

Материалы для изучения роли рельефа поверхности имплантируемых конструкций в модулировании поведения клеток

Л. Ю. Басырева, М. Н. Чегренец, К. О. Сочилина, И. А. Будашов,
И. А. Грицкова, С. А. Гусев

Разработаны рельефные образования в диапазоне размеров 0,1 – 8 мкм, химический состав поверхности которых одинаков. Количественно показано, что в первые 6 часов культивирования клетки линии HeLa независимо от размеров рельефных образований хорошо распластываются и объединяются в ассоциаты, состоящие из нескольких клеток. Пролиферативная активность клеток линии HeLa на рельефных образованиях диаметром 8 мкм достоверно ниже, чем на ровной поверхности и рельефных образованиях диаметром 0,1 и 1,5 мкм. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии клетки линии HeLa на рельефных образованиях 0,1 и 1,5 мкм имеют большее количество отростков, чем клетки, расположенные на рельефе диаметром 8 мкм. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности влияния рельефных образований в диапазоне размеров 0,1 – 8 мкм на поверхности материалов для имплантации на структурно-функциональные свойства клеток.

Введение

В настоящее время в медицине широко используются различные материалы (металлы, полимеры и композитные материалы) для восстановления утраченных структур организма. Материалы могут использоваться как сами по себе, так и в комбинации с клетками (тканевая инженерия). Очевидно, что независимо от способа применения одним из центральных моментов интеграции конструкций из любого материала в организм является взаимодействие поверхности материала и клеток организма.

Сегодня ясно, что направленное влияние на поведение клеток невозможно без понимания основных закономерностей реакции клеток на химические, физические и геометрические характеристики поверхности. Химическим и физическим свойствам поверхности материалов традиционно уделяется большое внимание [1, 2].

Вместе с тем, только относительно недавно стали обращать пристальное внимание на топографию поверхности. Хотя еще в конце 30-х — начале 40-х годов Weiss P. сформулировал концепцию контактного регулирования формы и локомоции нейронов

в ответ на особенности топографических (рельефных) характеристик поверхности субстрата [3 – 5].

В настоящее время роль рельефных характеристик поверхности в регуляции поведения была показано для различных типов клеток: фибробластов [6 – 9], эндотелиальных клеток [10 – 12], клеток эпителия [8, 13], макрофагов [14, 15], нейтрофилов [14, 16] и др.

При этом показано, что особенности топографии поверхности влияют не только на упаковку F-актина [6, 11, 12, 17, 18] и винкулина в фокальных контактах [11, 12, 18], но и стимулируют пролиферацию [19], синтез белков [20], секрецию протеиназ [21] и фагоцитоз [15] в различных клетках.

Вместе с тем, несмотря на достигнутые результаты, многие вопросы, связанные с механизмом, благодаря которому клетки способны чувствовать особенности топографии поверхности и адекватно отвечать на них, остаются не до конца понятыми.

В значительной степени это связано с трудностями в получении рельефных образований различного размера (кривизны), но с одинаковыми химическими и физическими свойствами поверхности материалов, пригодных для культивирования

клеток. В связи с этим, мы в настоящем исследовании разработали методику получения пленок, сформированных из монослоя плотно упакованных микросфер диаметром от 0,1 до 8 мкм, закрепленных на поверхности стекла, и провели изучение распластывания и пролиферации клеток линии HeLa на полученных поверхностях.

Материал и методы исследования

Реагенты

В работе были использованы: хлорид натрия, дигидрофосфат натрия и гидрофосфат натрия, диметил сульфоксид, бычий сывороточный альбумин (БСА), сахароза, гексаметилдисилазан, поливиниловый спирт (м.в.100000), оксид осмия (OsO_4) (Сигма, США); среда DMEM для культивирования клеток, трипсин, буфер Хенкса (Панэко, Россия); сыворотка эмбрионов коров (БиолоТ, Россия); глутаровый альдегид (Реанал, Болгария); какодилат натрия (BDH Chemical, Англия), дивинилбензол (Aldrich США), Cell Tracker Red (Molecular Probes, OR). Стирол (технический продукт) очищали от стабилизатора и использовали фракцию, кипящую при 41°C (10 мм Hg столба), $n_d^{20} = 1,5450$, $d_4^{20} = 0,906$ г/см³. Персульфат калия марки “ХЧ” использовали без дополнительной очистки, содержание активного вещества составляло 99,9%. Перекись бензоила (технический продукт) получали двукратным осаждением метиловым спиртом из раствора в хлороформе, очищенный продукт содержал 99,6% активной перекиси. ПДС — альфа-(карбокситил)-омега-(триметилсилокси) полидиметилсилоксан синтезирован в ИНЭОС РАН, $n_d^{20} = 1,4105$, вязкость $\rho_d^{25} = 35$ спз.

Культура клеток

Клетки линии HeLa (клетки эпителиоидной карциномы человека) выращивали на среде DMEM с 10% сывороткой эмбрионов коров в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C. Жизнеспособность клеток составляла не менее 98 %.

Клетки рассевали в 24-луночные плашки, на дне ячеек которых располагались образцы пленок. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C в течение 1, 3, 6 и 24 ч.

Полимерные микросферы

Полистирольные микросферы диаметром 1,5 мкм получали методом микроэмульсионной

полимеризации стирола, инициированной персульфатом калия, в присутствии ПДС. Объемное соотношение стирол : вода составляло 1:10 соответственно, концентрация персульфата калия и ПДС составляла 1 масс.% в расчете на стирол. Полимеризацию проводили при 80°C, конверсия стирола составляла 99%, м.в. составлял $2,4 \cdot 10^5$. Полимерную суспензию очищали от непрореагировавших продуктов, пропуская дважды через фильтрационную колонку.

Сшитые полистирольные микросферы диаметром 8 мкм получали методом затравочной полимеризации из частиц затравки размером 1,5 мкм. Затравки (1 г) суспендировали в 200 мл дистиллированной воды, содержащей 1,5 г додецилсульфата натрия. После этого по каплям добавляли 160 мл стирол-дивинилбензольного раствора с растворенным инициатором (2 г перекиси бензоила). Набухание частиц происходило в течение 6 ч при медленном перемешивании. Содержание сшивающего агента дивинилбензола составляло 8% на стирол. После полного поглощения мономерной смеси частицами добавляли 350 мл 3%-ного раствора поливинилового спирта в дистиллированной воде. Полимеризацию вели в течение 4 ч при 82°C.

Полимерные сферы промывали 3 раза горячей водой и суспендировали в смеси этанол – вода в соотношении 1:1

Получение монослоев из плотно упакованных полимерных микросфер

Монослои из плотно упакованных полимерных микросфер диаметром 1,5 мкм получали по методу O. Stranik и др. [22]. Покровное стекло погружали в 10%-ную суспензию полимерных микросфер и затем вынимали из суспензии со скоростью 1 – 10 мкм/с и высушивали при комнатной температуре.

Монослои из плотно упакованных полимерных микросфер диаметром 8 мкм получали по модифицированной методике K. Fujimoto и др. [23]. 10 мг полимерных микросфер диаметром 8 мкм суспендировали в 1 мл этанола. После этого суспензии наслаивали на поверхность дистиллированной воды в чашке Петри таким образом, чтобы достигалась максимальная плотность упаковки микросфер в слое. Затем монослой микросфер переносили на покровное стекло и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Получение микрорельефа диаметром 0,1 мкм

На поверхность покровного стекла с помощью диодного спуттера (EIKO IB 3, Япония) напыляли слой

золота толщиной 3,5 нм, после чего пленки в течение 15 мин прогревали при температуре 300°C [25].

Получение однородной по химическому составу поверхности для всех пленок

На поверхность всех пленок с помощью термического испарения в вакууме в аппарате “Вакуумный испаритель” (Hitachi, Япония) напыляли аморфный углерод при давлении 10^{-5} – 10^{-6} торр и токе 30 А в течение 30 – 40 с. Стерилизовали полученные пленки в 70% этаноле.

Флуоресцентная микроскопия

Для флуоресцентной микроскопии образцы промывали буфером Хенкса, фиксировали 3,5% раствором параформальдегида на буфере Хенкса в течение 24 ч. Окрашивали красителем Cell Tracker Red, промывали в буфере Хенкса.

После этого образцы помещали в микрокамеру с буфером Хенкса и анализировали с помощью лазерного конфокального флуоресцентного микроскопа Eclips E 800 (Nikon, Япония).

Количественный анализ изображений проводили с помощью программы Image J. Обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2003 в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики [25]. В таблицах представлены данные средних значений параметра X с ошибкой среднего значения m . Оценку различий между двумя средними значениями проводили по t критерию Стьюдента. Различия считали достоверными, если значение уровня значимости P было $< 0,05$.

Электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы промывали буфером Хенкса, фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 24 ч. После обезвоживания образцы высушивали с помощью гексаметилдисилазана и покрывали слоем золота (10 нм) в аппарате ЕІКО ІВ 3 (Япония) [26–28].

Анализ полученных препаратов проводили в сканирующем электронном микроскопе S-570 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Атомно-силовая микроскопия

Исследование рельефа поверхности проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P 47 (НТ-МДТ, Россия) в режиме прерывисто-контактной атомно-силовой микроскопии на воздухе. В работе использовали зондовые датчики серии NSG 11 фирмы НТ-МДТ с номинальными жесткостью балок 5,5 и 11,5 Н/м и резонансной частотой 150 и 255 кГц, соответственно. Радиус закругления окончания зонда составлял не более 10 нм, конический угол при вершине зонда — 22°. Сканирование проводили с частотой около 1 Гц с разрешением 512 × 512 точек.

Результаты исследования

Анализ данных, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии, показал, что при прогревании золотой пленки толщиной 3,5 нм происходит формирование рельефных образований диаметром 0,05 – 0,1 мкм и высотой 0,02 мкм с закругленной поверхностью. Рельефные образования располо-

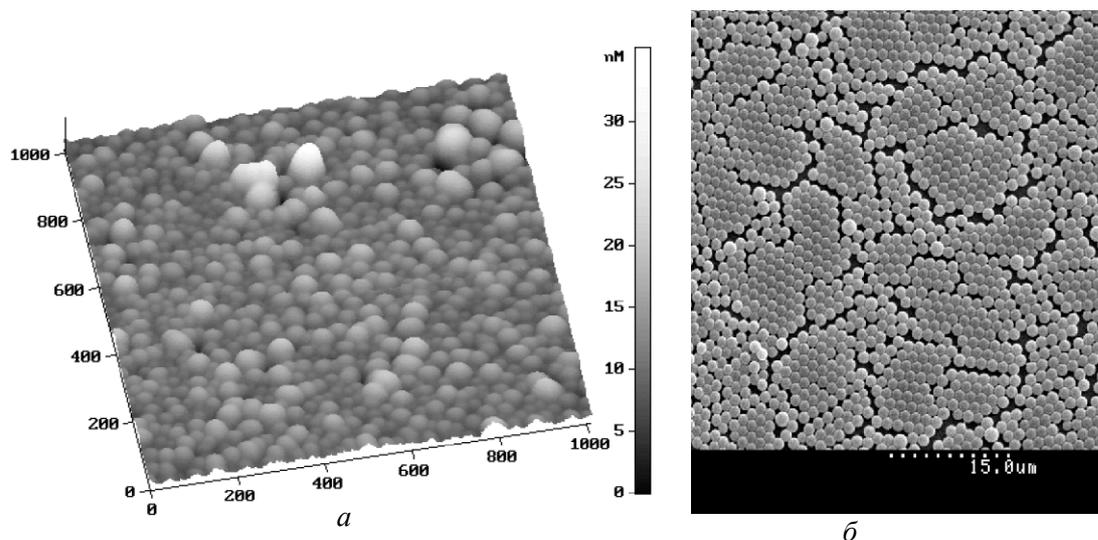


Рис. 1. Рельефные образования диаметром 0,1 (а) и 1,5 мкм (б).

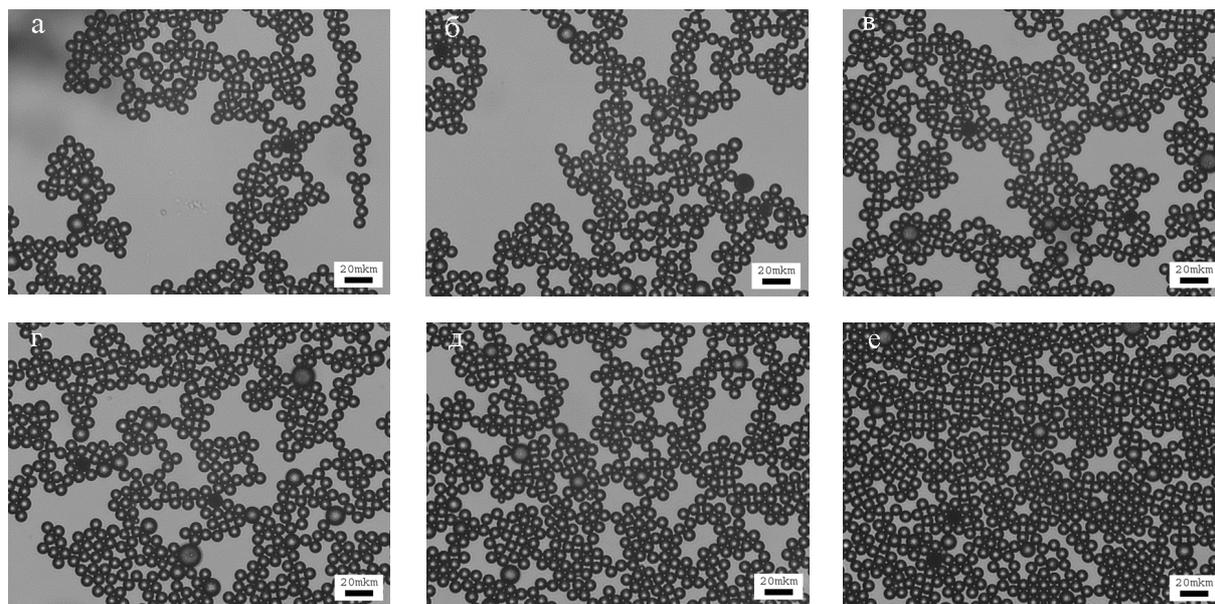


Рис. 2. Изменение упаковки микросфер в пленке, полученной при добавлении различных объемов 10% суспензии на поверхность воды в чашке Петри (объектив $\times 25$, диаметр микросфер 8 мкм).

жены случайным образом вплотную друг к другу (рис. 1а).

Анализ пленок из суспензии полимерных микросфер диаметром 1,5 мкм с помощью растровой электронной микроскопии показал, что при использовании предложенной методики получают вполне удовлетворительные пленки, состоящие из плотно упакованных частиц. При этом имеются участки с гексагональной упаковкой микросфер, в которых находится от 30 до 100 микросфер. Эти участки прилегают друг к другу, формируя линии, вдоль которых гексагональная упаковка нарушена (рис. 1б). Площадь, не занятая микросферами, составляет около 15%.

Анализ пленок, получаемых с помощью на-слоения 10%-ной суспензии 8 мкм микросфер на поверхность раздела вода/воздух в чашке Петри с внутренним диаметром 38 мм, показал, что по мере увеличения количества суспензии, попавшей на поверхность, происходит уменьшение площади поверхности, не занятой микросферами (рис. 2). Расчеты показывают, что при добавлении 50 мкл суспензии микросферы должны полностью занять поверхность воды в чашке. При добавлении 60 мкл 10%-ной суспензии на поверхность чашки Петри с внутренним диаметром 38 мм, величина свободного пространства составляет около 14%, и дальнейшее увеличение количества микросфер, добавленных на поверхность раздела вода/воздух, не приводит к росту плотности упаковки микросфер в слое (рис. 3). Это

свидетельствует, по-видимому, о том, что избыточная часть микросфер формирует второй слой или уходит в воду.

Определение краевого угла смачивания на полученных поверхностях показало, что на стекле угол смачивания равен $35^\circ \pm 6^\circ$; на поверхности стекла, покрытого углеродом, и на поверхности приготовленных рельефных образований, покрытых углеродом, угол смачивания варьировался от 89° до 94° и в среднем оказался равен $92^\circ \pm 7^\circ$.

Анализ поведения клеток линии HeLa показал, что в течение первых 3 ч после посадки на стекло отмечается увеличение доли площади, занимаемой клетками на субстрате. К 6 ч доля площади, занимаемая клетками, не изменяется (табл. 1).

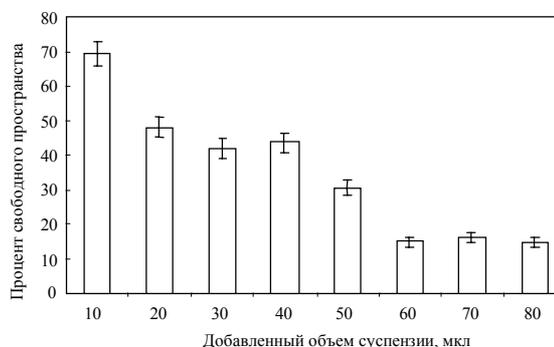


Рис. 3. Изменение величины площади, не занятой микросферами ($d = 8$ мкм), в зависимости от объема добавленной 10% суспензии на поверхность воды в чашке Петри.

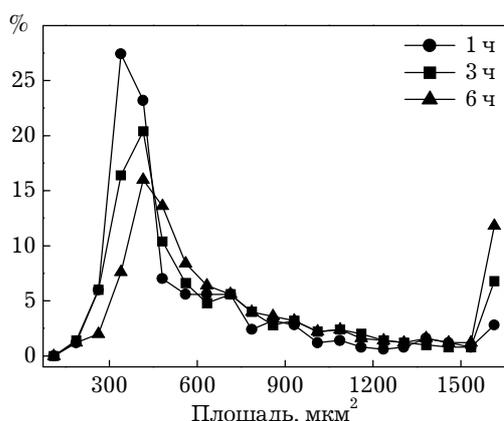


Рис. 4. Распределение площадей (мкм²) клеток линии HeLa в течение 6 ч культивирования на стекле.

Таблица 1

Изменение доли площади поверхности ($X(m)$, %), занимаемой клетками, в течение 6 ч культивирования на различных поверхностях

Тип поверхности	$X(m)$, %		
	1 ч	3 ч	6 ч
Стекло	7,37(0,75)	12,92(0,91)	13,78(1,2)
Углерод на стекле	8,64(1,24)	13,62(1,98)	15,66(1,86)
0,1 мкм	4,76(0,43)	14,45(1,3)	16,54(1,7)
1,5 мкм	12,59 (1,13)	28,46(3,13)	17,79(1,42)
8 мкм	6,14(0,67)	11,48(1,0)	21,31(1,7)

X — среднее значение параметра, m — ошибка среднего значения.

Изменение доли площади, занятой клетками на стекле, свидетельствует о том, что распластывание клеток линии HeLa практически завершается за 3 ч.

Анализ распределения измеренных площадей клеток линии HeLa на поверхности стекла показывает, что по сравнению с одним часом к трем часам происходит смещение модального класса со значения 226 – 300 мкм² до значения 301 – 375 мкм². К 6 часам по сравнению с 3 часами сдвига модального класса не наблюдается (рис. 4). Эти данные корреспондируются с данными по изменению доли площади, занимаемой клетками, и указывают на то, что распластывание клеток линии HeLa на стекле завершается за 3 часа и далее степень распланированности клеток не изменяется.

Кроме того, в течение 6 ч наблюдается постепенное уменьшение относительного количества измеренных площадей модальных классов с 27 до 16 % и увеличение относительных частот площадей больше 1500 мкм² с 3 до 12% (табл. 2).

Поскольку очевидно, что площади более 1500 мкм² представляют собой ассоциаты из не-

Таблица 2

Изменение относительной частоты площадей больше 1500 мкм² клеток линии HeLa при культивировании в течение 6 часов на различных подложках ($X(m)$)

Тип поверхности	$X(m)$, %		
	1 ч	3 ч	6 ч
Стекло	2,97(0,27)	6,62(0,36)	12,12(0,48)
Углерод на стекле	5,62(0,36)	14,93(0,50)	19,43(0,51)
0,1 мкм	2,26(0,23)	18,81(0,55)	22,9(,54)
1,5 мкм	8,62(0,44)	19,21(0,59)	16,99(0,48)
8 мкм	2,95(0,26)	11,64(0,47)	23,41(0,54)

X — среднее значение параметра, m — ошибка среднего значения.

скольких клеток (более трех), можно предположить, что на поверхности стекла клетки линии HeLa в течение первых 3-х ч распластываются и объединяются в ассоциаты, а через 3 ч распластывание прекращается и наблюдается только объединение клеток между собой.

Аналогичные данные были получены нами для подложки, которая представляет собой стекло, покрытое углеродной пленкой, и для подложки с рельефными образованиями диаметром 0,1 мкм.

На подложке с рельефными образованиями диаметром 1,5 мкм доля площади, занятая клетками, сначала увеличивается к 3 ч с 12 до 28%, а затем к 6 ч уменьшается до 18% (табл. 1).

На подложке с рельефными образованиями диаметром 8 мкм доля площади, занятая клетками, увеличивается к 3 ч до 11%, а к 6 ч до 20% (табл.1).

Закономерности изменения распределения площадей клеток на подложках с рельефными образованиями диаметром 1,5 и 8 мкм оказались сходны с таковыми, описанными выше для стекла, углеродной пленки на стекле и подложки с рельефными образованиями диаметром 0,1 мкм. В течение 6 ч культивирования отмечается смещение значений модальных классов в сторону больших величин, уменьшение относительных частот модальных классов и увеличение относительных частот площадей более 1500 мкм² (табл. 2).

Таблица 3

Площадь поверхности в % ($X(m)$), занятой клетками через 6 и 24 ч после начала инкубации

Тип поверхности	$X(m)$, %		
	6 ч	24 ч	P (24 ч – 6 ч)
Стекло	18,3(6,5)	60,4(6,4)	< 0,001
Углерод на стекле	19,8(6,8)	51,6(6,1)	< 0,001
0,1 мкм	19,8(6,7)	50,2(5,8)	< 0,001
1,5 мкм	22,2(6,2)	46,0(5,3)	< 0,001
8 мкм	16,9(5,9)	31,3(6,2)*	нд

X — среднее значение параметра, m — ошибка среднего значения, P — уровень значимости, нд — недостоверно.

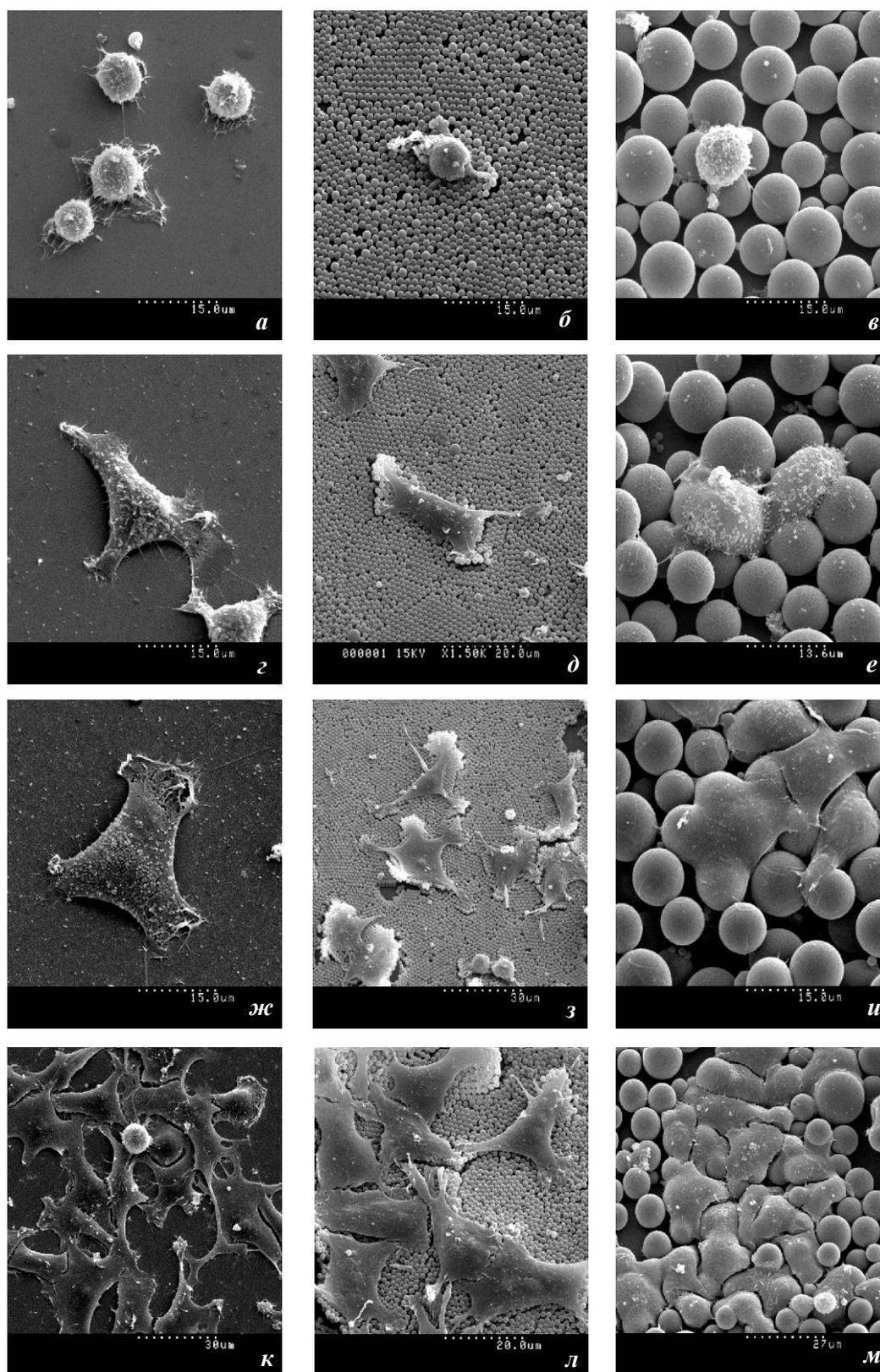


Рис. 5. Стереультраструктура клеток линии HeLa на рельефных образованиях 0,1 мкм (а, з, ж, к), 1,5 мкм (б, д, з, л) и 8 мкм (в, е, и, м) через 1 ч (а, б, в), 3 ч (z, д, е), 6 ч (ж, з, и) и 24 ч (к, л, м).

Проллиферативную активность клеток линии HeLa оценивали, сравнивая процент площади поверхности, занятой клетками через 6 ч после начала инкубации, с процентом площади, занятой клетками после 24 ч инкубации.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что через 6 ч после начала инкубации площадь, занимаемая клетками на различных субстратах, статистически достоверно не различается и составляет 17–20 % (табл. 3). Через 24 ч после начала инкубации площадь, занимаемая клетками на стекле, на ровной углеродной поверхности, на рельефных образованиях диаметром 0,1 и 1,5 мкм, статистически достоверно увеличивается, тогда как на поверхности микросфер диаметром 8 мкм увеличение площади, занимаемой клетками, минимально и статистически недостоверно (табл. 3).

Таким образом, из всех исследованных поверхностей минимальные темпы деления наблюдаются на поверхности микросфер диаметром 8 мкм. На ровной поверхности, на поверхности с рельефными образованиями диаметром 0,1 и 1,5 мкм статистически достоверных различий в пролиферативной активности клеток обнаружить не удалось.

Растровая электронная микроскопия показала, что клетки линии HeLa распластаются на исследованных поверхностях по-разному (рис. 5). Анализ электронно-микроскопических данных свидетельствует о том, что клетки линии HeLa, расположенные на микросферах 0,1 и 1,5 мкм, имеют большее количество отростков, чем клетки, расположенные на микросферах диаметром 8 мкм.

Выводы

1. Разработан ряд подходов к созданию рельефных образований в диапазоне размеров от 0,1 до 8 мкм, химический состав поверхности которых одинаков.

2. Распластывание и объединение клеток в ассоциаты на исследованных рельефных образованиях не отличаются от таковых для клеток, выращенных на ровной поверхности.

3. Динамика роста клеток на рельефных образованиях размером 0,1 и 1,5 мкм была близка к скорости роста на ровной поверхности.

4. На рельефных образованиях размером 8 мкм отмечалось статистически достоверное снижение скорости роста клеток.

5. Стереоультраструктурная организация клеток, выращенных на рельефных образованиях размером 8 мкм, отличалась от таковой у клеток на рельефных образованиях 0,1 и 1,5 мкм.

6. Полученные данные позволяют предположить, что рельефные образования в диапазоне размеров 0,1 – 8 мкм на поверхности различных материалов для имплантации могут оказывать влияние на структурно-функциональные свойства клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11Г-47-358.

Литература

1. Curtis A.S., Forrester J.V. The competitive effects of serum proteins on cell adhesion. *J. Cell. Sci.* 1984, v.71, p.17 – 35.
2. Fauchaux N., Schweiss R., Lutzow K., Werner C., Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials.* 2004, v.25, p.2721 – 2730.
3. Weiss P. In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exp. Zool.* 1934, v.68, p.393 – 448.
4. Weiss P. Nerve pattern: The mechanics of nerve growth. *Growth* 1941, v.5, p.163 – 203.
5. Weiss P. Experiments on cell and axon orientation in vitro: The role of colloidal exudates in tissue organization. *J. Exp. Zool.* 1945, v.68, p.353 – 448.
6. den Braber E.T., de Ruijter J.E., Ginsel L.A., von Recum A.F., Jansen J.A. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed. Mater. Res.* 1998, v.40, p.291 – 300.
7. Dunn G.A., Heath J.P. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp. Cell Res.* 1976, v.101, p.1 – 14.
8. Ohara P, Buck R. Contact guidance in vitro: A light, transmission, and scanning electron microscopic study. *Exp. Cell Res.* 1979, v.121, p.235 – 249.
9. den Braber E.T., de Ruijter J.E., Ginsel L.A., von Recum A.E., Jansen J.A. Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials.* 1996, v.17, p.2037 – 2044.
10. Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science.* 1997, v.276, p.1425 – 1428.
11. van Kooten T.G., von Recum A.F. Cell adhesion to textured silicone surfaces: The influence of time of adhesion and texture on focal contact and fibronectin fibril formation. *Tissue Eng.* 1999, v.5, p.223 – 240.
12. Jiang X., Takayama S., Qian X., Ostuni E., Wu H., Bowden N., LeDuc P., Ingber D., Whitesides G.M. Controlling mammalian cell spreading and cytoskeletal arrangement with conveniently fabricated continuous wavy features on poly(dimethylsiloxane). *Langmuir.* 2002, v.18, p.3273 – 3280.
13. Teixeira A.I., Abrams G.A., Murphy C.J., Nealey P.F. Cell behavior on lithographically defined nanostructured

- substrates. J. Vac. Sci. Technol. B. 2003, v.21, p.683 – 687.
14. Meyle J., Gueltig K., Nisch W. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. J. Biomed. Mater. Res. 1995, v.29, p.81 – 88.
 15. Wo'ciak-Stothard B., Curtis A., Monaghan W., Macdonald K., Wilkinson C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. Exp. Cell Res. 1996, v.223, p.426 – 435.
 16. Tan J., Saltzman W.M. Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. Biomaterials. 2002, v.23, p.3215 – 3225.
 17. Britland S., Morgan H., Wojciak-Stothard B., Riehle M., Curtis A., Wilkinson C. Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells. Exp. Cell Res. 1996, v.228, p.313 – 325.
 18. Oakley C., Brunette D.M. The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. J. Cell Sci. 1993, v.106, p.343 – 354.
 19. Singhvi R., Stephanopoulos G., Wang D.I.C. Review: Effects of substratum morphology on cell physiology. Biotech. Bioeng. 1994, v.43, p.764 – 771.
 20. Chesmel K.D., Clark C.C., Brighton C.T., Black J. Culture response to chemical and morphological aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. J. Biomed. Mater. Res. 1995, v.29, p.1101 – 1110.
 21. Hong H.L., Brunette D.M. Effect of cell shape on proteinase secretion by epithelial cells. J. Cell Sci. 2004, v.87, p.259 – 267.
 22. Stranik O., McEvoy H.M., McDonagh C., MacCraith B.D. Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications. Sensors and Actuators. B. 2005, v.107, p.148 – 153.
 23. Fujimoto K., Nakahama K., Shidara M., Kawaguchi H., Preparation of unsymmetrical microspheres at the interfaces. Langmuir. 1999, v.15, p.4630 – 4635.
 24. Albrecht-Buehler G. Filopodia of spreading 3T3 cells. Do they have a substrate? Exploring function? The Journal of cell biology. 1976, v.69, p.275 – 286.
 25. Лакин Г.Ф. Биометрия. «Высшая школа», Москва, 1973, 243 с.
 26. Nation J.L. A new method using hexamethyl-disilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. Stain Technol. 1983, v.58, p.347 – 351.
 27. Heegaard S., Jensen O.A., Prause J.U. Structure of the vitread face of the monkey optic disc (Macaca mulatta). SEM on frozen resin-cracked optic nerveheads supplemented by TEM and immunohistochemistry. Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1988, v.226, no.4, p. 377 – 383.
 28. Slizova D., Krs O., Pospisilova B. Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron microscopy. J. Endovasc. Ther. 2003, v.10, no.2, p.285 – 287.

Басырева Лиля Юрьевна — ГУ НИИ Физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, кандидат химических наук. Специалист в области химии высокомолекулярных соединений.

Чегренец Мария Николаевна — ГУ Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, аспирант. Специалист в области химии высокомолекулярных соединений.

Будашов Игорь Анатольевич — ГУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, кандидат биологических наук. Специалист в области биохимии

Сочилина Ксения Очоловна — АНО «Синтез полимерных сорбентов», кандидат химических наук. Специалист в области химии полимеров.

Грицкова Инесса Александровна — Московская Государственная Академия Тонкой Химической Технологии им. М.В.Ломоносова, доктор химических наук, профессор. Специалист в области химии высокомолекулярных соединений.

Гусев Сергей Андреевич — ГУ НИИ Физико-химической медицины Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, доктор медицинских наук, профессор. Специалист в области гистологии и эмбриологии.