

АГАПОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

**ОПТИЧЕСКАЯ И ЗОНДОВАЯ НАНОТОМОГРАФИЯ
ДЛЯ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА МИКРО- И МАКРОНОСИТЕЛЕЙ,
КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Доктор биологических наук

Ефимов Антон Евгеньевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Морозов Сергей Георгиевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Шайтан Константин Вольдемарович – доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Манухов Илья Владимирович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)».

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «17» декабря 2024 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и на сайте <http://www.transpl.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Развитие современных направлений биоинженерии, регенеративной медицины и структурной биологии требует разработки новых технологий и методик, позволяющих с высоким разрешением анализировать трехмерные структуры биоматериалов и биоинженерных конструкций, а также структурные особенности клеток и тканей на микро- и наноуровне.

Фундаментальные наномасштабные ультраструктурные исследования необходимы для разработки и создания новых микро- и макроносителей, материалов и изделий для регенеративной медицины, систем доставки биологически активных веществ, техник нанодиагностики клеток и тканей различных органов, что, в свою очередь, требует создания специфического инструментария, который бы позволил изучать, в частности, трехмерное распределение флуоресцентных органелл-специфических маркеров в клетках и биоинженерных конструкциях с разрешением, превосходящим разрешение стандартных оптических методик.

К сожалению, большинство разработанных на данный момент методов ультрамикроскопии обладают рядом существенных недостатков. Методы электронной микроскопии высокого разрешения позволяют исследовать ультраструктуру клеточных компонентов с разрешением от десятков до единиц нанометров, в том числе трехмерные структуры, с применением техник сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком или сканирующей электронной микроскопии поверхности после серийных срезов. Однако эти методики не обладают свойствами флуоресцентной спектроскопии (микроспектроскопии), т.е. не дают возможности проводить наномасштабный анализ распределения флуоресцентных маркеров. Методы оптической наноскопии в большинстве случаев требуют специфического окрашивания объекта и позволяют строить пространственное распределение специфического красителя с высоким разрешением, но не в трехмерном пространстве в корреляции с ультраструктурными данными.

Нами было высказано предположение, что использование и развитие разработанных в нашем Центре подходов сканирующей зондовой нанотомографии в сочетании с методами флуоресцентной оптической микроскопии высокого разрешения *in situ* позволит строить карты наноструктурных распределений флуоресцентных маркеров или иных оптических и спектральных свойств, что чрезвычайно значимо для решения широкого спектра биологических и медицинских задач. Методики оптической и зондовой нанотомографии могут применяться для объемного спектрального и ультраструктурного исследования особенностей различных клеток и тканей и их взаимодействия с биополимерными наноматериалами, а также

зависимости внутриклеточного трафика препаратов от ультраструктуры клеток. Последовательное объединение полученных данных позволит получить трехмерную модель исследуемого объекта на основе морфологических и оптических (распределение флуоресцентных маркеров) характеристик.

Разработка специализированного аппаратного комплекса для реализации метода флуоресцентной оптической нанотомографии на основе объединения флуоресцентной микроскопии и ультрамикротомии как метода выполнения сверхтонких срезов может стать основой как для развития уникальных методов исследования широкого ряда искусственных и биологических объектов (медицинские изделия, включая микро- и макроносители лекарственных веществ и клеток, клетки и ткани), так и для разработки биомедицинских продуктов и технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины на их основе.

Степень разработанности темы исследования

Выполненные в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России) исследования, направленные на разработку технологии сканирующей зондовой нанотомографии, показали эффективность применения метода сканирующей зондовой нанотомографии для трехмерного анализа микро- и наноструктуры биологических объектов и материалов. Были разработаны методические подходы к изучению микро- и наноструктур для задач регенеративной медицины. Однако реализация и эффективность применения комбинированных подходов флуоресцентной оптической нанотомографии и сканирующей зондовой нанотомографии для задач исследования микро- и макроносителей, клеток и тканей оставалась под вопросом, что и послужило основанием для выполнения настоящей работы.

Цель исследования

Целью работы является разработка аппаратного-методического комплекса флуоресцентной оптической нанотомографии и доказательство эффективности его применения для трехмерного анализа микро- и наноструктуры биоматериалов, клеток и тканей.

Задачи исследования

1. Разработать экспериментальный образец аппаратного-методического комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии.
2. Доказать эффективность разработанного метода флуоресцентной оптической нанотомографии на примере наноструктурного анализа тканей печени и нервной ткани.
3. Проанализировать наноструктуру полиэлектролитных микрокапсул с магнитными наночастицами и флуоресцентными нанокристаллами, предназначенных для медицинской тераностики, методами зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии.
4. На основе зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии разработать методику трехмерного анализа внутриклеточного распределения цитостатика (доксорубицина), характер которого влияет на активность систем доставки противоопухолевых препаратов.
5. Охарактеризовать особенности трехмерной наноструктуры скаффолдов на основе фиброина шелка и фрагментов внеклеточного матрикса печени человека, обладающих высоким регенеративным потенциалом.

Научная новизна

Впервые создан уникальный экспериментальный аппаратный комплекс флуоресцентной оптической нанотомографии, проанализированы возможности объединения методов флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ультрамикротомии в рамках одного устройства, и разработан эффективный алгоритм структурного анализа биомедицинских микро- и макроносителей, клеток и тканей.

Впервые с использованием разработанных методик флуоресцентной оптической и зондовой нанотомографии получены данные о трехмерных ультраструктурных характеристиках микро- и макроносителей: полиэлектролитных микрокапсул с магнитными наночастицами и флуоресцентными нанокристаллами и скаффолдов на основе фиброина шелка и фрагментов внеклеточного матрикса печени человека, а также культивированных на них клеток, и проанализировано их влияние на биологические и функциональные свойства данных объектов. Экспериментально продемонстрирован высокий регенеративный потенциал полученных скаффолдов *in vivo*.

Впервые с применением разработанных методик флуоресцентной оптической и зондовой нанотомографии исследованы особенности внутриклеточного распределения доксорубицина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Установлено, что метод флуоресцентной оптической нанотомографии позволяет повысить эффективность и достоверность анализа трехмерной ультраструктуры ткани печени крысы и нервной ткани мыши.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработанный экспериментальный приборный комплекс и методики флуоресцентной оптической нанотомографии дают возможность с наномасштабным разрешением анализировать трехмерные распределения флуоресцентных маркеров в полимерных микро- и макроносителях, клетках и тканях.

Анализ трехмерной наноструктуры и регенеративного потенциала конструкций на основе фиброина шелка и внеклеточного матрикса печени человека позволяет рекомендовать данные изделия для проведения доклинических исследований с целью их использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Разработанные методы анализа взаимных пространственных распределений магнитных наночастиц и полупроводниковых нанокристаллов в полиэлектролитных микрокапсулах с применением подходов флуоресцентной оптической и зондовой нанотомографии могут использоваться для контроля функциональных свойств при разработке флуоресцентных магнитных микрокапсул для задач медицинской тераностики и адресной доставки лекарственных препаратов.

Разработанные подходы к оценке трехмерных внутриклеточных распределений цитостатиков могут быть использованы для повышения эффективности новых лекарственных препаратов и средств их доставки.

Результаты анализа трехмерной структуры ткани печени крысы и нервной ткани мыши могут быть использованы при разработке новых диагностических подходов, основанных на анализе наноструктурных патологических изменений в клетках и тканях.

Методология и методы исследования

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

1. Метод сканирующей зондовой нанотомографии.
2. Методы оптической флуоресцентной микроскопии и нанотомографии.

3. Методы трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.
4. Метод магнитно-силовой микроскопии.
5. Методы культивирования клеточных культур.
6. Метод электроспиннинга.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный экспериментальный аппаратно-методический комплекс для флуоресцентной оптической нанотомографии может быть эффективно использован для структурного анализа микро- и макроносителей, клеток и тканей.

2. Интеграция методов флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ультрамикротомии с использованием алмазного ножа ультрамикротомы в качестве оптического элемента позволяет реконструировать трехмерные распределения флуоресцентных маркеров в объеме исследуемых объектов с высоким (до 150 нм) разрешением по глубине.

3. Использование технологии флуоресцентной оптической нанотомографии *in situ* повышает точность и достоверность анализа трехмерных распределений флуоресцентных маркеров в ткани печени и нервной ткани.

4. Комбинация подходов зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии позволяет охарактеризовать трехмерное внутриклеточное распределение доксорубина.

5. Трехмерный структурный анализ биосовместимых скаффолдов на основе фиброина шелка и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека при помощи технологий сканирующей зондовой и оптической нанотомографии позволяет определять их наноразмерные морфологические параметры, влияющие на эффективность использования скаффолдов для тканевой инженерии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, использованием современных методов исследования и методов статистической обработки. Работа выполнена в рамках государственных заданий Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по темам

«Разработка технологии трехмерного нано- и микроструктурного анализа искусственных и нативных биологических объектов» (2015-2017 гг.), «Разработка технологии флуоресцентной сканирующей оптической-зондовой нанотомографии для высокоразрешающего корреляционного анализа структуры биоматериалов» (2018-2020 гг.) и «Разработка биodeградируемых изделий из натурального шелка для лечения раневых поверхностей и замещения дефектов ткани (LJPM-2024-0005)» (2024-2026 гг.).

Апробация работы состоялась 24 июня 2024 года на заседании объединенной научной конференции клинических, экспериментальных отделений и лабораторий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и кафедры трансплантологии и искусственных органов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на межинститутских семинарах ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России (2019 – 2023 гг.); 43 Конгрессе Европейского общества искусственных органов (ESAO), г. Варшава, Польша, 14-17 сентября 2016 г.; 45 Конгрессе ESAO, г. Мадрид, Испания, 12-15 сентября 2018 г.; IX Всероссийском съезде трансплантологов, Москва, Россия, 17-19 сентября 2018 г.; IV Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» 7–9 октября 2019 г; X Всероссийском съезде трансплантологов (с международным участием), Москва, 2020 г.; V Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (с международным участием), Москва, Россия, 27-29 сентября 2021 г.; XI Всероссийском съезде трансплантологов (с международным участием), Москва, Россия, 21-23 сентября 2022 г. и VI Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (с международным участием), Москва, Россия, 25-27 сентября 2023 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику лаборатории бионанотехнологий, лаборатории биотехнических систем и отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором лично сформулированы цели и задачи работы, разработаны концепция и технические решения экспериментального аппаратно-методического комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии, проведены экспериментальные исследования микро- и макроносителей, клеток и тканей с использованием технологий сканирующей зондовой и оптической нанотомографии, выполнена систематизация и обобщение полученных результатов.

Работы, опубликованные по теме диссертации

Результаты работы отражены в 41 публикации. По материалам диссертации опубликована 31 научная статья в рецензируемых журналах, индексируемых в международных наукометрических базах (Scopus, Web of Science, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), из них 17 опубликованы в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук. Получено 10 патентов РФ на изобретение.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, пяти глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, десяти выводов, практических рекомендаций, указателя используемой литературы, включающего 228 наименований, из них 22 отечественных и 206 зарубежных источников. Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста, содержит 3 формулы, 4 таблицы и 103 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Децеллюляризация печени человека и получение микрочастиц внеклеточного матрикса

Для изготовления микрочастиц была проведена децеллюляризация ткани печени человека. Данное исследование было выполнено в соответствии с принципами, установленными Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И.Шумакова» Минздрава России. Обезличенный фрагмент левой доли печени здорового донора, оставшийся после редукционной резекции трансплантата, произведённой при трансплантации реципиенту, измельчали ножницами до среднего размера частиц 5×5 мм, паренхиматозную ткань отделяли от сосудов и соединительной ткани. Децеллюляризацию печени производили человека путем инкубации частиц в лизирующих растворах с увеличивающейся концентрацией тритона X-100 (1%, 2%, 3%) [Bobrova M.M. 2021]. Сублимационное высушивание фрагментов децеллюляризованной печени производилось с использованием лиофильной сушки IIShinBioBase FD8580 (IIShinBioBase Co. Ltd., Южная Корея). Для получения микрочастиц полученную децеллюляризованную ткань печени человека измельчали в жидком азоте с использованием предварительно охлажденного пестика и ступки в течение 15 мин. Выделение необходимой фракции микрочастиц выполнялось путем осаждения и центрифугирования. Анализ фракций проводили методами оптической и сканирующей электронной микроскопии. Микрочастицы преобладающей фракции, выделенной в результате криоизмельчения внеклеточного матрикса в жидком азоте, имели средний размер менее 1 мкм. Для исследований скаффолдов методом флуоресцентной сканирующей оптически-зондовой нанотомографии микрочастицы внеклеточного матрикса предварительно были окрашены флуоресцентным красителем FITC. Автор благодарит М. М. Боброву и Л. А. Сафонову за содействие в получении биоматериалов на основе внеклеточного матрикса печени.

Изготовление образцов скаффолдов на основе фиброина шелка в виде плёнок

Скаффолды в виде пленок изготавливали на основе фиброина шелка методом полива. Фиброин для изготовления скаффолдов выделяли из шелковых нитей тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Для этого нити шелка диаметром 4-0 (Моснитки, Россия) в количестве 1 г разрезали на фрагменты по 0,5 см и отмывали от серицина. Для получения водного раствора фиброина в 1 мл спиртового раствора хлорида кальция, приготовленного из расчета 389 мг хлорида кальция, 388 мкл этанола и 544 мкл бидистиллированной воды на 1 мл, вносили навеску фиброина до конечной концентрации 130 мг/мл и нагревали на водяной бане при 40°C

в течение 4 часов. После растворения фиброина шелка производили четырехкратный диализ раствора против бидистиллированной воды. Для изготовления композитных скаффолдов в виде пленок разведенный водный раствор с концентрациями 20 мг/мл фиброина и 8 мг/мл суспензии микрочастиц децеллюляризованной ткани печени человека в суспензии высушивался на поверхности полированного тефлона в течение 2 суток при комнатной температуре. Затем полученные пленки инкубировали в течение 30 минут в 96% этаноле, отделяли от поверхности тефлона при помощи скальпеля и переносили в 70% этанол. При получении пленок на основе фиброина шелка без микрочастиц суспензия микрочастиц не вносилась.

Пробоподготовка образцов скаффолдов и матриксов для исследований методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии

Для изготовления препарата для исследований методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии (СОЗНТ) при помощи скальпеля вырезали фрагменты скаффолдов размером $1,5 \times 1,5$ мм. Далее для фиксации полученных образцов фрагменты скаффолдов помещали в 2,5% раствор глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (pH=7,4) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4°C. Затем производили три отмывки образцов в натрий-фосфатном буфере по 10 минут. После этого производили дегидратацию образцов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией. Далее производили три отмывки образцов в пропиленоксиде по 10 минут, а затем инкубировали в смеси пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образцы переносили в смесь пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем образцы заключали в эпоксидную смолу, инкубировали в термостате при 45°C в течение 12 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60°C. Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилентарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинотетил)-фенола (DMP-30).

Пробоподготовка образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 для исследований внутриклеточного распределения доксорубина методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии

Для подготовки образцов использовались клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) в 25 см² флаконах (SPL Lifesciences) в CO₂-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO₂, 5% CO₂, 37°C). Наблюдение за ростом клеток осуществляли с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия).

Для подготовки образцов клетки высаживали в 6-луночный планшет (300 тыс/лунка) и оставляли в CO₂-инкубаторе на ночь. Через 24 ч среду в лунках заменяли средой, содержащей краситель Calcein AM (15 мкг/мл, PBS), и инкубировали в течение 20 мин при 37°C, после чего удаляли раствор красителя и трижды промывали физраствором. К окрашенным клеткам добавляли доксорубицин (DOX) в концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение 15 мин и 1 ч соответственно. Несвязавшийся DOX удаляли трехкратной промывкой физраствором. Открепление клеток от планшета проводили раствором трипсин-ЭДТА, затем переносили клетки в пробирку и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Сухой остаток клеток ресуспендировали в 1 мл глутарового альдегида (2,5%, PBS) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4°C. После отмывки проводили дегидратацию образцов последовательной проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией и заливку образцов в эпоксидную среду по методике, описанной выше.

Анализ образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии

Трехмерный анализ образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ) выполнялся с использованием специализированного сканирующего зондового микроскопа (СЗМ), комбинированного с ультрамикротом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) для сканирующей зондовой нанотомографии. Последовательные срезы образцов толщиной 75 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 1.32 Гц с использованием кремниевых зондов-кантилеверов HA_HR (Tipsnano OÜ, Эстония) с резонансной частотой 380 кГц и радиусом кривизны острия <10 нм. Первичная обработка СЗМ изображений проводилась в программе Nova ImageAnalysis 1.0.26.1443 (NT-MDT, Москва). Трехмерные структуры образцов реконструировались и визуализировались на основе полученных серий последовательных СЗМ-изображений с использованием программного пакета ImagePro AMS 6.0 с опцией 3DConstructor (MediaCybernetics Inc, США).

Пробоподготовка образцов нервной ткани мыши для исследований методами флуоресцентной оптической нанотомографии

Для получения и пробоподготовки образцов нервной ткани в первую очередь были получены переживающие срезы гиппокампа мыши толщиной 350 мкм в растворе, соответствующем по составу спинномозговой жидкости, содержащем (в mM) 124 NaCl, 3 KCl, 2,4 CaCl₂, 2,4 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 10 глюкозы, pH 7,4. После периода восстановления срезы помещали в 4% раствор параформальдегида при температуре 36°C

сроком 90 мин, а затем дважды промывали по 5 раз в течение 15 минут в фосфатном буферном растворе (pH 7.4). Фиксированные срезы инкубировали в блок-растворе (PBS с 0,3% Triton-X100, 0,1% Tween20 и 5% раствором BSA) при комнатной температуре в течение 90 мин для пермеабиллизации. После пермеабиллизации срезы инкубировались в растворе первичных антител в PBS с 0,01% Tween 20 в течение 60 ч при 25°C, трижды промывались PBS (3 смены по 10 мин) и инкубировались с вторичными антителами в темноте в течение 2 ч в при 25 °C. При окрашивании астроцитов использовались первичные кроличьи моноклональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка GFAP (ABIN3043832), присутствующего только в астроцитах. В качестве вторичных антител были использованы антикроличьи поликлональные антитела Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, США, каталожный номер AB_2313584). Первично производилось обезвоживание окрашенных иммуногистохимически срезов гиппокампа мозга мышей путем последовательного инкубирования образцов срезов в этиловом спирте различной концентрации: 30-50-70% по 10 минут, 90% - 30 минут. Далее выполнялось инкубирование образца в смеси Lowicryl:этиловый спирт 95% (1:1) в течение 60 мин и в смеси Lowicryl:этиловый спирт 95% (2:1) в течение 2 часов при комнатной температуре. После удаления спирта образцы погружали в заливочную среду и помещали под УФ лампу 366 нм для полимеризации акрилатной среды. Полимеризация производилась в течение 48 часов. Полимеризованный образец извлекался из заливочных силиконовых капсул для дальнейших измерений методами оптической флуоресцентной нанотомографии.

Автор благодарит Д. О. Соловьеву (ИБХ РАН) за содействие в получении и подготовке образцов нервной ткани для исследований.

Статистическая обработка результатов исследования

Обработка полученных в ходе исследования данных выполнялась с применением стандартного пакета программ Microsoft Excel. При интерпретации данных использовали вычисленные среднеарифметические значения ($\langle X \rangle$) и среднеквадратические отклонения (SD) измеряемых величин. За исключением специально выделенных случаев, среднеарифметические значения и среднеквадратические отклонения рассчитывались на основе результатов 5-ти независимых измерений. Различия между полученными значениями принимались статистически значимыми в случаях, если вероятность ошибки по t-критерию Стьюдента составляла менее 5% ($p < 0,05$).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка экспериментального аппаратного комплекса для флуоресцентной оптической нанотомографии

Для получения адекватных трехмерных данных коррелятивными методами флуоресцентной и зондовой микроскопии с высоким разрешением необходимо соблюдение нескольких условий, определяющих соответствующие аппаратные и конструктивные решения для системы оптической и зондовой нанотомографии:

1. СЗМ-измерения необходимо проводить на поверхности блокфейса образца непосредственно после выполнения сверхтонкого среза. Только в данном случае можно избежать искажений морфологии поверхности, препятствующих прецизионным измерениям ее наноструктуры при помощи зонда СЗМ.

2. Так как поверхность блокфейса, измеряемая СЗМ, удаляется при каждом срезе, измерения методами СЗМ и флуоресцентной оптической микроскопии (ФОМ) надо проводить *in situ* одновременно в пределах одного цикла среза ультрамикротомом, с возможностью интерактивной корреляции и наведения зонда СЗМ на интересующие области по данным ФОМ, что невозможно выполнить при использовании существующей технологии Array Tomography – исследований массивов серийных срезов, предварительно собранных на ленты или пластины.

3. Исходя из вышеприведенных двух условий ФОМ-измерения после среза необходимо выполнять на поверхности изучаемого объекта с глубиной резкости, не превышающей толщину сверхтонкого среза.

Для решения вышеописанной задачи был разработан экспериментальный аппаратный комплекс флуоресцентной оптической нанотомографии, объединяющий специализированный флуоресцентный микроскоп и ультрамикротом в рамках одного устройства. Данный комплекс позволяет исследовать трехмерные распределения флуоресцентных маркеров в двух основных режимах: режиме анализа поверхности блока образца после среза методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF) с использованием алмазного ножа ультрамикротомом в качестве TIRF-призмы и режиме флуоресцентного анализа последовательных срезов образца *in situ* на поверхности воды ванночке алмазного ножа ультрамикротомом. Конструктивная модель специализированного прямого флуоресцентного микроскопа и системы его прецизионного позиционирования по трем координатам и по углу наклона оптической оси представлена на рисунке 1.

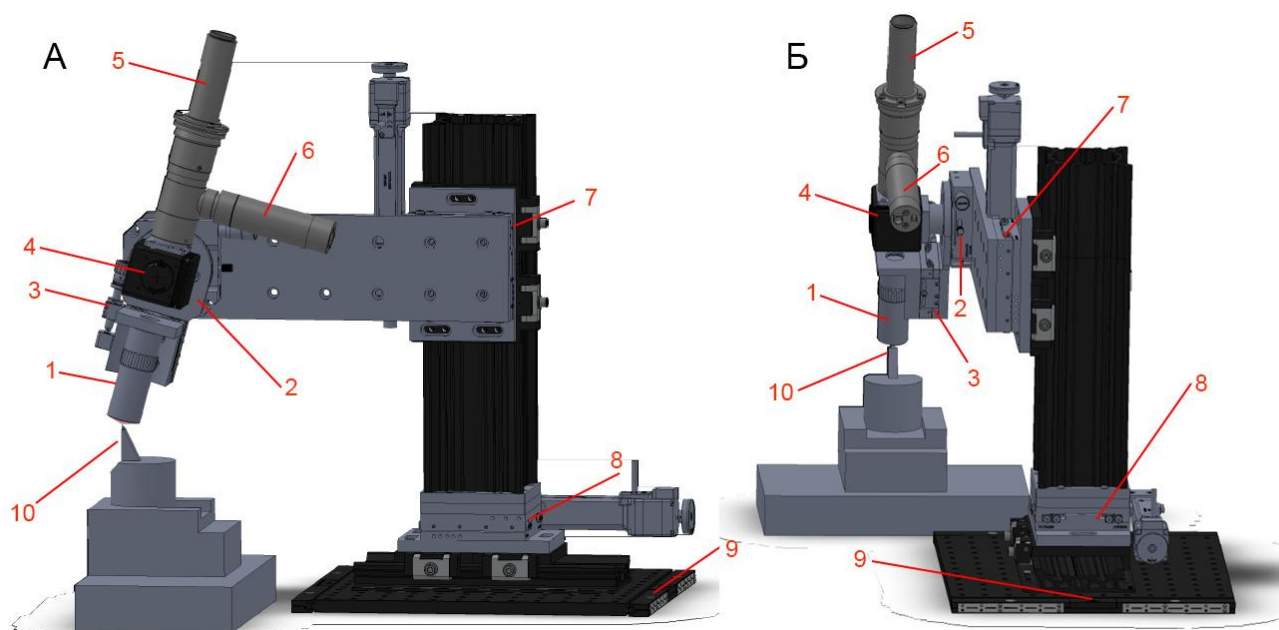


Рисунок 1 – Модель специализированного прямого флуоресцентного микроскопа для реализации методики флуоресцентной оптической нанотомографии. А – вид сбоку, Б – вид сзади. Обозначения: 1 – объектив, 2 – прецизионная угловая подвижка, 3 – прецизионная аксиальная микроподвижка для точной фокусировки, 4 – кубик с флуоресцентными фильтрами, 5 – тубусная линза, 6 – светодиод для освещения при работе в режиме яркого поля, 7 – прецизионная моторизованная подвижка микроскопа по вертикали, 8 – прецизионная моторизованная подвижка микроскопа по горизонтали («вперед – назад»), 9 – установочная оптическая панель с прецизионной подвижкой по горизонтали («вправо – влево»), 10 – алмазный нож ультрамикротомы

Геометрия и оптические свойства ножа ультрамикротомы позволяют проводить возбуждение и сбор оптического сигнала с помощью объектива с числовой апертурой 0.75 и рабочим отрезком 5.2 мм (Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected×50). Возбуждающее излучение выходит из объектива и, проходя через внешнюю грань алмазного ножа, испытывает полное внутреннее отражение на его внутренней грани во всем угловом диапазоне падающих лучей. Таким образом, для данного объектива оказывается задействована вся его числовая апертура, что способствует повышению чувствительности флуоресцентной микроскопии и её латерального разрешения. Условие полного внутреннего отражения во всем угловом диапазоне падающих лучей также будет выполняться при варьировании положения оптической оси объектива в диапазоне от 0° (вертикальное расположение) до 45° (перпендикулярно первой грани ножа), как показано на рисунке 2.

Исследуемый образец располагается на сканирующем XYZ-пьезостейдж, закрепленном на подвижной консоли ультрамикротомы таким образом, что одна из его координат (X) параллельна кромке алмазного ножа.

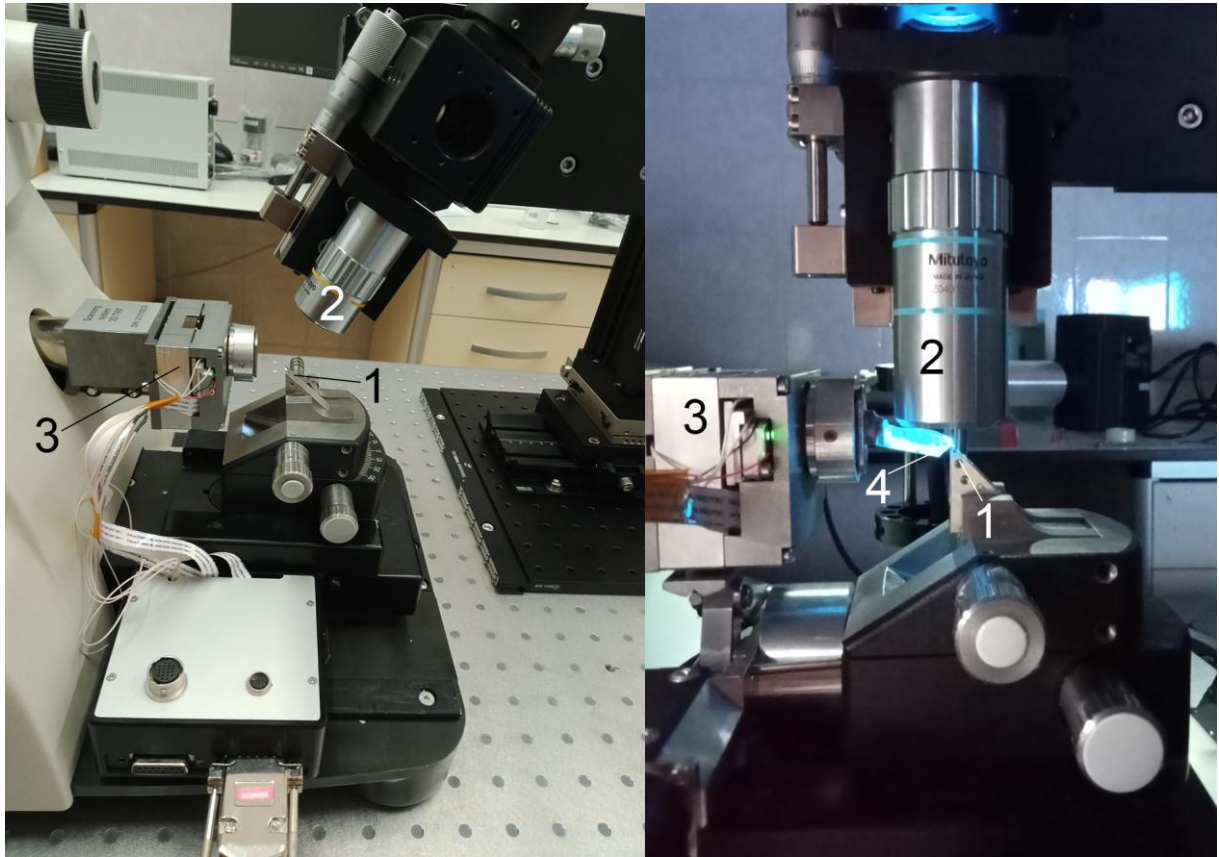


Рисунок 2 – Экспериментальная установка для методики флуоресцентной оптической нанотомографии полного внутреннего отражения (слева – наклонное, справа – вертикальное положение объектива): 1 – алмазный нож ультрамикротомы, 2 – объектив флуоресцентного микроскопа, 3 – XYZ-пъезостейдж, установленный на подвижной консоли ультрамикротомы, 4 – образец

Алгоритм проведения измерений методом 3D-TIRF микроскопии выглядит следующим образом:

- 1) Выполняется первичный срез образца для формирования плоской поверхности.
- 2) Выполняется очистка ножа от остатков срезов.
- 3) С помощью XYZ-пъезостейджа образец отводится от кромки ножа на заданное расстояние в диапазоне 100 – 150 нм.

4) После выбора области исследования образец подводится обратно на одну и ту же предварительно заданную высоту к кромке алмазного ножа.

Шаги 2 и 4 могут выполняться с помощью собственного микроскопа ультрамикротомы или микроскопа TIRF системы в режиме яркого поля с объективом меньшей кратности.

5) Микроскоп с объективом $\times 50$ подводится к ножу с помощью моторизированной подвижки так, чтобы задняя грань ножа была в фокусе. При этом с использованием XYZ-пъезостейджа положение образца прецизионно настраивается по оси Z относительно задней поверхности ножа до появления на изображении «полосы контрастности» TIRF.

6) 2D-флуоресцентные изображения плоскости среза получаются при сканировании образцом вдоль оси Y с целью создать соответствующий набор «полос контрастности» TIRF и последующим их сложением в одно изображение.

7) TIRF микроскоп отводится от ножа и образца на заданное расстояние при помощи моторизованной подвижки по оси Z.

8) Выполняется очередной сверхтонкий срез поверхности образца заданной толщины (в диапазоне от 20 до 200 нм) при помощи механизма ультрамикротом.

9) Многократный повтор п.п. 2-8.

10) Преобразование массива двумерных изображений в 3D-флуоресцентное изображение исследуемого образца.

В качестве тестового образца для практического исследования возможностей микроскопии 3D-TIRF были выбраны полистирольные микросферы (PCM) диаметром 5 мкм, поверхность которых покрыта монослоем полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек (КТ) структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) с длиной волны испускаемой флуоресценции в районе 530 нм. Толщина флуоресцентного монослоя КТ соответствует их среднему диаметру порядка 7 нм. Для проведения измерений массив PCM/КТ был залит в среду Ловикрил, позволяющую легко выполнять срезы ультрамикротомом и, соответственно, проводить их полную 3D-реконструкцию. в соответствии с описанным выше алгоритмом, было получено 33 последовательных 2D-TIRF изображения с шагом ультрамикротомирования 150 нм.

Каждое 2D-TIRF изображение было получено в результате последовательной интеграции 256 горизонтальных линий пикселей – «полос контрастности» вблизи лезвия ножа, полученных при растровом сканировании образцом по оси Y с шагом 100 нм. На рисунке 3 (левая панель) показан пример одного из полученных интегрированных 2D-TIRF изображений. Получение каждого из изображений заняло около 40 секунд. Серия полученных 2D-TIRF изображений была обработана при помощи программного пакета ImagePro Plus 6.0 3DConstructor (Media Cybernetics, Inc., USA). Визуализация полученной трехмерной реконструкции представлена на рисунке 3 (правая панель).

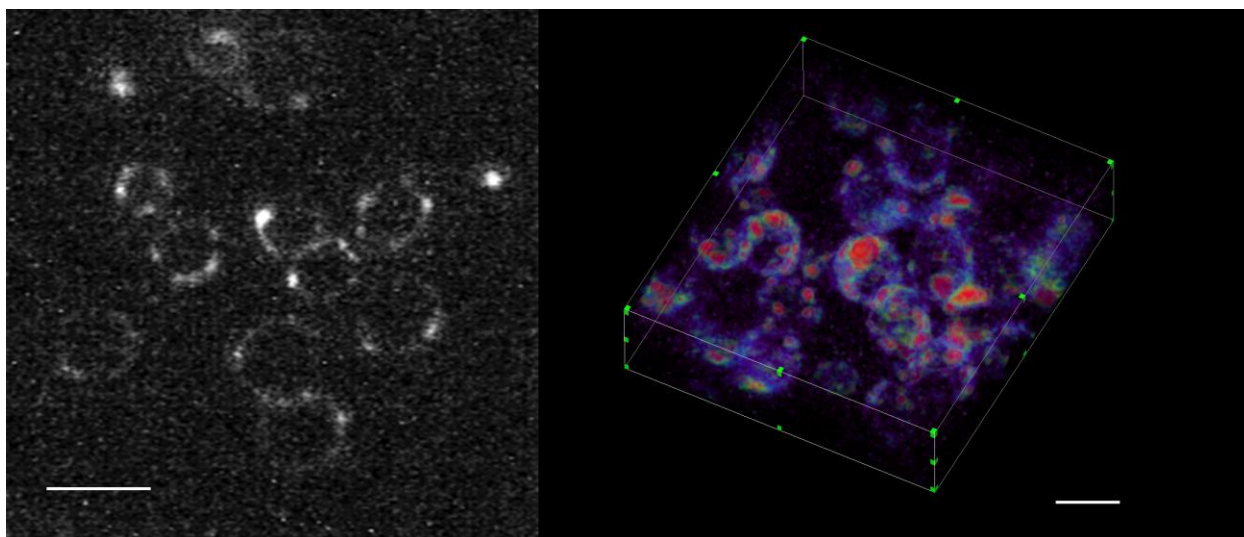


Рисунок 3 – Левая панель – флуоресцентное изображение образца полистирольных микросфер с нанесенным оптически тонким (несколько нанометров) поверхностным слоем квантовых точек структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) с длиной волны испускаемой флуоресценции в районе 530 нм. Размер изображения $25,6 \times 25,6$ мкм; правая панель – трехмерная реконструкция образца полистирольных микросфер с поверхностным слоем квантовых точек на основе 33 последовательных изображений, толщина среза 150 нм, объем реконструкции $25,6 \times 25,6 \times 4,95$ мкм. Размерные отрезки – 5 мкм

На ней различимы объекты сферической формы полые внутри, что указывает на успешность трехмерной реконструкции с приемлемым аксиальным разрешением. Также как и на 2D-изображении, можно отметить, что флуоресцентные квантовые точки на поверхности распределены неравномерно, большинство находятся в кластерах размерами до нескольких сотен нанометров.

Для ускоренного флуоресцентного скрининга сверхтонких срезов нами был разработан метод флуоресцентной нанотомографии (ФОНТ) серийных срезов *in situ*. В этом подходе используется та же конструкция прямого флуоресцентного микроскопа, совмещаемого с областью выполнения срезов ультрамикротомом при помощи прецизионной трехкоординатной и угловой подвижки (Рисунок 4). Однако в данном случае для получения сверхтонких срезов используется алмазный нож с водяной ванночкой, заполняемой водой Milli-Q. Как и в случае стандартной ультрамикротомии для подготовки образцов для трансмиссионной электронной микроскопии, полученные сверхтонкие срезы находятся на поверхности воды, удерживаемые силами поверхностного натяжения. Оптическая ось флуоресцентного микроскопа устанавливается вертикально, и объектив фокусируется на последнем выполненном срезе. Далее выполняются флуоресцентное картирование области интереса на поверхности среза также с использованием объектива с числовой апертурой 0,75 и рабочим отрезком 5.2 мм (Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected $\times 50$), после чего выполняется следующий сверхтонкий срез и получение следующего последовательного флуоресцентного изображения области

интереса. Далее на основе серии полученных флуоресцентных изображений выполняется трехмерная реконструкция распределения флуоресцентного маркера в объеме образца. При этом разрешение по глубине (Z), соответствующее параметру глубины резкости, определяется исключительно толщиной получаемых сверхтонких срезов (от 40 до 200 нм).

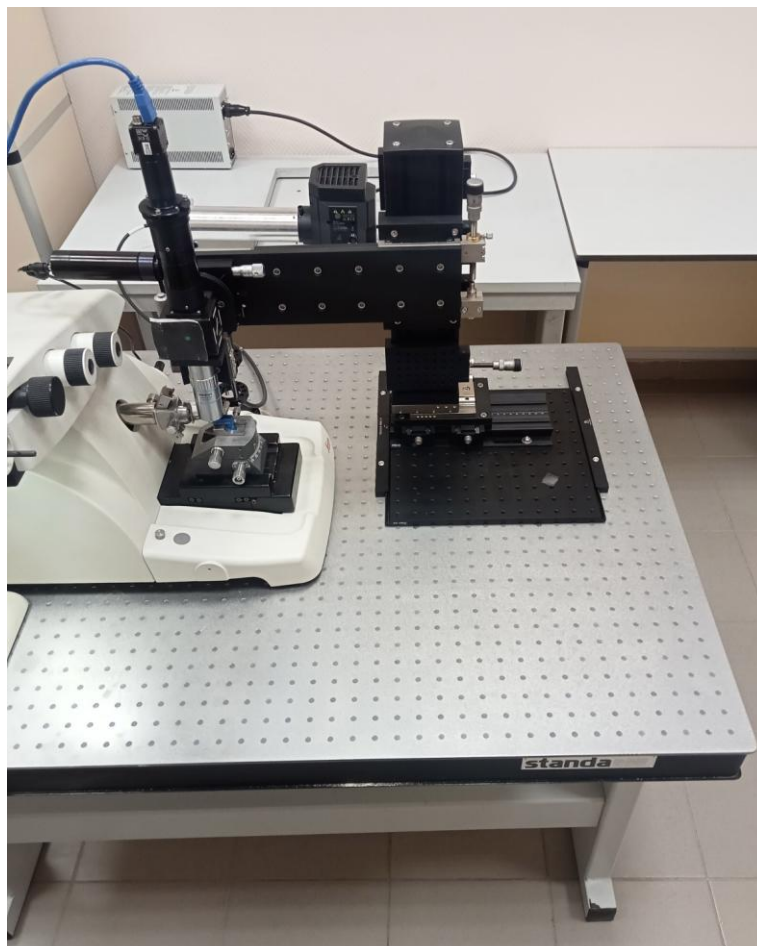


Рисунок 4 – Общий вид системы для флуоресцентной оптической нанотомографии, объединяющей ультрамикротом и вертикально-ориентированный прямой флуоресцентный микроскоп, установленный на прецизионной трехмерной подвижке. Объектив $\times 50$, $NA=0,75$

Для доказательства эффективности предложенного подхода был проведен трехмерный анализ залитых в эпоксидную среду образцов ткани печени крысы породы Wistar. Были получены серии коррелятивных изображений одних и тех же участков поверхности срезов образца методом флуоресцентной микроскопии серийных срезов *in situ*. Последовательные сверхтонкие срезы образца толщиной 120 нм выполнялись с использованием алмазного ножа с шириной режущей кромки 2,0 мм.

Для выполнения трехмерной реконструкции структуры ткани печени было получено 50 последовательных флуоресцентных микроскопических изображений *in situ* срезов образца печени толщиной 120 нм каждый. Полученная серия была также обработана с использованием

программного пакета ImagePro Plus 6.0 3DConstructor (Media Cybernetics, Inc., USA) для визуализации трехмерной реконструкции. Полученные изображения трехмерного распределения флуоресцентного красителя FITC в объеме ткани печени представлены на рисунке 5.

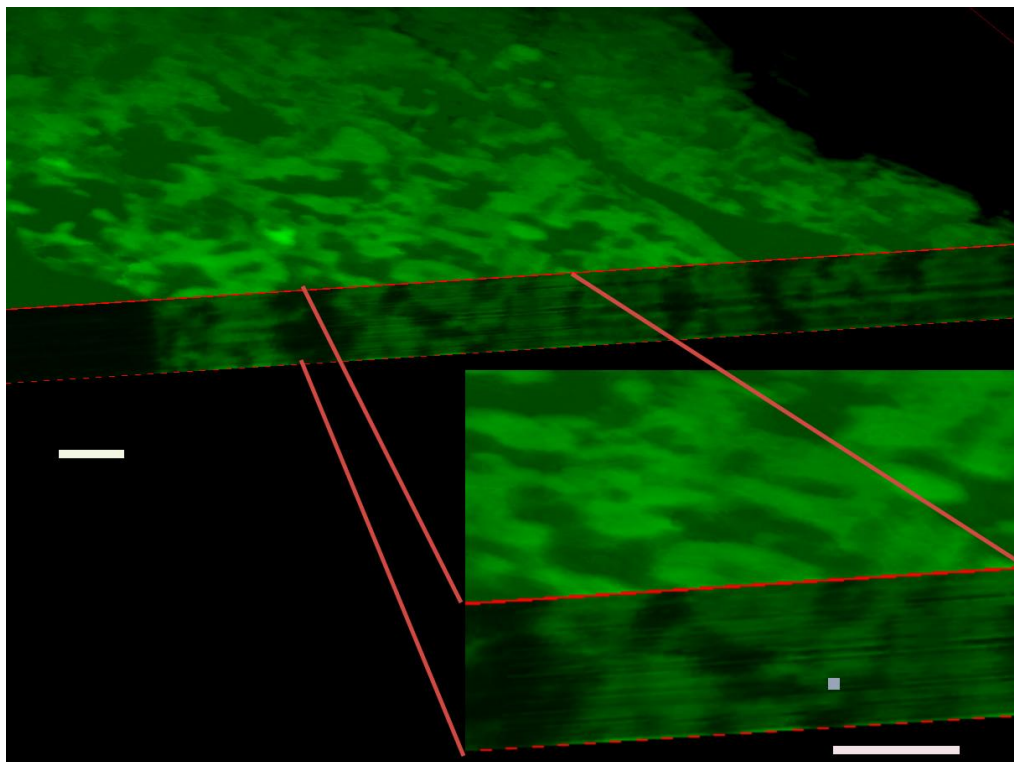


Рисунок 5 – Трехмерная реконструкция фрагмента ткани печени крысы на основе последовательных флуоресцентных изображений срезов, окрашивание FITC, объектив $\times 50$ NA=0,75; 50 последовательных срезов толщиной 120 нм, размерные отрезки – 5 мкм; квадрат во вставке - 500×500 нм (порядка длины волны излучения)

На вставке на рисунке 5 для сравнения приведен квадрат, соответствующий характерному оптическому разрешению данной системы в плоскости изображения. Разрешение полученного распределения интенсивности по глубине определяется исключительно толщиной срезов (120 нм), так как в данном случае информация, получаемая на каждом изображении, ограничена физическим сверхтонким срезом. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что разработанный метод флуоресцентной оптической нанотомографии серийных срезов *in situ* позволяет выполнять корректную трёхмерную реконструкцию распределения флуоресцентного красителя в объеме ткани печени с разрешением по глубине не более 120 нм.

Исследование трехмерной структуры нервной ткани при помощи флуоресцентной оптической нанотомографии

Нервная ткань мозга имеет наиболее сложную трехмерную организацию среди всех тканей организмов млекопитающих. В то же время особенности восстановления иннервации и взаимодействия нервных клеток также играют огромную роль в процессах регенерации поврежденных тканей и органов, в частности, при использовании тканеинженерных конструкций [Das S. 2020, Sun W. 2023, Moisenovich M.M. 2019], включая искусственные нервные проводники [Федяков А.Г. 2023]. При этом важнейшими компонентами нейронных цепей и наиболее распространенными глиальными клетками в центральной нервной системе являются астроциты. Хорошо развитые протоплазматические астроциты содержат многочисленные отростки, имеющие сложную разветвленную форму.

Основными функционально значимыми характеристиками астроцита на клеточном уровне являются площадь его территориального домена и ветвистость, количество крупных, оптически разрешённых астроцитарных отростков. Эти параметры могут быть оценены за счёт выявления глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) – классического маркера астроцитарного цитоскелета [Ravin R. 2016, Minge D. 2021]. Распределение GFAP практически полностью совпадает с телом астроцита, вплоть до второго порядка ветвления включительно, что позволяет провести его первичное трассирование в образце еще до начала проведения исследований при помощи методов флуоресцентной нанотомографии. Для проведения экспериментов по исследованию астроцитарных морфологических особенностей была использована линия мышей 5xFAD на досимптоматической стадии. Данная линия характеризуется наличием нескольких мутаций в тех генах, которые связаны с болезнью Альцгеймера.

В ходе выполнения работы был проведен трехмерный анализ образца ткани радиального слоя гиппокампа мыши, окрашенного на GFAP и залитого в среду Lowicryl. Пример трехмерной реконструкции астроцитарных участков в объеме 39270 мкм^3 , полученной в результате интеграции 62 последовательных изображений срезов толщиной 150 нм показан на рисунке 6. Для выравнивания изображений и визуализации трехмерной структуры использовался программный пакет Image Pro AMS 6.0 (MediaCybernetics, Inc., США). На трехмерной реконструкции мы можем видеть несколько тел астроцитов и множество участков ветвящихся отростков разной толщины. Используемый пакет программного обеспечения позволил выполнить сегментацию отдельных астроцитов и отростков и вычислить некоторые их интегральные количественные характеристики.

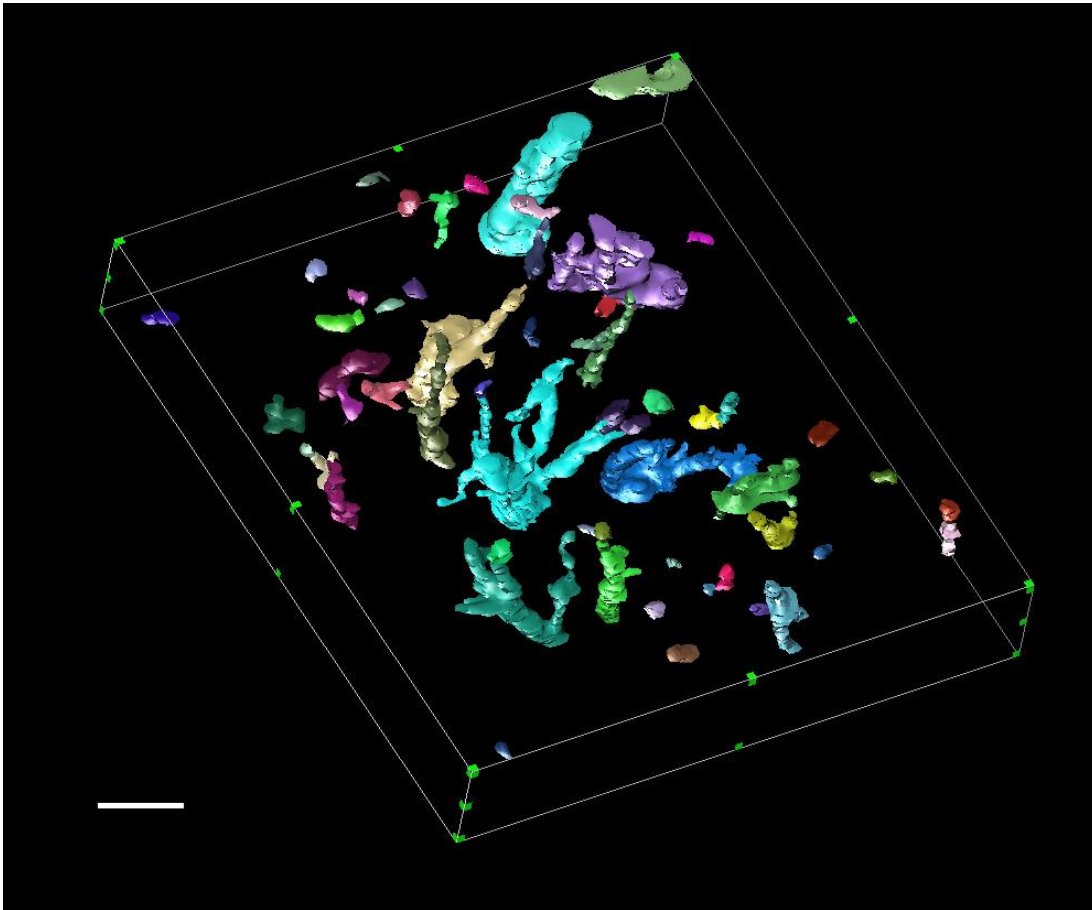


Рисунок 6 – Трехмерная реконструкция распределения астроцитарных участков в объеме с выделенными изоповерхностями, соответствующими отдельным трехмерным объектам, 62 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем $69,8 \times 60,5 \times 9,3$ мкм ($419 \times 363 \times 62$ пиксела), размерный отрезок 10 мкм

Выполненная оценка доли общего объема, занимаемого астроцитами в выполненной реконструкции (V_f), дает величину 0,0362, в то время как интегральное отношение площади поверхности к объему составляет $4,07 \text{ мкм}^{-1}$. Данная оценка отношения площади поверхности к объему близка к результатам, вычисленным путем статистической обработки значительно большего объема трехмерных данных (в реконструированном объеме 750000 мкм^3), приведенных в работе [Cali C. 2019] ($4,39 \pm 0,3 \text{ мкм}^{-1}$). Полученная нами оценка V_f согласуется с диапазоном результатов измерений доли объема, занимаемого астроцитами в ткани радиального слоя (*Stratum radiatum*) гиппокампа мыши (исключая сому), полученных на основе данных двухфотонной флуоресцентной микроскопии (от 3,35 до 4,67%) и приведенных в работе [Minge D. 2021].

На рисунке 7 представлена трехмерная реконструкция астроцита, полученная на основе серии из 60 флуоресцентных изображений последовательных срезов с большим увеличением. На приведенной реконструкции видно, что разработанный подход позволяет реконструировать форму отростков астроцитов в трехмерном пространстве.

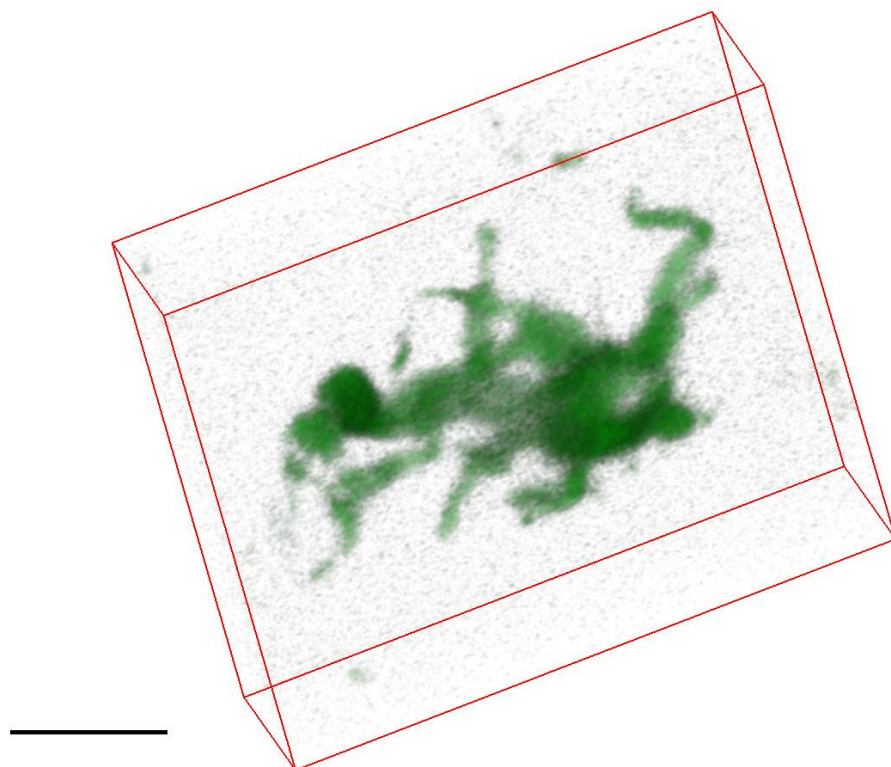


Рисунок 7 – Трехмерная реконструкция астроцита (окрашивание на GFAP), 60 срезов толщиной 150 нм, реконструированный объем $33,9 \times 28,4 \times 9,0$ мкм ($339 \times 284 \times 90$ пикселей), размерный отрезок 10 мкм

Особый интерес представляют возможности томографического реконструирования наиболее тонких отростков астроцита. На рисунке 8 показано сегментированное увеличенное трехмерное изображение участка астроцита с отростком. Ширина отростка на данном изображении составляет порядка 500 нм, что близко к дифракционному пределу нашей оптической системы и согласуется с полученными отдельными флуоресцентными изображениями. На рисунке 9 представлено виртуальное продольное сечение одного из тонких отростка наклонной плоскостью. Данный подход позволяет оценить толщину отростка по оси Z, учитывая, что толщина каждого среза в нашем случае гораздо меньше дифракционного предела оптической системы, определяющего разрешение отдельных флуоресцентных изображений.

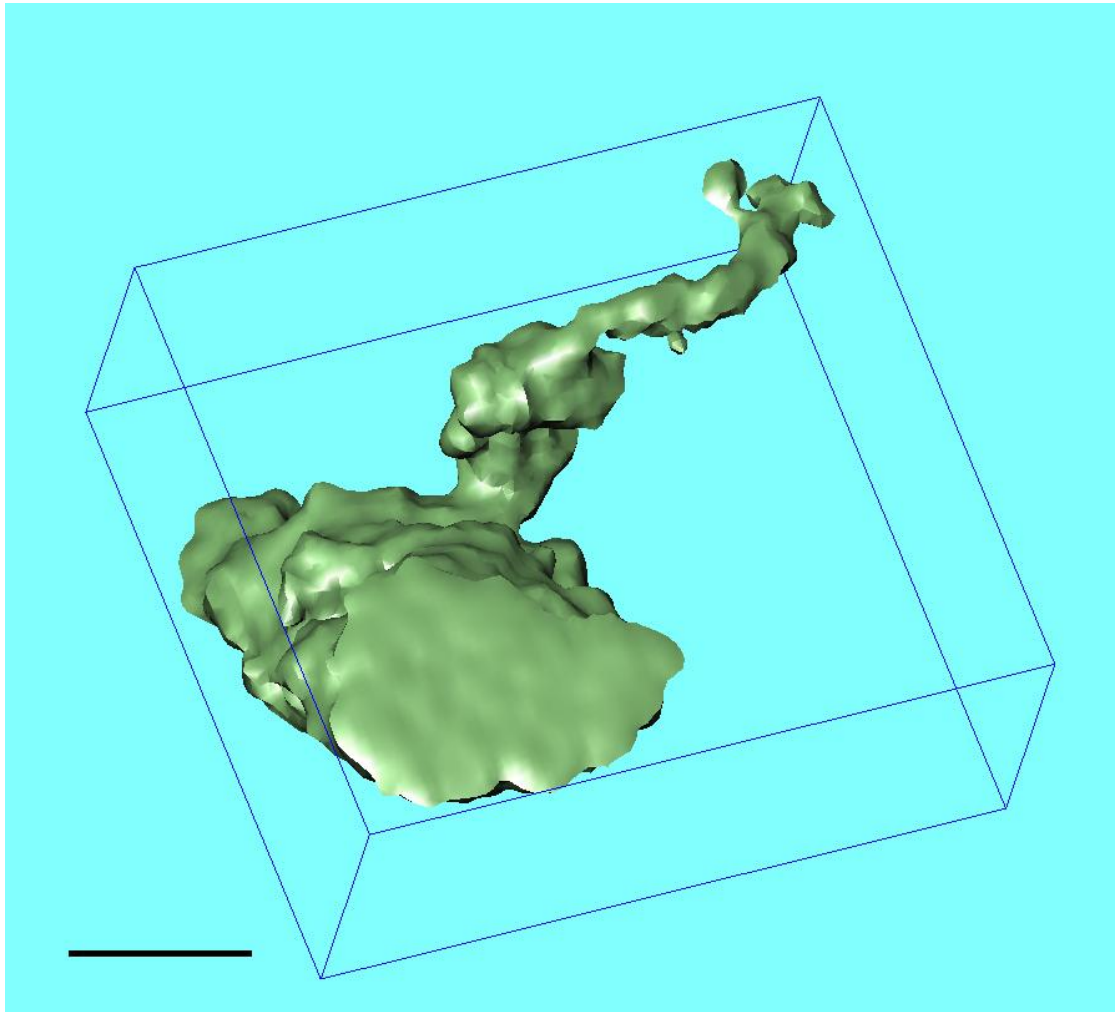


Рисунок 8 – Трехмерная изоповерхность участка астроцита с тонким отростком в объеме $7,9 \times 7,2 \times 3,0$ мкм ($79 \times 72 \times 30$ пикселей), размерный отрезок 2 мкм

Увеличенное изображение сечения отростка на вставке показывает, что его толщина не превосходит толщину среза (150 нм). Таким образом, можно сделать вывод, что наблюдаемая эффективная ширина отростков на двумерных флуоресцентных изображениях значительно увеличивается за счет дифракции, в то же время разработанная методика нанотомографии позволяет получать флуоресцентные данные с разрешением по глубине (оси Z), не ограниченным оптическим дифракционным пределом, а определяемым исключительно толщиной выполняемых срезов. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что разработанный метод ФОНТ позволяет повысить эффективность и достоверность анализа трехмерной ультраструктуры клеток нервной ткани.

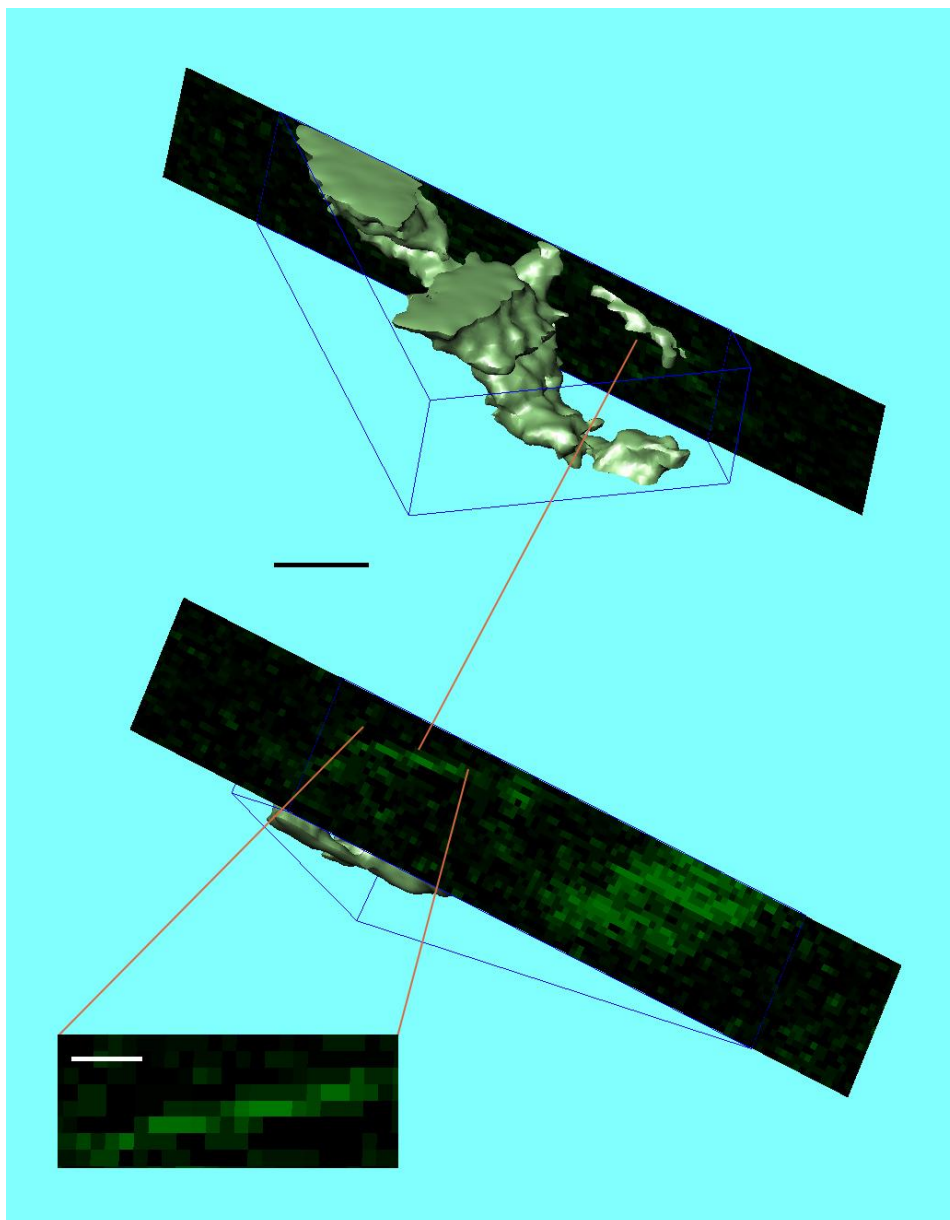


Рисунок 9 – Продольное сечение трехмерной реконструкции тонкого отростка астроцита наклонной плоскостью, размерный отрезок 2 мкм, размерный отрезок на вставке – 500 нм

Исследование трехмерных микро- и наноструктур флуоресцентных полимерных микрокапсул, используемых для задач медицинской тераностики

В качестве многофункциональных тераностических инструментов для применения в контролируемых системах доставки лекарств, сенсорах, диагностике и биоимиджинге широко используются микрокапсулы на основе полиэлектролитов [Biswas A. 2017, Novoselova M.V. 2019, Alford A. 2018]. Подобные микрокапсулы могут применяться в задачах регенеративной медицины [Mansour A. 2023] для адресной доставки трансплантируемых клеток [Marikar S. 2022], лекарственных препаратов (в том числе противоопухолевых препаратов [Kalenichenko D. 2021] и антибиотиков [Mateos-Maroto A. 2022]), ростовых факторов, в том числе стимулирующих

ангиогенез при регенерации тканей [Gallo N. 2023], и невирусной доставки генетических векторов, в том числе для задач тканевой инженерии и регенерации костной ткани [Santos J.L. 2011, Santos J.L. 2012]. Структурные и физико-химические параметры микрокапсул, дуально кодируемых с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц (МНЧ), включенных в послойно сформированную полиэлектролитную оболочку микрокапсул, влияют на их стабильность и фотолюминесцентные свойства.

В ходе выполнения работы было проанализирована наноструктура образцов микрокапсул с разным расстоянием между слоями с КТ и МНЧ, разной общей толщиной оболочки и разными зарядами полимеров, используемых для сборки оболочек. Образцы микрокапсул были получены и предоставлены для структурного анализа коллективом лаборатории нанобиоинженерии НИЯУ МИФИ. Мягкие микрокапсулы с полый конструкцией изготовлены путем растворения ядра карбоната кальция с использованием ЭДТА в качестве комплексообразователя с кальцием [Jeannot L. 2018]. Послойное нанесение противоположно заряженных полимеров и наночастиц является эффективным методом как для флуоресцентной, так и для магнитной маркировки микрокапсул, делая их магниточувствительными, с возможностью пространственного разделения инкапсулированных функциональных компонентов, а также обеспечивая их физическую и химическую совместимость [Hu S.-H. 2008]. Оптическое кодирование микрокапсул и их последующую функционализацию МНЧ проводили во время их изготовления посредством электростатического нанесения КТ и МНЧ на полиэлектролитные бислои поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия) (ПАГ/ПСН), ограниченные слоем поли(аллиламин гидрохлорида) (ПАГ), которые были предварительно сформированы на поверхности микрошариков карбоната кальция. Флуоресцентное мечение микрокапсул с КТ во время послойной самосборки («слой-за-слоем») в среднем включает $(8,9 \pm 0,1) \times 10^6$ КТ на микрокапсулу. Микрокапсулы были залиты в эпоксидную среду, после чего были выполнены сверхтонкие срезы полученных образцов при помощи ультрамикротомом. Срезы микрокапсул, кодированных наночастицами, под объективом флуоресцентного микроскопа представляют собой объекты кольцевидной формы с полый структурой и размерами от 3,2 до 6,9 мкм, демонстрирующие яркую флуоресценцию по окружности (рисунок 10).

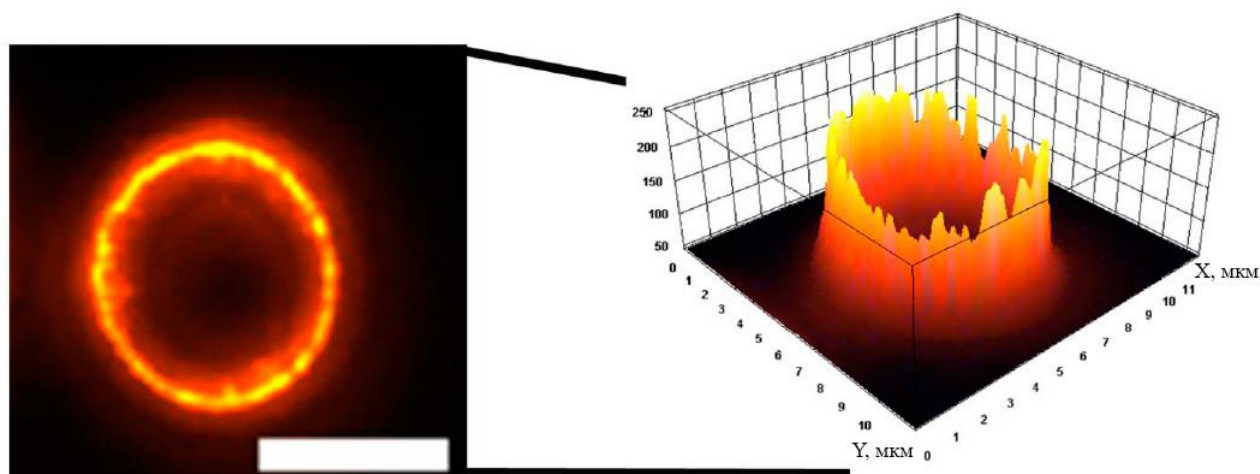


Рисунок 10 – Распределение сигнала интенсивности флуоресценции микрокапсулы, кодированной с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц. Шкала составляет 5 мкм

Топография и относительное распределение КТ и МНЧ внутри оболочки микрокапсул исследованы с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и магнитно-силового режима сканирующего зондового микроскопа (МСМ). Изображения поверхности образцов микрокапсул после среза продемонстрировали их полую внутреннюю часть с остаточными фрагментами карбоната кальция в сердцевине, наблюдаемую в режиме топографии АСМ в области, близкой к оболочке (рисунок 11А, В). Бугорки диаметром несколько десятков нанометров и высотой около 10 нм, четко наблюдаемые на АСМ-изображении в области оболочки, могут соответствовать топографии как КТ, так и МНЧ. Напротив, на магнитно-силовом изображении светлые области соответствуют наивысшему сигналу поверхностной намагниченности и, следовательно, только в области локализации МНЧ (рисунок 11Б). Изображение МСМ показывает однородное и достаточно однородное распределение МНЧ внутри полимерной оболочки. 2D и 3D-визуализация объединенных изображений АСМ и МСМ (рис. 11В, Г соответственно) показывают предполагаемое расположение МНЧ на поверхности оболочки микрокапсул и их четкое отделение от области локализации КТ. На рисунке 11Д показаны сравнительные распределения магнитных и немагнитных наночастиц в полимерной оболочке как функция их расстояния от поверхности микрокапсулы. Можно сделать вывод, что максимальное количество МНЧ распределено ближе к поверхности оболочки микрокапсулы относительно наибольшего распределения КТ, что обеспечивает значительное разделение большинства КТ и МНЧ. Длинный хвост распределения немагнитных частиц в диапазоне расстояний от 200 до 1000 нм от поверхности микрокапсулы можно отнести к остаточным ядрам частиц.

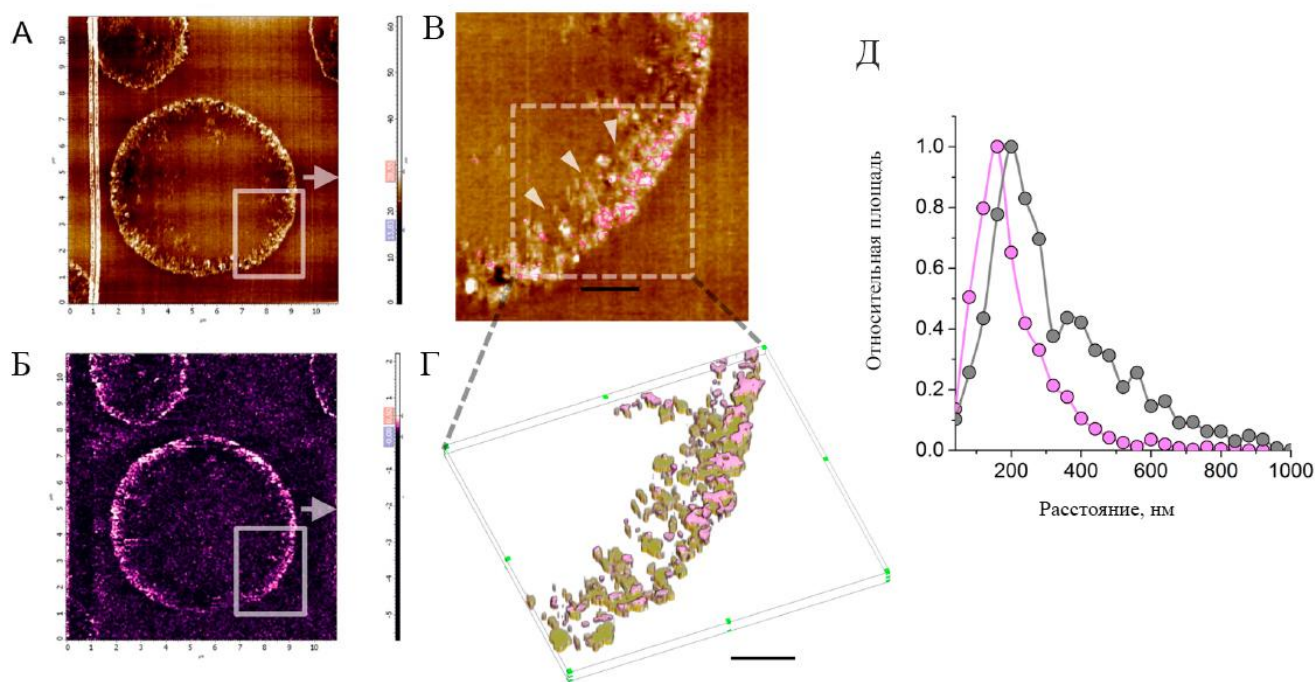


Рисунок 11 – Данные сканирующей зондовой микроскопии по визуализации и обработке изображений микрокапсулы, залитой в эпоксидную смолу, разрезанной ультрамикротомом. На панели (А) показаны реконструированные изображения атомно-силовой микроскопии. Панель (Б) показывает восстановленное магнитно-силовое изображение залитых эпоксидной смолой ультратонких срезов микрокапсул. Размер скана 10,9 мкм × 10,9 мкм. Вариация высоты изображения 13 нм. Панель (В) показывает объединенное изображение сканов, полученных при помощи атомно-силовой и магнитно-силовой микроскопии. Область интереса (белая рамка) представлена в трехмерном виде на панели (Г). Масштабные отрезки на панелях (В) и (Г) 500 нм. Белые стрелки показывают остатки матрицы карбоната кальция, используемого для формирования полиэлектролитных микрокапсул. На панели (Д) представлены кривые распределения относительных площадей, занимаемых наночастицами, в зависимости от расстояния от поверхности микрокапсулы до ее внутренней полости. Относительная площадь, занимаемая магнитными наночастицами, показана пурпурным цветом, а относительная площадь, занимаемая немагнитными наночастицами (квантовыми точками и остатками микрошариков карбоната кальция), представлена серым цветом

Таким образом, использование промежуточных слоёв (поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия))₂/поли(аллиламин гидрохлорида) позволило более эффективно разделить слои с квантовыми точками и магнитными наночастицами, что подтверждается также данными электронной микроскопии. Это позволяет избежать паразитных эффектов, связанных с переносом заряда, которые провоцируют изменение светового излучения квантовых точек, характеризующееся как «фотозатемнение» или «фотоосветление» [Krivenkov V. 2018, Fan H.-M. 2010, Li L. 2004]. Представленные данные могут открыть путь к дальнейшему развитию инструментов доставки лекарств и биовизуализации, кодированных как магнитно, так и оптически с использованием КТ с улучшенными флуоресцентными свойствами.

Исследование внутриклеточного распределения цитостатика методом корреляционной сканирующей флуоресцентно-зондовой нанотомографии

Одними из важнейших практических приложений методик трехмерного ультраструктурного анализа при помощи микроскопии и микроспектроскопии высокого разрешения являются биомедицинские исследования, направленные на изучение внутриклеточного трафика фармацевтических препаратов, в том числе противоопухолевых препаратов, антибиотиков, факторов роста для ускорения процессов регенерации тканей, невирусных генетических векторов, а также наноносителей, предназначенных для адресной доставки. Применение разработанной нами уникальной технологии оптической и зондовой нанотомографии позволяет исследовать микро- и наноструктуру клеток и тканей методами СЗМ в сочетании с коррелятивным картированием распределений флуоресцентных агентов в объеме изучаемых образцов.

Однако исследования трехмерных распределений противоопухолевых препаратов в биологических клетках и тканях при помощи технологии СОЗНТ ранее не проводились. Ниже представлены результаты исследований внутриклеточного распределения цитостатического препарата в опухолевых клетках. Представленные исследования выполнялись совместно со специалистами ИБХ РАН.

В качестве исследуемого объекта использовались клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Средний размер клеток составлял 18 ± 2 мкм. Клетки были загружены противоопухолевым препаратом – антрациклиновым антибиотиком доксорубицином (Doxorubicin hydrochloride, Sigma Aldrich), в свободной форме или загруженным в наноносители. Полученные с применением набора флуоресцентных фильтров Texas Red (полоса возбуждения 542 – 582 нм, полоса эмиссии 604 – 644 нм) флуоресцентные изображения среза образца (см. рисунок 12) показали, что флуоресценция доксорубицина сохраняется после проведения процедуры внедрения клеток в эпоксидные смолы, однако распределение доксорубицина внутри клетки обладает значительной неоднородностью.

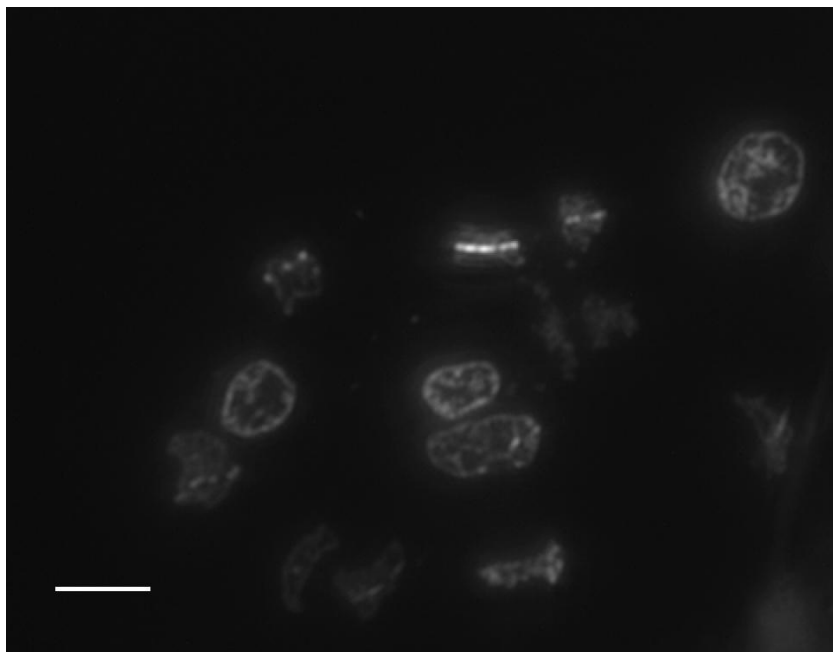


Рисунок 12 – Флуоресцентное изображение среза образца клеток MCF-7, загруженных доксорубицином, размерный отрезок 10 мкм

Для трехмерной реконструкции распределения доксорубицина в исследуемой клетке MCF-7 была выполнена серия измерений путем флуоресцентной микроскопии 20 последовательных срезов поверхности образца толщиной 120 нм. Флуоресцентные изображения были получены также с использованием длиннофокусного объектива 50X Mitutoyo Plan Apo HR (Mitutoyo, Япония) с числовой апертурой 0.75 и набора флуоресцентных фильтров Texas Red.

Корреляция полученных флуоресцентных и СЗМ-изображений клеток показывает, что в данном случае доксорубицин достаточно эффективно проходит сквозь клеточную мембрану в клетку и аккумулируется в ее объеме, хотя заметное количество препарата остается в клеточной мембране. Внутриклеточное распределение доксорубицина достаточно неравномерно и в значительной степени дискретно, на изображениях выделяются либо участки с высокой интенсивностью флуоресценции, либо области, где флуоресценция практически отсутствует. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени пространственной корреляции деталей клеточной ультраструктуры, хорошо различимых на СЗМ-изображении (рисунок 13), и зон накопления доксорубицина, что, по всей видимости, указывает на накопление доксорубицина в отдельных клеточных компартментах, функциональное значение которых будет являться предметом дополнительного исследования.

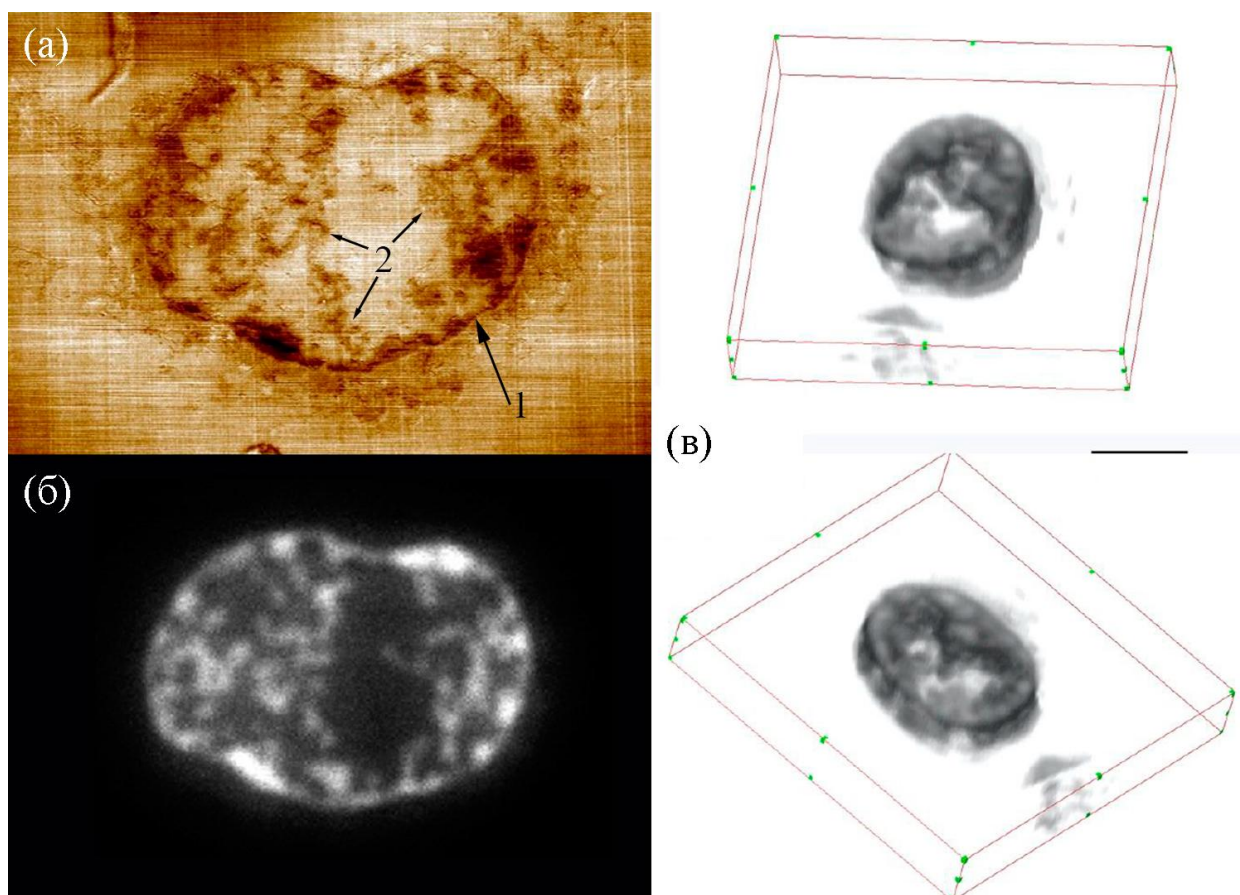


Рисунок 13 – Анализ образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с доксорубицином. а – зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза клетки MCF-7, размер скана $13,8 \times 9,5$ мкм, диапазон вариации высоты 33,5 нм, стрелками указаны: 1 – клеточная мембрана, 2 – примеры различных деталей ультраструктуры; б – флуоресцентное изображение среза той же области клетки MCF-7; в – трехмерная реконструкция распределения доксорубицина в объеме образца клетки MCF-7, $22,5 \times 18,7 \times 2,4$ мкм, толщина среза 120 нм, размерный отрезок 5 мкм, представлена визуализация в двух ракурсах

При этом доксорубицин практически полностью отсутствует в большей части объема цитоплазмы. Представленные результаты могут сыграть заметную роль в совершенствовании методов адресной доставки доксорубицина. Разработанная технология исследования трехмерных характеристик наномасштабных распределений доксорубицина в клетках с использованием принципов сканирующей оптической и зондовой нанотомографии может быть использована для решения широкого спектра задач по исследованию особенностей взаимодействия флуоресцентных или флуоресцентно-маркированных препаратов и наноносителей с клетками и тканями различных типов.

Микро- и наномасштабные исследования трехмерной структуры биосовместимых скаффолдов на основе биоматериалов

В области тканевой инженерии, регенеративной и персонализированной медицины важное значение имеет создание биологически совместимых материалов для более эффективного и ускоренного заживления повреждений, восстановления после оперативного вмешательства, а также разработка конструкций для адгезии клеток и целенаправленной доставки лекарств в организме (матриксы, пленки, гели, пластыри). В связи с этим необходимо усовершенствование уже существующих методов микроскопии, а также создание новых, позволяющих исследование микро- и наноструктурных особенностей материалов, биоинженерных конструкций и клеток в их составе, включая количественную оценку параметров взаимодействия клеток с поверхностью конструкций на микро- и наноуровне.

При создании тканеинженерных конструкций важное значение имеет выбор биосовместимого материала. Фиброин шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* является одним из наиболее перспективных природных полимеров для тканевой инженерии и регенеративной медицины [Safonova L. 2021, Агапова О.И. 2017]. В ходе исследований показано, что скаффолды на основе фиброина успешно помогают в лечении кишечника [Gou S. 2019], восстановление нервной [Yonesi M. 2021] и костной ткани [Choi J.H. 2018]. Другим перспективным подходом к получению биоматериалов для тканеинженерных конструкций является децеллюляризация различных тканей и получение внеклеточного матрикса, из которого устранены иммуногенные компоненты. В регенеративной медицине могут быть использованы матриксы на основе таких децеллюляризованных тканей и органов, как поджелудочная железа [Пономарева А.С. 2020], роговица [Борзенко С.А. 2021], пуповина [Кондратенко А.А. 2023, Басок Ю.Б. 2023], хрящ [Немец Е.А. 2022, Кириллова А.Д. 2023], печень [Немец Е.А. 2017, Bobrova M.M. 2021, Bobrova M. 2022]. В данной работе были выполнены исследования скаффолдов на основе фиброина шелка шелкопряда *Bombyx mori* и фрагментов децеллюляризированной ткани печени человека.

Структура полученных фрагментов межклеточного матрикса печени человека была проанализирована с использованием методов СЗНТ. Результаты СЗМ-анализа подтвердили данные, полученные с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и гистологических исследований, свидетельствующие об успешной децеллюляризации ткани печени человека и об отсутствии клеточных структур в полученных матриксах, характеризующихся повышенной шероховатостью и локальной кривизной поверхности матрикса. На рисунке 14А показана трехмерная реконструкция децеллюляризованного межклеточного матрикса ткани печени человека. Реконструированный объем составил $57.0 \times 50.0 \times 6.0$ мкм. Количественный анализ полученных трехмерных данных показал, что

структура является высокопористой (степень объемной пористости $72.8 \pm 6,4\%$), с микропорами размером в диапазоне от 2.5 – 20 мкм и нанопорами размером 50 – 400 нм, образующими взаимосвязанную систему. Шероховатость поверхности матрикса составила 634 ± 88 нм, в то время как отношение площади поверхности к объему – 4.61 ± 0.31 мкм⁻¹.

На рисунке 14Б показана трехмерная реконструкция фрагмента децеллюляризованного внеклеточного матрикса ткани печени человека после лиофилизации. В данном случае объем реконструкции составил $54.3 \times 53.0 \times 6.0$ мкм. Степень объемной пористости лиофилизированного матрикса составляет $60.5 \pm 8.2\%$, в то время как нанощероховатость поверхности – 312.2 ± 42.4 нм. Снижение величин нанощероховатости и объемной пористости, вероятнее всего, связано с процессом лиофильного высушивания. Отношение площади поверхности к объему для лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени человека также заметно ниже и составляет 0.23 ± 0.03 мкм⁻¹.

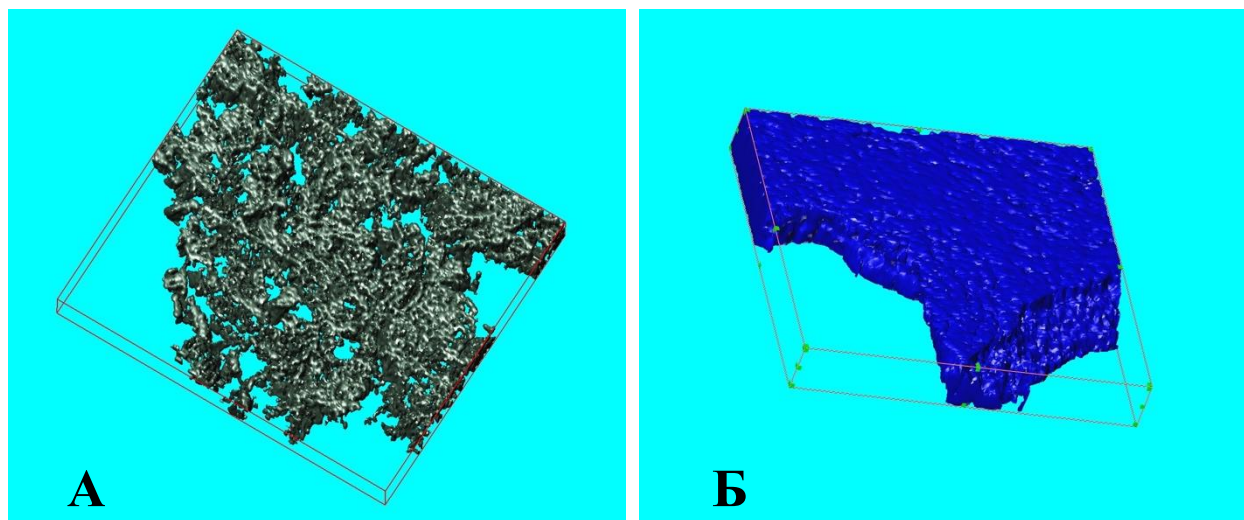


Рисунок 14 – Визуализации трехмерной структуры при помощи сканирующей зондовой нанотомографии: А – децеллюляризованная ткань печени человека, объем реконструкции – $57,0 \times 50,0 \times 6,0$ мкм, 15 срезов толщиной 400 нм; Б – лиофилизированный фрагмент децеллюляризованной ткани печени человека, объем реконструкции – $54,3 \times 53,0 \times 6,0$ мкм, 15 срезов толщиной 400 нм

Далее был выполнен анализ объемной микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолдов на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, с применением технологии сканирующей зондовой нанотомографии. На рисунке 15 приведены СЗМ-изображения поверхности поперечных срезов скаффолдов. Микрочастицы децеллюляризованной ткани печени человека детектировались как на поверхности, так и в объеме фиброиновых пленок.

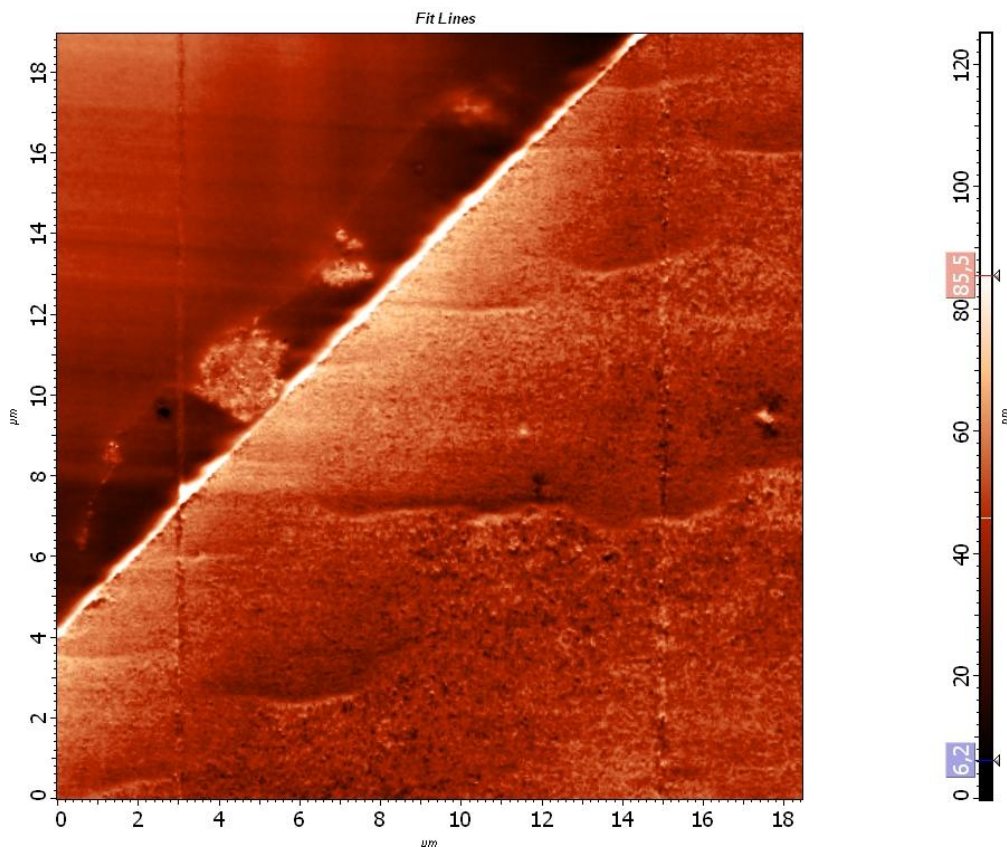


Рисунок 15 – Зондово-микроскопическое изображение поверхности поперечного среза пленки на основе фиброина шелка, с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека (область сканирования 18×19 мкм)

Использование технологии СЗНТ позволило проанализировать трехмерную структуру микрочастиц и особенности их контактов с поверхностью пленки, что было бы невозможно получить, применяя стандартные технологии зондовой, оптической или электронной микроскопии. Количественный анализ полученных СЗМ-данных показал, что при добавлении микрочастиц внеклеточного матрикса печени шероховатость поверхности пленок возрастает до 5-кратного уровня (от $36,5 \pm 10,6$ нм до $225,0 \pm 45,0$ нм). Для количественного анализа наноструктурных особенностей пленки с микрочастицами были произведены их трехмерные СЗНТ-реконструкции. На рисунке 16 приведен пример трехмерной реконструкции участка пленки с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека на поверхности. Полученные трехмерные данные позволили также напрямую рассчитать отношение объема микрочастиц децеллюляризованной ткани печени человека к объему фибриновой пленки, которое составило $1.2\% \pm 0,4$.

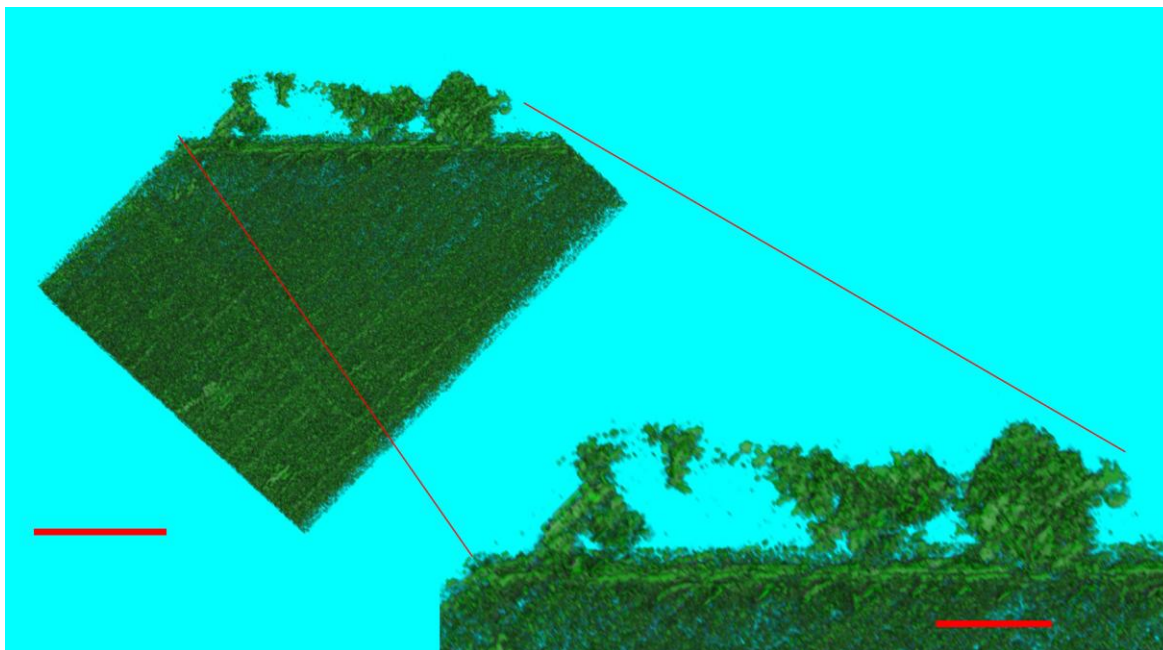


Рисунок 16 – Трехмерная реконструкция структуры скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека (реконструированный объем $16,00 \times 13,30 \times 2,55$ мкм, 17 срезов толщиной – 150 нм, размерный отрезок – 5 мкм, размерный отрезок на вставке – 2 мкм)

Для оценки регенеративного потенциала скаффолдов фрагментов внеклеточного матрикса печени человека и скаффолдов на основе фиброина шелка и фрагментов внеклеточного матрикса печени человека были выполнены эксперименты *in vivo* в модели заживления полнослойной раны кожи крысы. В экспериментальной группе 2, в которой в качестве раневого покрытия использовали лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной печени человека, по прошествии 18 суток с начала эксперимента наблюдалось полное заживление ран кожи. Остаточные покраснения, размерами около 6 мм, исчезали на 23 день; к этому сроку происходило и восстановление волосяного покрова, что говорит о полной регенерации ткани кожи. В экспериментальной группе 3 при использовании пленок на основе фиброина шелка с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека полное заживление ран происходило на 23 сутки. При этом в группе 1 (контроль) восстановление кожного покрова фиксировалось только через 40 суток [Bobrova M.M. 2021].

Гистологический анализ срезов образцов кожи, полученных в день полного заживления раны в каждой группе, показал наличие эпидермиса и дермы. Эпидермис на всех трех образцах представлен блестящим базальным роговым слоем, на приведенных изображениях образцов из экспериментальных групп наблюдается сосочковый и сетчатый слой дермы с волосяными фолликулами (рисунок 17). Полученные данные свидетельствуют о достижении полного заживления ран на данных сроках.

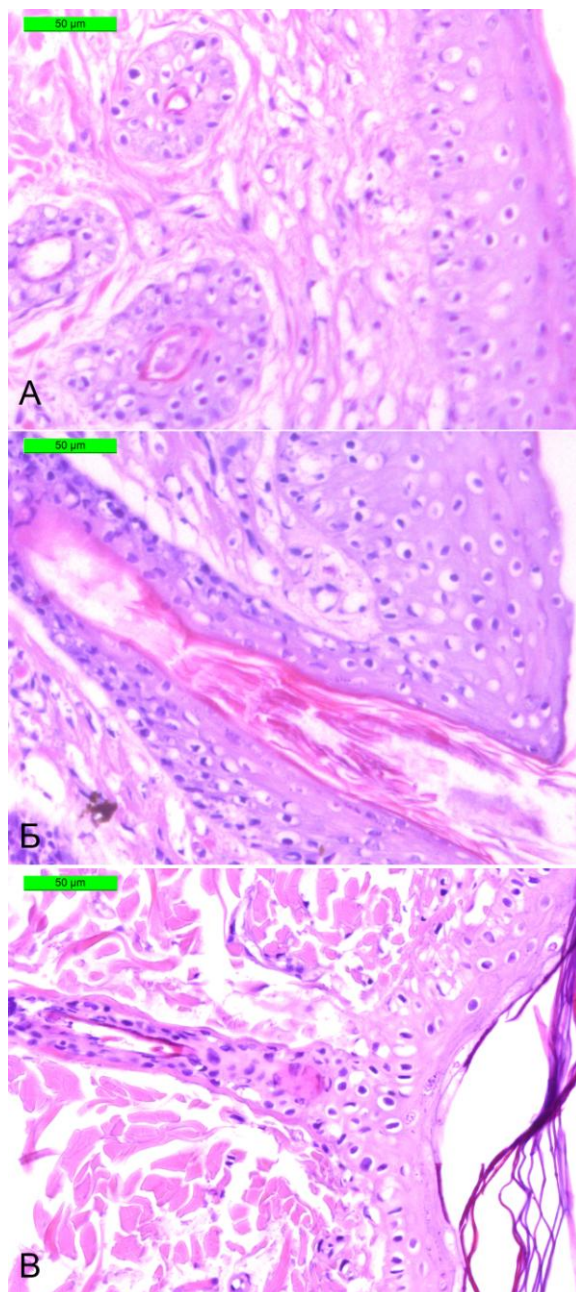


Рисунок 17 – Гистологический анализ кожных срезов после заживления полнослойных ран (окраска гематоксилином и эозином, размерный отрезок 50 мкм). А – группа 1 (контроль), 40 суток; Б – группа 2, 18 суток; В – группа 3

Таким образом, время полного заживления полнослойной раны кожи у крысы сокращается на 55% (22 дня) при использовании в качестве раневого покрытия лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной печени человека, и на 42,5% (17 дней) при использовании в качестве раневого покрытия полученных пленок на основе фиброина шелка с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, что позволяет сделать вывод о высоком регенеративном потенциале данных конструкций. Полученные данные о наноструктуре и регенеративном потенциале фиброиновых пленок с микрочастицами печени человека очень важны и применимы при аллогенных имплантациях таких композитных конструкций для ускорения заживления ран у человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ трехмерной структуры биологических объектов и материалов играет важную роль в решении задач тканевой инженерии и регенеративной медицины. Разработка новых эффективных техник нанотомографии позволяет охарактеризовать ключевые микро- и наноразмерные параметры морфологии и распределений флуоресцентных маркеров и препаратов в клетках и тканях, а также в наноструктурированных биоинженерных продуктах.

В данной работе уникальные техники оптической и зондовой нанотомографии, базирующиеся на комбинации подходов ультрамикротомии и флуоресцентной оптической или сканирующей зондовой микроскопии, успешно применены для структурного анализа микро- и макроносителей на основе полимерных и биологических материалов, отдельных клеток и образцов различных тканей, что подтверждает эффективность разработанных техник для решения задач трансплантологии и регенеративной медицины.

Разработан экспериментальный аппаратный комплекс флуоресцентной оптической нанотомографии, объединяющий специализированный флуоресцентный микроскоп и ультрамикротом в рамках одного устройства. Данный комплекс позволяет исследовать трехмерные распределения флуоресцентных маркеров в двух основных режимах: режиме анализа поверхности блока образца после среза методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF) с использованием алмазного ножа ультрамикротомы в качестве TIRF-призмы и режиме флуоресцентного анализа последовательных срезов образца *in situ* на поверхности воды ванночке алмазного ножа ультрамикротомы. Разрешение трехмерной реконструкции по глубине в обоих режимах заметно превосходит возможности лазерных конфокальных оптических систем и дает возможность значительно повысить точность трехмерного анализа биологических структур.

Эффективность разработанного метода флуоресцентной оптической нанотомографии *in situ* доказана на примерах наноструктурного анализа тканей печени крыс породы Вистар и нервной ткани мышей. Полученные данные позволяют реконструировать трёхмерные распределения флуоресцентного красителя FITC в объеме ткани печени с разрешением по глубине не более 120 нм и корректно проанализировать внутриклеточные структуры клеток печени. Анализ ткани гиппокампа мыши, флуоресцентно окрашенной на GFAP, с использованием разработанного аппаратного комплекса дает возможность изучать трехмерную структуру астроцитов и их тонких отростков с разрешением по глубине до 150 нм.

Объединение разработанных подходов флуоресцентной оптической нанотомографии с методами сканирующей зондовой нанотомографии позволят изучать распределения

флуоресцентных красителей в корреляции с особенностями трехмерной наноморфологии исследуемых биологических объектов и материалов.

Выполнены исследования наноструктуры полиэлектролитных микрокапсул с оболочками, содержащими магнитные наночастицы и квантовые точки. Подобные микрокапсулы широко используются для ряда задач современного биоимиджинга и медицинской тераностики, в том числе и в регенеративной медицине. Однако яркость и стабильность флуоресцентного сигнала микрокапсул зависят от относительной пространственной организации магнитных наночастиц и квантовых точек внутри полимерной оболочки, а точнее от расстояния между слоями квантовых точек и магнитных наночастиц.

Применение подходов зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии с использованием метода магнитно-силовой микроскопии позволило разработать метод контроля взаимного распределения магнитных наночастиц и полупроводниковых нанокристаллов в оболочках исследуемых полиэлектролитных микрокапсул, являющегося определяющим фактором для их стабильной функциональности. Представленные результаты могут открыть путь к дальнейшему развитию инструментов биовизуализации и доставки лекарств на основе флуоресцентно и магнитно кодированных микрокапсул.

Разработанный комплекс подходов может быть использован не только для исследований распределений флуоресцентных маркеров и наночастиц, но и для анализа внутриклеточного трафика фармацевтических препаратов, обладающих флуоресцентными свойствами, например такого цитостатика, как доксорубин. В работе представлены результаты исследования внутриклеточного распределения доксорубина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, загруженных доксорубином с различным временем инкубации. Трехмерный анализ с высоким разрешением позволяет отметить высокую степень неравномерности распределения цитостатика. Разработанный подход к изучению внутриклеточного распределения доксорубина в клетках с использованием принципов оптической и зондовой нанотомографии может эффективно применяться для исследования особенностей взаимодействия ряда флуоресцентных или флуоресцентно-маркированных препаратов и наноносителей с клетками и тканями различных типов.

Выполнено исследование трехмерной наноструктуры скаффолдов на основе фиброина шелка *Bombyx mori* и фрагментов внеклеточного матрикса печени человека, полученных методом децеллюляризации. Использование технологии СЗНТ в сочетании с флуоресцентной оптической нанотомографией позволило охарактеризовать такие ключевые наноморфологические параметры, как степень объемной пористости скаффолдов, отношение площади поверхности к объему скаффолдов, средняя шероховатость, эффективная площадь и

длина автокорреляции поверхности адгезированных на скаффолды клеток различных типов, а также параметры микровключений внеклеточного матрикса в фиброиновых скаффолдах.

Анализ полученных результатов позволил предположить, что скаффолды на основе фиброина шелка и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека могут обладать значительным потенциалом для ускорения регенерации различных тканей.

Выполненное *in vivo* исследование заживляющей активности данных скаффолдов в модели полнослойной раны кожи крысы породы Вистар подтвердило, что как фрагменты внеклеточного матрикса печени человека, так и композитные скаффолды на основе фиброина шелка и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека обладают высоким регенеративным потенциалом и значительно, на 55% и 42,5% соответственно, ускоряют заживление полнослойной раны кожи.

Использование технологий оптической и зондовой нанотомографии позволяет повысить точность трехмерных исследований различных клеточных структур как в составе биотканей, так и в изолированных клетках и получать уникальную информацию о наноструктурных характеристиках биоинженерных микро- и макроносителей, определяющих их функциональность и взаимодействие с клетками организма реципиента. Представленные в работе результаты позволяют заключить, что поставленная цель работы полностью достигнута.

ВЫВОДЫ

1. Разработан экспериментальный аппаратный комплекс для реализации флуоресцентной оптической нанотомографии в двух основных режимах: серийной TIRF-микроскопии поверхности образца и флуоресцентной микроскопии серийных срезов *in situ*.
2. Экспериментально обоснована эффективность использования алмазного ножа ультрамикротомом в качестве TIRF-призмы для исследования поверхности образца после среза методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения.
3. Разработанный метод флуоресцентной оптической нанотомографии серийных срезов *in situ* позволяет выполнять корректную трёхмерную реконструкцию распределения флуоресцентного красителя в объеме ткани печени с разрешением по глубине не более 120 нм.
4. Продемонстрирована возможность использования разработанного метода флуоресцентной оптической нанотомографии серийных срезов *in situ* для анализа трехмерной структуры астроцитов и их отростков в нервной ткани мыши с разрешением по глубине до 150 нм.
5. Разработан метод контроля взаимного распределения магнитных наночастиц и полупроводниковых нанокристаллов в оболочках полиэлектролитных микрокапсул с использованием магнитно-силовой микроскопии, сканирующей зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии, обеспечивающий стабильную функциональность флуоресцентно-кодированных магнитных микрокапсул для задач медицинской тераностики.
6. Разработан метод трехмерного исследования внутриклеточного распределения цитостатика (доксорубицина) с использованием подходов зондовой и флуоресцентной оптической нанотомографии.
7. Внутриклеточное распределение доксорубицина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, загруженных доксорубицином со временем инкубации 15 мин и 1 ч, отличается неравномерностью и значительной степенью дискретности.
8. Технологии сканирующей зондовой и оптической нанотомографии могут эффективно применяться для контроля наноструктурных морфологических параметров при создании тканеинженерных медицинских продуктов на основе фиброина шелка и внеклеточного матрикса печени человека, нацеленных на для ускорение регенерации поврежденных тканей и органов.
9. Скаффолды на основе фрагментов внеклеточного матрикса печени человека и на основе фиброина шелка и микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека обладают высоким регенеративным потенциалом и сокращают время заживления полнослойной раны кожи крысы на 55% и 42,5% соответственно.
10. Определены трехмерные наноразмерные морфологические параметры фибробластов мыши 3T3, клеток гепатокарциномы человека Hep-G2 и клеток печени крысы, адгезированных на пленках на основе фиброина шелка.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод флуоресцентной оптической нанотомографии *in situ* рекомендуется для проведения анализа трехмерных распределений флуоресцентных меток в полимерных и биологических объектах.
2. Фрагменты и микрочастицы внеклеточного матрикса печени человека рекомендуются к использованию для разработки новых тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины.
3. Для повышения достоверности анализа внутриклеточного распределения лекарственных препаратов рекомендуется использовать подходы сканирующей зондовой и оптической нанотомографии.
4. Точность реконструкции трехмерной структуры отростков глиальных клеток с использованием клеточно-специфичных флуоресцентных маркеров может быть повышена при использовании метода флуоресцентной оптической нанотомографии *in situ*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ультроструктурная 3D-микроскопия для биомедицины. Принципы, применение, перспективы / К. Е. Мочалов, Д. С. Коржов, А. В. Алтунина, О. И. Агапова, В. А. Олейников // *Acta Naturae*. – 2024. – Т. 16. – №1. – С. 14-29. doi 10.32607/actanaturae.27323.
2. Hydrogels Based on Recombinant Spidroin Stimulate Proliferation and Migration of Human Corneal Cells / O. I. Agapova, D. S. Ostrovsky, M. K. Khubetsova [et al.] // *Doklady Biological Sciences*. – 2023. – 513 (Suppl 1). – S41–S44. doi 10.1134/S0012496623600173.
3. Identification of Ultrastructural Details of the Astrocyte Process System in Nervous Tissue of the Brain Using Correlative Scanning Probe and Transmission Electron Microscopy / O. I. Agapova, A. E. Efimov, E. A. Obratsova [et al.] // *Doklady Biological Sciences*. – 2023. – 513 (Suppl 1). – S51–S54. doi 10.1134/S0012496623600185.
4. Исследование внутриклеточного распределения доксорубина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 методом корреляционной сканирующей флуоресцентно-зондовой нанотомографии / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, К. Е. Мочалов [и др.] // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2023. – Т. 509. – № 1. – С. 119-123. doi 10.31857/S2686738923700178.
5. Исследование распределения магнитных наночастиц в опухолевых тканях методом сканирующей магнитно-силовой нанотомографии / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, К. Е. Мочалов [и др.] // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2022. – Т. 504. – № 1 – С. 219-222. doi 10.31857/S2686738922030027.
6. Scaffolds Based on Silk Fibroin with Decellularized Rat Liver Microparticles: Investigation of the Structure, Biological Properties and Regenerative Potential for Skin Wound Healing / M. Bobrova, L. Safonova, A. Efimov, A. Lyundup, N. Mozheiko, O. I. Agapova, I. I. Agapov // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2313. doi:10.3390/pharmaceutics14112313.
7. Сканирующая оптически-зондовая нанотомография для исследования структуры биоматериалов и клеток / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, Л. А. Сафонова [и др.] // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2021. – Т. 500. – № 1. – С. 483-487. doi 10.31857/S2686738921050036.
8. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process / N. A. Gavrilova, S. A. Borzenok, O. E. Tishchenko, M. B. Agammedov, D. S. Ostrovkiy, A. V. Revishchin, G. V. Pavlova, M. M. Bobrova, L. A. Safonova, A. E. Efimov, O. I. Agapova, I. I. Agapov // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 185. – P. 264-276. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.040.
9. Relation between micro- and nanostructure features and biological properties of the decellularized rat liver / M. M. Bobrova, L. A. Safonova, A. E. Efimov, I. M. Iljinsky, O. I. Agapova, I. I. Agapov // *Biomedical Materials*. – 2021. – Vol. 16. – № 4. – P. 045035. doi:10.1088/1748-605X/ac058b.
10. A Comparative Analysis of the Structure and Biological Properties of Films and Microfibrous Scaffolds Based on Silk Fibroin / L. Safonova, M. Bobrova, A. Efimov, A. Lyundup, O. I. Agapova, I. I. Agapov // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 1561. doi 10.3390/pharmaceutics13101561.

11. Silk Fibroin/Spidroin Electrospun Scaffolds for Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats / L. Safonova, M. Bobrova, A. Efimov, L. Davydova, T. Tenchurin, V. Bogush, O. I. Agapova, I. I. Agapov // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 1704. doi 10.3390/pharmaceutics13111704
12. Способ модификации поверхности альгинатных микроносителей для улучшения их биологических свойств / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, И. И. Агапов, С. В. Готье // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2021. – Т. 499. – № 1. – С. 301-303. doi 10.31857/S2686738921040211.
13. Nanoscale Correlation Analysis of the Morphological, Optical, and Magnetic Structure of Polymer Microspheres for Multiplex Diagnostics / K. E. Mochalov, A. N. Generalova, I. S. Vaskan, D. O. Solov'eva, V. A. Oleinikov, O. I. Agapova, I. I. Agapov, A. E. Efimov // *Technical Physics Letters*. – 2020. – Vol. 46. – № 3. – P. 224-227. doi 10.1134/S1063785020030128.
14. Исследование микро- и наноструктуры клеток печени, культивированных на биodeградируемых скаффолдах на основе фиброина шелка, методом сканирующей зондовой оптической нанотомографии / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, Л. А. Сафонова [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 115-122. doi 10.15825/1995-1191-2020-4-115-122.
15. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры ткани легкого методом сканирующей зондовой нанотомографии / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, И. И. Агапов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 143-148. doi 10.15825/1995-1191-2020-3-143-148.
16. Биodeградируемые материалы на основе тканей из натурального шелка как перспективные скаффолды для тканевой инженерии и регенеративной медицины / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, И. И. Агапов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 105-114. doi 10.15825/1995-1191-2020-4-105-114.
17. Микроносители в виде волокон из натурального шелка для культивирования клеток / М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, И. И. Агапов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 98-104. doi 10.15825/1995-1191-2020-4-98-104.
18. Controlling Charge Transfer from Quantum Dots to Polyelectrolyte Layers Extends Prospective Applications of Magneto-Optical Microcapsules / G. Nifontova, V. Krivenkov, M. Zvaigzne, P. Samokhvalov, I. Nabiev, A. E. Efimov, O. I. Agapova, I. I. Agapov, E. Korostylev, S. Zarubin, A. Karaulov, A. Sukhanova // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2020. – Vol. 12. – № 32. – P. 35882-35894. doi 10.1021/acsami.0c08715.
19. Bioimaging Tools Based on Polyelectrolyte Microcapsules Encoded with Fluorescent Semiconductor Nanoparticles: Design and Characterization of the Fluorescent Properties / G. Nifontova, A. E. Efimov, O. I. Agapova [et al.] // *Nanoscale Research Letters*. – 2019. – Vol. 14. – № 1. – P. 29. doi 10.1186/s11671-019-2859-4.
20. 3D scanning probe nanotomography of tissue spheroid fibroblasts interacting with electrospun polyurethane scaffold / A. E. Efimov, O. I. Agapova, L. A. Safonova [et al.] // *Express Polymer Letters*. – 2019. – Vol. 13. – P. 632-641. doi 10.3144/expresspolymlett.2019.55.

21. Анализ пролиферативной активности клеток в микрочастицах, полученных из децеллюляризованной ткани печени и почки / М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, И. И. Агапов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20. – № 4. – С. 69-75. doi 10.15825/1995-1191-2018-4-69-75.
22. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nano-fibers reveals formation of unusual sheathed structure / V. Balashov, A. Efimov, О. Agapova [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2018. – Vol. 68. – P. 214-222. doi 10.1016/j.actbio.2017.12.031.
23. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крионанотомографии / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. – № 4. – С. 78-87. doi 10.15825/1995-1191-2017-4-78-87.
24. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography / A. E. Efimov, I. I. Agapov, О. I. Agapova [et al.] // Review of Scientific Instruments. – 2017. – Vol. 88. – № 2. – P. 023701. doi 10.1063/1.4975202.
25. Биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии (обзор) / О. И. Агапова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9. – № 2. – С. 190-206. doi 10.17691/stm2017.9.2.24.
26. Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers / A. E. Efimov, О. I. Agapova, L. A. Safonova [et al.] // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – № 15. – P. 8808-8815. doi 10.1039/C6RA26516B.
27. New Silk Fibroin-Based Bioresorbable Microcarriers / A. Y. Arkhipova, M. C. Kotlyarova, S. G. Novichkova, M. M. Moisenovich, O. I. Agapova, I. I. Agapov, D. A. Kulikov, A. V. Kulikov, M. S. Drutskaya // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 160. – № 4. – P. 491-494. doi 10.1007/s10517-016-3204-x.
28. Scanning near-field optical nanotomography: a new method of multiparametric 3D investigation of nanostructural materials / A. E. Efimov, A. Yu. Bobrovsky, I. I. Agapov, О. I. Agapova, V. A. Oleinikov, I. R. Nabiev, K. E. Mochalov // Technical Physics Letters. – 2016. – Vol. 42. – № 2. – P. 171-174. doi 10.1134/S1063785016020231.
29. Наноструктурные особенности контактов фибробластов и двухмасштабного биосовместимого полиуретанового матрикса / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, Л. А. Сафонова [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2016. – Т. 11. – № 11-12. – С. 116-119. EDN XDNIPH.
30. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления / А. И. Соколова, М. М. Боброва, Л. А. Сафонова, О. И. Агапова, М. М. Мойсенович, И.И. Агапов // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8. – № 3. – С. 6-15. doi 10.17691/stm2016.8.3.01.
31. Исследование микро- и наноструктуры микроволокнистого биосовместимого полиуретанового матрикса методом сканирующей зондовой нанотомографии / А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, В. А. Парфенов [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2015. – Т. 10. – № 11-12. – С. 118-123. EDN: VBUACP.

Патенты

1. «Способ получения биологического образца для исследований методом сканирующей зондовой нанотомографии». Агапов И.И., Агапова О.И., Боброва М.М., Сафонова Л.А., Ефимов А.Е. Патент на изобретение 2766727 С2, 15.03.2022. Заявка № 2020124900 от 27.07.2020.
2. «Подложка для исследования биологического образца методом сканирующей зондовой нанотомографии и способ ее получения». Агапов И.И., Агапова О.И., Боброва М.М., Сафонова Л.А., Ефимов А.Е. Патент на изобретение 2740872 С1, 21.01.2021. Заявка № 2020124901 от 27.07.2020.
3. «Микроноситель для клеток на основе натурального шелка и способ его получения». Агапов И.И., Агапова О.И., Боброва М.М., Сафонова Л.А., Ефимов А.Е. Патент на изобретение 2732598 С1, 21.09.2020. Заявка № 2019142535 от 19.12.2019.
4. «Композиция для изготовления биodeградируемых скаффолдов и способ ее получения». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Патент на изобретение RU 2684769 С1, 12.04.2019. Заявка № 2017140583 от 22.11.2017.
5. «Способ получения биodeградируемых скаффолдов из фиброина шелка сулуч-шенными биологическими свойствами». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Патент на изобретение RU 2683557 С1, 28.03.2019. Заявка № 2017140585 от 22.11.2017.
6. «Способ исследования трехмерных структур посредством сканирующей оптической зондовой нанотомографии». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Патент на изобретение RU 2680726 С1, 26.02.2019. Заявка № 2017138865 от 08.11.2017.
7. «Способ получения биodeградируемых скаффолдов на основе тканей из натурального шелка». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Патент на изобретение RU 2653428 С1, 08.05.2018. Заявка № 2017108939 от 17.03.2017.
8. «Способ получения модифицированных альгинатных микросфер». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю., Боброва М.М., Сафонова Л.А. Патент на изобретение RU 2606843 С1, 10.01.2017. Заявка № 2015145455 от 22.10.2015.
9. «Координатный стол». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю. Патент на изобретение RU 2618073 С1, 02.05.2017. Заявка № 2015150092 от 23.11.2015.
10. «Способ измерения поверхности объекта в режиме сканирующего зондового микроскопа». Агапов И.И., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Соколов Д.Ю. Патент на изобретение RU 2597959 С1, 20.09.2016. Заявка № 2015124125/28 от 22.06.2015.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

КТ – квантовые точки

МНЧ – магнитные наночастицы

МСМ – магнитно-силовая микроскопия

ПАГ – поли(аллиламин гидрохлорид)

ПАГ/ПСН – поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия)

ПСМ – полистирольные микросферы

СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия

СЗНТ – сканирующая зондовая нанотомография

СОЗНТ – сканирующая оптически-зондовая нанотомография

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова" Минздрава России – федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФОМ – флуоресцентная оптическая микроскопия

ФОНТ – флуоресцентная оптическая нанотомография

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

3D – трехмерный

BSA — бычий сывороточный альбумин

DDSA – додеценилантарный ангидрид

DMEM – культуральная среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко

DMP-30 – 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенол

DOX – доксорубин

FBS – телячья эмбриональная сыворотка

FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

PBS – фосфатный буферный раствор

TIRF – флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения