

УДК 546.26.043

ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ЯК НОВІТНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ НЕЙРОІНЖЕНЕРІЇ

Д. М. РОТКО, С. В. ПРИЛУЦЬКА, К. І. БОГУЦЬКА, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: psvit@bigmir.net

Створення новітніх біосумісних структур для взаємодії з нервовою тканиною є важливою комплексною проблемою, яка не може бути вирішена із застосуванням традиційних технологій. Розв'язання її потребує використання останніх досягнень біотехнології.

В огляді узагальнено дані літератури щодо структури, хімічної функціоналізації, електричних та механічних властивостей вуглецевих нанотрубок, які уможливають їх практичне використання в нейроінженерії як ефективних субстратів для культивування нейронів, синтезу нейропротекторів та як блокаторів іонних каналів. Зокрема, показано, що одностінні вуглецеві нанотрубки індукують посилений ріст відростків нейронів; ріст нейронів на субстраті з багатостінних вуглецевих нанотрубок супроводжується зростанням міжмережевої активності; одностінні вуглецеві нанотрубки блокують калієві потенціалкеровані канали, стабілізуючи їх конформацію в інактивованому стані після індукування. Дія аміномодифікованих одностінних вуглецевих нанотрубок активує захисні функції нервової тканини щодо ішемічного ушкодження та зменшує ділянки інфаркту міокарда, спричиненого оклюзією середньої мозкової артерії у щурів.

Ключові слова: вуглецеві нанотрубки, функціоналізація, електричні та механічні властивості, вирощування нейронів, блокування іонних каналів, нейропротекторна дія.

У попередніх дослідженнях матеріалів для нейропротезування використовували головним чином досягнення мікрообробки кремнію та інших пов'язаних з електронікою речовин [1, 2]. Взаємодія матеріалів з нервовою тканиною ускладнюється необхідністю постійного контролю і регуляції поширення нервових сигналів. Електричні властивості та нанорозмірний структурний характер нервової тканини потребують створення нанокомпозитів, які можуть контактувати зі структурами клітинного рівня біологічних систем на молекулярному рівні й забезпечувати високий ступінь контролю фізіологічних процесів. Упровадження досягнень нанобіотехнології в клінічну нейронауку поки що перебувають на ранній стадії, частково через складнощі, пов'язані з вивченням взаємодії наноструктур з нейронами та нервовою системою ссавців. Подальший розвиток цієї галузі матиме важливе значення як для фундаментальної науки, так і для медицини [3]. У цьому контексті

актуальним є вивчення можливості використання унікальних фізико-хімічних властивостей вуглецевих нанотрубок (ВНТ) з метою створення на їх основі біосумісних наноматеріалів для нейроінженерії.

У роботі узагальнено сучасні дані літератури щодо структури, хімічної модифікації та електрофізичних властивостей ВНТ, механізмів їхньої взаємодії з іонними каналами клітинних мембран, впливу на ріст та функціональні характеристики культивованих клітин, що уможливорює застосування ВНТ як субстратів для вирощування нейронів, блокаторів іонних каналів та нейропротекторів.

Структура, властивості та функціоналізація вуглецевих нанотрубок

Структура

ВНТ — одна з алотропних sp^2 -модифікацій вуглецю, що являє собою циліндрично згорнутий графен, поверхня якого складається

з правильних шестикутників, на вершинах яких розміщені атоми вуглецю [4]. Залежно від кількості згорнутих графенових шарів, з яких вони можуть складатися, ВНТ поділяють на одностінні (ОВНТ) та багатостінні (БВНТ). БВНТ структури типу «російської матрьошки» — це сукупність коаксіально вкладених одна в одну циліндричних ОВНТ [5]. Для всіх БВНТ значення відстані між сусідніми графеновими шарами близьке до величини 0,34 нм — відстані між сусідніми площинами кристалічного графіту.

На рис. 1 і 2 подано типові зображення ОВНТ та БВНТ відповідно, отримані за допомогою просвітлювальної електронної мікроскопії (ПЕМ) високої роздільної здатності.

Кінці ВНТ після синтезу зазвичай відкриті або закриті напівсферичними чи конічними «шляпками», які можуть бути видалені окиснювальним шляхом. «Шляпки» складаються з упорядкованих пентагональних і гексагональних структур, що споріднює їх із фулеренами C_{60} [6–8]. ОВНТ зазвичай містять менше структурних дефектів, ніж БВНТ, а після відпалювання в інертній середовищі можуть не мати їх взагалі.

Експериментально встановлено, що залежно від способу синтезу (електродуговий; лазерної абляції графіту за присутності металевих наночастинок як каталізаторів; осаджування з газової фази під час термічного розкладу вуглецевмісних газів на каталітичних наночастинок металів [9, 10])

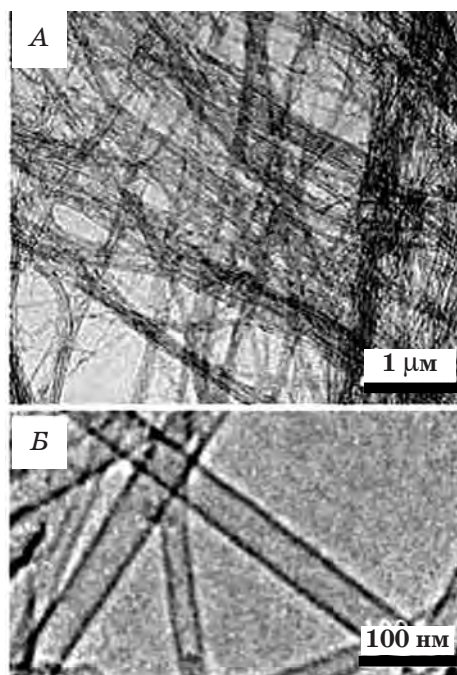


Рис. 1. Зображення ОВНТ, отримані за допомогою ПЕМ за різних збільшень [6]

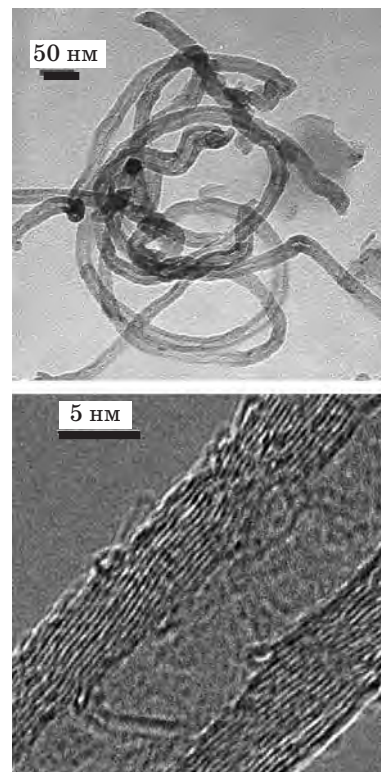


Рис. 2. Зображення БВНТ, отримані за допомогою ПЕМ за різних збільшень [7]

внутрішній діаметр ОВНТ становить від 0,4 до декількох нм. Зовнішній діаметр БВНТ залежно від кількості стінок — від десятків до сотень нм, а внутрішній — 4–15 нм. Довжина ВНТ варіює в межах від сотень нанометрів до декількох десятків мікрометрів. Характеристичне відношення довжини до діаметра ВНТ зазвичай перевищує 100 і може досягати 10 000 [9]. Для розділення ВНТ різного типу розроблено методи, що ґрунтуються на ультрацентрифугуванні, електрофорезі, хроматографії тощо.

Характерною для ВНТ властивістю є агрегування індивідуальних ВНТ з утворенням досить міцних пучків, зв'язок, джгутів. Агрегати можуть бути вигнутими або навіть у вигляді кілець. Між ВНТ в агрегатах присутня ван-дер-ваальсова порожнина величиною не менше 0,32 нм [11].

Отже, ідеальна ОВНТ — це згорнутий у циліндр графен [12]. Результат такої операції залежить від кута орієнтації графена відносно аксіальної вісі ОВНТ, що задає її хіральність і визначає електричні та коливальні властивості. Спосіб згортання графена зображають хіральним вектором — парою індексів (m, n) . Числа m та n визначають координати шестикутника, який внаслідок згортання графена буде суміщатись із шес-

тикутником, розміщеним на початку координат (рис. 3). Інший спосіб визначення хіральності полягає у зазначенні кута α між напрямом згортання ОВНТ і напрямом, у якому шестикутники мають спільну сторону.

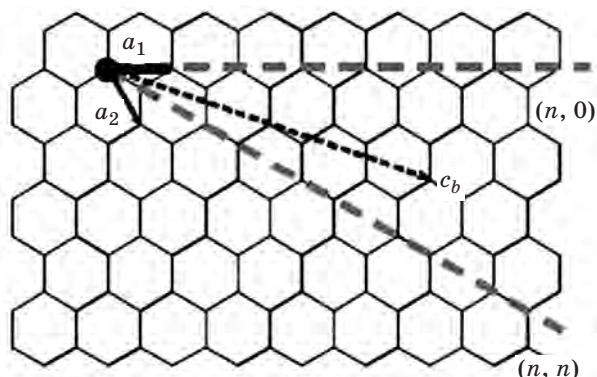


Рис. 3. Схематичне зображення площини графена з векторами хіральності, що відповідають різним конфігураціям ОВНТ [13]

Зв'язок між індексами хіральності (m, n) та кутом α задається співвідношенням:

$$\sin \alpha = 3m / 2\sqrt{m^2 + n^2 + nm}.$$

Діаметр ОВНТ може бути розрахований за формулою:

$$D = \sqrt{m^2 + n^2 + nm} \cdot \sqrt{3}d_0 / \pi,$$

де $d_0 = 0,142$ нм — відстань між сусідніми атомами вуглецю у графені [14].

Серед різних можливих напрямів згортання ОВНТ виділяють ті, для яких суміщення шестикутника (m, n) з початком координат не потребує викривлення його структури. Цим напрямам відповідають кути $\alpha = 30^\circ$ (крісельна конфігурація) та $\alpha = 0^\circ$ (конфігурація зиг-заг). Зазначені конфігурації відповідають хіральностям (m, m) та $(m, 0)$ або $(0, n)$. Інші конформації називають хіральними (рис. 4).

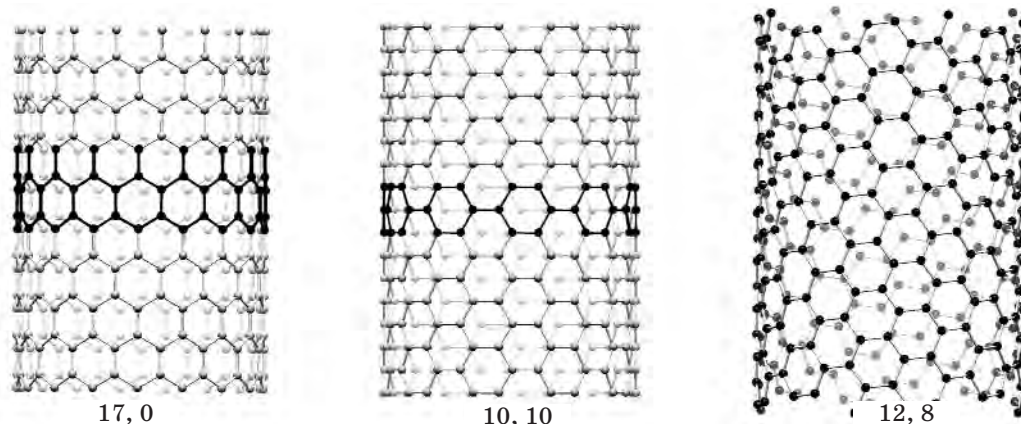


Рис. 4. Будова ОВНТ типу зиг-заг (17, 0), крісельна (10, 10) та хіральна (12, 8). Елементарні комірки ОВНТ виділено чорним кольором [6]

Електричні та механічні властивості

Тип будови ОВНТ впливає на її хімічні, електричні та механічні властивості. Ширина забороненої зони ОВНТ варіює від 0 до 2 еВ, а їхня електрична провідність може мати металічний чи напівпровідниковий характер [15].

Для ОВНТ конфігурації зиг-заг притаманні два типи електричних властивостей: за умови $s = m/3$, де s — ціле число, ОВНТ є металами, в інших випадках — напівпровідниками [8, 14]. Електронні характеристики хіральних ОВНТ (m, n) схожі до типу зиг-заг: за виконання умови $s = (2m+n)/3$ ОВНТ є металевими, в іншому разі — напівпровідниками. Але є певні винятки, оскільки ефекти кривизни в ОВНТ з малим діаметром можуть істотно впливати на їхні електричні властивості. Наприклад, ОВНТ (5, 0), яка має бути напівпровідниковою, фактично є металевою, і навпаки, хіральні ОВНТ з малим діаметром часто є напівпровідниками [13].

У крісельній конфігурації два з С-С-зв'язків, що входять до складу кожного шестичленного кільця, орієнтовані паралельно до аксіальної вісі ОВНТ. Важливо зазначити, що під час отримання ОВНТ шляхом випаровування графітової мішені у нагрітій печі стрибним променем лазера або випаровування графіту в електричній дузі потоком інертного газу вони переважно складаються з (10, 10) крісельних металевих ОВНТ.

Методом Фарадея було виміряно питомий електричний опір пучка металевих (10, 10) ОВНТ, значення якого при 300 К становило 10^{-4} Ом·см [16]. У деяких дослідах було отримано значення $0,34 \cdot 10^{-4}$ Ом·см, що навіть з урахуванням експериментальної похибки може свідчити про найвищу електропровідність металевих ОВНТ серед усіх нині відомих вуглецевих волокон. Встановлено значення щільності струму: 10^6 – 10^9 А/см² [17].

ОВНТ досить міцні в аксіальному напрямі. Значення модуля лінійної пружності ОВНТ лежать у межах 1,0–1,4 ТПа (для порівняння: у сталі 200 ГПа). Межа міцності на розтягування — 30 ГПа (у високоякісних сталей 1–2 ГПа) [18]. ОВНТ більш гнучкі, ніж БВНТ, і можуть бути вигнуті, сплюснені та скручені без ламання. Проте в радіальному напрямі ОВНТ мають значно меншу міцність. З використанням ПЕМ було встановлено, що навіть ван-дер-ваальсові сили можуть деформувати ідеально циліндричну симетрію двох суміжних ОВНТ діаметром від 2 нм [19]. Згодом за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ) для кількісного оцінювання радіальної еластичності ОВНТ зі зростанням їхнього діаметра від 0,92 до 1,91 нм було отримано значення модуля Юнга від 57 до 9 ГПа [20]. Радіальний напрям еластичності особливо важливий для створення наноконструкцій на основі ОВНТ, оскільки останні зазнають значної деформації у поперечному напрямі внаслідок прикладеного навантаження. Вигнуті ОВНТ містять топологічні дефекти (наприклад, пари 5- та 7-вуглецевих циклів) і їхня реакційна здатність відрізняється від ідеальних ОВНТ.

БВНТ притаманні типові металічні властивості. Експериментально визначені значення модуля Юнга для БВНТ лежать у межах від 770 до 950 ГПа, межа міцності на розтягування — 18–68 ГПа [21].

Функціоналізація

Нативні форми ВНТ нерозчинні у водних розчинах та органічних розчинниках, що значно ускладнює їх використання у біологічному середовищі. Застосовуючи ультразвукову соніфікацію, можна диспергувати ВНТ у певних розчинниках, але після її зупинки одразу відбувається агрегація ВНТ. Оскільки ВНТ здатні реагувати з різними класами речовин, формування супрамолекулярних комплексів дозволяє специфічно модифікувати ВНТ для інтеграції з біологічними системами [22]. Головні методи функціоналізації ВНТ можна розділити на такі категорії [23] (рис. 5):

- 1) ковалентне приєднання молекул до стінок ВНТ;
- 2) хімія дефектних циклів;
- 3) нековалентна адсорбція;
- 4) заповнення внутрішньої порожнини ВНТ.

Метод ковалентної модифікації стінок ВНТ широко застосовують для збільшення розчинності ВНТ. Часто вдаються до окиснення ВНТ різними кислотами, наприклад сумішшю $H_2SO_4 - HNO_3$, унаслідок чого поверхня стінок вкривається карбоксильни-

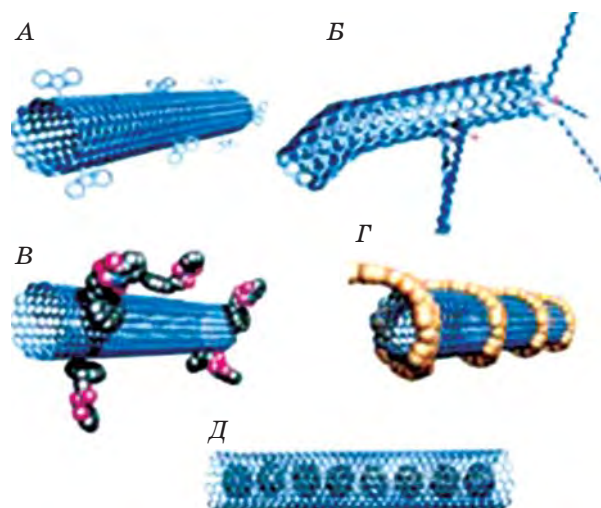


Рис. 5. Основні методи функціоналізації ВНТ:
 А — ковалентне приєднання;
 Б — приєднання за дефектними циклами;
 В, Г — нековалентна модифікація;
 Д — молекулярна інсерція у порожнину ВНТ [24]

ми, карбонільними та гідроксильними групами [25]. У наступних реакціях через циклоприєднання, амінування або етерифікацію карбоксильних груп до ВНТ можна приєднати низку молекул, таких як аміни, полі-L-лізин, пептиди та ін. [26]. Функціональні групи можуть бути видалені з поверхні ВНТ під час нагрівання [27].

Оброблення кислотами з наступним нагріванням на повітрі також є одним зі способів очищення ВНТ від металевих домішок [28]. Це призводить до відкриття кінців ВНТ та формування дірок у їхніх стінках, унаслідок чого отримують ВНТ з карбонільними та карбоксильними групами на кінцях та в дефектних місцях, які добре розчиняються: наприклад, ацилюванням окиснених ВНТ алкіламінами з довгими ланцюгами досягають їх розчинності в органічних розчинниках [25].

Для забезпечення біосумісності у разі використання ВНТ з біологічними матеріалами вкрай важливою є контрольована модифікація ВНТ протеїнами, нуклеїновими кислотами, ліпідами, яка реалізується методом нековалентної функціоналізації через ван-дер-ваальсові або π - π -стекинґ взаємодії [23]. При цьому зберігаються sp^2 -структура ВНТ та їхні унікальні електричні й механічні характеристики [29]. В основі явища фізичної адсорбції протеїнів до ВНТ лежать π - π -взаємодії між залишками гістидину і триптофану та стінками нанотрубок, тому їх кількість та положення в поліпептидному ланцюзі визначає специфічність адсорбції протеїнів до поверхні ВНТ [30]. Аналогічно,

нуклеїнові кислоти можуть формувати комплекси з ВНТ завдяки π - π -стекинг взаємодіям азотистих основ зі стінками ВНТ [31]. Самозбирання комплексу ВНТ–лізофосфоліпідів, забезпечуване гідрофобними та ван-дер-Вальсовими взаємодіями, також є одним із методів підвищення розчинності ВНТ з наданням специфічної біологічної активності [32].

ВНТ з відкритими кінцями можна використовувати як наноконтейнери — експериментально підтверджена можливість заповнення внутрішньої порожнини ВНТ низкою молекул (наприклад, фулеренами, порфіринами та ін.), головним чином завдяки гідрофобним взаємодіям між ними [33]. Такі конструкції у перспективі можна використовувати для розроблення новітніх фармацевтичних препаратів.

Вуглецеві нанотрубки як ефективні субстрати для вирощування нейронів

Вирощування нейронів на субстратах з одностінних вуглецевих нанотрубок

Розвиток нейроінженерії потребує розроблення нових біодоступних матеріалів, які контактують з нервовою тканиною, для стимуляції чи фіксації її електрофізіологічної активності. Важливим кроком у їх пошуку є вивчення можливості детермінування поведінки нейронних мереж *in vitro*, для чого досліджують, наприклад, використання ВНТ на етапі вирощування нейронів. ВНТ можуть бути функціоналізовані різними хімічними групами, полімерами або біологічно активними молекулами для підвищення їхньої біологічної сумісності, транспортування у клітинне середовище та забезпечення бажаної біологічної активності. Залежно від хіральності ВНТ демонструють різні значення електропровідності [13], є міцними та гнучкими, що може бути використано для практичних цілей. Велике характеристичне співвідношення довжина/діаметр ВНТ здатне викликати анізотропію електричного поширення сигналу і тому є потенційно важливим для розташування клітин або індукування їх міграції [34]. Хімічна модифікація у поєднанні з унікальними фізичними характеристиками ВНТ робить їх перспективним матеріалом для взаємодії з елементами нервової системи завдяки регулюванню молекулярних взаємодій нейронів. Розвиток різних методів синтезу, очищення та функціоналізації ВНТ сприяв проведенню низки комплексних досліджень їхніх властивостей *in vitro* як субстратів для культивування нейронів, впливу на електрофізіоло-

гічні процеси всередині мереж нейронів, а також взаємодії з гліальними елементами.

Приготування субстрату з ОВНТ для вирощування нейронів є двоетапним. Перед розміщенням на скляній пластинці для забезпечення необхідного значення розчинності та рівномірного розподілу ОВНТ функціоналізують ковалентним приєднанням до їхньої поверхні певних хімічних груп. Після повільного випаровування розчинника ОВНТ піддають впливу високої температури (350 °С), унаслідок чого відбувається їх дефункціоналізація та утворюється зафіксована на склі плівка — мережева структура з нативних ОВНТ (на рис. 6 зображено мережеву структуру «ОВНТ+ДНК», отриману у відділі фізичної електроніки Інституту фізики НАН України). Під час вирощування на субстраті з шаром ОВНТ завтовшки 50–60 нм гіпокампальні клітини були життєздатними та виявляли значну спонтанну електричну активність після перших днів культивування [35].

Сканувальною електронною мікроскопією (СЕМ) було підтверджено, що нейрони мали нормальну морфологію, ріст їх супроводжувався поширенням на субстраті розгалужених відростків, які не відрізнялись від галузження відростків клітин на контрольних субстратах. Порівняння методом *current-clamp* поведінки клітин, культивованих на субстраті з ОВНТ, з контрольною групою нейронів, вирощених на склі, показало значне збільшення частоти генерування спонтанних потенціалів дії (ПД): 44 ± 1 Гц для експериментальної групи порівняно з величиною 12 ± 3 Гц для контрольної [35].

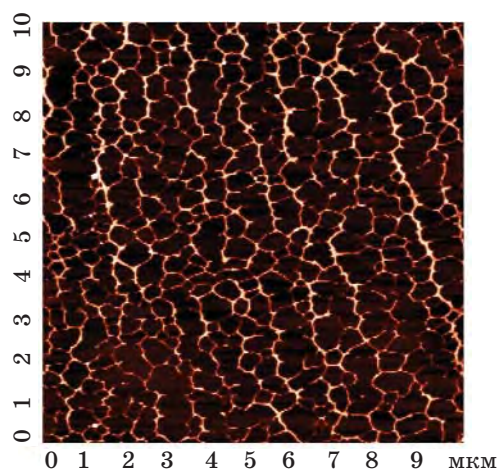


Рис. 6. Зображення мережевої структури «ОВНТ+ДНК», осадженої з водного розчину на підкладку скла; діаметр ОВНТ становить близько 1,5 нм (дані АСМ)

При цьому змін у морфології нейронів або пасивних характеристиках мембрани не спостерігали. Цей ефект є наслідком взаємодії ОВНТ-субстрату з нейронами: дані, отримані з використанням СЕМ за великих збільшень, підтверджують наявність сильних взаємодій між клітинними мембранами та ОВНТ на рівні поверхні тіла клітини і відростків (рис. 7). Постійна латеральна електрична стимуляція, проведена через шар ОВНТ, унаслідок деполяризації мембрани (ДМ) викликала тривалу імпульсацію нейронів, які росли у безпосередній близькості до ОВНТ.

Провідність одностінних вуглецевих нанотрубок як фактор індукції росту нейронів

ВНТ мають деякі переваги перед іншими електропровідними субстратами, наприклад поліпіролом. Провідність ВНТ у біологічному оточенні є стабільною, на відміну від поліпіролу, у якого провідність зменшується під час його окиснення у водних розчинах. Для полегшення приготування субстрату в дослідженнях залежності росту нейронів від електропровідності субстрату використовували ОВНТ-поліетиленгліколевий кополімер (ОВНТ-ПЕГ) [36]. Водний розчин з гомогенно диспергованими ОВНТ-ПЕГ концентрацією 0,05 мг/мл розпилювали над нагрітими до 160 °С скельцями. Значення електропровідності субстрату регулювали, змінюючи товщину шару з ОВНТ. Було отримано субстрати завтовшки 10, 30 та 60 нм з провідністю 0,3, 28 і 42 См/см, відповідно. У контрольному досліді використовували скло, покрите непровідним поліетиленімі-

ном (ПЕІ) — субстратом, який широко застосовують для стимулювання клітинної адгезії і росту [37]. Порівняно з використанням АСМ ПЕІ з ОВНТ-ПЕГ-субстратів останні відзначалися чітко вираженою нано/мікроспорсткістю поверхні плівок різної товщини (рис. 8).

Після тридобового культивування гіпокампальних нейронів та мічення нейронів флуорексоном (флуоресцентним барвником, який утримується цитоплазмою клітини) морфологію нейронів досліджували інтерференційно-контрастною та флуоресцентною мікроскопією. Загальна кількість нейритів і довжина усіх розгалужень відростків порівняно з непровідним гладеньким ПЕІ-субстратом була більшою у нейронів, які вирощували на субстраті з шаром ОВНТ-ПЕГ 10 нм, хоча на шарі з ОВНТ-ПЕГ завтовшки 30 та 60 нм не спостерігали відмінностей у рості нейритів відносно контролю (рис. 9). Це свідчить про те, що саме плівки ОВНТ з меншим значенням провідності (0,3 См/см) здатні ефективно індукувати ріст відростків. Цікаво, що в досліді з культивування фібробластів та ендотеліальних клітин на поліестерових волокнах з різною електропровідністю клітинна адгезія, щільність та протеїнова експресія були найвищими на субстратах з провідністю 0,43–0,9 См/см [38]. Середня площа тіла клітини збільшувалася зі зростанням провідності шару ОВНТ до значень 28 См/см, однак за подальшого зростання провідності вона зменшувалась до величини стандарту ПЕІ. Отже, за допомогою провідності ОВНТ-ПЕГ-субстратів можна регулювати ріст нейронів та їхніх відростків.

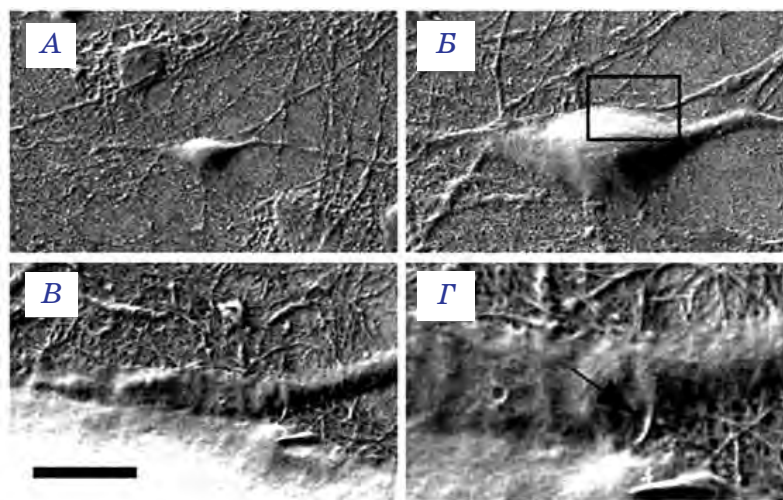


Рис. 7. Нейрон, що росте на шарі ОВНТ:

СЕМ фотографії за різних збільшень: А — 25 мкм, Б — 10 мкм, В — 2 мкм, Г — 450 нм. Стрілка вказує на контактну взаємодію ОВНТ з мембраною нейрона [35]

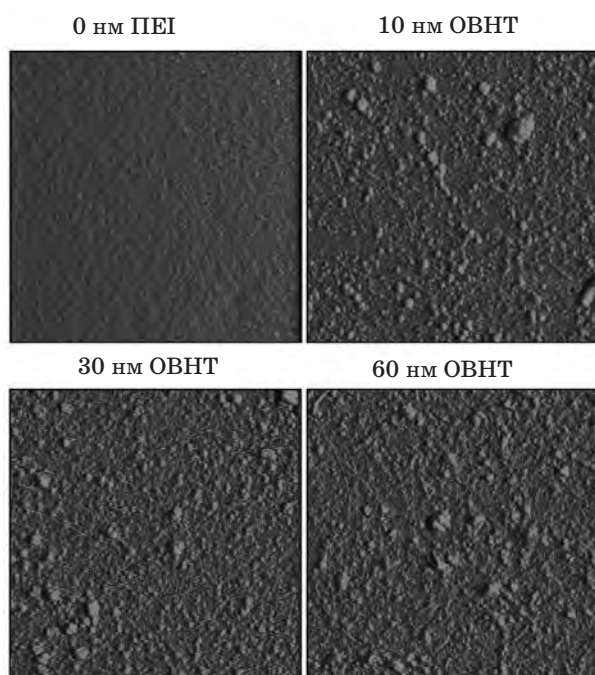


Рис. 8. Порівняння шорсткості поверхонь субстратів (дані АСМ [36])

Вирощування нейронів на субстратах з багатостінних вуглецевих нанотрубок

Аналогічно до дослідів з ОВНТ приготування субстрату для клітинного росту безпосередньо з немодифікованих БВНТ не дає позитивного результату, оскільки не відбувається належна адгезія наночастинок до скла. У дослідженнях росту культивованих нейронів гіпокампу для отримання придатного для вирощування нейронів субстрату з гомогенною дисперсією очищених наночастинок була необхідна двостадійна підготовка: спочатку кінці та стінки БВНТ хімічно функціоналізували піролідіновими групами, що істотно підвищувало розчинність БВНТ в органічному розчиннику (диметилформамід) [39]. Далі скельця з нанесеним на них розчином вміщували в атмосферу азоту за температури 350 °C на 15 хв, що призвело до дефункціоналізації БВНТ. Для приготування субстрату з БВНТ дисперговані в етанолі БВНТ наносили на предметне скло, вкрите ПЕІ, а після випарування етанолу утворювався шар БВНТ на ПЕІ. Показано, що гіпокампальні нейрони, культивовані на цьому субстраті, виживали та продовжували ріст у культурі щонайменше протягом восьми днів. Це також було підтверджено наявністю конусів росту, ростом та галуженням нейритів гіпокампальних нейронів, які вирощували на БВНТ. Отже, БВНТ є біосумісними субстратами.

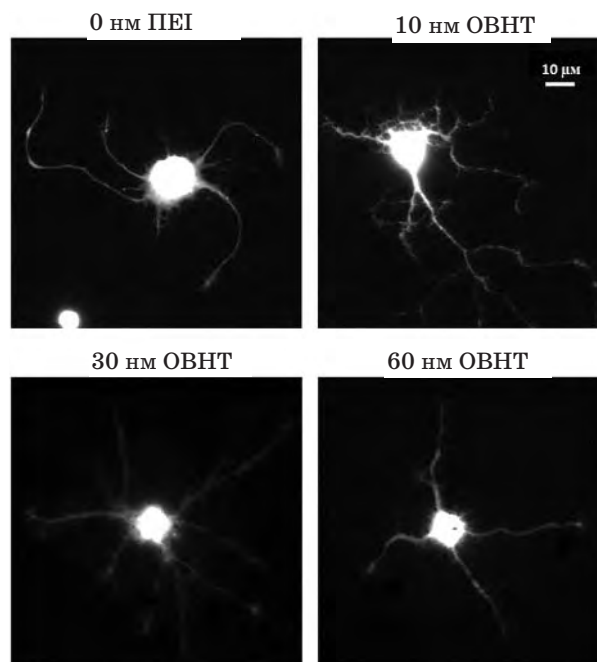


Рис. 9. Гіпокампальні нейрони, вирощені на ПЕІ та ОВНТ-ПЕІ субстратах з різною електропровідністю (дані флуоресцентної мікроскопії [36])

Для дослідження активності мережі нейронів, що росли інтегровано до субстрату з БВНТ, використовували відомий *patch-clamp* метод. Поява постсинаптичних струмів (ПСС) є доказом формування функціонального синапсу і показником дієвості нейронної мережі. Нейрони, які вирощували на БВНТ, виявляли в середньому шестиразове збільшення частоти спонтанних ПСС порівняно з контрольною групою: $6,67 \pm 1,04$ Гц для досліджуваної групи та $1,01 \pm 0,20$ Гц для контрольної (рис. 10). Аналіз середньої амплітуди зафіксованих ПСС не виявив значущих відмінностей між двома групами ($48,9 \pm 9,2$ пА для контрольної та $65,5 \pm 23,1$ пА для досліджуваної групи). Вирощування нейронів на субстраті з БВНТ не впливало на співвідношення між збуджувальними та гальмівними ПСС — частка збуджувальних ПСС була однаковою в обох групах (64%). Дослідження частоти імпульсації нейронів за значень мембранного потенціалу спокою (МПС) також виявило значне збільшення імпульсації у нейронів, які вирощували на субстраті з БВНТ (0,22 Гц для контрольної та 1,34 Гц для досліджуваної групи). Ці результати свідчать, що нейронні мережі, утворені на БВНТ, демонструють зростання міжмережних взаємодій.

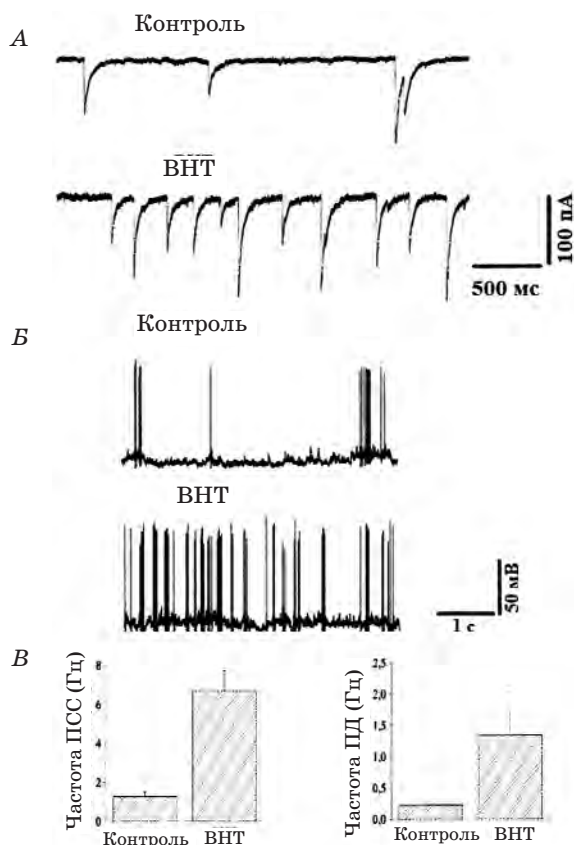


Рис. 10. А — спонтанні ПСС у контрольній групі та культурі нейронів, вирощених на субстраті з BVHT; Б — запис *current-clamp* клітин контрольної групи та культивованих на BVHT гіпокампальних нейронів; В — частота генерації ПСС та ПД клітинами контрольної групи і культивованими на субстраті з BVHT [39]

Дослідження з використанням імуноцитохімічних методів показали, що співвідношення між клітинами глії та нейронами — відповідно, GFAP- та MAP-2-імунореактивними [40] — у культурах експериментальної та контрольної груп були майже однаковими. Отже, ефект підвищення мережевої активності не пов'язаний зі збільшенням популяції нейронів. Суттєвих відмінностей в електрофізіологічних властивостях мембрани між нейронами, вирощеними на субстраті з BVHT, та нейронами контрольної групи не виявлено: значення МПС, вхідного опору та ємнісних характеристик були однакові. Зростання ефективності поширення нейронних сигналів пов'язано зі специфічними властивостями BVHT, зокрема з їхньою високою електропровідністю. BVHT можуть, у принципі, забезпечувати шлях, який уможливує пряму електротонічну передачу струму, призводячи до перерозподілу заряду на поверхні мембрани.

Значну увагу на сьогодні приділяють розробленню скефолдів з BVHT, які могли б

регулювати посттравматичну регенерацію нервової тканини. Концептуально це можна вирішити через проектування субстратів, які здатні стимулювати контрольований ріст та галуження нейритів [41], наприклад приєднанням до модифікованих скефолдів з BVHT біологічно активних субстратів або молекул, що несуть на своїй поверхні різноманітні заряди.

Після вирощування на функціоналізованих BVHT шляхом сорбції 4-гідроксинеоналю — продукту пероксидного окиснення ліпідів, що контролює формування відростків нейронів, — нейрони гіпокампу щурів розвивали численні нейрити з широким галуженням [42]. Виявлено підвищене прикріплення до субстрату нейроноподібних диференційованих PC12-клітин під час вирощування на BVHT, вкритих тонким шаром колагену типу IV — протеїну позаклітинного матриксу [43]. Ці результати засвідчили, що для здійснення впливу на взаємодію між нейронами та BVHT можна використовувати такий спосіб модифікації цих наноструктур, як фізична адсорбція. Однак, слід зазначити, що адсорбовані молекули не демонструють стабільного та довготривалого утримання на BVHT. Для вирішення цієї проблеми використовують хімічну модифікацію BVHT шляхом ковалентного приєднання до них певних функціональних груп [44]. Негативною стороною такої модифікації є можливість втрати біологічної активності вибраних молекул. Проте було доведено, що нейротропін — протеїн, ключовий для нейронної диференціації, після ковалентного приєднання до BVHT зберігає біологічну активність, сприяючи росту відростків нейронів дорзальних гангліїв [45].

Ковалентну модифікацію можна застосовувати для маніпулювання зарядом функціоналізованих BVHT. Встановлено, що ріст та розвиток нейронів на субстратах зі скла і пластика посилюється внаслідок оброблення цих поверхонь позитивно зарядженими полімерами на зразок полілізину або поліорнітину. Аналогічно, після вирощування на функціоналізованих етилендіаміном BVHT було одержано дані про отримання нейронів гіпокампу з широким галуженням та більшою кількістю конусів росту порівняно з нейронами, що росли на субстратах з нейтральними або негативно зарядженими BVHT. Субстрати з функціоналізованими бензойною кислотою BVHT зменшували приєднання та виживання вирощуваних на них клітин [44].

Посилення електросполучення нейронів під час вирощування на субстраті з вуглецевих нанотрубок

Зазвичай поширення ПД нейронів відбувається за аксоном. У нейронів, які мають інтенсивне галуження дендритів біля соми, інколи спостерігають поширення ПД у протилежному напрямі — до дендритів, що індукує появу кальцієвих потоків на дендритах, створюючи тим самим слідову деполаризацію на сомі — індуковану ДМ, що з'являється після ПД. Внесок слідової ДМ до генерування наступного ПД залежить від ступеня сполучення між дендритами та сомою [46]. Показано, що вирощування нейронів на субстратах з ВНТ сприяє появі цього феномену [47]. Для його дослідження стимулювали сому нейрона коротким імпульсом струму, нейрони гіпокампу генерували звичайну відповідь послідовності шести ПД, після чого очікували появу ДМ після останнього ПД [48]. Порівняно з нейронами, які вирощували на скляних субстратах, гіпокампульні нейрони на ВНТ демонстрували значне посилення слідової ДМ (рис. 11). У разі повторення експерименту на інших субстратах зі схожими властивостями електропровідності, зокрема оксид індію та олова, і непровідних субстратах з аналогічними до ВНТ нанорозмірними поверхневими нерівностями — пептид RADA1 — нейрони не виявляли значної слідової ДМ, що свідчить про специфічність цього ефекту саме для ВНТ (таблиця).

Пасивні електричні характеристики (значення вхідного опору та ємності) мемб-

ран нейронів, культивованих на склі, ВНТ, оксидах індію та олова, пептидах RADA16, не мали статистично значущих відмінностей, що свідчить про відсутність впливу цих субстратів на електричні властивості нейронів. Значення ДМ залежало від ступеня галуження дендритів: дорзальні гангліональні нейрони спинного мозку, які мають мінімальний ступінь галуження, жодного разу не виявляли слідової ДП за будь-якої частоти генерації ПД за аналогічних умов вирощування на поверхнях з ВНТ. Деполаризація, яка мала місце після ПД, репрезентує електричну збудливість, що базується на дендросоматичних електричних взаємодіях від загального притоку Ca^{2+} через потенціалкеровані кальцієві канали від дендритів до соми, приведених у дію зворотно спрямованими поширеннями ПД [49].

Стан ВНТ — прикріплених до скляної поверхні або у водорозчинному вигляді — може спричиняти регульовальну дію на нейрони. Отримані за допомогою ПЕМ зображення нейронів, які вирощували на субстраті з ВНТ, виявили наявність щільних контактів між ними та клітинною мембраною. Специфічні зміни в електричній поведінці клітин можуть бути спричинені саме такими взаємодіями. Імовірно, що викликана ВНТ зміна у нейронній збудливості після серії ПД може бути зумовлена посиленням дендросоматичного сполучення, створюючи найкоротший шлях електросполучення дендритів та соми (рис. 12). Гібридні ділянки між поверхнею ВНТ та нейронними мембранами є актуальним об'єктом досліджень, які

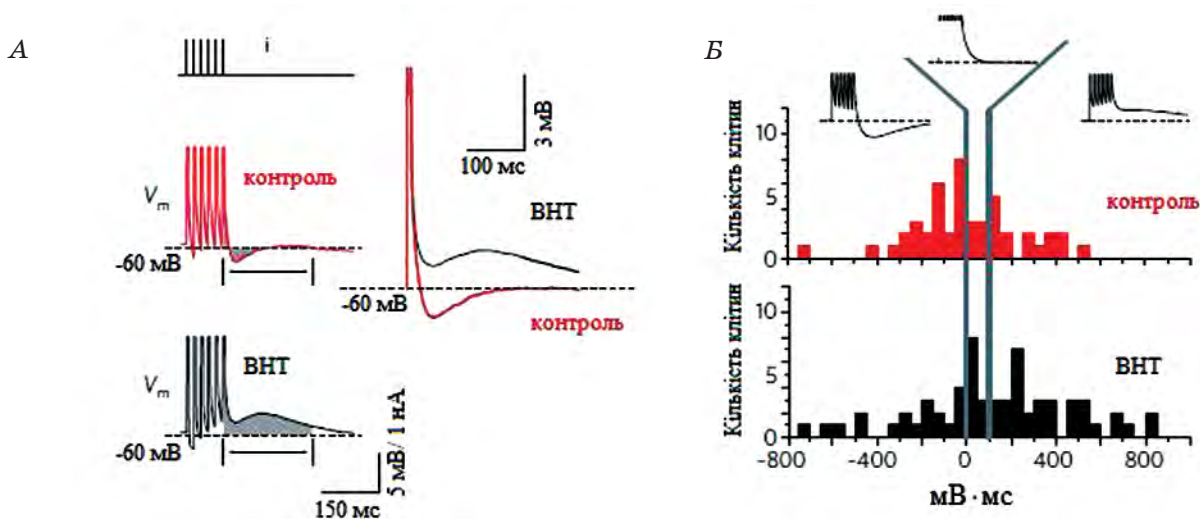


Рис. 11. Вплив ВНТ на нейрональну збудливість:

А — індуковане ВНТ генерування слідової ДМ та звичайна слідова ДМ контрольної групи;

Б — мембранний потенціал після серії ПД контрольних та культивованих на ВНТ клітин: гіперполяризація, нейтральна відповідь, деполаризація [47]

включають аналіз можливості індукування ВНТ кальцієвих «гарячих точок» — скупчення потенціалкерованих кальцієвих каналів на плазмалемі та/або їх збільшеної експресії, що могло б слугувати додатковим механізмом модуляції ВНТ нейронної збудливості.

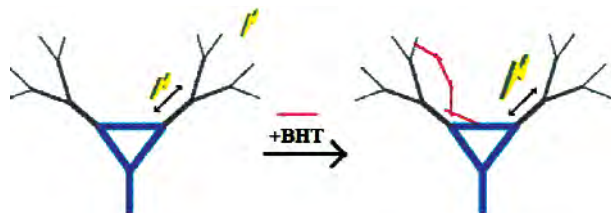


Рис. 12. Модель посилення ВНТ дендросоматичного електросполучення [48]

Тип мембранного потенціалу та його пропорція після серії ПД, викликаних у гіпокампальних нейронах під час вирощування на різних субстратах [48]

Субстрат	Мембранний потенціал		
	ГМ	НВ	ДМ
<i>Скло</i>			
Нейрони (N)	26	6	15
Пропорція (%)	55	13	32
<i>ВНТ</i>			
Нейрони (N)	19	11	33
Пропорція (%)	30	17	52
<i>Оксид індію та олова з низькою провідністю</i>			
Нейрони (N)	19	2	6
Пропорція (%)	70	7	22
<i>Оксид індію та олова з високою провідністю</i>			
Нейрони (N)	11	6	9
Пропорція (%)	42	23	35
<i>Об'єднані дані по оксиду індію та олова</i>			
Нейрони (N)	30	8	15
Пропорція (%)	57	15	28
<i>RADA</i>			
Нейрони (N)	17	13	9
Пропорція (%)	44	33	23

Примітка: ГМ — гіперполяризація мембрани після ПД; НВ — нейтральна відповідь; ДМ — деполяризація мембрани після ПД.

Особливості росту астроцитів на субстратах із вуглецевих нанотрубок

З уведенням деяких стандартно використовуваних у нейроінженерії синтетичних матеріалів, наприклад силікону, часто спостерігають індукцію формування гліального шрамового рубця (гліоз). Ця фізіологічна відповідь опосередкована головним чином

астроцитами і формується на місцях імплантації та ушкоджень. На ділянці нейропротезування гліальні шрамові утворення можуть спричинити значні порушення функціонування імпланту, особливо у випадках хронічної імплантації. Це призводить до зростання опору електродів імпланту, локального зменшення щільності нейронів і погіршення аксонної регенерації [50].

Для уникнення проблем відповіді організму на чужорідні тіла і мінімізації формування шрамової тканини вдалою стратегією є дизайн синтетичних матеріалів, що імітують властивості натуральних тканин. Фізіологічні поверхні, з якими зазвичай контактують клітини, складаються з нанорозмірних протеїнів. Дослідження *in vitro* нанофазних матеріалів підтвердили, що клітини порізногому реагують на матеріали з нано- та мікророзмірною нерівністю [51].

Показано, що вуглецеві волокна сумісні з біологічними тканинами і з урахуванням їхніх унікальних електричних та механічних властивостей відкривають перспективу для використання в нейрональних біоматеріалах. У дослідженнях з вирощування астроцитів щурів на дисках з пресованих БВНТ різного діаметра — стандартних (125 та 150 нм) і нанофазних (100 та 60 нм) та з різними значеннями поверхневої енергії — великими (125–140 мДж/м²), які отримано піролітичним зніманням зовнішнього вуглецевого шару, і малими (25–50 мДж/м²), що їх одержано через 1 год після засівання на диски та культивування у середовищі «Ігла» (з 10% бичачої сироватки та 1% пеніциліну), астроцити переважно адгезувалися на дисках з БВНТ традиційного розміру та з малою поверхневою енергією [52] (рис. 13).

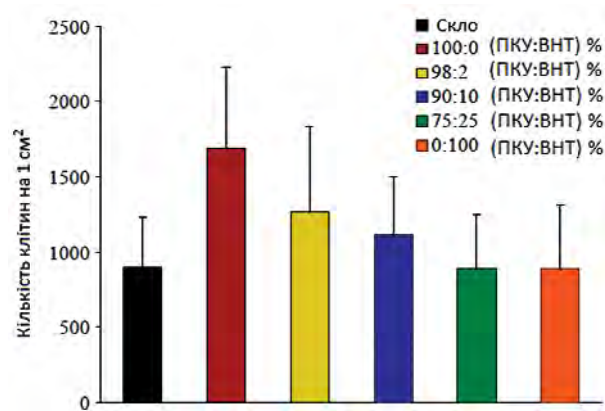


Рис. 13. Адгезія астроцитів до дисків з БВНТ після 1 год культивування [52]

Адгезія астроцитів до нанокompatитів БВНТ (діаметр 60 нм) з полікарбонатуретаном (ПКУ) у співвідношенні 10:90 та 25:75, відповідно, була значно меншою порівняно з адгезією до 100% ПКУ субстрату (рис. 14). Найменшу проліферацію астроцитів на 1-, 3- і 5-ту добу культивування спостерігали на дисках з нанофазними БВНТ з великими значеннями поверхневої енергії (рис. 15).

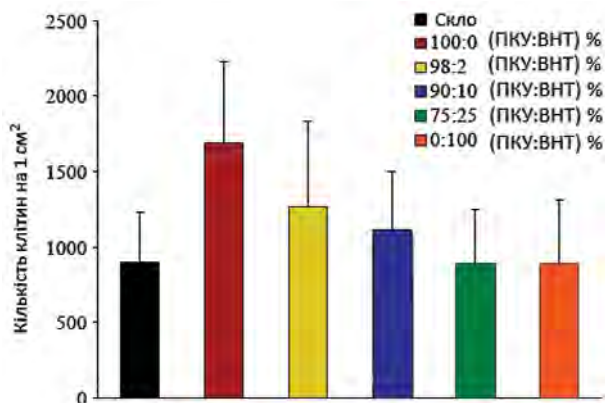


Рис. 14. Адгезія астроцитів до композитів БВНТ з ПКУ після 1 год культивування [52]

Вуглецеві нанотрубки як блокатори калієвих потенціалкерованих каналів та нейропротектори

Блокатори іонних каналів

Завдяки значному зростанню наукового інтересу до можливості застосування ВНТ в галузі нейроінженерії питання їхньої взаємодії з іонними каналами — ключовими функціональними елементами мембран нейронів — є вкрай актуальним. Для аналізу характеру взаємодій різних типів вуглецевих наночастинок з низкою калієвих потенціалкерованих каналів, що експресувалися клітинами ссавців, проводили електрофізіологічні експерименти [53] методом *patch-clamp* у конфігурації *whole cell*, у яких використовували фулерени C_{60} , ОВНТ та БВНТ з діаметром відповідно 0,7, 1,3 і 10–15 нм. Об'єктом досліджень слугували культивовані яйцеклітини, в які попередньо було введено генетичні вектори для кодування таких каналів: EXP-2, KVS-1, KCNQ1 і hERG. Останні слугували репрезентативним зразком для моделювання механізмів взаємодії. Загально визнано, що тривимірна структура пори та селективного фільтра K^+ -каналів є консервативною через універсальну амінокислотну послідовність TVGYG [54].

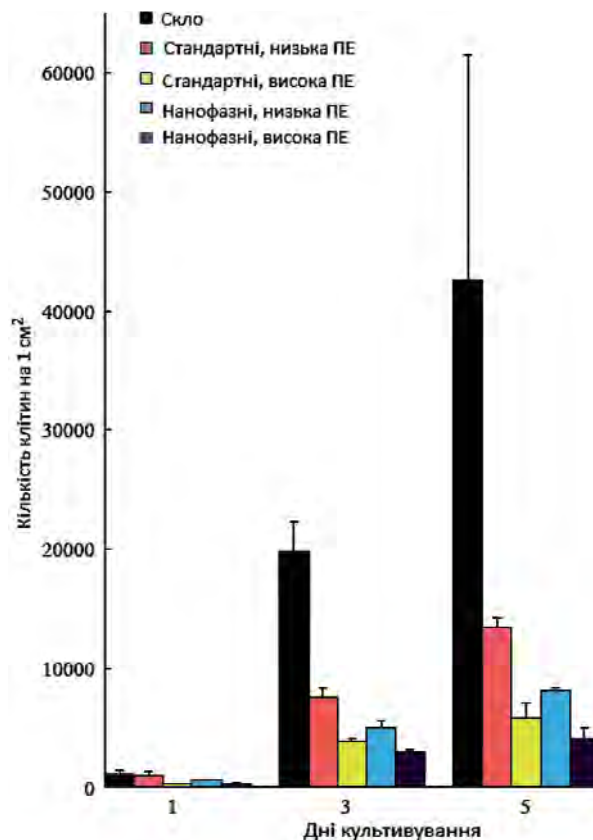


Рис. 15. Проліферація астроцитів на дисках з БВНТ [52]

Встановлено, що ОВНТ виявляли істотний вплив на роботу досліджуваних каналів: за їх присутності кількість інактивованих каналів значно зростала порівняно з контрольними умовами, про що свідчило зменшення калієвого струму. Цей ефект був оборотним і усувався після відмивання (рис. 16).

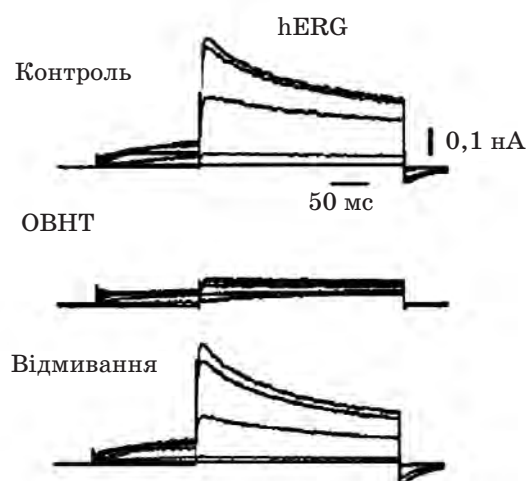


Рис. 16. Струми каналів класу hERG за відсутності (контроль), у присутності ОВНТ та після відмивання [53]

Блокування відбувається внаслідок поєднання ефектів стабілізування конформації каналів в інактивованому стані та пришвидшення кінетики деактивації. Вплив шляхом запобігання відкриття каналу є маловірогідним, про що свідчить пришвидшення процесу блокування зі зростанням деполаризуючого імпульсу (рис. 17). Отже, відкриття каналу є передумовою для його блокування ОВНТ. Залежність електричної відповіді від концентрації ОВНТ із середнім діаметром 1,3 нм можна описати рівнянням Хілла з константою $K_i = 0,021 \pm 0,005$ мг/мл та значенням $n = 1$ коефіцієнта Хілла, що свідчить про відсутність кооперативного ефекту блокування (рис. 17) [53]. Вияв цього ефекту мав відмінності для різних типів каналів, але в усіх випадках блокування було сильнішим за аплікації наночастинок з меншим діаметром, припиняючись у досліді з ВНТ великого діаметру: БВНТ не справляли блокувального впливу взагалі. На пригнічення калієвого струму впливали не лише діаметр, а й форма наночастинок: блокування hERG-каналів ОВНТ порівняно з фулеренами C_{60} було у 2-3 рази ефективнішим.

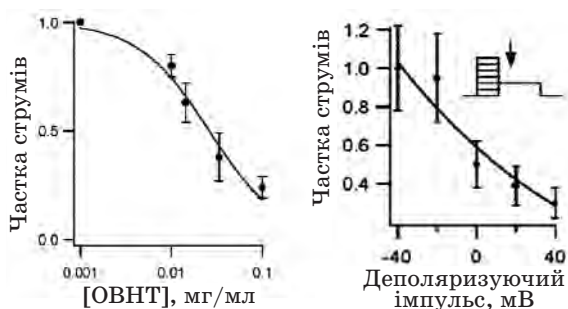


Рис. 17. Залежність електричної відповіді від концентрації ОВНТ в омиваючому розчині (зліва). Залежність значень калієвих струмів від деполаризуючих імпульсів (справа) [53]

Встановлено, що ОВНТ є новим класом блокаторів потенціалкерованих калієвих каналів з принципово новим механізмом дії, регульованим виключно геометричними факторами (рис. 18) за відсутності впливу інших фізико-хімічних складових, що є визначальними для традиційних речовин (так, для іонів тетраетиламонію важливим у спрямуванні руху та встановленні блокуючих взаємодій є експонування позитивних зарядів; молекули токсину отрути скорпіона формують електрохімічний зв'язок зі специфічними амінокислотними залишками протеїну-мішені [55]).

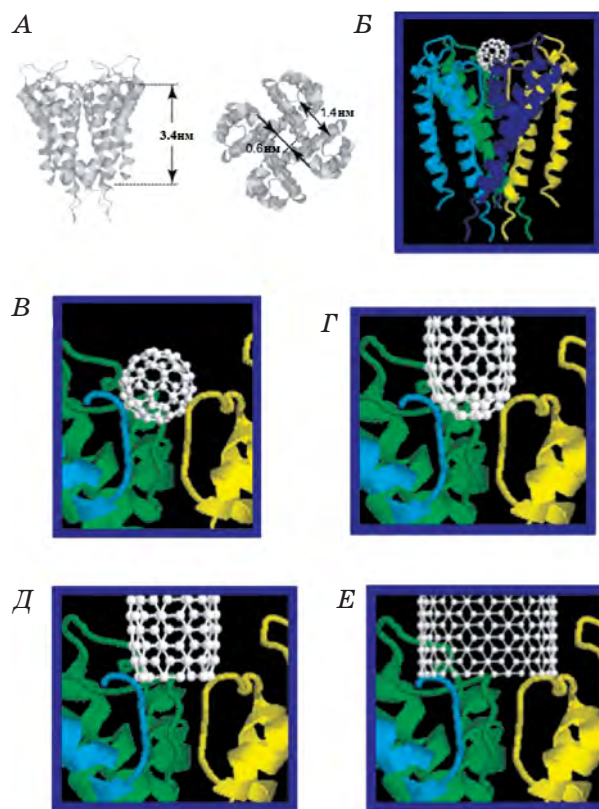


Рис. 18. Докінг-моделювання взаємодії різних наночастинок з молекулами KcsA: А — кристалічна структура K^+ KcsA-каналу; Б, В — моделювання приєднання фулерену C_{60} ; Г — моделювання взаємодії каналу з ОВНТ зі сферичним кінцем; Д, Е — моделювання взаємодії відкритих ОВНТ діаметром 0,9 та 1,3 нм, відповідно, з каналом [53]

Нейропротекторна дія

У досліді [56] з оклюзією середньої мозкової вени в щурів продемонстровано, що у тварин з попередньою ін'єкцією аміномодифікованих ОВНТ (а-ОВНТ) у праві латеральні шлуночки мозку ділянка інфаркту мозку була значно меншою порівняно з тваринами контрольної групи, яким вводили фосфатно-буферний розчин (ФБР) (рис. 19). Аналізуючи нейрональний апоптоз методом TUNEL, виявили, що зрізи мозку щурів, яким вводили а-ОВНТ, мали значно меншу кількість TUNEL-позитивних клітин порівняно з контрольною групою. З використанням імуногістохімічних методів зафіксовано знижену експресію GFAP, Iba-1 — показників запалення та гліальної відповіді [57] — у зрізах іпсилатеральних півкуль мозку тварин з попередньою ін'єкцією а-ОВНТ.



Рис. 19. Корональні зрізи мозку щурів, забарвлені трифенілтетразолхлоридом; білі ділянки репрезентують ділянки інфаркту після оклюзії середньої мозкової артерії.

Зліва: контроль — мозок неоперованої тварини. У центрі: мозок, у який уведено ФБР перед операцією.

Справа: мозок тварини, ін'єктованої α -ОВНТ перед операцією [56]

Вплив α -ОВНТ також виявлявся у зниженні рівня прозапальних цитокінів $IL-1\beta$ і $TNF-\alpha$, що свідчить про протекторну протиішемічну дію α -ОВНТ й інгібування гліальної активації та постішемічного запалення [58].

Експресія N-кадгерину, що впливає на виживання клітин після ішемічного ушкодження, відновлення тканин і синаптичних функцій [59], була в 1,8 раза вищою у тварин, яким вводили α -ОВНТ. Ін'єкція α -ОВНТ сприяла підвищенню «толерантності» нервової тканини щодо ішемічного ушкодження і зменшенню ділянки інфаркту, спричиненого оклюзією середньої мозкової артерії.

Таким чином, ОВНТ є біосумісними субстратами: нейрони у процесі вирощування на них є життєздатними, мають нормальну морфологію та незмінні пасивні характеристики мембрани. Унаслідок формування щільних взаємодій між ОВНТ і мембраною нейрона відбувається збільшення частоти генерування спонтанних ПД.

ОВНТ-плівки з низькою провідністю (0,3 См/см) індують посилений ріст відростків нейронів; у культивованих нейронів на ОВНТ-субстраті з більшими значеннями провідності (28 См/см) збільшується площа соми. Використовуючи різні способи модифікації БВНТ (ковалентної/нековалентної), можна змінювати їхній заряд або приєднувати до них низку біологічно активних молекул без змін у їхній активності для впливу на ріст та галуження відростків культивованих нейронів.

Ріст нейронів на субстраті з БВНТ супроводжується зростанням міжмережевої активності. Нейрони, культивовані на БВНТ, характеризуються значним збільшенням частоти спонтанних ПСС, причому співвідношення між збуджувальними та гальмівними ПСС не змінюється.

Субстрати з ВНТ можна використовувати для модуляції клітинної збудливості: у нейронів зі значним галуженням дендритів під час вирощування на них часто спостерігають появу слідової ДП після серії ПД. Природу цього явища поки що не з'ясовано.

Для уникнення індукції гліальної відповіді на введення імпланту можна застосовувати матеріали з шаром нанофазних БВНТ з високими значеннями поверхневої енергії.

Завдяки геометричній відповідності до структури пори та селективного фільтра ролі калієвих потенціалкерованих каналів ОВНТ діаметром 1,3 нм блокують їх, стабілізуючи конформацію каналів в інактивованому стані після його відкриття.

Аміномодифіковані ОВНТ є ефективними нейропротекторами, зокрема, їхня дія активує захисні функції нервової тканини щодо ішемічного ушкодження та зменшує ділянку інфаркту, спричиненого оклюзією середньої мозкової артерії у щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Wise K. D.* Silicon microsystems for neuroscience and neural prostheses // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* — 2005. — V. 24, N 5. — P. 22–29.
2. *Pearce T. M., Williams J. C.* Microtechnology: meet neurobiology // *Lab. Chip.* — 2007. — V. 7, N 1. — P. 30–40.
3. *Cooper D. R., Nadeau J. L.* Nanotechnology for *in vitro* neuroscience // *Nanoscale.* — 2009. — V. 1, N 2. — P. 183–200.
4. *Iijima S.* Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature.* — 1991. — V. 354. — P. 56–58.
5. *Maurin G., Stepanek I., Bernier P. et al.* Segmented and opened multi-walled carbon nanotubes // *Carbon.* — 2001. — V. 39, N 8. — P. 1273–1278.
6. *Kenji Hata, Don N. Futaba, Kohei Mizuno et al.* Water-assisted highly efficient synthesis of impurity-free single-walled carbon nanotubes // *Science.* — 2004. — V. 306, N 5700. — P. 1362–1364.
7. *Yuan L., Saito K., Hu W., Chen Z.* Ethylene flame synthesis of well-aligned multi-walled carbon nanotubes // *Chem. Phys. Lett.* — 2001. — V. 346, N 1–2. — P. 23–28.
8. *Dresselhaus M. S., Dresselhaus G., Eklund P. C.* Science of fullerenes and carbon nanotubes: their properties and applications. — New York: Acad. Press, 1996. — 985 p.
9. *Wang X., Li Q., Xie J. et al.* Fabrication of ultralong and electrically uniform single-walled carbon nanotubes on clean substrates // *NanoLet.* — 2009. — V. 9, N 9. — P. 3137–3141.
10. *Guo T., Nikolaev P., Thess A. et al.* Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization // *Chem. Phys. Lett.* — 1995. — V. 243, N 1–2. — P. 49–54.
11. *Раков Э. Г.* Химия и применение углеродных нанотрубок // *Усп. химии.* — 2001. — № 70. — С. 934–974.
12. *Сагалянов І. Ю., Прилуцький Ю. І., Радченко Т. М., Татаренко В. А.* Графенові системи: способи виготовлення й оброблення, структуроутворення та функціональні властивості // *УФМ.* — 2010. — Т. 11, № 1. — С. 95–138.
13. *Odom T. W., Huang J.-L., Kim P., Lieber C. M.* Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes // *Nature.* — 1998. — V. 391. — P. 62–64.
14. *Елецкий А. В.* Углеродные нанотрубки // *УФН.* — 1997. — Т. 167, № 9. — С. 945–972.
15. *Лозовик Ю. Е., Попов А. М.* Свойства и нанотехнологические применения нанотрубок // *Там же.* — 2007. — Т. 177, № 7. — С. 786–799.
16. *Thess A., Lee R., Nikolaev P. et al.* Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes // *Science.* — 1996. — V. 273. — P. 483–487.
17. *Avouris P., Chen Z., Perebeinos V.* Carbon based electronics // *Nat. Nanotechnol.* — 2007. — V. 2, N 10. — P. 605–615.
18. *Lu J. P.* Elastic properties of carbon nanotubes and nanopores // *Phys. Rev. Lett.* — 1997. — V. 79, N 7. — P. 1297–1300.
19. *Ruoff R. S., Tersoff J., Lorents D. et al.* Radial deformation of carbon nanotubes by Van der Waals forces // *Nature.* — 1993. — V. 364, N 6437. — P. 514–516.
20. *Yang Y. H., Li W. Z.* Radial elasticity of single-walled carbon nanotube measured by atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.* — 2011. — V. 98. — P. 130–133.
21. *Yu M.-F., Lourie O., Dyer M. et al.* Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load // *Science.* — 2000. — V. 287, N 5453. — P. 637–640.
22. *Prato M., Kostarelos K., Bianco A.* Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery // *Acc. Chem. Res.* — 2008. — V. 41, N 1. — P. 60–68.
23. *Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M.* Chemistry of carbon nanotubes // *Chem. Rev.* — 2006. — V. 106, N 3. — P. 1105–1136.
24. *Cipollon S.* Carbon nanotubes and neurons: Nanotechnology application to the nervous system. — Università degli studi di Trieste, 2010. — 150 p.
25. *Chen J., Hamon M. A., Hu H. et al.* Solution properties of single-walled carbon nanotubes // *Science.* — 1998. — V. 282. — P. 95–98.
26. *Пуотровський Л. Б., Куселев О. І.* Фуллерени в біології. — СПб: Росток, 2007. — 236 с.
27. *Kuznetsova A., Mawhiney D. B., Naumenko V. et al.* Enhancement of adsorption inside of single-walled nanotubes: opening the entry ports // *Chem. Phys. Lett.* — 2000. — V. 321, N 3–4. — P. 292–296.
28. *Dillon A. C., Gennett T., Jones K. M. et al.* A simple and complete purification of single-walled carbon nanotube materials // *Adv. Mater.* — 1999. — V. 11, N 16. — P. 1354–1358.
29. *Star A., Liu Y., Grant K. et al.* Noncovalent side-wall functionalization of single-walled carbon nanotubes // *Macromolecules.* — 2003. — V. 36, N 3. — P. 553–560.
30. *Zorbas V., Smith A. L., Xie H. et al.* Importance of aromatic content for peptide/single-walled carbon nanotube interactions // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — V. 127, N 35. — P. 12323–12328.
31. *Yang R., Tang Z., Yan J. et al.* Noncovalent assembly of carbon nanotubes and single-stranded DNA: an effective sensing platform for probing biomolecular interactions // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, N 19. — P. 7408–7413.
32. *Qiao R., Ke P. C.* Lipid-Carbon Nanotube self-assembly in aqueous solution // *J. Am.*

- Chem. Soc. — 2006. — V. 128, N 42. — P. 13656-13657.
33. *Khlobystov A. N., Britz D. A., Briggs G. A. D.* Molecules in carbon nanotubes // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38, N 12. — P. 901–909.
 34. *Alexander J. K., Fuss B., Colello R. J.* Electric field-induced astrocyte alignment directs neurite outgrowth // *Neuron Glia Biol.* — 2006. — V. 2, N 2. — P. 93–103.
 35. *Mazzatenta A., Giugliano M., Campidelli S. et al.* Interfacing neurons with carbon nanotubes: electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits // *J. Neurosci.* — 2007. — V. 27, N 26. — P. 6931–6936.
 36. *Malarkey E. B., Fisher K. A., Bekyarova E. et al.* Conductive single-walled carbon nanotube substrates modulate neuronal growth // *Nano Let.* — 2009. — V. 9, N 1. — P. 264–268.
 37. *Vanha A. R., Govindaraju S., Parsa K. V. L. et al.* Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer // *BMC Biotechnol.* — 2004. — V. 15, N 4. — P. 23–27.
 38. *Jakubiec B., Marois Y., Zhang Z. et al.* *In vitro* cellular response to polypyrrole-coated woven polyester fabrics: potential benefits of electrical conductivity // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1998. — V. 41, N 4. — P. 519–526.
 39. *Lovat V., Pantarotto D., Lagostena L. et al.* Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling // *Nano Let.* — 2005. — V. 5, N 6. — P. 1107–1110.
 40. *Heller D. A., Garga V., Kelleher K. J. et al.* Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces // *Biomaterials.* — 2005. — V. 26, N 8. — P. 883–889.
 41. *Supacane A., Cellot G., Prato M. et al.* Interactions between cultured neurons and carbon nanotubes: a nanoneuroscience vignette // *J. Nanoneurosci.* — 2009. — V. 1, N 1. — P. 10–16.
 42. *Mattson M. P., Haddon R. C., Rao A. M.* Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth // *J. Mol. Neurosci.* — 2000. — V. 14, N 3. — P. 175–182.
 43. *Nguyen-Vu T. D., Chen H., Cassell A. M. et al.* Vertically aligned carbon nanofiber architecture as a multifunctional 3-D neural electrical interface // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* — 2007. — V. 54, N 6 (Pt. 1). — P. 1121–1128.
 44. *Hu H., Ni Y., Mandal S. K. et al.* Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth // *J. Phys. Chem.* — 2005. — V. 109, N 10. — P. 4285–4289.
 45. *Matsumoto K., Sato C., Naka Y. et al.* Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes // *J. Biosci. Bioeng.* — 2007. — V. 103, N 3. — P. 216–220.
 46. *Larkum M. E., Waters J., Sakmann B., Helmchen F.* Dendritic spikes in apical dendrites of neocortical layer 2/3 pyramidal neurons // *J. Neurosci.* — 2007. — V. 27, N 34. — P. 8999–9008.
 47. *Cellot G., Cilia E., Cillipone S., Rancic V.* Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts // *Nat. Nanotechnol.* — 2009. — V. 4, N 2. — P. 126–133.
 48. *Lee W., Parpura V.* Wiring neurons with carbon nanotubes // *Front Neuroeng.* — 2009. — V. 2, N 8. — doi: 10.3389/neuro.16.005.2009.
 49. *Chen S., Yaari Y.* Spike Ca^{2+} influx upmodulates the spike afterdepolarization and bursting via intracellular inhibition of KV7/M channels // *J. Physiol.* — 2008. — V. 586, N 5. — P. 1351–1363.
 50. *Edell D. J., Toi V. V., McNeil V. M., Clark L. D.* Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* — 1992. — V. 39, N 6. — P. 635–643.
 51. *Craighead H. G., James C. D., Turner A. M. P.* Chemical and topographical patterning for directed cell attachment // *Cur. Opin. Sol. St. Mat. Sci.* — 2001. — V. 5, N 2-3. — P. 177–184.
 52. *McKenzie J. L., Waid M., Shi R., Webster T. J.* Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber material // *Biomaterials.* — 2004. — N 7–8. — P. 1309–1317.
 53. *Park K. H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F.* Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278, N 50. — P. 50212–50216.
 54. *Heginbotham L., Abramson T., MacKinnon R. A.* Functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K^+ channels // *Science.* — 1992. — V. 258, N 5085. — P. 1152–1155.
 55. *Hille B.* *Ionic channels of excitable membranes.* — Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001. — 730 p.
 56. *Lee H. J., Park J., Yoon O. J. et al.* Amine-modified single-walled carbon nanotubes protect neurons from injury in a rat stroke model // *Nature.* — 2011. — V. 6, N 2. — P. 121–125.
 57. *Stoll G., Jander S., Schroeter M.* Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions // *Progr. Neurobiol.* — 1998. — V. 56, N 2. — P. 149–171.
 58. *Jordan J., Segura T., Brea D. et al.* Inflammation as therapeutic objective in stroke // *Cur. Pharm. Des.* — 2008. — V. 14, N 33. — P. 3549–3564.
 59. *Inoue A., Sanes J. R.* Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates // *Science.* — 1997. — V. 276, N 5317. — P. 1428–1431.

**УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ
КАК НОВЕЙШИЕ МАТЕРИАЛЫ
ДЛЯ НЕЙРОИНЖЕНЕРИИ**

*Д. М. Ротко
С. В. Прилуцкая
Е. И. Богуцкая
Ю. И. Прилуцкий*

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

E-mail: psvit@bigmir.net

Создание новейших биосовместимых структур для взаимодействия с нервной тканью является важной комплексной проблемой, которая не может быть решена с применением традиционных технологий. Для ее разрешения необходимо использование последних достижений биотехнологии.

В обзоре обобщены данные литературы о структуре, химической функционализации, электрических и механических свойствах углеродных нанотрубок, которые делают возможным их практическое использование в нейроинженерии, в частности как эффективных субстратов для культивирования нейронов, синтеза нейропротекторов и как блокаторов ионных каналов. В частности, показано, что одностенные углеродные нанотрубки индуцируют повышенный рост отростков нейронов; рост нейронов на субстрате с многостенных углеродных нанотрубок сопровождается возрастанием межсетевой активности; одностенные углеродные нанотрубки блокируют калиевые потенциалуправляемые каналы, стабилизируя их конформацию в инактивированном состоянии после его индуцирования. Действие аминомодифицированных одностенных углеродных нанотрубок активирует защитные функции нервной ткани относительно ишемического повреждения и уменьшает области инфаркта миокарда, вызванного окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

Ключевые слова: углеродные нанотрубки, функционализация, электрические и механические свойства, выращивание нейронов, блокирование ионных каналов, нейропротекторные свойства.

**CARBON NANOTUBES
AS NEW MATERIALS
FOR NEUROENGINEERING**

*D. M. Rotko
S. V. Prylutska
K. I. Bogutska
Yu. I. Prylutskiyy*

Taras Shevchenko Kiyv National University

E-mail: psvit@bigmir.net

Creation of the newest biocompatible structures for interaction with nervous tissue is an important complex problem, which can't be decided with the use of traditional technologies. For its decision, drawing on the last accomplishments of biotechnology is needed.

The data on the structure, chemical functionalization, electrical and mechanical properties of carbon nanotubes, which enable their practical use in neural engineering, in particular as efficient substrates for growth of neurons, neuroprotectors synthesis and as ion channel blockers are summarized in the review. In particular, it is shown that single-walled carbon nanotubes induce an increased growth of neurons shoot; neuron growth on a substrate with multi-walled carbon nanotubes is accompanied by an increase of inter-network activity; single-walled carbon nanotubes block potential controlled potassium channels, stabilizing their conformation in the inactivated state after its induction. The action of amino-modified single-walled carbon nanotubes activates protective functions of the nervous tissue with respect to ischemic injury and reduces myocardium infarct area caused by occlusion of middle cerebral artery of rats.

Key words: carbon nanotubes, functionalization, electric and mechanical properties, growing of neurons, blocking of the ionic channels, neuroprotective properties.