

Министерство Здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов  
имени академика В.И. Шумакова»

На правах рукописи

Агапова Ольга Игоревна

Сканирующая зондовая нанотомография для исследования 3D структуры  
матриц для тканевой инженерии и регенеративной медицины

(14.01.24 – трансплантология и искусственные органы)

Диссертация на соискание  
ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель –  
д.б.н., профессор В. И. Севастьянов

МОСКВА

2015

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	10
1.1 Микроскопические методы исследования биоматериалов.....	10
1.1.1 Сканирующая электронная микроскопия.....	10
1.1.2 Трансмиссионная электронная микроскопия .....	11
1.1.3 Конфокальная микроскопия .....	13
1.1.4 Сканирующая зондовая микроскопия .....	15
1.1.5 Сканирующая зондовая нанотомография.....	17
1.1.6 Сравнительный анализ сканирующей зондовой микроскопии с существующими методами исследования структуры биоматериалов .....	18
1.1.7 Особенности проведения сканирующей зондовой микроскопии для гидратированных сред .....	20
1.2. Биополимерные конструкции для тканевой и регенеративной медицины.....	22
1.2.1 Биосовместимые полимеры для изготовления биоконструкций .....	22
1.2.1.1 Синтетические полимеры.....	23
1.2.1.2 Полимеры природного происхождения.....	27
1.2.2 Виды биоконструкций .....	36
1.3 Технологии изготовления 3D-матриков .....	45
1.4 Тканеспецифические матриксы .....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	50
2.1 Материалы.....	50
2.2 Экспериментальные животные .....	54
2.3 Методы изготовления матриков для исследования.....	53
2.3.1 Изготовление трехмерных полимерных матриков из рекомбинантного спидроина методом выщелачивания.....	55

2.3.2 Изготовление трехмерных матриц из фиброина шелка методом выщелачивания.....	55
2.3.3 Изготовление микрочастиц децеллюляризованного матрикса из печени крысы.....	56
2.3.4 Изготовление альгинатных сферических микроносителей.....	58
2.4 Оценка адгезии клеток гепатомы человека Hep G2 на поверхность микроносителей.....	59
2.5 Подготовка образцов альгинатных микроносителей для криоСЗНТ.....	61
2.6 Методы микроскопического исследования структуры матриц.....	61
2.7 Метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии для оценки адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на изготовленных матриксах в экспериментах <i>in vitro</i> .....	63
2.8 Экспериментальная модель травматического повреждения бедренной кости.....	63
2.9 Проведение статистического анализа полученных результатов.....	66
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1 Разработка технологии сканирующей зондовой крионанотомографии.....	67
3.1.1 Создание аппаратного комплекса для проведения криоСЗНТ.....	67
3.1.2 Последовательные этапы работы аппаратного комплекса при выполнении криоСЗНТ.....	78
3.2 Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка при комнатной температуре.....	85
3.2.1 Результаты исследования микро- и наноструктуры матриц с помощью сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии.....	85
3.2.2 Изучение адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на каркасных матрицах из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка в экспериментах <i>in vitro</i> .....	90
3.2.3 Результаты имплантации каркасных матриц в костную ткань	

крыс в экспериментах <i>in vivo</i> с моделированием повреждения бедренной кости .....	91
3.3. Разработка тканеспецифического мелкодисперсного альгинатного матрикса и исследование его микро- и наноструктуры с помощью сканирующей зондовой крионанотомографии .....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	117
ВЫВОДЫ .....	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	121
БЛАГОДАРНОСТИ .....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Дефицит донорских органов в трансплантологии не позволяет обеспечить ими всех нуждающихся, поэтому разработка альтернативных методов восстановления поврежденных органов и тканей является актуальной и необходимой [1] [2]. На успешную имплантацию и регенерацию оказывает существенное влияние подбор адекватного материала для изготовления биоискусственных конструкций [3]. В связи с этим важную роль играет изучение наноструктуры того или иного используемого биоматериала, от которой в значительной степени зависит биологическая и функциональная активность изделия. Методика сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), предполагающая использование сканирующего зондового микроскопа и ультрамикротомы в одном устройстве, позволяет изучать биологические объекты в трехмерном виде, с минимальными изменениями их природной структуры, характеристик и свойств, что является её преимуществом перед другими методами микроскопии [4] [5]. Использование замораживания в присутствии криопротекторов для анализа трехмерной структуры методом сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях позволяет получить уникальную информацию о нативной структуре клеток, тканей, искусственных гидрогелевых биоконструкций с наноразрешением.

Объектами настоящего исследования являются пористые биodeградируемые матрицы из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина, а также альгинатные клеточные микроносители, поверхность которых модифицирована микрочастицами девитализированного матрикса печени для повышения адгезии эукариотических клеток. Наноструктура и ее влияние на биологические свойства этих матриц и микроносителей ранее не были изучены, поэтому настоящее исследование посвящено сравнительному изучению наноструктуры каркасных и

мелкодисперсных матриц методом сканирующей зондовой нанотомографии как при комнатной температуре, так и в криогенных условиях.

### Степень разработанности темы исследования

Проведенные в ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России серии исследований по разработке метода сканирующей зондовой нанотомографии показали принципиальную возможность анализа трехмерной структуры биологических объектов при комнатной температуре. Были разработаны методические подходы к изучению микро- и наноструктуры биоматериалов и фиксированных тканей. Возможность разработки технологии СЗНТ в криогенных условиях оставалась под вопросом, что и послужило основанием для выполнения настоящей работ.

### Цель работы

Целью работы является изучение 3D микро- и наноструктуры пористых и мелкодисперсных матриц, перспективных для тканевой инженерии и регенеративной медицины, с помощью сканирующей зондовой нанотомографии для установления взаимосвязей между наноструктурными и биологическими свойствами имплантатов.

### Задачи исследования

1. Разработать технологию сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях для анализа структурных свойств водосодержащих материалов и тканей.
2. Разработать тканеспецифический мелкодисперсный матрикс из альгинатных микросфер, модифицированных микрочастицами девитализированной ткани печени.

3. Исследовать микро- и наноструктуру трехмерных пористых биоматриков из фиброина шелка и рекомбинатного спидроина методом сканирующей зондовой нанотомографии при комнатной температуре.
4. Исследовать микро- и наноструктуру мелкодисперсных альгинатных и тканеспецифических матриков методом сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях.
5. Изучить влияние особенностей структуры биополимерных матриков на их биологические свойства *in vitro* и *in vivo* в экспериментальной модели травматического повреждения кости у крыс.

#### Научная новизна

1. Разработана технология сканирующей зондовой крионанотомографии для выполнения наномасштабных исследований водосодержащих материалов и тканей.
2. Методом сканирующей зондовой нанотомографии при комнатной температуре установлены существенные различия в наноструктуре каркасных матриков из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка.
3. Установлено, что матриксы из рекомбинантного спидроина с более высокой нанопористостью и взаимосвязанностью пор по сравнению с матриксами из фиброина шелка, обладают более высокой биологической активностью в экспериментах с восстановлением поврежденной бедренной кости у крыс.
4. Разработан тканеспецифический мелкодисперсный матрикс из альгинатных микросфер, модифицированных микрочастицами девитализированной ткани печени.
5. Методом сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях установлена более высокая наноструктурированность поверхности мелкодисперсного матрикса из альгинатных микросфер, модифицированных микрочастицами девитализированной ткани печени, по сравнению с

немодифицированными поверхностями этого матрикса, что сопровождается более высокой адгезией клеток, на примере гепатомы человека Hep G2.

### Теоретическая и практическая значимость

Результаты предварительных исследований биологической активности пористых трехмерных матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка, а также мелкодисперсного тканеспецифического матрикса из альгинатных микросфер, поверхность которых модифицирована фрагментами девитализированной ткани печени, позволяют рекомендовать данные изделия для проведения доклинических исследований с целью их использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Разработана и внедрена в практику ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России технология сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях для скрининга биоматериалов.

### Методология и методы исследования

В ходе выполнения работы использован комплекс физико-химических и биологических методов исследования.

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях пригодна для исследования трехмерной наноструктуры водосодержащих материалов и тканей.
2. Технология сканирующей зондовой нанотомографии позволяет проводить количественный анализ трехмерной наноструктуры биополимерных матриксов.



3. Степень и характер нанопористости матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка, изготовленных методом выщелачивания, влияют на их биологическую активность при имплантации в поврежденную ткань бедренной кости крысы.

4. Модификация поверхности альгинатных микросфер фрагментами девитализированной ткани печени повышает их адгезивные свойства для клеток гепатомы человека Hep G2.

#### Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, использованием современных методов исследования и методов статистической обработки.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на межинститутских семинарах ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России (2013 г., 2014 г., 2015 г.), XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, 13-17 апреля 2015г., V Международной Конференции «ФизтехБио» МФТИ, 29-30 апреля 2015г., а также «Nanotech 2015», Washington, DC, USA, June 14-17, 2015.

Часть работы выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014-2020 Минобрнауки России (Соглашение № 14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0001).

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ БИОПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В настоящей главе приведены данные, отражающие современное состояние проблем изготовления биodeградируемых конструкций для регенеративной медицины, а также описаны характеристики существующих микроскопических методов изучения структуры биоматериалов, отражающие возможности и преимущества новой технологии сканирующей зондовой нанотомографии.

## 1.1 Микроскопические методы исследования биоматериалов

Для изучения структуры и свойств тех или иных биоматериалов, а также конструкций из них, существуют различные методы микроскопии, которые выбираются в зависимости от особенностей объекта и цели исследования.

### 1.1.1 Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) представляет собой метод, в котором изображение образца формируется по точкам в результате взаимодействия электронного пучка (зонда) с поверхностью объекта [6]. Электронный пучок перемещается по поверхности, последовательно облучая каждую точку объекта, а синхронное построение изображения на экране происходит благодаря ответным сигналам различной физической природы (рентгеновское излучение, отраженные и вторичные электроны, свет, поглощенный ток), возникающим при взаимодействии электронов зонда с веществом [7]. При нормальном атмосферном давлении электронный пучок не может фокусироваться из-за своего рассеивания и поглощения, поэтому сканирующий электронный микроскоп – вакуумный прибор. СЭМ является одним

из основных инструментов для получения знаний в разделе наук о материалах благодаря высокой информативности, универсальности, простоте и удобстве в управлении оборудованием [8]. СЭМ обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами: характеризуется большей разрешающей способностью, а также глубиной резкости по сравнению с традиционной световой микроскопией; благодаря трехмерному представлению изображения метод отличается легкостью в его интерпретации; существует возможность подключать дополнительные приборы для исследования в микродиапазоне. Кроме того, метод не предполагает очень сложную пробоподготовку [9], а по сравнению со сканирующей зондовой микроскопией дает возможность изучать участки образца большей площади, исследовать поверхности, обладающие сильным рельефом, применять больший диапазон увеличений, а также получать информацию о слоях, которые прилегают к поверхности [10]. К недостаткам метода можно отнести то, что электронные микроскопы дороги в обслуживании и производстве, кроме того, они должны работать в помещениях без вибраций и внешних электромагнитных полей.

Технология корреляционной микроскопии представляет собой объединение исследований в одном цикле образцов с помощью оптического и электронного микроскопа, что открывает новые возможности изучения объектов биологии, материаловедения, геологии, минералогии, криминалистики, при этом экономя время работы. В перспективе, корреляционная микроскопия может совместить в одном устройстве несколько микроскопов, включая флуоресцентные со сверхразрешением, конфокальные, просвечивающие электронные, гелиево-ионные микроскопы, что при правильном выборе новейших приложений, зондов, при адекватной подготовке методологии, техники и программных разработок позволит реализовать весь потенциал подобных конструкций в изучении образцов [11].

### 1.1.2 Трансмиссионная электронная микроскопия

Принцип работы трансмиссионного (просвечивающего) электронного микроскопа [12] состоит в том, что тонкопленочный образец просвечивается пучком ускоренных электронов с энергией, равной 50-200 кэВ. Электроны отклоняются атомами объекта на малые углы, другие проходят сквозь него с небольшими энергетическими потерями, после чего попадают в систему магнитных линз, формирующих на люминесцентном экране светлорольное изображение внутренней структуры объекта [13]. Данным методом получается разрешение порядка 0,1 нм (увеличение до  $1,5 \times 10^6$  раз) [14]. Контраст изображения находится в зависимости от диаметра задерживающих рассеянные электроны диафрагм. Во время исследования сильно рассеивающих объектов лучше использовать темнопольные изображения. Стоит отметить, что способ подготовки образца сильно влияет на разрешение и информативность изображений, получающихся с помощью ТЭМ [15]. Во время изучения тонких пленок и срезов полимерных материалов и биологических тканей контраст увеличивается пропорционально толщине, но разрешение понижается. В связи с этим следует использовать тонкие пленки и срезы (до 0,01 мкм), обрабатывая их соединениями тяжелых металлов, избирательно взаимодействующих с элементами микроструктуры, для повышения контраста. Используя ультрамикротомы, получают срезы полимерных материалов необходимой толщины, а пористые и волокнистые материалы пропитываются и заливаются эпоксидными компаундами [16]. Исследуя форму и размеры микрочастиц (вирусы, макромолекулы), они наносятся в виде суспензий на проницаемые для электронного луча пленки-подложки из формвара (поливинилформаль) или аморфного углерода, а контрастируют методом оттенения или негативного контрастирования [17]. ТЭМ дает возможность визуализировать как трехмерную структуру объекта, так и динамику биологических нанообъектов с разрешением от 2-5 нм до атомного (0,2 нм) [18]. Кроме того, в ТЭМ нет лимитирующего размера частиц, наличие кристаллов не является обязательным требованием, также стоит отметить, что используется малое количество материала, а криомодификация метода делает возможным наблюдение биологической молекулы в

нативном водном окружении в состоянии, которое схоже с физиологическим [19]. Возможность быстрого документирования ТЭМ изображений также является преимуществом данного метода: оцифровка изображения осуществляется уже в процессе его получения. При этом происходит контролирование содержания сохраняемого кадра, фокусировки, влияние дрейфа; управление контрастом ТЭМ-изображения, что помогает избежать проблемы с недостаточным контрастированием срезов. Также имеется возможность работать с диафрагмами объектива большего диаметра, понижая влияние дифракционных ошибок и астигматизма, используется цифровая фильтрация (коррекция фона, автоматическое вычитание дефектов сцинтиллятора), отсутствует ограничение в количестве кадров [20]. Недостатком методики ТЭМ является невысокое разрешение первичного изображения, которое компенсируется повышением ТЭМ-увеличения, сужая при этом поле зрения, а также из-за автоматической регулировки чувствительности нет возможности денситометрических измерений, т. е. измерять и сравнивать электронную плотность различных участков изображения [21].

### 1.1.3 Конфокальная микроскопия

Конфокальная микроскопия является методом оптической микроскопии с высоким контрастом благодаря использованию диафрагмы, которая отсекает поток фонового рассеянного света [22]. В конфокальном микроскопе происходит регистрация изображения одной точки образца в каждый момент времени, а полноценное изображение формируется сканированием посредством перестройки оптической системы или перемещением объекта [23]. Для регистрации света от одной точки после объективной линзы имеется диафрагма малого размера, её расположение таково, что свет, который излучает анализируемая точка, проникает через диафрагму и регистрируется, в то время как свет остальных точек диафрагма задерживает [24]. Также высокий контраст получается благодаря тому, что осветителем производится фокусировка света в исследуемой точке,

избегая равномерной освещенности поля зрения. Этого можно добиться, разместив фокусирующую систему за объектом, при условии, что образец прозрачный. В связи с тем, что объективные линзы дорогие, альтернативой могут быть светоделительные пластинки, их нужно применять так, чтобы фокусировка падающего и отражённого света осуществлялась одним объективом. Подобная схема делает юстировку более легкой. Повышая контраст изображения за счет сужения отверстия в диафрагме, снижается его яркость, поэтому необходимо применять высокочувствительные регистрирующие системы, а также находить баланс между яркостью и контрастом. Благодаря высокому разрешению и контрасту, конфокальная микроскопия довольно часто применяется в изучении структуры клеток, их органелл: цитоскелета, эндоплазматического ретикулума, лизосом, митохондрий, ядра, а также может применяться для определения расположения веществ в клетке [25] [26] [27]. Кроме того, конфокальная микроскопия используется для изучения динамических процессов в живых клетках, например, транспорта биологически-активных соединений [28]. С помощью данного метода микроскопии можно получить объемную реконструкцию объекта, записав в памяти компьютера серию оптических срезов. Также, возможно получение нескольких изображений виртуальных срезов клетки, которые впоследствии могут быть объединены в трехмерную модель. Всё это реализуемо благодаря лазеру, чей луч может фокусироваться в любой точке объекта [29]. Стоит отметить, что образец при этом должен являться флуоресцентно активным, другими словами, он должен излучать свет с длиной большей, чем длина волны того света (лазера), который на него попадает. За счёт улавливания микроскопом этого света и строится изображение [30] [31] [32]. Также электромеханическое устройство содержит оптический фильтр, который пропускает луч лазера, отражая свет с более длинными волнами на диафрагму («пинхол»), отсекающую ненужный фоновый свет и снижающую воздействие нижележащих оптических слоев на четкость изображения. Оцифровывается информация фотоприемником, который находится за диафрагмой. Использование в конфокальной системе спиннинг-диска дает

возможность получать изображение не одной точки, а линии на образце за один акт работы. Т.о. конфокальный микроскоп обладает уникальными возможностями: с его помощью можно изучать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности и оценивать результаты в четырёх направлениях — высоте, ширине, глубине и во времени, а использование специальной приставки делает возможным исследование при разных температурах [33] [34].

#### 1.1.4 Сканирующая зондовая микроскопия

Сканирующая зондовая или атомно-силовая микроскопия (СЗМ) представляет собой вид микроскопии, с помощью которой можно исследовать рельеф поверхности с разрешением от десятков ангстрем до атомарного [35]. Основа СЗМ – силовое взаимодействие атомов зонда и поверхности (силовое взаимодействие атомов), которое регистрируется специальными зондовыми датчиками – упругими консолями, на конце которых расположен острый зонд [36]. Зонды обычно имеют коническую или пирамидальную форму с радиусом кривизны острия от десятка нанометров до размера одного атома и высотой от 1 до 20 мкм, изготавливаются в основном из Si и Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Располагается зонд на свободном конце консоли (кантилевера), представляющей собой упругую пластинку, по её отклонению оценивается сила взаимодействия острия с образцом [37]. Влияние острия на итоговое изображение зависит от угла его схождения и радиуса кривизны: чем меньше радиус и угол, тем меньше влияние и выше разрешение получаемого изображения. Силы межатомного взаимодействия действуют при приближении острия к объекту. От расстояния между ними зависит то, будет ли это сила притяжения или сила отталкивания, поэтому в атомно-силовом микроскопе существует несколько режимов сканирования: контактный (*contact mode*), бесконтактный (*non-contact mode*), полуконтактный или прерывистый (*tapping mode*). При контактном режиме острие подходит очень близко к образцу, при этом рельеф поверхности формируется или в режиме

постоянной высоты, т. е. кантилевер передвигается в горизонтальной плоскости, регистрируется его отклонение в каждой точке), или в режиме постоянной силы, когда путем системы обратных связей сила взаимодействия кантилевера с образцом (отклонение (прогиб) кантилевера) поддерживается постоянной. При бесконтактном режиме расстояние между зондом и образцом должно быть таким, чтобы отталкивание не имело большого значения, но и не настолько большим, чтобы взаимодействие отсутствовало. Режим прерывистого контакта дает возможность улучшить качество итогового изображения и применяется чаще всего при изучении мягких материалов (полимерные цепи, биообъекты). При таком режиме совершаются вынужденные механические колебания кантилевера с частотой десятки и сотни килогерц (близка к резонансной) и амплитудой около 100 нм. Итоговое трёхмерное изображение поверхности в СЗМ формируется после математической обработки цифровой информации – двумерных массивов целых чисел (например, характеризующих отклонения кантилевера в каждой точке скана). Подготовка образца имеет важное значение при получении качественного изображения. Иногда подготовка не требуется, например, если образец – поверхность графита. Но при изучении биохимических веществ и молекул требуется их адсорбция на соответствующей подложке. Изучение биологических объектов в водной среде дает возможность исследовать процессы *in vitro* [38]. С помощью СЗМ можно наблюдать динамику различных процессов, например, деление и рост бактериальных клеток [39], [40]. В медицине такой метод может использоваться для диагностики заболеваний, например, при изучении структуры поверхности мембран эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом второго типа [41], для диагностики ортопоксовирусов, в частности, вируса коровьей оспы [42]. СЗМ позволяет изучать как проводящие, так и непроводящие поверхности, кроме того дает возможность манипулировать атомами. Также среди преимуществ СЗМ можно выделить то, что в результате исследования получается истинный трехмерный рельеф поверхности, непроводящая поверхность не требует нанесения проводящего металлического покрытия. Большинство режимов метода осуществляются на воздухе или в



жидкости без применения вакуума [43], что играет большую роль в изучении биомакромолекул и живых клеток. В условиях сверхвысокого вакуума СЗМ способна на атомное разрешение [44]. К недостаткам метода можно отнести небольшой размер поля сканирования (максимальный перепад высот равен нескольким мкм, наибольшее поле сканирования составляет порядка 150 мкм<sup>2</sup>), появление артефактов на изображении если зонд выбран неправильно, искажение изображения тепловым дрейфом из-за низкой скорости развёртки СЗМ [45], [46]. Кроме того, снижать качество изображения могут нелинейность, гистерезис и ползучесть (крип) пьезокерамики сканера [47]. Для устранения искажений современные СЗМ используют программное обеспечение и сканеры с замкнутыми следящими системами [48].

#### 1.1.5 Сканирующая зондовая нанотомография

Сканирующая зондовая нанотомография (СЗНТ) представляет собой метод, предполагающий объединение техники ультрамикротомии с последовательным анализом наноструктуры поверхности после произведенного среза методом сканирующей зондовой микроскопии. Он дает возможность осуществлять СЗМ-измерения поверхности блока изучаемого материала, не передвигая образец, непосредственно после сверхтонкого среза в рабочем цикле ультрамикротомы [49]. Точность и надежность измерений возрастает благодаря тому, что на поверхности блока практически отсутствуют артефакты, которые возникают при проведении механического воздействия (сжатие или растяжение, деформация) [50]. Чтобы получить СЗМ-изображений одного и того же участка поверхности, осуществляются последовательные срезы объекта с указанной толщиной (от 20 нм) и СЗМ-измерения морфологии поверхности и карт распределения физических свойств исследуемых образцов после каждого среза. В течение одного эксперимента можно получить несколько десятков изображений благодаря тому, что автоматизация и оптимизация цикла дает возможность получать до 10 последовательных изображений в час. Метод сканирующей зондовой

нанотомографии (СЗНТ) позволяет реконструировать трехмерные структуры образцов, получать информацию о трехмерной морфологии, локальном распределении ряда физических свойств, о трехмерном распределении компонент (наночастиц, кластеров) в объеме нано- и биоматериалов [51] [52].

#### 1.1.6 Сравнительный анализ сканирующей зондовой микроскопии с существующими методами исследования структуры биоматериалов

Для микроскопических исследований конструкций из полимерных материалов с витализированными клетками, биodeградируемых клеточных носителей, гидратированных гелевых биоматериалов необходимо сохранять их нативную структуру на уровне отдельных макромолекул как во время измерений, так и в процессе подготовки объекта.

Методы просвечивающей электронной микроскопии и электронной томографии [53] [54] [55] [56] [57], их сочетание с корреляционными оптическими методиками [58] [59] [11] имеют как свои достоинства и преимущества, так и недостатки, например, высокая стоимость оборудования, трудоемкость работы [60] [61], а также ограничения, связанные с физическими принципами измерений и формированием контраста в этих методах. Кроме того, электронная микроскопия дает возможность восстанавливать трехмерную структуру объекта при срезах не более 300 нм, что ограничивает возможности исследования клеточных носителей.

Объединение техники сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и травления поверхности фокусированным ионным пучком (ФИП) является одним из перспективных методов. Восстановление трехмерной структуры осуществляется с помощью последовательных СЭМ-изображений поверхности, которые получают после стравливания слоев материала ионным потоком с поверхности объекта. Метод эффективен при работе с большим количеством материалов и объектов [62] [63], но воздействие электронных и ионных пучков, а

также вакуумные условия могут оказывать структурные изменения в биологических образцах, что является недостатком при исследовании [64].

Для изучения полимеров, клеточных носителей, биоматериалов на микроуровне [65] [66] [67] широко применяется рентгеновская томография, однако, она не позволяет получать на такого рода объектах разрешение в десятки нм, кроме того, для максимального разрешения в данном методе размер образца не должен превосходить 1 мкм [68] [69].

Такие ограничения рентгеновской и электронной томографии весьма неудобны при анализе биологических и полимерных материалов из легких химических элементов. Избежать подобных ограничений возможно с помощью методов сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). Такой анализ структуры поверхности позволяет осуществлять исследование с наноразрешением [70] [71], при этом не разрушая образец химической фиксацией, не нанося повреждения электронным пучком, а также помогает избежать слабого электронно-микроскопического контраста [72] [73]. Кроме того, СЗМ позволяет анализировать поверхность несколькими методиками: изображение фазы, распределение электрической проводимости [74] [75], метод измерения силовых кривых, магнитная [76] или электростатическая силовая микроскопия, химическая силовая микроскопия [77] [78].

Принцип сканирующей зондовой нанотомографии заключается в серии последовательных измерений поверхности образца после удаления сверхтонких поверхностных слоев материала, после которых выполняется воссоздание трехмерного томографического изображения путём объединения серий двухмерных СЗМ-изображений. Существует несколько способов удаления верхних слоев образца: плазменное или химическое травление, механическое удаление с использованием жесткого зонда СЗМ, срез ультрамикротомом.

Впервые, томографическая трехмерная реконструкция на основе последовательных измерений СЗМ была сделана при помощи плазменного травления [79], а также защищена патентами [80] [81]. Плазменное травление проиоводилось *ex situ*, что предполагало перемещение образца из СЗМ в установку

для травления и обратно с дальнейшей локализацией области исследования с точностью до десятков нм, что является недостатком данной методики. Спустя некоторое время, благодаря усовершенствованию методики и установки, стало возможно химическое [82] или плазменное травление поверхности образца, оставляя его в установке СЗМ. Такая методика использовалась при изучении трехмерных структур полимерных композитов, а также кости человека [83] [84].

Недостатком удаления верхних слоев образца плазменным травлением при низком давлении является отличие скорости травления различных компонентов или фаз в сложных гетерогенных, гибридных полимерных системах, что ведет к ошибке определения вертикального положения зон поверхности при реконструкции. В связи с этим такая методика не подходит для исследования микро- и нанопористых биоматериалов.

Другая методика предполагает последовательное удаление тонких слоев поверхности образца зондом СЗМ и дальнейшими измерениями поверхности. В одном из исследований структуры, состоящей из многостенных углеродных нанотрубок в матрице из оксида кремния, проводящий алмазный зонд, который легировали бором, был использован для удаления слоев и измерения образца [85]. Такой подход осуществим на стандартной установке СЗМ, но не подходит для мягких полимерных и биополимерных материалов, а также для микро- и нанопористых материалов.

#### 1.1.7 Особенности проведения сканирующей зондовой микроскопии для гидратированных сред

В данной технологии используется метод анализа биоконструкций, предполагающий предварительное замораживание объекта исследования. В связи с этим, стоит обратить внимание, что очень важен правильный выбор методики замораживания, а также подбор криопротекторов, помогающих в наибольшей степени сохранить нативную структуру образца в процессе исследования.

Криопротекторы представляют собой вещества, которые защищают живые клетки и ткани от повреждения при замораживании. Криопротекторы используются при криоконсервации - хранении живых объектов при низких температурах (кровь, эмбрионы, изолированные органы, клеточные культуры) [86] [87]. Во время замораживания живые объекты подвергаются обезвоживанию, а также негативному воздействию внутриклеточного льда, поэтому действие криопротекторов направлено на снижение влияния этих двух факторов на объект полностью или частично. Кристаллизация воды внутри клетки характерна для высокой скорости замораживания ( $>10\text{K}/\text{мин}$ ) и является причиной увеличения внутреннего объема мембранных структур (лизосомы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи), что приводит к их разрушению. Вымораживание воды во внешней среде и возрастание концентрации растворенных в ней веществ приводит к потере воды клеткой. Обезвоживание клетки происходит при низкой скорости замораживания ( $<10\text{K}/\text{мин}$ ). Несмотря на то, что существует довольно большое количество веществ с криопротекторными свойствами, в медицине и лабораторной практике применяется лишь десяток подобных соединений. По принципу действия криопротекторы можно разделить на проникающие и непроникающие [88]. Проникающие криопротекторы – вещества, которые проникают вглубь клетки и препятствуют образованию кристаллов льда путем формирования водородных связей с молекулами воды. Наиболее часто используемыми проникающими криопротекторами являются диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль [89]. Непроникающие криопротекторы не проходят внутрь клеток и, предполагается, что они снижают скорость роста кристаллов льда, а также защищают клетку от осмотических перепадов. Существует две группы веществ, относящихся к непроникающим криопротекторам: олигосахариды, среди которых наиболее часто применяются сахароза и трегалоза [90], и высокомолекулярные соединения, из них наиболее часто используют фиколл, альбумин, поливинилпирролидон. Раствор 10%-ной сахарозы использовался ранее в экспериментах для замораживания пробиотических бактерий [91]. Стоит отметить, что непроникающие

криопротекторы часто используются как дополнительные компоненты в растворах проникающих криопротекторов, так как применение лишь одних непроникающих может быть недостаточным [92]. После размораживания, при условии дальнейшего использования, живой объект должен быть освобожден от криопротекторных веществ. Одними из наиболее подходящих криопротекторов для эукариотических клеток млекопитающих являются этиленгликоль [93], пропиленгликоль [94], глицерин [95], диметилсульфоксид [96], которые вводятся с раствором сахарозы. Исследования показали, что гидроксипропилцеллюлоза может успешно использоваться в качестве криопротектора при витрификации мышинных и человеческих бластоцист [97]. Этиленгликоль был использован в качестве хорошего криопротектора для медленного замораживания эмбрионов млекопитающих (человека и мышей) [98]. Эксперименты показали, что использование растворов на основе 10% пропиленгликоля и 20% перколла в качестве криопротекторов подходит для криоконсервации крысиных эмбрионов ранней стадии [99].

## 1.2 Биополимерные конструкции для тканевой и регенеративной медицины

### 1.2.1 Биосовместимые полимеры для изготовления биоконструкций

Выбор материала для регенеративной медицины, а также технология изготовления биоконструкций из него зависит от области применения: костная ткань, кровеносные сосуды, кожные покровы, мышечная ткань, нервные волокна. Для успешного использования биоматериал должен обладать определенными химическими, биологическими и механическими свойствами [100] [101]. К требуемым химическим свойствам можно отнести такие характеристики, как отсутствие вредных химических реакций с тканями организма, а также межтканевыми жидкостями, резорбция с контролируемой скоростью в организме [102]. Необходимые механические свойства заключаются в прочности конструкции, возможности осуществлять хирургические манипуляции.

Главной биологической характеристикой для материала является его биосовместимость с организмом. Биоматериалы можно разделить по отклику организма на его имплантацию. Материал может быть 1) токсичным, и в этом случае окружающие его ткани будут отмирать; 2) биоинертным, и тогда образуется соединительная волокнистая ткань; 3) биоактивным, благодаря чему идёт образование новой ткани; 4) биорезорбируемым – конструкция из биоматериала заменяется собственной тканью организма, обладающей всеми присущими ей характеристиками и функциями [103].

Полимерные соединения являются одним из основных материалов для создания имплантируемых конструкций [104]. Они начали использоваться для медицинских целей в 60-х годах двадцатого века. По происхождению биоматериалы делятся на две большие группы: натуральные, имеющие природное происхождение (коллаген, альгиновая кислота, белок паутины, шелк), и синтетические, созданные искусственным путем (полилактиды, полигликолиды, полиэтилен, полипропилен, полистирол).

#### 1.2.1.1 Синтетические полимеры

Биодеградируемые синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот начали использоваться для создания имплантируемых конструкций одними из первых в области тканевой инженерии.

**Полигликолевая кислота (ПГА).** Представляет собой биоразлагаемый, термопластичный полимер, является самым простым линейным алифатическим полиэфиром. ПГА - кристаллическое вещество белого цвета, его плотность составляет  $1,530 \text{ г/см}^3$  при  $25^\circ\text{C}$ , температура плавления равна  $225\text{-}230^\circ\text{C}$ , а стеклования –  $25\text{-}40^\circ\text{C}$ . Полигликолевая кислота обладает повышенной кристаллическостью, равной приблизительно 45-55%, в связи с чем она нерастворима в воде [105]. Высокомолекулярные формы также нерастворимы в большинстве органических растворителей, таких как этилацетат, ацетон, хлороформ. Однако, формы с низким молекулярным весом обладают другими

физическими свойствами, что сказывается на их растворении. Тем не менее, полигликолид растворяется в таких фторированных растворителях, как гексафторизопропанол и сесквигидрат гексафторацетона. Они используются в том случае, если надо приготовить раствор полимера с высоким молекулярным весом для электроспиннинга или изготовления пленки [106].

В настоящее время ПГА широко применяется для создания рассасывающегося хирургического шовного материала [107] [108]. Хирургическая нить образуется путем скручивания волокон из ПГА. Одним из преимуществ этого материала является способность присоединения к нему дополнительных химических цепочек, приводящих к появлению новых свойств, что увеличивает диапазон применения. Благодаря своей кристаллической структуре, ПГА нерастворим в воде, его пластичность возрастает с повышением влажности, что позволяет легко формировать биоконструкции [109]. Одним из главных преимуществ хирургических нитей из полигликолида является то, что они не требуют удаления после операции, т.е. отсутствуют дополнительные травмы для прооперированной области, и нити не оказывают негативного влияния на окружающие ткани организма. Внутри организма материал полностью рассасывается в течение нескольких месяцев, растворяясь до углекислоты и воды.

**Полилактид.** Представляет собой алифатический полиэфир, мономером которого выступает молочная кислота. Полимер обладает термопластичностью, является биоразлагаемым и биосовместимым [110]. Полилактиды применяются для изготовления биоразлагаемых упаковок, средств личной гигиены, из них конструируются винты и пластины, фиксирующие переломы, хирургические нити, штифты [111]. Также полилактид служит в качестве исходного материала для печати в 3D – принтерах [112]. Из полилактида изготавливают лекарственные препараты, где основу оболочки составляет полилактид в сочетании с противомикробными веществами в различных концентрациях, что способствует медленному и постепенному высвобождению препарата, а также предотвращению роста микроорганизмов [113].



**Поликапролактон (ПКЛ)** – биоразлагаемый полиэфир, полимер  $\epsilon$ -капролактона. Температура плавления ПКЛ составляет 59-64°C [114]. Поликапролактон устойчив к воде, растворителям и различным маслам, а также характеризуется низкой вязкостью и легко поддается обработке. При смешивании с крахмалом снижается его стоимость и повышается биоразлагаемость [115]. В медицине ПКЛ используется как шовный материал [116], а также применяется для изготовления носителей для доставки лекарств в организме [117], а в косметологии – для изготовления филлеров [118] [119].

**Полиэтилентерефталат (ПЭТФ).** Биоинертный термопластик, представляющий собой в аморфном состоянии твердое, бесцветное и прозрачное вещество, а в кристаллическом – непрозрачное и белое [120]. При нагревании до температуры стеклования, которая равна 70°C, происходит его переход в прозрачное состояние, в котором материал остается при резком охлаждении. Температура плавления ПЭТФ составляет 260°C [121]. Длина молекулы полимера влияет на вязкость ПЭТФ, и чем больше вязкость, тем ниже скорость кристаллизации [122] [110]. Полиэтилентерефталат практически нерастворим в воде и органических растворителях, устойчив к кислотам и растворам слабых щелочей, довольно прочен, износостоек и является диэлектриком. В области медицины ПЭТФ используется для изготовления протезов костных сосудов [123], сухожилий, связок, клапанов сердца [124]. Благодаря изменению химического состава боковых групп существует возможность производить из ПЭТФ материалы с разной скоростью деградации [122].

**Полиамиды.** Представляет собой пластмассу, в основе которой - линейные синтетические высокомолекулярные соединения. Алифатические полиамиды в расплавленном состоянии имеет низкую вязкость в небольшом температурном интервале [125], а температура плавления и кристаллизации равна 210-260 °C [126]. Высокая температура плавления объясняется тем, что между макромолекулами образуются водородные связи. Полиамиды характеризуются гидрофильностью [127], и их водопоглощение оказывает существенное влияние

на ударную вязкость и прочность [128]. Из полиамидных волокон изготавливают хирургические нити, протезы кровеносных сосудов [129] [130].

**Полиуретаны.** Представляют собой гетероцепные полимеры, которые являются синтетическими эластомерами и содержат незамещенные или замещенные уретановые группы. [54]. Полиуретаны устойчивы к воздействию кислот, минеральных масел, окислителей и гидролитически более стойкие, чем полиамиды. В связи с этим полиуретаны нашли широкое применение в автомобилестроении, изготовлении мебели (лаковые покрытия), строительстве (вибро- и шумозащитных материалы) [131], сельском хозяйстве, электронике, производстве товаров культурно-бытового назначения (искусственная кожа, клеи) [132]. В медицине полиуретаны применяют для изготовления имплантатов [133] [134], катетеров и трубок общего назначения [135], хирургических простыней или салфеток.

**Силиконы (полиорганосилоксаны).** Представляют собой высокомолекулярные кислородсодержащие кремний-органические соединения, включающие в себя также полиорганосилоксаны (силиконовые масла, гидрофобизаторы, низкомолекулярные каучуки) и кремнийорганические мономеры (силаны) [136] [137]. На основе молекулярного веса, степени сшивки, а также вида и количества органических групп у атомов кремния силиконы можно разделить на три группы: силиконовые жидкости, у которых менее 3000 силоксановых звеньев, силиконовые эластомеры, содержащие от 3000 до 10000 звеньев и силиконовые смолы с более, чем 10000 силоксановых звеньев, и обладающие довольно высокой степень сшивки [61] [138]. Силиконы обладают большим количеством уникальных свойств. Силиконы увеличивают или уменьшают адгезию белков и клеток, могут придавать материалам гидрофобность, сохраняют свойства при экстремальных температурах, а также их быстрых перепадах, обладают диэлектрическими качествами, химически и биологически инертны, эластичны, экологичны и нетоксичны [139] [140]). Изделия из силиконов резистентны к воздействию радиации, ультрафиолетового излучения, электрических полей.

### 1.2.1.2 Полимеры природного происхождения

Полимеры природного происхождения при изготовлении биоконструкций имеют значительные преимущества перед синтетическими полимерами, поскольку продукты распада таких материалов в организме являются естественными метаболитами, участвующими в биохимических процессах внутри клеток, и т.о. биосовместимость природных полимеров значительно выше. При этом их механические характеристики не уступают свойствам изделий из синтетических полимеров.

**Коллаген.** Представляет собой фибриллярный структурный белок межклеточного матрикса, который является самым распространенным в организме млекопитающих (25-35% от всего количества белка в организме) и служит основой соединительной ткани, придавая ей эластичность и прочность. Молекула коллагена – это правозакрученная спираль из трёх  $\alpha$ -цепей, один виток которой включает три аминокислотных остатка. Эта структурная единица коллагена носит название тропоколлаген. Сдвинутые на  $\frac{1}{4}$  относительно друг друга ступенчатые параллельные ряды молекул тропоколлагена являются основой структурной организации фибрилл коллагена. Образование коллагеновых волокон происходит с помощью агрегации микрофибрилл. Формирование фибрилл происходит спонтанно путём само сборки [141]. Изначально им не свойственна высокая прочность, а укрепление уже образовавшихся фибрилл происходит за счёт внутри- и межцепочечных ковалентных сшивок. В природе существует несколько форм коллагена, но их структуры схожи. Коллаген является полиморфным белком, и на основе первичной структуры пептидных цепей, локализации и функций выделяют 19 типов коллагена. При одном и том же содержании воды температура денатурации фибриллярного коллагена равна 65°C, а тропоколлагена - 40°C [142]. Благодаря содержанию RGD (аргинин-глицин-аспартат) последовательностей в первичной структуре, коллаген является биоматериалом, обеспечивающим адгезию клеток [143] [144]. Он обладает

низкими аллергенными свойствами, нетоксичен, но нерегулируемое и быстрое время биodeградации существенно сокращает срок функционирования коллагеновых изделий (до 1 месяца). При введении в организм, коллаген стимулирует репаративные процессы [145], способствуя образованию собственного коллагена, но при этом не обеспечивает полной регенерации органа, рассасываясь раньше и образуя рубцовую ткань. Формирование гетерогенной надмолекулярной структуры коллагенсодержащего геля [5] [146] позволяет замедлить биodeградацию. Коллаген обладает гемостатическими свойствами, поэтому его применяют при изготовлении искусственных клапанов и сосудов [147] [148]. Желатин – продукт гидролиза коллагена. Пористые желатиновые трубки [149] могут быть использованы как субстрат для зрелых мезенхимных стволовых клеток и гепатоцитов у крыс [150]. Также было показано, что рост церебральных нейронов, скелетных миобластов и кардиомиоцитов может поддерживаться благодаря имплантации микросфер из желатина [151]. Получают коллаген из отходов кожевенной промышленности [152] [153], из отходов спилки шкур крупного рогатого скота [154].

**Хитин, хитозан.** Хитин (поли-N-ацетил-D-глюкозамин) - это природное соединение, которое является азотсодержащим полисахаридом, полимером из остатков N-ацетилглюкозамина, между которыми - бета-(1,4)-гликозидные связи. Хитин является самым распространенным полисахаридом в природе, это основной компонент экзоскелета членистоногих и других беспозвоночных [155], а также содержится в клеточных стенках грибов и бактерий, выполняет защитную и опорную функцию [156]. При этом он образовывается и у других животных, таких как черви, кишечнополостные. В организме хитин находится в комплексе с другими полисахаридами, нередко ассоциирован с белками. Хитин является жестким полупрозрачным полимером, нерастворимым в воде, а также устойчивым к воздействию разбавленных кислот, щелочей, спирта, и к другим органическим растворителям. В ионных жидкостях и концентрированных растворах таких солей, как хлорид цинка, соли кальция, хитин растворяется, а при

нагревании с концентрированными растворами минеральных кислот гидролизуется.

Хитозан - аминополисахарид 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан, образующийся при деацетилировании хитина. Хитозан получают промышленными способами из панцирей ракообразных и продуктов микробиологического синтеза. Благодаря большому количеству свободных аминогрупп в составе, из-за которых происходит связывание ионов водорода и приобретение избыточного положительного заряда, хитозан является хорошим катионитом [157], а также обладает способностью связывать и удерживать ионы различных металлов. Из-за способности образовывать большое количество водородных связей, хитозан может связывать большое количество органических водорастворимых веществ, например, бактериальные токсины. Связи между молекулами хитозана гораздо прочнее, чем между молекулами хитозана и водой, поэтому он плохо растворим в воде, но растворяется в растворах уксусной и соляной кислоты, а также обладает способностью удерживать в своей структуре растворитель и растворенные в нём вещества. В растворенном виде обладает большим сорбирующим действием [158]. Жиры, жирорастворимые соединения, предельные углеводороды связываются хитозаном благодаря эффекту молекулярного сита, а также гидрофобным взаимодействиям. С помощью таких микробных ферментов, как хитиназа и хитобиаза, хитин и хитозан расщепляются до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина, поэтому хитозан является экологически чистым материалом. Хитозан применяется для производства продуктов питания, косметики, в сельском хозяйстве, биомедицине. Из-за способности связываться с молекулами жира при пищеварении и способности прилипать к слизистым оболочкам, хитозан используется в производстве средств для похудения [159], Хитин и хитозан используют для создания искусственных кровеносных сосудов, катетеров, шовных материалов. В медицине они применяются в качестве раневых, ожоговых, заживляющих покрытий и адгезивов [160], а также входят в составы конструкций для доставки лекарств [161] [162]. Использование хитина и хитозана связано с их сходством в структурных

характеристиках с гликозаминогликанами, являющимися одними из компонентов межклеточного матрикса. Из хитозана легко формируются устойчивые и прочные изделия (пленки, губки, мембраны) [163]. Но они весьма термически нестабильны, что ведет к изменению структуры и усложняет их стерилизацию. В связи с этим их добавляют как дополнительные компоненты в композитные матриксы, а хрупкость уменьшают за счет добавления таких пластификаторов, как глицерол, лауриновая кислота, молочная кислота, полиэтиленгликоль [164].

**Бактериальные полиоксиалканоаты - полиоксибутираты (полимеры  $\beta$ -оксимасляной кислоты, ПОБ).** Представляют собой класс полиэфиров, которые являются внутриклеточными резервными соединениями в гетероцистах у цианобактерий [165]. Идентифицировано более 100 различных бактериальных полиоксиалканоатов, и их общая структурная формула  $\text{H}[-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-]_n-\text{OH}$ . Полиоксиалканоаты различного химического состава характеризуются разнообразной структурой и физико-химическими свойствами. Наиболее часто исследуются гомогенный полиоксибутират и двухкомпонентные сополимеры оксибутирата и оксивалерата, оксибутирата и оксиоктаноата. Их физико-химические свойства сходны с такими широко используемыми полимерами, как полиэтилен, полипропилен, при этом они биосовместимы и биodeградируемы. Продукты их разложения (углекислый газ и вода) нетоксичны. Также им свойственна большая устойчивость к ультрафиолетовому излучению, высокие газобарьерные качества, хорошая водостойкость, теплоустойчивость. Одним из преимуществ полиоксибутирата и сополимера полиоксибутирата с оксивалератом является то, что в условиях *in vivo* они биodeградируют довольно медленно, материал послойно выщелачивается с поверхности, не образуя грубых дефектов и не теряя прочности. В зависимости от состава сополимеров полиоксиалканоатов меняются их механические свойства. Так, увеличивая в составе долю оксивалерата, снижается кристалличность полимера, при этом увеличивается эластичность и гидрофильность. При молекулярном весе меньше 400 кДа снижается механическая прочность полиоксибутирата. Материал с высоким

качеством и отвечающий всем необходимым требованиям можно получить путем подбора оптимального размера цепи и соотношения сополимеров [166].

Получают полиоксибутират путем ферментации культуры *Alcaligenes eutrophus* ВКПМ В5786 при температуре 30°C и pH 7,0 при ограниченном содержании азота и добавлением субстрата, при постоянном перемешивании и аэрации [167].

В области тканевой инженерии полиоксибутираты используются, например, для изготовления пористых биорезорбируемых матриц [168].

**Фиброин шёлка.** Фиброин является основным белком шелка, который получают из коконов шелкопряда *Bombyx mori* и родственных видов. Представляет собой гетеродимер, состоящий из двух ковалентно связанных через дисульфидные мостики цепей: легкой цепи Fib-L с массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H цепи с массой 350 кДа (5263 аминокислоты) [169] [170]. Гликозилированный белок P25 с массой 30 кДа объединен с Fib-L и Fib-H гидрофобными связями [171]. Предполагается, что этот комплекс может формироваться из 6 тяжелых и 6 легких цепей на одну молекулу гликолизированного белка P25 [172]. Легкая цепь и тяжелая цепь фиброина, а также белок P25 кодируются в геноме отдельно [169]. Первичную последовательность фиброина составляют глицин (43%), аланин (30%), серин (12%) [173]. В меньшем количестве входят тирозин (5%), валин (2%), аспартат, глутамат и цистеин, который выполняет главную интегрирующую роль в объединении разных субъединиц в одну молекулу. Глицин, валин и серин составляют основную структурную последовательность Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser тяжелой цепи Fib-H, доля которой – 70% всей белковой последовательности [174]. Более редко встречаются похожие последовательности: Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr (20%), Gly-Ala-Gly-Tyr-Gly-Ala (6%), Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala (4%), каждая из которых составляет основу 12 регулярных гидрофобных кристаллических блоков, длина каждого из них 413 аминокислотных остатков. Эти 12 блоков – 94% общей белковой последовательности, и разделяются они 11-ю нерегулярными аморфными промежуточными участками длиной в 42-43 аминокислотных остатка

с отрицательным зарядом [173]. В общей структуре фиброина выделяют положительно заряженный С-конец тяжелой цепи длиной в 58 аминокислотных остатка, отрицательно заряженный N-конец тяжелой цепи длиной в 151 аминокислотных остатка и последовательность легкой цепи Fib-L, обладающая амфифильностью с небольшим преобладанием отрицательного заряда. Исходя из такой структуры, фиброин – амфифильный белок с существенным перевесом в сторону гидрофобности. Он не растворяется в воде, а также в разбавленных растворах многих кислот и щелочей, но растворим в концентрированных растворах хлорида лития, тиоцианата лития и кальция, хлорида кальция. Благодаря тому, что фиброин способен формировать и  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складки, он существует в нескольких структурных формах: 1) рыхлой, глобулярной; 2) обогащенной  $\alpha$ -спиралями аморфной форме (silk I); 3) прочной кристаллической  $\beta$ -форме (silk II). Первая форма нестабильна и механически непрочная,  $\alpha$ -форма (silk I) является устойчивой и упругой, а третья  $\beta$ -форма (silk II) обладает самой высокой прочностью на разрыв, она устойчива к сильным механическим воздействиям, но менее упругая, чем  $\alpha$ -форма [173]. Кристаллизуется белок под воздействием непредельных алифатических спиртов, метанола или этанола, высоких температур, концентрированных растворов солей, а также при доведении pH раствора фиброина шелка до изоэлектрической точки. Фиброин способен сохранять кристаллическую структуру в течение долгого времени [175]. Именно насыщенная  $\beta$ -структурами форма белка задает и поддерживает форму создаваемому из фиброина шелка имплантату, обеспечивает его целостность и стабильность в близких физиологической среде организма водных растворах в течение долгого времени [176]. В связи с этим, конструкции из фиброина перед применением необходимо подвергать  $\beta$ -кристаллизации в целях сохранения их целостности и предотвращения разрушения в среде культивирования или в условиях *in vivo*. Боковые группы, входящих в состав аминокислот фиброина (аминогруппы, спиртовые, карбоксильные, тио-группы, ароматические) определяют химические свойства белка. Доля фиброина в шелковой нити составляет 70-80% массы белка, остальная часть – это серицин, который



выполняет роль клея, скрепляя фибриллы фиброина в коконе, а также несколько процентов жира- и воскоподобных веществ и неорганических анионов и катионов (менее 1%) [177] [178]. Фиброин является термостабильным белком, температура его денатурации выше 127°C. Модуль упругости фиброина равен 15-17 гПа, белок обладает высокой прочностью на разрыв (610-690 мПа), что позволяет его применять в работах по созданию искусственных сухожилий (150 мПа) и костной ткани (160 мПа) [179]. Фиброин характеризуется высокой прозрачностью, его способность пропускания видимого спектра излучения составляет 90-95%, а коэффициент преломления фиброиновых пленок равен 1,55 при толщине 30-50 мкм [180]. Фиброин применяется в сфере регенеративной медицины в качестве материала для изготовления матриксов [181] [182], пленок [183], а также входит в состав конструкций для доставки лекарственных и биологически активных веществ в организме [184] [185].

**Каркасный шёлк паутины.** Представляет собой шелк, который синтезируется пауками (*Arachnida*) [115]. Наиболее изучены свойства паутины пауков рода *Nephila*, представителем которого является *Nephila clavipes*, синтезирующий паутину нескольких видов [115] [186]. Основными ампулярными железами вырабатывается каркасный шёлк паутины, чьи нити очень эластичны, характеризуются высокой прочностью на разрыв, сопоставимой с кевларом и превышающей сталь, что делает его уникальным среди других природных, а также большей части искусственных материалов [187]. Шёлк паутины устойчив к условиям внешней среды, обладает высокой биосовместимостью и способностью к биодegradации. Такие свойства объясняются структурой материала. В состав каркасной нити входят два ковалентно связанных белка: спидроин 1, который кодируется геном *MASP1* (образует кристаллические бета-складчатые структуры), и спидроина 2, кодирующийся геном *MASP2* (образует “аморфный матрикс”). Спидроины – высокомолекулярные белки: молекулярная масса выделенных спидроинов 300-350 кДа, а димерных форм – 550-650 кДа [188]. Спидроины имеют периодическое строение с большим числом прямых повторов [189]. Их макромолекулы насыщены повторами из 34 аминокислотных остатков,

которые отличаются наличием делеций и вставок. Первичная последовательность, обогащенная полиаланиновыми и насыщенными глицином последовательностями, формирует неоднородную вторичную структуру, а сегменты кристаллического строения, состоящие из антипараллельных  $\beta$ -складчатых структур, чередуются с менее структурированными участками т.н. «аморфного матрикса» [190]. Этот матрикс, состоящий из молекул, богатых глицином, представляет собой спиральные участки и случайные петли, но при этом не является бесструктурным, так как полагают, что его макромолекулы ориентированы преимущественно параллельно вертикальной оси спидроиновых фибрилл [191]. В формировании кристаллических доменов участвует 90% аланиновых остатков, а  $\beta$ -складчатые структуры расположены параллельно оси волокна. Существует два типа кристаллических доменов: плотно упакованные и строго ориентированные  $\beta$ -складчатые, а также свободно расположенные складчатости. В высокоупорядоченных областях метильные группы аланиновых остатков ориентированы относительно осей цепей строго под углом  $90^\circ$ . В менее упорядоченных областях метильные группы аланиновых остатков не имеют строгой ориентации относительно оси волокна и обладают большей возможностью для пространственной переориентации [191]. Кристаллические части макромолекулы отвечают за высокую прочность на разрыв, а «аморфный матрикс» - за эластичность. У кристаллических доменов и «аморфного матрикса» нет четких структурных границ. Макромолекула спидроина способна к структурным переходам, уменьшая или увеличивая кристалличность. Изменяя условия прядения, можно влиять на эти переходы [192]. Каркасные нити паутины обладают высокой термостабильностью (до  $230^\circ\text{C}$ ). При  $210^\circ\text{C}$  начинается плавление основных кристаллических доменов, их предел прочности на разрыв равен 22 ГПа, а на растяжение - 1,1 ГПа, относительное удлинение - 9% [193]. В связи с наличием дефектов и колебаниями толщины получаемой нити, механическая прочность натуральных белков может изменяться. Структура паутиной нити изменяется при хранении: в течение года после получения улучшаются показатели механической прочности и эластичности, но она

подвержена старению из-за распада аминных групп, поэтому при возрастании времени хранения падает прочность и эластичность [194]. Кроме того, к старению приводит ультрафиолетовое излучение [195]. Влажность среды влияет на степень гидратации нитей, что также сказывается на механических свойствах белков за счет изменения характера водородных связей между белковыми цепями [196]. При максимальной степени гидратации  $2/3$  веса нити составляет вода, которая связывается в основном аморфным матриксом [186]. Влажность оказывает положительное влияние на значение растяжения до разрыва (остаточная деформация), а также на модуль упругости.

Существуют рекомбинантные аналоги природных спидроинов, которые получают синтезом в клетках дрожжей *Pichia pastoris* и *Saccharomyces cerevisiae*, используя в качестве продуцентов спидроинов культур животных клеток, путем синтеза белков в трансгенных животных и растениях [197] [198, 199]. Рекомбинантные аналоги отличаются от натуральных меньшей механической прочностью, которую впоследствии можно увеличить различными методами (путём вытягивания нитей в метаноле [200], а также кристаллизацией [201]). Введение дополнительных полинуклеотидных последовательностей в гены, кодирующие спидроины, также помогает модифицировать свойства материалов из рекомбинантных белков [202] [203]. На основе рекомбинантных аналогов можно создавать сополимеры, которые по свойствам будут отличаться от нативных белков. Благодаря своим уникальным свойствам, каркасные белки паутины могут применяться для изготовления изделий для регенеративной медицины [204] [205].

**Альгиновая кислота.** Представляет собой полисахарид, который получают из красных водорослей (*Laminaria japonica Aresch*). Альгиновая кислота – это вязкое вещество, нерастворимое в воде, а также в большинстве органических растворителей; одна её часть способна адсорбировать 300 массовых частей воды, поэтому кислоту используют в качестве загустителя [206]. Альгиновая кислота – гетерополимер, который образован двумя мономерами: D-маннуроновой и L-гулууроновой кислотами, которые являются остатками полиуроновых кислот, и их

пропорции зависят от вида водорослей. Соли альгиновой кислоты образуют в воде коллоидные растворы. Альгинат натрия, альгинат калия, альгинат кальция используются как пищевые добавки, а в области стоматологии альгинат служит в качестве эластичного слепочного материала, в котором неорганические наполнители (оксид цинка, тальк) составляют основную массу альгинатного порошка и влияют на вязкость материала, а также прочность после затвердевания [207] [162]. В области медицины альгинаты используются в системах доставки биологически активных веществ [208], а также в качестве инъекционного средства сайт-специфической доставки клеток (хондроцитов, стромальных клеток костного мозга) и различных факторов (нейротрофического фактора головного мозга, основного фактора роста фибробластов) благодаря способности формировать гидрогели при взаимодействии с двухвалентными и трехвалентными катионами ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) [209] [210]. Альгинаты не содержат RGD-последовательность, поэтому адгезия клеток на их поверхность довольно низкая. Однако, конструкции, содержащие альгинаты с  $\beta$ -трикальцийфосфатом, способны поддерживать рост и дифференцировку остеогенных клеток *in vitro*, а альгинатные капсулы, стабилизированные полилизинном, являются одними из иммунозащитных матриксов для иммобилизации гемопоэтических клеток костного мозга, паратиреоидных клеток, островковых клеток поджелудочной железы при создании гибридной поджелудочной железы [211]. Пористые губки из альгината применялись для восстановления нервной проводимости у крыс, трехмерные конструкции сердечной мышцы на основе альгинатной матрицы применялись в экспериментах на крысах как компенсаторы сердечной функции после инфаркта миокарда [209]. Также альгинатные матриксы использовались для регенерации хрящевой ткани [212].

### 1.2.2 Виды биоконструкций

В области медицины биополимеры используются для изготовления биоконструкций и тканеинженерных микроносителей для регенерации тканей

путем двухмерного и трехмерного культивирования клеток на их поверхности. При этом биополимеры обеспечивают адгезию клеток, их пролиферацию, а также их дальнейшее нормальное функционирование. Также биоматериалы входят в состав носителей лекарственных препаратов, направленных на лечение и восстановление организма.

**Пленки.** Представляют собой конструкции из сплошного слоя полимеров толщиной до нескольких миллиметров, которые служат в качестве клеточных макроносителей [213] [214], а также используются в качестве конструкций для трансдермальной доставки лекарственных препаратов в кровь [215] [216]. Мембраны, сделанные из поли(ε-капролактона) используются в периодонтальных операциях для направленной регенерации костной ткани, способствуя адгезии остеобластов [217]. Трансдермальный пластырь, состоящий из поликарбазола и натурального каучука с добавлением индометацина, применяется для трансдермальной доставки лекарственного средства в организме [218]. Также проводились исследования, подтверждающие возможность применения пленок, состоящих из поливинилпирролидона (ПВП) и поливинилового спирта (ПВС) в качестве пленкообразующих полимеров, полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ 400) в качестве пластификатора, диметилсульфоксида (ДМСО) и диметилформамида (ДМФ) - в качестве усилителей проницаемости, для трансдермального проникновения каптоприла, который используется для лечения гипертензии [219].

Проводились эксперименты по использованию пленок, изготовленных из поливинилпирролидона и карбоксиметилцеллюлозы для более быстрой регенерации ран слизистой оболочки полости рта, основанной на замедленном высвобождении фактора роста эпидермиса (ФРЭ) (Epidermal Growth Factor, EGF) из них [220]. Был разработан метод, при котором нанесенному на поверхность полимеру полилактиду ко-гликолиду (ПЛГ) (PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid))) придавали форму пленки, на поверхности которой формировали чередуемые узкие и тонкие полоски, в результате чего посаженные на эту конструкцию клетки адгезировали на поверхности узких полосок. Далее полоски вместе с клетками собирали в шприц для дальнейшего введения в организм при

помощи инъекции для регенерации миокарда крысы [221]. Пленки из поливинилового спирта, прикрепленные к никель-титановой рамке, использовались для устранения дефекта межпредсердной перегородки у человека [222]. Также полимерные пленки из полиамидамина, поверхность которых модифицирована плазмидами, использовалась для трансфекции эукариотических клеток [223].

**Трубки** - полые изделия из полимерных материалов, служащие для регенерации тканей, а также замены органов и их частей в организме человека. Так, были проведены эксперименты на собаках, показывающие, что полимерные трубки из L-лактида/ $\epsilon$ -капролактона, содержащие недифференцированные стромальные клетки костного мозга, могут помочь в лечении повреждений периферических нервов [224]. Исследования на крысах, в которых сравнивались регенеративные свойства искусственных трубок из силикона и хитозана с аутотрансплантатами нервов, показали, что хитозановые трубки в перспективе могут быть материалом для искусственных трансплантатов нервов [114] [225]. Были изготовлены трубки, представляющие собой многодисковые конструкции, мономерами которых являются либо кольца из клеток с синтезируемым ими коллагеном, либо кольца, при формировании которых к мезенхимным стволовым клеткам человека были добавлены желатиновые микрокапсулы с включенным в них трансформирующим фактором роста  $\beta 1$ . Такие тканеинженерные конструкции были испытаны *in vivo*, по результатам была высказано предположение о возможности использования таких конструкций в качестве «строительного материала» для создания искусственной трахеи [226]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что силиконовые трубки, заполненные магнитно-ориентированным коллагеном, способствовали регенерации нервов [227]. Трубки из полигликолевой кислоты, используемые в качестве искусственного нервного канала, помогли функциональной и морфологической регенерации барабанной струны - концевой ветви промежуточного нерва (*chorda tympani nerve*) и восстановлению функции ощущения вкуса [228]. Конструкции из политетрафторэтилена (ПТФЭ)

использовались в качестве сосудистых имплантатов, а их модификация с помощью фторсодержащего полимера с добавлением гептомальтозы и пептида CRRETAWAC помогла снизить гиперплазию интимы. Конструкции из нитинола применяются в качестве искусственного пищевода в экспериментах на свиньях, а полиэстеровые кольца позволили улучшить их характеристики при трансплантации [229] [230] [231].

**Волокна.** Ранее было показано, что толстые коллагеновые пучки, состоящие из одноосных выровненных фибрилл, могут стать основной технологией для создания искусственных матриц сухожилий и связок [232]. Армированная система искусственных связок наравне с аутотрансплантатами подколенного сухожилия успешно использовались для реконструкции разрывов задней крестообразной связки [233]. Эксперименты показали, что покрытие поверхности полиэтилентерефталатных волокон фиброином шелка с кристаллами гидроксиапатита может обеспечить остеоинтеграцию в костном канале, тем самым подтверждая возможность изготовления новых искусственных связок, отвечающих клиническим потребностям [234]. Было показано, что трехмерные коллагеновые имплантаты искусственных сухожилий, покрытые полидиоксаноновой оболочкой и обработанные бычим тромбоцитарным гелем, были успешно использованы для регенерации сухожилий *in vivo* [235]. Искусственные связки из полиэфира были использованы для акромиально-ключичной внесуставной реконструкции связок в плечевом поясе [236].

**Гидрогели.** Было показано, что биосинтетический амфифильный гибридный гидрогель с нанопористой структурой, полученный с использованием природного полисахарида альгината и синтетического полипропилен фумарата, был успешно использован в тканевой инженерии сердца [237]. Волокнистые гидрогели из фиброина шелка и альгината натрия помогли получить кристаллы гидроксиапатита нужной морфологии для восстановления костной ткани [238]. Адгезивный гидрогель, изготовленный из хитиновых нановолокон и галловой кислоты, показал более прочную силу сцепления с тканями с эксперименте со свиной кожей, по сравнению с фибриновым клеем [239]. В качестве тканевого

эквивалента кожи был использован гидрогель из полидиметилсилоксана и поливинилового спирта, перешитый глутаральдегидом [240]. Гидрогель из фиброина шелка использовался в качестве имплантата в экспериментах на крысах для определения его биodeградации и неоваскуляризации [241]. Для восстановления повреждений периферических нервов был использован фибриновый гель с инкапсулированным в PLGA микросферами, содержащими иммуносупрессор FK-506 [242]. Было показано, что альгинат-желатиновый гидрогель может быть использован в качестве перспективной матрицы для тканевой инженерии [243]. Гидрогель из полиэтиленгликоль-акриламида с ковалентно связанным пептидом, способным связываться с матриксными металлопротеиназами, был использован для культивирования гепатоцитов *in vitro* и поддерживал надежную функцию печени в течение нескольких недель после имплантации у мышей [244]. Микрогетерогенный коллаген-содержащий гидрогель (торговый знак *Сфера*®ГЕЛЬ, ФСР 2012/13033 от 01.02.2012 г., производитель ЗАО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Россия) был использован для регенерации суставного хряща у кроликов [128]. Также было показано, что в исследованиях *in vitro* полученные из жировой ткани мезенхимальные стромальные клетки человека, помещенные на биополимерные гидрогелевые микроматрицы *Сфера*®ГЕЛЬ, в хондрогенных условиях генерируют трехмерные хрящевые структуры и продуцируют такие компоненты внеклеточного матрикса, как коллаген II типа и гликозаминогликаны [127]. Также было показано, что коллагенсодержащий гидрогель способствует формированию и выживанию культур островковых клеток поджелудочной железы, в связи с чем может служить в качестве основы тканеинженерной конструкции этой железы [245]. Биомедицинский клеточный продукт из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля с добавлением мезенхимальных стромальных клеток человеческой жировой ткани, введенный в коленный сустав, стимулирует восстановительные процессы структуры хрящевой ткани [246].



**Микро- и наноносители лекарственных средств.** Наиболее распространенными наноносителями лекарственных препаратов на полимерной основе являются наночастицы, полимерные мицеллы, представляющие собой наноразмерные коллоидные частицы с гидрофобной внутренней частью (ядром) и гидрофильной поверхностью (оболочкой), а также полимеросомы, которые являются самоорганизующимися наноструктурами, состоящими из амфифильных макромолекул [247]. Самоорганизующиеся пептиды, и, особенно, малые пептидные наноструктуры на их основе, могут выступать в качестве носителей лекарственных средств. Например, были проведены исследования *in vitro* с пептидом ВОС-Pro-Phe-Gly-OMe, самоорганизующимся в водных растворах в наночастицы со средним размером 119,6 нм и гидрофобным ядром, в которые были успешно инкапсулированы такие препараты, как аспирин и куркумин. Такие наноструктуры, а также частицы, дополнительно стабилизированные витамином Е, могут выступать в качестве регулируемой системы доставки лекарств [248]. Полимерные соединения входят в состав тераностических носителей, представляющих собой фармацевтические средства, которые обеспечивают раннюю диагностику заболевания, а также его лечение. Как правило, в такие носители входят три компонента: 1) компонент-детектор для неинвазивной визуализации - часто, это металлические или магнитные соединения для магнитно-резонансной томографии (МРТ), флуоресцентные соединения для оптических изображений, радиоизотопы для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), 2) полимерное покрытие для придания коллоидной стабильности и предоставления функциональных групп для биоконъюгации, а также возможности для загрузки лекарства, 3) инкапсулируемый терапевтический агент [249].

Полимерные частицы являются наиболее перспективными и жизнеспособными технологическими платформами для целевой и контролируемой доставки лекарственных препаратов в организме [250]. При этом они должны обладать достаточной вместимостью для лекарства, доставлять

препарат в нужные ткани и клетки без его потери, контролируемо его высвободить, достигнув нужной локализации. Для этого создаются полимерные наночастицы, которые высвобождают лекарство в ответ на внутренний или внешний стимул, например, на pH [251], окислительно-восстановительный потенциал, температуру, магнитное поле, свет, а также частицы, реагирующие на двойные и мульти-стимулы, такие, как pH/температура, pH/окислительно-восстановительный потенциал, pH/магнитное поле, двойной pH, температура/магнитное поле, температура/фермент [252]. Такие наночастицы особенно актуальны для целенаправленной терапии при раковых заболеваниях [253]. Было показано, что модифицированные ангиопептидом-2 наночастицы из PLGA с инкапсулированными в них доксорубицином и малой интерферирующей РНК, способны проникать через гематоэнцефалический барьер в живом организме, в результате чего лекарство накапливается в мозге. Результаты испытаний *in vivo* подтвердили, что происходил апоптоз клеток глиомы, и продолжительность жизни больных мышей увеличивалась [254].

Из рекомбинантного белка паутины были изготовлены механически и химически стабильные микрокапсулы, способные медленно высвободить большие биологически-активные молекулы, что важно, если использовать их в системе доставки лекарств, а также в микрореакторах [255]. Были изготовлены альгинатные микрокапсулы с самоэмульгирующимся ядром для использования в качестве системы доставки лекарственных средств, которая имеет преимущества в виде повышения стабильности и биодоступности лекарства в организме [256]. Инъецируемые коллагеновые микросферы были сделаны для доставки белковых лекарственных препаратов в организме, а фотохимическое сшивание повышало их способность к удержанию таких лекарств [257].

**Клеточные биodeградируемые микроносители** представляют собой микросферы и микрокапсулы из полимерных материалов, которые используются в системах доставки лекарственных препаратов в организме, а также в качестве клеточных носителей, способствующих адгезии, пролиферации и дифференциации клеток. Ранее четыре линии клеток культивировали на

шаровидных макропористых желатиновых микроносителях ((CultiSpher-G) и использовали в качестве модели для трехмерного роста клеток при экспериментальной терапии рака [258]. С помощью метода эмульсификации (типа «вода-в-масле») были получены микрочастицы из фиброина шелка без каких-либо поверхностно-активных веществ, обработаны метанолом, и было показано, что их полые структуры способствуют прикреплению клеток и иммобилизации ферментов. Т.о. такие микрочастицы могут быть использованы в качестве биodeградируемых микроносителей для клеток и белковых лекарственных препаратов [130]. Желатиновые гидрогелевые микросферы были успешно применены для адгезии и остеогенной дифференцировки культивированных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс [259]. Из фиброина шелка была изготовлена пенообразная матрица и в экспериментах на крысах использована в виде инъецируемого материала, который может служить в качестве каркаса для заполнения мягких тканей, и использоваться как отдельно, так и вместе с липоаспиратами [260].

**Пористые биополимерные 3D-матрицы** представляют собой трехмерные конструкции из биополимеров, которые используются для регенерации тканей в организме благодаря таким качествам, как 1) многофункциональность, т. е. они являются каркасом, подложкой и могут быть питательной средой для клеточных культур [261], 2) механическая прочность и эластичность, 3) пористость, которая способствует адгезии клеток и их дальнейшей пролиферации, дифференцировке и нормальному функционированию, 4) пригодность для использования при хирургических манипуляциях и 5) возможность стерилизации стандартными способами без повреждения и изменения их свойств. Разработаны гибридные матрицы на основе фиброина шелка, включающие ткань сердечного внеклеточного матрикса, с регулируемой структурой, механическими свойствами и скоростью деградации [262].

Конструкция, состоящая из остеобластов человека, кальций-альгинатных матриц и биореакторной системы, способствующей подаче растворимых питательных веществ и остеогенных сигнальных молекул для поддержания

жизнеспособности клеток, была создана для аутотрансплантации остеобластов человека с целью устранения возрастных ортопедических заболеваний и дефектов костей. Данная методика позволяет сохранить жизнеспособность, пролиферативную способность клеток, связанную с костной тканью экспрессию генов в клетках и формирование кристаллов биологического апатита [263]. Коллагеновые матрицы с однонаправленными порами были созданы для регенерации таких тканей, как хрящевая, нервные пучки, скелетные мышцы, в которых ориентация клеток и внеклеточного матрикса имеет важное значение [264]. Матрицы из фиброина шелка, содержащие механический фактор роста (МФР) (mechano growth factor (MGF)) и трансформирующий фактор роста (ТФР) (transforming growth factor  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ )), а также стволовые клетки, способствовали регенерации суставного хряща *in situ* в экспериментах с кроликами [265]. Трехмерные матрицы из внеклеточного матрикса, поэтапно имитирующие хондрогенез, были изготовлены на основе анализа стадий хондрогенной дифференцировки (стадия стволовых клеток, ранняя стадия и поздняя стадия хондрогенеза). Путем иммуногистохимического анализа было показано, что эти матрицы имеют различный состав в зависимости от стадии хондрогенеза и по-разному влияют на хондрогенез мезенхимных стволовых клеток. Такие матрицы позволяют не только предоставить новые трехмерные модели внеклеточного матрикса для исследования того, как он влияет на функции мезенхимных стволовых клеток в процессе развития хрящевой ткани, но и могут стать одними из наиболее подходящих конструкций для тканевой инженерии [266]. Децеллюляризованные подчелюстные железы крысы были использованы в качестве матрикса для адгезии первичных клеток подчелюстной железы крыс. Результаты эксперимента показали, что данная трехмерная конструкция может служить в качестве матрикса для регенерации слюнных желез [267]. Трехмерные матрицы из полилактида с добавлением гепарина были успешно использованы для адгезии и пролиферации мышечных 3Т3 фибробластов [268].

### 1.3 Технологии изготовления 3D-матриков

Существуют разные технологии изготовления трехмерных матриков, каждый из которых имеет как свои достоинства, так и недостатки. Методика выбирается в зависимости от свойств материала, желаемых итоговых характеристик готовой конструкции и области её применения.

**Метод выщелачивания.** В основе метода лежит принцип выщелачивания, при котором из системы происходит вымывание одной из составляющих – порообразователя, за счет чего и происходит формирование пористой трехмерной структуры матрикса. В качестве порообразователя могут быть использованы как жидкие частицы, так и порошкообразные материалы: воск, соли (например, хлорид натрия, карбонат аммония) [269], сахар [173], размер частиц порообразователя влияет на итоговый размер пор конструкции. К основным преимуществам этого метода можно отнести его простоту, универсальность и удобство в контроле размера и формы пор. Недостатком методики является ограниченность толщины конечной конструкции (до 3 мм), а также трудность формирования матриков с гарантированной взаимосвязанностью пор [68].

**Метод сублимации.** В основе метода лежит принцип сублимации. Суть метода заключается в том, что полимер растворяют в растворителе с образованием раствора требуемой концентрации, после чего раствор замораживается, и растворитель удаляется путем лиофилизации под высоким вакуумом. При этом формируется высокопористый матрикс, обладающий внутренней взаимосвязанностью пор [270]. Эта техника применима к различного рода полимерам, включая фиброин шелка, полигликолевую кислоту, полилактид [271]. Размер пор при использовании такой методики можно регулировать скоростью замораживания и рН, более быстрая скорость замораживания позволяет получать поры меньшего размера [272]. Одним из основных преимуществ метода является то, что он не требует ни высокой температуры, ни

отдельного этапа выщелачивания. К недостаткам метода можно отнести длительность его процесса, а также получение пор малого размера.

**Метод электроспиннинга.** В основе метода лежит процесс электроспиннинга, при котором происходит подача раствора полимера с одинаковой скоростью через иглу малого диаметра в пространство с электростатическим полем высокого напряжения, в результате чего на металлическом коллекторе формируются нити с диаметром менее 1 микрона. К основным достоинствам данной методики относится возможность изготавливать матрицы с высоким соотношением поверхности к объему, возможность регулировать пористость матриц, возможность ориентировать заряженные нити полимера в процессе изготовления конструкции, а также регулировать толщину волокна. Для этого метода используются более чем двести полимеров, включая фиброин шелка [273], коллаген [274], хитозан [275], желатин [276].

**Метод биопринтирования.** В основе метода лежит технология струйной печати, она дает возможность формировать 3D-структуры с заранее указанной морфологией. «Биочернилами» в данной методике выступают полимеры для формирования матрикса, живые клетки, белки, а в качестве «биобумаги» используется подложка, обеспечивающая существование сформированных структур и их стабилизацию [277]. В конце процесса применяется инкубатор, где при наличии определенных условий матрица фиксируется, или происходит прорастание и пролиферация клеток, если было проведено биопринтирование клеточных структур. Метод биопринтирования не имеет недостатков более традиционных методов формирования матриц благодаря тому, что дает возможность непосредственно задавать итоговую структуру изделия. Благодаря точности метода и его высокой воспроизводимости можно осуществлять послойную печать, а также наносить на получаемую конструкцию факторы роста и цитокины, которые нужны для адгезии клеток и их дифференциации [278]. Таким образом, биопринтирование – наиболее современный, бесконтактный, неструктурный метод, используемый для принтирования двухмерных и трехмерных структур послойно [279] [280].

#### 1.4 Тканеспецифические матриксы

При создании имплантируемых биоинженерных конструкций для регенеративной медицины одну из главных ролей играет их способность адгезировать и пролиферировать на своей поверхности необходимые клеточные культуры. В связи с этим важную роль играет поиск повышения тканеспецифичности этих конструкций для улучшения их биосовместимости и регенеративных свойств. Одним из таких методов является покрытие поверхности конструкции дополнительными структурами, например, фрагментами девитализированной ткани. Такую ткань получают методом децеллюляризации того или иного органа, заключающимся в удалении клеток перфузией специальным отмывочным раствором, сохраняя при этом архитектуру микроциркуляторного русла и ткани. Модификация поверхности каркаса подобными структурами (биомимикрирование) хороша тем, что фрагменты тканеспецифического нативного внеклеточного матрикса могут значительно повысить адгезию клеток такого же вида ткани на эту конструкцию. В настоящее время разработаны способы децеллюляризации таких органов, как сердце, легкие, печень, почка, проводятся эксперименты по созданию тканеспецифических рецеллюляризованных матриксов и их возможного применения в области трансплантации и регенерации органов [281]. Исследователями был получен девитализированный матрикс почечной ткани для дальнейшей его рецеллюляризации с помощью эксплантов почечной ткани от групп разного возраста и фетальных клеток с целью возможного применения таких конструкций для регенерации почечной ткани в организме [282]. Была децеллюляризована сердечная ткань для дальнейшей адгезии на её поверхности кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток в попытке применения такой конструкции генерировать насосную функцию сердца [283]. Исследования, направленные на изучение свойств децеллюляризованной ткани легких показали перспективу их возможного использования в области тканевой инженерии [284]. Децеллюляризованные каркасы ткани печени были получены с сохранением сосудистого дерева, после

чего повторно заполнялись фетальными клетками печени человека и эндотелиальными клетками с целью дальнейшей разработки полнофункциональной биоинженерной печени для трансплантации органов и тестирования лекарств [285]. Бали изучены свойства трансплантата на основе децеллюляризованного матрикса печени, рецеллюляризованного гепатоцитами, и было показано, что такая тканеинженерная конструкция может поддерживать функции печени в экспериментах *in vitro* и в перспективе может быть пересажена в крыс для поддержания функций печени с минимальным ишемическим повреждением [286]. Современные методы децеллюляризации органов, как человеческих [287], так и взятых от животных [288], позволяют создавать на их основе биоматрикс, являющиеся перспективным материалом для тканевой инженерии, для ксенотрансплантации и регенеративной медицины [289].

При микроскопических исследованиях конструкций из полимерных материалов с витализированными клетками, биodeградируемых клеточных носителей, гидратированных гелевых биоматериалов необходимо сохранять их нативную структуру не только во время измерений, так и в процессе пробоподготовки. Планируемая в данной работе разработка новой технологии криоСЗНТ удовлетворяет данным требованиям, поскольку позволяет с наноразрешением анализировать трехмерную структуру биологических объектов без нарушения их нативной структуры. Для демонстрации возможностей новой технологии проведены эксперименты по сравнительному изучению микро- и наноструктуры трехмерных пористых каркасных матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка, а также впервые изготовленных тканеспецифических гидрогелевых альгинатных микроносителей, поверхность которых модифицирована микрофрагментами девитализированной ткани печени. Для изготовления трехмерных матриксов были выбраны рекомбинантный спидроин и фиброин шелка из-за присущих этим полимерам высокой биосовместимости и уникальных механических свойств (упругость и прочность), позволяющих формировать широкий спектр биodeградируемых изделий для



регенеративной медицины: нити, пленки, трубки, матриксы. Трехмерные матриксы и метод выщелачивания для их изготовления выбраны в работе из-за высокой пористости материала, что делает эти изделия не только биосовместимыми, но и интересными для анализа их микро- и наноструктуры. Альгинат был использован вследствие способности формировать биodeградируемые микрогелевые клеточные носители, возможности химически модифицировать поверхность микроносителей с целью ковалентной пришивки фрагментов девитализированной ткани печени и образовывать тканеспецифический мелкодисперсный инъектируемый матрикс.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Материалы

Для изготовления пористых каркасных матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка, мелкодисперсного альгинатного матрикса и их витализации были использованы следующие материалы:

коконы тутового шелкопряда *Bombyx mori*, которые были предоставлены директором Государственного научного учреждения Республиканской научно-исследовательской станции шелководства Российской академии сельскохозяйственных наук Богословским В. В. (Ставропольский край, г. Железноводск);

очищенный и лиофилизированный рекомбинантный аналог спидроина 1 (rS1/9), предоставленный к.б.н. Богушем В.Г. (ФГУП ГосНИИгенетика, РФ);

этанол ГОСТ 18300-72;

вода дистиллированная, подготовленная по ГОСТ 6709;

вода бидистиллированная, подготовленная с помощью системы Millipore Simplicity, степень чистоты 1 по ГОСТ Р 52501-2005;

хлорид натрия (Sigma-Aldrich, Product Number: S7653, CAS-No.: 7647-14-5, США);

гидрофосфат натрия двузамещенный (Sigma, Product Number: RES20908-A7, CAS-No.: 7558-79-4, США);

дигидрофосфат калия (Sigma-Aldrich, Product Number: PHR1330, CAS-No.: 7778-77-0, США);

калия хлорид (Sigma, Product Number : P9541, CAS-No. : 7447-40-7, США);

среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Sigma, Product Number: D7777, США);

среда Ham's F-12 (Flow Laboratories, Cat. No.: 10-431-22, Lot No.: 028003, Великобритания);

эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, Product code: CH30160.03, Lot.No: CSF0388, США);

гентамицин-Ферейн, раствор для инъекций 4% (Ферейн, Россия);

трипсин из поджелудочной железы свиньи, активность 285 ед/мг (ПанЭко, Россия);

этилендиаминтетрауксусная кислота (Serva, Cat.No: 11280.01, Германия);

карбонат натрия (Sigma, Product Number: S5761, США);

клеточная культура Hep G2 (ATCC HB 8065; УСФСС 85011430; ИНЦ РАН);

трипановый синий (Serva, Германия); альгинат натрия (Terra Aromatica, Россия);

хлорид кальция (Sigma-Aldrich, Product Number: 1016, CAS-No.: 10043-52-4, США);

додецилсульфат натрия (Sigma, Product Number: L3771, CAS-No.: 151-21-3, США);

гепарин-натрий Браун раствор для инъекций 25000 МЕ, ГОСТ Р 52249-2004;

диэтиловый эфир, ТУ 2600-001-43852015-10;

жидкий азот по ГОСТ 9293-74;

N-гидроксисукцинимид (Sigma Aldrich, Product Number: 56480, CAS-No.: 6066-82-6 США) (NHS);

гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (Sigma Aldrich, Product Number: 03450, CAS-No.: 25952-53-8, США) (EDC);

дигидрофосфат натрия, ГОСТ 245-76 (Реахим, Россия);

трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma, Product Number: T1503, CAS-No.: 77-86-1, США);

глицин (Sigma, Product Number: G8898, CAS-No. : 56-40-6, США);

диметилсульфоксид (Panreac, Испания);

сито металлическое (ГОСТ Р 51568-99 ИСО 3310-1-90);

стерилизатор воздушный (Витязь ГП-40-3, Республика Беларусь);

стеклянная палочка, ГОСТ 27460-87;

стакан из термостойкого стекла на 500 мл, ГОСТ 25336-82;

диализные мешки;

зажимы для диализных мешков;

пластиковый стакан на 1 л;

стеклянный стакан на 1 л;

кюветы кварцевые (LKB, Швеция);

90%-ая муравьиная кислота (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Германия));

скальпель медицинский ГОСТ 21240-89;

пробирки полипропиленовые микроцентрифужные типа «Эппендорф» (Eppendorf, Германия), объем 1.5 мл, с крышкой;

чашки Петри диаметр 40 мм ГОСТ 25336-82;

чашки Петри пластиковые диаметром 5 см (Greiner, Австрия);

шприцы инъекционные однократного применения объемом 2 мл ГОСТ 24861-91;

химическая посуда из фарфора: пестик и ступка по ГОСТ 9147-80;

пробирки пластиковые на 50 мл (Greiner, Австрия);

шпатель медицинский металлический ГОСТ 10778-83;

10%-м раствор хлорида лития (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Германия));

флаконы культуральные площадью 25 см<sup>2</sup> (Greiner, Австрия);

планшеты культуральные на 96, 48 и 24 лунки (Greiner, Австрия);

пипетки автоматические Eppendorf Research (Eppendorf, Германия), переменный объем 10-100 мкл, 100-1000 мкл;

медицинские инструменты: пинцеты, зажимы, хирургические ножницы по ГОСТ 19126-2007;

стеклянные флаконы герметичные, автоклавируемые, на 500 мл ГОСТ Р 53416-2009;

пробирки полипропиленовые на 15 мл, 50 мл (Greiner, Австрия), паспорт производителя; рН-метр по ГОСТ Р 50.2.036-2004; рН-метр (Mettler, Швейцария);

алмазный нож Diatome UltraAFM 45;  
кремниевые кантилеверы NSG10.

В работе было использовано лабораторное оборудование:

спектрофотометр (Ultrospec, LKB, Швеция);

весы лабораторные электронные OHAUS RV-313 (Ohaus Corp., США),  
предел взвешивания: 310г, точность: 0,001г, платформа: д.100мм, класс точности:  
II, ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009;

автоклав Labo Autoclave MLS-3020U (Panasonic, Япония);

центрифуга Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Германия);

световой микроскоп Axiovert 405 M (Carl Zeiss, Германия), общее  
увеличение 200;

инкапсулятор В-390, (Buchi, Швейцария);

шприцевой насос Legato 100 (KD Scientific, США);

эксикатор лабораторный на 2 литра ГОСТ 25336-82;

шприц Hamilton 1 мл;

соединитель тефлоновый, с затвором Луэра (без иглы), модель 1002TLL,  
объем 2,5 мл, калибр 22 (Hamilton, США);

микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия), вместимость —  
12×1,5/2,0 мл, максимальное ускорение — до 12 100 g (до 13 400 об/мин), таймер  
до 30 мин;

стерилизатор воздушный ГОСТ 22649-83;

шейкер-термостат (Elmi, Латвия);

компьютерный томограф (модель Light Speed VCT компании General  
Electric (GE));

биохимический анализатор проточного типа “Verno” (производство Electa  
Lab., Италия);

биохимический анализатор “Sapphire 350” (Audit Diagnostics, Ирландия);

микроскоп “Nikon Eclipse 50i” (Nikon Instruments, США);

комбинированная система Ntegra Tomo (ЗАО «НТМДТ», Москва), представляющая собой атомно-силовой микроскоп и ультрамикротом Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Austria) в одном устройстве, зонд A-probe (Nanosensors, Швейцария).

## 2.2 Экспериментальные животные

Крысы породы Wistar, самцы (возраст 1 год, вес 350 г), использовавшиеся в экспериментальной модели травматического повреждения бедренной кости (n=60) и для экспериментов по изготовлению микрочастиц децеллюляризованного матрикса печени (n=10), были получены из питомника лабораторных животных (филиал «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН). Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986). Содержание животных осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям содержания животных». Было получено ветеринарное свидетельство о здоровье животных, также после их приобретения они содержались в карантине на протяжении двух недель. Их содержание осуществлялось в поликарбонатных клетках, в которых были углубления для корма и решетчатые крышки из стали, древесные опилки из лиственных пород дерева служили в качестве подстила. Температура в виварии составляла 18-22°C, относительная влажность равнялась 50-65%, цикл освещения был двенадцатичасовым, а смена объема воздуха помещения в час была десятикратной. Рацион вивария был стандартным: питались животные комбинированным кормом для лабораторных животных (микробиологический статус соответствовал ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных

животных»), а также фильтрованная водопроводная вода *ad libitum* в стандартных питьевых бутылочках (микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»).

## 2.3 Методы изготовления матриц для исследования

### 2.3.1 Изготовление трехмерных матриц из рекомбинантного спидроина методом выщелачивания

Пористые матрицы были получены методом выщелачивания. Навеска рекомбинантного спидроина весом 15 мг растворялась при 40°C в течение 30 минут в 50 мкл раствора 10% хлористого лития с 90%-ой муравьиной кислотой. Полученный раствор центрифугировали 10 минут при 11300 g, затем 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 110 мг хлорида натрия, размер частиц соли был от 200 до 400 мкм. После этого происходило формирование диска диаметром 10 мм и высотой 2 мм. При комнатной температуре (20-25 °C) диск высушивался, подвергался на протяжении 2 часов обработке 96%-ым этанолом, после чего отмывался от частиц хлорида натрия дистиллированной водой. Полученные матрицы дегазировали и хранили в 70%-ном этаноле. Размеры пор составили от 100 до 600 мкм, пористость 85%.

### 2.3.2 Изготовление трехмерных матриц из фиброина шелка методом выщелачивания

Для получения очищенного фиброина шелка в термостойкий стакан на 500 мл наливали 500 мл бидистиллированной воды, в которой растворяли 1260 мг пищевой соды. Кокконы шелка разрезали и разделяли на тонкие слои, которые затем распушались вручную. Навеска шелка 1 г помещалась в тот же стакан. Полученная смесь кипятилась на водяной бане в течение 40 минут при

постоянном помешивании с помощью стеклянной палочки, шелк всегда был погружен в воду. Далее смесь опрокидывалась на металлическое сито и шелк, оставшийся на сите, промывался 3600 мл дистиллированной воды. Промытый шелк снова кипятился в течение 30 минут на водяной бане в термостойком стакане с 500 мл бидистиллированной воды, а затем промывался 3600 мл дистиллированной воды. Этап промывания и кипячения шелка повторялся еще два раза. Полученный фиброин шелка высушивался в воздушном стерилизаторе в течение ночи (стерилизатор воздушный (Витязь ГП-40-3, Республика Беларусь)). Полученный фиброин шелка взвешивался на весах (весы лабораторные электронные (Ohaus Corp., США)). Масса полученного фиброина шелка составляла чуть менее 750 мг. Готовый продукт представлял собой нити фиброина шелка белого цвета, хранящиеся при комнатной температуре.

Пористые матриксы были получены методом выщелачивания. Навеска фиброина шелка весом 15 мг растворялась при 40°C в течение 30 минут в 50 мкл раствора 10% хлористого лития с 90%-ой муравьиной кислотой. Полученный раствор центрифугировали 10 минут при 11300 g, затем 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 110 мг хлорида натрия, размер частиц соли был от 200 до 400 мкм. После этого происходило формирование диска диаметром 10 мм и высотой 2 мм. При комнатной температуре (20-25 °C) диск высушивался, подвергался на протяжении 2 часов обработке 96%-ым этанолом, после чего отмывался от частиц хлорида натрия дистиллированной водой. Полученные матриксы дегазировали и хранили в 70%-ном этаноле. Размеры пор составили от 200 до 400 мкм, пористость 85%.

### 2.3.3 Изготовление микрочастиц децеллюляризованного матрикса из печени крысы

Крысам породы Wistar за 20 минут до проведения процедуры забора печени, вводили 250 мкл гепарина внутривенно для снижения тромбообразования. Через 30 минут вводили 200 мкл трентала в качестве



ангиопротекторного препарата. Для общего парентерального наркоза через 30 минут вводили 0,20 мл препарата Zoletil. Далее помещали крысу брюхом вверх на операционный стол, расправляли лапы. Затем, оттягивая кожу на брюхе с помощью пинцета, ножницами делали продольный разрез кожи на средней линии брюшной стороны тела, начиная от полового отверстия и заканчивая около грудины. Далее вскрывали брюшную полость, производя продольный разрез по средней линии, после чего мышечные лоскуты отворачивались в стороны. Затем портальную вену канюлировали и промывали от крови 200 мл натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) со скоростью 150 мл/ч, состав буфера: натрия хлорид (Sigma-Aldrich, Product Number: S7653, CAS-No.: 7647-14-5, США) - 137 mM, калия хлорид (Sigma, Product Number : P9541, CAS-No. : 7447-40-7, США) - 2,7 mM, гидрофосфат натрия (Sigma, Product Number: RES20908-A7, CAS-No.: 7558-79-4, США) двузамещенный - 10 mM, дигидрофосфат калия (Sigma-Aldrich, Product Number: PNR1330, CAS-No.: 7778-77-0, США) - 1,76 mM, pH 7,4. Печень децеллюляризировали со скоростью 150 мл/ч последовательно 1) 500 мл натрий-фосфатного буфера, содержащего 0,1% додецилсульфата натрия и 1% Triton X-100, 2) 500 мл натрий-фосфатного буфера с 0,1% додецилсульфата натрия и 2% Triton X-100, 3) 500 мл натрий-фосфатного буфера с 0,1% додецилсульфата натрия и 3% Triton X-100. После децеллюляризации печень отмывали от детергентов 200 мл натрий-фосфатного буфера со скоростью 150 мл/ч, извлекали из крысы, помещали в чашку Петри и измельчали с помощью хирургических ножниц. Измельченную печень перемещали в пробирку, доводили объем до 15 мл 15% раствором глицерина в натрий-фосфатном буфере, инкубировали 20 минут и центрифугировали 10 минут при 500 об/мин. Осадок измельчался в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 5 минут. Полученные частицы перемещались в чистую предварительно охлажденную пробирку, объем доводили до 25 мл 70% этанолом. Полученную суспензию центрифугировали 3 раза по 10 минут при 500 об/мин. После каждого центрифугирования 70% супернатанта отбиралось в отдельную пробирку с микрочастицами нужного размера. Полученная готовая суспензия микрочастиц

переносилась в микропробирки на 1,5 мл типа «Эппендорф» (Eppendorf, Германия), пробирки с микрочастицами герметично закрывались и хранились при +4°C в 70% этаноле. Концентрация белка в суспензии микрочастиц межклеточного матрикса печени оценивалась следующим образом: 100 мкл полученной суспензии микрочастиц децеллюляризованного межклеточного матрикса помещали в чашку Петри и высушивали 3 дня при комнатной температуре на воздухе.

Концентрацию белка в продукте рассчитывали по формуле:

$$C(\text{микрочастиц}) = \frac{M(2) - M(1)}{V}$$

где  $M(1)$  – масса пустой чашки Петри (взвешивали до испытания), мг;

$M(2)$  – масса чашки Петри с сухими микрочастицами, мг;

$V$  - объем суспензии микрочастиц, вносимой в чашку Петри, мл.

Концентрация белка составляла 20 мг/мл.

Размеры микрочастиц децеллюляризованного межклеточного матрикса контролировались при помощи инвертированного оптического микроскопа (Axiovert 405 M, Carl Zeiss, Германия) и камеры Горяева. Наносились 10 мкл разбавленной суспензии микрочастиц на камеру Горяева. Ориентируясь на размеры сетки камеры, визуально оценивался размер микрочастиц: не более 1-5 мкм.

#### 2.3.4 Изготовление альгинатных сферических микроносителей

Для приготовления 1,6% раствора альгината натрия в стеклянный стакан на 400 мл вносилась навеска 3,3 г альгината натрия и 200 мл бидистиллированной воды. Навеска растворялась при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа. Раствор инкубировался при перемешивании в течение 1 часа. Раствор отстаивался при комнатной температуре до выхода из него пузырей воздуха. Далее для получения 1 мл альгинатных микроносителей раствор альгината

разводился бидистиллированной водой в 4 раза до концентрации 0,4% в стеклянном стакане при тщательном перемешивании. Полученный раствор дегазировался в эксикаторе в течение 3 часов до выхода всех пузырьков воздуха. В стеклянном стакане готовился раствор хлорида кальция с концентрацией 100 мМ. Далее 2,5 мл раствора набирались в шприц, а затем с помощью инкапсулятора В-390, (Buchi, Швейцария) производилось распыление раствора альгината через форсунку диаметром 120 мкм с параметрами: частота – 1000 Гц, напряжение – 2500 В, нагрев – откл. Скорость подачи раствора из шприца равнялась 5 мл/мин. В качестве принимающей раствора был 100 мМ раствор хлорида кальция. Полученные микроносители имели диаметр от 200 до 300 мкм. Хранились микроносители в 100 мМ растворе хлорида кальция с добавлением 30% этанола.

#### 2.4 Оценка адгезии клеток гепатомы человека Hep G2 на поверхность микроносителей

Для приготовления культуральной среды для культуры клеток человека Hep G2 навеска сухой среды DMEM – high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma, Product Number: D7777, США) разводилась в 1 л бидистиллированной воды, добавлялось 3,7 г карбоната натрия (Sigma, Product Number: S5761, США), после чего по цвету проверялся рН полученного раствора. Приготовленный раствор имел розовый цвет. Готовый раствор стерильно фильтровался через фильтр 0,22 мкм в стерильную посуду. Навеска сухой среды Ham's F12 (Flow Laboratories, Cat. No.: 10-431-22, Lot No.: 028003, Великобритания) разводилась в 1 л бидистиллированной воды, добавлялось 1,176 г карбоната натрия, после чего по цвету проверялся рН полученного раствора. Приготовленный раствор имел розовый цвет. Готовый раствор стерильно фильтровался через фильтр 0,22 мкм в стерильную посуду. Затем оба полученных раствора стерильно сливались в соотношении 1:1. Далее добавлялась эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, Product code: CH30160.03, Lot.No: CSF0388, США) до конечной концентрации

10%. Затем добавлялся гентамицин (Ферейн, Россия) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Полученная готовая среда хранилась стерильно при +4°C.

Для приготовления 250 мл раствора трипсина-Версена 2,25 г хлорида натрия (Sigma-Aldrich, Product Number: S7653, CAS-№.: 7647-14-5, США) растворяли в 200 мл бидистиллированной воды, добавляли 0,625 г трипсина (ПанЭко, Россия). 0,5 г ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (Serva, Cat.№: 11280.01, Германия) растворялась в 50 мл бидистиллированной воды. Далее полученные растворы смешивались, и смесь фильтровалась через фильтр 0,22 мкм в стерильную посуду. Раствор хранился стерильно при +4°C и использовался для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов.

Для приготовления стерильного фосфатно-солевого буфера в стеклянном флаконе 500 мл бидистиллированной воды растворялись следующие навески солей: 0,136 г дигидрофосфата калия (Sigma-Aldrich, Product Number: PHR1330, CAS-№.: 7778-77-0, США) (конечная концентрация 1,76 мМ), 1,79 г двузамещенного 12-тиводного гидрофосфата натрия (Sigma, Product Number: RES20908-A7, CAS-№.: 7558-79-4, США) (конечная концентрация 10 мМ), 4 г хлорида натрия (Sigma-Aldrich, Product Number: S7653, CAS-№.: 7647-14-5, США) (конечная концентрация 137 мМ), 0,1 г хлорида калия (Sigma, Product Number : P9541, CAS-№. : 7447-40-7, США) (конечная концентрация 2,7 мМ). Полученный раствор имел pH 7,4 и стерилизовался в автоклаве (Labo Autoclave MLS-3020U (Panasonic, Япония)) при температуре 121°C и высоком давлении в течение 30 минут.

Все операции по витализации образцов микроносителей проводились в ламинарном шкафу. Суспензию альгинатных микроносителей вносили в лунки стерильного 48-луночного планшета из расчета 300 мкл на лунку. В каждую лунку вносили по 200 мкл фосфатно-солевого буфера с pH 7,4 и инкубировали в течение 30 минут до осаждения микроносителей. Супернатант удаляли и повторяли описанную процедуру.

Суспензию клеток культуры Нер G2 с концентрацией  $4,2 \times 10^6$  клеток/мл в среде инкубации состава DMEM – high glucose и Ham's F12 в соотношении 1:1,

10% эмбриональной бычьей сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина вносили в лунки планшета по 200 мкл на лунку. Инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение суток.

Оценку количества адгезировавших клеток проводили с помощью МТТ-теста [290]. Для этого из лунок планшета отбирали супернатант. Густую суспензию микроносителей переносили в лунки 96-луночного планшета по 100 мкл на лунку, а затем в каждую лунку вносили по 50 мкл пятикратного раствора 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), который является субстратом для митохондриальных дегидрогеназ клетки. Планшет инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 3-4 часов до выпадения темно-синих кристаллов формазана. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида и инкубировали при комнатной температуре до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 540 нм с помощью анализатора иммуноферментных реакций Пикон (Пикон, Россия).

## 2.5 Подготовка образцов альгинатных микроносителей для криоСЗНТ

Образцы фиксировали с помощью раствора 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4). Инкубировали в течение 2-х часов в темноте при 4°C. Затем проводили 2 отмывки микроносителей фосфатно-солевым буфером по 15 минут каждая и ресуспендировали в 2,3 М растворе сахарозы. 50 мкл суспензии микроносителей переносили в микропробирку и инкубировали при 4°C в течение 12-ти часов.

## 2.6 Методы микроскопического исследования структуры матриксов

**Изучение структуры пористых матриксов методом сканирующей электронной микроскопии.** Для изучения структуры матриксов образцы фиксировали 3% глутаровым альдегидом, затем осуществляли постфиксацию 1 %

тетроксидом осмия, после чего обезвоживали возрастающими концентрациями этанола, а затем погружением в ацетон. После этого происходило высушивание образцов методом перехода критической точки в приборе. С помощью прибора Ion Coater IB-3 (Eiko Engineering, Мито, Япония) препараты были покрыты слоем золота в 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе в 6 мА, давлении 0,1 мм рт. ст., после чего структура матриц исследовалась в режиме SEI в сканирующем электронном микроскопе Camscan S2 (Cambridge Instruments, Кембридж, Великобритания), разрешение микроскопа составляло 10 нм, рабочее напряжение – 20 кВ. Итоговые изображения получались с помощью программного обеспечения MicroCapture (SMA, РФ).

**Изучение структуры пористых матриц методом сканирующей зондовой нанотомографии.** Трехмерная структура матриц изучалась с использованием комбинированной системы Ntegra Tomo (ЗАО «НТМДТ», Москва), представляющая собой атомно-силовой микроскоп и ультрамикротом Leica EM UC6NT (Leica Microsystems GmbH, Austria) в одном устройстве. Образцы матриц заливались в эпоксидную смолу, после чего выполнялась серия последовательных срезов ультрамикротомом с помощью алмазного ножа Diatome UltraAFM 45 с дальнейшим измерением топографии поверхности участка после каждого среза при помощи атомно-силового микроскопа. Измерения проводились в полуконтактном режиме с применением зондов – кремниевых кантилеверов NSG10 с резонансной частотой 240 кГц, радиус кривизны острия зонда составлял не более 10 нм. Далее изображения выравнивались в плоскости сканирования друг относительно друга, итоговые трехмерные структуры визуализировались и анализировались с помощью пакета программного обеспечения ImagePro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc., США), включающую опцию трехмерного реконструирования. Визуализация и статистический анализ объема пор, а также взаимосвязанных кластеров системы нанопор применялись, чтобы получить наиболее полную комплексную характеристику трехмерной структуры.

## 2.7 Метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии для оценки адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на изготовленных матриксах в экспериментах *in vitro*.

Образцы матриксов помещали в 24-луночный планшет, предназначенный для культивирования клеток, добавляли 300 мкл суспензии мышинных 3Т3 фибробластов, концентрация которой была 24000 клеток в 1 мл культуральной среды DMEM (Sigma), в составе которой было 10% фетальной бычьей сыворотки. Далее отмывали неприкрепившиеся клетки, после чего матриксы инкубировали в присутствии 6.1% CO<sub>2</sub> при 37°C. Замена культуральной среды осуществлялась каждые два дня. Через 1, 3, 14 дней смотрели изменения в количестве клеток. На протяжении 30 минут препараты фиксировались 4%-ным формалином, а клетки проявлялись флуоресцентным ядерным красителем SYTOX® Green nucleic acid stain (Invitrogen, Карлсбад, США), обладающим высокой афинностью к нуклеиновым кислотам. На изображениях изучали 2,55 мм<sup>3</sup> каждого образца, начиная от поверхности в глубину до 600 мкм. Количество клеток определялось с помощью приложений 3D for LSM Version 1.4.2 (Carl Zeiss, Йена, Германия) и Imaris 6.1.5 (Bitplane AG, Цюрих, Швейцария).

## 2.8 Экспериментальная модель травматического повреждения бедренной кости

Травматическое повреждение бедренной кости у крыс породы Wistar проводили, чтобы оценить возможность использования каркасных полимерных матриксов для восстановления костной ткани. Животные (n=60) были разделены на две опытных и одну контрольную группы (табл. 1).

Таблица 1 - Группы крыс с моделью дефекта бедренной кости в зависимости от сроков наблюдения и использованных матриксов, изготовленных из различных полимеров.

Сроки наблюдения Группы наблюдения	1 неделя	2 недели	4 недели	8 недель
спидроин	5 крыс	5 крыс	5 крыс	5 крыс
фиброин	5 крыс	5 крыс	5 крыс	5 крыс
контроль	5 крыс	5 крыс	5 крыс	5 крыс

В опытных группах в зону повреждения была произведена имплантация матриксов из фиброина шелка (n=20) или спидроина (n=20), а в контрольной группе (n=20) заполнение матриксом зоны повреждения не осуществлялось. Операция проходила при стерильных условиях, доза препаратов для анестезии рассчитывалась на животное весом около 200 гр и составила 0,05 мг золитила и 0,01 мг ксиловета, которые вводились внутримышечно в бедренную мышцу крысы. Далее выбривалось операционное поле в проекции бедренной кости, кожу обрабатывали 70%-ным раствором спирта и осуществляли линейный кожный разрез, длина которого составляла до 25 мм. Далее с помощью зажима типа «москит» делалось расслаивание фасций бедренной мышцы, чтобы получить доступ к кости, в итоге происходило обнажение наружной поверхности бедренной кости. В проекции диафиза бедренной кости в передне-заднем направлении выполнялось сквозное отверстие диаметром 2 мм. Из полученных дисков-матриксов формировались цилиндры с диаметром 2 мм, длиной 5 мм, которыми производилось заполнение дефекта. Перед имплантацией матриксы промывали в стерильном физиологическом растворе. По окончании операции рана зашивалась и закрывалась повязкой. Животные содержались до и после операции при комнатной температуре, в одинаковых условиях, питание было согласно стандартному рациону: комбинированным кормом для лабораторных животных, а также фильтрованной водопроводной водой *ad libitum* в стандартных питьевых бутылочках.



По 5 животных из каждой группы через 1, 2, 4, 8 недель после операции выводилось из эксперимента с помощью ингаляционной передозировки эфира. Путем экзартикуляции по суставам производилось извлечение бедренных костей с окружающими мягкими тканями, мягкие ткани удалялись, и кость помещалась в 10% нейтральный раствор формалина.

Исследования костей проводились на 64-срезовом мультиспиральном компьютерном томографе (модель Light Speed VCT) компании General Electric (GE)). Параметры сканирования: 120 кВ, 80 мА, толщина реконструкции 0,6 мм. Полученные серии изображений обрабатывались на рабочей станции экспертного класса с многопрофильным просмотром изображений AW VolumShare 4 по 3D («three-dimensional») и VR («virtual reality») протоколам. Количественная оценка проводилась по индексу костной мозоли (ИКМ) по шкале Хаунсфилда. С этой целью проводили динамические измерения денситометрических показателей интермедиарной зоны регенерированной ткани и интактного кортикального слоя с помощью спиральной компьютерной томографии, ИКМ вычисляли по формуле:

$$\text{ИКМ} = \text{ИР}(\text{НУ}) / \text{КС}(\text{НУ}) \times 100,$$

где ИР - плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани в единицах Хаунсфилда, НУ;

КС - плотность интактного кортикального слоя прилежащего участка кости в единицах Хаунсфилда, НУ. Единицы Хаунсфилда оценивают степень абсорбции рентгеновского излучения анатомическими структурами организма по отношению к воде. Степень абсорбции рентгеновского излучения водой в шкале Хаунсфилда принимается равной 0. Воздух и жир имеют отрицательные значения, костная ткань - положительные значения.

На полученных изображениях в интерактивном режиме выделяли область, в которой автоматически высчитывалась площадь и плотность зоны регенерации в единицах Хаунсфилда. В процессе измерений оценивали форму и соотношение костного дефекта и материала для замещения костной ткани, структуру кости, выявляли наличие дистрофических изменений костного и мягкотканого компонентов, характер изменений в окружающих тканях. Оценку вышеуказанных

параметров проводили в 2 этапа. На первом этапе полученные аксиальные изображения просматривали в костном и мягкотканом окнах, оценивали состояние костных и мягкотканых структур в области дефекта, проводили измерения площади и плотности костного регенерата. На втором этапе измерение проводили на серии мультипланарных реконструкций в костном и мягкотканном режиме. Качественная оценка остеорегенерации проводилась по следующим критериям:

- снижение четкости границы костного дефекта,
- повышение оптической плотности костной мозоли за счет формирования островков минерализации.

О клиническом состоянии животных судили по уровню общего белка, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), а также креатинина, которые определяли на автоматическом биохимическом анализаторе проточного типа “Verno” (производства Electa Lab., Италия). Щелочную фосфатазу определяли на биохимическом анализаторе “Sapphire 350” (Audit Diagnostics, Ирландия).

Формула крови была подсчитана на лабораторном микроскопе “Nikon Eclipse 50i” (Nikon Instruments, США) после окрашивания мазков крови по стандартной методике гематоксилин-эозином. Кровь забиралась у животных прижизненно из хвостовой вены.

## 2.9 Проведение статистического анализа полученных результатов

Обработка данных, полученных в ходе хроматографического исследования, проводилась с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel. Для построения графиков использовали найденные средние значения ( $\bar{X}$ ), стандартную ошибку, среднеквадратические отклонения (SD). Используя t-критерий Стьюдента определяли достоверность различий (при  $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Разработка технологии сканирующей зондовой крионанотомографии

#### 3.1.1 Создание аппаратного комплекса для проведения криоСЗНТ

В качестве методики для анализа наноструктуры поверхности биологических образцов предлагается метод сканирующей зондовой микроскопии, который является методом неразрушающего многопараметрического анализа поверхности с наноразмерным (вплоть до молекулярного и атомного) разрешением. Главной особенностью предлагаемой методики является возможность выполнять серии последовательных измерений поверхности после сверхтонких срезов исследуемого биологического объекта и восстанавливать его трехмерную наноструктуру с помощью нанотомографии. Был разработан дизайн нового прибора для выполнения томографических наномасштабных исследований в криогенных условиях трехмерных наноразмерных структурных и морфологических свойств биологических объектов. Его применение позволяет получить новые визуализированные научные результаты относительно трехмерной организации внутриклеточных органелл и структур в клетках, кроме того расширяет существующие представления о наноструктурных особенностях биологических тканей и искусственных материалов, перспективных для применения в регенеративной медицине. Также предполагается, что этот прибор и технология позволит диагностировать ряд патологических изменений структуры тканей и органов перед трансплантацией.

Концепция разработки заключается в объединении методик и аппаратных решений сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) и ультрамикротомии (УМТ) при низких температурах (криоУМТ) в рамках одной измерительной системы для обеспечения сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ), обладающей следующими базовыми характеристиками:

1) возможностью измерений основными методами СЗМ (топография, фазовый и амплитудный контраст) поверхности образцов клеточных макро- и микроносителей непосредственно после среза ультрамикротомом *in situ* в рамках рабочего цикла среза УМТ;

2) согласованным функционированием СЗМ и ультрамикротома для возможности трехмерной реконструкции структуры образцов на основе последовательных измерений;

3) обеспечением достаточного разрешения и уровня шума СЗМ, необходимых для изучения ультраструктуры клеточных макро- и микроносителей – уровень шума по вертикали Z 0.05 нм RMS, латеральное разрешение в плоскости образца XY 5-10 нм.

Для проведения срезов используется серийный криоультрамикротом Leica Microsystems EM UC6/FC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия), что приводит к важнейшему основному конструктивному и техническому решению по разработке комплекса криоСЗНТ – встраиванию основных модулей системы (системы сканирования и измерительного модуля СЗМ) в криокамеру ультрамикротома, которая служит основой всего устройства. Далее мы подробнее рассмотрим технические решения основных блоков комплекса, их функционирование и достигаемые характеристики. Составные части комплекса представлены на рис. 1. Функциональная схема – на рис. 2, внешний вид комплекса – на рис. 3.

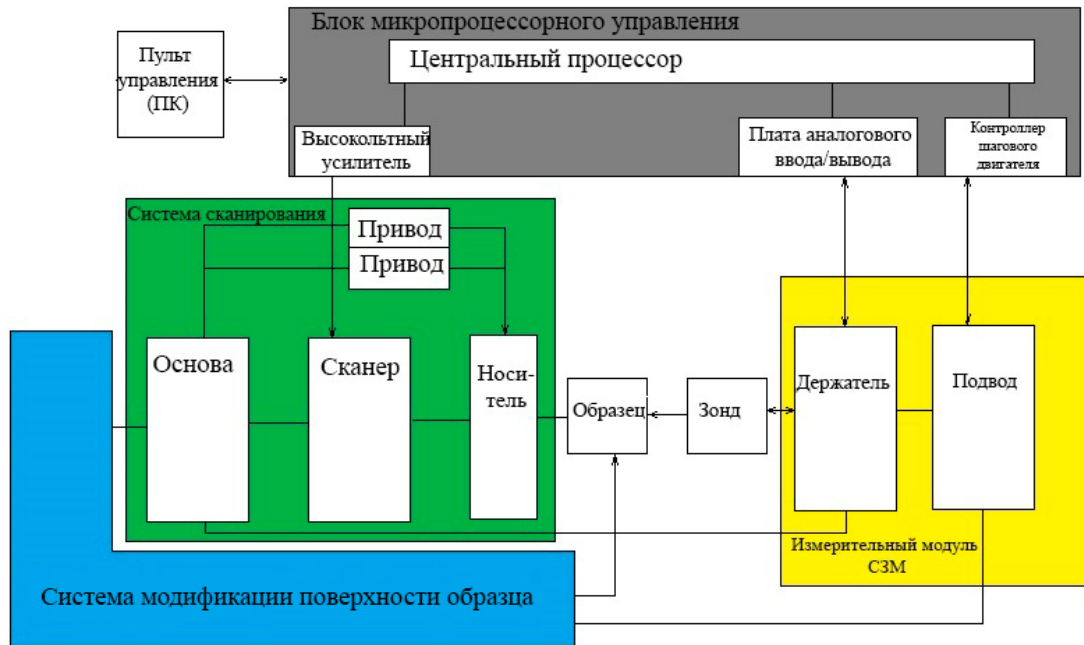


Рисунок 1 - Составные части комплекса

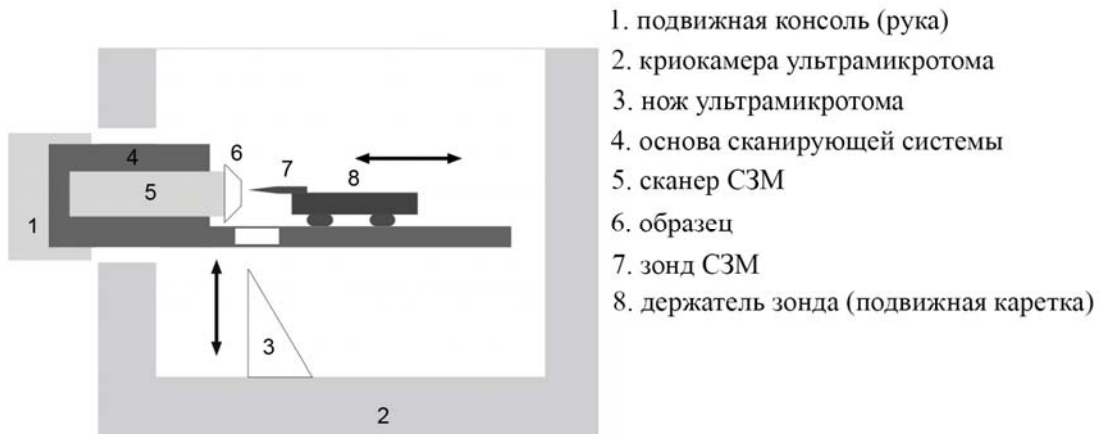


Рисунок 2 - Функциональная схема комплекса

а)



б)

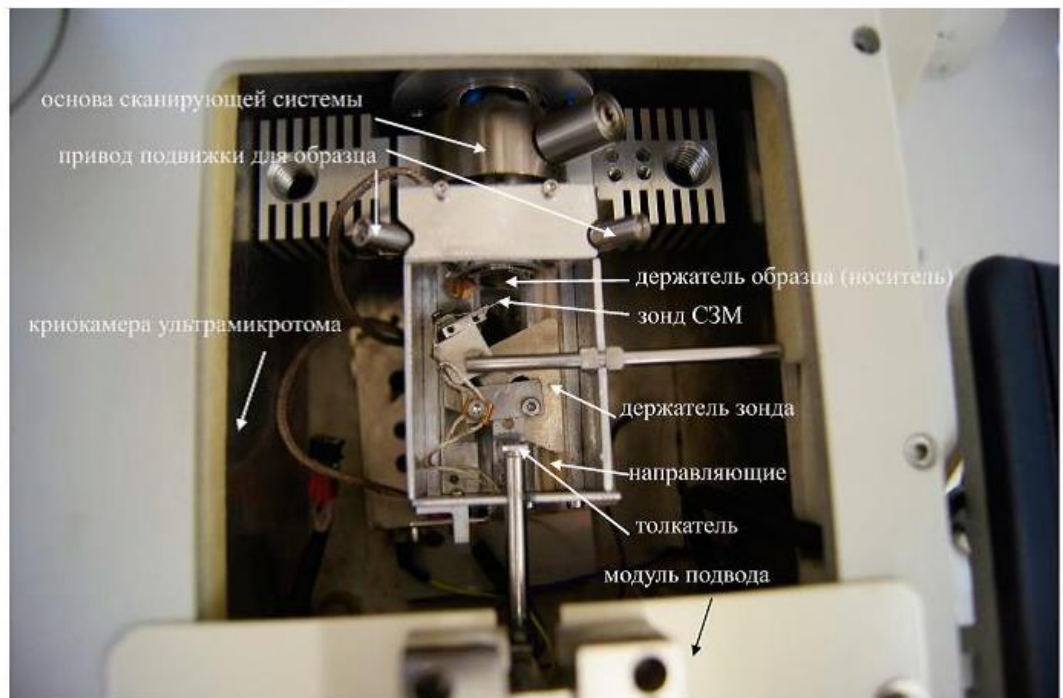


Рисунок 3 - Внешний вид комплекса для криоСЗНТ: а) общий вид; б) система сканирования в криокамере ультрамикротомы (вид сверху)

**Система проведения ультрасрезов при СЗНТ в криогенных условиях.** В качестве системы проведения срезов образца используется криоультрамикротом Leica Microsystems EM UC6/FC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия), оснащенный криокамерой для выполнения сверхтонких срезов образцов при низких температурах. Для выполнения поставленных задач криоультрамикротом должен обеспечивать необходимые технические характеристики:

- 1) толщину среза – от 25 до 500 нм;
- 2) максимальный размер поверхности срезаемого образца – не менее 3×3 мм;
- 3) скорость среза - 0.05-100 мм/с;
- 4) рабочий диапазон температур от минус 190°С до 25°С.

Для выполнения ряда последовательных срезов толщиной от 25 нм применялись специализированные алмазные ножи с углом раствора 35°, приспособленные для исследований как при комнатной, так и при низких температурах. Использование стеклянных ножей не дало бы возможности получить ряд в несколько десятков срезов подобной толщины без снижения качества срезов, что критично для выполнения нанотомографических реконструкций.

Всего лишь две компании на мировом рынке производят криоультрамикротомы, отвечающие базовым требованиям по толщине срезов и диапазону рабочих температур: Leica Microsystems GmbH (Австрия) и Boeckeler Instruments (США). Криоультрамикротом Leica Microsystems EM UC6/FC6 удовлетворяет всем необходимым требованиям, поэтому был выбран в работе в качестве системы проведения ультрасрезов образца для экспериментального комплекса криоСЗНТ.

**Система сканирования.** Система сканирования образцов состоит из модулей сканера, основы и приводов подвижки для образца. Трехмерная модель и внешний вид системы сканирования представлены на рисунках 4, 5, 6, 7, 8. Она размещается в криокамере ультрамикротомы и закрепляется вместо штатного

держателя образца криоультрамикротомы так, что ось пьезотрубок сканера совпадает с осью руки (подвижной консоли) криоультрамикротомы. Данное расположение позволяет установить никелевый носитель образца на сканере при помощи магнита и выполнить его срез при помощи ножа ультрамикротомы, а затем без перемещения образца на сканере выполнить сканирование образца непосредственно после среза в камере ультрамикротомы. При этом сканирование образцов выполняется в вертикальной плоскости, совпадающей с плоскостью среза.

В разработанной конструкции используется двухтрубчатый пьезосканер, с использованием трубок из пьезокерамики толщиной  $h = 0,5$  мм и длиной  $L = 32$  мм. Конструкция вложенных пьезотрубок обеспечивает компенсацию термического расширения и дрейфа трубок при изменениях температуры, что особенно важно при работе комплекса в широком диапазоне температур.

Внешняя пьезотрубка большего диаметра (внешний диаметр  $D = 12$  мм, внутренний диаметр  $d = 11$  мм) служит для перемещения образца по оси сканера (оси  $Z$ ). Внутренняя пьезотрубка меньшего диаметра (внешний диаметр  $D = 9$  мм, внутренний диаметр  $d = 8$  мм) имеет четырехсекционные электроды и используется для сканирования образцом в плоскости  $XY$ . В результате подачи противофазного напряжения на противоположные электроды возникает изгиб пьезотрубки и перемещение образца в плоскости сканирования. При заданных размерах трубки и диапазоне прикладываемого электрического напряжения от  $-300$  до  $+300$  В получаем размер области сканирования  $50 \times 50$  мкм, а диапазон перемещения образца по оси  $Z$  – около 7 мкм. Расчетные резонансные частоты сканера составляют более 10 кГц в аксиальном направлении и более 1 кГц в латеральном направлении.

Использование данной конфигурации для сканирования образцом позволяет закрыть стенками и шторкой зону измерений с держателем зонда во время измерений. Это позволяет изолировать зону измерений от газовых конвекционных потоков в криокамере, что критично для достижения требуемых уровней шумов и разрешения СЗМ.



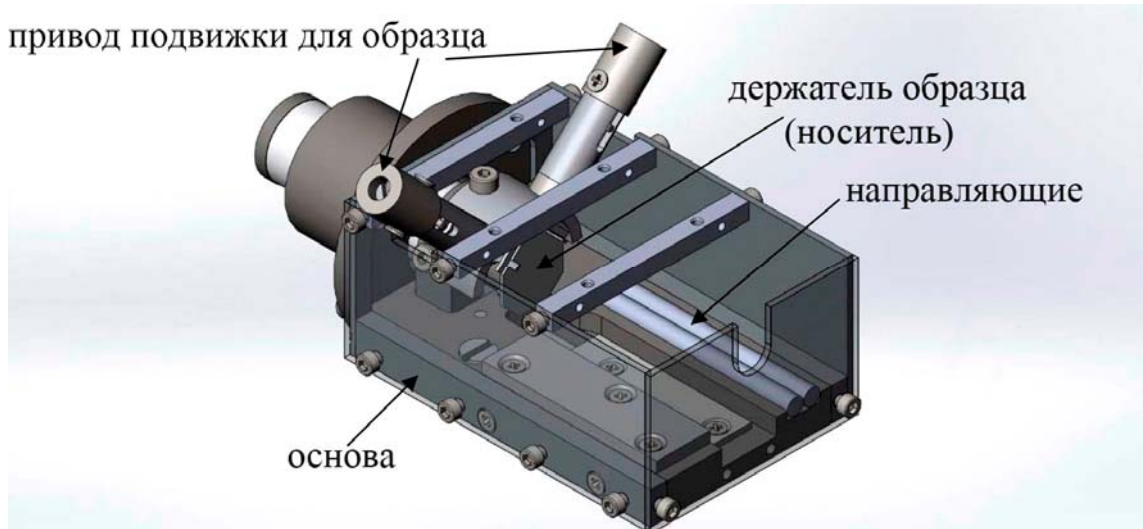


Рисунок 4 - Система сканирования (трехмерная модель)

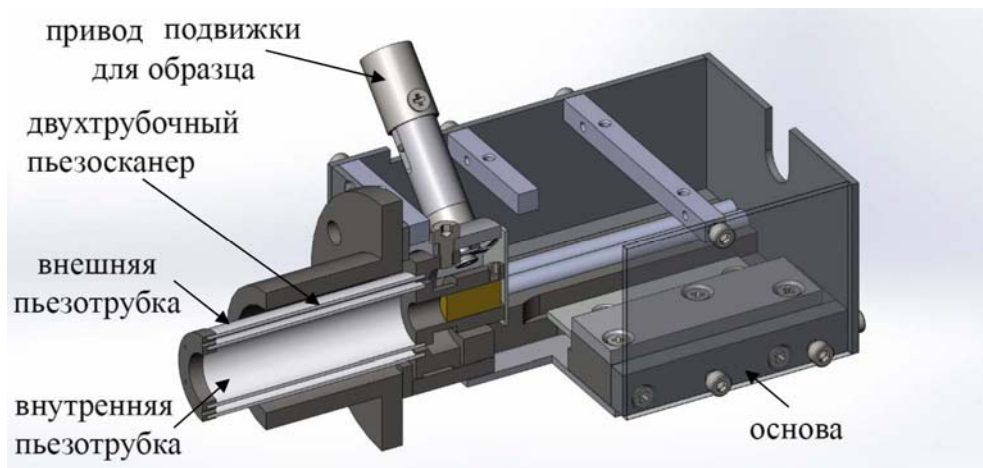


Рисунок 5 - Система сканирования (трехмерная модель, в разрезе)

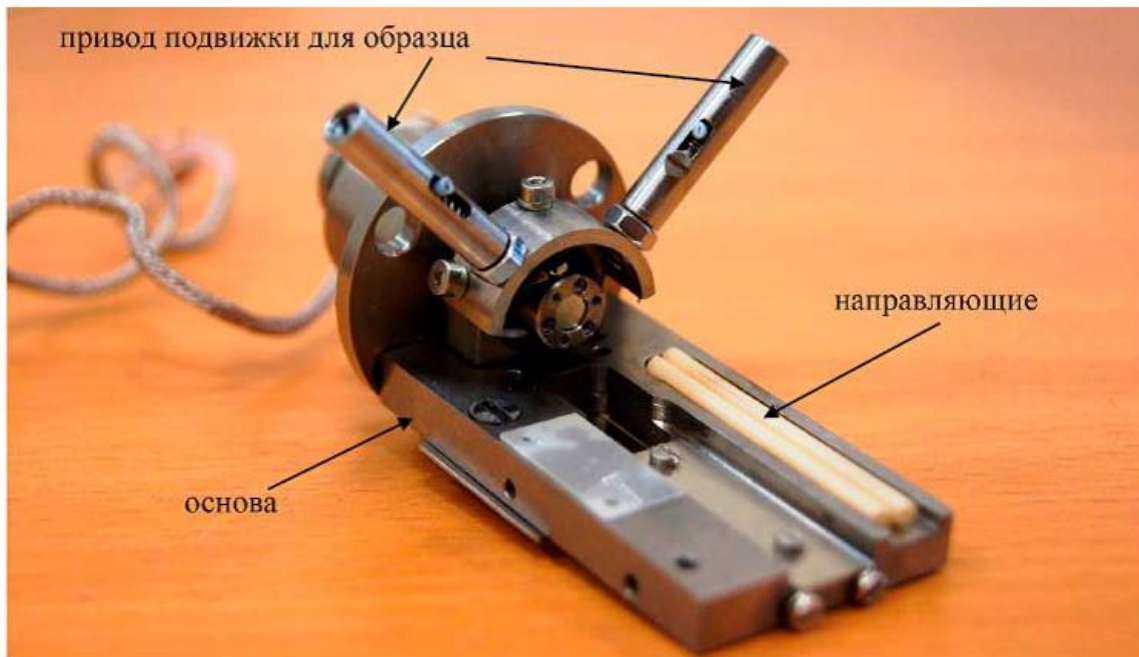


Рисунок 6 - Внешний вид системы сканирования без защитных пластин и крышки

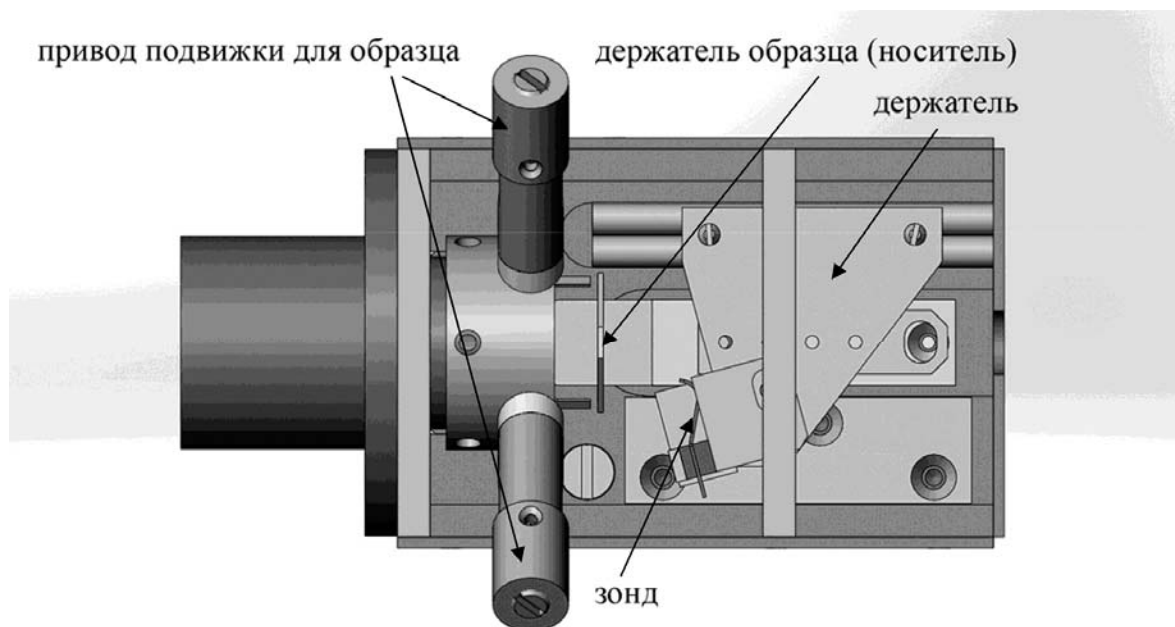


Рисунок 7 - Расположение держателя зонда в системе сканирования (трехмерная модель, вид сверху)



Рисунок 8 - Внешний вид системы сканирования с установленным держателем зонда

**Измерительный модуль СЗМ.** Измерительный модуль СЗМ состоит из двух основных модулей – держателя зонда и модуля подвода. Внешний вид деталей представлен на рисунках 9, 10.

Держатель зонда размещается на направляющих на основе системы сканирования и подводится горизонтально к поверхности образца для сканирования. В качестве зонда используются СЗМ-зонды на основе кварцевых резонаторов (A-probe, Nanosensors, Германия), что позволяет исключить из конструкции обычную для СЗМ оптическую систему регистрации отклонений зонда и обеспечить уверенное функционирование в криокамере. При выполнении среза держатель перемещается вместе с системой сканирования, - таким образом относительные нефункциональные перемещения зонд-образец в плоскости сканирования минимизируются. Этот аспект критичен для выполнения последовательных измерений в одной и той же области образца после срезов и последующей трехмерной нанотомографической реконструкции структур образца, так как при значительных относительных нефункциональных

перемещениях зонд-образец зонд не будет попадать в требуемую область с достаточной точностью, что усложнит трехмерную реконструкцию.

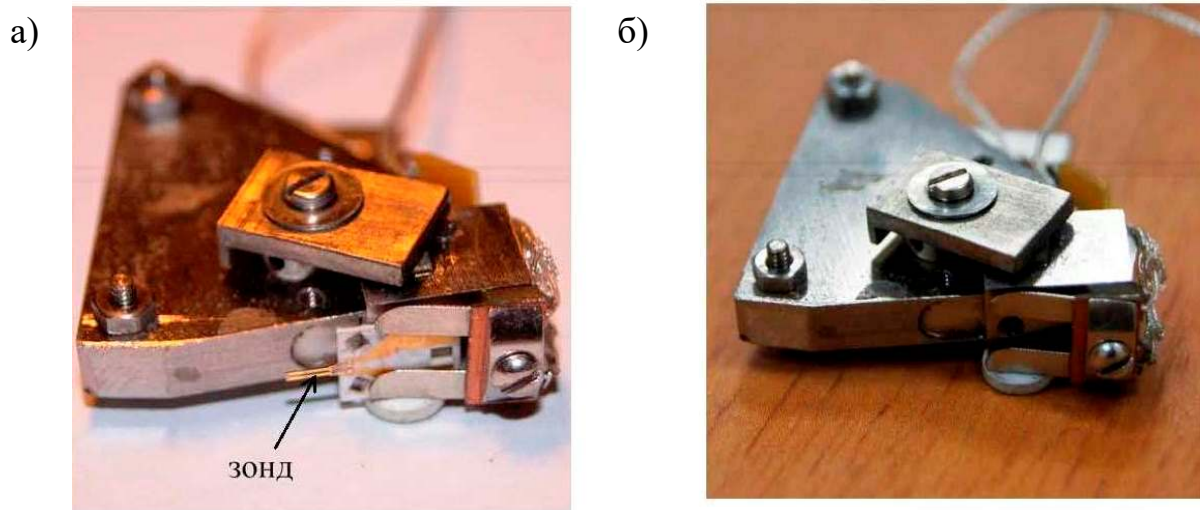


Рисунок 9 - Внешний вид держателя зонда (вид спереди): а) – с установленным зондом A-probe; б) – без зонда

Модуль подвода закрепляется на верхней крышке криокамеры вне охлаждаемой зоны и передвигает держатель зонда вдоль оси  $Z$  к образцу или от образца при помощи толкателя, входящего во внутреннюю зону криокамеры. Для перемещения толкателя используется прецизионный шаговый двигатель (8СМА06-13-15, Standa, Литва). Это техническое решение позволяет использовать шаговый двигатель при комнатной температуре, что повышает надежность и снижает стоимость используемых комплектующих, и освободить ограниченное пространство внутри криокамеры.

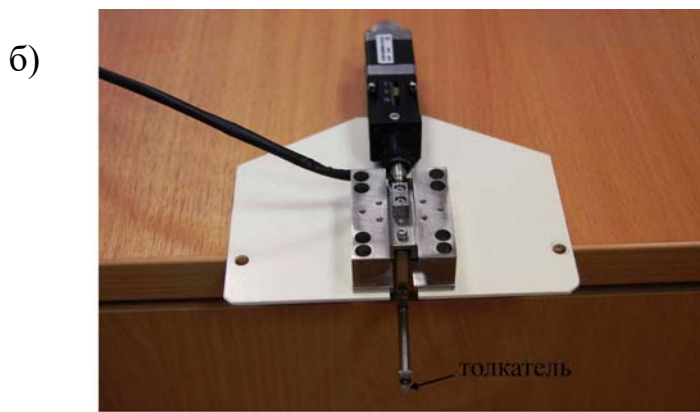
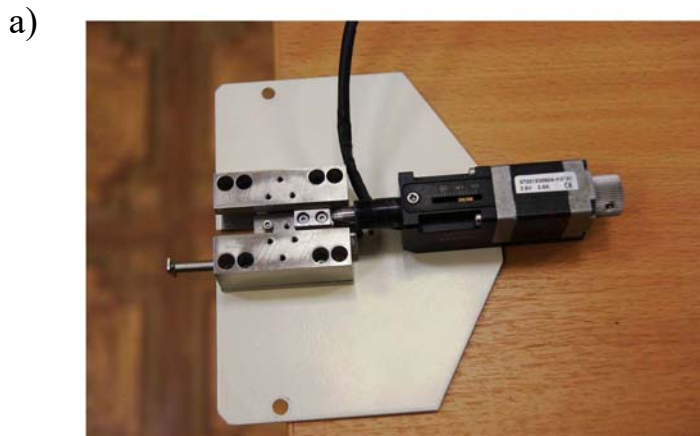


Рисунок 10 - Модуль подвода: а - вид сверху; б – вид спереди

**Блок микропроцессорного управления.** Сканер, двигатель подвода и зонд СЗМ на базе кварцевого резонатора соединяются с блоком микропроцессорного управления для согласованного выполнения операций и измерений. Блок микропроцессорного управления, в свою очередь, соединяется при помощи интерфейса USB 2.0 с управляющим компьютером.

Блок микропроцессорного управления состоит из следующих функциональных узлов:

- 1) Плата аналогового ввода-вывода
- 2) Синхронный детектор
- 3) Центральный процессор
- 4) Высоковольтный усилитель

5) Контроллер шагового двигателя

6) Источник питания

Данный блок решает следующие основные задачи, необходимые для функциональности комплекса:

1) Управление пьезоэлектрическим сканером для сканирования образцом;

2) Сбор данных и синхронное детектирование с зонда СЗМ;

3) Поддержание обратной связи образец-зонд в различных режимах;

4) Управление шаговым двигателем подвода;

5) Обеспечение интерфейса с управляющим компьютером.

### 3.1.2 Последовательные этапы работы аппаратного комплекса при выполнении криоСЗНТ

Описанная выше архитектура комплекса и его сборочных единиц позволяет обеспечить функционирование комплекса СЗМ/криоультрамикротом по следующей основной схеме.

Образец на магнитном носителе закрепляется на сканере. Выполняется охлаждение криокамеры ультрамикротом до необходимой температуры и делается срез поверхности образца ножом криоультрамикротом. Затем выполняется подвод зонда СЗМ, закрепленного в держателе, к поверхности образца. Зона измерений на поверхности может быть выбрана и скорректирована при помощи приводов системы сканирования образцов, позволяющих передвигать в вертикальной плоскости магнитный носитель с образцом на сканере. Система сканирования образцов закрывается шторкой снизу и крышкой сверху для минимизации конвекционных газовых потоков в зоне измерений и выполняется сканирование поверхности зондом и измерение методами СЗМ. После выполнения измерений зонд СЗМ отводится от поверхности, крышка и шторка открываются и производится следующий срез поверхности образца.

Данная процедура может быть повторена в цикле, в результате чего будет получена серия послойных СЗМ изображений после последовательных

сверхтонких срезов, на базе которой при помощи специализированного программного обеспечения может быть воссоздана трехмерная структура изучаемого образца в объеме.

Для достижения необходимого качества измерений необходимо ограничить влияние на систему механических вибрационных и акустических шумов, а также конвекционных газовых потоков в криокамере на систему зонд-образец. Уменьшение влияния механических вибрационных и акустических шумов достигается за счет увеличения жесткости и уменьшения массы элементов системы, что приводит к увеличению резонансных частот и снижению чувствительности к низкочастотным вибрациям. Это обеспечивается за счет следующих конструктивных решений комплекса СЗМ/криоультрамикротом:

- 1) образец располагается на пьезосканере и выполняется сканирование образцом;
- 2) держатель зонда СЗМ устанавливается на основе системы сканирования образцов, которая механически соединена с корпусом сканера, что минимизирует механическую петлю «зонд-образец» и чувствительность измерительной системы к механическим и вибрационным шумам, а также нефункциональные относительные перемещения зонда относительно образца в плоскости сканирования;
- 3) держатель зонда дополнительно прижимается к основе за счет магнитной системы, что позволяет уменьшить его массу при сохранении устойчивости. Это позволяет повысить резонансные частоты системы и снизить чувствительность измерительной системы к механическим и вибрационным шумам.

То, что держатель зонда располагается на основе и перемещается вместе с рукой микротомы, вибрационные шумы, к которым чувствительна сама рука микротомы, эффективно отсеиваются.

Влияние газовых потоков и термических дрейфов снижается за счет следующих конструктивных особенностей:

- 1) во время выполнения измерений система сканирования образцов с держателем СЗМ зонда внутри закрывается шторкой снизу и крышкой сверху; таким образом, зона измерений эффективно изолируется со всех сторон от газовых конвекционных потоков в криокамере ультрамикротоме, что снижает шумы и повышает точность измерений;
- 2) корпус сканера и соединенные с ним детали основы системы сканирования изготавливаются из титана, что снижает термические и нефункциональные дрейфы при работе при низких температурах.

Совокупность вышеописанных технических решений позволила достичь необходимых технических характеристик комплекса СЗМ/криоультрамикротом для выполнения исследований альгинатных гидрогелевых микроносителей методом сканирующей зондовой нанотомографии.

Стоит отметить, что подобный метод ранее не применялся для анализа гелевых клеточных микроносителей ни в России, ни за рубежом, и его применение для подобных объектов требует решения ряда методических задач, связанных как с подготовкой образцов, так и непосредственно с измерениями. В этой работе для сохранения нативной структуры модифицированных гелевых микроматриц проведено последовательных сверхтонких срезов и СЗМ-анализ впервые опробованы при низкой температуре (до - 190 °С). Для этого потребовался подбор соответствующих фиксаторов и криопротекторов, а также выбор оптимальной технологии заморозки образцов без нарушения нативной структуры вследствие кристаллизации содержащейся в них воды. Результаты данных экспериментов описаны в разделе 3.3

Большая часть биомакромолекул (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) состоит из легких химических элементов (С, Н, О, N), слабо рассеивающих электроны, в связи с чем на электронно-микроскопических изображениях биобъектов отмечается слабый контраст. Стоит отметить, что после соответствующей подготовки и среза ультрамикротомом СЗМ-измерения биологических образцов предоставляют возможность исследовать архитектуру и локализацию макромолекулярных компонент в клетках [291]. КриоСЗНТ может



быть хорошим инструментом при исследовании внутриклеточных наноструктур и макромолекулярных комплексов. Одним из требований в данной методике является то, что при срезе алмазным ножом не должна происходить пластическая деформация образца. Только в этом случае получится качественный сверхтонкий срез поверхности образца с помощью ультрамикротомата. Для некоторых биологических образцов и мягких полимерных материалов, чья температура стеклования ниже комнатной, это условие выполнимо, если производить срезы при низкой температуре (криоультрамикротомия), когда образец и нож находятся в специальной криокамере, охлаждающейся жидким азотом. Объединение сканирующего зондового микроскопа и криокамеры ультрамикротомата в одной конструкции дает возможность измерений поверхности блока образца непосредственно после среза при низкой температуре (до  $-190^{\circ}\text{C}$ ). Применение криоСЗНТ совместно с необходимыми технологиями подготовки образца (витрификация) сделает возможным расширить область применения СЗНТ для изучения нативных биологических структур и гидратированных материалов [292]. Ранее была выполнена трехмерная реконструкция хитиновой структуры антенных сенсилл Placodea и Coeloconica паразитической осы Cotesia glomerata с помощью метода СЗНТ [293]. Стоит добавить, что результаты СЗМ достоверны, если осуществляется должное методическое обеспечение для калибровки и контроля измерительных параметров. В настоящее время ряд национальных стандартов Государственной системы обеспечения единства измерений РФ, которые относятся к измерениям параметров поверхности при помощи СЗМ и СЭМ, разработан и вводится в обеспечение нормативно-методической базы нанометрологии. Также разработан ряд национальных стандартов рельефных мер нанометрового диапазона для калибровки СЗМ. Тем не менее, данные стандарты нельзя применить целиком к рассматриваемым методикам нанотомографии, например, они неприменимы по отношению к точности совмещения последовательных послойных СЗМ-изображений в плоскости сканирования, а также точности определения толщины срезов ультрамикротомата, которые определяют разрешение трехмерной реконструкции по оси Z. Визуализация и

изучение трехмерных наноструктур, топологии и характеристик систем микро- и нанопор в объеме полимерных биodeградируемых матриц является перспективным направлением для развития метода СЗНТ [294] [295] [296] [297].

Сохранение и стабилизация нативной структуры на уровне индивидуальных макромолекул является одним из важных требований для микроскопического изучения биообъектов, и фиксация при низкой температуре - наилучший способ стабилизации макромолекулярной структуры биообъектов. С помощью существующих техник ультрамикротомии возможно получение сверхтонких срезов поверхности различных биообъектов и материалов толщиной от 25 до 250 нм. Для криофиксации нативной структуры биологических объектов необходимо применение криоультрамикротомии, при которой срезы производятся при низких температурах (до  $-190^{\circ}\text{C}$ ). Для достижения наилучших результатов образец должен быть подвергнут измерениям через минимальное время после среза, при низкой температуре, с минимальными механическими и структурными изменениями. В связи с этим, предпочтительнее в данном случае является анализ при низких температурах не среза, а поверхности блока образца непосредственно после среза, так как поверхность блока испытывает гораздо меньше механических повреждений в процессе среза.

Разработанный нанотехнологический комплекс и технология криоСЗНТ могут быть использованы для решения широкого класса задач. В частности, применение данной технологии позволит оценивать трехмерное распределение наночастиц и их кластеров в биологических объектах и биоискусственных конструкциях, в том числе применяемых в средствах доставки лекарственных веществ, степень нанопористости и трехмерную структуру взаимосвязанных систем микро- и нанопор в биосовместимых матрицах, трехмерную организацию компартментов в клетках. Основной областью применения данного комплекса является обеспечение нанотехнологических и материаловедческих исследований и разработок в области биоинженерии, создания и контроля качества новых фармацевтических препаратов и изделий медицинского назначения для

регенеративной медицины, и анализа структур клеток и тканей для целей медицинской диагностики.

На данный момент, существуют и другие устройства и методики, позволяющие изучение микроструктуры объектов, измеряя и визуализируя полученные данные о внутренней морфологии образца как в двухмерных, так и трехмерных изображениях. Например, микрокомпьютерная томография (МКТ) [298], предназначенная дополнить сканирующую электронную микроскопию благодаря трехмерной микроскопии. МКТ позволяет получать информацию о внутренней микроструктуре объекта, при этом не разрушая структуру и не требуя дополнительной подготовки образца, внутренняя морфология исследуется в двухмерном и трехмерных режимах, а получаемые реалистичные модели могут использоваться для виртуального изучения объекта. Визуализация при МКТ может осуществляться в виде трех ортогональных сечений, а также срез за срезом, что делает данное устройство схожим по качеству получаемых результатов с ультрамикротомом. Однако, МКТ не позволяет исследовать объекты в жидком состоянии или состоянии геля, что возможно при использовании криоультрамикротомии, а также не дает возможности оценить взаимосвязанность нанопор, что играет важную роль при использовании исследуемых материалов в регенеративной медицине.

Также, одной из методик, используемых для локального анализа материалов, является ФИП (фокусируемый ионный пучок) [63]. Принцип его работы схож с электронным микроскопом, разница в том, что в ФИП используется ионный пучок. Ещё одно отличие состоит в том, что метод ФИП разрушает образец путем вырывания атомов объекта при ударе ионов галлия о его поверхность. А за счет того, что в процессе обработки происходит проникновение атомов гелия в толщу образца на несколько нанометров, поверхность образца приобретает аморфное состояние. Одним из преимуществ этого метода является очень тонкая обработка поверхности образца, т. е. толщина удаленного верхнего слоя может равняться размеру атома, при этом следующий слой не затрагивается. ФИП можно использовать для контролируемого травления, так как положение

ионного пучка, размер и время воздействия хорошо регулируются. При использовании данной методики возможно травление до нанометрового масштаба. В этом ФИП имеет преимущество перед нашим методом, так как толщина слоя, подвергающегося травлению, составляет не менее 2 нм, в то время как толщина среза криоультрамикротомом больше 10 нм. Кроме того, при СЗНТ можно исследовать лишь те виды материалов, которые пригодны для резки алмазным ножом, в то время как ФИП можно использовать практически для любого вида материалов, пригодного для ионного фрезерования. Однако, при исследовании криоСЗНТ не происходит радиационного повреждения образца, отсутствует поверхностная молекулярная модификация образца, а также не происходит изменений его химического состава, что является важным фактором при исследовании биологических образцов, так как важно сохранить при исследовании их нативную структуру и свойства. Кроме того, наша методика позволяет исследовать большую площадь поверхности блока, и не требует долгой предварительной подготовки образца, в отличие от ФИП, где пробоподготовка занимает несколько часов с использованием специальных методов.

Разработка новых технологий трехмерного анализа биоматериалов и биоискусственных конструкций на их основе (нанотомографии) позволит значительно повысить эффективность создания новых биомедицинских изделий и тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины, а также улучшить диагностику органов и тканей, предназначенных для трансплантации.

В качестве примеров использования разработанной технологии сканирующей зондовой нанотомографии для анализа наноструктуры биологических объектов в данной работе приведены результаты изучения особенностей структуры пористых каркасных матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка, а также альгинатных микроносителей, поверхность которых модифицирована микрочастицами децеллюляризованной ткани печени.

### 3.2 Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриц из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка при комнатной температуре

Методом выщелачивания были получены трехмерные пористые матрицы из рекомбинантного спидроина rS1/9 и фиброина шелка. Внешний вид матриц показан на рисунке 11.

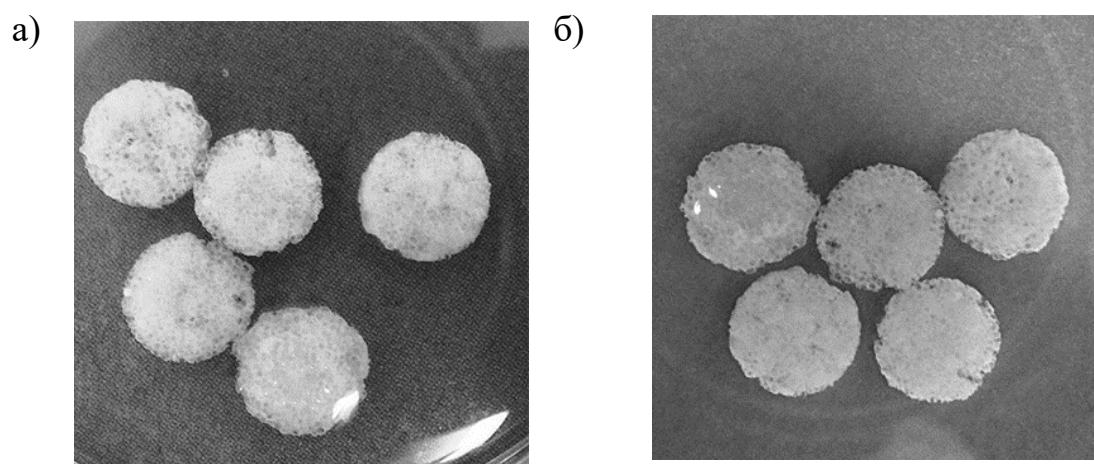


Рисунок 11 - Макрофотографии пористых матриц из рекомбинантного спидроина (а) и фиброина шелка *Bombyx mori* (б). Матрицы представляют собой пористые диски диаметром 10 мм и высотой 2 мм

Микро- и наноструктура матриц исследовалась с помощью сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии. Также полученные образцы матриц исследовались в опытах *in vitro*, где оценивалась способность матриц к адгезии клетки и обеспечивать их пролиферацию. После этого матрицы имплантировались в костную ткань крыс для изучения их способности влиять на регенерацию костной ткани *in vivo*.

#### 3.2.1 Результаты исследования микро- и наноструктуры матриц с помощью сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии

По данным электронной микроскопии матриксы из фиброина шёлка и рекомбинантного спидроина имели видимые отличия в форме пор и их толщине. Стенки пор в матриксах из фиброина имели более однородную структуру с чешуйчатой шероховатой поверхностью, в то время как матриксы из спидроина обладали более рыхлой конструкцией с перфорированной поверхностью (рисунок 12). Размеры макропор задавались частицами хлорида натрия в процессе изготовления матриксов и составили 200-400 мкм. Пористость достигала 85%.

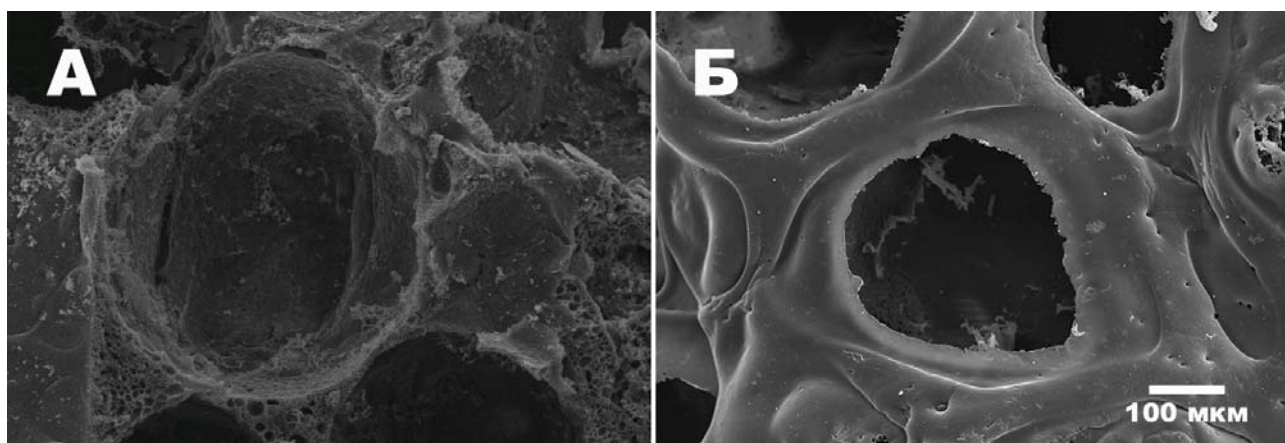


Рисунок 12 - Сканирующая электронная микроскопия пористых матриксов из рекомбинантного спидроина (А) и фиброина шелка (Б)

На рисунке 13А приведено СЗМ изображение ( $5 \times 5$  мкм) поверхности образца, представленного в виде залитого в эпоксидную смолу матрикса на основе фиброина шелка, после среза ультрамикротомом. Анализ полученных двумерных изображений поверхностей срезов стенок макропор, полученных с использованием сканирующего зондового микроскопа показал, что размеры нанопор в стенках макропор составляют от 30 до 200 нм, со средним диаметром в 50 нм. Плотность (количество на единицу площади) нанопор и степень объемной нанопористости в трехмерных структурах из фиброина шелка составляют  $2.4 \pm 0.2 \mu\text{м}^{-2}$  и  $0.5 \pm 0.04\%$  соответственно. Степень объемной нанопористости определялась при помощи программного пакета Image Analysis Nova 1.0.26.1443

(ЗАО «НТМДТ», Москва) как среднее отношение суммарной площади нанопор на СЗМ-изображениях к общей площади среза участка матрикса.

Для получения трехмерной реконструкции структуры матрикса в объеме была осуществлена серия из 12 СЗМ-изображений топографии поверхности стенки макропоры после выполнения последовательных срезов ультрамикротомом толщиной в 150 нм. Изображение было получено путем совмещения всех полученных СЗМ-изображений серии и визуализации в заданном объеме, учитывая физические размеры вокселей, задаваемых толщиной срезов и разрешением исходных СЗМ-изображений. Конечная трехмерная структура была представлена и проанализирована с помощью программного пакета 3D Constructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc, США). Визуализация полученной трехмерной реконструкции приведена на рисунке 13Б. Статистический анализ трехмерных данных показал, что отдельные нанопоры практически не взаимосвязаны друг с другом.

Аналогичным образом были исследованы и матриксы из рекомбинантного спидроина rS1/9. Анализ двухмерных изображений поверхностей срезов стенок макропор в rS1/9 матриксах показал, что размеры нанопор в стенках макропор составляют от 30 до 180 нм, со средним диаметром 50 нм, что имеет сходство с размерами нанопор в фиброиновых матриксах. Однако плотность нанопор и степень пористости в трехмерных структурах из рекомбинантного спидроина rS1/9 гораздо выше и составляет  $46 \pm 5.0 \mu\text{m}^2$  и  $24 \pm 2.6 \%$  соответственно. На рисунке 14А приведено СЗМ изображение ( $5 \times 5 \mu\text{m}$ ) поверхности блока залитого в эпоксидную смолу матрикса на основе рекомбинантного спидроина после среза ультрамикротомом.

Одним из наиболее важных параметров матрикса является взаимосвязанность нанопор. Согласно теории перколяции, если значение объемной пористости выше стандартного объема порога перколяции для трехмерных систем, составляющий 16%, то существенная часть пор соединяется в перколяционные кластеры, которые могут быть больше размеров единичных пор. Таким образом, исходя из того, что для rS1/9 матриксов средняя степень

объемной нанопористости составляет 24%, можно сделать вывод о высоком уровне взаимосвязанности пор в них, в отличие от пор в матриксах из фиброина шелка. Двухмерные СЗМ-изображения показывают, что заметная часть нанопор связана друг с другом наноканалами. Тем не менее, учитывая, что вышеуказанный порог перколяции для трехмерных систем намного меньше, чем для двухмерных (44%), только трехмерный анализ нанопористой структуры может дать адекватную оценку степени взаимосвязанности и перколяции нанопор.

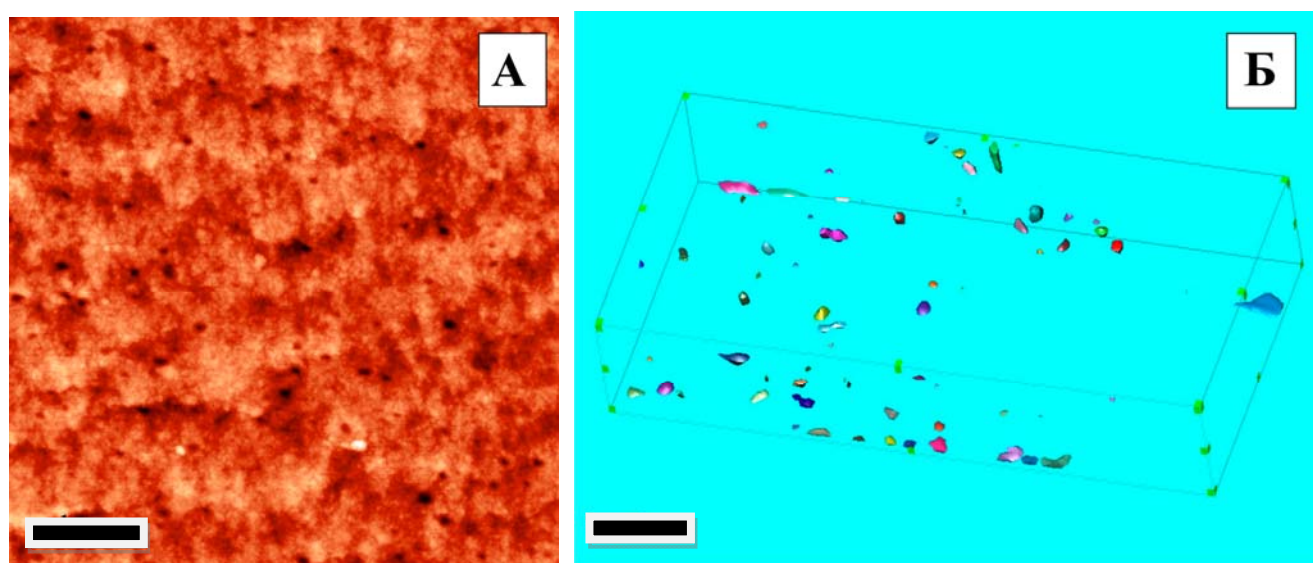


Рисунок 13 - Анализ наноструктуры матрикса из фиброина шелка. А) СЗМ-изображение топографии поверхности блока матрикса на основе фиброина шелка, размер скана  $5 \times 5$  мкм, размерный отрезок 1 мкм, диапазон вариации высоты 30 нм; Б) трехмерная реконструкция отдельных нанопор в стенке макропоры матрикса на основе фиброина шелка ( $6.36 \times 3.18 \times 1.0$  мкм), размерный отрезок 1 мкм.

Для реконструкции и анализа трехмерной структуры нанопор в объеме матрикса была осуществлена серия из 13 СЗМ-изображений топографии поверхности срезов стенки макропоры с областью сканирования  $15.0 \times 15.0$  мкм и разрешением  $1024 \times 1024$  пикселя после выполнения последовательных срезов ультрамикротомом толщиной в 70 нм. Конечная трехмерная структура была



проанализирована с помощью программного пакета 3D Constructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics Inc., США).

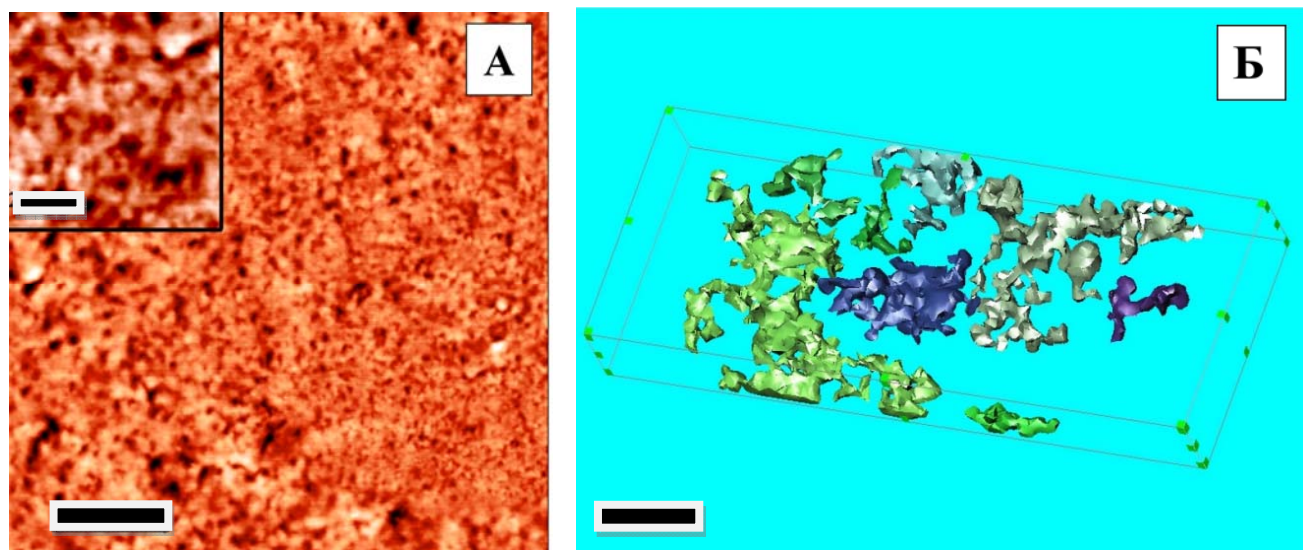


Рисунок 14 - Анализ наноструктуры матриксов из рекомбинантного спидроина. А) СЗМ-изображение топографии поверхности блока матрикса на основе рекомбинантного спидроина, размер скана  $5 \times 5$  мкм, диапазон вариации высоты 30 нм, размерный отрезок 1 мкм, размерный отрезок во вставке 200 нм; Б) трехмерная реконструкция кластеров взаимосвязанных нанопор в стенке макропоры матрикса на основе рекомбинантного спидроина rS1/9 ( $7.54 \times 3.28 \times 1.0$  мкм), размерный отрезок 1 мкм.

Статистический анализ трехмерной реконструкции пор показал, что общий объем пористости rS1/9 матриксов равен  $23.8 \pm 1.4\%$  и это соответствует значению, полученному в результате анализа отдельных двухмерных изображений. Обработка полученных данных позволила визуализировать и охарактеризовать кластеры сообщающихся нанопор и определить их параметры путем построения соответствующих изоповерхностей в трехмерном объеме. Оказалось, что значительная часть пор взаимосвязаны друг с другом и соединяются в перколяционные кластеры размерами от 1.5 до 6 мкм. На рисунке 14Б представлено изображение нескольких соседних кластеров нанопор в объеме

стенки макропоры. Объемная доля сообщающихся пор в перколяционных кластерах в матриксах из рекомбинантного спидроина rS1/9 равна  $35.3 \pm 4.8\%$  от всего объема пор, что составляет  $8.4 \pm 1.1\%$  от общего объема матрикса.

### 3.2.2 Изучение адгезии и пролиферации фибробластов 3T3 на каркасных матриксах из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка в экспериментах *in vitro*

При сравнении скорости адгезии и пролиферации фибробластов 3T3 на обоих видах матриксов методом конфокальной микроскопии в опытах *in vitro* было выявлено, что полная адгезия фибробластов наблюдалась через 2-3 часа инкубации, а их морфология соответствовала данному типу клеток. На завершающем этапе культивирования в течение нескольких дней (с 3 по 14 день) на стенках макропор матриксов формировался монослой клеток, при этом происходило врастание некоторых клеток в стенки пор. Несмотря на разницу в структуре матриксов, изученную с помощью сканирующей электронной микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии, скорость адгезии и пролиферации клеток была примерно одинакова для обоих видов трехмерных конструкций (таблица 2).

Возможно, что для адгезии и пролиферации мышинных фибробластов обнаруженная нами разница в нанопористости матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка не имеет существенного значения. При этом оба полимера в достаточно высокой степени обеспечивают адгезию фибробластов на поверхности изделий.

Таблица 2 - Адгезия (1-й день) и пролиферация (3-14 дни) фибробластов 3Т3 на матриксах из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений.

Время культивирования, дни	Матрикс из фиброина, количество клеток в 1 мм <sup>3</sup>	Матрикс из рекомбинантного спидроина, количество клеток в 1 мм <sup>3</sup>
1	18 ± 2	19 ± 2
3	48 ± 3	53 ± 5
14	4105 ± 320	3800 ± 304

Различия в адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на матриксах недостоверны ( $p > 0.05$ )

### 3.2.3 Результаты имплантации каркасных матриксов в костную ткань крыс в экспериментах *in vivo* с моделированием повреждения бедренной кости

Эксперименты *in vivo* проводили совместно с Сибирским федеральным научным клиническим центром Федерального медико-биологического агентства (г. Томск).

В ходе проведения эксперимента было прооперировано 60 крыс породы “Wistar”, все животные были разделены на группы исследования, что представлено в таблице 1 (глава 2 «Материалы и методы»).

Результаты имплантации матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка в дефект бедренной кости оценивали по изменению общего состояния организма с помощью биохимических исследований крови и по рентгенографическим признакам регенерации костной ткани в зоне имплантации в сроки 1, 2, 4, и 8 недель после операции.

Методика моделирования дефекта кости, извлечения бедренных костей, методика проведения биохимических исследований, рентгенографии, а также методика проведения статистического анализа описаны в главе 2 «Материалы и методы».

Внешний вид бедренных костей через 8 недель после имплантации матриксов в зону повреждения у животных разных групп показан на рисунке 15.



Рисунок 15 - Внешний вид бедренных костей через 8 недель после операции. Прямой линией указаны зоны повреждения и места имплантации матриксов.

В послеоперационном периоде и у экспериментальных животных, и в группе контроля, в течение первых двух суток отмечалась выраженная гиподинамическая реакция, отек прооперированной зоны. Затем, в период до 1 недели, указанные явления уменьшались, отмечалось сохранение умеренного отека мягких тканей бедра. Через 4 недели в послеоперационном периоде наступало полное клиническое восстановление.

При анализе динамики показателей лейкоцитарной формулы периферической крови у крыс были выявлены изменения, приведенные в таблице 3.

Увеличение уровня лейкоцитов, особенно смещение лейкоцитарной формулы в сторону увеличения содержания сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов после операции свидетельствует о возникновении воспалительного процесса, который постепенно уменьшается в течение 2 недель. Через 2 недели после введения материала содержание нейтрофилов не отличалось от

физиологической нормы. Изменения в лейкоцитарной формуле, свидетельствующие о наличии аллергической реакции в течение раннего послеоперационного периода (эозинофилия), были более выражены в группе с имплантированными фиброиновыми матриксами, по сравнению с группой, в которой были использованы спидроиновые матриксы, и группой контроля. Такая реакция постепенно затухала в динамике наблюдения и полностью исчезала через 2 недели после операции.

Таблица 3 - Среднестатистические значения гематологических показателей крови у крыс до и после операции через 1, 2, 4, 8 недель,  $X \pm SD$

Сроки Показа тели	До опер ации	спидроин				фиброин				контроль			
		1 нед еля	2 неде ли	4 неде ли	8 неде ль	1 неде ля	2 неде ли	4 неде ли	8 неде ль	1 неде ля	2 неде ли	4 неде ли	8 неде ль
Лейкоц иты $10^9/л$	$4,4 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,9$	$5,3 \pm 0,8$	$4,9 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,7$	$6,6 \pm 1,0$	$5,9 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,4$
Лимфо циты $10^9/л$	$6,43 \pm 0,4$	$3,95 \pm 0,7$	$4,56 \pm 0,9$	$5,85 \pm 0,6$	$6,35 \pm 0,7$	$3,15 \pm 0,7$	$3,56 \pm 0,9$	$4,95 \pm 0,6$	$6,15 \pm 0,7$	$4,56 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,7$	$5,36 \pm 0,5$	$6,58 \pm 0,4$
с/я нейтро филы $10^9/л$	$2,8 \pm 0,3$	$5,08 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,14$	$1,95 \pm 0,15$	$5,64 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$	$2,15 \pm 0,1$	$4,53 \pm 0,21$	$4,31 \pm 0,19$	$3,56 \pm 0,12$	$2,4 \pm 0,3$
Эозино филы $10^9/л$	$0,2 \pm 0,01$	$2,66 \pm 0,07$	$1,59 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,13$	$0,1 \pm 0,08$	$3,16 \pm 0,07$	$2,59 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,03$	$1,2 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,12$	$0,46 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,06$
Моноц иты $10^9/л$	$0,15 \pm 0,02$	$4,05 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,02$	0	$4,25 \pm 0,02$	$2,16 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,02$	0	$0,15 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,02$	0	0

Обнаружены достоверные различия в содержании эозинофилов между опытными группами и контролем, между группой с фиброиновыми матриксами и группой со спидроиновыми матриксами (все на 1 и 2 неделях),  $p < 0,05$

Восстановительный послеоперационный период у животных протекал удовлетворительно, отмечалось достаточно быстрое снижение всех

послеоперационных явлений, отсутствие локальных и системных осложнений, что подтверждается исследованием уровней биохимических показателей в сыворотке крови животных. Данные биохимического исследования представлены в таблице 3. Уровни содержания общего белка, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), а также креатинина на протяжении всего срока наблюдения оставались в пределах физиологической нормы во все сроки наблюдения и это дает нам основание утверждать о нормальном функциональном состоянии печени и почек животных и об отсутствии токсического эффекта матриксов.

Динамическое наблюдение за изменением содержания в сыворотке крови щелочной фосфатазы показало незначительный рост к 14 дню этого показателя при имплантации как спидроиновых, так и фиброиновых матриксов. Так как явления воспаления ко 2 неделе наблюдения затухают полностью, что доказано при анализе гематологических показателей, то можно утверждать, что повышенный уровень щелочной фосфатазы по сравнению с контролем, вероятно, отражает активацию остеобластов и, следовательно, активацию процессов регенерации костной ткани.

Данные рентгеновского исследования демонстрируют более активные процессы репаративной регенерации костной ткани в случае применения спидроиновых матриксов, по сравнению с фиброиновыми и группой контроля. В ходе эксперимента были исследованы оперированные кости в каждой группе из 5 животных в заданные сроки после операции. При денситометрическом анализе мультипланарных томограмм получены абсолютные значения плотности в области дефекта. Результаты исследования представлены на рисунке 16 и в таблице 4.

Об образовании костной мозоли можно судить по увеличению плотности искусственно сформированного отверстия в кости, что связано с процессом кальцификации и регенерацией костной ткани. Данные процессы были более выражены у животных опытных групп, особенно в группе с применением спидроина. Начиная со второй недели, более высокий индекс регенерации

костной ткани у крыс наблюдался при заполнении дефекта исследуемыми материалами по сравнению с группой контроля. Преимущество спидроина по сравнению с фиброином и контролем выявлялось во все сроки наблюдения после операции (рисунок 17).

Таблица 3 - Среднестатистические значения биохимических показателей крови у крыс до и после операции через 1, 2, 4, 8 недель,  $X \pm SD$

Сроки / Показатели	До операции	спидроин				фиброин				контроль			
		1 нед	2 нед	4 нед	8 нед	1 нед	2 нед	4 нед	8 нед	1 нед	2 нед	4 нед	8 нед
Общий белок, г/л	86,7 ±1,8	81,3 ±1,6	84,1 ±1,5	84,9 ±1,6	87,5 ±1,5	79,9 ±1,8	82,3 ±1,9	84,9 ±1,5	86,6 ±1,8	82,3 ±1,5	85,4 ±1,6	84,7 ±1,8	86,3 ±1,7
Щелочная фосфатаза, Ед/л	70,0 ±1,2	94,9 ±1,5	90,0 ±1,3	84,8 ±1,4	75,3 ±1,3	91,5 ±1,7	89,6 ±1,5	84,9 ±1,6	71,5 ±1,3	74,6 ±1,4	74,3 ±1,6	73,7 ±1,5	71,8 ±1,4
Билирубин общий, мкмоль/л	3,6 ±0,4	3,3 ±0,1	3,2 ±0,2	3,4 ±0,14	3,7 ±0,15	3,4 ±0,3	3,1 ±0,2	3,6 ±0,2	3,5 ±0,16	3,5 ±0,2	3,3 ±0,15	3,5 ±0,2	3,4 ±0,3
Креатинин, мкмоль/л	105,3 ±6,5	103,7 ±7,2	101,9 ±8,1	102,7 ±7,3	105,8 ±6,0	101,6 ±7,7	104,7 ±7,5	107,1 ±7,1	106,5 ±6,9	103,4 ±8,3	104,7 ±7,5	105,7 ±7,0	107,3 ±7,3
АЛТ, нмоль/л	72,7 ±5,5	73,4 ±6,8	75,1 ±5,9	73,8 ±6,2	72,4 ±5,6	75,6 ±5,8	74,4 ±6,1	74,9 ±5,6	73,3 ±5,2	74,2 ±5,1	75,3 ±6,3	76,1 ±5,8	74,2 ±5,5
АСТ, нмоль/л	101,0 ±8,4	99,6 ±8,5	96,8 ±7,9	98,9 ±8,0	102,8 ±8,5	97,6 ±7,5	99,8 ±7,9	103,1 ±8,5	104,5 ±8,5	97,4 ±7,6	99,4 ±8,1	105,9 ±9,2	102,4 ±8,7

Обнаружены достоверные различия в концентрации щелочной фосфатазы между опытными группами и контролем на 1, 2 и 4 неделях,  $p < 0.05$

Введение матриксов из фиброина шелка и рекомбинантного спидроина создает условия для регенерации костной ткани в области оперативного вмешательства. При применении двух видов материалов обеспечивается интеграция костной ткани с имплантатом и последующее восстановление целостности кости.

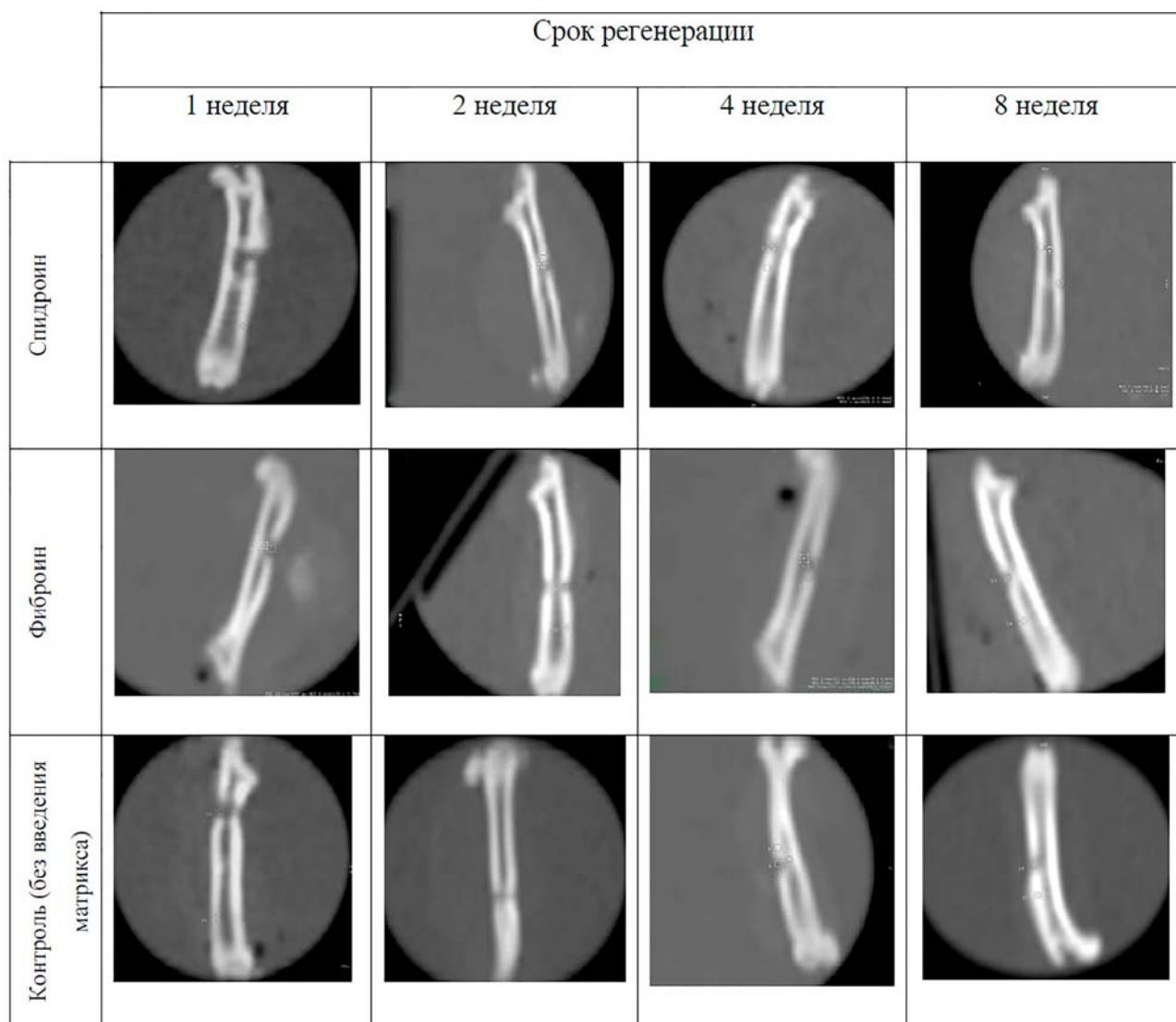


Рисунок 16 - Рентгенограммы костей после моделирования дефекта костной ткани и имплантации каркасного матрикса в зону повреждения прооперированных животных. Представлены рентгенограммы одной из 5 крыс каждой группы



При анализе динамики формирования костной ткани было выявлено, что использование спидроина для её замещения приводит к более быстрому восстановлению костной ткани в зоне дефекта по сравнению с фиброином шелка. Возможно, на такой результат регенерации могут влиять различия в аминокислотной последовательности и/или молекулярном весе биополимеров, а также особенности нано- и микроструктуры изготовленных матриц.

Таблица 4 - Данные рентгеновского исследования образцов бедренной кости с различными видами имплантированных матриц в разные сроки наблюдения,  $X \pm SD$ .

Материал матрикса	Сроки наблюдения	Плотность интермедиарной зоны регенерированной ткани в единицах Хаунсфилда	Плотность интактного кортикального слоя в единицах Хаунсфилда	Индекс регенерации
спидроин	1 неделя	290,7 ± 21,0	953,1 ± 12,7	30,5 ± 0,6
	2 недели	451,9 ± 9,2	1048,7 ± 19,4	43,1 ± 0,7
	4 недели	560 ± 12,2	1129,1 ± 21,8	49,6 ± 0,9
	8 недель	862,3 ± 10,3	1565,1 ± 22,5	55,1 ± 0,5
фиброин	1 неделя	268,1 ± 0,8	921,4 ± 15,6	29,1 ± 0,4
	2 недели	292,7 ± 10,2	863,4 ± 16,1	33,9 ± 0,6
	4 недели	423,8 ± 0,9	990,3 ± 19,1	42,8 ± 0,5
	8 недель	731,5 ± 10,0	1364 ± 20,2	47,5 ± 0,7
контроль	1 неделя	431,2 ± 13,2	1540 ± 12,1	28,0 ± 0,8
	2 недели	239,5 ± 10,3	753,0 ± 0,89	31,8 ± 0,7
	4 недели	387,7 ± 0,95	964,5 ± 12,6	40,2 ± 0,4
	8 недель	435,5 ± 11,5	983 ± 14,9	44,3 ± 0,6

Обнаружены достоверные различия между группой с имплантированными спидроиновыми матриксами и группой с фиброиновыми матриксами через 2, 4 и 8 недель после операции, а также между опытными группами и контролем через 2, 4 и 8 недель после операции,  $p < 0,05$

Разница в нанопористости между фиброином шелка и rS1/9 может быть связана с их различной молекулярной организацией. Белки имеют различную аминокислотную последовательность (поли-А блоки и чередование гидрофобных и гидрофильных участков в rS1/9 и (GAGAGS)<sub>n</sub> - в фиброине), а также разную

молекулярную массу (94.3 кДа у rS1/9 и 350 кДа у тяжелой цепи фиброина, 26 кДа у легкой цепи фиброина). Такие различия могут быть причиной формирования разных пор в процессе изготовления матриксов и/или во время обработки этанолом. Разница в степени нанопористости также может быть связана с частичным гидролизом фиброина в процессе растворения его в муравьиной кислоте с LiCl и влиянием продуктов гидролиза на формирование матрикса.

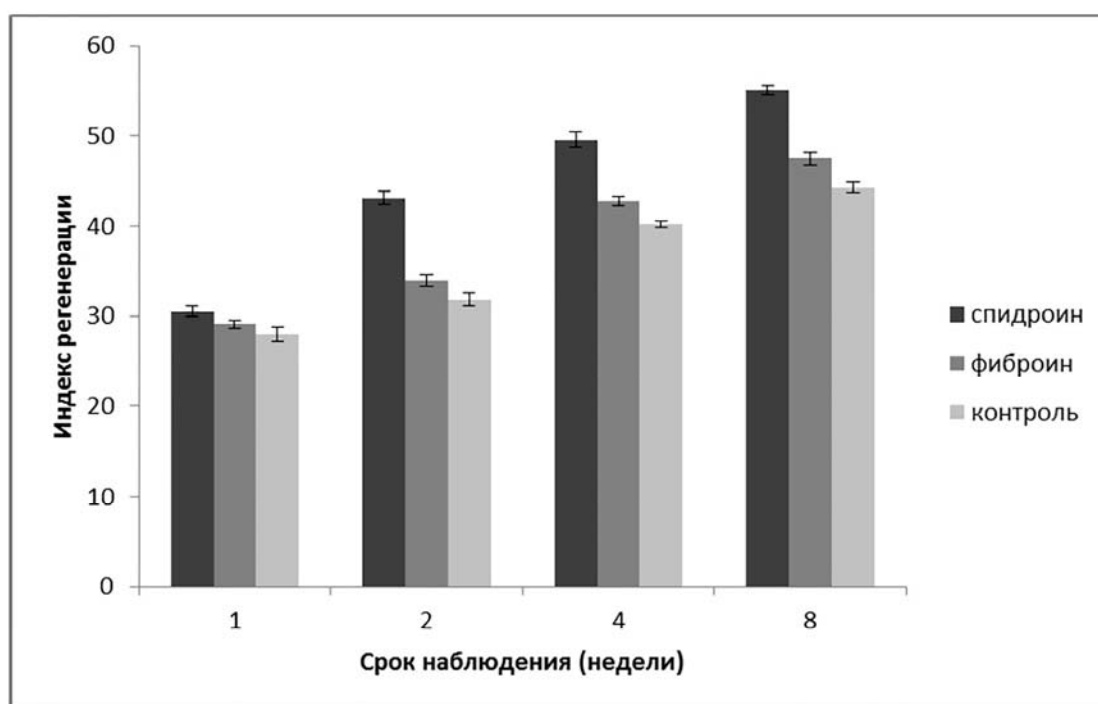


Рисунок 17 - Изменения индекса Хаунсфилда в динамике наблюдения при применении различных материалов для заполнения дефектов костной ткани. Обнаружены достоверные различия между группой с имплантированными спидроиновыми матриксами и группой с фиброиновыми матриксами через 2, 4 и 8 недель после операции, а также между опытными группами и контролем через 2, 4 и 8 недель после операции,  $p < 0,05$

Некоторые исследования показывают, что муравьиная кислота может оказывать существенное влияние на молекулярную массу фиброина шелка [299], в то время как белок рекомбинантного спидроина rS1/9 остается стабильным в кислотной среде [300]. Однако, эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Таким образом, предполагается, что именно внутренняя нанопористая структура матрикса из рекомбинантного спидроина объясняет его способность формировать более благоприятную микросреду для регенерации ткани в организме. Влияние нанопористости биоинженерных конструкций на их характеристики и поведение при использовании в области регенеративной медицины, а также фармации, было показано и в других работах. Например, ранее было подтверждено, что нанопористость матриксов из биологически активного стекла повышает их биологическую совместимость благодаря большей площади поверхности, обеспечивая более высокую концентрацию биологически активных химических веществ, повышая прикрепление преостеобластов (полустволовых остеогенных клеток) *in vitro*, а также улучшая колонизацию и проникновение клеток вглубь матрикса при подкожной имплантации у кроликов *in vivo* [301]. Исследования *in vitro* с изготовлением и применением матриксов из поли(ε-капролактона) (ПКЛ), а также из ПКЛ с добавлением поливинилпирролидона также показали, что нано- и микроструктурные морфологические особенности трехмерных матриксов, а именно нанопористость и плотность волокон, играют ключевую роль в регулировании поведения клеток, позволяя сделать вывод о том, что высокопористые матриксы с оптимизированным составом и плотностью волокон могут более успешно применяться в тканевой инженерии [302]. Эксперименты с использованием нанопористых титановых поверхностей, полученных путем окислительного нанопаттеринга, также подтвердили, что нанопористость материала положительно влияет на адгезию клеток на их поверхность, а в дальнейшем стимулирует и направляет клеточную пролиферацию. Кроме того, нанопористость увеличивает объем для загрузки биологически активных соединений и модулирует их высвобождение в течение долгого времени в организме [303].

### 3.3 Разработка тканеспецифического мелкодисперсного альгинатного матрикса и исследование его микро- и наноструктуры с помощью сканирующей зондовой крионанотомографии

В настоящее время наряду с полномасштабными трехмерными матриксами в регенеративной медицине используют клеточные микроносители из различных материалов [304]. Микроносители из биосовместимых и биodeградируемых полимеров являются важными биоматериалами для тканевой инженерии и доставки лекарств. Инжектируемые системы имеют существенные преимущества перед трехмерными макроносителями, такие как простота в применении, минимальная инвазивность [305].

Альгинат является одним из наиболее часто используемых полимеров, применяемых для изготовления микроносителей для тканевой инженерии [306] [307].

В качестве объекта исследований методом криоСЗНТ в настоящем разделе работы были выбраны альгинатные микросферы, стабилизированные двухвалентными катионами, по причине их гелеобразной структуры, которая характерна для живых систем, а также по причине широкой распространенности альгината в изделиях медицинского назначения.

В связи с тем, что одним из недостатков альгината является низкая адгезия клеток на полученном изделии и нестабильность образцов [307], было сделано предположение, что использование микрочастиц межклеточного децеллюляризованного матрикса печени улучшит свойства альгинатных микрочастиц, так как они могут создать естественное микроокружение на поверхности сфер, благоприятное для клеток, аналогичное микроокружению в нативной ткани.

Были получены микроносители сферической или близкой к сферической формы с примерным диаметром 200 мкм (рисунок 18). Такой размер обеспечивает возможность использования микроносителей в инъекционной форме.

Технология децеллюляризации позволила получить межклеточный матрикс, не содержащий клеточных элементов, но при этом содержащий ряд гликопротеинов, протеогликанов, факторов роста и других соединений, необходимых для адгезии, пролиферации и миграции клеток [308].

Микрочастицы межклеточного матрикса получали путем дробления децеллюляризированной печени крысы породы Wistar в жидком азоте, микрочастицы имели размер, не превышающий 5 мкм (рисунок 19).

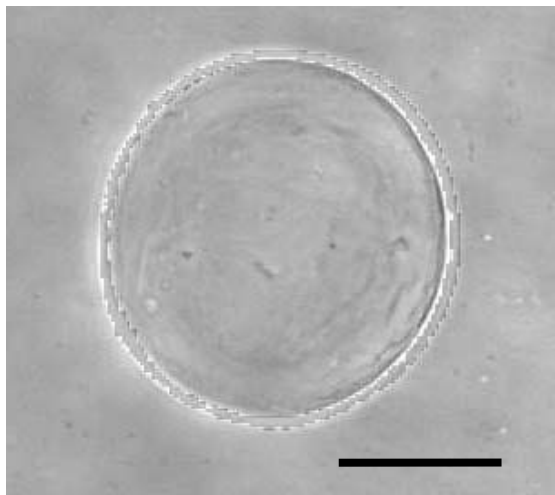


Рисунок 18 - Микроноситель на основе альгината. Световая микроскопия, увеличение x100. Размер метки – 50 мкм.

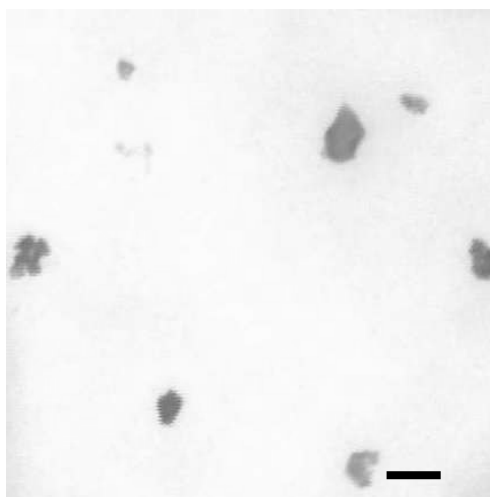


Рисунок 19 - Микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризированной печени крысы породы Wistar. Световая микроскопия, увеличение x100. Размер метки – 5 мкм

Модификацию поверхности альгинатных микроносителей проводили путем ковалентной пришивки микрочастиц децеллюляризованного матрикса печени. Предварительно альгинатные микроносители и микрочастицы децеллюляризованного матрикса печени переводили в фосфатно-солевой буфер следующего состава: 50 мМ однозамещенного фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия, рН=6,15 – путем центрифугирования в течение 5 минут при 900 g. Суспензию альгинатных микроносителей готовили из расчета 300 мкл густого осадк альгинатных микроносителей на 1 мл суспензии.

В качестве модифицирующих агентов использовали N-гидроксисукцинимид (NHS) и гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (EDC), так как эти вещества делают возможным образование ковалентной связи между карбоксильными группами, которые в большом количестве присутствуют в структуре альгината, и аминогруппами в составе компонентов межклеточного матрикса. EDC и NHS добавляли к суспензии альгинатных микроносителей до конечной концентрации 3 мМ и 10 мМ соответственно. Суспензию инкубировали с EDC при перемешивании в течение 1 часа при комнатной температуре, затем добавляли NHS и инкубировали в течение 1 часа в аналогичных условиях.

Отмывку от модифицирующих агентов проводили путем центрифугирования в течение 5 минут при 900 g. Осадок альгинатных микроносителей ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с рН 6,15 и добавляли суспензию микрочастиц децеллюляризованного матрикса печени до конечной концентрации 12 мг/мл. Полученную смесь инкубировали при перемешивании в течение 12-ти часов при комнатной температуре. Далее микроносители инкубировали в 100 мМ растворе глицина в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 5 минут при 900 g. Осадок модифицированных альгинатных микроносителей ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с рН=7,4 с добавлением 100 мМ хлорида кальция и 30% этанола.

Изображения микроносителей, полученных в результате модификации, представлены на рисунке 20. Для визуализации микрочастиц межклеточного

матрикса был использован краситель Кумасси бриллиантовый синий R-250, который связывается с белковыми компонентами в составе матрикса и не связывается с альгинатом. Модифицированный мелкодисперсный матрикс представлял собой суспензию микрочастиц сферической (или близкой к сферической) формы диаметром от 200 до 300 мкм. На поверхности модифицированных альгинатных микроносителей идентифицировались оптически плотные гранулы размером 1-5 мкм, окрашенные в темно-синий цвет, соответствующие микрочастицам децеллюляризованного внеклеточного матрикса печени. У немодифицированных образцов окраска отсутствовала.

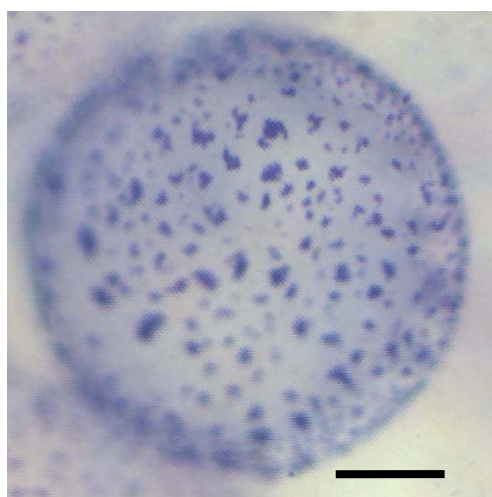


Рисунок 20 - Альгинатные микроносители, поверхность которых модифицирована микрочастицами межклеточного матрикса печени крысы породы Wistar. Световая микроскопия. Окрашивание – Кумасси бриллиантовый синий R-250, увеличение x100. Размер метки – 50 мкм

Крио-СЗМ-исследования образцов микроносителей, подготовленных по разработанной методике, были выполнены с применением экспериментального комплекса для нанотомографии, описанного в разделе 3.1.

Так как альгинатные микроносители имеют гидрогелевую структуру и находятся в суспензии, то ультрамикротомирование и исследование данных объектов при помощи СЗМ возможно только в замороженном состоянии при

низких температурах. Разработка методик исследования нативных структур подобных гидрогелевых биоматериалов при помощи сканирующей зондовой крионанотомографии является одной из основных задач данной работы. При этом одним из важнейших аспектов разработки методики пробоподготовки и предварительной характеристики альгинатных микроносителей являлся выбор способа криопротекции. При обычной заморозке, выполняемой, например, при помощи погружения образцов альгинатных микроносителей в жидкий азот, происходит кристаллизация воды, содержащейся в альгинатном гидрогеле и в суспензии. Образование кристаллов льда приводит к необратимому разрушению структуры микроносителей. Соответственно для выполнения эффективных исследований микроносителей необходим способ заморозки, при котором подобные кристаллы не будут образовываться (витрификация). В литературе описаны способы применения различных криопротекторов, а также методы заморозки биологических объектов при высоком давлении для этой цели [309] [310].

Стоит отметить, что эксперименты по витрификации гидрогелевых микрочастиц размерами от 200 до 300 мкм не были описаны ранее. Метод заморозки при высоком давлении эффективен при работе с объектами размером до 100 мкм, и к тому же требует использования дорогостоящего оборудования.

Были выполнены эксперименты по заморозке и последующему криоультрамикротомированию образцов суспензии альгинатных гидрогелевых микроносителей с добавлением различных концентраций трех наиболее часто используемых криопротекторов – сахарозы, диметилсульфатоксида и глицерина при помощи криоультрамикротомы Leica EM UC6/FC6 (рисунок 21 и 22).





Рисунок 21 - Криоультрамикротом Leica EM UC6/FC6 (Leica Microsystems, Австрия) используемый для выполнения срезов образцов суспензии альгинатных гидрогелевых микроносителей при низких температурах

Эксперименты показали, что широко используемые в клеточной биологии криопротекторы ДМСО (5%, 10% и 20% р-р) и глицерин (5% и 10% раствор) не эффективны для решения поставленной задачи, так как образец при низких температурах (от минус 80 до минус 140 °С) остается достаточно вязким, что не позволяет выполнять качественные сверхтонкие срезы криоультрамикротомом. В результате выполненных экспериментов с использованием различных концентраций сахарозы были сделаны выводы, что оптимальной является концентрация сахарозы в суспензии 2.3 М. В этом случае инспекция ультратонких криосрезов и поверхности образцов срезов при помощи оптической микроскопии демонстрирует, что качество поверхности является наиболее предпочтительным

для низкотемпературных СЗМ-исследований наноструктуры микроносителей (рисунок 22). Поверхность после среза при анализе с помощью оптического микроскопа не содержит видимых неровностей при размерах области среза от 0.8 до 1,2 мм, при этом на поверхности среза идентифицируются отдельные микроносители.



Рисунок 22 - Выполнение срезов суспензии альгинатных гидрогелевых микроносителей алмазным ножом Diatome CryoAFM 35 при температуре минус 120 °С в криокамере ультрамикротом

Также, в результате выполненных экспериментов было установлено, что в качестве держателя для образцов гидрогелевых микроносителей оптимально использовать медную гексагональную сетку для просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 23). Для заморозки образец микроносителя наносится на гексагональную сетку при помощи пипетки, затем гексагональная сетка с

альгинатными гидрогелевыми микроносителями погружается в жидкий азот для быстрой заморозки. После этого замороженный образец может быть перенесен в охлажденную криокамеру экспериментального комплекса для выполнения исследований с помощью сканирующей зондовой нанотомографии.

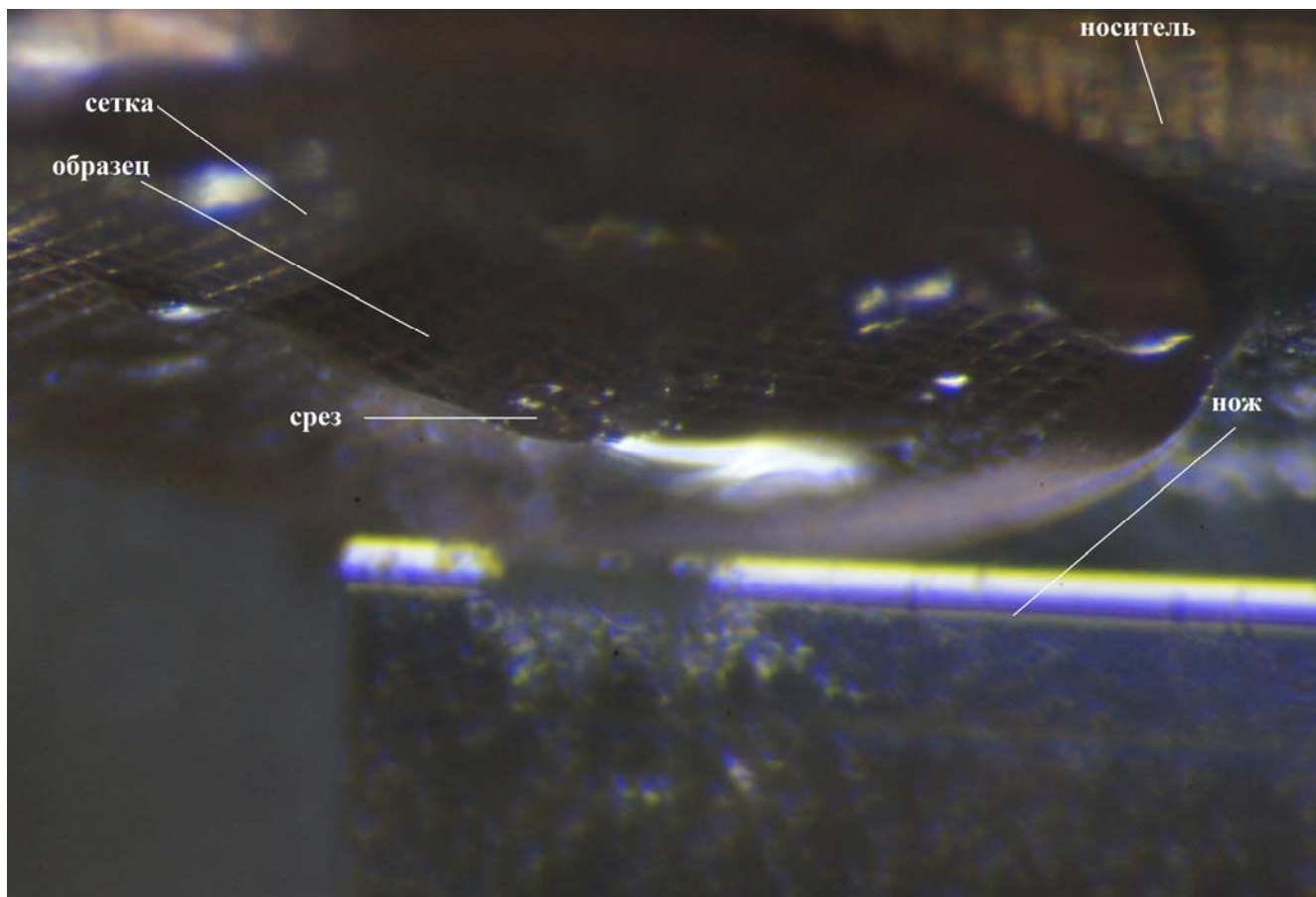


Рисунок 23 - Выполнение срезов суспензии альгинатных гидрогелевых микроносителей алмазным ножом Diatome CryoAFM 35 при температуре минус 120 °С. Вид на поверхность среза получен при помощи оптического микроскопа Leica MZ6, установленного на криоультрамикротоме. Увеличение x40

СЗМ-измерения поверхности замороженной суспензии микроносителей после сверхтонкого среза выполнялись при помощи зондов A-probe (Nanosensors, Германия). Данный зонд представляет собой кварцевый резонатор, комбинированный с микромеханическим кремниевым кантилевером, на котором расположена игла СЗМ-зонда. Эти зонды хорошо зарекомендовали себя при

работе в криогенных условиях, что отражено в ряде научных публикаций [311] [312]. Резонансная частота использованных зондов составляла от 41 до 44 кГц, измерения проводились в полуконтактном режиме. Скорость растрового сканирования составляла 0.75 Гц (количество линий в секунду).

На рисунке 24 приведено криоСЗМ изображение среза микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы породы Wistar на поверхности альгинатного микроносителя. СЗМ-изображение показывает, что микрочастица расплывается на поверхности микроносителя, ширина микрочастицы составляет порядка 5 мкм, в то время, как толщина – порядка 1 мкм. В объеме микроносителя наблюдается гранулярная микроструктура с размером наногранул 20-50 нм, в то время как наноструктура альгинатного микроносителя представляется более гомогенной. Предполагается, что в объеме микрочастиц наблюдается распределение белковых гранул матрикса. На рисунке 25 показано увеличенное СЗМ-изображение наноструктуры среза микрочастицы.

Последовательные криоСЗМ-измерения после проведения сверхтонких срезов образцов альгинатных микроносителей, модифицированных микрочастицами межклеточного матрикса децеллюляризованной печени, и без модификации, позволили реконструировать их трехмерные структуры. Для выполнения каждой трехмерной реконструкции была получена серия из 13 СЗМ-изображений топографии поверхности носителя после осуществления последовательных срезов криоультрамикротомом толщиной в 80 нм при температуре  $-120^{\circ}\text{C}$ . Размер каждого изображения (скана) составлял  $5.0 \times 5.0$  мкм с разрешением  $400 \times 400$  пикселей соответственно.

На рисунке 26 представлены трехмерные реконструкции участка альгинатного микроносителя (а) и участка микрочастицы (б) на поверхности микроносителя в объеме  $5.0 \times 5.0 \times 1.1$  мкм, полученные с помощью программного пакета 3D Constructor Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics, Inc.). Для получения данного изображения было выполнено совмещение всех полученных СЗМ-изображений серии и визуализация в заданном объеме с учетом физических размеров вокселей (объемных пикселей), задаваемых, соответственно, толщиной

срезов и разрешением исходных СЗМ-изображений. Данный метод позволяет реконструировать поверхности микроносителей и микрочастиц. Статистический анализ реконструированных поверхностей с помощью данного программного пакета позволяет определить и проанализировать наномасштабные трехмерные параметры этих поверхностей. Эти параметры могут оказывать значительное влияние на адгезию клеток на микроносители.

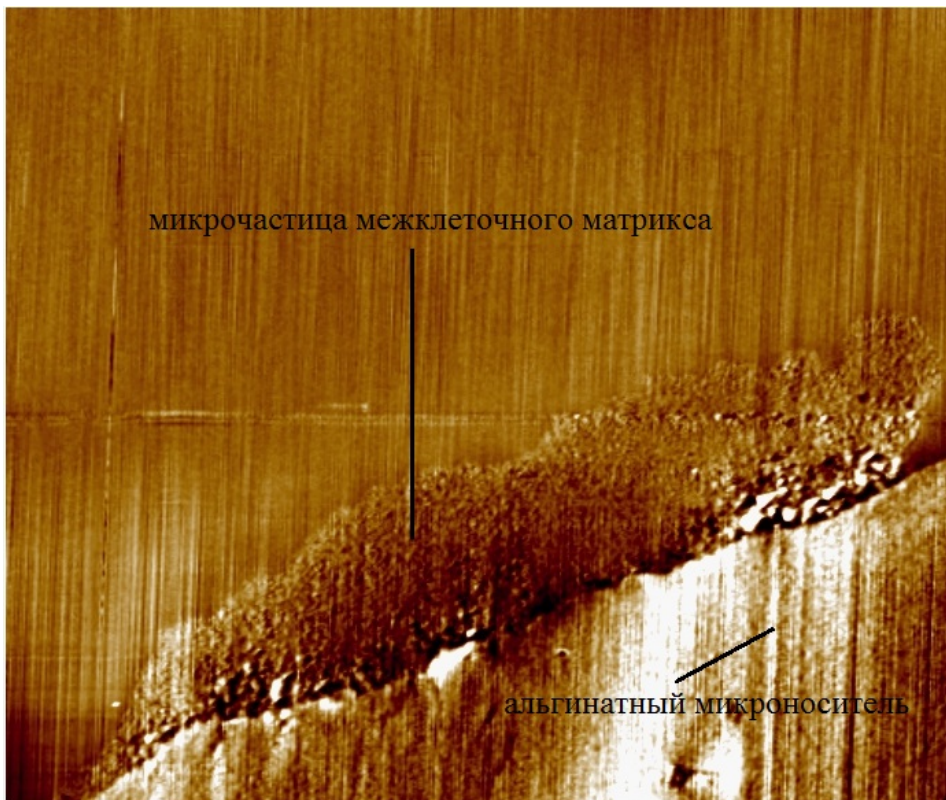


Рисунок 24 - КриосЗМ-изображение среза микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы породы Wistar на поверхности альгинатного микроносителя, размер скана 5.0x4.0 мкм, вариация высоты 35 нм

Таким образом, выполненные реконструкция и математический анализ показывают заметные различия в шероховатости поверхности альгинатных микроносителей и микрочастиц. Вычисленная средняя шероховатость  $R_a$  поверхности микроносителя составляет 82.3 нм, в то время как средняя шероховатость поверхности микрочастиц, прикрепленных к микроносителю, составляет 212.4 нм.

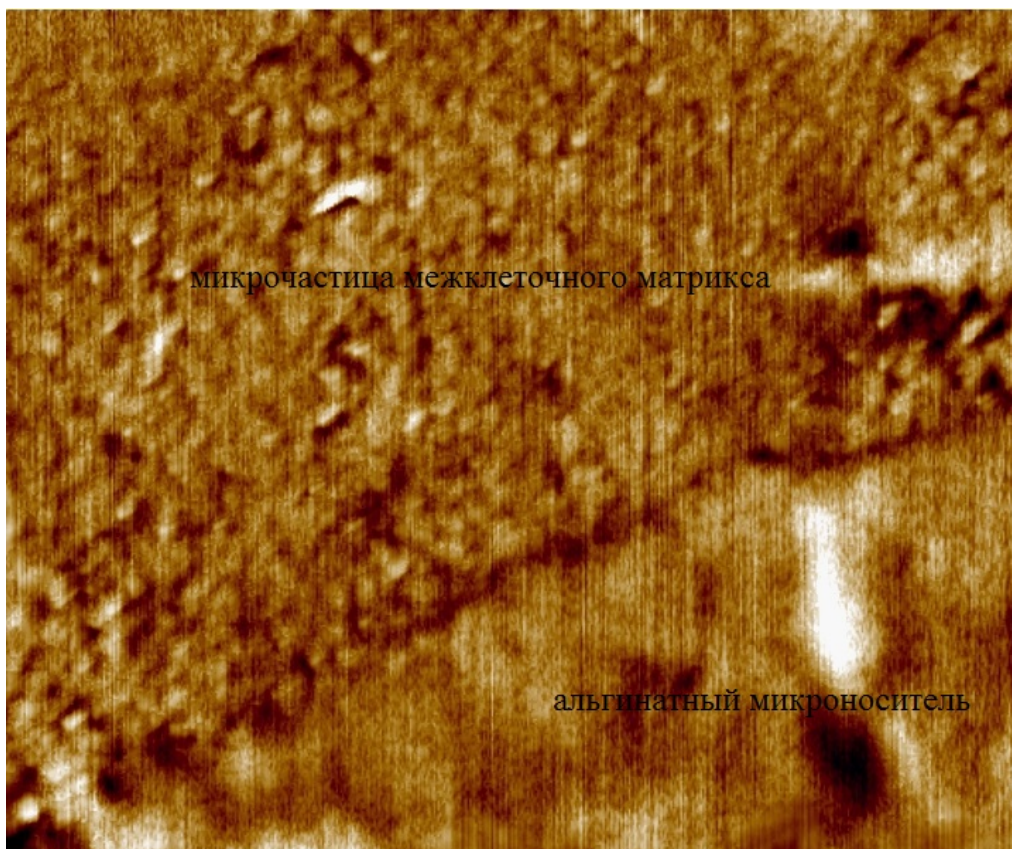


Рисунок 25 - КриосЭМ-изображение среза микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы породы Wistar на поверхности альгинатного микроносителя, размер скана 1.25x1.0 мкм, вариация высоты 20 нм

Помимо шероховатости, важным параметром, влияющим на биологические свойства поверхности, является эффективная площадь поверхности  $\sigma$ , вычисляемая, как отношение площади поверхности к площади ее двумерной проекции на плоскость. Этот параметр определяет степень развитости поверхности.

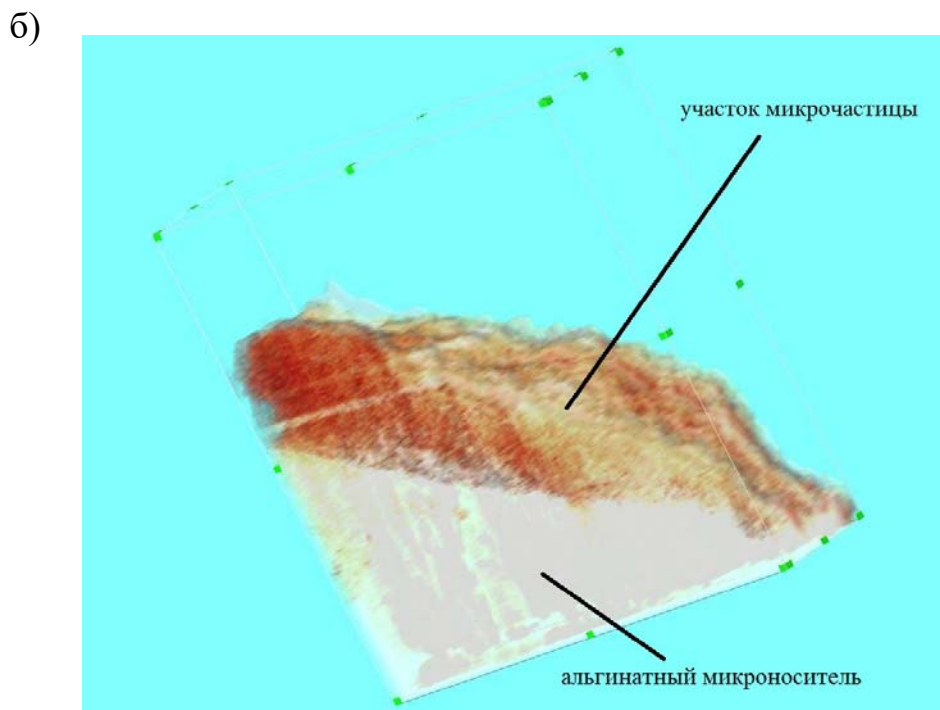
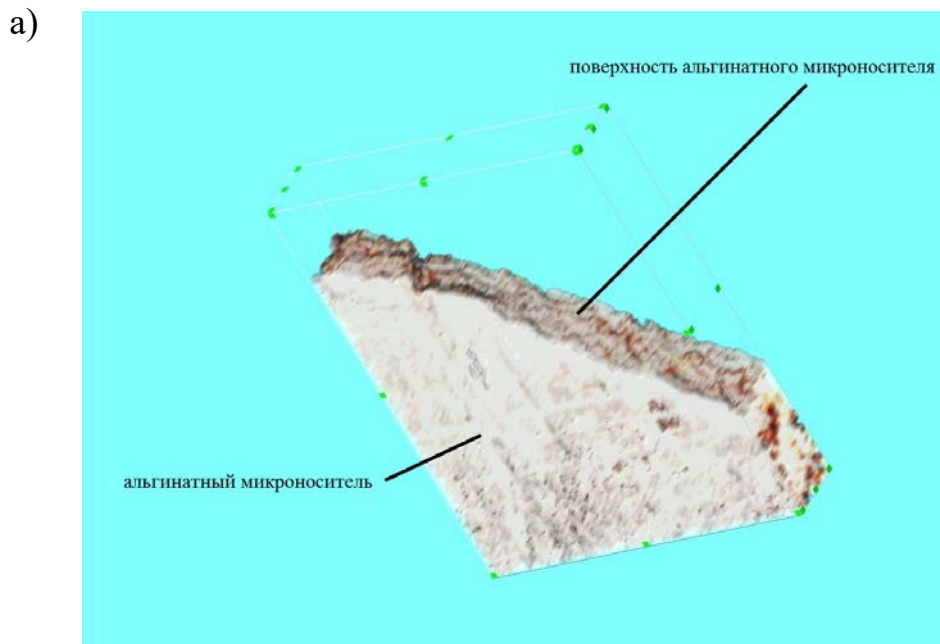


Рисунок 26 - Трехмерные реконструкции участка альгинатного микроносителя (а) и участка микрочастицы (б) на поверхности микроносителя в объеме  $5.0 \times 5.0 \times 1.1$  МКМ

Также для характеристики наномасштабных трехмерных поверхностей используют параметр длины автокорреляции  $L_1$ , интерпретируемый, как характерное расстояние, на котором формируется дисперсия измеряемых высот профиля трехмерного рельефа [313] [314]. Данный параметр может служить оценкой характерных латеральных размеров особенностей рельефа.

Для реконструированных методом нанотомографии трехмерных поверхностей альгинатных микроносителей и микрочастиц, прикрепленных к микроносителю, вычисленные значения эффективной площади  $\sigma$  составляют 1.103 и 1.205 соответственно, а вычисленные значения длины автокорреляции  $L_1$  составляют 115 нм и 246 нм соответственно (таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение шероховатости, удельной эффективной площади  $\sigma$  и длины автокорреляции  $L_1$  поверхности микроносителя и поверхности микрочастицы межклеточного матрикса децеллюляризованной печени. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений

Параметр	Поверхность микроносителя	Поверхность микрочастицы, прикрепленной к микроносителю
Шероховатость $R_a$ , нм	$82.3 \pm 7.4$	$212.4 \pm 28.2$
Удельная эффективная площадь $\sigma$	$1.103 \pm 0.01$	$1.205 \pm 0.025$
длины автокорреляции $L_1$ , нм	$115 \pm 22$	$246 \pm 38$

Обнаружены достоверные различия между значениями для поверхности микроносителя и поверхности микрочастицы, прикрепленной к микроносителю ( $p < 0.05$ )

Оценка адгезионных свойств полученных микроносителей была проведена на примере культуры клеток гепатокарциномы человека Hep G2. Изображения микроносителей с клетками культуры Hep G2 после суток культивирования



представлены на рисунке 27. Количественная оценка проводилась с помощью метода МТТ (рисунок 28).

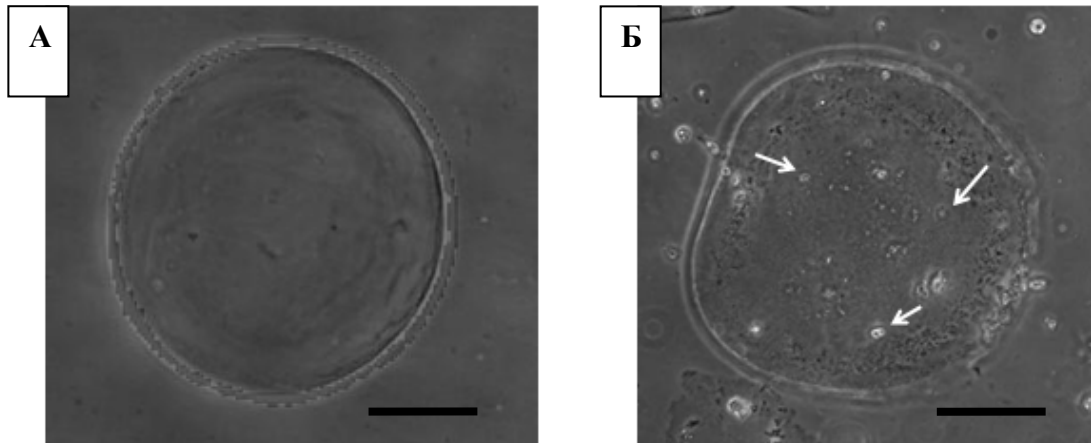


Рисунок 27 - Изображения альгинатных микроносителей (А) и альгинатных микроносителей, модифицированных микрочастицами межклеточного матрикса децеллюляризованной печени крысы породы Wistar (Б) после 1 суток культивирования с клетками культуры гепатокарциномы человека Hep G2. Белые стрелки указывают на клетки, адгезированные на поверхности носителя. Световая микроскопия, увеличение  $\times 100$ . Размер метки – 30 мкм

На поверхности модифицированных альгинатных микроносителей было зарегистрировано примерно в 7 раз больше клеток, чем на поверхности немодифицированных, что свидетельствует о том, что модификация полученных изделий микрочастицами межклеточного матрикса приводит к значительному улучшению их адгезионных свойств. Альгинатные микроносители с иммобилизованными микрочастицами межклеточного матрикса имеют повышенные адгезионные свойства по сравнению с немодифицированными микроносителями за счет присутствия на их поверхности различных последовательностей, определяющих адгезию клеток.

Таким образом, обнаруженная более высокая адгезия клеток на поверхность модифицированных альгинатных микроносителей может объясняться не только

особенностями молекулярного строения микрочастиц децеллюляризированного матрикса, но и повышенной шероховатостью поверхности носителей после модификации.

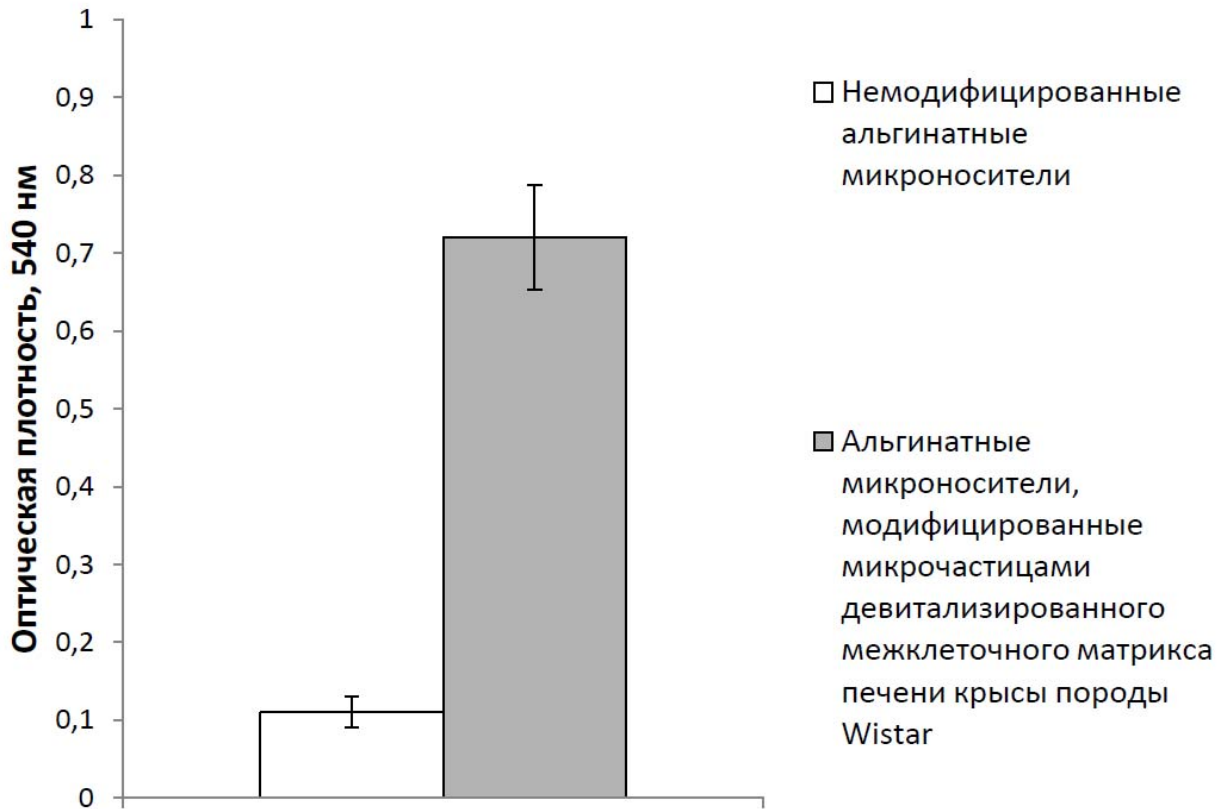


Рисунок 28 - Сравнительная оценка адгезии клеток гепатокарциномы человека Нер G2 на альгинатных микроносителях, модифицированных или немодифицированных микрочастицами межклеточного матрикса децеллюляризированной печени крысы породы Wistar. Представлены данные МТТ теста. Представлены значения стандартного отклонения для 5-ти независимых измерений.

Разработанная технология криоСЗНТ позволила выявить такие характеристики исследуемого объекта, как шероховатость поверхности, эффективная площадь поверхности  $\sigma$ , определяющая степень развитости поверхности, и параметр длины автокорреляции  $L_1$ , интерпретируемый, как характерное расстояние, на котором формируется дисперсия измеряемых высот

профиля трехмерного рельефа. На основе полученных данных, можно сделать вывод, что изделия из альгината, модифицированные микрочастицами из децеллюляризованного матрикса, способны мимикрировать среду для клеток, что позволяет улучшить их адгезию на альгинатных микрочастицах.

Для решения проблемы низкой адгезии клеток на поверхность альгинатных микроносителей, изделия из альгината могут быть изменены с помощью химических и физических реакций, чтобы получить производные, имеющих различные структуры, свойства, функции и приложения. Изменение структуры и свойств, таких как способность к биodeградации, механической прочности, и адгезии клеток, может быть достигнуто путем комбинации с другими биоматериалами, иммобилизации конкретных лигандов и физического или химического сшивания [315].

Как и в нашем исследовании, ранее, в работах других авторов, было показано, что микросферы, изготовленные из натуральных материалов, являются перспективными биоразлагаемыми и биосовместимыми клеточными носителями для регенерации тканей путем эффективной доставки клеток в пораженные участки организма без оперативного вмешательства, путем инъекций или в качестве лекарственных препаратов. Также, исследования подтверждают, что на адгезию и пролиферацию клеток существенно влияет характер поверхности таких микроносителей. Например, нановолоконные полые микросферы из полилактида были использованы в качестве инъецируемых носителей клеток (хондроцитов) для регенерации хрящевой ткани. В этом же исследовании, при сравнении степени адгезии хондроцитов на поверхность нановолоконных, нановолоконных полых и внутренне-твердых микросфер было показано, что характер их поверхности существенно влияет на приклепление клеток [316]. Коллагеновые микросферы были успешно применены для культивирования и дифференцировки на их поверхности клеток-предшественников олигодендроцитов с целью возможного дальнейшего их применением для регенерации нервной ткани [304]. Были проведены клинические испытания, которые показали возможность использования многослойных альгинатных микрогранул, в которых внутри

размещали клетки, а в наружном слое – ангиогенные белки, для лечения сахарного диабета 1-го типа [317]. В экспериментах *in vitro* полученные из жировой ткани мезенхимальные стромальные клетки человека, помещенные на биополимерные гидрогелевые микроматрицы *Сферо®ГЕЛЬ*, в хондрогенных условиях генерировали трехмерные хрящевые структуры и продуцировали такие компоненты внеклеточного матрикса, как коллаген II типа и гликозаминогликаны [127].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная новая технология криоСЗНТ для анализа структуры водосодержащих материалов и тканей позволяет получить изображения морфологии наноразмерных структур на поверхности изучаемого объекта после каждого выполненного сверхтонкого среза, при низких температурах (до  $-190^{\circ}\text{C}$ ). Получив массив последовательных двумерных изображений наномасштабной морфологии срезов замороженных образцов, данные преобразовываются в визуализированные трехмерные представления морфологии наноразмерных структур в заданном объеме. С помощью методики СЗНТ были исследованы и визуализированы трехмерные наноструктуры, топология, а также характеристики системы макро- и нанопор каркасных матриц из фиброина шёлка и рекомбинантного спидроина. Было установлено, что несмотря на получение матриц с помощью одного и того же метода выщелачивания, имеются существенные различия в их наноструктуре, а именно в размере пор, их сообщаемости и объеме пористости в целом. Таким образом, технология нанотомографии позволяет проводить анализы нанопористых материалов с разрешением в несколько десятков нанометров во всех трех плоскостях, что позволяет, исходя из уникальных данных об их наноструктуре, объяснять их биологические свойства. Результаты наших исследований продемонстрировали, что скорость адгезии и пролиферации фибробластов 3Т3 на матрицах из фиброина шёлка и рекомбинантного спидроина отличается несущественно, в то время как в экспериментах с животными *in vivo* процесс костной регенерации в ране, заполненной спидроиновым матриксом, протекает быстрее, чем с фиброиновым. Для эффективности регенерации, плотность распределения и взаимосвязанность (перколяция) микро- и нанопор в матрицах, очевидно, имеют решающее значение. Взаимосвязанность структур между собой является необходимым условием для равномерного клеточного распределения и эффективного прорастания ткани *in vivo*, так как способствует активному газообмену, доставке питательных веществ, а также адекватному метаболизму.

Изучение размеров, плотности распределения и взаимосвязанности нанопор может помочь в изготовлении матриц с улучшенными биологическими свойствами. Наши результаты по изучению структуры альгинатных микроносителей показали, что альгинатные микросферы, модифицированные микрочастицами децеллюляризованного матрикса, имеют более выраженную шероховатость и площадь поверхности, чем немодифицированные, что, в совокупности с биохимическим изменением поверхности, определяет более активную адгезию клеток. Такие модифицированные альгинатные микросферы могут применяться в регенеративной медицине и тканевой инженерии в качестве биodeградируемых клеточных носителей. Учитывая, что модифицировать поверхность микросфер можно любым девитализированным матриксом, такая технология носит универсальный характер, и таким образом позволяет изготавливать тканеспецифические носители, в зависимости от задач тканевой инженерии и регенеративной медицины. Сканирующая зондовая нанотомография представляется одним из наиболее перспективных методов для исследования и визуализации трехмерных наноструктур, а также характеристики совокупности микро- и нанопор в биodeградируемых трехмерных конструкциях. Степень пористости, размер и взаимосвязанность пор, отношение площади их поверхности к занимаемому ими объему в подобных материалах могут оказывать заметное влияние на эффективность их использования для регенеративной медицины. Стоит отметить, что для эффективного применения методов СЗНТ и криоСЗНТ необходим подбор адекватных методик пробоподготовки и исследований для различных видов клеток и нативных тканей, в связи с чем эту задачу можно назвать одной из важнейших, на которые необходимо обращать особое внимание при проведении подобных исследований.

**Практические рекомендации.** При осуществлении пробоподготовки образцов водосодержащих материалов и тканей для сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях, в качестве криопротектора рекомендуется использовать раствор сахарозы с концентрацией 2,3 М.

При создании новых биологических конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицины рекомендуется использовать технологии, повышающие наноструктурированность изделий, что оказывает положительное влияние на адгезию клеток, а также на их биологическую активность *in vivo*.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Технология сканирующей зондовой нанотомографии как при комнатной температуре, так и в криогенных условиях, может быть использована для сравнительного анализа наноструктуры клеток и тканей в норме и при патологических состояниях, что позволит проводить углубленные клинико-диагностические исследования.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан криогенный модуль для сканирующей зондовой нанотомографии для выполнения томографических исследований трехмерных наноразмерных структур водосодержащих материалов и тканей.
2. Технология сканирующей зондовой нанотомографии позволяет провести количественный наномасштабный анализ трехмерных параметров биоматрикс: размеры и степень объемной пористости и взаимосвязанности микро- и нанопор, шероховатость, длина автокорреляции и эффективная площадь поверхностей.
3. Методом сканирующей зондовой нанотомографии обнаружены существенные различия в плотности и объеме нанопор каркасных матрикс: интегральная плотность нанопор и степень нанопористости составила для спидроина  $46 \mu\text{м}^{-2}$  и 24%, для фиброина  $2.4 \mu\text{м}^{-2}$  и 0.5%, соответственно.
4. Матрикс из рекомбинантного спидроина с более высокой нанопористостью и взаимосвязанностью пор по сравнению с матриксами из фиброина шелка, обладают более высокой биологической активностью в экспериментах с восстановлением дефекта бедренной кости у крыс.
5. Разработан тканеспецифический мелкодисперсный матрикс из альгинатных микросфер, поверхность которых модифицирована микрочастицами девитализированной ткани печени.
6. Методом сканирующей зондовой нанотомографии в криогенных условиях установлено, что модификация поверхности альгинатных микросфер микрочастицами девитализированной ткани печени сопровождается увеличением средних значений шероховатости, удельной эффективной площади и длины автокорреляции и составляет 212.4 нм, 1.205, и 246 нм соответственно. Модификация поверхности альгинатных микросфер повышает адгезию клеток гепатомы человека Hep G2 по сравнению с немодифицированными микросферами.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DMEM - игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- EDC - гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимид
- FDA - Food and Drug Administration
- NHS - N-гидроксисукцинимид
- TRITC - тетраметилпродамин
- АЛТ - аланинаминотрансфераза
- СЗМ - атомно-силовая микроскопия
- АСТ - аспаратаминотрансфераза
- БАВ – биологически активное вещество
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ДМФ - диметилформаид
- ИКМ - индекс костной мозоли
- криоУМТ - ультрамикротомия при низких температурах
- МКТ - микрокомпьютерная томография
- МРТ - магнитно-резонансная томография
- МФР - механический фактор роста (MGF - mechano growth factor)
- ОФЭКТ - однофотонная эмиссионная компьютерная томография
- ПВП - поливинилпирролидон
- ПВС - поливиниловый спирт
- ПГА - полигликолевая кислота
- ПКЛ - поли(ε-капролактона)
- ПКЛ - поликапролактон
- ПЛА - полилактид
- ПЛГ - полилактид ко-гликолид (PLGA - poly(lactic-co-glycolic acid))
- ПОБ - полиоксибутират
- ПТФЭ - политетрафторэтилен
- ПЭГ - полиэтиленгликоль
- ПЭТ - позитронно-эмиссионной томография

ПЭТФ - полиэтилентерефталат

СЗМ - сканирующая зондовая микроскопия

СЗНТ - сканирующая зондовая нанотомография

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ТФР - трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ 3 - transforming growth factor  $\beta$ 3)

ТЭМ - трансмиссионная электронная микроскопия

ФИП - фокусированный ионный пучок

ФИП - фокусируемый ионный пучок

ФРЭ - фактора роста эпидермиса (EGF - Epidermal Growth Factor)

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

## Благодарности

Я благодарю своего научного руководителя профессора Севастьянова Виктора Ивановича за всестороннюю поддержку при проведении настоящей работы, Ефимова Антона Евгеньевича за помощь при конструировании модуля криоСЗНТ, Мойсеновича Михаила Михайловича за помощь при проведении конфокальной микроскопии, Татьяну Владимировну Дружинину за помощь при проведении экспериментов *in vivo*, Константина Викторовича Трофимова за помощь при проведении компьютерной рентгеновской томографии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Nayak, A., Ettenger, R., McGuire, S., Lipshutz, G., Reed, E., Veale, J., and Tsai, E.: 'Optimizing HLA matching in a highly sensitized pediatric patient using ABO-incompatible and paired exchange kidney transplantation', *Pediatr Nephrol*, 2015, 30, (5), pp. 855-858
- 2 Parikh, K., Appis, A., and Doukky, R.: 'Cardiac imaging for the assessment of patients being evaluated for kidney or liver transplantation', *J. Nucl. Cardiol.*, 2015, 22, (2), pp. 282-296
- 3 Wagenhäuser, M., Pietschmann, M., Docheva, D., Gülecüyüz, M., Jansson, V., and Müller, P.: 'Assessment of essential characteristics of two different scaffolds for tendon in situ regeneration', *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23, (4), pp. 1239-1246
- 4 Efimov, A.E., Moisenovich, M.M., Kuznetsov, A.G., Safonova, L.A., Bobrova, M.M., and Agapov, I.I.: 'Investigation of micro- and nanostructure of biocompatible scaffolds from regenerated fibroin of *Bombix mori* by scanning probe nanotomography', *Nanotechnol Russia*, 2014, 9, (11-12), pp. 688-692
- 5 Mochalov, K.E., Efimov, A.E., Alexey, B., Agapov, I.I., Chistyakov, A.A., Vladimir, O., Alyona, S., and Igor, N.: 'Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials', *ACS Nano*, 2013, 7, (10), pp. 8953-8962
- 6 Schmitt, R.: 'Scanning Electron Microscope', in Laperrière, L., and Reinhart, G. (Eds.): 'CIRP Encyclopedia of Production Engineering' (Springer Berlin Heidelberg, 2014), pp. 1085-1089
- 7 Frank, L., Hovorka, M., Mikmeková, Š., Mikmeková, E., Müllerová, I., and Pokorná, Z.: 'Scanning Electron Microscopy with Samples in an Electric Field', *Materials*, 2012, 5, (12), pp. 2731-2756
- 8 Eberle, A.L., Mikula, S., Schalek, R., Lichtman, J., Tate, M.L., and Zeidler, D.: 'High-resolution, high-throughput imaging with a multibeam scanning electron microscope', *Journal of microscopy*, 2015, 259, (2), pp. 114-120

- 9 Sakalli, Y., and Trettin, R.: 'Investigation of C3S hydration by environmental scanning electron microscope', *Journal of microscopy*, 2015, 259, (1), pp. 53-58
- 10 Bogner, A., Jouneau, P.H., Thollet, G., Basset, D., and Gauthier, C.: 'A history of scanning electron microscopy developments: towards "wet-STEM" imaging', *Micron (Oxford, England : 1993)*, 2007, 38, (4), pp. 390-401
- 11 Caplan, J., Niethammer, M., Taylor, R.M., 2nd, and Czymmek, K.J.: 'The power of correlative microscopy: multi-modal, multi-scale, multi-dimensional', *Current opinion in structural biology*, 2011, 21, (5), pp. 686-693
- 12 Abellan, P., Woehl, T.J., Parent, L.R., Browning, N.D., Evans, J.E., and Arslan, I.: 'Factors influencing quantitative liquid (scanning) transmission electron microscopy', *Chemical Communications*, 2014, 50, (38), pp. 4873-4880
- 13 Joy, D.C.: 'Scanning electron microscopy: Second best no more', *Nat Mater*, 2009, 8, (10), pp. 776-777
- 14 Howe, J.M., Fultz, B., and Miao, S.: 'Transmission Electron Microscopy': 'Characterization of Materials' (John Wiley & Sons, Inc., 2002)
- 15 Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., and Laub, D.: 'Web sample preparation guide for transmission electron microscopy (TEM)', in Luysberg, M., Tillmann, K., and Weirich, T. (Eds.): 'EMC 2008 14th European Microscopy Congress 1-5 September 2008, Aachen, Germany' (Springer Berlin Heidelberg, 2008), pp. 801-802
- 16 Li, W., Luo, T., Yang, Y., Tan, X., and Liu, L.: 'Formation of controllable hydrophilic/hydrophobic drug delivery systems by electrospinning of vesicles', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2015, 31, (18), pp. 5141-5146
- 17 Limonta, D., Falcon, V., Torres, G., Capo, V., Menendez, I., Rosario, D., Castellanos, Y., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., de la Rosa, M.C., Pavon, A., Lopez, L., Gonzalez, K., Guillen, G., Diaz, J., and Guzman, M.G.: 'Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever', *Infection*, 2012, 40, (6), pp. 689-694

- 18 Bowie, R., Kida, K., Leroux, M., and Blacque, O.: 'A picture tells a thousand words: transmission electron microscopy of the ciliary transition zone in *C. elegans*', *Cilia*, 2012, 1, (1), pp. 1-1
- 19 Zasadzinski, J.A.: 'Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure', *Biophysical Journal*, 49, (6), pp. 1119-1130
- 20 Pennycook, S.J.: 'Scanning transmission electron microscopy: Seeing the atoms more clearly', *MRS Bulletin*, 2012, 37, (10), pp. 943-951
- 21 Jinschek, J.R.: 'Advances in the environmental transmission electron microscope (ETEM) for nanoscale in situ studies of gas-solid interactions', *Chemical Communications*, 2014, 50, (21), pp. 2696-2706
- 22 Uguz, A.: 'Book review: Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances, edited by Alberto Diaspro', *Annals of Biomedical Engineering*, 2002, 30, (7), pp. 984-984
- 23 Flaberg, E., Sabelström, P., Strandh, C., and Szekely, L.: 'Extended Field Laser Confocal Microscopy (EFLCM): Combining automated Gigapixel image capture with in silico virtual microscopy', *BMC Med Imaging*, 2008, 8, (1), pp. 1-13
- 24 Vekshin, N.L., and Frolova, M.S.: 'Artefacts of confocal microscopy', *BIOPHYSICS*, 2014, 59, (5), pp. 843-847
- 25 Srinivasan, R., Zhou, X., Miller, E., Lu, J., Litchman, J., and Wong, S.T.C.: 'Automated Axon Tracking of 3D Confocal Laser Scanning Microscopy Images Using Guided Probabilistic Region Merging', *Neuroinformatics*, 2007, 5, (3), pp. 189-203
- 26 Gorshkov, A.N., Snigirevskaya, E.S., and Komissarchik, Y.Y.: 'Analysis of vasopressin-induced transepithelial water transport by confocal and electron microscopy methods', *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2009, 3, (3), pp. 311-311
- 27 Kann, B., and Windbergs, M.: 'Chemical Imaging of Drug Delivery Systems with Structured Surfaces—a Combined Analytical Approach of Confocal Raman Microscopy and Optical Profilometry', *AAPS J*, 2013, 15, (2), pp. 505-510
- 28 McAllister, J., Wagshul, M., Rashid, S., and Li, J.: 'Measurement of capillary pulsations in the rat neocortex with two-photon laser scanning confocal microscopy', *Cerebrospinal Fluid Res*, 2009, 6, (Suppl 2), pp. 1-1

- 29 Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Pilarczyk, G., Monajembashi, S., Uhl, V., and Greulich, K.O.: ‘Optical tweezers for confocal microscopy’, *Appl Phys B*, 2000, 71, (5), pp. 747-753
- 30 Zitta, C., Oliveira, E., Bouzon, Z., and Hayashi, L.: ‘Ploidy determination of three *Kappaphycus alvarezii* strains (Rhodophyta, Gigartinales) by confocal fluorescence microscopy’, *J Appl Phycol*, 2012, 24, (3), pp. 495-499
- 31 Dobbs, J., Krishnamurthy, S., Kyrish, M., Benveniste, A., Yang, W., and Richards-Kortum, R.: ‘Confocal fluorescence microscopy for rapid evaluation of invasive tumor cellularity of inflammatory breast carcinoma core needle biopsies’, *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 149, (1), pp. 303-310
- 32 Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F.H., Anderson, R.R., Schwarzenberger, K., and Young, R.C.: ‘Introduction to confocal microscopy’, *The Journal of investigative dermatology*, 2012, 132, (12), pp. e3
- 33 Harper, D., Pallazola, V., Williams, D., Harte, S., Clauw, D., and Shtein, R.: ‘Confocal microscopy reveals nerve fiber similarities in fibromyalgia and patients with dry eyes with a normal ophthalmic exam’, *Mol Pain*, 2014, 10, (1), pp. 1-1
- 34 Cremer, C., and Masters, B.R.: ‘Resolution enhancement techniques in microscopy’, *EPJ H*, 2013, 38, (3), pp. 281-344
- 35 Lee, Y.C., Kim, H.J., Kim, K.S., Choi, S., Kim, S.W., Park, H.-K., and Eun, Y.G.: ‘Investigation of nanostructural changes following acute injury using atomic force microscopy in rabbit vocal folds’, *Microscopy research and technique*, 2015, 78, (7), pp. 569-576
- 36 Abbasi, M., and Karami Mohammadi, A.: ‘Study of the sensitivity and resonant frequency of the torsional modes of an AFM cantilever with a sidewall probe based on a nonlocal elasticity theory’, *Microscopy research and technique*, 2015, 78, (5), pp. 408-415
- 37 Liao, H.S., Chen, Y.H., Ding, R.F., Huang, H.F., Wang, W.M., Hwu, E.T., Huang, K.Y., Chang, C.S., and Hwang, I.S.: ‘High-speed atomic force microscope based on an astigmatic detection system’, *The Review of scientific instruments*, 2014, 85, (10), pp. 103710

- 38 Braunsmann, C., Seifert, J., Rheinlaender, J., and Schaffer, T.E.: 'High-speed force mapping on living cells with a small cantilever atomic force microscope', *The Review of scientific instruments*, 2014, 85, (7), pp. 073703
- 39 Van Der Hofstadt, M., Huttener, M., Juarez, A., and Gomila, G.: 'Nanoscale imaging of the growth and division of bacterial cells on planar substrates with the atomic force microscope', *Ultramicroscopy*, 2015, 154, pp. 29-36
- 40 Touhami, A., Jericho, M.H., and Beveridge, T.J.: 'Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*', *Journal of bacteriology*, 2004, 186, (11), pp. 3286-3295
- 41 Buys, A., Van Rooy, M.-J., Soma, P., Van Papendorp, D., Lipinski, B., and Pretorius, E.: 'Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study', *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12, (1), pp. 1-7
- 42 Trindade, G.S., Vilela, J.M., Ferreira, J.M., Aguiar, P.H., Leite, J.A., Guedes, M.I., Lobato, Z.I., Madureira, M.C., da Silva, M.I., da Fonseca, F.G., Kroon, E.G., and Andrade, M.S.: 'Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus', *Journal of virological methods*, 2007, 141, (2), pp. 198-204
- 43 Arai, T., Koshioka, M., Abe, K., Tomitori, M., Kokawa, R., Ohta, M., Yamada, H., Kobayashi, K., and Oyabu, N.: 'Atom-Resolved Analysis of an Ionic KBr(001) Crystal Surface Covered with a Thin Water Layer by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2015, 31, (13), pp. 3876-3883
- 44 Wang, T., Ma, C., Chen, Y., Chu, J., and Huang, W.: 'Effects of temperature and humidity on atomic force microscopy dimensional measurement', *Microscopy research and technique*, 2015, 78, (7), pp. 562-568
- 45 Lapshin, R.V.: 'Feature-oriented scanning methodology for probe microscopy and nanotechnology', *Nanotechnology*, 2004, 15, (9), pp. 1135-1151
- 46 Lapshin, R.V.: 'Automatic drift elimination in probe microscope images based on techniques of counter-scanning and topography feature recognition', *Measurement Science and Technology*, 2007, 18, (3), pp. 907-927



- 47 Lapshin, R.V., and Obyedkov, O.V.: 'Fast-acting piezoactuator and digital feedback loop for scanning tunneling microscopes', *Review of Scientific Instruments*, 1993, 64, (10), pp. 2883-2887
- 48 Bazaei, A., Yong, Y.K., Moheimani, S.O.R., and Sebastian, A.: 'Tracking of Triangular References Using Signal Transformation for Control of a Novel AFM Scanner Stage', *Control Systems Technology, IEEE Transactions on*, 2012, 20, (2), pp. 453-464
- 49 Efimov, A.E., Tonevitsky, A.G., Dittrich, M., and Matsko, N.B.: 'Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples', *Journal of microscopy*, 2007, 226, (Pt 3), pp. 207-217
- 50 Walther, P., and Muller, M.: 'Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo-SEM of block faces after cryo-sectioning', *Journal of microscopy*, 1999, 196, (Pt 3), pp. 279-287
- 51 Mochalov, K.E., Efimov, A.E., Bobrovsky, A.Y., Agapov, I.I., Chistyakov, A.A., Oleinikov, V.A., and Nabiev, I.: 'High-resolution 3D structural and optical analyses of hybrid or composite materials by means of scanning probe microscopy combined with the ultramicrotome technique: an example of application to engineering of liquid crystals doped with fluorescent quantum dots', in Editor (Ed.)^(Eds.): 'Book High-resolution 3D structural and optical analyses of hybrid or composite materials by means of scanning probe microscopy combined with the ultramicrotome technique: an example of application to engineering of liquid crystals doped with fluorescent quantum dots' (2013, edn.), pp. 876708-876708-876712
- 52 Mochalov, K.E., Efimov, A.E., Bobrovsky, A., Agapov, I.I., Chistyakov, A.A., Oleinikov, V., Sukhanova, A., and Nabiev, I.: 'Mochalov, K.E., Efimov, A.E., Bobrovsky, A., Agapov, I.I., Chistyakov, A.A., Oleinikov, V.A., Sukhanova, A., Nabiev, I. Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials// *ACS Nano*. 2013; 7 (10), P. 8953–8962. ', *ACS Nano*, 2013, 7, (10), pp. 8953-8962

- 53 Midgley, P.A., and Dunin-Borkowski, R.E.: 'Electron tomography and holography in materials science', *Nat Mater*, 2009, 8, (4), pp. 271-280
- 54 Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., and Baumeister, W.: 'Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography', *Science (New York, N.Y.)*, 2002, 298, (5596), pp. 1209-1213
- 55 Milne, J.L., and Subramaniam, S.: 'Cryo-electron tomography of bacteria: progress, challenges and future prospects', *Nature reviews. Microbiology*, 2009, 7, (9), pp. 666-675
- 56 Möebus, G., and Inkson, B.J.: 'Novel Nanoscale Tomography Modes in Materials Science', *Microscopy and Microanalysis*, 2003, 9, (SupplementS02), pp. 176-177
- 57 van Bavel, S.S., and Loos, J.: 'Volume Organization of Polymer and Hybrid Solar Cells as Revealed by Electron Tomography', *Advanced Functional Materials*, 2010, 20, (19), pp. 3217-3234
- 58 Mironov, A.A., and Beznoussenko, G.V.: 'Correlative microscopy: a potent tool for the study of rare or unique cellular and tissue events', *Journal of microscopy*, 2009, 235, (3), pp. 308-321
- 59 Spiegelhalter, C., Tosch, V., Hentsch, D., Koch, M., Kessler, P., Schwab, Y., and Laporte, J.: 'From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy', *PloS one*, 2010, 5, (2), pp. e9014
- 60 Pilhofer, M., Ladinsky, M.S., McDowall, A.W., and Jensen, G.J.: 'Bacterial TEM: new insights from cryo-microscopy', *Methods in cell biology*, 2010, 96, pp. 21-45
- 61 Bouchet-Marquis, C., and Hoenger, A.: 'Cryo-electron tomography on vitrified sections: a critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology', *Micron (Oxford, England : 1993)*, 2011, 42, (2), pp. 152-162
- 62 Holzer, L., Indutnyi, F., Gasser, P.H., Munch, B., and Wegmann, M.: 'Three-dimensional analysis of porous BaTiO<sub>3</sub> ceramics using FIB nanotomography', *Journal of microscopy*, 2004, 216, (Pt 1), pp. 84-95

- 63 Zankel, A., Wagner, J., and Poelt, P.: 'Serial sectioning methods for 3D investigations in materials science', *Micron* (Oxford, England : 1993), 2014, 62, pp. 66-78
- 64 Al-Abboodi, A., Fu, J., Doran, P.M., and Chan, P.P.: 'Three-dimensional nanocharacterization of porous hydrogel with ion and electron beams', *Biotechnology and bioengineering*, 2013, 110, (1), pp. 318-326
- 65 Ho, S.T., and Hutmacher, D.W.: 'A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds', *Biomaterials*, 2006, 27, (8), pp. 1362-1376
- 66 Barbetta, A., Bedini, R., Pecci, R., and Dentini, M.: 'Role of X-ray microtomography in tissue engineering', *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 2012, 48, (1), pp. 10-18
- 67 Zielke, L., Hutzenlaub, T., Wheeler, D.R., Manke, I., Arlt, T., Paust, N., Zengerle, R., and Thiele, S.: 'A Combination of X-Ray Tomography and Carbon Binder Modeling: Reconstructing the Three Phases of LiCoO<sub>2</sub> Li-Ion Battery Cathodes', *Advanced Energy Materials*, 2014, 4, (8), pp. n/a-n/a
- 68 Moore, M.J., Jabbari, E., Ritman, E.L., Lu, L., Currier, B.L., Windebank, A.J., and Yaszemski, M.J.: 'Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography', *J Biomed Mater Res A*, 2004, 71, (2), pp. 258-267
- 69 Muller, W.G., Heymann, J.B., Nagashima, K., Guttman, P., Werner, S., Rehbein, S., Schneider, G., and McNally, J.G.: 'Towards an atlas of mammalian cell ultrastructure by cryo soft X-ray tomography', *Journal of structural biology*, 2012, 177, (2), pp. 179-192
- 70 Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C.: 'Atomic Force Microscope', *Physical Review Letters*, 1986, 56, (9), pp. 930-933
- 71 'Magonov, S. N.; Reneker, D. H. Characterization of Polymer Surfaces with Atomic Force Microscopy. //Annu. Rev. Mater. Sci. 1997, 27, P. 175–222.'

- 72 Matsko, N.B.: 'Atomic force microscopy applied to study macromolecular content of embedded biological material', *Ultramicroscopy*, 2007, 107, (2-3), pp. 95-105
- 73 Gallyamov, M.O.: 'Scanning force microscopy as applied to conformational studies in macromolecular research', *Macromolecular rapid communications*, 2011, 32, (16), pp. 1210-1246
- 74 Alekseev, A., Chen, D., Tkalya, E.E., Ghislandi, M.G., Syurik, Y., Ageev, O., Loos, J., and de With, G.: 'Local Organization of Graphene Network Inside Graphene/Polymer Composites', *Advanced Functional Materials*, 2012, 22, (6), pp. 1311-1318
- 75 Alekseev, A., Efimov, A., Lu, K., and Loos, J.: 'Three-dimensional Electrical Property Mapping with Nanometer Resolution', *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 2009, 21, (48), pp. 4915-4919
- 76 Hartmann, U.: 'Magnetic force microscopy: Some remarks from the micromagnetic point of view', *Journal of Applied Physics*, 1988, 64, (3), pp. 1561-1564
- 77 'Noy, A.; Vezenov, D.V.; Lieber, C.M. Chemical Force Microscopy. //Annu. Rev. Mater. Sci. 1997, 27, P. 381-421.'
- 78 Zlatanova, J., Lindsay, S.M., and Leuba, S.H.: 'Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope', *Progress in biophysics and molecular biology*, 2000, 74, (1-2), pp. 37-61
- 79 Magerle, R.: 'Nanotomography', *Phys Rev Lett*, 2000, 85, (13), pp. 2749-2752
- 80 'Magerle, R. //Europ. Patent EP 1144989, "Nanotomography", 2001.'
- 81 'Magerle R. //U.S. Patent 6,546,788, "Nanotomography", 2001.'
- 82 Dietz, C., Roper, S., Scherdel, S., Bernstein, A., Rehse, N., and Magerle, R.: 'Automatization of nanotomography', *The Review of scientific instruments*, 2007, 78, (5), pp. 053703
- 83 Rehse, N., Marr, S., Scherdel, S., and Magerle, R.: 'Three-Dimensional Imaging of Semicrystalline Polypropylene with 10 nm Resolution', *Advanced Materials*, 2005, 17, (18), pp. 2203-2206

- 84 Liedel, C., Hund, M., Olszowka, V., and Boker, A.: 'On the alignment of a cylindrical block copolymer: a time-resolved and 3-dimensional SFM study', *Soft Matter*, 2012, 8, (4), pp. 995-1002
- 85 Schulze, A., Hantschel, T., Dathe, A., Eyben, P., Ke, X., and Vandervorst, W.: 'Electrical tomography using atomic force microscopy and its application towards carbon nanotube-based interconnects', *Nanotechnology*, 2012, 23, (30), pp. 305707
- 86 Amstislavsky, S.Y., Brusentsev, E.Y., Okotrub, K.A., and Rozhkova, I.N.: 'Embryo and gamete cryopreservation for genetic resources conservation of laboratory animals', *Russ J Dev Biol*, 2015, 46, (2), pp. 47-59
- 87 Larman, M.G., Sheehan, C.B., and Gardner, D.K.: 'Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes', *Reproduction*, 2006, 131, (1), pp. 53-61
- 88 McGann, L.E.: 'Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents', *Cryobiology*, 1978, 15, (4), pp. 382-390
- 89 Jomha, N.M., McGann, L.E., Law, G.K., and Sharma, R.: 'Cryoprotectant penetration into intact porcine articular cartilage', *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 2008, 90-B, (SUPP I), pp. 105
- 90 Janz Fde, L., Debes Ade, A., Cavaglieri Rde, C., Duarte, S.A., Romao, C.M., Moron, A.F., Zugaib, M., and Bydlowski, S.P.: 'Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation', *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 2012, pp. 649353
- 91 Bhat, A., Irorere, V., Bartlett, T., Hill, D., Kedia, G., Morris, M., Charalampopoulos, D., and Radecka, I.: 'Bacillus subtilis natto: a non-toxic source of poly- $\gamma$ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria', *AMB Expr*, 2013, 3, (1), pp. 1-9
- 92 Rosato, M.P., and Iaffaldano, N.: 'Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification', *Theriogenology*, 2013, 79, (3), pp. 508-516

- 93 Chauvigne, F., Lubzens, E., and Cerda, J.: 'Design and characterization of genetically engineered zebrafish aquaporin-3 mutants highly permeable to the cryoprotectant ethylene glycol', *BMC biotechnology*, 2011, 11, pp. 34
- 94 P, I.: 'Effect of sucrose and propylene glycol on the vitrification of sheep oocytes', *Journal of Cell and Animal Biology*, 2013, 7, (3), pp. 25-30
- 95 Bruyas, J.F., Sanson, J.P., Battut, I., Fieni, F., and Tainturier, D.: 'Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day 6) equine embryos', *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 2000, (56), pp. 549-560
- 96 Thirumala, S., Gimble, J.M., and Devireddy, R.V.: 'Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells', *Stem cells and development*, 2010, 19, (4), pp. 513-522
- 97 Mori, C., Yabuuchi, A., Ezoe, K., Murata, N., Takayama, Y., Okimura, T., Uchiyama, K., Takakura, K., Abe, H., Wada, K., Okuno, T., Kobayashi, T., and Kato, K.: 'Hydroxypropyl cellulose as an option for supplementation of cryoprotectant solutions for embryo vitrification in human assisted reproductive technologies', *Reproductive biomedicine online*, 2015, 30, (6), pp. 613-621
- 98 Chi, H.J., Koo, J.J., Kim, M.Y., Joo, J.Y., Chang, S.S., and Chung, K.S.: 'Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing', *Human reproduction (Oxford, England)*, 2002, 17, (8), pp. 2146-2151
- 99 Eto, T., Takahashi, R., Kamisako, T., Hioki, K., and Sotomaru, Y.: 'A study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos', *Cryobiology*, 2014, 68, (1), pp. 147-151
- 100 Jeffries, E.M., Allen, R.A., Gao, J., Pesce, M., and Wang, Y.: 'Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds', *Acta biomaterialia*, 2015, 18, (0), pp. 30-39
- 101 Lace, R., Murray-Dunning, C., and Williams, R.: 'Biomaterials for ocular reconstruction', *Journal of Materials Science*, 2014, 50, (4), pp. 1523-1534
- 102 Song, Z.-m., Shi, B., Ding, J.-x., Zhuang, X.-l., Zhang, X.-n., Fu, C.-f., and Chen, X.-s.: 'Prevention of postoperative tendon adhesion by biodegradable electrospun

membrane of poly(lactide-co-glycolide)', *Chinese Journal of Polymer Science*, 2015, 33, (4), pp. 587-596

103 Zhao, F., Vaughan, T.J., and McNamara, L.M.: 'Multiscale fluid-structure interaction modelling to determine the mechanical stimulation of bone cells in a tissue engineered scaffold', *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 2015, 14, (2), pp. 231-243

104 'А. Г. Федяков, О. Н. Древаль, В. И. Севастьянов, Н. В. Перова, А. В. Кузнецов, Г. Н. Чапандзе. Экспериментально-клиническое обоснование применения биodeградируемых имплантатов в хирургическом лечении поражений периферических нервов. Журнал "Вопросы нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко", 2010, №3, с. 15-18.'

105 Zhu, G.C., Gu, Y.Q., Geng, X., Feng, Z.G., Zhang, S.W., Ye, L., and Wang, Z.G.: 'Experimental study on the construction of small three-dimensional tissue engineered grafts of electrospun poly-epsilon-caprolactone', *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2015, 26, (2), pp. 112

106 Amoore, L., and De Goede, M.: 'Governance, risk and dataveillance in the war on terror', *Crime Law Soc Change*, 2005, 43, (2-3), pp. 149-173

107 Cartmill, B.T., Parham, D.M., Strike, P.W., Griffiths, L., and Parkin, B.: 'How do absorbable sutures absorb? A prospective double-blind randomized clinical study of tissue reaction to polyglactin 910 sutures in human skin', *Orbit*, 2014, 33, (6), pp. 437-443

108 Pihlajamaki, H., Tynnenen, O., Karjalainen, P., and Rokkanen, P.: 'The impact of polyglycolide membrane on a tendon after surgical rejoining. A histological and histomorphometric analysis in rabbits', *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2007, 81, (4), pp. 987-993

109 Costa, M.P., Teixeira, N.H., Longo, M.V., Gemperli, R., and Costa, H.J.: 'Combined polyglycolic acid tube and autografting versus autografting or polyglycolic acid tube alone. A comparative study of peripheral nerve regeneration in rats', *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, 2015, 30, (1), pp. 46-53

- 110 Zhu, Y., Liang, C., Bo, Y., and Xu, S.: 'Non-isothermal crystallization behavior of compatibilized polypropylene/recycled polyethylene terephthalate blends', *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014, 119, (3), pp. 2005-2013
- 111 Makarawo, T.P., Reynolds, R.A., and Cullen, M.L.: 'Polylactide bioabsorbable struts for chest wall reconstruction in a pediatric patient', *The Annals of thoracic surgery*, 2015, 99, (2), pp. 689-691
- 112 Guo, S.Z., Heuzey, M.C., and Therriault, D.: 'Properties of polylactide inks for solvent-cast printing of three-dimensional freeform microstructures', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2014, 30, (4), pp. 1142-1150
- 113 Water, J.J., Bohr, A., Boetker, J., Aho, J., Sandler, N., Nielsen, H.M., and Rantanen, J.: 'Three-dimensional printing of drug-eluting implants: preparation of an antimicrobial polylactide feedstock material', *Journal of pharmaceutical sciences*, 2015, 104, (3), pp. 1099-1107
- 114 Gonzalez-Perez, F., Cobianchi, S., Geuna, S., Barwig, C., Freier, T., Udina, E., and Navarro, X.: 'Tubulization with chitosan guides for the repair of long gap peripheral nerve injury in the rat', *Microsurgery*, 2015, 35, (4), pp. 300-308
- 115 Shen, Z.Q., Hu, J., Wang, J.L., and Zhou, Y.X.: 'Comparison of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends as carbon source for biological denitrification', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014, 12, (4), pp. 1235-1242
- 116 de Mel, A., Yap, T., Cittadella, G., Hale, L., Maghsoudlou, P., de Coppi, P., Birchall, M., and Seifalian, A.: 'A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for paediatric organ development', *J Mater Sci: Mater Med*, 2015, 26, (3), pp. 1-8
- 117 Alhusein, N., Blagbrough, I.S., and De Bank, P.A.: 'Electrospun matrices for localised controlled drug delivery: release of tetracycline hydrochloride from layers of polycaprolactone and poly(ethylene-co-vinyl acetate)', *Drug Delivery and Translational Research*, 2012, 2, (6), pp. 477-488



- 118 Osten, K.M., Aluthge, D.C., and Mehrkhodavandi, P.: 'The effect of steric changes on the isoselectivity of dinuclear indium catalysts for lactide polymerization', *Dalton Transactions*, 2015, 44, (13), pp. 6126-6139
- 119 Kim, J.A., and Van Abel, D.: 'Neocollagenesis in human tissue injected with a polycaprolactone-based dermal filler', *Journal of cosmetic and laser therapy : official publication of the European Society for Laser Dermatology*, 2014, pp. 1-3
- 120 Xu, Z., Zhu, J., Liao, X., and Ni, H.: 'Thermal behavior of poly (ethylene terephthalate)/SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> nano composites prepared via in situ polymerization', *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2014, 12, (5), pp. 765-770
- 121 Finosh, G., and Jayabalan, M.: 'Hybrid amphiphilic bimodal hydrogels having mechanical and biological recognition characteristics for cardiac tissue engineering', *RSC Advances*, 2015, 5, (48), pp. 38183-38201
- 122 Mallick, B.: 'Analysis of strain-induced crystallinity in neutron-irradiated amorphous PET fiber', *Appl. Phys. A*, 2015, 119, (2), pp. 653-657
- 123 Ma, Z., Kotaki, M., Yong, T., He, W., and Ramakrishna, S.: 'Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering', *Biomaterials*, 2005, 26, (15), pp. 2527-2536
- 124 Huang, Z., Bi, L., Zhang, Z., and Han, Y.: 'Effects of dimethylolpropionic acid modification on the characteristics of polyethylene terephthalate fibers', *Molecular medicine reports*, 2012, 6, (4), pp. 709-715
- 125 Ebadi, H., and Mehdipour-Ataei, S.: 'Heat-resistant, pyridine-based polyamides containing ether and ester units with improved solubility', *Chinese Journal of Polymer Science*, 2009, 28, (1), pp. 29-37
- 126 Buccella, M., Dorigato, A., Pasqualini, E., Caldara, M., and Fambri, L.: 'Thermo-mechanical properties of Polyamide 6 chemically modified by chain extension with Polyamide/Polycarbonate blend', *J Polym Res*, 2012, 19, (8), pp. 1-9
- 127 Surguchenko, V.A., Ponomareva, A.S., Kirsanova, L.A., Skaleckij, N.N., and Sevastianov, V.I.: 'The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study)', *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2015, 103, (2), pp. 463-470

- 128 Sevastianov, V.I., Dukhina, G.A., Grigoriev, A.M., Perova, N.V., Kirsanova, L.A., Skaletskiy, N.N., Akhaladze, D.G., and Gautier, S.V.: 'The Functional Effectiveness of a Cell-Engineered Construct for the Regeneration of Articular Cartilage', *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*, 2015, (1), pp. 86
- 129 Srisuwan, Y., Srihanam, P., and Baimark, Y.: 'Preparation of Silk Fibroin Microspheres and Its Application to Protein Adsorption', *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2009, 46, (5), pp. 521-525
- 130 'Yodthong Baimark and Prasong Srihanam, 2009. Effect of Methanol Treatment on Regenerated Silk Fibroin Microparticles Prepared by the Emulsification-Diffusion Technique. *Journal of Applied Sciences*, 9: 3876-3881.'
- 131 Mahaphasukwat, S., Shimamoto, K., Hayashida, S., Sekiguchi, Y., and Sato, C.: 'Mode I critical fracture energy of adhesively bonded joints between glass fiber reinforced thermoplastics', *Appl Adhes Sci*, 2015, 3, (1), pp. 1-13
- 132 Cui, H.-W., Suganuma, K., and Uchida, H.: 'Highly stretchable, electrically conductive textiles fabricated from silver nanowires and cupro fabrics using a simple dipping-drying method', *Nano Res.*, 2015, 8, (5), pp. 1604-1614
- 133 Jalilian, S., and Yeganeh, H.: 'Preparation and properties of biodegradable polyurethane networks from carbonated soybean oil', *Polym. Bull.*, 2015, 72, (6), pp. 1379-1392
- 134 Schüttler, K., Pöttgen, S., Getgood, A., Rominger, M., Fuchs-Winkelmann, S., Roessler, P., Ziring, E., and Efe, T.: 'Improvement in outcomes after implantation of a novel polyurethane meniscal scaffold for the treatment of medial meniscus deficiency', *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23, (7), pp. 1929-1935
- 135 Breslauer, D.N., Muller, S.J., and Lee, L.P.: 'Generation of monodisperse silk microspheres prepared with microfluidics', *Biomacromolecules*, 2010, 11, (3), pp. 643-647
- 136 Skorotetcky, M.S., Borshchev, O.V., Surin, N.M., Meshkov, I.B., Muzafarov, A.M., and Ponomarenko, S.A.: 'Novel Cross-Linked Luminescent Silicone Composites Based on Reactive Nanostructured Organosilicon Luminophores', *Silicon*, 2014, 7, (2), pp. 191-200

- 137 Surovikin, Y.V., and Likholobov, V.A.: 'Synthesis and properties of a new generation of carbon materials from the Sibunit family modified with silicon compounds', *Solid Fuel Chemistry*, 2014, 48, (6), pp. 335-348
- 138 Liu, Q., Shao, L., Fan, H., Long, Y., Zhao, N., Yang, S., Zhang, X., and Xu, J.: 'Characterization of maxillofacial silicone elastomer reinforced with different hollow microspheres', *Journal of Materials Science*, 2015, 50, (11), pp. 3976-3983
- 139 Zolotareva, N., and Semenov, V.: 'Microchannel Thermocured Silicone Rubber', *Silicon*, 2014, 7, (2), pp. 89-93
- 140 Lonys, L., Vanhoestenbergh, A., Julémont, N., Godet, S., Delplancke, M.-P., Mathys, P., and Nonclercq, A.: 'Silicone rubber encapsulation for an endoscopically implantable gastrostimulator', *Med Biol Eng Comput*, 2015, 53, (4), pp. 319-329
- 141 Nikolaeva, T.I., Kuznetsova, S.M., and Tiktopulo, E.I.: 'Does collagen microunfold stimulate fibril formation?', *Biophysics*, 2010, 54, (6), pp. 683-685
- 142 Markel, M.D., Hayashi, K., and Thabit, G., III: 'Basic Properties of Collagen Shrinkage and Laser-Collagen Interactions', in Gerber, B., Knight, M.N., and Siebert, W. (Eds.): 'Lasers in the Musculoskeletal System' (Springer Berlin Heidelberg, 2001), pp. 162-169
- 143 Dawson, J., Schussler, O., Al-Madhoun, A., Menard, C., Ruel, M., and Skerjanc, I.S.: 'Collagen scaffolds with or without the addition of RGD peptides support cardiomyogenesis after aggregation of mouse embryonic stem cells', *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 2011, 47, (9), pp. 653-664
- 144 Chaisri, P., Chingsungnoen, A., and Siri, S.: 'Repetitive Gly-Leu-Lys-Gly-Glu-Asn-Arg-Gly-Asp peptide derived from collagen and fibronectin for improving cell-scaffold interaction', *Applied biochemistry and biotechnology*, 2015, 175, (5), pp. 2489-2500
- 145 Kretzschmar, M., Bieri, O., Miska, M., Wiewiorski, M., Hainc, N., Valderrabano, V., and Studler, U.: 'Characterization of the collagen component of cartilage repair tissue of the talus with quantitative MRI: comparison of T2 relaxation time measurements with a diffusion-weighted double-echo steady-state sequence (dwDESS)', *European radiology*, 2015, 25, (4), pp. 980-986

- 146 Togo, S., Sato, T., Sugiura, H., Wang, X., Basma, H., Nelson, A., Liu, X., Bargar, T.W., Sharp, J.G., and Rennard, S.I.: 'Differentiation of embryonic stem cells into fibroblast-like cells in three-dimensional type I collagen gel cultures', *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 2011, 47, (2), pp. 114-124
- 147 Werkmeister, J., Edwards, G., and Ramshaw, J.M.: 'Collagen-Based Vascular Prostheses', in Wise, D., Gresser, J., Trantolo, D., Cattaneo, M., Lewandrowski, K.-U., and Yaszemski, M. (Eds.): 'Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications' (Humana Press, 2000), pp. 121-136
- 148 Bhat, S.: 'Cardiovascular Implants and Extracorporeal Devices': 'Biomaterials' (Springer Netherlands, 2002), pp. 130-162
- 149 Tran, A., Brown, S., Rosenberg, J., and Hovsepian, D.: 'Tract Embolization With Gelatin Sponge Slurry for Prevention of Pneumothorax After Percutaneous Computed Tomography-Guided Lung Biopsy', *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2014, 37, (6), pp. 1546-1553
- 150 Chiu, C.-H., Shih, H.-C., Jwo, S.-C., and Hsieh, M.-F.: 'Effect of Crosslinkers on Physical Properties of Gelatin Hollow Tubes for Tissue Engineering Application', in Dössel, O., and Schlegel, W. (Eds.): 'World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany' (Springer Berlin Heidelberg, 2010), pp. 293-296
- 151 Chou, K., Chiu, H., Lin, J., Huang, W., Chen, P., Xiao, W., Chen, T., and Wang, L.: 'The Effect of Microwave Treatment on the Drug Release Property of Gelatin Microspheres', in Goh, J. (Ed.): 'The 15th International Conference on Biomedical Engineering' (Springer International Publishing, 2014), pp. 726-729
- 152 Parot, P., Dufrene, Y.F., Hinterdorfer, P., Le Grimellec, C., Navajas, D., Pellequer, J.L., and Scheuring, S.: 'Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine', *Journal of molecular recognition : JMR*, 2007, 20, (6), pp. 418-431
- 153 Ankudinov, A.V., Yanul, M.L., Slipchenko, S.O., Shelaev, A.V., Dorozhkin, P.S., Podoskin, A.A., and Tarasov, I.S.: 'Investigation of the light field of a semiconductor diode laser', *Opt. Express*, 2014, 22, (21), pp. 26438-26448

- 154 Новикова, Л., Шорманов, В., Беяева, Г., Полонская, М., Беяева, Т., and Ахметзянова, И.: 'Получение коллагена и некоторых лекарственных препаратов на его основе', Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", 2011, (1), pp. 139-145
- 155 Tretenichenko, E.M., Datsun, V.M., Ignatyuk, L.N., and Nud'ga, L.A.: 'Preparation and properties of chitin and chitosan from a hydroid polyp', Russian Journal of Applied Chemistry, 2006, 79, (8), pp. 1341-1346
- 156 Kaya, M., Akata, I., Baran, T., and Menteş, A.: 'Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan Produced from Medicinal Fungus (*Fomitopsis pinicola*)', Food Biophysics, 2015, 10, (2), pp. 162-168
- 157 Greben', V.P., Rodzik, I.G., and Kolzunova, L.G.: 'Effect of modification of a sulfonic cation-exchange membrane with cross-linked chitosan on the selectivity of the transport of magnesium and calcium ions relative to sodium ions', Russian Journal of Applied Chemistry, 2011, 84, (3), pp. 473-478
- 158 Bashash, S., Saeidpourazar, R., and Jalili, N.: 'Development, analysis and control of a high-speed laser-free atomic force microscope', The Review of scientific instruments, 2010, 81, (2), pp. 023797-023791
- 159 Sogias, I.A., Williams, A.C., and Khutoryanskiy, V.V.: 'Why is Chitosan Mucoadhesive?', Biomacromolecules, 2008, 9, (7), pp. 1837-1842
- 160 Bhattarai, N., Gunn, J., and Zhang, M.: 'Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery', Advanced drug delivery reviews, 2010, 62, (1), pp. 83-99
- 161 Pradines, B., Bories, C., Vauthier, C., Ponchel, G., Loiseau, P.M., and Bouchemal, K.: 'Drug-Free Chitosan Coated Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles Are Active Against *Trichomonas vaginalis* and Non-Toxic Towards Pig Vaginal Mucosa', Pharmaceutical research, 2015, 32, (4), pp. 1229-1236
- 162 Abou Taleb, M.F., Alkahtani, A., and Mohamed, S.K.: 'Radiation synthesis and characterization of sodium alginate/chitosan/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels: a drug delivery system for liver cancer', Polymer Bulletin, 2015, 72, (4), pp. 725-742

- 163 Grigoriadi, K., Giannakas, A., Ladavos, A.K., and Barkoula, N.-M.: 'Interplay between processing and performance in chitosan-based clay nanocomposite films', *Polymer Bulletin*, 2015, 72, (5), pp. 1145-1161
- 164 Teterina, A.Y., Fedotov, A.Y., Egorov, A.A., Barinov, S.M., and Komlev, V.S.: 'Microstructure formation in porous calcium phosphate-chitosan bone cements', *Inorganic Materials*, 2015, 51, (4), pp. 396-399
- 165 Vioque, A.: 'Transformation of Cyanobacteria', in León, R., Galván, A., and Fernández, E. (Eds.): 'Transgenic Microalgae as Green Cell Factories' (Springer New York, 2007), pp. 12-22
- 166 Beltrán, F.J.E., Muñoz-Saldaña, J., Torres-Torres, D., Torres-Martínez, R., and Schneider, G.A.: 'Atomic force microscopy cantilever simulation by finite element methods for quantitative atomic force acoustic microscopy measurements', *Journal of Materials Research*, 2006, 21, (12), pp. 3072-3079
- 167 Sasidharan, R.S., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M.: 'Biocompatible polyhydroxybutyrate (PHB) production by marine *Vibrio azureus* BTKB33 under submerged fermentation', *Annals of Microbiology*, 2014, 65, (1), pp. 455-465
- 168 'Василец В.Н., Зайтов Л.М., Милентьев А.Ю., Недосеев С.Л., Шварцкопф П.В., Егорова В.А., Севастьянов В.И. Создание и биологические испытания новых матриц из биорезорбируемых материалов. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2010, Т. XII, № 2, стр. 67-73.'
- 169 Wadbua, P., Promdonkoy, B., Maensiri, S., and Siri, S.: 'Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*', *International journal of biological macromolecules*, 2010, 46, (5), pp. 493-501
- 170 Ho, W.: 'Single-molecule chemistry', *The Journal of Chemical Physics*, 2002, 117, (24), pp. 11033-11061
- 171 Tanaka, K., Inoue, S., and Mizuno, S.: 'Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29, (3), pp. 269-276

- 172 Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K., and Mizuno, S.: 'Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio', *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275, (51), pp. 40517-40528
- 173 Vepari, C., and Kaplan, D.L.: 'Silk as a Biomaterial', *Prog Polym Sci*, 2007, 32, (8-9), pp. 991-1007
- 174 Gandhimathi, C., Venugopal, J.R., Tham, A.Y., Ramakrishna, S., and Kumar, S.D.: 'Biomimetic hybrid nanofibrous substrates for mesenchymal stem cells differentiation into osteogenic cells', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2015, 49, pp. 776-785
- 175 Gholami, A., Tavanai, H., and Moradi, A.R.: 'Production of fibroin nanopowder through electrospraying', *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 13, (5), pp. 2089-2098
- 176 Scherer, M.P., Frank, G., and Gummer, A.W.: 'Experimental determination of the mechanical impedance of atomic force microscopy cantilevers in fluids up to 70 kHz', *Journal of Applied Physics*, 2000, 88, (5), pp. 2912-2920
- 177 Dong, Y., Dai, F., Ren, Y., Liu, H., Chen, L., Yang, P., Liu, Y., Li, X., Wang, W., and Xiang, H.: 'Comparative transcriptome analyses on silk glands of six silkmoths imply the genetic basis of silk structure and coloration', *BMC Genomics*, 2015, 16, (1), pp. 1-14
- 178 Kim, E.Y., Tripathy, N., Park, J.Y., Lee, S.E., Joo, C.-K., and Khang, G.: 'Silk fibroin film as an efficient carrier for corneal endothelial cells regeneration', *Macromolecular Research*, 2015, 23, (2), pp. 189-195
- 179 Lawrence, B.D.: '3 - Processing of *Bombyx mori* silk for biomedical applications', in Kundu, S.C. (Ed.): 'Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine' (Woodhead Publishing, 2014), pp. 78-99
- 180 Smith, R.K., Lewis, P.A., and Weiss, P.S.: 'Patterning self-assembled monolayers', *Progress in Surface Science*, 2004, 75, (1-2), pp. 1-68
- 181 Sun, K., Li, H., Li, R., Nian, Z., Li, D., and Xu, C.: 'Silk fibroin/collagen and silk fibroin/chitosan blended three-dimensional scaffolds for tissue engineering', *European*

journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie, 2015, 25, (2), pp. 243-249

182 ‘Агапов И.И., Мойсенович М.М., Васильева Т.В., Пустовалова О.Л., Коньков А.С., Архипова А.Ю., Соколова О.С., Богуш В.Г., Севастьянов В.И., Дебабов В.Г., Кирпичников М.П. Биодegradируемые матриксы из регенерированного шелка для медицинских целей. Доклады Академии наук, 2010, том 433, № 5, с.699-702.’

183 Lian, X.-J., Wang, S., and Zhu, H.-S.: ‘Surface properties and cytocompatibility of silk fibroin films cast from aqueous solutions in different concentrations’, *Frontiers of Materials Science in China*, 2010, 4, (1), pp. 57-63

184 Wang, P., Pi, B., Wang, J.-N., Zhu, X.-S., and Yang, H.-L.: ‘Preparation and properties of calcium sulfate bone cement incorporated with silk fibroin and Sema3A-loaded chitosan microspheres’, *Frontiers of Materials Science*, 2015, 9, (1), pp. 51-65

185 Wenk, E., Wandrey, A.J., Merkle, H.P., and Meinel, L.: ‘Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery’, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2008, 132, (1), pp. 26-34

186 Vehoff, T., Glisovic, A., Schollmeyer, H., Zippelius, A., and Salditt, T.: ‘Mechanical properties of spider dragline silk: humidity, hysteresis, and relaxation’, *Biophysical journal*, 2007, 93, (12), pp. 4425-4432

187 Kluge, J.A., Rabotyagova, O., Leisk, G.G., and Kaplan, D.L.: ‘Spider silks and their applications’, *Trends in Biotechnology*, 2008, 26, (5), pp. 244-251

188 Spohner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F., and Weisshart, K.: ‘Characterization of the Protein Components of Nephila clavipes Dragline Silk†’, *Biochemistry*, 2005, 44, (12), pp. 4727-4736

189 van Beek, J.D., Hess, S., Vollrath, F., and Meier, B.H.: ‘The molecular structure of spider dragline silk: folding and orientation of the protein backbone’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99, (16), pp. 10266-10271



- 190 Rousseau, M.-E., Lefèvre, T., and Pézolet, M.: 'Conformation and Orientation of Proteins in Various Types of Silk Fibers Produced by *Nephila clavipes* Spiders', *Biomacromolecules*, 2009, 10, (10), pp. 2945-2953
- 191 Simmons, A.H., Michal, C.A., and Jelinski, L.W.: 'Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk', *Science (New York, N.Y.)*, 1996, 271, (5245), pp. 84-87
- 192 Thiel, B.L., Guess, K.B., and Viney, C.: 'Non-periodic lattice crystals in the hierarchical microstructure of spider (major ampullate) silk', *Biopolymers*, 1997, 41, (7), pp. 703-719
- 193 Cunniff, P.M., Fossey, S.A., Auerbach, M.A., Song, J.W., Kaplan, D.L., Adams, W.W., Eby, R.K., Mahoney, D., and Vezie, D.L.: 'Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*', *Polymers for Advanced Technologies*, 1994, 5, (8), pp. 401-410
- 194 Agnarsson, I., Boutry, C., and Blackledge, T.A.: 'Spider silk aging: initial improvement in a high performance material followed by slow degradation', *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, 2008, 309, (8), pp. 494-504
- 195 Osaki, S., Yamamoto, K., Kajiwara, A., and Murata, M.: 'Evaluation of the Resistance of Spider Silk to Ultraviolet Irradiation', *Polymer Journal*, 2004, 36, (8), pp. 623-627
- 196 Sapede, D., Seydel, T., Forsyth, V.T., Koza, M.M., Schweins, R., Vollrath, F., and Riekell, C.: 'Nanofibrillar Structure and Molecular Mobility in Spider Dragline Silk', *Macromolecules*, 2005, 38, (20), pp. 8447-8453
- 197 Yang, J., Barr, L.A., Fahnestock, S.R., and Liu, Z.B.: 'High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting', *Transgenic research*, 2005, 14, (3), pp. 313-324
- 198 Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A., and Conrad, U.: 'Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation', *Transgenic research*, 2004, 13, (1), pp. 51-57

- 199 Wen, H., Lan, X., Zhang, Y., Zhao, T., Wang, Y., Kajiura, Z., and Nakagaki, M.: 'Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons', *Molecular biology reports*, 2010, 37, (4), pp. 1815-1821
- 200 Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P., and Scheibel, T.: 'Structural Analysis of Spider Silk Films', *Supramolecular Chemistry*, 2006, 18, (5), pp. 465-471
- 201 Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J.F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E.A., Soares, J.W., and Karatzas, C.N.: 'Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells', *Science (New York, N.Y.)*, 2002, 295, (5554), pp. 472-476
- 202 Grip, S., Johansson, J., and Hedhammar, M.: 'Engineered disulfides improve mechanical properties of recombinant spider silk', *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2009, 18, (5), pp. 1012-1022
- 203 Rabotyagova, O.S., Cebe, P., and Kaplan, D.L.: 'Self-assembly of genetically engineered spider silk block copolymers', *Biomacromolecules*, 2009, 10, (2), pp. 229-236
- 204 Hauptmann, V., Menzel, M., Weichert, N., Reimers, K., Spohn, U., and Conrad, U.: 'In planta production of ELPylated spidroin-based proteins results in non-cytotoxic biopolymers', *BMC biotechnology*, 2015, 15, (1), pp. 1-14
- 205 'M.M. Moisenovich, O.L. Pustovalova, A.Yu. Arhipova, T.V. Vasiljeva, O.S. Sokolova, V.G. Bogush, V.G. Debabov, V.I. Sevastianov, M.P. Kirpichnikov, I.I. Agapov In vitro and In vivo Biocompatibility Studies of a Recombinant Analogue of Spidroin 1 Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Research*, 2010, Part A, V. 96A, №1, PP. 125-131.'
- 206 Al-Zoreky, N., and Al-Otaibi, M.: 'Suitability of camel milk for making yogurt', *Food Sci Biotechnol*, 2015, 24, (2), pp. 601-606
- 207 Shibukawa, Y., Sato, M., Kimura, M., Sobhan, U., Shimada, M., Nishiyama, A., Kawaguchi, A., Soya, M., Kuroda, H., Katakura, A., Ichinohe, T., and Tazaki, M.: 'Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal

transduction', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2015, 467, (4), pp. 843-863

208 Zhang, X.-Z., Tian, F.-J., Hou, Y.-M., and Ou, Z.-H.: 'Preparation and in vitro in vivo characterization of polyelectrolyte alginate–chitosan complex based microspheres loaded with verapamil hydrochloride for improved oral drug delivery', *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2015, 81, (3-4), pp. 429-440

209 Perets, A., Baruch, Y., Weisbuch, F., Shoshany, G., Neufeld, G., and Cohen, S.: 'Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres', *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2003, 65, (4), pp. 489-497

210 Qiao, P.-y., Li, F.-f., Dong, L.-m., Xu, T., and Xie, Q.-f.: 'Delivering MC3T3-E1 cells into injectable calcium phosphate cement through alginate-chitosan microcapsules for bone tissue engineering', *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2014, 15, (4), pp. 382-392

211 Orive, G., Tam, S.K., Pedraz, J.L., and Hallé, J.-P.: 'Biocompatibility of alginate–poly-l-lysine microcapsules for cell therapy', *Biomaterials*, 2006, 27, (20), pp. 3691-3700

212 Heywood, H.K., Sembi, P.K., Lee, D.A., and Bader, D.L.: 'Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs', *Tissue engineering*, 2004, 10, (9-10), pp. 1467-1479

213 'Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Шмерко Н.П., Андриянова А.А., Аврамов П.В., Немец Е.А., Севастьянов В.И., Готье С.В. Выживание клеток печени, иммобилизованных на 3D-матриксах, при моделировании печеночной недостаточности. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2011, Т. XIII, № 3, стр. 59-66.'

214 'Сургученко В.А., Пономарева А.С., Ефимов А.Е., Немец Е.А., Агапов И.И., Севастьянов В.И. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2012, № 1, стр. 72-77.'

- 215 Frederiksen, K., Guy, R.H., and Petersson, K.: 'Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin', *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2015, 91, pp. 9-15
- 216 'В. И. Севастьянов, Е. А. Немец, В. П. Столяров, В. А. Баранов, Н. Н. Божко, В. Г. Назаров. Сравнительное исследование влияния некоторых методов модификации поверхности пленок полиэтилена на взаимодействие с компонентами крови. Перспективные материалы, 2010, № 4, стр. 41-48. '
- 217 da Silva, L.C.E., Bertran, C.A., and Gonçalves, M.C.: 'Water vapor-induced formation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) membranes for guided bone regeneration', *Journal of Materials Science*, 2015, 50, (11), pp. 4122-4131
- 218 Thorngkham, P., Paradee, N., Niamlang, S., and Sirivat, A.: 'Permeation Study of Indomethacin from Polycarbazole/Natural Rubber Blend Film for Electric Field Controlled Transdermal Delivery', *Journal of pharmaceutical sciences*, 2015, 104, (5), pp. 1795-1803
- 219 Nair, R.S., and Nair, S.: 'Permeation Studies Of Captopril Transdermal Films Through Human Cadaver Skin', *Curr Drug Deliv*, 2015
- 220 Ramineni, S.K., Fowler, C.B., Fisher, P.D., Cunningham, L.L., and Puleo, D.A.: 'Effects of epidermal growth factor-loaded mucoadhesive films on wounded oral tissue rafts', *Biomedical materials*, 2015, 10, (1), pp. 015026
- 221 Song, H., Yin, L., Chilian, W.M., and Zhang Newby, B.M.: 'Dewetting based fabrication of fibrous micro-scaffolds as potential injectable cell carriers', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2015, 48, pp. 663-672
- 222 Aubry, P., Brochet, E., du Fretay, X.H., Bouton-Brochet, S., Ibrahim, H., Arrault, X., Hvass, U., and Juliard, J.M.: 'Early malfunction of polyvinyl alcohol membrane-covered atrial septal defect closure devices', *Circulation. Cardiovascular interventions*, 2014, 7, (5), pp. 721-722
- 223 Hujaya, S.D., Marchioli, G., Roelofs, K., van Apeldoorn, A.A., Moroni, L., Karperien, M., Paulusse, J.M., and Engbersen, J.F.: 'Poly(amido amine)-based multilayered thin films on 2D and 3D supports for surface-mediated cell transfection',

Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2015, 205, pp. 181-189

224 Kaizawa, Y., Kakinoki, R., Ikeguchi, R., Ohta, S., Noguchi, T., Oda, H., and Matsuda, S.: 'Bridging a 30 mm defect in the canine ulnar nerve using vessel-containing conduits with implantation of bone marrow stromal cells', *Microsurgery*, 2015

225 Zhang, P., Wang, Z., Kou, Y., Han, N., Xu, C., Yin, X., Wang, Y., and Feng, X.: 'Role of lumbricus extract in the nerve amplification effect during peripheral nerve regeneration', *American journal of translational research*, 2014, 6, (6), pp. 876-885

226 Dikina, A.D., Strobel, H.A., Lai, B.P., Rolle, M.W., and Alsberg, E.: 'Engineered cartilaginous tubes for tracheal tissue replacement via self-assembly and fusion of human mesenchymal stem cell constructs', *Biomaterials*, 2015, 52, pp. 452-462

227 Eguchi, Y., Ohtori, S., Sekino, M., and Ueno, S.: 'Effectiveness of magnetically aligned collagen for neural regeneration in vitro and in vivo', *Bioelectromagnetics*, 2015, 36, (3), pp. 233-243

228 Yamanaka, T., Hosoi, H., Murai, T., Kobayashi, T., Inada, Y., and Nakamura, T.: 'Regeneration of the nerves in the aerial cavity with an artificial nerve conduit - reconstruction of chorda tympani nerve gaps', *PloS one*, 2014, 9, (4), pp. e92258

229 Liang, J.H., Zhou, X., Peng, P.X., Zheng, Z.B., and Yu, X.L.: '[Experimental study of replacement of an esophageal segment with an nitinol alloy composite artificial esophagus]', *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 2006, 44, (14), pp. 952-955

230 Liang, X.L., and Liang, J.H.: 'Effect of Slip Time in Forming Neo-Esophageal Stenosis After Replacement of a Thoracic Esophagus With Nitinol Artificial Esophagus', *Artificial organs*, 2015, 39, (7), pp. 607-614

231 Liang, J.H., Zhou, X., Zheng, Z.B., and Liang, X.L.: 'Polyester connecting ring improves outcome in nitinol composite artificial esophagus', *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 2009, 55, (5), pp. 514-518

232 Yunoki, S., Hatayama, H., Ebisawa, M., Kondo, E., and Yasuda, K.: 'A novel fabrication method to create a thick collagen bundle composed of uniaxially aligned

fibrils: An essential technology for the development of artificial tendon/ligament matrices', *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103, (9), pp. 3054-3065

233 Xu, X., Huang, T., Liu, Z., Wen, H., Ye, L., Hu, Y., Yu, H., and Pan, X.: 'Hamstring tendon autograft versus LARS artificial ligament for arthroscopic posterior cruciate ligament reconstruction in a long-term follow-up', *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2014, 134, (12), pp. 1753-1759

234 Jiang, J., Wan, F., Yang, J., Hao, W., Wang, Y., Yao, J., Shao, Z., Zhang, P., Chen, J., Zhou, L., and Chen, S.: 'Enhancement of osseointegration of polyethylene terephthalate artificial ligament by coating of silk fibroin and depositing of hydroxyapatite', *International journal of nanomedicine*, 2014, 9, pp. 4569-4580

235 Oryan, A., Moshiri, A., and Meimandi-Parizi, A.: 'Role of embedded pure xenogenous bovine platelet gel on experimental tendon healing, modelling and remodelling', *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 2014, 28, (6), pp. 537-556

236 Kocsis, G., McCulloch, T.A., Thyagarajan, D., and Wallace, W.A.: 'The biological response to a failed extra-articular polyester ligament used for AC Joint reconstruction at the shoulder girdle: a retrieval analysis of five cases', *The bone & joint journal*, 2015, 97-b, (1), pp. 83-88

237 Finosh, G.T., Jayabalan, M., Vandana, S., and Raghu, K.G.: 'Hybrid alginate-polyester bimodal network hydrogel for tissue engineering - Influence of structured water on long-term cellular growth', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2015

238 Ming, J., Jiang, Z., Wang, P., Bie, S., and Zuo, B.: 'Silk fibroin/sodium alginate fibrous hydrogels regulated hydroxyapatite crystal growth', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2015, 51, pp. 287-293

239 Oh, D.X., Kim, S., Lee, D., and Hwang, D.S.: 'Tunicate-mimetic nanofibrous hydrogel adhesive with improved wet adhesion', *Acta biomaterialia*, 2015, 20, (0), pp. 104-112

240 Morales-Hurtado, M., Zeng, X., Gonzalez-Rodriguez, P., Ten Elshof, J.E., and van der Heide, E.: 'A new water absorbable mechanical Epidermal skin equivalent: The

combination of hydrophobic PDMS and hydrophilic PVA hydrogel', *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2015, 46, pp. 305-317

241 Leng, X., Liu, B., Su, B., Liang, M., Shi, L., Li, S., Qu, S., Fu, X., Liu, Y., Yao, M., Kaplan, D.L., Wang, Y., and Wang, X.: 'In situ ultrasound imaging of silk hydrogel degradation and neovascularization', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2015

242 Tajdaran, K., Shoichet, M.S., Gordon, T., and Borschel, G.H.: 'A novel polymeric drug delivery system for localized and sustained release of tacrolimus (FK506)', *Biotechnology and bioengineering*, 2015, 112, (9), pp. 1948-1953

243 Zehnder, T., Sarker, B., Boccaccini, A.R., and Detsch, R.: 'Evaluation of an alginate-gelatine crosslinked hydrogel for bioplotting', *Biofabrication*, 2015, 7, (2), pp. 025001

244 Stevens, K.R., Miller, J.S., Blakely, B.L., Chen, C.S., and Bhatia, S.N.: 'Degradable hydrogels derived from PEG-diacrylamide for hepatic tissue engineering', *J Biomed Mater Res A*, 2015

245 'Кирсанова Л.А., Баранова Н.В., Бубенцова Г.Н., Скалецкая Г.Н., Перова Н.В., Севастьянов В.И., Скалецкий Н.Н., Влияние микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля на культуры островковых клеток поджелудочной железы. Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2014, №1, С. 29-33'

246 'Севастьянов В. И., Духина Г. А., Григорьев А. М., Перова Н. В., Кирсанова Л. А., Скалецкий Н. Н., Ахаладзе Д. Г., Готье С. В. Функциональная эффективность биомедицинского клеточного продукта для регенерации суставного хряща (экспериментальная модель остеоартроза). Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2015; 17(1): 86-96.'

247 Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., and Couvreur, P.: 'Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery', *Chemical Society reviews*, 2013, 42, (3), pp. 1147-1235

- 248 Yadav, S., Rai, V., Mahato, M., Singh, M., Deka, S.R., and Sharma, A.K.: 'Vitamin E-TPGS stabilized self-assembled tripeptide nanostructures for drug delivery', *Current topics in medicinal chemistry*, 2015, 15, (13), pp. 1227-1235
- 249 Caldorera-Moore, M.E., Liechty, W.B., and Peppas, N.A.: 'Responsive Theranostic Systems: Integration of Diagnostic Imaging Agents and Responsive Controlled Release Drug Delivery Carriers', *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44, (10), pp. 1061-1070
- 250 'Богородский С.Э., Кротова Л.И., Минаева С.А., Мишаков Г.В., Попов В.К., Басок Ю.Б., Севастьянов В.И. Сверхкритическая флюидная микронизация и инкапсуляция ибупрофена в микрочастицы алифатических полиэфиров. Перспективные материалы, 2013, №1, с. 23-32.'
- 251 Yoshida, T., Lai, T.C., Kwon, G.S., and Sako, K.: 'pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery', *Expert opinion on drug delivery*, 2013, 10, (11), pp. 1497-1513
- 252 Hu, J., Zhang, G., and Liu, S.: 'Enzyme-responsive polymeric assemblies, nanoparticles and hydrogels', *Chemical Society reviews*, 2012, 41, (18), pp. 5933-5949
- 253 Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H.A., and Zhong, Z.: 'Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery', *Biomaterials*, 2013, 34, (14), pp. 3647-3657
- 254 Wang, L., Hao, Y., Li, H., Zhao, Y., Meng, D., Li, D., Shi, J., Zhang, H., Zhang, Z., and Zhang, Y.: 'Co-delivery of doxorubicin and siRNA for glioma therapy by a brain targeting system: angiopep-2-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles', *Journal of drug targeting*, 2015, pp. 1-15
- 255 Hermanson, K.D., Huemmerich, D., Scheibel, T., and Bausch, A.R.: 'Engineered Microcapsules Fabricated from Reconstituted Spider Silk', *Advanced Materials*, 2007, 19, (14), pp. 1810-1815
- 256 Homar, M., Suligoj, D., and Gasperlin, M.: 'Preparation of microcapsules with self-microemulsifying core by a vibrating nozzle method', *Journal of microencapsulation*, 2007, 24, (1), pp. 72-81



- 257 Chan, O.C., So, K.F., and Chan, B.P.: 'Fabrication of nano-fibrous collagen microspheres for protein delivery and effects of photochemical crosslinking on release kinetics', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2008, 129, (2), pp. 135-143
- 258 Rasey, J.S., Cornwell, M.M., Maurer, B.J., Boyles, D.J., Hofstrand, P., Chin, L., and Cervený, C.: 'Growth and radiation response of cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-G)', *The British journal of cancer. Supplement*, 1996, 27, pp. S78-81
- 259 Hayashi, K., and Tabata, Y.: 'Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions', *Acta biomaterialia*, 2011, 7, (7), pp. 2797-2803
- 260 Bellas, E., Lo, T.J., Fournier, E.P., Brown, J.E., Abbott, R.D., Gil, E.S., Marra, K.G., Rubin, J.P., Leisk, G.G., and Kaplan, D.L.: 'Injectable silk foams for soft tissue regeneration', *Advanced healthcare materials*, 2015, 4, (3), pp. 452-459
- 261 'Богородский С.Э., Василец В.Н., Кротова Л.И., Минаева С.А., Миронов А.В., Немец Е.А., Сургученко В.А., Попов В.К., Севастьянов В.И. Формирование биоактивных высокопористых полимерных матриц для тканевой инженерии. Перспективные материалы, 2013, №5, с. 44-54.'
- 262 Stoppel, W.L., Hu, D., Domian, I.J., Kaplan, D.L., and Black, L.D.: 'Anisotropic silk biomaterials containing cardiac extracellular matrix for cardiac tissue engineering', *Biomedical materials*, 2015, 10, (3), pp. 034105
- 263 Chen, C.Y., Ke, C.J., Yen, K.C., Hsieh, H.C., Sun, J.S., and Lin, F.H.: '3D Porous Calcium-Alginate Scaffolds Cell Culture System Improved Human Osteoblast Cell Clusters for Cell Therapy', *Theranostics*, 2015, 5, (6), pp. 643-655
- 264 Pot, M.W., Faraj, K.A., Adawy, A., van Enckevort, W.J., van Moerkerk, H.T., Vlieg, E., Daamen, W.F., and van Kuppevelt, T.H.: 'Versatile wedge-based system for the construction of unidirectional collagen scaffolds by directional freezing: practical and theoretical considerations', *ACS applied materials & interfaces*, 2015, 7, (16), pp. 8495-8505

- 265 Luo, Z., Jiang, L., Xu, Y., Li, H., Xu, W., Wu, S., Wang, Y., Tang, Z., Lv, Y., and Yang, L.: 'Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)-beta3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model', *Biomaterials*, 2015, 52, pp. 463-475
- 266 Cai, R., Nakamoto, T., Kawazoe, N., and Chen, G.: 'Influence of stepwise chondrogenesis-mimicking 3D extracellular matrix on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells', *Biomaterials*, 2015, 52, pp. 199-207
- 267 Gao, Z., Wu, T., Xu, J., Liu, G., Xie, Y., Zhang, C., Wang, J., and Wang, S.: 'Generation of Bioartificial Salivary Gland Using Whole-Organ Decellularized Bioscaffold', *Cells Tissues Organs*, 2015
- 268 Bogorodskii, S.E., Vasilets, V.N., Krotova, L.I., Minaeva, S.A., Mironov, A.V., Nemets, E.A., Surguchenko, V.A., Popov, V.K., and Sevast'yanov, V.I.: 'Formation of bioactive highly porous polymer matrixes for tissue engineering', *Inorg. Mater. Appl. Res.*, 2013, 4, (5), pp. 448-456
- 269 Hou, Q., Grijpma, D.W., and Feijen, J.: 'Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique', *Biomaterials*, 2003, 24, (11), pp. 1937-1947
- 270 Mandal, B.B., and Kundu, S.C.: 'Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds', *Biomaterials*, 2009, 30, (15), pp. 2956-2965
- 271 Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D.L.: 'Silk-based biomaterials', *Biomaterials*, 2003, 24, (3), pp. 401-416
- 272 Haugh, M.G., Murphy, C.M., and O'Brien, F.J.: 'Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes', *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16, (5), pp. 887-894
- 273 Zarkoob, S., Eby, R.K., Reneker, D.H., Hudson, S.D., Ertley, D., and Adams, W.W.: 'Structure and morphology of electrospun silk nanofibers', *Polymer*, 2004, 45, (11), pp. 3973-3977
- 274 Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G., and Bowlin, G.L.: 'Electrospinning of Collagen Nanofibers', *Biomacromolecules*, 2002, 3, (2), pp. 232-238

- 275 Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., and Yamamoto, H.: 'Electrospinning of Chitosan', *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25, (18), pp. 1600-1605
- 276 Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., and Ramakrishna, S.: 'Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds', *Tissue Eng*, 2005, 11, (1-2), pp. 101-109
- 277 Jakab, K., Norotte, C., Damon, B., Marga, F., Neagu, A., Besch-Williford, C.L., Kachurin, A., Church, K.H., Park, H., Mironov, V., Markwald, R., Vunjak-Novakovic, G., and Forgacs, G.: 'Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures', *Tissue Eng Part A*, 2008, 14, (3), pp. 413-421
- 278 Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E., and Forgacs, G.: 'Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting', *Biomaterials*, 2009, 30, (30), pp. 5910-5917
- 279 Murphy, S.V., and Atala, A.: '3D bioprinting of tissues and organs', *Nat Biotech*, 2014, 32, (8), pp. 773-785
- 280 Wang, Q., Xia, Q., Wu, Y., Zhang, X., Wen, F., Chen, X., Zhang, S., Heng, B.C., He, Y., and Ouyang, H.W.: '3D-Printed Atsttrin-Incorporated Alginate/Hydroxyapatite Scaffold Promotes Bone Defect Regeneration with TNF/TNFR Signaling Involvement', *Adv Healthc Mater*, 2015, 4, (11), pp. 1701-1708
- 281 Arenas-Herrera, J.E., Ko, I.K., Atala, A., and Yoo, J.J.: 'Decellularization for whole organ bioengineering', *Biomed Mater*, 2013, 8, (1), pp. 014106
- 282 Nakayama, K.H., Batchelder, C.A., Lee, C.I., and Tarantal, A.F.: 'Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal Tissue Engineering', *Tissue engineering. Part A*, 2010, 16, (7), pp. 2207-2216
- 283 Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I., and Taylor, D.A.: 'Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart', *Nat Med*, 2008, 14, (2), pp. 213-221
- 284 Petersen, T.H., Calle, E.A., Colehour, M.B., and Niklason, L.E.: 'Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds', *Cells, tissues, organs*, 2012, 195, (3), pp. 222-231
- 285 Baptista, P.M., Siddiqui, M.M., Lozier, G., Rodriguez, S.R., Atala, A., and Soker, S.: 'The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid', *Hepatology*, 2011, 53, (2), pp. 604-617

- 286 Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., Milwid, J., Kobayashi, N., Tilles, A., Berthiaume, F., Hertl, M., Nahmias, Y., Yarmush, M.L., and Uygun, K.: 'Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix', *Nat Med*, 2010, 16, (7), pp. 814-820
- 287 Zheng, X.L., Xiang, J.X., Wu, W.Q., Liu, X.M., Liu, W.Y., and Lv, Y.: '[Preparation of a decellularized scaffold derived from human liver tissue]', *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015, 35, (7), pp. 1028-1033
- 288 Gardin, C., Ricci, S., Ferroni, L., Guazzo, R., Sbricoli, L., De Benedictis, G., Finotti, L., Isola, M., Bressan, E., and Zavan, B.: 'Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures', *PLoS One*, 2015, 10, (7), pp. e0132344
- 289 Park, K.M., and Woo, H.M.: 'Systemic decellularization for multi-organ scaffolds in rats', *Transplant Proc*, 2012, 44, (4), pp. 1151-1154
- 290 Mosmann, T.: 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J Immunol Methods*, 1983, 65, (1-2), pp. 55-63
- 291 Matsko, N., and Mueller, M.: 'AFM of biological material embedded in epoxy resin', *Journal of structural biology*, 2004, 146, (3), pp. 334-343
- 292 Efimov, A.E., Gnaegi, H., Schaller, R., Grogger, W., Hofer, F., and Matsko, N.B.: 'Analysis of native structures of soft materials by cryo scanning probe tomography', *Soft Matter*, 2012, 8, (38), pp. 9756-9760
- 293 Bleeker, M.A., Smid, H.M., Van Aelst, A.C., Van Loon, J.J., and Vet, L.E.: 'Antennal sensilla of two parasitoid wasps: a comparative scanning electron microscopy study', *Microscopy research and technique*, 2004, 63, (5), pp. 266-273
- 294 Shirakigawa, N., Ijima, H., and Takei, T.: 'Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering', *Journal of bioscience and bioengineering*, 2012, 114, (5), pp. 546-551

- 295 Gao, J., Crapo, P.M., and Wang, Y.: 'Macroporous elastomeric scaffolds with extensive micropores for soft tissue engineering', *Tissue engineering*, 2006, 12, (4), pp. 917-925
- 296 Ho, M.H., Kuo, P.Y., Hsieh, H.J., Hsien, T.Y., Hou, L.T., Lai, J.Y., and Wang, D.M.: 'Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods', *Biomaterials*, 2004, 25, (1), pp. 129-138
- 297 Zong, X., Bien, H., Chung, C.Y., Yin, L., Fang, D., Hsiao, B.S., Chu, B., and Entcheva, E.: 'Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs', *Biomaterials*, 2005, 26, (26), pp. 5330-5338
- 298 Boerckel, J.D., Mason, D.E., McDermott, A.M., and Alsberg, E.: 'Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering', *Stem cell research & therapy*, 2014, 5, (6), pp. 144
- 299 Wang, Q., Chen, Q., Yang, Y., and Shao, Z.: 'Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin', *Biomacromolecules*, 2013, 14, (1), pp. 285-289
- 300 Sokolova, O.S., Bogush, V.G., Davydova, L.I., Polevova, S.V., Antonov, S.A., Neretina, T.V., Klinov, D.V., Debabov, V.G., and Kirpichnikov, M.P.: 'The formation of a quaternary structure by recombinant analogs of spider silk proteins', *Molecular Biology*, 2010, 44, (1), pp. 150-157
- 301 Wang, S., Kowal, T.J., Marei, M.K., Falk, M.M., and Jain, H.: 'Nanoporosity significantly enhances the biological performance of engineered glass tissue scaffolds', *Tissue engineering. Part A*, 2013, 19, (13-14), pp. 1632-1640
- 302 Lee, Y.J., Elosegui-Artola, A., Le, K.H.T., and Kim, G.-M.: 'Morphological Cues for Regulation of Cell Adhesion and Motility with Tailored Electrospun Scaffolds of PCL and PCL/PVP Blends', *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2013, 6, (4), pp. 482-495
- 303 Ketabchi, A., Komm, K., Miles-Rossouw, M., Cassani, D.A., and Variola, F.: 'Nanoporous titanium surfaces for sustained elution of proteins and antibiotics', *PLoS one*, 2014, 9, (3), pp. e92080

- 304 Yao, L., Phan, F., and Li, Y.: 'Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro', *Stem cell research & therapy*, 2013, 4, (5), pp. 1-8
- 305 Balakrishnan, B., and Jayakrishnan, A.: 'Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds', *Biomaterials*, 2005, 26, (18), pp. 3941-3951
- 306 Sun, J., and Tan, H.: 'Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications', *Materials*, 2013, 6, (4), pp. 1285-1309
- 307 Dhoot, N.O., Tobias, C.A., Fischer, I., and Wheatley, M.A.: 'Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth', *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2004, 71, (2), pp. 191-200
- 308 Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F.: 'Decellularization of tissues and organs', *Biomaterials*, 2006, 27, (19), pp. 3675-3683
- 309 Koning, R.I., and Koster, A.J.: 'Cryo-electron tomography in biology and medicine', *Ann Anat*, 2009, 191, (5), pp. 427-445
- 310 Tokuyasu, K.T.: 'A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues', *J Cell Biol*, 1973, 57, (2), pp. 551-565
- 311 Akiyama, T., Suter, K., Rooij, N.F.d., Baumgartner, A., Gildemeister, A.E., Ihn, T., Ensslin, K., and Staufer, U.: 'Scanning Probe with Tuning Fork Sensor, Microfabricated Silicon Cantilever and Conductive Tip for Microscopy at Cryogenic Temperature', *Japanese Journal of Applied Physics*, 2006, 45, (3S), pp. 1992
- 312 Akiyama, T., Staufer, U., and de Rooij, N.F.: 'Self-sensing and self-actuating probe based on quartz tuning fork combined with microfabricated cantilever for dynamic mode atomic force microscopy', *Applied Surface Science*, 2003, 210, (1-2), pp. 18-21
- 313 'Мисуркин П.И., Аксёнова Н.А., Тимашев П.С., Тимофеева В.А., Соловьёва А.Б. Параметризация хаотического рельефа поверхностей по данным атомно-силовой микроскопии, *Российский химический журнал*. 2009. Т. LIII. № 6. С. 84-92'

- 314 Mirsaidov, U., Timashev, S.F., Polyakov, Y.S., Misurkin, P.I., Musaev, I., and Polyakov, S.V.: 'Analytical method for parameterizing the random profile components of nanosurfaces imaged by atomic force microscopy', *Analyst*, 2011, 136, (3), pp. 570-576
- 315 Balakrishnan, B., Mohanty, M., Umashankar, P.R., and Jayakrishnan, A.: 'Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin', *Biomaterials*, 2005, 26, (32), pp. 6335-6342
- 316 Liu, X., Jin, X., and Ma, P.X.: 'Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair', *Nat Mater*, 2011, 10, (5), pp. 398-406
- 317 Khanna, O., Larson, J.C., Moya, M.L., Opara, E.C., and Brey, E.M.: 'Generation of Alginate Microspheres for Biomedical Applications', *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2012, (66), pp. 3388