

DOI: 10.15825/1995-1191-2014-3-109-116

## ИССЛЕДОВАНИЕ НАНО- И МИКРОСТРУКТУРЫ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

*Ефимов А.Е., Агапов И.И.*

Лаборатория бионанотехнологий ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Провести исследование трехмерной микро- и наноструктуры пористых биосовместимых матриксов и выполнить количественный анализ наномасштабной пористости. **Материалы и методы.** Трехмерные пористые матриксы из высокоочищенного спидроина rS1/9 (рекомбинантного аналога белка паутины) были получены методом выщелачивания. Размер макропор полученных трехмерных матриксов составил от 200 до 400 мкм. Изучение трехмерной структуры матриксов производилось методом сканирующей зондовой нанотомографии при помощи экспериментальной установки, объединяющей ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп. **Результаты.** Получена трехмерная нанотомографическая реконструкция структуры стенки макропоры матрикса. Установлено, что в объеме стенок макропор исследуемых матриксов формируется трехмерная сеть сообщающихся пор и каналов с размерами от 20 до 700 нм. Средний диаметр пор составляет 150 нм. Объемный коэффициент пористости стенок макропор составляет 22%, при этом объемная доля пор, взаимосвязанных между собой и соединяющихся в кластеры, составляет порядка 20% от объема всех пор. **Заключение.** Полученные в результате исследования количественные характеристики пористой микро- и наноструктуры матриксов показывают заметную степень наномасштабной пористости и проницаемости стенок макропор, что коррелирует с высокой эффективностью регенерации тканей на подобных матриксах при их имплантации *in vivo*. Использование метода сканирующей зондовой нанотомографии для анализа характеристик и топологии систем микро- и нанопор позволяет повысить эффективность разработок по созданию новых биосовместимых и биодеградируемых материалов с заданными морфологическими, физико-химическими и биологическими характеристиками.

*Ключевые слова:* сканирующая зондовая нанотомография, нанопористость, трехмерные биосовместимые матриксы, спидроин.

## INVESTIGATION OF NANO- AND MICROSTRUCTURE OF BIOMATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE BY METHOD OF SCANNING PROBE NANOTOMOGRAPHY

*Efimov A.E., Agapov I.I.*

Laboratory of Bionanotechnology, V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Aim.** To perform a study of three-dimensional micro- and nanostructure of porous biocompatible scaffolds and quantitative analysis of nanoscale porosity parameters. **Materials and methods.** Three-dimensional porous scaffolds made from spidroin rS1/9 (recombinant analog of spider dragline protein) were produced by salt leaching technique. Dimensions of macropores in produced three-dimensional scaffolds were in range from 200 to 400 microns. The study of three-dimensional structure of scaffolds was carried out by scanning probe nanotomography technique with the use of experimental setup combining ultramicrotome and scanning probe microscope. **Results.** Three-dimensional nanotomographical reconstruction of scaffold macropore wall structure is obtained. The formation of three-dimensional network of interconnected pores and channels with characteristic dimensions in range from 20 to 700 nm in the volume of macropore walls of studied scaffolds is observed. Mean pore diameter is 150 nm. Volume porosity of macropore walls is 22% while volume fraction of pores interconnected in large pore clusters is about 20% of all pore volume. **Conclusion.** Obtained as a result of the study quantitative characteristics of porous micro- and nanostructure of scaffolds show significant degree of nanoscale porosity and percolation of macropore walls what correlates with reported high efficiency of tissue

regeneration on such scaffolds implanted *in vivo*. Use of scanning probe nanotomography technique for analysis of characteristics and topology of micro- and nanopore systems enables to improve efficiency of development of novel biocompatible and biodegradable materials with predicted morphological, physical, chemical and biological characteristics.

*Key words: scanning probe nanotomography, nanoporosity, three-dimensional biocompatible scaffolds, spidroin.*

## ВВЕДЕНИЕ

Исследование микро- и наноструктуры полимерных и биополимерных материалов имеет ключевое значение для ряда задач в различных областях структурной биологии, медицинской диагностики, создания и изучения новых биологических материалов для заместительной и регенеративной медицины. При этом важнейшим требованием для микроскопических исследований подобных материалов (а также биологических объектов, гидратированных гелевых материалов и наноэмульсий) является сохранение и стабилизация ненарушенной нативной структуры на уровне индивидуальных макромолекул как при подготовке объектов, так и при самих измерениях.

Низкотемпературная микроскопия высокого разрешения на сегодняшний день является самым мощным инструментом для достижения этой цели. Применяемые в настоящее время для подобных исследований методы электронной микроскопии и электронной томографии кроме несомненных достоинств имеют и ряд недостатков и ограничений, вызванных физическими принципами измерений и формирования контраста в данных методах, а также чрезвычайно высокую стоимость оборудования для исследований и трудоемкость подобных работ [1, 2]. Данные ограничения особенно заметно проявляются в задачах анализа биологических и полимерных материалов, состоящих преимущественно из легких химических элементов. Методы сканирующей зондовой микроскопии – неразрушающего анализа структуры поверхности с наноразмерным разрешением – позволяют обойти такие ограничения электронной микроскопии, как нарушения структуры образцов, вызванных химической фиксацией образца, повреждения электронным пучком, слабый электронно-микроскопический контраст [3, 4].

Объединение техники ультрамикротомии с последовательным анализом наноструктуры поверхности после произведенного среза методом сканирующей зондовой микроскопии представляет перспективный подход к исследованию трехмерной наноструктуры широкого класса биологических и полимерных объектов и материалов. Комбинация данных техник в рамках одного интегрированного устройства (рис. 1) позволяет производить АСМ-измерения поверхности блока изучаемого материала без перемещения образца непосредственно после сверхтонкого среза в рабочем цикле ультрамикротомы [5]. В отличие от самих сверхтонких срезов на поверхности блока практически отсутствуют артефакты, возникающие при проведении механического среза (сжатие, растяжение, деформация и др.), что повышает точность и надежность проводимых измерений [6]. Для получения серии АСМ-изображений одного и того же участка поверхности производятся последовательные срезы образца с заданной толщиной



Рис. 1. Экспериментальная установка для сканирующей зондовой нанотографии Ntegra Tomo, комбинирующая ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп

*Ефимов Антон Евгеньевич* – к. ф.-м. н., старший научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация. *Агапов Игорь Иванович* – д. б. н., профессор, заведующий лабораторией бионанотехнологий того же центра.

**Для корреспонденции:** Агапов Игорь Иванович. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. 8 (499) 190-66-19. E-mail: igor\_agapov@mail.ru.

*Efimov Anton Evgenievich* – Senior Research Fellow Laboratory of Bionanotechnology V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. *Agapov Igor Ivanovich* – Professor, head of the laboratory of Bionanotechnology at the same center.

**For correspondence:** Agapov Igor Ivanovich. Address: 1, Schukinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. 8 (499) 190-66-19. E-mail: igor\_agapov@mail.ru.

(от 20 нм), и соответственно, АСМ-измерения морфологии поверхности и карт распределения физических свойств изучаемых объектов после каждого среза. Автоматизация и оптимизация измерительного цикла позволяет получать до 10 последовательных изображений в час и несколько десятков изображений в течение одного эксперимента. Данный метод сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) позволяет восстанавливать трехмерные структуры объектов и получать информацию о трехмерной морфологии и локальном распределении ряда физических свойств, а также о трехмерном распределении компонентов (например, наночастиц и кластеров) в объеме нанокompозитных и биоматериалов [7–9]. Ниже мы приведем примеры применения этого нового метода к биологическим объектам и материалам.

На рис. 2 представлен пример трехмерного анализа структуры мембран цианобактерии *Synechococcus* [5]. Образцы цианобактерий для измерений были подготовлены методом заморозки при высоком давлении и залиты в эпоксидную смолу. На приведенном изображении визуализированы расположение и морфология концентрических мембран внутри объема бактерии. Данная информация является взаимодополняющей с данными стандартных электронно-микроскопических исследований. Однако большинство биомакромолекул (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты) состоит из легких химических элементов (С, Н, О, N), которые слабо рассеивают электроны, что приводит к очень слабому контрасту на соответствующих электронно-микроскопических изображениях. АСМ-измерения биологических объектов после соответствующей подготовки и среза ультрамикротомом, напротив, позволяют исследовать архитектуру и локализацию макромолекулярных компонент в клетках [10–11]. Так, мембранные белки на приведенном томографическом изображении выглядят как зерна, включенные в мембранные слои. Таким образом, технология СЗНТ может служить мощным инструментом для изучения внутриклеточных наноструктур и макромолекулярных комплексов.

На рис. 3 приведен пример реконструкции трехмерной структуры биodeградируемого клеточного матрикса из поли-β-оксибутирата, полученного с помощью электроспиннинга [12]. Для выполнения срезов и измерений матрикс был залит в эпоксидную смолу, после чего была получена серия последовательных фазовых АСМ-изображений поверхности блока. На приведенной визуализации трехмерной морфологии выделены волокна поли-β-оксибутирата, в то время как окружающая их эпоксидная смола установлена прозрачной. Полученная реконструкция показывает, что полученные электроспиннингом волокна с диаметром 500–2000 нм,

переплетаясь, образуют трехмерную сетку с размером ячеек 2–7 микрон.

Выполнение качественных сверхтонких срезов поверхности при помощи ультрамикротомата требует, чтобы во время среза алмазным ножом не происходила пластическая деформация образца. Для ряда биологических образцов и мягких полимерных материалов с температурой стеклования  $T_g$  ниже комнатной это условие выполняется только при выполнении срезов при низкой температуре (криоультрамикротомия), когда и нож, и образец помещаются в специальную криокамеру, охлаждаемую жидким азотом. Для реализации технологии СЗНТ в криогенных условиях был разработан экспериментальный сканирующий зондовый микроскоп SNOTRA (рис. 4), интегрированный в криокамеру ультрамикротомата и позволяющий вы-

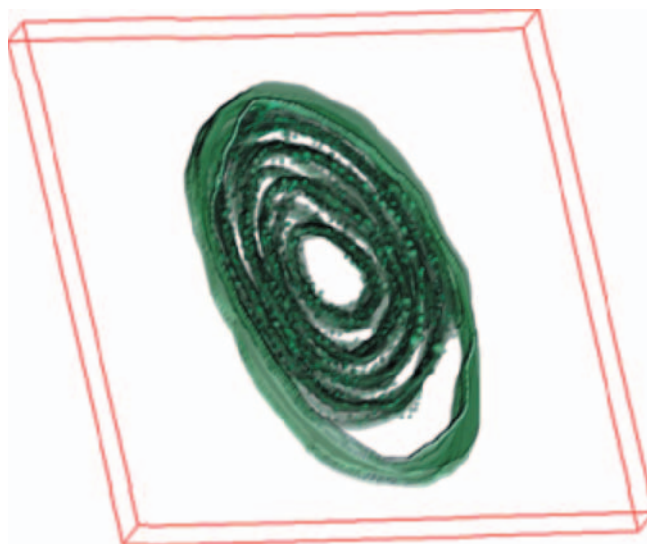


Рис. 2. Трехмерная визуализация плазматических мембран цианобактерии,  $2,7 \times 2,5 \times 0,15 \text{ мкм}^3$  [5]

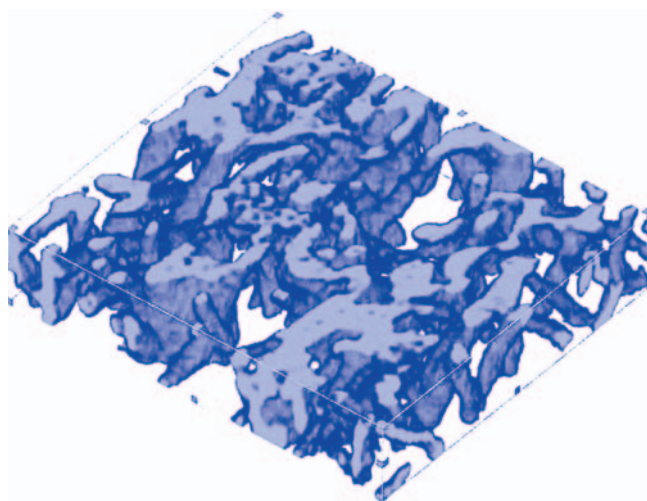


Рис. 3. Трехмерная реконструкция структуры биodeградируемого матрикса из поли-β-оксибутирата (20 срезов,  $41,2 \times 34,1 \times 8,5 \text{ мкм}^3$ ) [12]

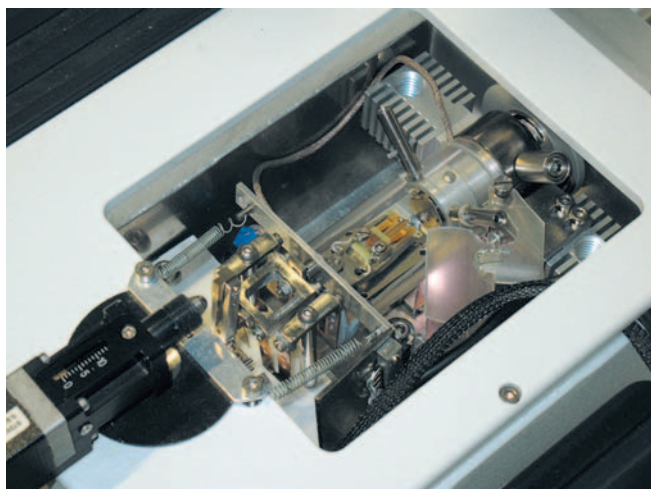


Рис. 4. Экспериментальная установка для низкотемпературной сканирующей зондовой нанотографии SNOTRA, комбинирующая криоультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп, расположенный непосредственно в криокамере Leica EM FC6

полнять измерения поверхности блока образца непосредственно после среза при низкой температуре (до  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [13]. Использование данного прибора в совокупности с необходимыми технологиями подготовки образца (витрификация – замораживание при высоком давлении) позволит значительно расширить спектр применений метода СЗНТ для анализа нативных биологических структур и гидратированных материалов.

На рис. 5 представлена выполненная с помощью установки SNOTRA трехмерная реконструкция хитиновой структуры антенных сенсилл *Placodea* и *Coeloconica* паразитической осы *Cotesia glomerata* [14], предварительно замороженных при высоком давлении и залитых в эпоксидную смолу [13]. Полученные результаты позволяют изучать трех-

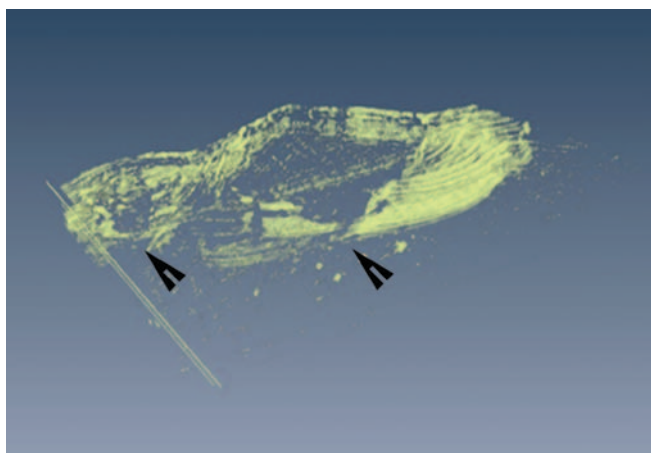


Рис. 5. Трехмерная модель организации хитиновой структуры антенных сенсилл *Placodea* и *Coeloconica* паразитической осы *Cotesia glomerata* ( $12,5 \times 13,0 \times 0,7\text{ мкм}^3$ , 11 срезов, толщина среза 70 нм). Стрелками указаны области выхода обеих сенсилл [13]

мерную организацию хитина и нервных клеток в сенсиллах антенны. Например, в данном случае было установлено, что обе сенсиллы одновременно проходят через кутикулу антенны к основному нервному каналу, что, в свою очередь, указывает на одновременную обработку сенсорной информации, детектируемой обеими сенсиллами [14].

Одним из перспективных направлений развития разрабатываемого метода нанотографии является визуализация и исследование трехмерных наноструктур, топологии и характеристик систем микро- и нанопор в объеме микро- и нанопористых полимерных биodeградируемых матриц-носителей. Такие параметры, как размер, степень пористости, взаимосвязанность пор в объеме материала и отношение площади поверхности пор к занимаемому объему на микро- и наноуровне имеют значительное влияние на эффективность использования носителей из биodeградируемых материалов для задач регенеративной медицины, в частности на однородность распределения клеток в матриксе и эффективность регенерации нативной ткани *in vivo*. Системы взаимосвязанных пор в объеме обеспечивают необходимый обмен веществ между клетками в матриксах [15–18].

В данной работе представлены исследования структуры трехмерных матриц из спидроина rS1/9 (рекомбинантного аналога белка паутины) [19–21]. Трехмерные матрицы из данного материала демонстрируют высокие биосовместимые свойства, повышенную адгезию и пролиферацию эукариотических клеток на их поверхности и в объеме. В процессе биodeградации после подкожной имплантации наблюдается биodeградация материала, сопровождающаяся неоваскуляризацией и неиннервацией [19].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение матриц

Трехмерный матрикс из высокоочищенного лиофилизированного спидроина rS1/9 получали методом выщелачивания. Навеску 15 мг рекомбинантного спидроина rS1/9 растворяли в 50 мкл 10%-ного раствора лития хлористого в 90%-ной муравьиной кислоте в течение 30 мин при температуре  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Раствор центрифугировали 10 мин при  $11\ 300\text{ g}$ , и 50 мкл супернатанта смешивали со 110 мг хлорида натрия с размером частиц от 200 до 400 мкм. Затем формировали диск диаметром 10 мм и толщиной примерно 1 мм, высушивали при комнатной температуре, обрабатывали 96%-ным этанолом в течение 120 мин, промывали дистиллированной водой в течение 120 мин, дегазировали и хранили в 96%-ном этаноле.

### Сканирующая зондовая нанотомография

Для исследований трехмерной структуры матриц использовалась экспериментальная установка Ntegra Томо (NT-MDT, Москва), представляющая собой сканирующий зондовый микроскоп, интегрированный с ультрамикротомом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия). Максимальная площадь сканирования поверхности составляет  $95,0 \times 95,0$  мкм<sup>2</sup>. АСМ-измерения проводились в полуконтактном режиме при скорости сканирования 1 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов NSC14 (MikroMasch Co., Эстония) с резонансной частотой 160 кГц и радиусом кривизны острия < 10 нм. Срезы образца выполнялись с использованием алмазного ножа UltraAFM 35 (Diatome AG, Швейцария) с шириной режущей кромки 2,5 мм. Перед выполнением срезов и измерений образцы матрикса заливались в эпоксидную смолу.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 6, А приведено обзорное АСМ-изображение ( $95,0 \times 95,0$  мкм<sup>2</sup>) поверхности блока залитого в эпоксидную смолу матрикса на основе спидроина rS1/9 после среза ультрамикротомом. На данном изображении видны пористые стенки матрикса толщиной от 5 до 15 микрон, разделяющие макропоры размером от 50 микрон и более, что согласуется с полученными ранее с помощью электронной и конфокальной оптической микроскопии данными о морфологии подобных матриц [19, 21]. Ха-

рактерные вертикальные линии на изображении поверхности эпоксидной смолы являются следами от неоднородностей алмазного ножа ультрамикротомом, возникшими в процессе среза.

На рис. 6, Б представлено одно из АСМ-изображений поперечного среза стенки макропоры размером  $25,0 \times 25,0$  мкм<sup>2</sup>. Толщина стенки макропоры на данном участке составляет от 6 до 12 мкм. На изображении видно наличие в стенке макропоры значительного количества наноразмерных и субмикронных пор размерами от 25 до 700 нм. Статистический анализ серии двумерных АСМ-изображений с помощью программного пакета Image Analysis Nova 1.0.26.1443 позволяет определить для данных изображений распределение пор по размерам и степень пористости как отношение суммарной площади всех пор к общей площади поверхности среза стенки макропоры. Вычисленная таким образом степень пористости составляет 21,7% при среднем диаметре пор порядка 150 нм. Среднее количество пор на единицу площади составляет  $3,81/\text{мкм}^2$ .

Однако для определения параметров объемной пористости, и в особенности взаимосвязанности системы пор, обработки данных отдельных двумерных АСМ-изображений недостаточно, и необходим трехмерный анализ пористой структуры стенок макропор матрикса. Для выполнения трехмерной реконструкции структуры матрикса в объеме нами была получена серия из 25 АСМ-изображений топографии поверхности стенки макропоры после последовательных срезов ультрамикротомом толщиной в 100 нм.

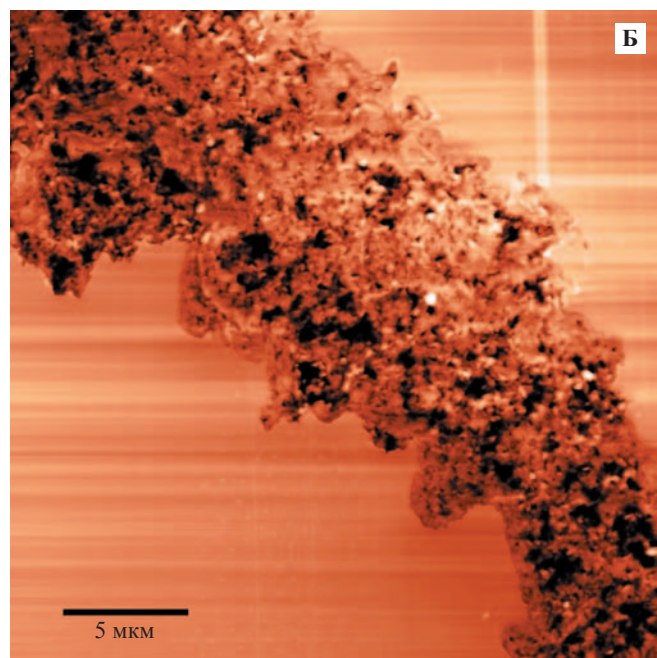
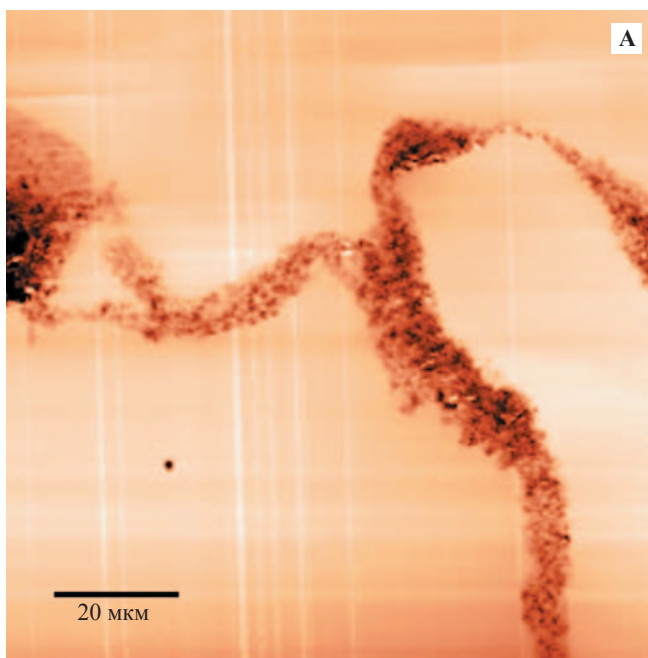


Рис. 6. АСМ-изображения топографии поверхности блока матрикса на основе спидроина rS1/9 после среза ультрамикротомом: А – размер скана  $95,0 \times 95,0$  мкм<sup>2</sup>, диапазон вариации высоты 300 нм; Б – размер скана  $25,0 \times 25,0$  мкм<sup>2</sup>, диапазон вариации высоты 100 нм

На рис. 7, А представлена трехмерная реконструкция стенки макропоры матрикса в объеме  $16,0 \times 16,0 \times 2,5$  мкм, полученная с помощью программного пакета 3DConstructor Image Pro AMS 6.0 (Media Cybernetics, Inc.). Для получения данного изображения было выполнено совмещение всех полученных АСМ-изображений серии и визуализация в заданном объеме с учетом физических размеров вокселей (объемных пикселей), задаваемых соответственно толщиной срезов и разрешением исходных АСМ-изображений. Однако несмотря на достаточно высокий заданный коэффициент прозрачности материала (0,958), подобная прямая визуализация все же не позволяет проанализировать интересующие нас структуры пор внутри объема стенки.

На рис. 7, Б представлена визуализация пор в том же исследуемом объеме, полученная при помощи инвертирования и пороговой бинаризации исходных изображений. На данном изображении объем пор отмечен зеленым цветом, в то время как объем самого материала сделан невидимым. Численный статистический анализ полученных данных позволяет определить объемный коэффициент пористости стенки матрикса, который составляет 22%. Это согласуется со значением, которое мы получили при анализе исходных двумерных АСМ-изображений.

Данное значение объемной пористости превосходит стандартный объемный порог перколяции для трехмерных систем, составляющий 16% [22]. Это означает, что, согласно теории перколяции, при таком уровне объемной пористости заметная часть пор соединяется в перколяционные кластеры, размер которых может значительно превосходить характерные размеры единичных пор [23]. Используемое нами программное обеспечение позволяет выделить взаимосвязанные кластеры нанопор и определить их параметры путем построения соответствующих изоповерхностей в трехмерном объеме. Так, на рис. 7, В приведена визуализация типичного протяженного кластера пор в том же исследуемом объеме, который соединяет поры вдоль всей длины данного участка стенки макропоры. Длина данного кластера составляет около 22 мкм при общей площади поверхности  $253 \text{ мкм}^2$ . Статистический анализ подобных кластеров позволяет определить, что в среднем объем нанопор, соединенных в подобные кластеры наноканалов, составляет 4,4% от общего объема материала или, соответственно, около 20% от объема всех нанопор.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Такие характеристики, как трехмерное распределение, средние размеры, степень пористости и степень взаимосвязанности субмикронных пор и нанопор в объеме стенок макропор матрикса, име-

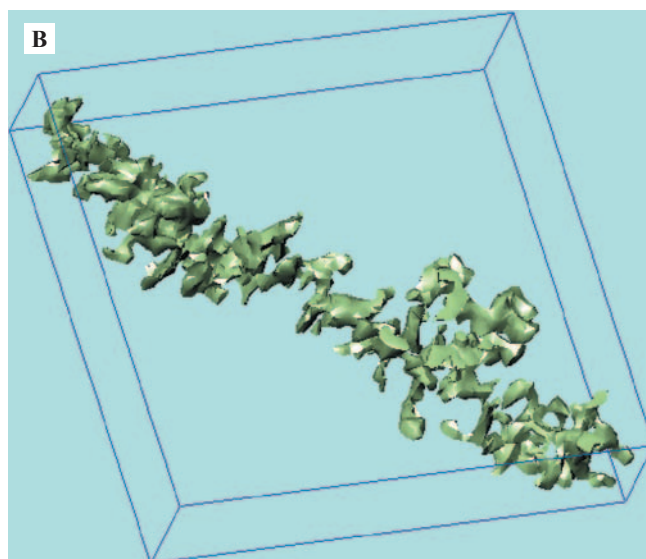
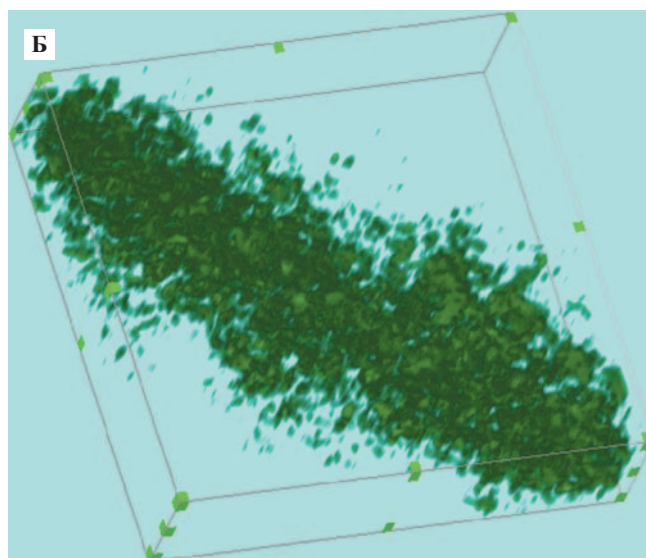
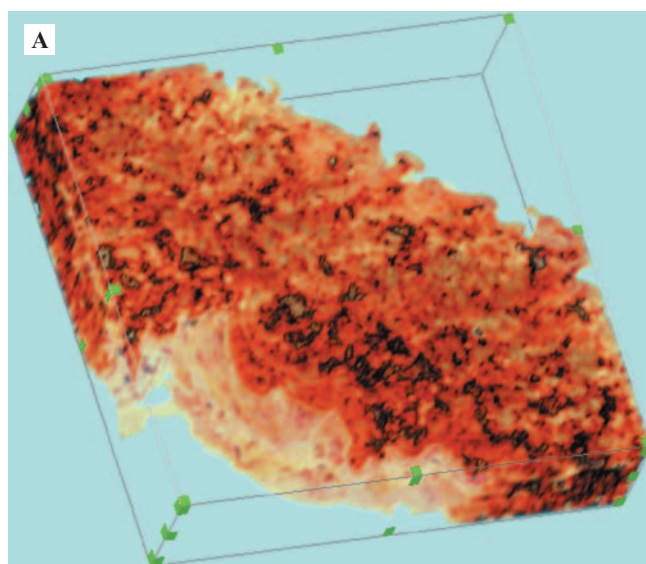


Рис. 7. Трехмерная реконструкция структуры стенки макропоры матрикса,  $16,0 \times 16,0 \times 2,5$  мкм<sup>3</sup>: А – визуализация объема материала; Б – визуализация объема нанопор; В – протяженный кластер взаимосвязанных нанопор

ют важнейшее значение для его биологических свойств и возможностей применения в целях регенеративной медицины.

Определенные нами параметры пористости позволяют предположить, что стенки подобного матрикса имеют высокую степень проницаемости для жидкостей, в том числе для продуктов обмена веществ клеток *in vitro* и *in vivo*. Существование в матриксе пор со средними размерами около 150 нм позволяет обеспечить проникновение глубоко в матрикс аминокислот, пептидов и других функционально активных веществ. Мы предполагаем, что именно формирование наблюдаемой нами связанной системы нанопор в стенках матриксов из спидроина rS1/9 является одним из ключевых факторов, обеспечивающих высокую эффективность неоваскуляризации и неоиннервации, наблюдаемых при имплантации подобных матриксов *in vivo* [18].

Данное обстоятельство делает пористые матриксы на основе спидроина rS1/9 одними из наиболее перспективных кандидатов для использования в биологических и медицинских приложениях для регенерации тканей.

Отработанная нами методология исследования количественных характеристик и топологии систем субмикронных пор и нанопор при помощи сканирующей зондовой нанотомографии применима как к биополимерным и биосовместимым материалам, так и к другим пористым полимерным материалам: фильтрационные и каталитические мембраны, применяемые для решения ряда задач в сфере медицинской биотехнологии, энергетики и экологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлено исследование методами СЗМ и СЗНТ трехмерных структур мягких микропористых биополимерных матриксов. Для исследований использованы трехмерные биополимерные матриксы на основе рекомбинантного спидроина rS1/9. 3D-реконструкция объемной структуры с помощью сканирующей зондовой нанотомографии демонстрирует, что в объеме стенок макропор исследуемых матриксов существует трехмерная сеть сообщающихся пор и каналов размерами от 20 до 700 нм. Объемный коэффициент пористости стенок макропор составляет 22%, при этом объемная доля пор, взаимосвязанных между собой и соединяющихся в кластеры, составляет порядка 20% от объема всех пор.

Полученные результаты демонстрируют, что разработанный метод сканирующей зондовой нанотомографии может быть использован для визуализации и исследования трехмерных нативных наноструктур в объеме микро- и нанопористых полимерных биodeградируемых матриксов-кле-

точных носителей. Использование метода сканирующей зондовой нанотомографии для анализа характеристик и топологии систем микро- и нанопор позволит повысить эффективность разработок по созданию новых биосовместимых и биodeградируемых материалов с заданными физико-химическими и биологическими характеристиками.

*Коллектив авторов выражает благодарность Владимиру Богушу (ФГУП «ГосНИИГенетика») за предоставленные образцы спидроина I для получения матриксов.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Pilhofer M, Ladinsky MS, McDowall AW, Jensen GJ.* Bacterial TEM: new insights from cryo-microscopy. *Methods Cell Biol.* 2010; 96: 21–45. doi: 10.1016/S0091-679X(10)96002-0.
2. *Bouchet-Marquis C, Hoenger A.* Cryo-electron tomography on vitrified sections: a critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology. *Micron.* 2011; 42 (2): 152–162. doi: 10.1016/j.micron.2010.07.003.
3. *Matsko N.* Atomic force microscopy applied to study macromolecular content of embedded biological material. *Ultramicroscopy.* 2007; 107: 95–105. doi: 10.1016/j.ultramic.2006.05.009.
4. *Gallyamov MO.* Scanning Force Microscopy as Applied to Conformational Studies in Macromolecular Research. *Macromolecular Rapid Communications.* 2011; 32 (16): 1210–1246. doi: 10.1002/marc.201100150.
5. *Efimov AE, Tonevitsky AG, Ditttrich M, Matsko NB.* 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 (3): 207–217.
6. *Walther P, Müller M.* Biological ultrastructure as revealed by high resolution cryo-SEM of block faces after cryo-sectioning. *Journal of Microscopy.* 1999; 196 (3): 279–287.
7. *Alekseev A, Efimov A, Lu K, Loos J.* Three-dimensional electrical property reconstruction of conductive nanocomposites with nanometer resolution. *Advanced Materials.* 2009; 21 (48): 4915–4919.
8. *Mochalov KE, Efimov AE, Bobrovsky AY, Agapov II, Chistyakov AA, Oleinikov VA, 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. *Proceedings SPIE.* 2013; 8767: 876708. doi:10.1117/12.2017088.
9. *Mochalov KE, Efimov AE, Bobrovsky A, Agapov II, Chistyakov AA, Oleinikov VA et al.* Combined Scanning Probe Nanotomography and Optical Microspectroscopy: A Correlative Technique for 3D Characterization of Nanomaterials. *ACS Nano.* 2013; 7 (10): 8953–8962. doi: 10.1021/nn403448p.

10. Matsko N. Atomic force microscopy applied to study macromolecular content of embedded biological material. *Ultramicroscopy*. 2007; 107: 95–105.
11. Matsko N, Mueller M. AFM of biological material embedded in epoxy resin. *J. Struct. Biol.* 2004; 146: 334–343.
12. Василец ВН, Казбанов ИВ, Ефимов АЕ, Севастьянов ВИ. Разработка новых методов формирования имплантационных материалов с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2009; 9 (2): 47–53. Vasilets VN, Kazbanov IV, Efimov AE, Sevastianov VI. New methods for implant matrix formation based on electrospinning and bioprinting technologies. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2009; 9 (2): 47–53.
13. Efimov AE, Gnaegi H, Schaller R, Grogger W, Hofer F, Matsko NB. Analysis of native structure of soft materials by cryo scanning probe tomography. *Soft Matter*. 2012; 8: 9756–9760. doi:10.1039/c2sm26050f.
14. Bleeker MAK, Smid HM, Van Aelst AC, Van Loon JJA, Vet LEM. Antennal Sensilla of Two Parasitoid Wasps: A Comparative Scanning Electron Microscopy Study. *Microsc. Res. Techniq.* 2004; 63 (5): 266–273.
15. Mandal BB, Kundu SC. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 2009; 30: 2956–2965.
16. Gao J, Crapo PM, Wang Y. Macroporous elastomeric scaffolds with extensive micropores for soft tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12: 917–925.
17. Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, Hsien TY, Hou LT, Lai JY, Wang DM. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials*. 2004; 25: 129–138.
18. Zong X, Bien H, Chung CY, Yin L, Fang D, Hsiao BS et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*. 2005; 26: 5330–5338.
19. Moisenovich MM, Pustovalova O, Shackelford J, Vasiljeva TV, Druzhinina, TV, Kamenchuk YA et al. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds. *Biomaterials*. 2012; 33 (15): 3887–3898.
20. Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009; 4: 17–27.
21. Moisenovich MM, Pustovalova OL, Arhipova AY, Vasiljeva TV, Sokolova OS, Bogush VG et al. In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2011; 96 (1): 125–131.
22. Scher H, Zallen R. Critical density in percolation processes. *J. Chem. Phys.* 1970; 53: 3759–3761.
23. Hunt A, Ewing R. Percolation Theory for Flow in Porous Media. *Lect. Notes Phys.* Springer: Berlin Heidelberg, 2009; 771.

Статья поступила в редакцию 1.07.2014 г.