

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-4-115-122

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРО- И НАНОСТРУКТУРЫ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НА БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СКАФФОЛДАХ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА, МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

О.И. Агапова, А.Е. Ефимов, Л.А. Сафонова, М.М. Боброва, И.И. Агапов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Провести анализ трехмерной микро- и наноструктуры и количественных морфологических параметров клеток печени, культивированных на биodeградируемых скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. **Материалы и методы.** Для исследования, были получены образцы биodeградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка с культивированными клетками печени крысы породы Wistar. Изучение трехмерной структуры клеток печени, культивированных на скаффолдах, было выполнено методом сканирующей зондовой оптической нанотомографии при помощи экспериментальной установки, объединяющей ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп в корреляции с флуоресцентной микроскопией. **Результаты.** Получены наномасштабные изображения и трехмерные нанотомографические реконструкции участков клеток печени крысы, культивированных на скаффолде. Определены морфологические параметры клеток печени: средняя шероховатость, удельная эффективная площадь. Установлено, что средняя шероховатость поверхности клеток печени R_a составляет $124,8 \pm 8,2$ нм, в то время как эффективная площадь поверхности σ составляет $1,13 \pm 0,02$. Анализ объемного распределения липидных капель показал, что они занимают 28% объема клетки. **Выводы.** Полученные в результате исследования данные демонстрируют, что технология сканирующей зондовой оптической нанотомографии позволяет успешно анализировать наноструктуру и определять количественные характеристики наноморфологии клеток печени, культивированных на биodeградируемых скаффолдах.

Ключевые слова: клетки печени, биodeградируемые скаффолды, фиброин шелка, сканирующая зондовая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, нанотомография.

INVESTIGATION OF THE MICRO- AND NANO-STRUCTURE OF LIVER CELLS CULTURED ON BIODEGRADABLE SILK FIBROIN-BASED SCAFFOLDS USING SCANNING PROBE OPTICAL NANOTOMOGRAPHY

O.I. Agapova, A.E. Efimov, L.A. Safonova, M.M. Bobrova, I.I. Agapov

Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Objective: to analyze the 3D micro- and nano-structure and quantitative morphological parameters of liver cells cultured on biodegradable silk fibroin-based film scaffolds. **Materials and methods.** Samples of biodegradable silk fibroin-based scaffolds with cultured Wistar rat liver cells were obtained for the study. The 3D structure of liver cells cultivated on the scaffolds was studied by scanning probe optical nanotomography using an experimental setup combining an ultramicrotome and a scanning probe microscope in correlation with fluorescence

Для корреспонденции: Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

Corresponding author: Igor Agapov. Address: 1, Shchukinskaya str., 123182, Moscow, Russian Federation. Phone: (499) 190-66-19. E-mail: igor_agapov@mail.ru

microscopy. **Results.** Nanoscale images and 3D nanotomographic reconstructions of rat liver cells cultured on scaffold were obtained. The morphological parameters of liver cells (average roughness, specific effective area) were determined. The average surface roughness of the liver cells R_a was found to be 124.8 ± 8.2 nm, while the effective surface area σ was 1.13 ± 0.02 . Analysis of the volume distribution of lipid droplets showed that they occupy 28% of the cell volume. **Conclusion.** Scanning probe optical nanotomography can successfully analyze the nanostructure and quantify the nanomorphology of liver cells cultured on biodegradable scaffolds.

Keywords: liver cells, biodegradable scaffolds, silk fibroin, scanning probe microscopy, fluorescence microscopy, nanotomography.

ВВЕДЕНИЕ

Задачи современной трансплантологии включают в себя поиск новых материалов для создания скаффолдов с повышенными адгезионными свойствами для разработки конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицины. При решении данных задач необходимо использование новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных особенностей конструкций и клеток в их составе, а также параметров взаимодействия клеток с поверхностью конструкций на микро- и наноуровне.

Комбинирование различных методик микроскопии (электронной микроскопии, сканирующей зондовой микроскопии, оптической микроспектроскопии высокого разрешения) позволяет проводить коррелятивные исследования микро- и наноструктур с высоким разрешением [1]. Информация, получаемая в ходе анализа с помощью различных микроскопических технологий, позволяет комплексно охарактеризовать структуру биологических объектов и получить новые знания об их свойствах [2].

Одним из наиболее востребованных направлений в этой области является разработка методов и подходов для анализа трехмерной микро- и наноструктуры биоматериалов, биологических объектов и тканеинженерных конструкций, которые позволили бы получать коррелятивную информацию как о наноморфологии, так и о биологической структуре изучаемых объектов.

Уникальная методика сканирующей оптической зондовой нанотомографии (СОЗНТ) позволяет объединить функциональные возможности сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) и ультрамикротомы и в одном устройстве в корреляции с методами флуоресцентной оптической микроскопии [3, 4]. Использование методики СОЗНТ позволяет изучать трехмерную наноструктуру биоматериалов, клеток, тканей и тканеинженерных конструкций в корреляции с исследованием локализации флуоресцентных маркеров в объеме измеряемых образцов. Анализ получаемых трехмерных реконструкций структуры биологических объектов и материалов позволяет количественно определять такие важные параметры их наноморфологии, как микро- и нанопористость [5], эффективную площадь и шероховатость

поверхности [6], отношение площади поверхности к объему [7].

В качестве объектов настоящего исследования были выбраны биodeградируемые скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок с культивированными клетками печени крысы.

Фиброин шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* является одним из перспективных материалов для тканевой инженерии. Данный биополимер не только удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к материалам в регенеративной медицине, но и обладает рядом преимуществ перед другими материалами. Его биосовместимость, оптимальные механические свойства, биodeградируемость обеспечивают возможное применение во многих областях регенеративной медицины, как в качестве самостоятельного материала, так и в качестве компонента различных композитов на его основе [8]. Все эти свойства позволяют получать из него двухмерные и трехмерные конструкции для различных целей [9–11].

В настоящее время рассматривается множество материалов, которые можно эффективно использовать для изготовления скаффолдов для культивирования клеток печени. Известны материалы, покрытия из которых поддерживают адгезию гепатоцитов, но формирование конструкций из них сопряжено с трудностями. К таким материалам, например, относятся хитозан, желатин, коллаген и др. Фиброин шелка привлекает внимание исследователей, так как сам по себе поддерживает адгезию и пролиферацию гепатоцитов, а также имеет подходящие механические свойства [12]. Фиброин также может применяться в составе композитных материалов. К примеру, трехмерные пористые скаффолды, изготовленные из фиброина и хитозана, смешанных в различных соотношениях, поддерживают адгезию и пролиферацию клеток гепатокарциномы человека *in vitro*, причем адгезивная способность клеток на скаффолдах гораздо выше, чем на контрольном субстрате [13]. Скаффолды аналогичного состава, изготовленные с применением технологии электроспиннинга, также были использованы для культивирования гепатоцитов мыши [12].

В рамках данной работы выполнены исследования микро- и наноструктуры клеток печени крысы,

адгезированных на биodeградируемых скаффолдах на основе фиброина шелка в виде пленок. Подобное исследование для данных типов клеток с использованием технологии СЗОНТ выполнено впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление скаффолдов для клеток в виде пленок на основе фиброина тутового шелкопряда *Bombyx mori*

Фиброин для изготовления скаффолдов для клеток в виде пленок выделяли из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для этого взвешивали 1 г нитей шелка, разрезали нити на фрагменты по 0,5 см. Кипятили на водяной бане в течение 40 минут в растворе с добавлением двууглекислого натрия для очистки нитей от серицина и других примесей. Затем промывали 3600 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 раза по 30 минут в бидистиллированной воде, промывая после каждого кипячения дистиллированной водой, после чего высушивали в сушильном шкафу.

Для получения водного раствора фиброина в раствор, приготовленный из расчета 389 мг CaCl_2 , 388 мкл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 544 мкл H_2O на 1 мл раствора, вносили навеску фиброина массой 130 мг/мл. Нагревали на водяной бане при 40 °С в течение 4 часов. После этого производили диализ раствора против бидистиллированной воды. Оптическую плотность раствора фиброина шелка в полученном после диализа растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, затем рассчитывали концентрацию по формуле $D = ECL$, где E – коэффициент экстинкции фиброина шелка, равный 1,07.

Далее водный раствор фиброина шелка, полученный по описанной выше методике, наносили на дно чашки Петри и высушивали при комнатной температуре. Высушенный фиброин шелка растворяли в муравьиной кислоте из расчета 20 мг/мл при нагревании до 40 °С на водяной бане в течение 30 минут. Полученный раствор центрифугировали 5 минут при 12 100 g.

Образцы биodeградируемых скаффолдов в виде пленок из фиброина шелка были получены методом полива. Для изготовления пленки 150 мкл раствора заданного состава наносили на дно лунок 48-луночного культурального планшета и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре. Общая концентрация белка в пленке составляла 20 мг/мл. После высыхания раствора фиброина в лунки планшета наносили по 100 мкл раствора фибронектина с концентрацией 10 мкг/мл и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре.

Перед культивированием клеток скаффолды в виде пленок подвергали стерилизации: обрабаты-

ли 70% этанолом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом в течение 30 минут. После этого в лунки планшета вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру повторяли три раза. Далее в лунки планшета вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

Подготовка образцов клеток печени крысы породы Wistar, культивированных на скаффолдах из фиброина шелка, для исследований методами сканирующей зондовой оптической нанотомографии

Выделение клеток печени крысы производили следующим образом. В эксперименте использовали самцов крыс возрастом 1 год породы Wistar (вес особи 250–350 г). Крысу усыпляли при помощи ингаляционного наркоза с применением диэтилового эфира. Далее крысу помещали брюхом вверх на операционный стол и расправляли лапы. Пинцетом, оттягивая кожу на брюхе, ножницами делали продольный разрез кожи на средней линии брюшной стороны тела от полового отверстия до грудины. Кожу отворачивали и закрепляли. Затем вскрывали брюшную полость, сделав продольный разрез по средней линии, мышечные лоскуты отворачивали в стороны. Производили забор печени, отсекая полые вены, портальную вену, печеночные артерии и вены. После забора печень помещали в стерильный 0,9% раствор хлорида натрия и отмывали от крови. Далее фрагмент печени переносили во вторую порцию стерильного 0,9% раствора хлорида натрия и измельчали печень с помощью ножниц на фрагменты размером 5 × 5 мм, а затем обмывали каждый фрагмент печени раствором 0,9% хлорида натрия при помощи шприца без иглы. После отмывки от крови фрагмент печени переносили в стерильную сухую чашку Петри и обкалывали раствором коллагеназы 2-го типа с концентрацией 2 мг/мл при помощи инсулинового шприца, затем ткань инкубировали в течение 20 минут. Далее измельчали печень с помощью ножниц и инкубировали еще 5 минут, затем переносили на лед. После этого к ткани печени добавляли 5 мл раствора 0,9% хлорида натрия. Полученный раствор переносили в пробирку, перемешивали, и центрифугировали в течение 5 минут при 1770 g и температуре –5 °С. Супернатант удаляли, к полученному осадку добавляли культуральную среду, перемешивали и суспензию клеток переносили в предварительно подготовленные 48-луночные планшеты. Клетки инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO_2 в течение 2 дней.

Клетки печени для дальнейших экспериментов с помощью метода СЗОНТ визуально локализовали с помощью оптического микроскопа.

Для исследований клеток на скаффолдах методом флуоресцентной сканирующей оптической нанотомографии клетки предварительно окрашивали флуоресцентными красителями FITC и DAPI. Лунки дважды промывали стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, затем вносили раствор DAPI с концентрацией 3 мкг/мл и инкубировали 5 минут при 37 °С. Затем производили две короткие отмытки стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, после чего в лунки вносили 2,5% раствор глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (рН = 7,4) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4 °С. Далее производили одну короткую отмытку стерильным 0,9% раствором хлорида натрия и одну короткую отмытку раствором карбонат-бикарбонатного буфера (рН = 9,0). Затем раствор FITC в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл вносили в лунки и инкубировали в течение 40 минут в темноте, после чего производили две короткие отмытки раствором карбонат-бикарбонатного буфера (рН = 9,0).

Для изготовления препарата для СОЗОНТ производили дегидратацию образцов скаффолдов с культивированными клетками печени проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

- а) р-р этанола 30% – 10 мин;
- б) р-р этанола 50% – 10 мин;
- в) р-р этанола 70% – 10 мин;
- г) р-р этанола 80% – 10 мин;
- д) р-р этанола 96% – 10 мин.

Образцы отмывали трехкратно 100% этиловым спиртом по 10 минут, а затем инкубировали в смеси 100% этилового спирта и эпоксидной смолы в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образцы переносили в смесь 100% этилового спирта и эпоксидной смолы в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем образцы заключали в эпоксидную смолу, инкубировали в термостате при 45 °С в течение 12 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60 °С. Затем скаффолды в эпоксидной смоле отделяли от дна планшетов с помощью скальпеля.

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилэтантарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

Сканирующая зондовая оптическая нанотомография

Для исследований образцов клеток печени крысы методами СЗОНТ использовалась экспериментальная установка Ntegra Tomo. Данный комплекс позволяет производить последовательные СЗМ-измерения поверхности образцов непосредственно после выполнения среза ультрамикротомом. Последовательные срезы образца толщиной 100 нм выполнялись с использованием алмазного ножа Diatome Ultra AFM 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 2,0 мм.

СЗМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1,0 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов NSG10 (NT-MDT, Москва) с резонансной частотой 240 кГц и радиусом кривизны острия <10 нм. Первичная обработка изображений проводилась в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (NT-MDT, Москва), трехмерные томографические реконструкции структуры клетки печени были получены в программе ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc, США).

Коррелятивные измерения срезов при помощи метода флуоресцентной оптической микроскопии выполнялись при помощи флуоресцентного инвертированного микроскопа AxioVert.A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного ртутной лампой HBO 100. Флуоресцентные изображения были получены с использованием иммерсионного объектива Carl Zeiss EC Plan-Neofluar 100x/1.30 Oil Ph3. Для анализа флуоресцентных изображений использовался программный пакет Zen (Carl Zeiss, Германия).

Анализ реконструированных методом СЗОНТ поверхностей при помощи программного обеспечения ImagePro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc, США) позволяет определить и проанализировать наномасштабные параметры этих поверхностей, такие как средняя шероховатость R_a и эффективная площадь поверхности σ . Используемые алгоритмы вычисления данных параметров приведены в [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовленные образцы клеток печени крысы, культивированные на скаффолдах из фиброина шелка, были исследованы при помощи технологии СЗОНТ. После отделения залитых в эпоксидную среду образцов скаффолдов от планшетов выполнялась локализация культивированных клеток печени в плоскости скаффолдов с использованием флуоресцентной микроскопии. На основе анализа полученных изображений отбирались скаффолды для дальнейшего СЗОНТ-анализа, затем выполнялись первичные срезы образца ультрамикротомом в плоскости, перпендикулярной плоскости скаффолда,

и при помощи флуоресцентной микроскопии измерялось расстояние от плоскости первичного среза до регистрируемых клеток печени. В соответствии с выполненными измерениями производились последующие срезы изучаемого скаффолда с контролируемой суммарной толщиной, для того чтобы получить срезы клеток печени. На рис. 1 приведено флуоресцентное изображение образца пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем клетками печени, линией отмечена плоскость среза, стрелка указывает на область локализации клеток, в которой выполнялся СЗОНТ-анализ.

На рис. 2 представлены изображения, полученные в ходе анализа образцов клеток печени, адгезированных на скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка. В ходе СЗМ-анализа (рис. 2, а) было выявлено наличие ядра, а также включений в виде липидной капли, занимающих значительный объем клетки. Такие включения являются одной из характерных особенностей клеток печени. Полученные данные подтверждаются коррелятивными флуоресцентными изображениями. Распределение красителя DAPI подтверждает наличие ядра в клетке (рис. 2, в), в

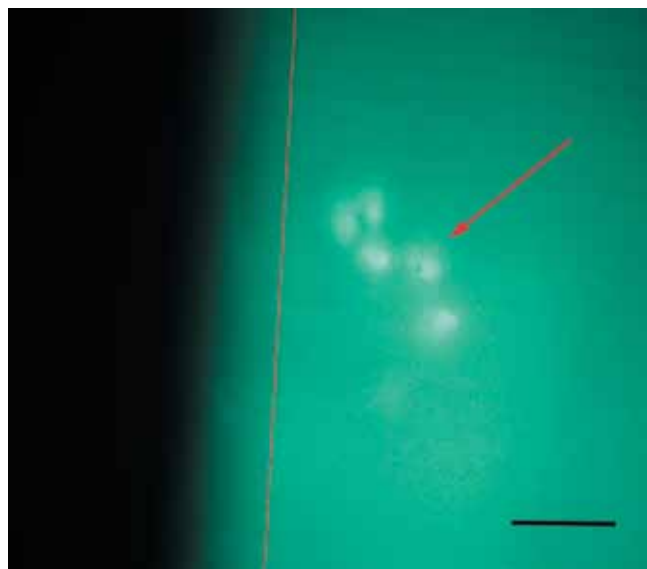


Рис. 1. Флуоресцентное изображение образца пленки фиброина шелка с адгезированным на ней клетками печени, окрашивание FITC, $\times 200$, размерный отрезок – 50 мкм

Fig. 1. Fluorescent image of a silk fibroin film sample with liver cells adhered to it; FITC stain, $\times 200$, scale bar – 50 μm

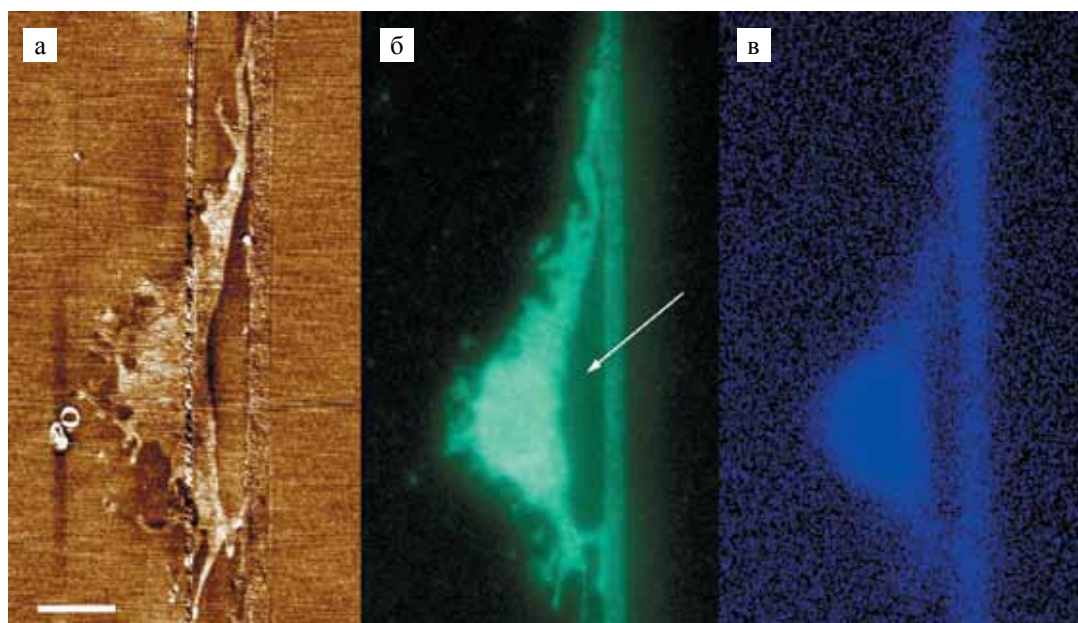


Рис. 2. Анализ образцов клеток печени, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка: а – СЗМ-изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана 25×12 мкм, диапазон вариации высоты 11 нм, размерный отрезок – 3 мкм; б – коррелятивное флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени, окрашивание FITC, $\times 1000$, стрелкой указана липидная капля; в – коррелятивное флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени, окрашивание DAPI, $\times 1000$

Fig. 2. Analysis of liver cell samples cultured on silk fibroin-based film scaffolds: а – SPM image of the surface topography of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell: scan size 25×12 μm , height variation range 11 nm, scale bar 3 μm ; б – correlative fluorescent image of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell, FITC stain, $\times 1000$, the arrow indicates a lipid droplet; в – correlative fluorescent image of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell, DAPI stain, $\times 1000$

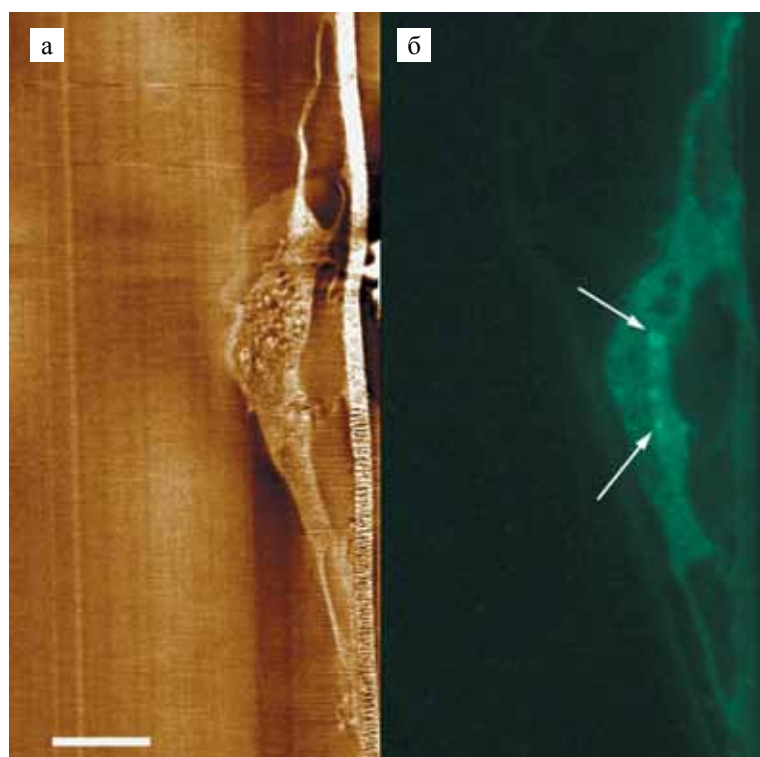


Рис. 3. Анализ образцов клеток печени, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка: а – СЗМ-изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана 32×15 мкм, диапазон вариации высоты 40 нм, размерный отрезок 4 мкм; б – флуоресцентное изображение поперечного среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени, окрашивание FITC, $\times 1000$, стрелками указаны гранулы гликогена

Fig. 3. Analysis of liver cell samples cultured on silk fibroin-based film scaffold: a – SPM image of the surface topography of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell: scan size 32×15 μm , height variation range 40 nm, scale bar 4 μm ; б – correlative fluorescent image of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell, FITC stain, $\times 1000$, the arrows indicate glycogen granules

области липидной капли не наблюдается флуоресценция красителей (рис. 2, б, в).

Дальнейший анализ структуры клеток печени крысы, адгезированных на скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок, выявил наличие большого количества включений. В ходе анализа изображений, представленных на рис. 3, в структуре клеток печени были выявлены включения в виде липидных капель, в области которых не регистрируется флуоресценция (рис. 3, б), и оформленных гранул, предположительно гликогена (указаны стрелками на рис. 3, б).

Анализ структуры клеток печени крысы, адгезированных на скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок с высоким разрешением, выявил обширные участки цитоплазмы с неоднородной структурой (рис. 4), наличие которых может свидетельствовать о высоком уровне метаболизма клеток за счет развитой системы эндоплазматического ретикулула.

Для оценки трехмерной морфологии клетки печени, адгезированной на поверхность скаффолда

на основе фиброина шелка в виде пленки, была выполнена трехмерная реконструкция фрагмента клетки при помощи метода СЗНТ. Для этого выполнено 14 последовательных срезов образца толщиной 200 нм и получено 14 последовательных СЗМ-изображений участка скаффолда размером 32×16 мкм. Полученная визуализация трехмерной структуры клетки печени показана на рис. 5.

Анализ полученных трехмерных данных позволил определить морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры клетки печени. Так, средняя шероховатость поверхности клетки R_a составляет $124,8 \pm 8,2$ нм, в то время как эффективная площадь поверхности σ , вычисляемая как отношение площади поверхности к площади ее двумерной проекции на плоскость, составляет $1,13 \pm 0,02$. Данный безразмерный параметр определяет степень развитости поверхности. Анализ объемного распределения липидных капель показал, что они занимают 28% объема реконструированного фрагмента клетки.



Рис. 4. СЗМ-изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана $7,0 \times 6,0$ мкм, диапазон вариации высоты 20 нм, размерный отрезок 1 мкм

Fig. 4. SPM image of the topography of a cross-section of the silk fibroin-based film scaffold with adhered liver cell: scan size 7.0×6.0 μm , height variation range 20 nm, scale bar 1 μm

Отработанная нами методика исследования наномасштабных структур клеток печени крысы, адгезированных на биodeградируемые скаффолды, при помощи сканирующей оптическо-зондовой нанотопографии применима для исследования особенностей трехмерной структуры клеток разных типов на микро- и наноуровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе при помощи метода СЗОНТ выполнены исследования наномасштабных структур клеток печени крысы, адгезированных на биodeградируемые скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка. Получены трехмерные реконструкции клетки печени крысы и его коррелятивные флуоресцентные изображения; определены параметры трехмерной наноморфологии клеток. Полученные результаты продемонстрировали, что разработанный метод флуоресцентной сканирующей оптическо-зондовой нанотопографии может быть

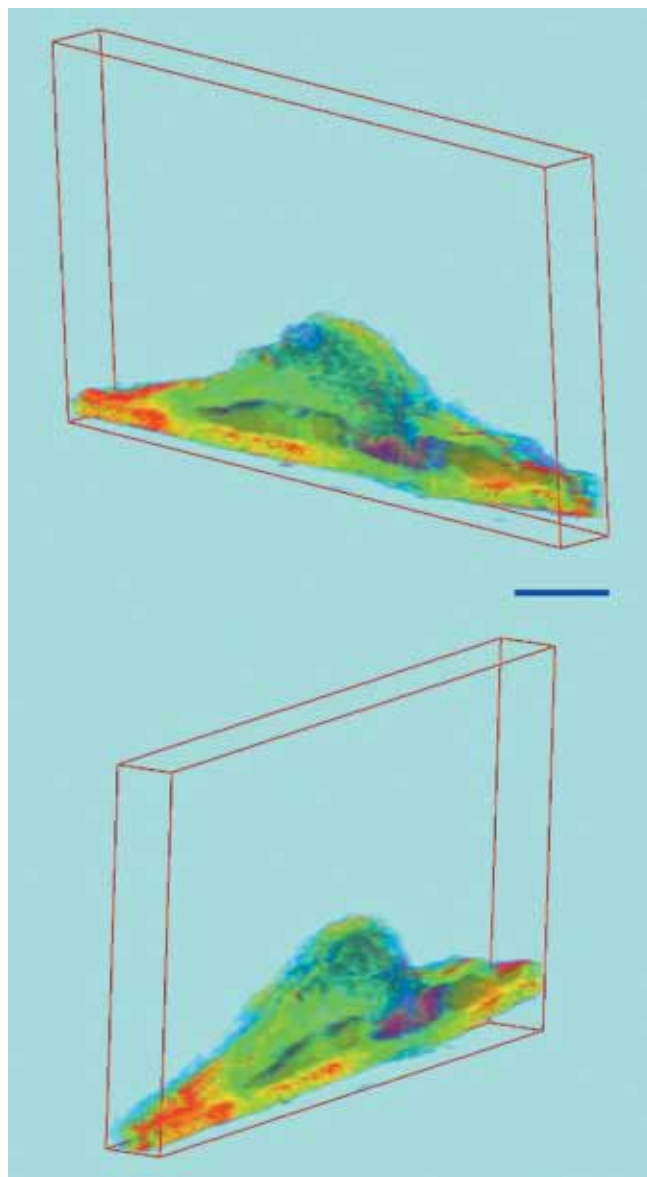


Рис. 5. Трехмерная СЗНТ-реконструкция клетки печени, адгезированной на скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, $32,0 \times 15,0 \times 2,8$ мкм, толщина среза 200 нм, размерный отрезок 5 мкм

Fig. 5. SPNT 3D-reconstruction of the liver cell adhered to the silk fibroin-based film scaffold, $32.0 \times 15.0 \times 2.8$ μm , slice thickness 200 nm, scale bar 5 μm

эффективно использован для корреляционного анализа структуры биodeградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка с культивированными на них клетками.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Caplan J, Niethammer M, Taylor RMII, Czymmek KJ. The Power of Correlative Microscopy: Multi-modal,

- Multi-scale, Multi-dimensional. *Curr Opin Struct Biol.* 2011; 21 (5): 686–693. doi: 10.1016/j.sbi.2011.06.010.
2. Balashov V, Efimov A, Agapova O, Pogorelov A, Agapov I, Agladze K. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure. *Acta Biomaterialia.* 2018; 68 (1): 214–222. doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.031.
 3. Efimov AE, Agapov II, Agapova OI, Oleinikov VA, Mezin AV, Molinari M et al. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography. *Review of Scientific Instruments.* 2017; 88 (2): 023701. doi: 10.1063/1.4975202.
 4. Mochalov KE, Chistyakov AA, Solovyeva DO, Mezin AV, Oleinikov VA, Molinari M et al. An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography. *Ultramicroscopy.* 2017; 182: 118–123. doi: 10.1016/j.ultramicro.2017.06.022.
 5. Efimov AE, Moisenovich MM, Bogush VG, Agapov II. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography. *RSC Adv.* 2014; 4: 60943–60947. doi: 10.1039/c4ra08341e.
 6. Ефимов АЕ, Агапова ОИ, Сафонова ЛА, Боброва ММ, Агапов ИИ. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры ткани легкого методом сканирующей зондовой нанотографии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2020; 22 (3): 143–148. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Agapov II. 3D analysis of the micro- and nanostructure of lung tissue by scanning probe nanotomography. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2020; 22 (3): 143–148. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2020-3-143-148.
 7. Efimov AE, Agapova OI, Safonova LA, Bobrova MM, Parfenov VA, Koudan EV et al. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold. *Express Polymer Letters.* 2019; 13 (7): 632–641. doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.53.
 8. Kim HH, Park JB, Kang MJ, Park YH. Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid–dopamine conjugate. *Int J Biol Macromol.* 2014; 70: 516–522. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.052.
 9. Gil ES, Panilaitis B, Bellas E, Kaplan DL. Functionalized Silk Biomaterials for Wound Healing. *Adv Healthc Mater.* 2013; 2: 206–217. doi: 10.1002/adhm.201200192.
 10. Zhua M, Wanga K, Meia J, Lib C, Zhanga J, Zhenga W et al. Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts. *Acta Biomater.* 2014; 10 (5): 2014–2023. doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.022.
 11. Gu Y, Zhu J, Xue C, Li Z, Ding F, Yang Y, Gu X. Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. *Biomaterials.* 2014; 35 (7): 2253–2263. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.087.
 12. Kasoju N, Bora U. Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications. *Biomed Mater.* 2012; 7 (4): 1–12. doi: 10.1088/1748-6041/7/4/045004.
 13. She Z, Jin C, Huang Z, Zhang B, Feng Q, Xu Y. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19: 3545–3553. doi: 10.1007/s10856-008-3526-y.

Статья поступила в редакцию 19.10.2020 г.
The article was submitted to the journal on 19.10.2020