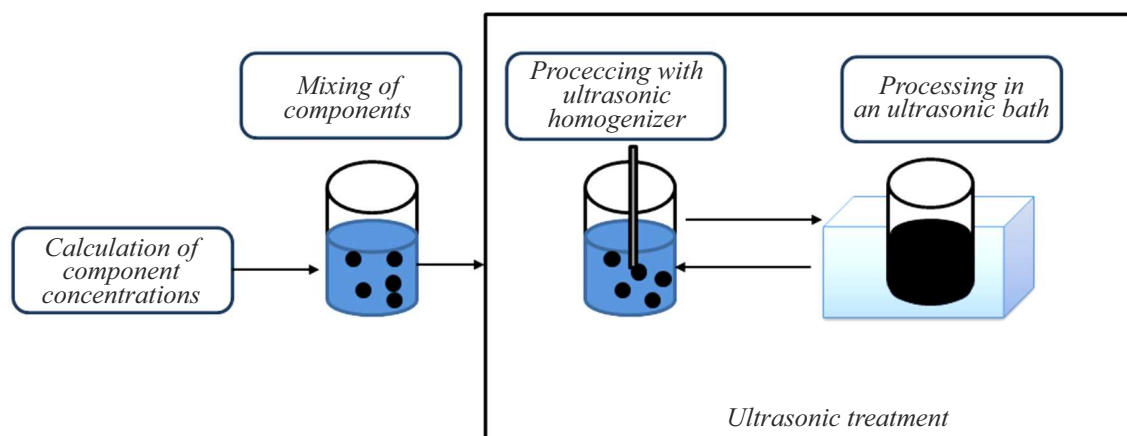


Рис. 1. Процесс формирования дисперсных сред с углеродными наноматериалами.

концентрациями компонентов 0.1 и 0.05/0.05 $\mu\text{g/ml}$ соответственно. Процесс формирования дисперсных сред представлен на рис. 1.

Данные дисперсные среды были послойно нанесены на поверхность подложек при помощи метода спрей-осаждения, реализованного с использованием дозирующей системы E2V (Nordson EFD, Westlake, OH, USA) с выходным соплом диаметром 0.5 mm. Давление для подачи дисперсной среды составляло 2 bar. Образцы помещались на нагревательный столик с целью испарения жидкости при температуре 70°C. На каждую подложку было нанесено вплоть до 50 слоев дисперсной среды.

1.2. Лазерное формирование заданной топологии углеродных каркасных наноматериалов для стимуляции клеток нервной ткани

Для увеличения электрической проводимости было проведено структурирование нанесенных покрытий путем воздействия лазерного излучения. Также было выполнено формирование задаваемой формы топологии с целью изучения распределения клеток по поверхности образца. Лазерное формирование топологии проводилось при помощи импульсного иттербиевого волоконного лазера с длиной волны 1064 nm, длительностью импульса 100 ns, частотой 30 kHz и мощностью излучения в диапазоне 0.07–0.27 W. Указанные параметры устанавливались с использованием программного обеспечения для компьютера, подключенного к лазерной системе. Для перемещения лазерного луча в установке имеется гальванометрический сканер с двумя зеркалами. Точность позиционирования составляла $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$, а фокусировка излучения осуществлялась при помощи объектива с фокусным расстоянием 210 mm до диаметра 35 μm . Пространственный профиль линейно поляризованного излучения имел форму гауссова распределения. Для равномерного распределения излучения по

всей облучаемой области в установке предусмотрен датчик расстояния.

Лазерное формирование образцов выполнялось по траектории, специально задаваемой в программном обеспечении. Для структурирования образцов в программном обеспечении задавалась траектория движения в виде прямоугольника, однако для формирования образцов требуемой топологии траектория движения луча задавалась в форме буквы „Ш“. Обе этих фигуры были заполнены линиями, которые частично перекрывали друг друга. Это было сделано для того, чтобы частично компенсировать интенсивность лазерного излучения с гауссовым распределением. Скорость движения луча вдоль заданной траектории составляла 240 mm/s. Длина линий прохождения лазерных импульсов находилась в диапазоне 5–10 mm, сами линии находились параллельно друг другу с расстоянием между каждой 17 μm . Схематичное изображение процесса формирования топологии представлено на рис. 2.

Таким образом, исследование включало следующие группы образцов из слоев с заданной топологией на кремниевом чипе из: 1) ОУНТ; 2) ОУНТ, структурированных лазерным излучением; 3) ВОГ; 4) ВОГ, структурированного лазерным излучением; 5) гибридных структур ОУНТ и ВОГ; 6) гибридных структур ОУНТ и ВОГ, структурированных лазерным излучением. Для каждой из представленных групп было изготовлено четыре образца. В качестве контрольного образца выступала подложка из чистого кремния.

1.3. Растровая электронная микроскопия

Исследование структурных особенностей образцов на кремниевых пластинах проводилось при помощи растровой электронной микроскопии (РЭМ), с использованием микроскопа FEI Helios NanoLab 650 (FEI Ltd., Hillsboro, OR, USA). Ускоряющее напряжение составляло 5 kV, ток электронного зонда составлял 86 pA для образцов с ОУНТ, ВОГ и ОУНТ+ВОГ. Давление в вакуумной камере

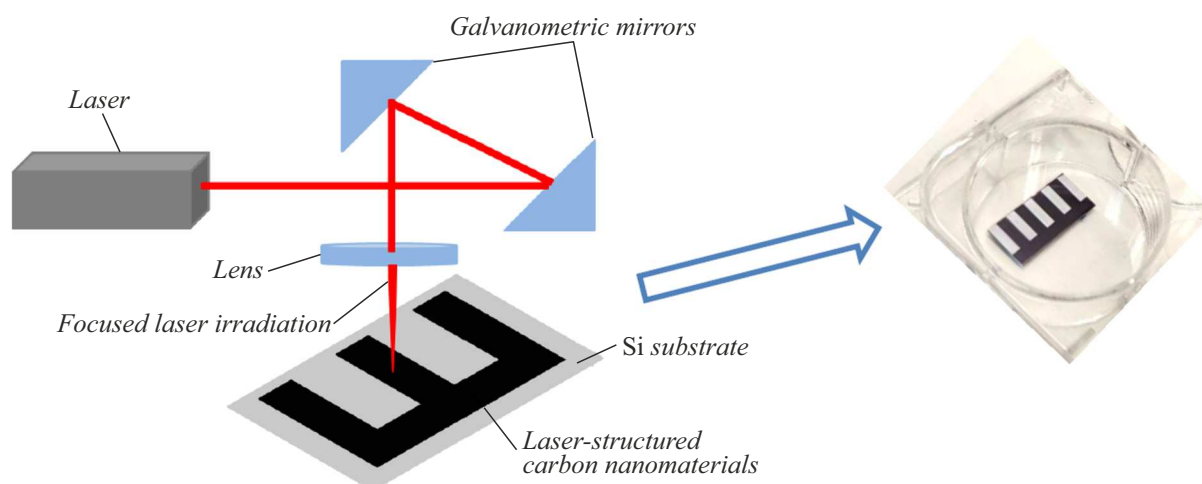


Рис. 2. Процесс формирования образцов на основе заданной топологии из углеродных наноматериалов.

ре составляло $7.04 \cdot 10^{-4}$ Pa. Образцы закреплялись на проводящей подложке при помощи углеродного скотча.

1.4. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектроскопия комбинационного рассеяния является эффективным методом обнаружения изменений в образцах на атомном уровне. Данный метод применительно к наноклеродным материалам позволяет сделать выводы об их чистоте, особенностях функционализации, а также о наличии и величине дефектов. Спектры комбинационного рассеяния углеродных каркасных наноматериалов для создания нейроинтерфейсов были получены с использованием спектрометра inVia Qontor (Renishaw plc, New Mills, UK) в геометрии обратного рассеяния. Для получения спектров использовалась решетка 1200 1/mm, в качестве источника возбуждения выступал полупроводниковый лазер с длиной волны 532 nm. Фокусировка лазерного луча на поверхности образца осуществлялась с помощью встроенного микроскопа с объективом $\times 50$. Измерения для каждого образца проводились в трех случайных точках, перед получением спектра поверхности образца выполнялась калибровка путем получения спектров чистого кремния.

1.5. Измерение электропроводности

Было получено сопротивление образцов при помощи метода четырехзондового измерения, с использованием измерительной установки (JG ST-2258C, Jingge Electronics Co., China). Для каждого из образцов была проведена серия измерений сопротивления, значения каждого из которых были пересчитаны в электропроводность (σ). После этого значения электропроводности были усреднены.

1.6. Электрическая стимуляция

Для проведения электрической стимуляции роста клеток была разработана экспериментальная установка. В качестве электродов использовались стерильные акупунктурные иглы, изготовленные из хирургической стали и покрытые золотым напылением. Диаметр электродов составлял 0.3 mm. Подобные иглы часто используются в медицинских приложениях. Материалы, используемые в их изготовлении, обладают высокой совместимостью с биотканями, а также способностью проводить электрический ток в достаточном количестве. Иглы электрода сгибались под углом 90° относительно макетной платы, к которой они были припаяны. Наконечник иглы, который примыкал к поверхности образца, был также согнут, образуя, таким образом, зацикленную форму. Данная форма была необходима для обеспечения мягкого и неповреждающего контакта между образцом и электродом. Другой конец электрода был припаян к макетной плате таким образом, чтобы обеспечить возможность пружинить при контакте с поверхностью образца. Каждая лунка культурального планшета содержала по два электрода (положительный и отрицательный), расстояние между которыми составляло 24 mm. В крышке культурального планшета были сформированы два отверстия диаметром 0.4 mm. Их расположение соответствовало положению электродов, проходящих через отверстия в пластине. Схематический внешний вид установки представлен на рис. 3.

Установка для электрической стимуляции включала в себя 6-луночный планшет, электроды, генератор импульсов, источник питания и соединительные элементы. В качестве источника питания выступала солевая марганцево-цинковая батарея типа „Крона (6F22)“ с номинальным напряжением в 9 V. Во время электростимуляции все элементы установки располагались в CO_2 инкубаторе. Инкубатор позволял обеспечить требуемые условия окружающей среды (т.е. температура 37°C и

содержание CO_2 в воздухе равное 5%) для жизнедеятельности клеток.

На основе МТТ-теста было выяснено, что оптимальные параметры генератора импульсов для электрической стимуляции роста клеток обеспечиваются при непрерывной последовательности импульсов с амплитудой $80 \mu\text{V}$. Частота импульсов при этом составляла 400 Hz, а их длительность 1.2 s [14].

1.7. Культивирование клеток

Для проведения экспериментов была использована клеточная линия фибробластов (ФЭЧ), полученная в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Клетки выращивались в модифицированной по методу Дульбекко среде (DMEM) — 90% культурального раствора, дополненного 10% телячьей сыворотки в 6-луночном планшете. Определение точного числа клеток, участвующих в эксперименте, проводилось непосредственно перед высаживанием культуральной смеси в лунки с образцами углеродных каркасных наноматериалов. Для определения точного числа клеток использовался автоматический счетчик клеток (Scepter Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Посадочная доза клеток ФЭЧ составила $2 \cdot 10^5$ cells/ml. Было добавлено по 2.5 ml клеток в 6-луночный планшет. Далее клетки инкубировались в термостате в течение 24 h при температуре 37°C и содержанием CO_2 в воздухе, равным 5%.

Также для исследований использовались клетки нервной ткани Neuro 2A, полученные в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, — клеточная линия глиобластомы мыши. Процедура подготовки клеток аналогична подготовке клеток ФЭЧ. Посадочная доза клеток Neuro 2A составила $2.7 \cdot 10^5$ cells/ml, в каждую лунку было добавлено по 2.5 ml клеток.

Образцы для клеточных исследований подготавливались в стерильных условиях. После изготовления образцы облучались в бактерицидной камере под ультрафиолетовым излучением в течение 20 min. Непосредственно перед проведением эксперимента образцы и электроды промывались клеточной средой с гентамицином ($25 \mu\text{l}$ на 50 ml среды). Для этого образцы помещались на

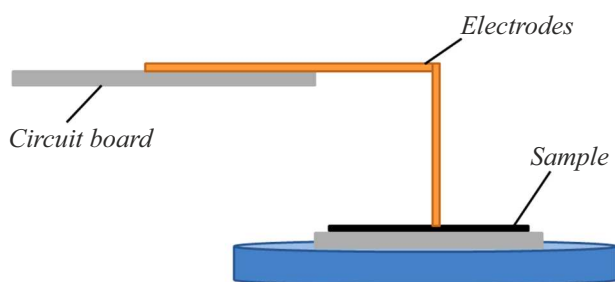


Рис. 3. Схематический внешний вид установки для электро-стимуляции роста клеток.

дно лунок, после чего лунки с образцами заполнялись раствором высотой в несколько миллиметров. Раствор находился в лунках в течение нескольких минут, после чего извлекался. В конечном этапе лунки заполнялись раствором с клетками. Рост клеток на образцах продолжался 24 h без электростимуляции, далее подключался элемент питания и рост клеток продолжался в течение 48 h со стимуляцией.

1.8. Клеточная визуализация

Окрашивание живых клеток осуществлялось с использованием красителя Hoechst 33342 (Life Technologies, New York, New York, USA) в количестве $10 \mu\text{g/ml}$ для окрашивания тела и ядра клеток. Клетки с Hoechst 33342 инкубировали 15 min при 37°C . Визуализация проводилась непосредственно после завершения культивирования с использованием флуоресцентного микроскопа (Olympus BX43, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) и лазерного сканирующего микроскопа (Olympus FV3000, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) при помощи программного обеспечения FV31S-SW Viewer software (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). В каждом случае было получено три изображения. Чистая кремниевая пластина без образцов была исследована в качестве контрольного образца.

2. Эксперимент

Для анализа улучшения метаболизма клеток и их функциональности до и после электрической стимуляции роста клеток на топологиях на основе углеродных нанотрубок и графена до и после лазерного структурирования было проведено исследование структуры и электропроводности образцов. А также было проанализировано влияние лазерного структурирования и электрической стимуляции на пролиферацию клеток.

2.1. Морфология углеродных каркасных наноматериалов для стимуляции клеток нервной ткани

Наружный диаметр ОУНТ нанотрубок составлял $1.6 \pm 0.4 \text{ nm}$, а длина более $5 \mu\text{m}$. На рис. 4 представлен исходный внешний вид образцов ОУНТ, ВОГ и гибридных структур ОУНТ и ВОГ.

На данных изображениях видно, что полученная поверхность образца ОУНТ представляет собой неупорядоченно распределенные по поверхности подложки перекрывающихся друг друга связки из нанотрубок. Данные связки возможно наблюдать как в виде отдельно стоящих друг от друга нанотрубок, так и в виде связанных между собой жгутов толщиной не более 2–3 соединенных между собой нанотрубок. Размер наружного диаметра одной нанотрубки составляет $1.6 \pm 0.4 \text{ nm}$.

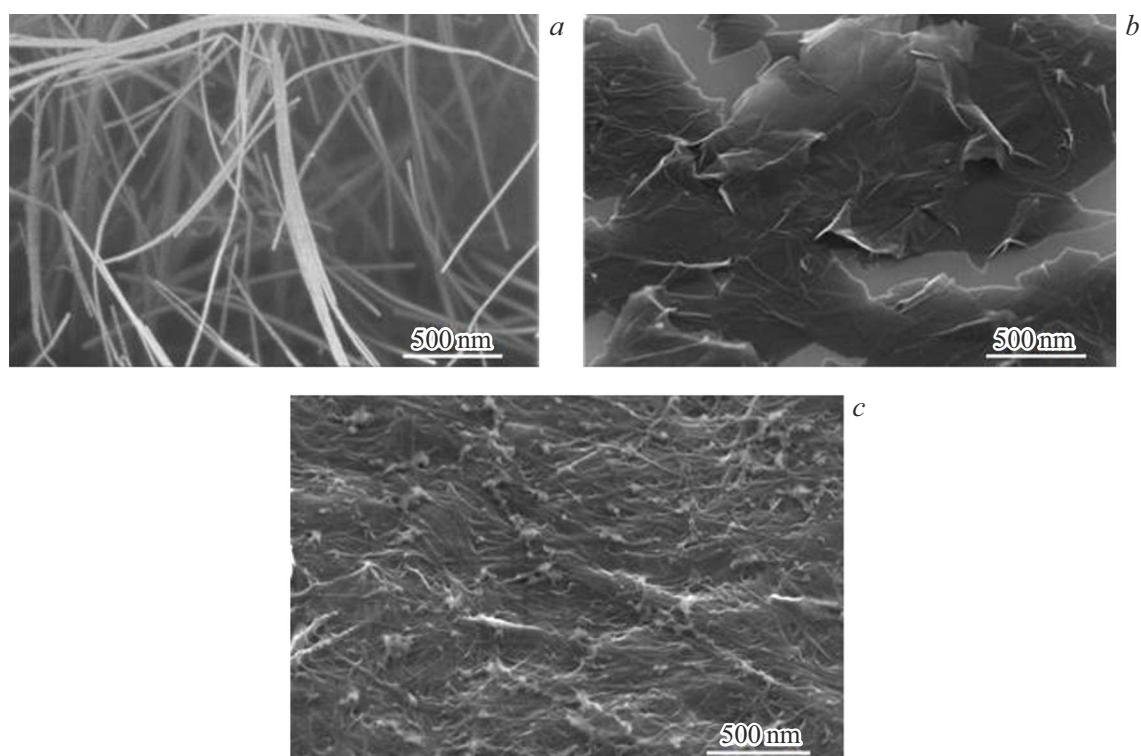


Рис. 4. Исходный внешний вид образцов: *a* — ОУНТ, *b* — ВОГ, *c* — гибридных структур ОУНТ и ВОГ.

Отдельно стоит отметить наличие послойного наложения наборов нанотрубок друг на друга, что соответствовало способу, при котором формировался образец (метод спрей-осаждения). В случае образца ВОГ можно увидеть неравномерное распределение частиц ВОГ по поверхности подложки, образующих таким образом многослойное покрытие. Сами частицы ВОГ представляли собой чешуйчатые листы неправильной формы длиной и шириной от 500 до 1000 нм. Изображения гибридных структур ОУНТ и ВОГ показали, что используемая дисперсная среда из ОУНТ+ВОГ образует плотное и равномерное покрытие на поверхности подложки. На изображениях видны множество наложенных друг на друга слоев из ОУНТ, а также видны частицы ВОГ.

Известно, что лазерное излучение обеспечивает образование ковалентных связей между углеродными нанотрубками [15]. Связи С–С образуются в наиболее облученных дефектных участках каркаса нанотрубки в результате слабой теплопроводности в данных областях. В результате образуются участки взаимосвязанных сетей, которые обеспечивают улучшение электропроводности по сравнению с исходными материалами на подложках. Также известно о возможности образования скаффолдов под действием лазерного излучения, как было продемонстрировано в случае образования скаффолдов на основе ОУНТ в матрице биополимера альбумина и хитозана [16,17]. Сформированные структуры обеспечивали высокую электрическую проводимость в самом биополимере [18,19]. В данном случае электри-

ческая проводимость имеет зависимость от морфологии используемых углеродных наноматериалов [20]. Проведено исследование морфологии каркасных материалов на основе углеродных нанотрубок и графена в зависимости от используемой мощности лазерного излучения.

Для формирования углеродных каркасных наноматериалов с целью стимуляции клеток нервной ткани было экспериментально установлено значение мощности, которое обеспечивает структурирование ОУНТ и ВОГ в областях дефектов нанотрубок, в результате чего происходит формирование каркасной структуры. Структурирование производилось при воздействии лазерного излучения с мощностью в диапазоне 0.07–0.27 W. Получено, что при более низких значениях мощности структурирование не происходило. Формирование связей между ОУНТ и ВОГ происходит в процессе воздействия лазерным излучением с мощностью ≥ 0.07 W, энергия излучения поглощается, что приводит к столкновению фононов с атомами углерода и образованию дефектов в атомном остове нанотрубок. Дефекты представляют собой вакантные области и междоузлия, образованные ввиду баллистического столкновения электронов с ядрами углерода [21], что приводит к разрыву связей С–С в структуре ОУНТ и ВОГ. Происходит формирование химических связей на контактной поверхности связанных ОУНТ и ВОГ. Это приводит к реконструкции поверхности графеновых слоев. В результате образуются соединения ОУНТ и ВОГ, что обеспечивает связь с образованием пар семи- и пятиугольников атомов

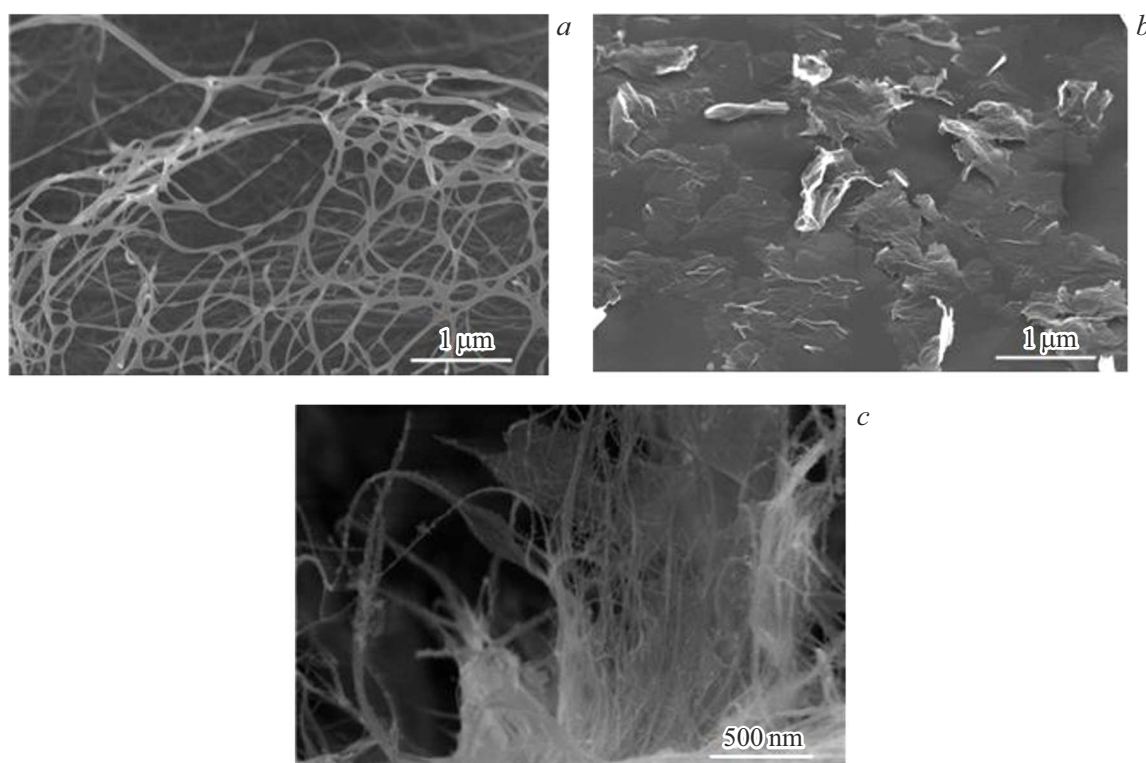


Рис. 5. Внешний вид образцов: *a* — ОУНТ, *b* — ВОГ, *c* — гибридных структур ОУНТ и ВОГ, обработанных лазерным излучением мощностью 0.07 W.

углерода [22]. На рис. 5 представлены изображения образцов ОУНТ, ВОГ и гибридных структур ОУНТ и ВОГ, полученные в результате воздействия лазерного излучения с мощностью 0.07 W.

В случае образца ОУНТ возможно заметить образование соединенных между собой сетей из углеродных нанотрубок, что возникает при воздействии лазерного излучения малой мощности. Представляется возможным также наблюдать, что каждая нанотрубка образует с другими от 2 до 4 взаимных соединений. Более того, образованные сети позволяют выстроить стоячие структуры, опирающиеся на нижние слои образца. В случае образца ВОГ на данных изображениях хорошо видно, что частицы ВОГ, подверженные воздействию лазерного излучения, имеют более светлые участки поверхности. При рассмотрении поверхности под углом было обнаружено, что частицы ВОГ со светлыми участками являлись областями, которые в результате лазерного воздействия приподнимались над поверхностью подложки, в то время как остальная часть частиц оказывалась более плотно прижатой к поверхности подложки или приваренной к ней. В случае образца гибридных структур ОУНТ и ВОГ видно, что в результате воздействия лазерного излучения были сформированы стоячие сложные древообразные структуры, включающие взаимные сети из ОУНТ и образующие мосты с частицами ВОГ. Высота стоячих структур составляла около 30 μm. Также можно заметить, что мостовые соединения из

ОУНТ покрывают большую часть поверхности частиц ВОГ. При этом заметно, что частицы ВОГ полностью приподняты над поверхностью и опираются на мостовые опоры из ОУНТ.

С увеличением мощности лазерного излучения можно было увидеть, что происходит разрушение образцов, что в итоге привело к уменьшению электропроводности. На рис. 6 представлены изображения образцов ОУНТ, ВОГ и гибридных структур ОУНТ и ВОГ, полученные в результате воздействия лазерного излучения с мощностью 0.14 W.

Так, в случае образца ОУНТ видно, что с увеличением мощности лазерного излучения до 0.14 W возможно обнаружить, что некоторые группы отдельно стоящих и сгруппированных в жгуты нанотрубок образуют скрученные структуры. Кроме того, наблюдается разрыв на некоторых участках взаимных соединений сетей нанотрубок. Возможным объяснением данного явления является высокая мощность используемого лазерного излучения, ввиду чего у нанотрубок с малым количеством взаимных соединений возникло разрушение части структуры. В случае образца ВОГ при воздействии лазерного излучения с мощностью 0.14 W видно, что количество светлых участков, т.е. частиц ВОГ, приподнявшихся над поверхностью подложки, возросло. Однако вместе с этим возможно обнаружить, что происходило частичное разрушение частиц по краям и середине в результате воздействия мощного лазерного излучения. Вместе с

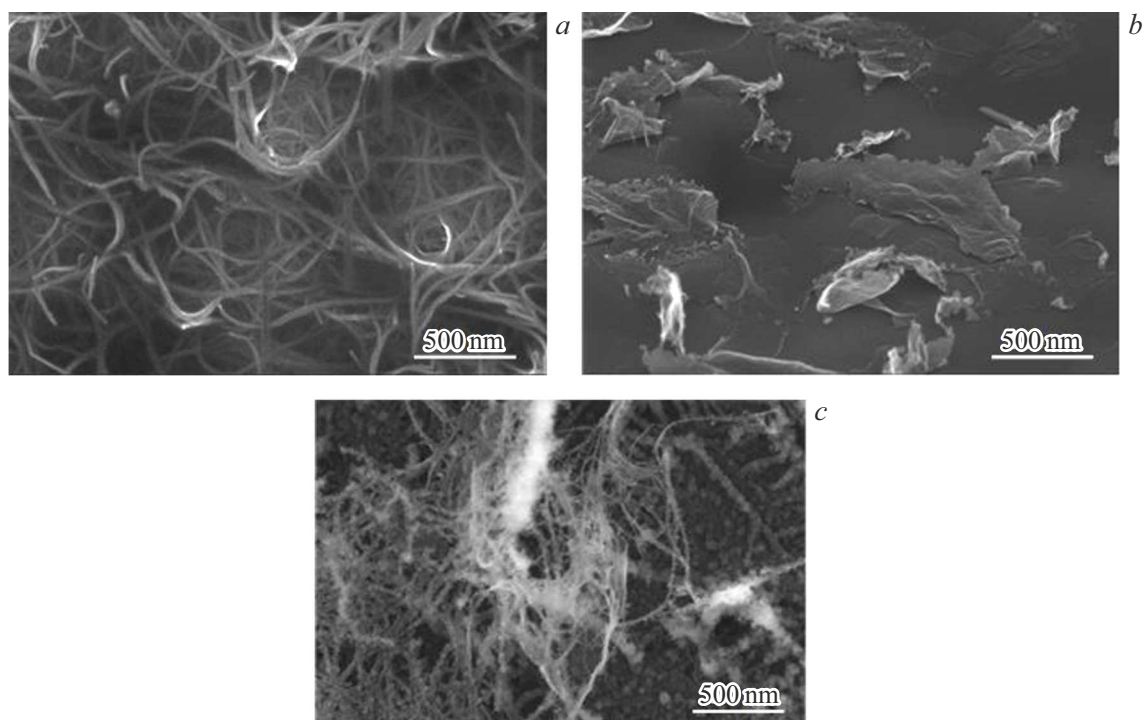


Рис. 6. Внешний вид образцов: *a* — ОУНТ, *b* — ВОГ, *c* — гибридных структур ОУНТ и ВОГ, обработанных лазерным излучением мощностью 0.14 W.

этим по краям частиц ВОГ можно увидеть образование сферических частиц, сваренных между собой, которые предположительно представляют собой аморфный углерод. Образец гибридных структур ОУНТ и ВОГ при воздействии лазерного излучения мощностью 0.14 W имеет заметно меньшее количество стоячих сложных древообразных структур, а также заметно образование аморфного углерода на их стенках. Также на данных изображениях видно, что нижние слои покрытия были частично удалены. Как и в случае образца ВОГ, возможно заметить частичное образование аморфного углерода на поверхности нанотрубок. Вместе с этим отсутствовали участки, в которых частицы ВОГ приподнимались при помощи мостовых опор из ОУНТ.

На рис. 7 представлены изображения образцов ОУНТ, ВОГ и гибридного состава ОУНТ и ВОГ, полученные в результате воздействия лазерного излучения с мощностью 0.27 W.

В случае воздействия лазерного излучения с мощностью 0.27 W на образце ОУНТ при общем осмотре поверхности видно значимое разрушение внешнего слоя поверхности. Более того, при увеличении изображения видны разрывы взаимных соединений сетей нанотрубок, а также обрывы краев нанотрубок. Подобные наблюдения позволяют сделать вывод о превышении данной мощности лазерного излучения порогового значения. При воздействии лазерного излучения 0.27 W на образец ВОГ, наблюдается заметно большее количество светлых участков, приподнятых над подложкой, однако вместе с

этим видно большее разрушение частиц ВОГ и образование аморфного углерода. При воздействии лазерного излучения с мощностью 0.27 W на изображениях выявлено отсутствие каких-либо сложных структур, образованных гибридным составом ОУНТ и ВОГ. Замечено небольшое количество взаимных соединений из ОУНТ при полном отсутствии связей с ВОГ. Обнаружено значительное количество аморфного углерода на поверхности нанотрубок, образованного воздействием лазерного излучения. Заметно, что часть нижних слоев образца была удалена.

2.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния было оценено влияние лазерного излучения на сформированные наноструктуры из ОУНТ, ВОГ и гибридов ОУНТ и ВОГ (рис. 8). На полученных спектрах можно выделить несколько областей интереса: колебательная мода RBM ($100\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), присутствующая только на спектре углеродных нанотрубок, при этом частота данной моды обратно пропорциональна диаметру нанотрубок; а также полоса *D* ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), возникающая из-за дефектов и нарушений в углеродной решетке и полоса *G* ($1580\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$), возникающая во всех углеродных материалах с sp^2 -гибридизацией и обусловленная растяжением связей C–C в гексагональной решетке. Отношение интенсивностей полос *D* и *G* широко используется в качестве косвенной оценки уровня дефектности углеродных наноматериалов, при

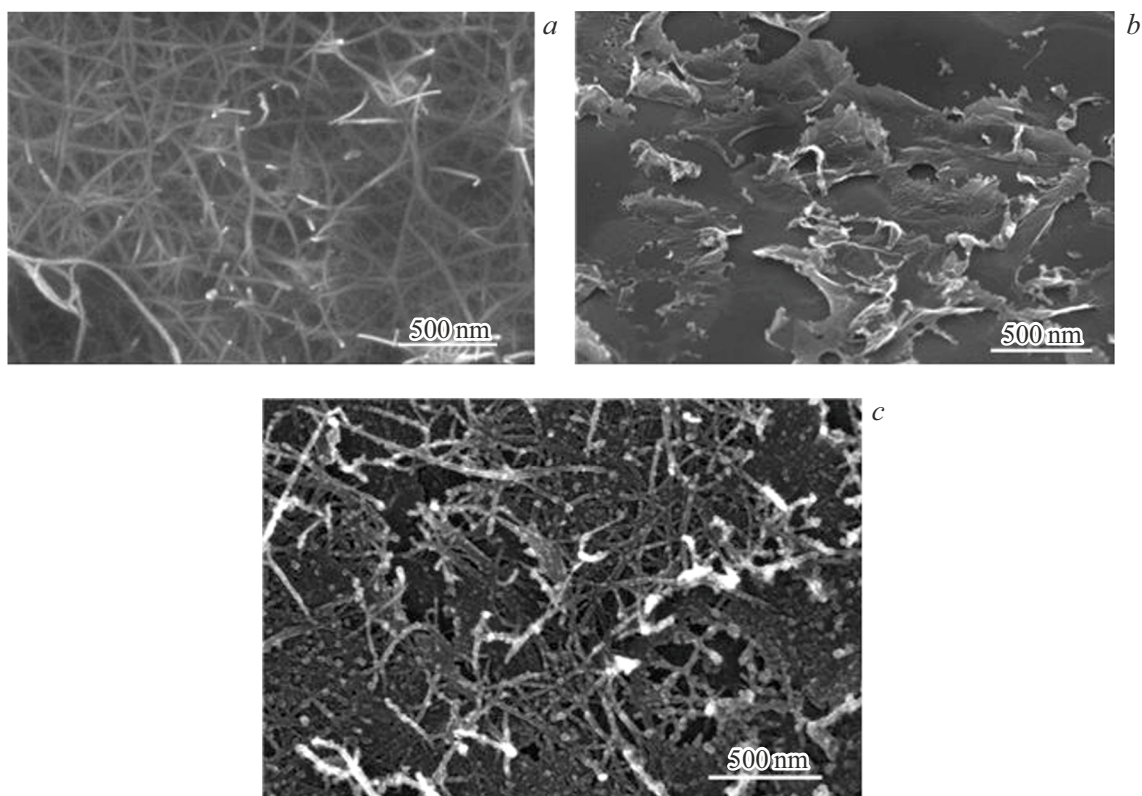


Рис. 7. Внешний вид образцов: *a* — ОУНТ, *b* — ВОГ, *c* — гибридного состава ОУНТ и ВОГ, обработанных лазерным излучением мощностью 0.27 W.

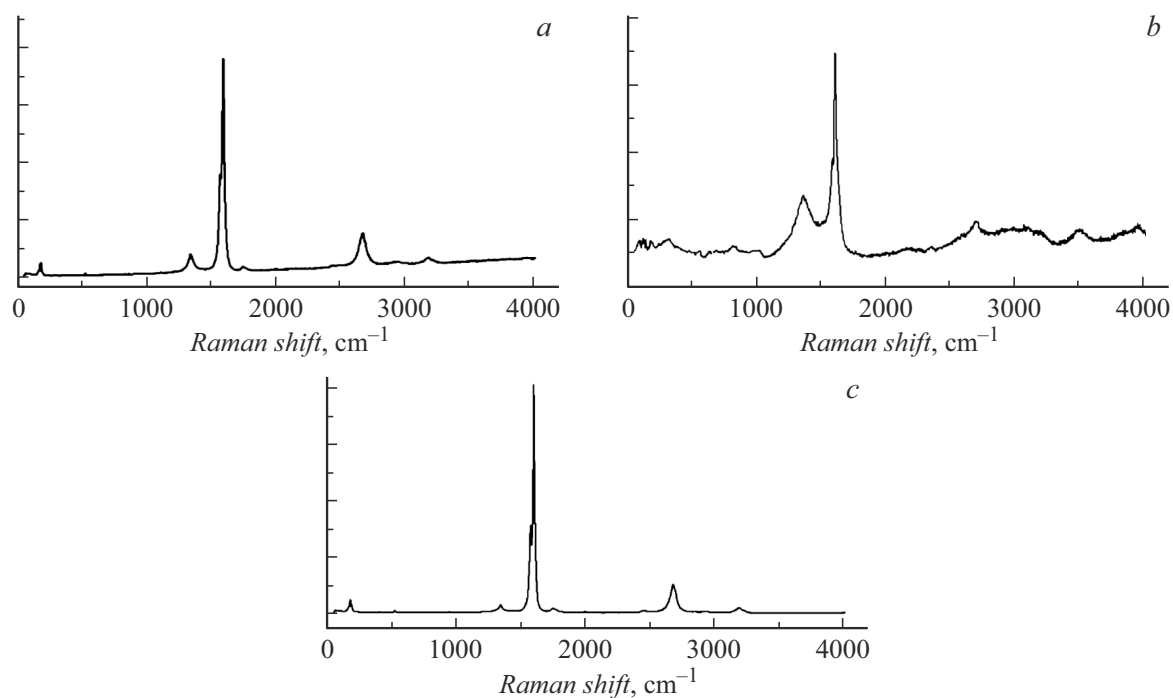


Рис. 8. Спектры комбинационного рассеяния образцов: *a* — ОУНТ, *b* — ВОГ, *c* — гибридный состав ОУНТ и ВОГ.

его увеличении наблюдается увеличение дефектности образцов и изменение их структуры.

В случае образцов на основе ОУНТ при увеличении плотности энергии лазерного излучения наблю-

далось постепенное увеличение дефектности, частоты характерных мод сдвигались в сторону значений для аморфного углерода. При этом колебательная мода RBM сохранилась при всех энергиях лазерного излучения, что свидетельствует о сохранении общих структурных особенностей ОУНТ и подтверждается данными РЭМ.

Повышение дефектности при повышении мощности лазерного воздействия наблюдалось и для гибридного состава ОУНТ и ВОГ. Однако в данном случае изменения происходили медленнее, что может объясняться расходом энергии лазерного излучения дополнительно на изменение положения графеновых чешуек и на образование связей между компонентами образца.

Для образцов ВОГ отношение интенсивностей полос D и G постепенно уменьшалось с увеличением плотности энергии лазерного излучения. Для данного типа образцов анализ затруднялся по причине случайности относительной укладки слоев графена, в результате чего дефектность затрагивала все основные характерные моды. Скорость изменения дефектности была значительно меньшей по сравнению с таковой для чистых нанотрубок, при этом ширина и интенсивность полос D и G также постепенно уменьшались. Вероятно, произошло приваривание чешуек графена к кремниевой подложке и последующее утончение графенового слоя.

2.3. Измерения электропроводности

В таблице представлены результаты измерения электропроводности образцов и углеродных каркасных наноматериалов в исходном виде и после лазерного излучения с заданной мощностью.

Обнаружено, что с изменением мощности воздействия лазерного излучения происходит изменение в электропроводности образцов. В то же время высокая электропроводность свидетельствует об эффективном формировании связанной каркасной структуры ОУНТ и ВОГ. Под влиянием лазерного излучения с мощностью 0.07 W, значения электропроводности для образцов ОУНТ, ВОГ и ОУНТ+ВОГ увеличивались в диапазоне от 1.2 до 3.5 раз и были равны 30.0 ± 0.8 mS, 15.4 ± 0.2 mS и 37.8 ± 1.2 mS соответственно. Увеличение мощности лазерного излучения приводило к уменьшению электропроводности до значений, близких к изначальным, в связи с чем формирование углеродных каркасных наноматериалов для стимуляции клеток биотканей выполнялось при мощности 0.07 W.

2.4. Клеточный рост на поверхности топологии

Были проведены исследования клеточного роста фибробластов на поверхности образцов в исходном виде и углеродных каркасных наноматериалов, которые были подвергнуты лазерному структурированию. Также проводились исследования с наличием и отсутствием электрической стимуляции роста клеток. Электрическая

стимуляция является известным методом, используемым для клеточного контроля в различных клеточных процессах таких как апоптоз, пролиферация, дифференцировка, миграция [23,24]. Данные процессы происходят за счет наличия клеточной трансмембранной разности потенциалов, которая регулируется за счет накопления ионов различной концентрации внутри и снаружи клетки. Концентрации ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ и Cl^- различаются внутри и снаружи клетки. Разность потенциалов контролируется при помощи ионных каналов и транспортеров. Концентрация ионов K^+ преобладает внутри клетки, в то время как концентрация Na^+ преобладает снаружи. Исследования Ходжкина и Хаксли показали, что из-за разной концентрации ионов K^+ по обе стороны мембраны возникает энергия, генерирующая напряжение на мембране. Из-за неравномерного распределения ионов натрия возникает активация реакции клетки, а также благодаря ионам натрия становится возможным активация потенциала действия клетки. Высокая концентрация ионов натрия с внешней стороны клетки уравнивается наличием отрицательно заряженных ионов хлора, а концентрация ионов калия уравнивается наличием отрицательно заряженных анионов, что приводит к электронейтральности внутри и снаружи клетки.

За перенос заряженных частиц через клеточную мембрану отвечают ионные каналы клетки. Данные каналы могут находиться как в закрытом, так и в открытом состояниях. Изменение состояния каналов обычно происходит за счет изменений в белках каналов, и определяется факторами, поступающими снаружи (экзогенные сигналы) и внутри (эндогенные сигналы) клетки. В большинстве случаев состояние каналов характеризуется случайным образом. Однако существуют сигналы, способствующие изменению (увеличению или уменьшению) проницаемости ионных каналов, а также способствующие изменению вероятности обнаружения структурной конфигурации белка, способствующей переходу между состояниями.

Потенциал покоя большинства клеток характеризуется отрицательным электрическим зарядом, вызванным более высокой концентрацией отрицательных ионов внутри клетки по сравнению с концентрацией отрицательных ионов вне клетки. Отрицательный потенциал покоя создает разность потенциалов на мембране, которая регулирует чувствительный к напряжению перенос ионов и синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях. Отрицательный заряд возникает частично из-за избытка отрицательных ионов внутри клетки (потенциал Доннана) и частично из-за ионизированных групп на мембране (поверхностный потенциал). Использование электрической стимуляции изменяет трансмембранный потенциал покоя клетки, что оказывает значительное влияние на функциональность клеток и клеточный метаболизм.

Результаты микроскопии клеток ФЭЧ на поверхности полученных образцов представлены на рис. 9.

Значения электропроводности образцов и углеродных каркасных наноматериалов в исходном виде и после лазерного излучения с заданной мощностью

Образцы	Мощность лазерного излучения, W			
	0	0.07	0.14	0.27
	Электропроводность, mS			
ОУНТ	12.07 ± 0.2	30.0 ± 0.8	15.8 ± 0.6	11.6 ± 0.6
ВОГ	12.2 ± 0.5	15.4 ± 0.2	12.6 ± 0.1	12.3 ± 0.2
Гибридные структуры ОУНТ и ВОГ	11.7 ± 0.2	37.8 ± 1.2	13.7 ± 0.1	11.8 ± 0.3

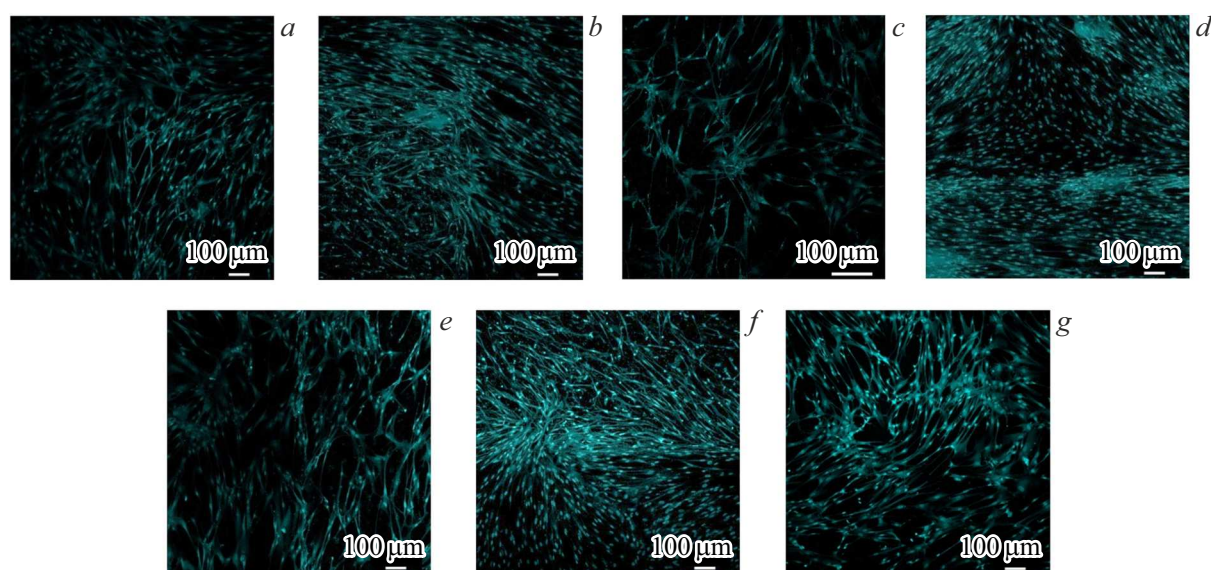


Рис. 9. Изображения, полученные после 72 h культивирования клеток ФЭЧ на образцах углеродных каркасных наноматериалов после лазерного структурирования: *a, b* — ОУНТ, *c, d* — ВОГ, *e, f* — гибридные структуры ОУНТ и ВОГ, *g* — контроль (чистый кремний); *a, c, e, g* — без стимуляции, *b, d, f* — с электрической стимуляцией.

На образцах хорошо просматриваются разные участки сформированных топологий. При этом клетки на образцах углеродных каркасных наноматериалов активнее распластаются в ширину в отличие от клеток на непроводящих участках, имеющих более утонченную форму. В данном случае можно говорить об улучшенной адгезии клеток к наноматериалам. Также на участках наноматериалов клетки преимущественно ориентированы в одном направлении. Клетки на слоях углеродных каркасных наноматериалов имеют морфологию, аналогичную морфологии клеток на контрольных образцах, что свидетельствует об отсутствии токсичности исследуемых материалов.

Микроскопические изображения клеток Neuro 2A представлены на рис. 10. Данные клетки не образуют монослой и более восприимчивы к условиям культивирования. На образцах после электростимуляции четко видно, что на участках с углеродными каркасными наноматериалами наблюдается более интенсивный

рост клеток, чем на непроводящих частях образцов, что говорит о возможности управления расположением клеток благодаря нанесению требуемой топологии и воздействию электрической стимуляции. Использование электрической стимуляции позволяет добиться роста клеток в меньших группах, что благоприятно для их равномерного распределения по поверхности. Наилучший рост клеток Neuro 2A зафиксирован на образцах ОУНТ. Количество клеток на экспериментальных образцах превышает данное значение для контрольного образца, при этом правильная морфология клеток на экспериментальных образцах сохранена, что указывает на нетоксичность исследованных образцов.

По полученным данным был произведен подсчет клеток на различных участках топологии для каждого из образцов. В графическом виде результаты представлены на рис. 11. В данном случае установлено повышение количества клеток при проведении электростимуляции вплоть до 2.6 раз. Наибольшее увеличение количества

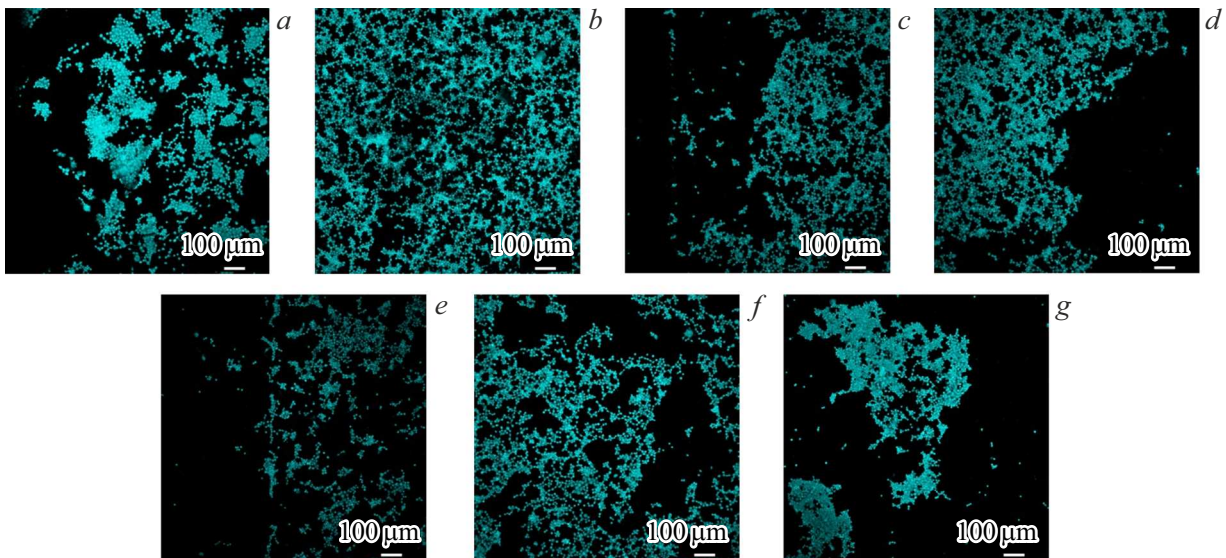


Рис. 10. Изображения, полученные после 72 h культивирования клеток Neuro 2A на образцах углеродных каркасных наноматериалов после лазерного структурирования: *a, b* — ОУНТ, *c, d* — ВОГ, *e, f* — гибридные структуры ОУНТ и ВОГ, *g* — контроль (чистый кремний); *a, c, e, g* — без стимуляции, *b, d, f* — электрическая стимуляция.

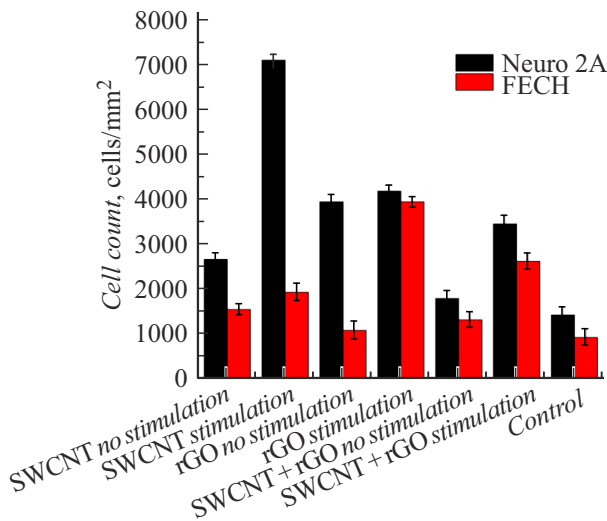


Рис. 11. Количество клеток на образцах углеродных каркасных наноматериалов для создания нейроинтерфейсов в сравнении с контрольным образцом спустя 72 h культивирования.

клеток Neuro 2A при стимуляции наблюдается для образцов ОУНТ и гибридных структур ОУНТ и ВОГ, что коррелирует с их более высокой электропроводностью по сравнению с образцами ВОГ.

Для клеток соединительной ткани, образующих монослой при культивировании, наибольшее увеличение количества клеток произошло при культивировании на образцах на основе восстановленного оксида графена. Можно сделать вывод, что чешуйчатая поверхность в данном случае вносит больший вклад в клеточный рост за счет улучшенной адгезии клеток к поверхности слоя на основе ВОГ. Получено увеличение количества клеток

в 4.3 раза для клеток ФЭЧ и 2.9 раз для Neuro 2A, чем в обычных условиях на контрольных образцах. Полученные результаты указывают на благоприятное воздействие полученных наноматериалов на пролиферацию клеток. Использование электрической стимуляции позволяет увеличить количество клеток различных типов и ориентировать их в необходимом направлении. Совокупное воздействие электропроводящего каркаса и электрической стимуляции показывает более высокие результаты для электропроводящих клеток, при этом для клеток соединительной ткани более активная пролиферация связана не только с электрической проводимостью, но и с более подходящей поверхностной структурой, благоприятной для адгезии клеток. Данные наноматериалы могут найти применение в областях, связанных с транспортом электрических импульсов в имплантируемых нейроинтерфейсах, а методы их обработки могут применяться для создания материалов для технологий микроэлектроники и систем обратной связи с целью диагностики и лечения болевых синдромов.

Заключение

Представлены результаты исследований углеродных каркасных наноматериалов, которые используются в качестве интерфейсов для стимуляции клеток соединительной и нервной тканей. Предложена технология формирования заданных топологий из каркасных наноматериалов с помощью метода спрей-осаждения слоев на основе ОУНТ, ВОГ, гибридных структур ОУНТ и ВОГ с последующим структурированием и сублимацией при воздействии лазерным излучением с различной мощностью. Установлено, что углеродные каркасные наномате-

риалы после лазерного структурирования с мощностью ≥ 0.07 W характеризуются формированием связей между ОУНТ и ВОГ и разветвленной структурой за счет фотон-фононного взаимодействия. Получено формирование сложных древообразных приподнятых структур ВОГ, включающих взаимные сети из ОУНТ, которые образуют мостовые соединения с чешуйками ВОГ. Такие каркасные наноматериалы обладают повышенной электропроводностью, особенно хорошо данный эффект проявляется для образцов, состоящих из гибридных структур ОУНТ и ВОГ. При лазерном структурировании излучением с мощностью 0.07 W, значения электропроводности для образцов ОУНТ, ВОГ и ОУНТ+ВОГ увеличивались в диапазоне от 1.2 до 3.5 раз и составили 30.0 ± 0.8 mS, 15.4 ± 0.2 mS и 37.8 ± 1.2 mS соответственно. Электропроводность каркасных наноматериалов не ниже значений для соединительных и нервных тканей является одним из ключевых требований к интерфейсам для стимулирующих устройств. Продемонстрирован положительный эффект влияния углеродных каркасных наноматериалов на рост клеток. При этом электрическая стимуляция в процессе культивирования обеспечивает увеличение количества клеток. Получено увеличение количества клеток в 4.3 раза для клеток ФЭЧ и 2.9 раз для Neuro 2A, чем в обычных условиях. Таким образом, исследования сформированных каркасных наноматериалов указывают на перспективность использования их в качестве нейроинтерфейсов для эффективной передачи электрических сигналов, устройств для культивирования клеток и других имплантируемых приборов.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках крупного научного проекта при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2024-555 от 25 апреля 2024 года.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] S.H. Ku, M. Lee, C.B. Park. *Adv. Healthcare Mater.*, **2**(2), 244 (2013). <https://doi.org/10.1002/adhm.201200307>
- [2] C. Satishkumar, P.J. Thomas, A. Govindaraj, C.N.R. Rao. *Appl. Phys. Lett.*, **77**, 2530 (2000). <https://doi.org/10.1063/1.1319185>
- [3] M. Terrones, F. Banhart, N. Grobert, J.C. Charlier, H. Terrones, P.M. Ajayan. *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 075505 (2002). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.89.075505>
- [4] J. Kim, G.G. Kim, S. Kim, W. Jung. *Appl. Phys. Lett.*, **108**, 203110 (2016). <https://doi.org/10.1063/1.4952397>
- [5] G. Ho, A. Wee, J. Lin. *Appl. Phys. Lett.*, **79**, 260 (2001). <https://doi.org/10.1063/1.1383279>
- [6] J. Han, M.P. Anantram, R.L. Jaffe, J. Kong, H. Dai. *Phys. Rev. B*, **57** (23), 14983 (1998). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.57.14983>
- [7] M. David-Pur, L. Bareket-Keren, G. Beit-Yaakov, D. Raz-Prag, Y. Hanein. *Biomed. Microdevices*, **16**, 43 (2014). DOI: 10.1007/s10544-013-9804-6
- [8] B.C. Kang, T.J. Ha. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **57** (5S), 05GD02 (2018). DOI: 10.7567/JJAP.57.05GD02
- [9] Y. Qiao, X. Li, T. Hirtz, G. Deng, Y. Wei, M. Li, S. Ji, Q. Wu, J. Jian, F. Wu, Y. Shen, H. Tian, Y. Yang, T.L. Ren. *Nanoscale*, **11** (41), 18923 (2019). DOI: 10.1039/C9NR05532K
- [10] Q.L. Zhao, Z.M. Wang, J.H. Chen, S.Q. Liu, Y.K. Wang, M.Y. Zhang, J.-J. Di, G.-P. He, L. Zhao, T.-T. Su, J. Zhang, X. Liang, W.-L. Song, Z.L. Hou. *Nanoscale*, **13** (24), 10798 (2021). DOI: 10.1039/D0NR08032B
- [11] A. Kuksin, D. Murashko, A. Gerasimenko. *Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB)*, IEEE, 250 (2022). DOI: 10.1109/CSGB56354.2022.9865613
- [12] N. Nekrasov, N. Yakunina, V. Nevolin, I. Bobrinetskiy, P. Vasilevsky, A.Y. Gerasimenko. *Biomimetics*, **6** (4), 66 (2021). DOI: 10.3390/biomimetics6040066
- [13] A.Y. Gerasimenko, A.V. Kuksin, Y.P. Shaman, E.P. Kitsyuk, Y.O. Fedorova, D.T. Murashko, A.A. Shamanaev, E.M. Eganova, A.V. Sysa, M.S. Savelyev, D.V. Telyshev, A.A. Pavlov, O.E. Glukhova. *Nanomaterials*, **12** (16), 2812 (2022). DOI: 10.3390/nano12162812
- [14] A.Yu. Gerasimenko, E. Kitsyuk, U.E. Kurilova, I.A. Suetina, L. Russu, M.V. Mezentseva, A. Markov, A.N. Narovlyansky, S. Kravchenko, S.V. Selishchev, O.E. Glukhova. *Polymers*, **14** (9), 1866 (2022). DOI: 10.3390/polym14091866
- [15] A.Y. Gerasimenko, A.V. Kuksin, Y.P. Shaman, E.P. Kitsyuk, Y.O. Fedorova, A.V. Sysa, A.A. Pavlov, O.E. Glukhova. *Nanomaterials*, **11**, 1875 (2021). DOI: 10.3390/NANO11081875
- [16] A.Y. Gerasimenko, G.N. Ten, D.I. Ryabkin, N.E. Shcherbakova, E.A. Morozova, L.P. Ichkitidze. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **227**, 117682 (2020). DOI: 10.1016/j.saa.2019.117682
- [17] M.S. Savelyev, A.Y. Gerasimenko, P.N. Vasilevsky, Y.O. Fedorova, T. Groth, G.N. Ten, D.V. Telyshev. *Anal. Biochem.*, **598**, 113710 (2020). DOI: 10.1016/J.AB.2020.113710
- [18] A.Y. Gerasimenko, U.E. Kurilova, M.S. Savelyev, D.T. Murashko, O.E. Glukhova. *Compos. Struct.*, **260**, 113517 (2021). DOI: 10.1016/j.compstruct.2020.113517
- [19] A.Y. Gerasimenko, U.E. Kurilova, I.A. Suetina, M.V. Mezentseva, A.V. Zubko, M.I. Sekacheva, O.E. Glukhova. *Appl. Sci.*, **11**, 8036 (2021). DOI: 10.3390/APP11178036
- [20] N.A. Demidenko, A.V. Kuksin, V.V. Molodykh, E.S. Pyankov, L.P. Ichkitidze, V.A. Zaborova, A.A. Tsymbal, S.A. Tkachenko, H. Shafaei, E. Diachkova, A.Yu. Gerasimenko. *Bioeng.*, **9**, 36 (2022). DOI: 10.3390/BIOENGINEERING9010036
- [21] Y. Yuan, J. Chen. *Laser Phys. Lett.*, **13** (2016). DOI: 10.1088/1612-2011/13/6/066001
- [22] L. Chico, V.H. Crespi, L.X. Benedict, S.G. Louie, M.L. Cohen. *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 971 (1996). DOI: 10.1103/PHYSREVLETT.76.971
- [23] M. Griffin, S.A. Iqbal, A. Sebastian, J. Colthurst, A. Bayat. *PLoS One*, **6**, e23404 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0023404
- [24] N. Matsuki, M. Takeda, T. Ishikawa, A. Kinjo, T. Hayasaka, Y. Imai, T. Yamaguchi. *Oncol. Rep.*, **23**, 1425 (2010). DOI: 10.3892/OR_00000780/HTML