Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии
и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»

На правах рукописи

Агапова Ольга Игоревна

Оптическая и зондовая нанотомография для структурного анализа микро- и макроносителей, клеток и тканей

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

Диссертация на соискание
ученой степени доктора
биологических наук

Научный консультант:
Доктор биологических наук
Ефимов Антон Евгеньевич

МОСКВА – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 7
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРО- И НАНОМАСШТАБНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И МАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 16
1.1 Рентгеновская микроскопия и нанотомография 16
1.2 Трансмиссионная электронная томография 18
1.3 Флуоресцентная микроскопия 18
1.4 Конфокальная микроскопия 24
1.5 Микроскопия полного внутреннего отражения 31
1.6 Томография массивов серийных срезов 35
1.7 Сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком 38
1.8 Серийная сканирующая электронная микроскопия блокфейса 41
1.9 Методы ультраструктурного трехмерного анализа на базе сканирующей зондовой микроскопии 43
1.10 Использование материалов на основе натурального шелка в регенеративной медицине 49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 58
2.1 Изготовление образцов пористых биодеградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка 58
2.2 Децеллюляризация печени человека и получение микрочастиц внеклеточного матрикса 59
2.3 Изготовления пористых биодеградируемых композитных скаффолдов на основе фиброина шелка 63
2.4 Изготовление образцов скаффолдов на основе фиброина шелка в виде плёнок 64
2.5 Пробоподготовка образцов скаффолдов и матриксов для исследований методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии 65

2.6 Изготовление скаффолдов в виде плёнок, содержащих мышиные фибробласты 3T3, и скаффолдов, содержащих клетки гепатокарциномы человека HepG2 66
2.7 Изготовление образцов клеток печени крысы породы Wistar, культивированных на скаффолдах в виде плёнок из фиброина шелка 67
2.8 Пробоподготовка скаффолдов виде пленок с культивированными клетками для исследований методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии 68
2.9 Окраска фрагментов печени крысы FITC и пробоподготовка к исследованиям методами флуоресцентной оптической нанотомографии..... 69
2.10 Анализ образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии..... 70
2.11 Анализ структуры образцов методом сканирующей электронной микроскопии 71
2.12 Получение и пробоподготовка полистирольных микросфер, покрытых монослоем полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек, для исследований методом флуоресцентной оптической нанотомографии..... 72
2.12.1 Функционализация поверхности полистирольных микросфер 72
2.12.2 Функционализация поверхности полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек 72
2.12.3 Нанесение монослоя квантовых точек на поверхность полистирольных микросфер 73
2.12.4 Подготовка образца полистирольных микросфер с квантовыми точками, залитого в полимерный блок 73
2.13 Пробоподготовка и исследование флуоресцентных полимерных микрокапсул, кодированных квантовыми точками и магнитными наночастицами 74
2.13.1 Характеризация наночастиц 74
2.13.2 Подготовка срезов микрокапсул 74
2.13.3 Исследование микрокапсул с помощью атомно-силовой микроскопии 75
2.13.4 Исследование микрокапсул с помощью трансмиссионной электронной микроскопии 76
2.13.5 Исследование микрокапсул с помощью флуоресцентной микроскопии..... 76

2.14 Пробоподготовка образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 для исследований внутриклеточного распределения доксорубицина методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии 77
2.15 Пробоподготовка образцов нервной ткани мыши для исследований методами флуоресцентной оптической нанотомографии 79
2.16 Оценка регенеративного потенциала в модели по заживлению полнослойной кожной раны крысы *in vivo* 81
2.17 Статистическая обработка результатов исследования 82
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АППАРАТНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НАНОТОМОГРАФИИ 83
3.1 Флуоресцентная оптическая нанотомография полного внутреннего отражения: объединение техник флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ультрамикротомии 84
3.1.1 Предварительные расчеты 85
3.1.2 Разработка инструментального комплекса флуоресцентной оптической нанотомографии 89
3.1.3 Результаты тестовых исследований 94
3.1.4 Обсуждение результатов 97
3.2 Флуоресцентная нанотомография серийных срезов *in situ* 100
3.3 Анализ ткани печени крысы породы Wistar методом флуоресцентной нанотомографии серийных срезов *in situ* 105
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НАНОТОМОГРАФИИ 111
4.1 Анализ трехмерных структур астроцитов в нервной ткани мыши 112
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ МИКРО- И НАНОСТРУКТУР ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОКАПСУЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ЗАДАЧ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕРАНОСТИКИ 129

5.1 Послойная сборка полиэлектролитных микрокапсул и их кодирование с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц 132
5.2 Структура внутренних слоев наночастиц и флуоресцентные характеристики полиэлектролитных микрокапсул, кодированных квантовыми точками и магнитными наночастицами 136
5.3 Обсуждение результатов: инструменты биоимиджинга на основе полиэлектролитных микрокапсул, кодированных флуоресцентными полупроводниковыми наночастицами 142
ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОСТАТИКА МЕТОДОМ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ 147
6.1 Анализ внутриклеточного распределения доксорубицина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 методом корреляционной сканирующей флуоресцентно-зондовой нанотомографии 148
ГЛАВА 7. МИКРО- И НАНОМАСШТАБНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БИОСОВМЕСТИМЫХ СКАФФОЛДОВ И КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ БИОМАТЕРИАЛОВ 158
7.1 Исследование образцов пористых биодеградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка и биодеградируемых композитных скаффолдов на основе фиброина шелка, содержащих компоненты внеклеточного матрикса печени человека 160
7.2 Структура образцов на основе лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени человека 170
7.3 Анализ наноструктурных особенностей пленок на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека 174
7.4 Трехмерный коррелятивный анализ распределения флуоресцентных маркеров, микро- и наноструктуры конструкций на основе скаффолдов, содержащих мышиные фибробласты 3T3, и конструкций на основе скаффолдов, содержащих клетки гепатокарциномы человека HepG2 180

7.5 Трехмерный коррелятивный анализ распределения флуоресцентных маркеров и микро- и наноструктуры клеток печени крысы, культивированных на биодеградируемых скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка..... 189
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 196
ВЫВОДЫ 200
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... 202
БЛАГОДАРНОСТИ 203
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 204
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 207

ВВЕДЕНИЕ

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 ультрамикротома 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 доксорубицина.

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 оптическо-зондовой нанотомографии для высокоразрешающего корреляционного анализа структуры биоматериалов» (2018-2020 гг.) и «Разработка биодеградируемых 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.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРО- И НАНОМАСШТАБНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И МАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Изучение трехмерной структуры биологических объектов и материалов на микро- и наноуровне имеет ключевое значение для понимания особенностей их организации, функциональности и структурной связности. Изучение и оценка данных особенностей трехмерных структур микро- и макроносителей имеют исключительную важность для эффективной разработки тканеинженерных медицинских продуктов для регенерации поврежденных тканей и органов [1].

Методы трехмерного анализа биологических структур обычно объединяют под одним термином «нанотомография». Термин томогра́фия (τομογραφία) происходит от древнегреческоих слов τομή – срез, сечение и γραφω – пишу, и исходно подразумевает получение послойных изображений внутренней структуры объекта с последующим объединением их в объемную реконструкцию. Однако в настоящее время этот термин используется практически для всех видов трехмерной микро- и наноскопии. Например, такие методы, как рентгеновская нанотомография и транмиссионная электронная нанотомография не подразумевают выполнения последовательных физических или оптических срезов исследуемых объектов.

Далее мы рассмотрим подробнее данные и другие современные методы нанотомографии, которые используются для изучения биологических объектов и материалов.

1.1 Рентгеновская микроскопия и нанотомография

В основе рентгеновской микроскопии лежит группа методов, созданных для исследования микроскопической структуры образцов с использованием рентгеновского излучения, представляющего собой электромагнитные волны длиной от от $\sim 10^{-7}$ до $\sim 10^{-12}$ м или $\sim 10^{3}$ до $\sim 10^{-2}$ Å (от 10 нанометров до 10^{-3}

нанометра, это соответствует энергии фотонов от 100 эВ до 1 МэВ) [2, 3]. Общепризнанного четкого разделения с ультрафиолетовым в мягкой области и гамма-излучением в жесткой области не имеется. Оба вида излучения (рентгеновское излучение и гамма-излучение) – электромагнитные и являются эквивалентными при одной и той же энергии фотонов. Мягкое рентгеновское излучение обладает более низкой энергией фотона, меньшей частотой излучения и, соответственно, большей длиной волны, в то время как жесткое характеризуется большей энергией фотона, более высокой частотой излучения с меньшей длиной волны [2].

Рентгеновская микроскопия дает возможность получения увеличенного изображения объекта в реальном пространстве благодаря фокусирующей оптике. По сравнению с видимым светом, рентгеновские лучи проникают глубже в исследуемый образец благодаря малой волновой длине, что делает возможным исследование непроницаемых для света объектов. Дифракционный предел рентгеновской микроскопии равен нескольким десяткам нанометров, по разрешению изображений этот вид микроскопии находится между электронной и оптической. Однако электронная микроскопия, отличающаяся более высоким разрешением, требует присутствия вакуума и объектов с металлическим напылением, будучи, таким образом, разрушающим образец методом. Многие рентгеновские безлинзовые методы изучения показывают изображение образца в обратном пространстве, в связи с чем необходимо использование математической инверсии, а значит чревато появлением артефактов. Размер источника рентгеновского излучения ограничивает разрешающую способность безлинзовых методов, в то время как применение линз может создавать уменьшенное до нескольких десятков нанометров изображение. Данный вид микроскопии используется для исследования полимеров, магнитных материалов, а также в биомедицине [3]. Например, сканирующая трансмиссионная рентгеновская спектромикроскопия (STXM) применена для исследования взаимодействия наноматериалов (из углеродов и на основе металлов) с биопленками, микробными клетками и внеклеточными полимерами [4].

1.2 Трансмиссионная электронная томография

Электронная томография представляет собой метод получения 3D изображений объектов с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). В данном методе томографии трехмерная структура объекта на макромолекулярном уровне воссоздается с помощью анализа большого количества проекций в широком угловом диапазоне. За основу взята теорема Фурье-среза, утверждающая, что преобразование Фурье проекционного изображения соответствует центральному срезу трехмерного преобразования Фурье исследуемого образца. Путем объединения преобразования Фурье каждой отдельной проекции под соответствующим углом с последующим обратным преобразованием Фурье получают реальную трехмерную структуру объекта [5]. Также восстановление может осуществляться с применением прямого обратного проецирования в реальном пространстве [6].

Эта информация собирается и используется для сборки трехмерного изображения цели. Для биологических применений типичное разрешение систем электронной томографии находится в диапазоне 5–20 нм, что подходит для изучения надмолекулярных мультибелковых структур, в том числе внутриклеточных, но не вторичной и третичной структуры отдельного белка или полипептида, которые, однако, могут быть получены с применением статистической математической обработки большого количества томографических изображений молекулярных комплексов одного типа [7].

1.3 Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия представляет собой метод, при котором изображение объекта строится за счет флуоресценции – излучения вещества, которое возникает за счет испускания поглощаемой ими световой энергии в виде света с другой длиной волны. Подобные вещества, флуорофоры, представляют собой флуоресцентные химические соединения, которые способны при

воздействии на них светом излучать свет обратно. Молекулы поглощают кванты света, после чего переходят в электронно-возбужденное состояние. Флуоресценция же представляет собой возвращение этой молекулы в своё обычное состояние, которое протекает с излучением света. Образец облучается светом с определенными длинами волн, которые поглощаются флуорофорами, излучающими свет с большей длиной волны, то есть другого цвета, чем тот, который поглотили. Возбуждающее излучение отделяется от более слабого флуоресцентного излучения благодаря спектральному эмиссионному фильтру (рисунок 1).

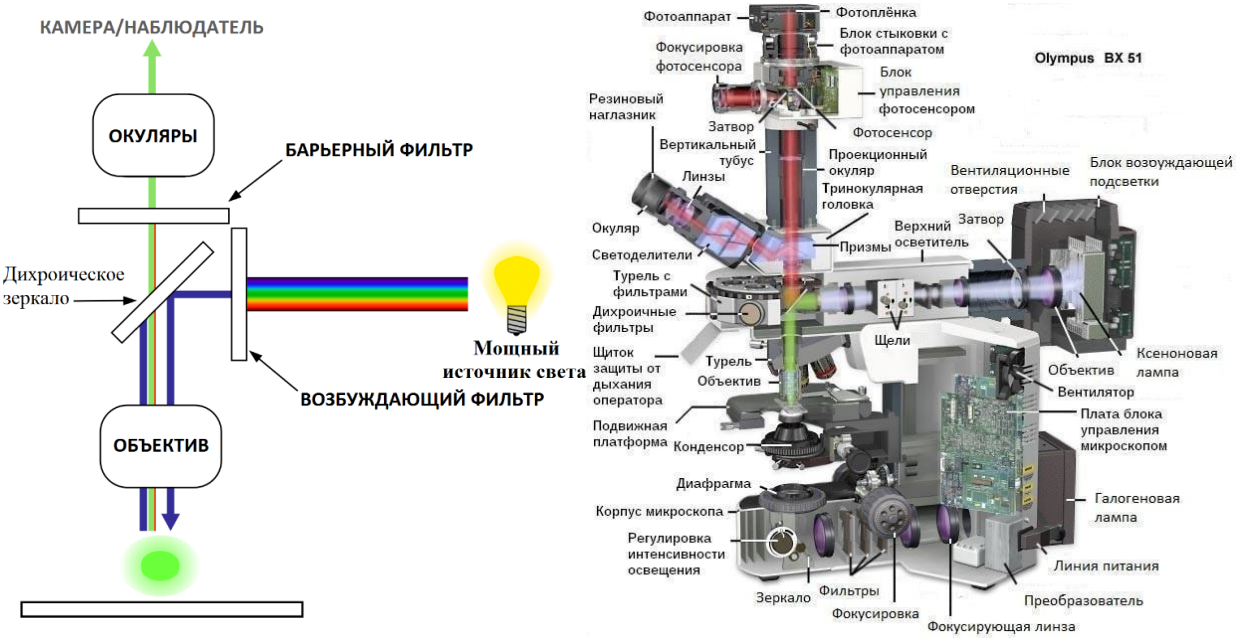


Рисунок 1 – Принцип работы флуоресцентной микроскопии и пример схемы современного флуоресцентного микроскопа Olympus BX 51 (предоставлено производителем)

Для каждого типа молекулы характерно специфическое поглощение и флуоресценция, которые зависят от строения её энергетических электронных уровней. Флуорофоры представляют собой молекулы, поглощающие свет в одном диапазоне длин волн (длина волны возбуждения) и испускающие в другом диапазоне, сдвинутом в сторону больших длин волн света (длина волны испускания) [8]. В связи с тем, что большинство молекул в клетке обладают

весьма слабой флуоресценцией, для биологических образцов используются яркие флуорофоры, которые специфически окрашивают структуры клеток и тканей. Метки нацеливаются на интересующую молекулу (молекулы) путем генетического кодирования флуоресцентного белка или с помощью связывания флуоресцентно меченого антитела. Также метод хорош тем, что одновременно могут быть различимы несколько различных флуоресцентных молекул, и есть возможность визуализировать только отдельные молекулы [9]. Благодаря этому метод ценен для медико-биологических исследований [10].

Оптическая микроскопия позволяет исследовать микроструктуру клеток и микроорганизмов как фиксированных, так и живых, и в этом заключается ее преимущество перед электронной и атомно-силовой микроскопией, хотя она и обладает более низким разрешением. Таким образом, флуоресцентная микроскопия является одним из наиболее подходящих методов для изучения функционирования организмов на трех уровнях: молекулярном, субклеточном и клеточном [11].

При использовании флуоресцентного микроскопа сам исследуемый объект подвергается облучению светом с большей частотой, а конечное изображение представлено в оптическом спектре. Излучение, исходящее от исследуемого объекта, проходит через фильтр, который отсекает свет на возбуждающей частоте. Специальная цифровая камера дает возможность сделать изображение флуоресцентного образца с большой выдержкой, при этом время формирования снимка может составлять около часа.

Основными компонентами во флуоресцентном микроскопе являются источники света, фильтры возбуждения и эмиссионные фильтры – полосовые фильтры, пропускающие диапазон волн, соответствующий необходимому спектру поглощения, при этом блокирующие нежелательное излучение, дихроичное зеркало, отражающее излучение волн только одной длины и свободно пропускающее остальные. В качестве источника света может быть использована ксеноновая лампа, ртутная лампа, в более мощных – светодиоды и лазеры.

Флуоресцентная микроскопия чаще всего выполняется с использованием эпифлуоресценции, когда свет возбуждения флуоресценции освещает образец через тот же объектив, который используется для обнаружения излучения исследуемого образца. Куб флуоресцентного фильтра разделяет свет по длине волны, благодаря чему испускаемый свет может отображаться без помех со стороны возбуждающего света [9].

Флуоресцентные метки вводятся в клетку способом иммунофлуоресценции и генетическим введением флуоресцентного белка. При иммунофлуоресценции вводятся флуоресцентно меченые антитела, связывающиеся со специфическими белками в клетке. Обычно сначала вводят первичные антитела, которые распознают интересующие белки в клетке. После отмывания несвязанных антител добавляются флуоресцентно меченые вторичные антитела, связывающиеся с первичными антителами. Такая непрямая иммунофлуоресценция позволяет легко переключать первичные антитела, поскольку их не нужно метить, а вторичные антитела обычно обладают широкой специфичностью [12].

На рисунке 2 показан характерный пример флуоресцентных изображений культуры нейральных клеток, меченных сразу несколькими маркерами с разными длинами волн испускания (маркер астроцитов GFAP с вторичными антителами goat anti-rabbit IgG (H+ L), меченными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488; маркеры нейронов TUJ1 и MAP2 с вторичными антителами goat-anti mouse IgG (H+ L), меченными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594; флуоресцентный маркер клеточных ядер (ДНК) Hoechst) [13].

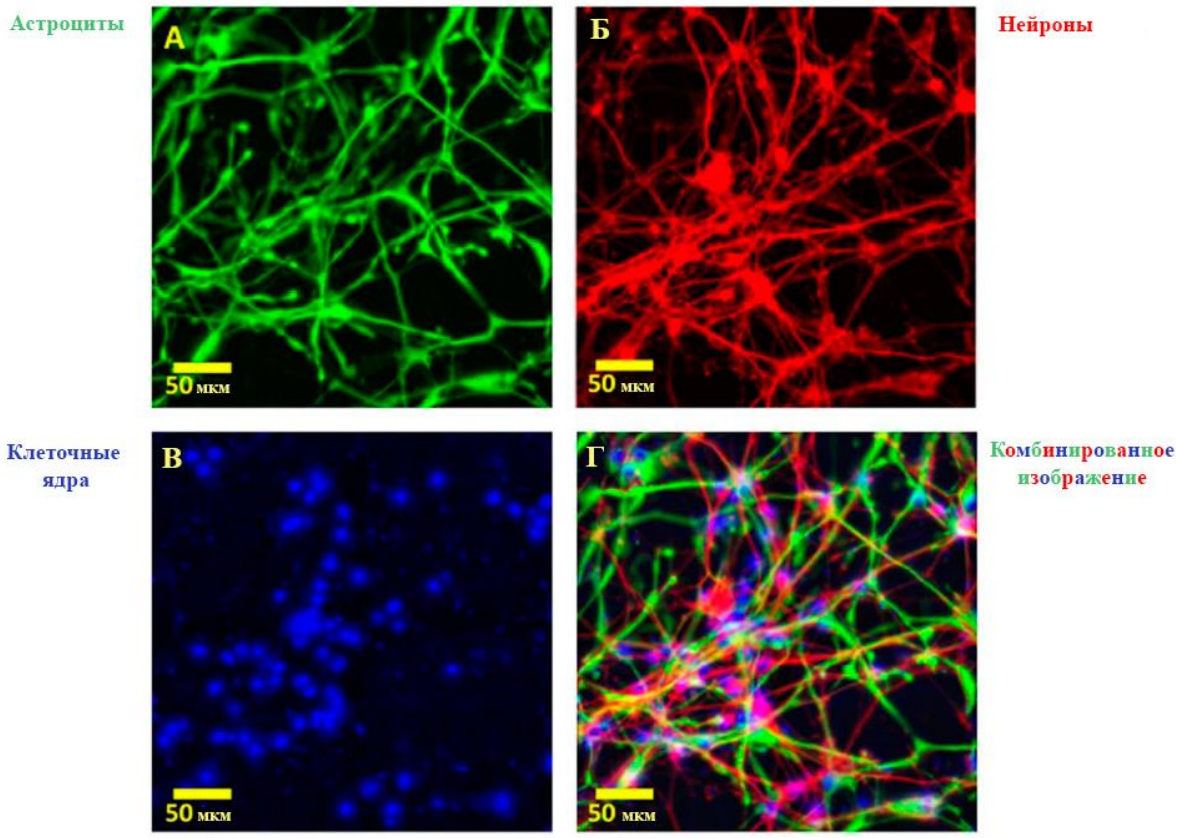


Рисунок 2 – Иммуноокрашивание диссоциированной культуры центральной нервной системы плода человека (21 день в культуре), меченной маркером астроцитов, GFAP (A), нейрональными маркерами TUJ1 и MAP2 (B), маркером ядер Hoechst (C) и композитным покрытием (D). Шкала – 50 мкм [13]

При генетическом введении флуоресцентного белка происходит слияние флуоресцентного белка с интересующей мишенью, которую потом вводят в геном клетки или экспрессируют из плаздмиды. Метод позволяет визуализировать белки в живых клетках, и при введении в геном это означает экспрессию белка на его эндогенном уровне из его эндогенного промотора. При обеих методиках можно отобразить четыре цвета в клетке [14].

На рисунке 3 приведен пример двухцветного флуоресцентного изображения, отражающего взаимодействие опухолевых клеток с клетками организма-хозяина. На изображении показаны клетки организма-хозяина, подобные дендритным клеткам, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP), непосредственно контактирующие с клетками меланомы, экспрессирующими B16F10 – красный флуоресцентный белок (RFP). Это

изображение было получено у трансгенной мыши, экспрессирующей GFP, которой инъецировали опухолевые клетки, экспрессирующие RFP [15].

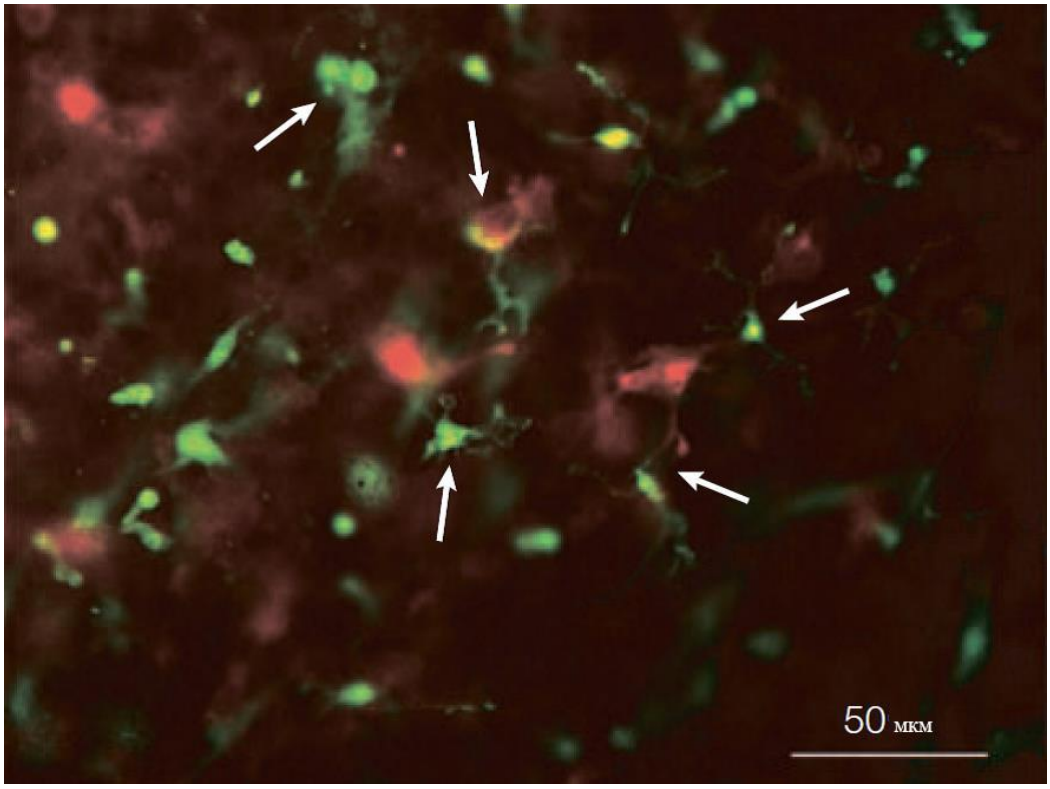


Рисунок 3 – Дендритоподобные клетки-хозяева, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP), непосредственно контактируют с клетками меланомы, экспрессирующими B16F10 – красный флуоресцентный белок (RFP) (взаимодействия между клетками обозначены стрелками). Двухцветное флуоресцентное изображение [15]

Однако необходимо отметить, что как латеральное, так и аксиальное разрешение обычной флуоресцентной микроскопии, ограниченные дифракционными пределами, недостаточны для решения многих биологических задач, и был разработан ряд методов, позволяющих увеличить разрешение флуоресцентной микроскопии, а также выполнять трехмерную реконструкцию распределений флуоресцентных маркеров в объеме образца.

1.4 Конфокальная микроскопия

Лазерная конфокальная сканирующая микроскопия (ЛКСМ) – вид оптической микроскопии, в которой поток фонового излучения (не из области фокуса объектива) на детекторе ограничен за счет применения точечной диафрагмы (пинхол, от английского pinhole), расположенной в плоскости изображения, в которой фокусируется свет за объективом. Благодаря такой конструкции данный вид микроскопии характеризуется высоким контрастом и пространственным разрешением на фоне классической световой микроскопии [16]. Конфокальная микроскопия даёт возможность получить реконструированное трёхмерное изображение исследуемого объекта на основе серий изображений, полученных на разной глубине фокальной плоскости внутри образца.

С помощью конфокального микроскопа получается изображение тонкого среза исследуемого образца на одном уровне глубины, то есть существует возможность контролировать глубину фокуса оптической системы, в то время как обычный световой микроскоп создает изображение всей части объекта, которая находится в глубине резкости микрообъектива. Во флуоресцентном микроскопе подсвечиваются любые молекулы красителя в поле зрения, в том числе и в нефокусных плоскостях. Конфокальная микроскопия позволяет отклонить расфокусированный свет от детектора, чтобы он не размывал собираемые изображения. Этот метод позволяет получать изображения с высоким разрешением в толстых тканях.

В конфокальной микроскопии применяется точечная подсветка и пинхол в связанной оптически плоскости перед детектором, чтобы убрать внефокусные сигналы, в отличие от широкопольного флуоресцентного микроскопа, где объект полностью освещен источником излучения, а значит, облучается весь образец с его фоновой частью, и исходящая флуоресценция обнаруживается фотоприемником или камерой микроскопа. В конфокальном микроскопе флуоресцентное излучение детектируется только из фокальной плоскости, в связи с этим разрешение итогового изображения значительно лучше по сравнению со световыми микроскопами,

особенно по глубине объекта (по оси Z). Вместе с тем с увеличением разрешения снижается интенсивность полезного сигнала, так как большая часть излучения от объекта диафрагмируется. Исправить это помогает применение более длительной экспозиции детектора и высокочувствительные приемники (лавинные фотодиоды, фотоэлектронные умножители), преобразующие оптический сигнал в электрический, после чего происходит регистрация на компьютере.

Для получения двумерных и трехмерных изображений в конфокальном микроскопе необходимо растровое сканирование объекта, так как регистрируется лишь одна флуоресцентная точка на образце. Передвижение лазерного пучка происходит в горизонтальной плоскости с применением зеркал, у которых можно регулировать угол наклона. Скорость сканирования в конфокальном микроскопе невысокая, тем не менее может регулироваться. При этом стоит учитывать, при медленном сканировании наилучшее соотношение сигнала к шуму, в результате чего контраст и разрешение изображения лучше. Вариант схемы конфокального флуоресцентного микроскопа представлен на рисунке 4.

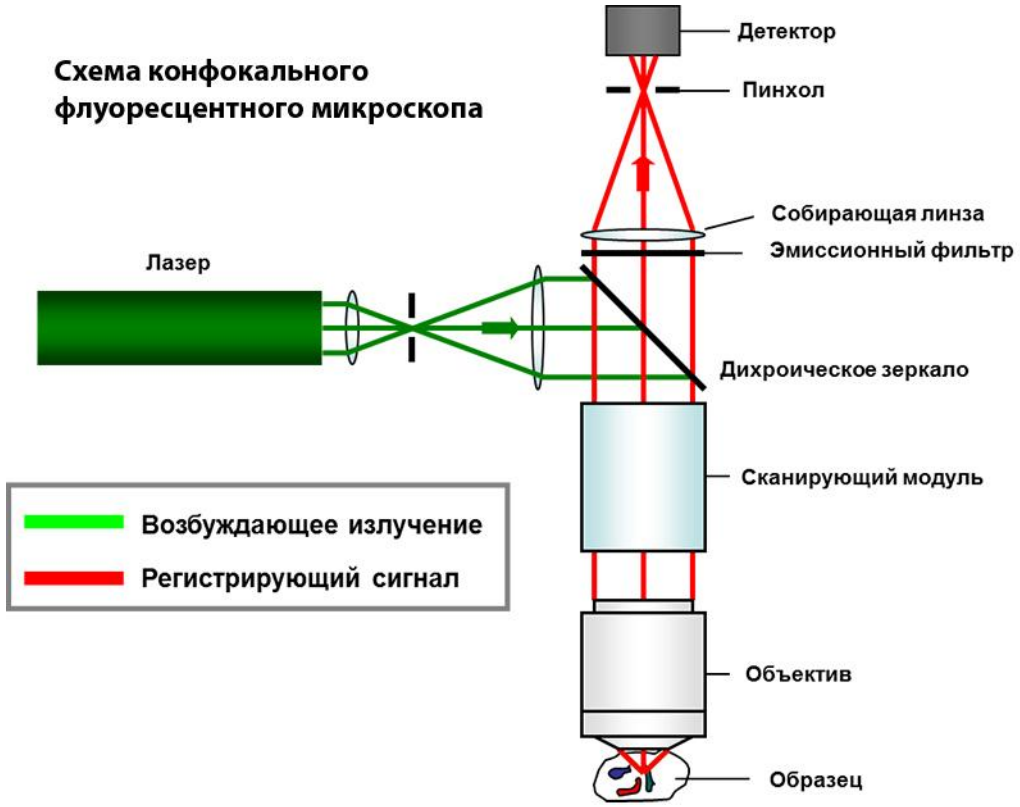


Рисунок 4 – Вариант схемы конфокального флуоресцентного микроскопа (предоставлен производителем NANOSCOPE Systems, Inc)

В конфокальном микроскопе толщина фокальной плоскости зависит от оптических характеристик образца и соответствует длине волны применяемого излучения, поделенной на числовую апертуру объектива. Малая величина толщины оптического среза позволяет использовать данный микроскоп для хорошей трехмерной визуализации, а также поверхностного профилирования образцов [17].

Данная микроскопия дает возможность исследовать биологические объекты на клеточном уровне в их естественном физиологическом состоянии и позволяет наблюдать клеточную динамику во времени по высоте, ширине и глубине. Этот тип микроскопа позволяет исследовать образцы большой толщины без повреждений, с минимальными требованиями к подготовке, при этом латеральное разрешение выше, чем в обычной световой микроскопии. В биологические образцы обычно вводят флуоресцентные красители низкой концентрации, чтобы минимально воздействовать на объект, но достаточной для визуализации органелл и конкретных областей [18].

На рисунке 5 показан пример данных, отражающих распределение нанокапсул, нагруженных флуоресцентным красителем родамин, в клетках аденокарциномы человека MCF-7, полученных при помощи конфокальной микроскопии, а также коррелятивные изображения распределений маркеров, окрашивающих ядро и цитоплазму.

Существуют конфокальные установки, способные детектировать отдельные флуоресцентные молекулы, а трансгенные технологии создают организмы, производящие собственные флуоресцентные химерные молекулы [19].

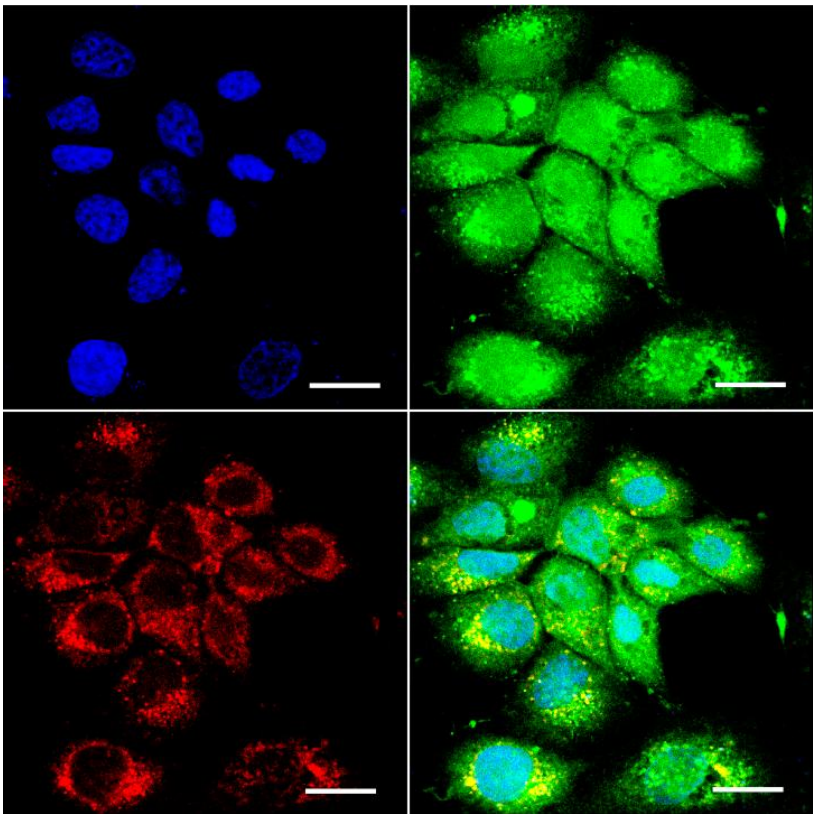


Рисунок 5 – Внутриклеточное распределение капсул с родамином длиной волны 550 нм в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 после 1-часовой инкубации. Синим цветом обозначены ядра клеток, зеленым – цитоплазма, красным – родамин. Правое нижнее изображение представляет собой наложение 3 каналов. Данные конфокальной микроскопии, масштабная линейка составляет 10 мкм [20]

На рисунках 6 и 7 приведены примеры использования флуоресцентной конфокальной микроскопии для исследований тканеинженерных конструкций, в частности, клеточных макро- и микроносителей на основе фиброина шелка с адгезированными клетками (в том числе нейронами на рисунке 7).

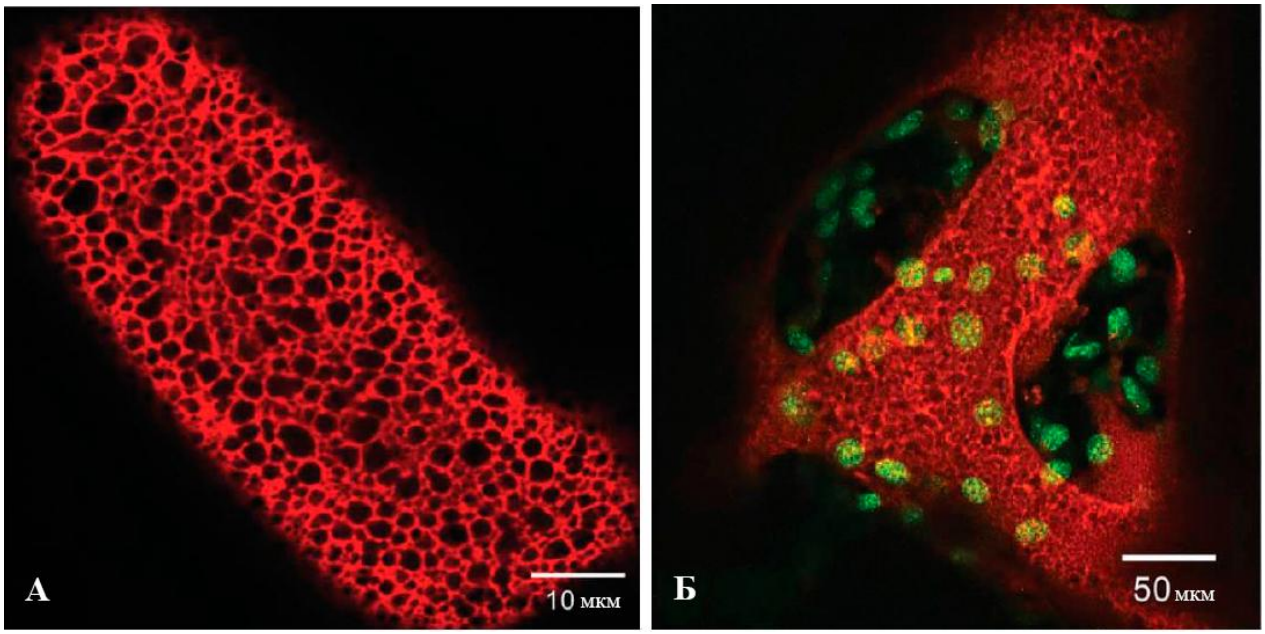


Рисунок 6 – Исследование клеточных макроносителей на основе фиброина шелка методом лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. А – изображение оптического поперечного сечения каркаса показывает микропористую структуру, сохраняющуюся в водной среде. Каркасы были конъюгированы с тетраметилродаминизотиоцианатом. Б – изображение использованное для количественного определения числа адгезированных клеток. Ядра визуализировали с помощью SYTOX Green. Микроструктуру каркасов визуализировали с помощью тетраметилродаминизотиоцианата [21]

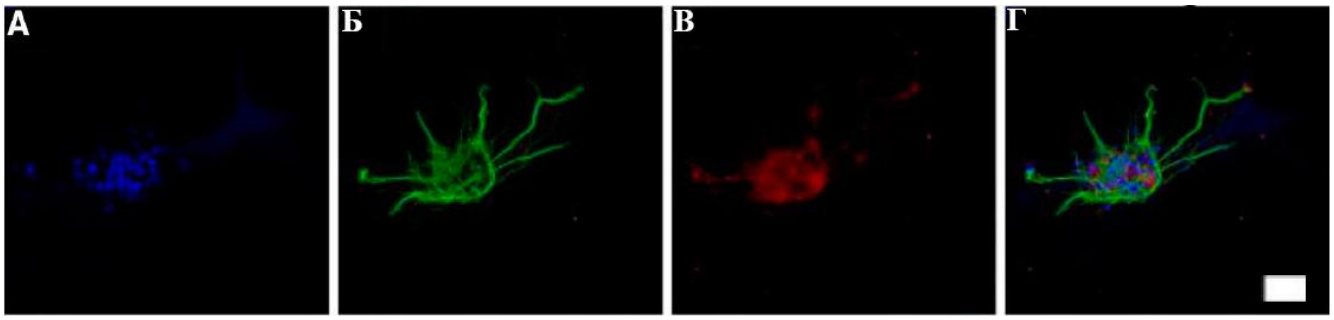


Рисунок 7 – Адгезия нейронов к фиброин-желатиновым микроносителям. Нейроны культивировали на фиброин-желатиновых микроносителях в течение 24 ч; А – окрашенные DAPI ядра клеток, Б – реактивность β-III тубулина, В – реактивность против NCAM (молекул нейрональной клеточной адгезии), Г – объединенные изображения. Шкала – 20 мкм [22]

На рисунке 8 приведены конфокальные флуоресцентные изображения клеточно-инженерных конструкций: неонатальных кардиомиоцитов и сердечных фибробластов крысы, культивированных на нановолокнах на основе полилактида (PLA) [23].

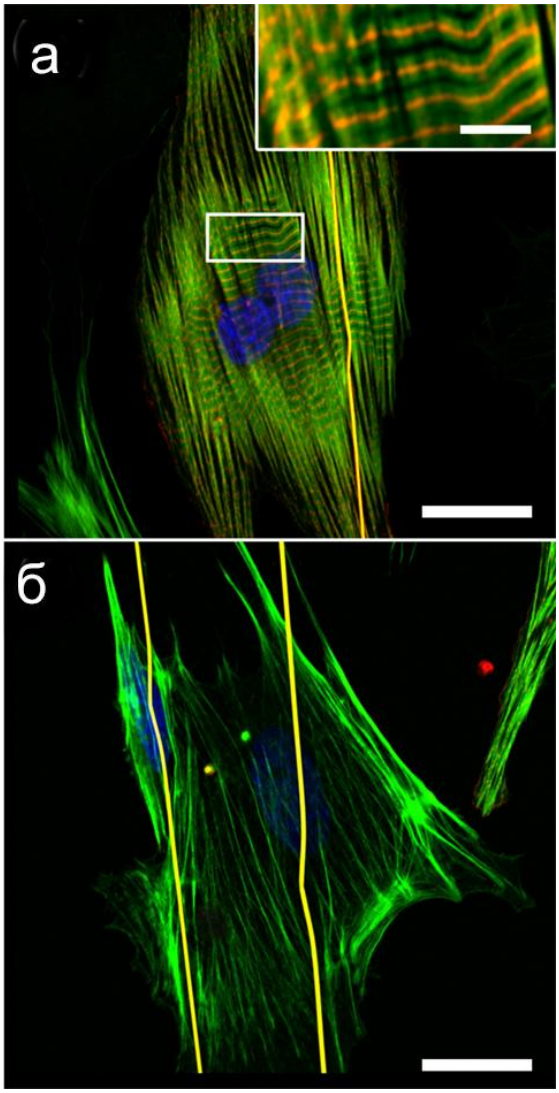


Рисунок 8 – Неонатальные кардиомиоциты (а) и сердечные фибробласты (б) крысы на полилактидных нановолокнах (продольные оптические сечения). Флуоресцентное маркирование: оранжевый – полилактидные нановолокна, зеленый – актиновые филаменты, красный – α-актинин в Z-дисках саркомеров кардиомиоцитов, синий – клеточные ядра. Размерные отрезки – 20 мкм. На вставке в (а): увеличенный фрагмент саркомерной структуры сократительного аппарата кардиомиоцита (отмечен прямоугольником). Размерный отрезок на вставке – 4 мкм [23]

Одним из главных преимуществ конфокальной микроскопии является повышенная контрастность, которая достигается благодаря использованию сфокусированного возбуждающего излучения в поле исследования, а также диафрагмированию флуоресцентного излучения. Также получение множественных последовательных «оптических срезов» с пошаговым смещением фокальной плоскости микроскопа дает возможность создавать послойную 3D-

реконструкцию образца [24], где разрешение по оси Z значительно улучшается по сравнению с глубиной резкости обычной флуоресцентной микроскопии, но все равно остается на уровне, превосходящем длину волны соответствующего излучения.

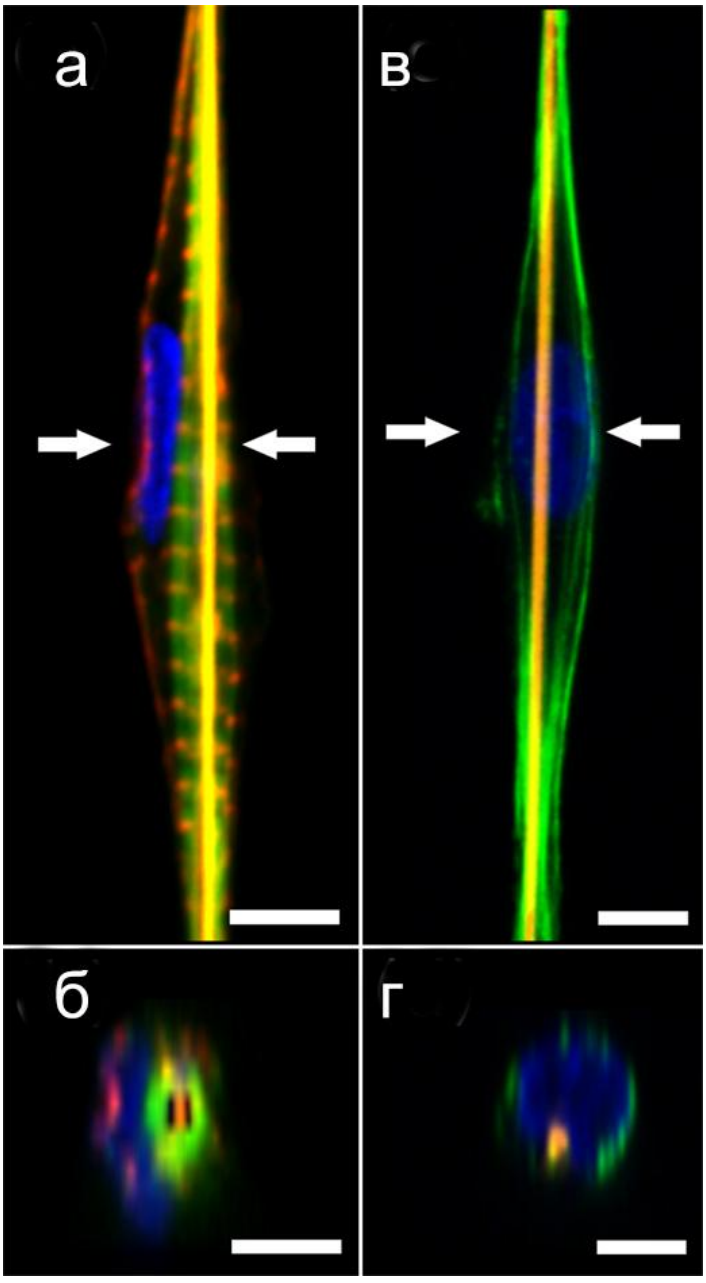


Рисунок 9 – Неонатальные кардиомиоциты (а, б) и сердечные фибробласты (в, г) крысы на свободных нановолокнах, продольные (а, в) и поперечные (б, г) оптические сечения. Флуоресцентное маркирование: оранжевый – полилактидные нановолокна, зеленый – актиновые филаменты, красный – α-актинин в Z-дисках саркомеров кардиомиоцитов, синий – клеточные ядра. Стрелки на (а) и (в) показывают положения соответствующих поперечных оптических сечений. Размерные отрезки – 4 мкм [23]

Пример такой реконструкции показан на рисунке 9, где трехмерный анализ продольных и поперечных сечений полученных конфокальных данных позволяет оценить топологию взаимодействия клеток с нановолокнами, в частности обволакивание нановолокон кардиомиоцитами.

1.5 Микроскопия полного внутреннего отражения

Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence) – многофункциональный метод микроскопии для визуализации отдельных молекул с суперразрешением, характеризующийся высоким соотношением сигнала к шуму и имеющий большое пространственное разрешение по вертикали. В основе данной микроскопии – использование затухающей волны, которая избирательно освещает и вызывает флуоресценцию в определенной области объекта. Для микроскопии полного внутреннего отражения берется образец до 200 нм толщиной, методика хорошо подходит для исследования взаимодействия отдельных молекул в области клетки, близкой к поверхности, а также мембранных процессов. Часто в исследуемый объект добавляют фрагменты молекул, придающих ей флуоресцентные свойства (флуорофоры) для избирательной визуализации.

Метод основан на физическом явлении полного внутреннего отражения: если угол падения световой волны на границу раздела сред выше критического, световой луч не проникает в среду с меньшим показателем преломления, однако за счет отраженного света происходит образование электромагнитного поля, границы которого находятся в области, соприкасающейся с границей раздела. Частота этого поля равна частоте падающего света, и, в связи с тем, что его затухание происходит экспоненциально с увеличением расстояния от границы раздела, глубина его прохождения по направлению z в толщу образца составляет около нескольких сотен нанометров. В связи с экспоненциальным характером затухания поля свечение флуорофоров индуцируется на толщине менее 100 нанометров, что составляет примерно одну десятую среза, полученного с помощью конфокальной

флуоресцентной микроскопии. Лучшее соотношение шума к сигналу в данном методе обеспечивается тем, что не происходит возбуждения флуорофоров во всем образце, вторичная флуоресценция происходит лишь в очень тонких слоях, за счет чего можно зафиксировать свечение отдельных молекул.

Для применения затухающей волны в микроскопии важно учитывать тот факт, что для полного внутреннего отражения и возникновения нераспространяющегося поля величина показателя преломления среды, из которой падает свет, должна быть выше показателя преломления среды образца, а угол его падения выше критического угла.

В микроскопии полного внутреннего отражения используют два основных метода измерения: с использованием призм и с использованием объективов. В конструкции с призмой лазерный луч падает на покровное стекло, проходя сквозь призму, находящуюся на поверхности микроскопа, угол падения в данном случае близок к критическому. Этот метод часто применяется в биологии, однако затрудняет манипуляции с объектом, например, введение дополнительных веществ или физиологические измерения. Кроме того, при использовании инвертированного микроскопа, где объект освещается с противоположной объективу стороны, область с нераспространяющимся полем наблюдается сквозь весь исследуемый образец. В этом случае призму помещают на сторону образца, которая обращена к объективу, но тогда возникает короткое рабочее расстояние между объективом, призмой и объектом, что также вызывает проблемы.

Сквозной метод освещения через объектив представляет собой микроскоп, где для наведения света на границу раздела используют объектив. Использование объективов с высокой числовой апертурой (> 1) дает возможность совершать большее количество действий и измерений с образцом, однако угол падения должен выставляться более тщательно, что является непростой задачей в данной конфигурации [25].

При применении лазера широк диапазон изменения угла падения света, проходящего через призму, а значит, есть возможность регулировать глубину проникновения нераспространяющегося поля. В случае использования объектива

фокус лазерного луча находится на задней фокальной плоскости объектива вне оси, и чем дальше рассеяние от оси, тем выше угол падения света на образец [26].

Микроскопия полного внутреннего отражения используется для исследования белковых взаимодействий внутри клетки. Например, TIRF применяется для визуализации молекулярной сборки актиновых/тропомиозиновых филаментов *in vitro*. Данная микроскопия помогает определить кинетические данные сборки тропомиозиновых филаментов. Метод позволяет собрать данные об отдельных молекулах в режиме реального времени, чтобы восполнить пробел между множественными исследованиями *in vitro* и *in vivo*, направленными на изучение функций тропомиозина [27].

Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения позволяет исследовать внеклеточные везикулы, эффективно оценивая наличие молекулярных биомаркеров. Данная микроскопия позволяет визуализировать определенные элементы на уровне одной везикулы. Благодаря рабочему расстоянию 200-300 нм можно улучшить видимость по оси Z, что и дает сверхвысокий тип разрешения в микроскопии. Это даёт возможность видеть небольшие везикулы в непосредственной близости от покровного стекла, а значит, не возникает проблемы визуализации более чем одной экзосомы в одном объёме, что происходит при использовании конфокальной микроскопии, где разрешение по оси Z 500 нм [28,29].

Разработана система анализа для автоматического обнаружения, отслеживания, извлечения данных о фокальных контактах, позволяющая лучше понимать их динамическую регуляцию. Система предназначена для количественной оценки динамики флуоресцентно меченого паксиллина и FAK (киназы фокальных контактов) в фибробластах NIH 3T3 с использованием флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF). Наблюдения включали размер, форму, интенсивность и положение каждого адгезирующего фокального контакта, присутствующего в живой клетке. Происходило отслеживание этих характеристик в течение времени, с фиксацией срока адгезии, скорости сборки и разборки, а также разделения свойств по отдельным зонам (Рисунок 10). Показано,

как одна точечная мутация в паксиллине в сайте фосфорилирования Jun-киназы Serine 178 изменяет размер, распределение и скорость сборки фокального контакта [30].

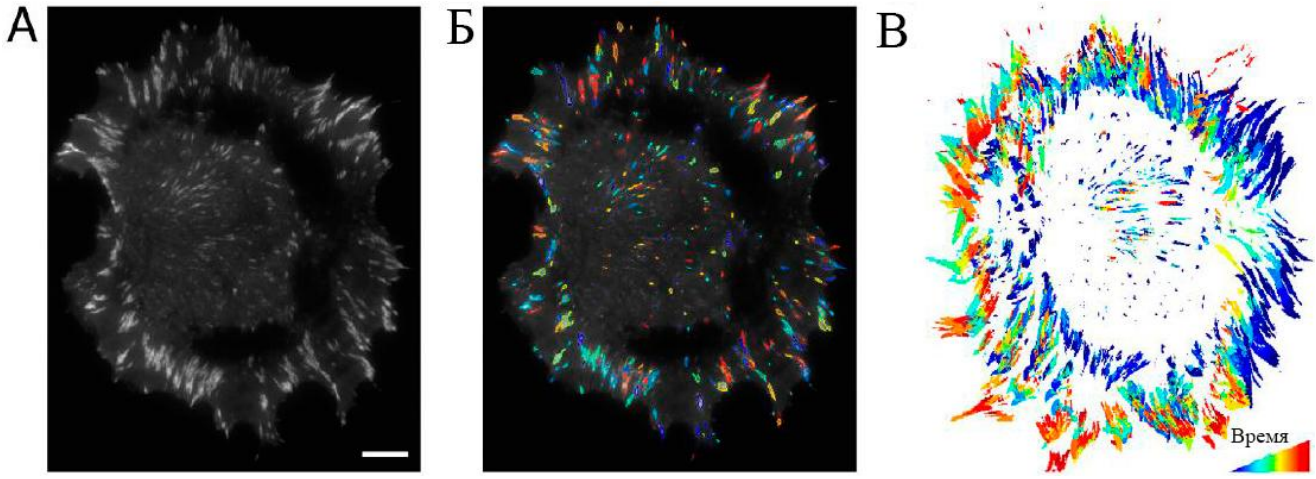


Рисунок 10 – Применение методов количественной обработки изображений к изображениям фокальных контактов позволяет всесторонне охарактеризовать их свойства. (А) Флуоресцентное изображение: один кадр из 200-минутной видеосъемки клеткок NIH 3T3, экспрессирующих GFP-паксиллин (размерный отрезок - 10 мкм). (В) То же изображение, что и в (А), но каждый фокальный контакт выделен отдельным цветом. (С) Весь набор фокальных контактов в эксперименте можно визуализировать, наложив контакты от каждого флуоресцентного изображения с использованием разного цвета для набора фокальных контактов для каждого момента времени. Приведенный пример включает спайки из 198 изображений [30]

С помощью многоцветной TIRF-микроскопии исследованы взаимодействия между различными +TIPs на концах динамических микротрубочек (TIP белки, связывающиеся с (+)-концом микротрубочек), чтобы исследовать динамику, иерархию и функцию этих белков [31].

Ионные каналы играют ключевую роль в самых разных клеточных функциях, и TIRF-микроскопия позволяет исследовать их физиологические характеристики, фармакологические реакции, молекулярную структуру, подвижность самого ионного канала в клеточной мембране (рисунок 11). Флуоресцентный микроскоп полного внутреннего отражения позволяет визуализировать флуорофоры в ограниченной области в пределах зоны исчезающего поля (менее 200 нм от границы раздела покровного стекла и плазматической мембраны) в живых клетках. Таким образом, микроскоп TIRF

полезен для выборочной визуализации поверхности плазмалеммы и зон под ней [32].

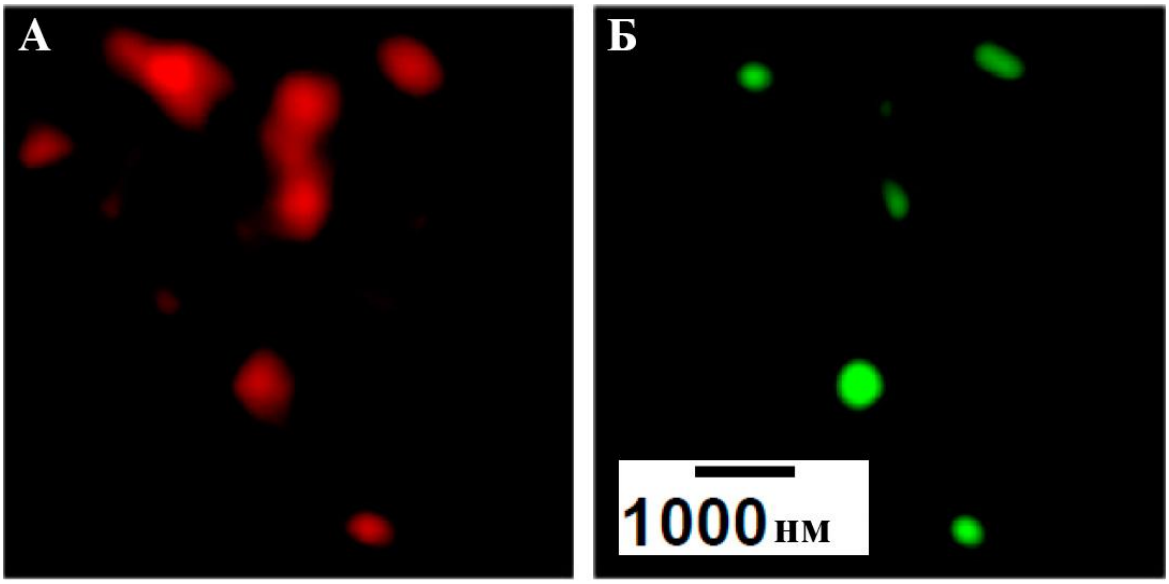


Рисунок 11 – Полученные с использованием микроскопии полного внутреннего отражения флуоресцентные изображения гладкомышечной клетки стенки аорты крысы, экспрессирующей ионные каналы BKCaα-YFP (А) и Cav1-CFP (Б) [33]

Основной недостаток TIRF-микроскопии следует из главного ее преимущества: регистрация флуоресценции возможна только в тонком приповерхностном слое образца, толщина которого не превышает нескольких сотен нм, что накладывает ограничения на спектр задач, решаемых с помощью данной методики. И на сегодняшний день TIRF используется в основном для визуализации процессов, ассоциированных с плазматической мембраной клетки, изучение взаимодействия лиганд-рецептор на клеточной поверхности, картирования цитоплазматической мембраны или контактов клетки с подложкой.

1.6 Томография массивов серийных срезов

Одним из путей повышения разрешения микроскопических методик по глубине является физическое ограничение толщины исследуемого фрагмента объекта - анализ сверхтонких срезов, аналогично трансмиссионной электронной микроскопии [34]. Современные технологии ультрамикротомии позволяют получать

срезы толщиной от десятков до нескольких сотен нанометров, которые могут быть проанализированы методами оптической или электронной микроскопии. Компьютерная обработка изображений, полученных на последовательных срезах, позволяет реконструировать трехмерные наноструктуры в объеме изучаемых образцов. При этом биологические объекты и материалы чаще всего приходится подвергать заливке в специальные эпоксидные среды.

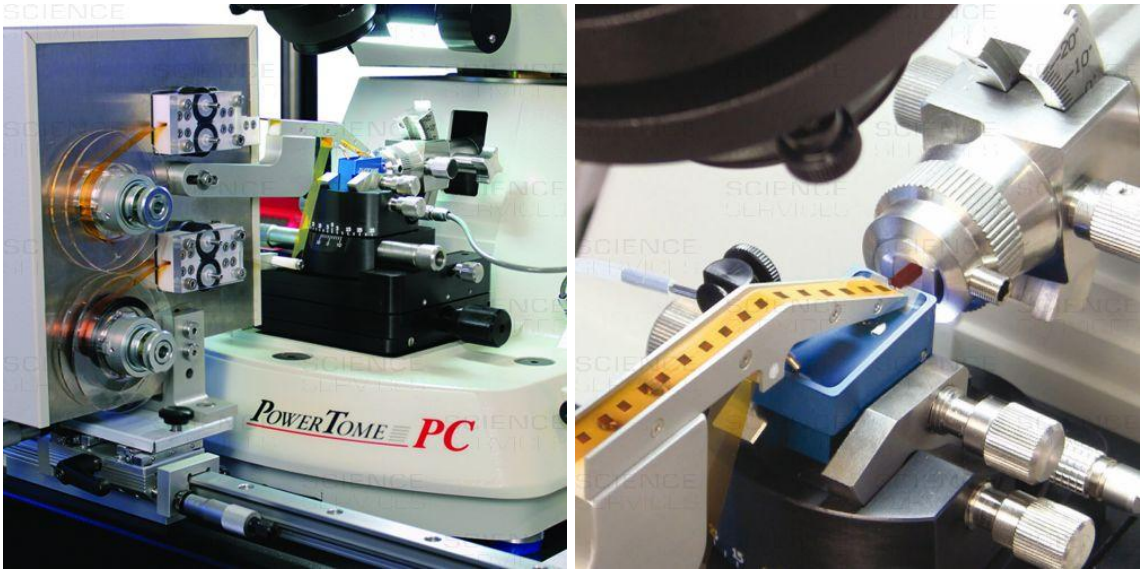


Рисунок 12 – ATUMtome – прибор для автоматического сбора последовательных срезов (Boeckeler Inc., США) [35]

Обычно срезы выполняются при помощи специализированного сверхострого алмазного ножа, оснащенного ванночкой, заполняемой водой, на поверхности которой срезы находятся после срезания. В настоящее время разработаны несколько систем автоматического или полуавтоматического сбора последовательных срезов, получаемых при помощи ультрамикротома. Например, на рисунке 12 показана система ATUMtome (Boeckeler Inc., США), позволяющая собирать последовательные срезы на специализированную полимерную ленту с углеродным покрытием [35]. Далее ленты могут быть перенесены на кремниевые пластины, на которых срезы могут быть проанализированы при помощи методик оптической или сканирующей электронной микроскопии. Другие устройства, например ARTOS 3D (Leica Microsystems), позволяют собирать серии срезов на

кремниевые пластины, погруженные в ванночку специализированного ножа ультрамикротома [34].

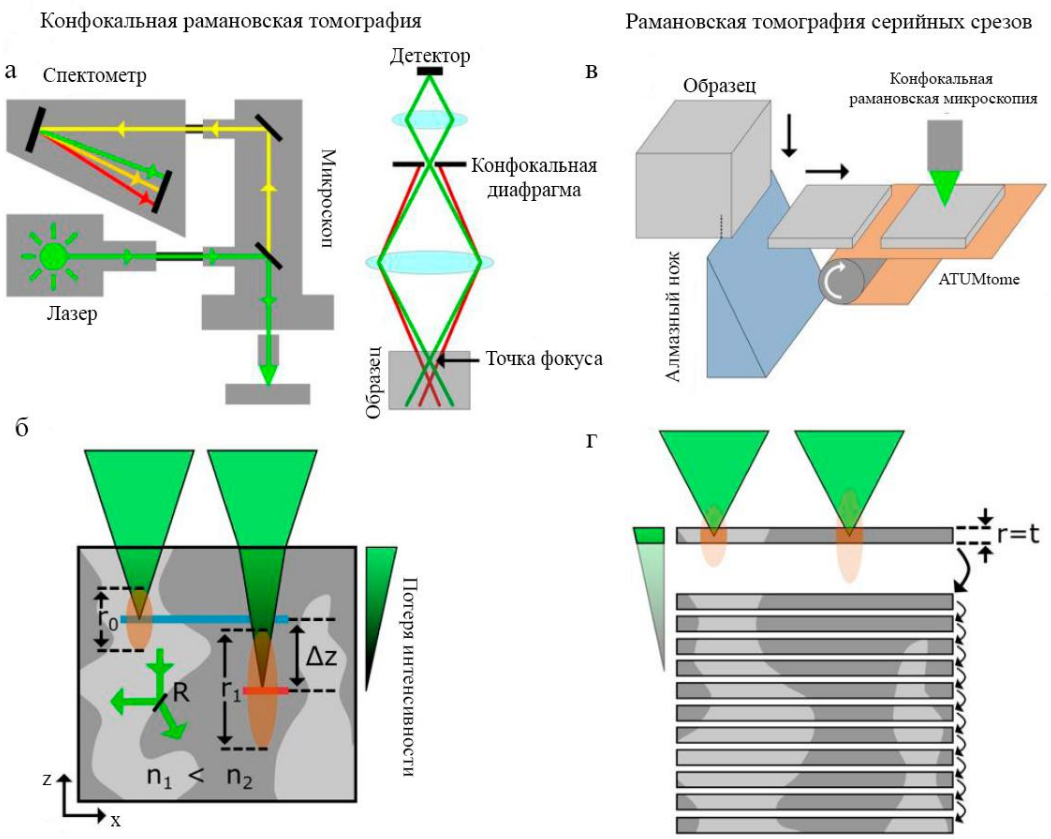


Рисунок 13 – Сравнение конфокальной рамановской томографии в объеме материала с применением метода массивов серийных срезов [35]

На рисунке 13 схематично показано преимущество метода томографии массивов серийных срезов над обычным подходом конфокальной микроспектроскопии. В данном случае разрешение по глубине будет соответствовать толщине среза и не зависеть от глубины проникновения в образец. Также исключено паразитное влияние флуоресценции от областей образца, находящихся вне фокуса, которое значительно ограничивает разрешение по глубине в случае использования стандартной флуоресцентной микроскопии. На рисунке 14 представлен пример трехмерной реконструкции распределения полилактида (PLA) в композите полилактид/полистирен, выполненной при помощи метода Рамановской томографии массивов серийных срезов. Толщина

каждого исследуемого среза в данном случае составляла 100 нм, что и определяет разрешение по глубине.

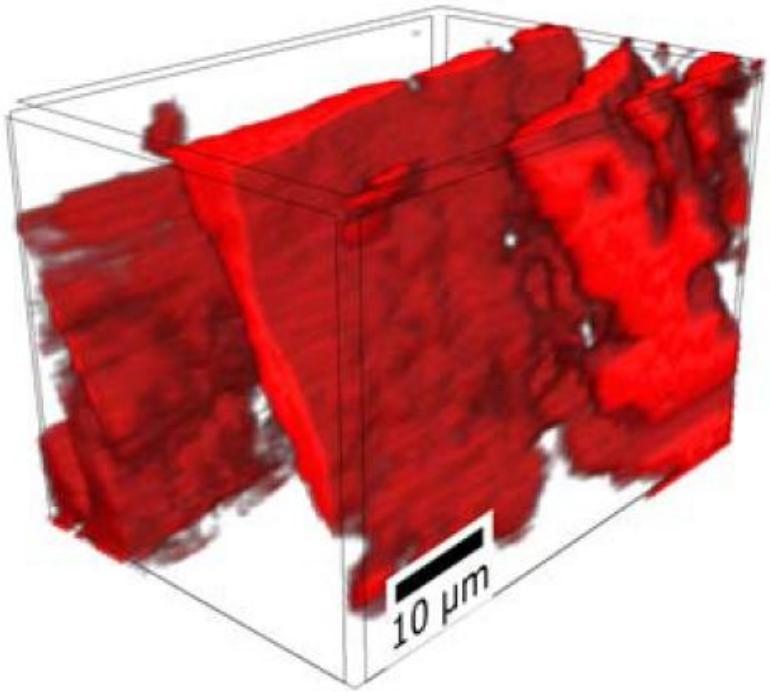


Рисунок 14 – Трехмерная реконструкция распределения полилактида в композите полилактид/полистирен при помощи метода Рамановской томографии серийных срезов (толщина среза 100 нм, размеры реконструированного объема 56 × 40 × 40 мкм³) [35]

Дуальной технологией к методике анализа массивов серийных срезов является послойный анализ блокфейса – поверхности блока образца после последовательных срезов, методами СЭМ или СЗМ. Далее рассмотрим эти технологии подробнее.

1.7 Сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком

Метод сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком (СЭМ-ФИП) позволяет получать последовательные СЭМ-изображения поверхности исследуемых структур после пошагового удаления слоев поверхности с использованием фокусированных пучков ионов [36]. Толщина

удаляемых слоев и, соответственно, разрешение методики по глубине может составлять от нескольких нм до 100 нм [37].

На рисунке 15 показан пример использования метода СЭМ-ФИП для трехмерной реконструкции ультраструктуры человеческого ооцита на стадии метафазы II. Выполненная 3D-реконструкция позволяет сегментировать и выделить такие органеллы, как хромосомы, митохондрии, трубчатую эндоплазматическую сеть и кортикальные гранулы в области веретена.

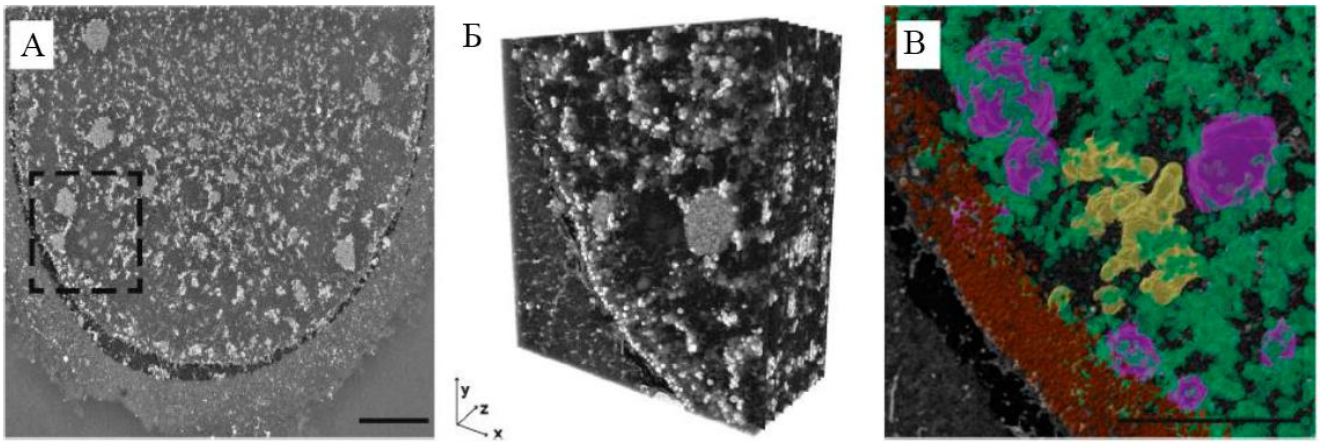


Рисунок 15 – (А) Одно изображение поверхности ооцита на стадии метафазы II в оттенках серого, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком. (Б) 3D-реконструкция области веретена (пунктирный прямоугольник на панели (А)). (В) 3D-сегментированные и псевдоцветные хромосомы (желтые), митохондрии (зеленые), трубчатая эндоплазматическая сеть (пурпурные) и кортикальные гранулы (коричневые) в области веретена (пунктирный прямоугольник на (А)). Размерные отрезки 10 мкм [38]

Аналогично подход СЭМ-ФИП был успешно использован для исследования трехмерной ультраструктуры подоцитов (специализированных эпителиальных клеток почек, осуществляющих клубочковую фильтрацию) крысы [39], что позволило идентифицировать новые субклеточные гребнеобразные компартменты подоцитов. Большой интерес для исследований представляет трехмерная структура нервных клеток, например дендритных шипиков и

синапсов, определяющих структуру и функциональность гранулярных клеток, дифференцирующихся в процессе нейрогенеза.

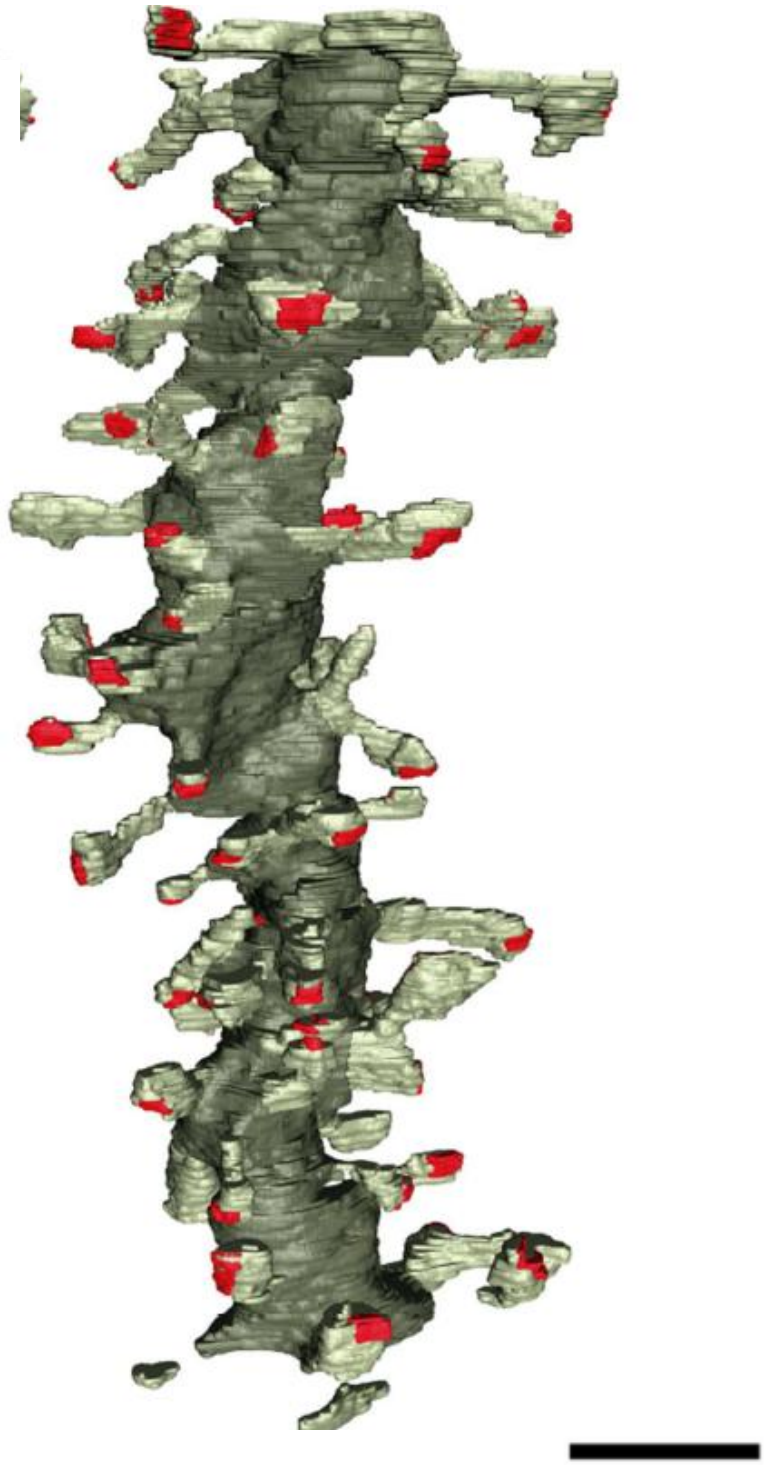


Рисунок 16 – Трехмерная реконструкция дендритных сегментов и шипиков в гранулярных клетках возрастом 8–9 недель у мышей. Масштабный отрезок 1 мкм. Дендритный стержень показан темно-зеленым цветом, шипики – бледно-зеленым, а их синапсы – красным [40]

На рисунке 16 представлена трехмерная СЭМ-ФИП реконструкция гранулярных клеток возрастом 8–9 недель, иллюстрирующая развивающиеся на этом сроке разветвленные шипики.

1.8 Серийная сканирующая электронная микроскопия блокфейса

Метод серийной сканирующей электронной микроскопии блокфейса (Serial block-face scanning electron microscopy, SBF-SEM) основан на подходе, схожем с СЭМ-ФИП, однако тонкие слои поверхности удаляются не с помощью ионных пучков, а путем срезания специализированным алмазным ножом. Для этого в колонну СЭМ помещается устройство, по сути, представляющее собой ультрамикротом с подвижным ножом, и последовательные СЭМ-измерения поверхности производятся поле каждого сверхтонкого среза. Данный метод ограниченно применим к твердым материалам, однако позволяет заметно увеличить площадь исследуемой области, так как размеры среза, выполняемого подобным алмазным ножом, могут достигать 500×500 мкм и более [41,42].

Так же одно из преимуществ данного метода состоит в отсутствии нарушений структуры исследуемых объектов, которые могут быть вызваны ионным пучком [43].

Разрешение по глубине в данном случае ограничено толщиной выполняемых срезов, от 25 нм и выше [37], однако применение математических методов обработки получаемых данных в некоторых случаях позволяет достичь двукратного улучшения z-разрешения [44].

На рисунке 17 представлен характерный пример трехмерной реконструкции методом SBF-SEM – реконструкция структуры мужских мейоцитов в пыльнике табака. Реконструкция отсканированного фрагмента ткани выполнена путем интеграции 2626 серийных СЭМ-изображений, выполненных после последовательных срезов поверхности толщиной 40 нм [45].

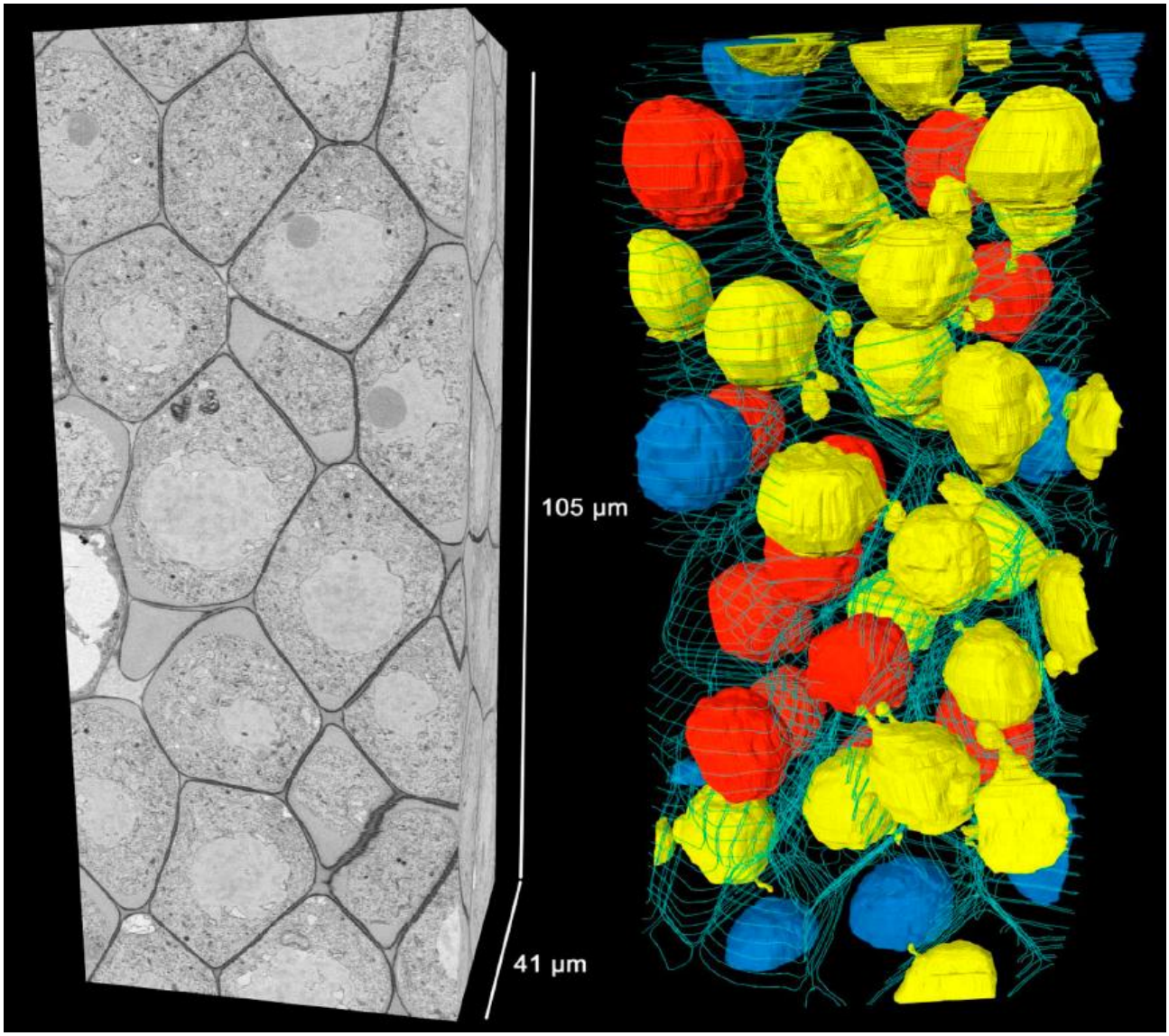


Рисунок 17 – Трехмерная реконструкция мужских мейоцитов в пыльнике табака. Трехмерные реконструкции отсканированного фрагмента ткани из 2626 серийных изображений. Весь немеченый фрагмент ткани (слева) и меченые ядра и клеточные стенки (справа). Желтым цветом обозначены мигрирующие ядра, красным – немигрирующие ядра, синим – частично сканированные ядра (их статус не ясен), а бирюзовым — внешний слой клеточных стенок, помеченный на каждом 50-м срезе [45]

Однако необходимо заметить, как в случае СЭМ-ФИП, так и в случае SBF-SEM пробоподготовка биологического объекта для измерений в большинстве случаев требует контрастирования с применением соединений тяжелых металлов [45,46], что заметно снижает эффективность коррелятивного маркирования исследуемых объектов с применением флуоресцентных красителей [47]. Несмотря на растущее число работ с использованием коррелятивной световой и

электронной микроскопии и определенные успехи в этой области, данное обстоятельство остается серьезной проблемой для многих исследований [48].

В качестве альтернативных техник для исследований ультраструктуры поверхности блокфейса после удаления сверхтонкого слоя материала образца можно использовать подходы сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), не требующие контрастирования образцов с использованием соединений тяжелых металлов.

В следующем разделе мы подробнее рассмотрим подобный подход.

1.9 Методы ультраструктурного трехмерного анализа на базе сканирующей зондовой микроскопии

Подход к трехмерному анализу с использованием сканирующей зондовой микроскопии во многом аналогичен другому описанному ранее методу картирования поверхности – SBF-SEM и требует удаления просканированного нанослоя с поверхности материала с использованием ультрамикротома. Принцип трехмерной реконструкции при этом остается аналогичен – объединение послойных двумерных СЗМ изображений в трехмерное [49,50]. Минимальная толщина среза при этом зависит от возможностей используемого ультрамикротома и для современных установок составляет 20 нм.

Устройство для реализации такого подхода продемонстрированно на рисунке 18. Оно состоит из сканирующей головки СЗМ, прикрепленной специальными шарнирами к держателю ножа ультрамикротома. Конструкция предусматривает два положения: для срезов (рисунок 18, справа) и для измерений (рисунок 18, слева). В первом сканирующая головка отведена от подвижной консоли ультрамиротома, которая, в свою очередь, передвигается, производя срез. Во втором положении консоль возвращается в исходное состояние, подводится СЗМ, и производится сканирование оставшейся части образца [49]. В случае СЗМ именно подобный подход позволяет избежать таких механических нарушений сканируемого объекта как сжатие, растяжение и деформация. Измеряемый при

помощи СЗМ рельеф поверхности после среза может составлять десятки или единицы нм, и в случае измерения срезов, осажденных на ленту или пластину, неминуемо возникают деформации поверхности, зачастую больших масштабов, что может быть непринципиально для оптических или СЭМ измерений, но критично ухудшает точность СЗМ-измерений.

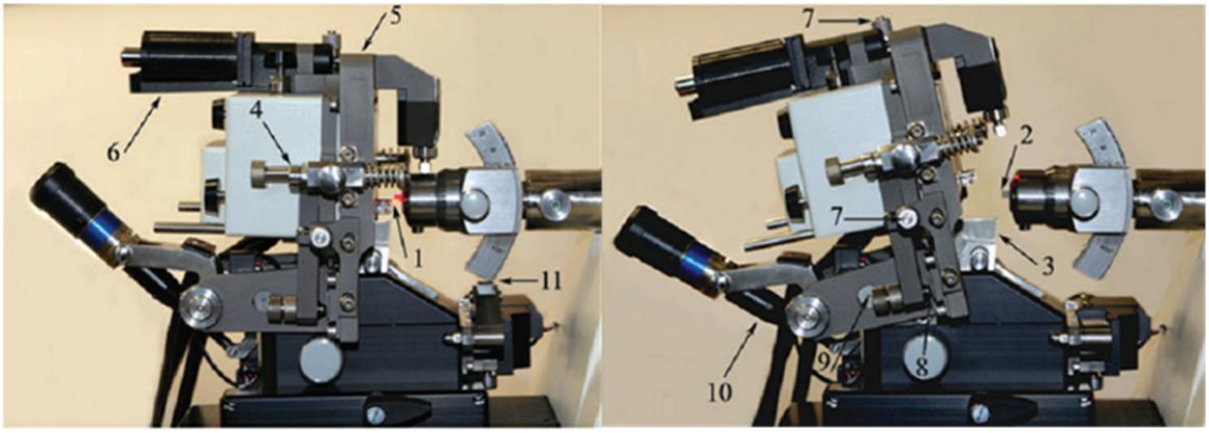


Рисунок 18 – Установка для объединения сканирующей зондовой микроскопии и ультрамикротомии - Ntegra Tomo (НТ-МДТ, Россия). Левая панель – рабочее положение для проведения зондовых измерений; правая панель – сканирующая-головка отведена для выполнения среза. 1 – Держатель сканирующего зонда; 2 – Исследуемый образец; 3 – Держатель ножа ультрамикротома; 4 – Опоры сканирующей головки; 5 – Опорная платформа сканирующей головки; 6– Система моторизированного подвода сканирующей головки; 7– Микрометрические винты позиционера сканирующей головки; 8 – Опорные пластины из поликорунда; 9 – Система шарнирного закрепления сканирующей головки; 10 – Система моторизированного отвода сканирующей головки для ее приведения в положение для среза; 11 – Ограничительная опора консоли ультрамикротома. Рисунок взят из работы [49]

Полученные серии последовательных СЗМ-изображений используются для реконструкции и визуализации трехмерных наноструктур в объеме исследуемых образцов. Использование различных измерительных методик СЗМ дает возможность получать информацию не только о морфологии, но и локальных электрических [51], механических [52] и многих других локальных свойствах. Также использование методики позволяет выполнять реконструкцию трехмерного распределения наночастиц в объеме наноматериалов [53] и трехмерной топологии нанопористых структур [54,55,56].

В частности, метод СЗНТ может эффективно применяться для трехмерной реконструкции микро- и нановолокнистых клеточных скаффолдов на основе биополимеров [57,58] и определения их объемной пористости, отношения площади поверхности к объему и других параметров трехмерной морфологии.

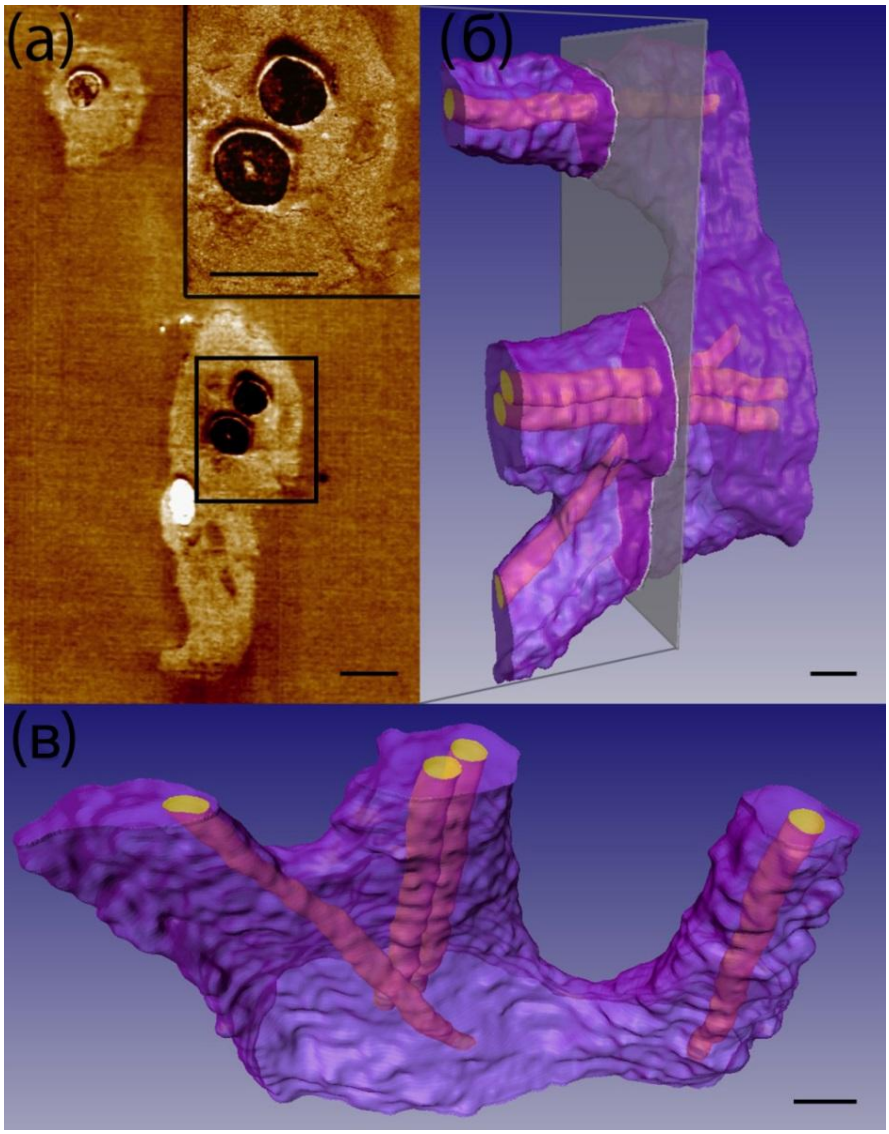


Рисунок 19 – Трехмерная зондово-нанотомографическая реконструкция кардиомиоцита, обволакивающего нановолокна. а – одно из зондово-микроскопических изображений, использованное для трехмерной реконструкции. На вставке: увеличенная область, обозначенная прямоугольником, включающая в себя волокна и складку мембраны; б, в – трехмерные модели кардиомиоцита, окружающего волокна (16.0 × 16.0 × 6.5 мкм, 54 среза, толщина среза 120 нм). Выделенная плоскость на (б) соответствует положению зондово-микроскопического изображения на (а). Размерный отрезок 1 мкм. Рисунок взят из работы [23]

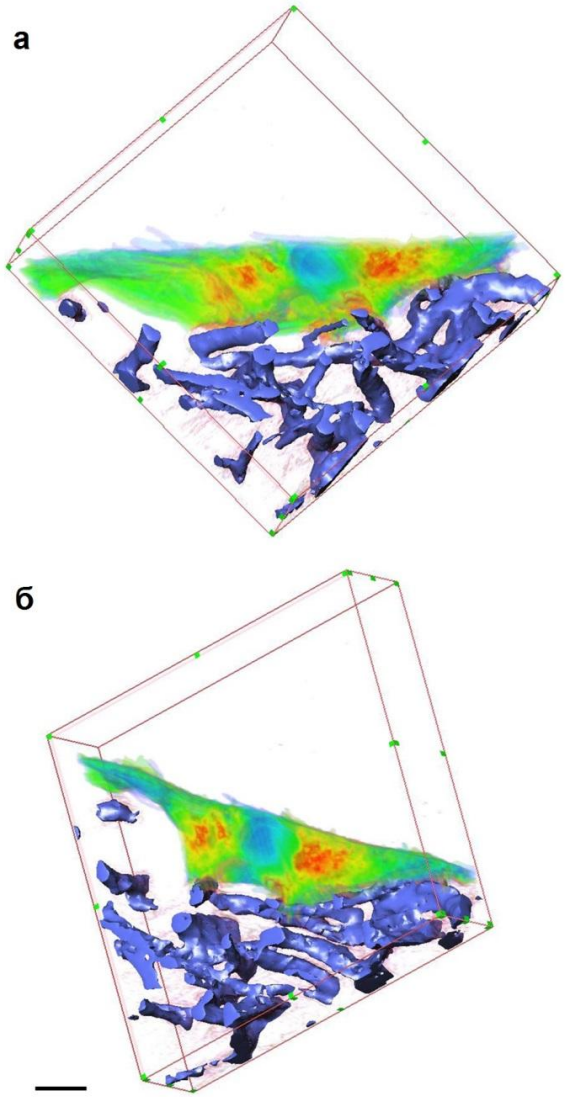


Рисунок 20 – Трехмерная реконструкция фрагмента фибробласта, контактирующего с полиуретановыми микроволокнами, 23 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем 32.0 × 32.0 × 3.3 мкм, размерный отрезок 3 мкм [59]

Реконструкция трехмерных структур клеточно-инженерных конструкций позволяет исследовать топологию и численные морфологические параметры клеток и интерфейсов между клетками и скаффолдами, которые могут служить определяющими индикаторами состояния и биологической активности клеток [23,59].Так, например, при помощи метода СЗНТ были выявлены характерные особенности взаимодействия неонатальных кардиомиоцитов крысы с полимерными нановолокнистыми матриксами. На рисунке 19 представлена трехмерная реконструкция участка кардиомиоцита, который полностью окружает

нановолокна на основе полилактида. При такой топологии взаимодействия значительно возрастает зона контакта «волокно-клетка» [23].

Другим примером может служить изображенная на рисунке 20 трехмерная структура фрагмента фибробласта (первичная культура фибробластов человека), контактирующего с несколькими волокнами микроволокнистого полиуретанового матрикса с образованием выступов клеточной мембраны [59].

Исследование мягких биополимерных материалов и биологических объектов, например гидрогелевых микроносителей, без заливки в эпоксидную среду требует их предварительной заморозки, для чего была разработана установка, объединяющая СЗМ и криокамеру ультрамикротома [60]. На рисунке 21 показан пример трехмерной крио-СЗНТ-реконструкции единичной микрочастицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя. Данная реконструкция была выполнена с использованием вышеупомянутой установки при температуре -120 °С [61,62].

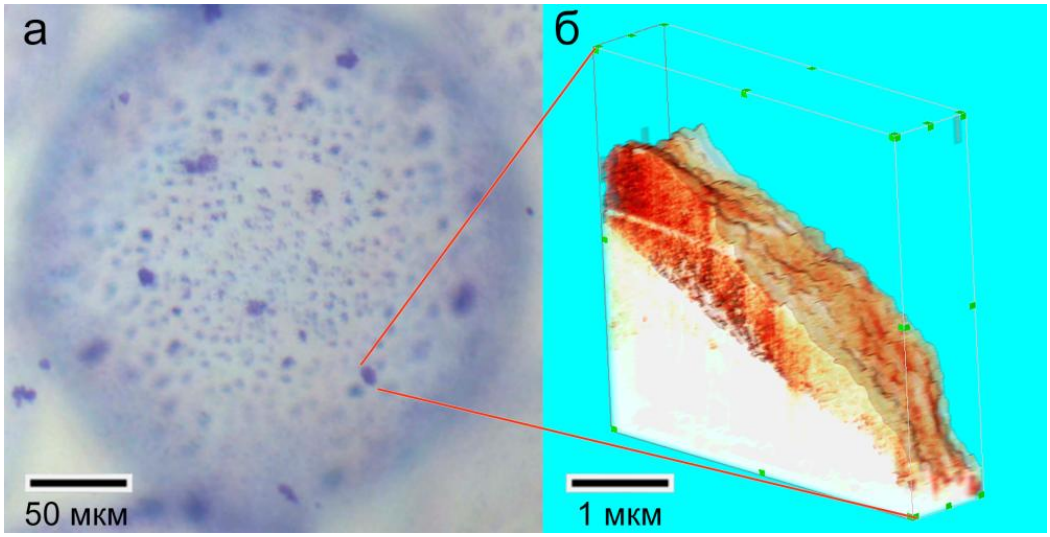


Рисунок 21 – Сферический альгинатный микроноситель, модифицированный микрочастицами внеклеточного матрикса печени крысы: а) оптическая микроскопия, окраска Coomassie Brilliant Blue R-250, ×100; б) трехмерная крио-нанотомографическая реконструкция единичной микрочастицы внеклеточного матрикса печени крысы на поверхности альгинатного микроносителя, реконструированный объем 5,0 × 5,0 × 1,1 мкм [62]

Возможности исследования биологических объектов могут быть значительно расширены за счет объединения методик СЗНТ и оптической микроскопии высокого разрешения, в частности флуоресцентной, в одну коррелятивную технологию оптическо-зондовой нанотомографии (ОЗНТ).

Для достижения этой цели была создана комбинированная установка, совмещающая в себе СЗНТ и оптическую микроскопию, отличительной характеристикой которой стало наличие оптического доступа к зоне «зонд-образец» для высокоапертурных объективов с численной апертурой NA, достигающей величины 0.75 [50,63,64]. СЗМ-система включает в себя сканер образца, закрепленный на подвижной «руке» ультрамикротома, и измерительный модуль (головку), содержащий держатель зонда-кантилевера и дефлектометр (рисунок 22) [65].

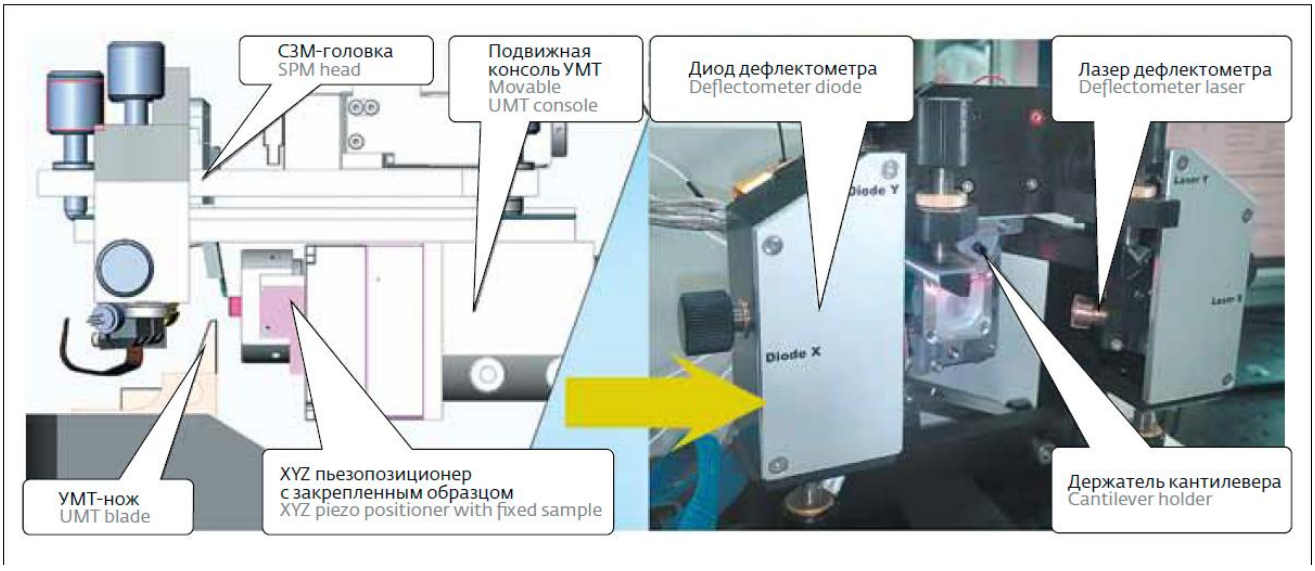


Рисунок 22 – Схема системы сканирующей зондовой нанотомографии с фронтальным оптическим доступом. Слева – схематический вид сбоку сканера на подвижной «руке» ультрамикротома и ножа, а также измерительной головки. Справа – фронтальное фото устройства [65]

В данном случае оптические измерения наравне с зондовыми выполняются на поверхности образца после выполнения сверхтонкого среза. Это позволяет выполнять непосредственную корреляцию зон измерений СЗМ и оптической микроскопии (ОМ). Однако основным недостатком подобного подхода к

коррелятивной нанотомографии является то, что глубина резкости при оптических и флуоресцентных измерениях достигает нескольких микрон, и даже применение конфокальной оптической схемы не позволяет уменьшить ее ниже уровня 1 мкм. Величина глубины резкости определяет толщину приповерхностного слоя образца, с которого считывается флуоресцентный сигнал, и, таким образом, значительно ограничивает аксиальное разрешение оптических методик, которое в данном случае в десятки раз превосходит толщину сверхтонких срезов, выполняемых ультрамикротомом.

Таким образом, можно сделать заключение, что задача создания технологии коррелятивной флуоресцентно-зондовой нанотомографии с высоким аксиальным и латеральным разрешением представляется чрезвычайно актуальной.

1.10 Использование материалов на основе натурального шелка в регенеративной медицине

В области регенеративной медицины выбор материала зависит от области применения, а полимеры природного происхождения имеют весомые преимущества перед синтетическими благодаря тому, что продукты их распада в организме являются естественными метаболитами, которые принимают участие в биохимических процессах внутри клеток, повышая биосовместимость. Для эффективного применения к материалу предъявляются определенные требования относительно химических, биологических и механических свойств [66]. Среди химических свойств важными являются отсутствие вредных химических реакций с тканями и межтканевыми жидкостями, резорбция с контролируемой скоростью внутри организма. К важным механическим характеристикам можно отнести прочность конструкции, возможность осуществлять хирургические манипуляции, а к биологическим – биосовместимость с организмом [67]. Фиброин шелка обладает всеми вышеперечисленными свойствами, в связи с чем и был выбран нами в качестве объекта исследования, выступая в качестве как самостоятельного биополимера, так и клеточного носителя.

Шелк обладает уникальными механическими, физическими, биологическими и химическими свойствами благодаря своему строению на молекулярном уровне. В связи с этим он нашел широкое применение в области медицины и фармацевтики для создания тканеинженерных конструкций и биологических носителей для клеток и лекарственных средств [67]. Самым распространенным является шелк, который получают из коконов гусениц тутового шелкопряда Bombyx mori [68]. В среднем толщина одного шелкового волокна равна 20-30 мкм, а длина одной нити из одного кокона может достигать тысячи метров. Шелковое белковое волокно состоит из фиброиновых фибрилл, которые покрыты белковым слоем белка серицина, способствующего склеиванию фибрилл при формировании кокона [68].

С медицинской точки зрения серицин может являться аллергеном, вызывающим аллергическую реакцию 1–го типа, поэтому очистка коконов основана на избавлении от него – кипячении, при котором он вымывается благодаря своим водорастворимым свойствам, в свою очередь сам фиброин не растворим в воде [69]. Доля фиброина в шелковом волокне составляет 72 - 81%, серицина – 19-28%, на жиры и воск приходится – 0,8 – 1,0%, а на красящие и другие минеральные вещества – 1,0 – 1,4% [70].

Фиброин, являющийся основным белком шелка, добываемого из коконов шелкопряда Bombyx mori и родственных видов, представляет собой гетеродимер, который состоит из двух ковалентно связанных через дисульфидные мостики цепей: легкой цепи Fib-L с массой 26 кДа (262 аминокислоты) и тяжелой Fib-H цепи с массой 350 кДа (5263 аминокислоты) [71,72]. Гликозилированный белок P25 с массой 30 кДа объединен с Fib-L и Fib-H гидрофобными связями [73].

Общая структура фиброина содержит положительно заряженный С-конец тяжелой цепи, длиной в 58 аминокислотных остатков, отрицательно заряженный N-конец тяжелой цепи, состоящий из 151 аминокислотного остатка, и последовательность легкой цепи Fib-L, обладающая амфифильностью с малым преобладанием отрицательного заряда [74]. Таким образом, фиброин является амфифильным белком с большим перевесом в сторону гидрофобности. Не растворяясь в воде, разбавленных растворах многих кислот и щелочей, он растворим

в концентрированных растворах хлорида лития, тиоцианата лития и кальция, хлорида кальция. Фиброин имеет три структурных формы благодаря способности формировать α-спирали и β-складки. Первая форма рыхлая, глобулярная, вторая – обогащенная α-спиралями аморфная форма (silk I), третья форма – это прочная кристаллическая β-форма (silk II) [74]. Благодаря β-структуре белка задается форма имплантата из фиброина шелка, в течение длительного времени поддерживается его целостность и стабильность в водных растворах, близких к физиологической среде организма. Учитывая эту особенность, изделия из фиброина шелка необходимо подвергать β–кристаллизации, чтобы сохранить их целостность в среде культивирования или в условиях *in vivo* [75]. Кристаллизация происходит под воздействием непредельных алифатических спиртов, метанола или этанола, концентрированных растворов солей, при доведении pH раствора фиброина шелка до изоэлектрической точки [75].

Фиброин щелка является термостабильным с температурой денатурации 127°C, характеризуется высокой прочностью на разрыв (610-690 мПа), а модуль упругости составляет 15-17 гПа. Такие особенности позволяют использовать его для создания конструкций для регенерации костной ткани, например [76,77].

Фиброин шелка применяется в регенеративной медицине в качестве материала для изготовления матриксов [66], пленок [78], гидрогелей [79], микро- и макроносителей для клеточных культур, а также входит в состав конструкций для доставки лекарственных и биологически активных веществ в организме [80,81].

Композитный материал, состоящий из фиброина шелка и оксида графена, является подходящим каркасом для стволовых клеток, способствует дифференцировке стволовых клеток человеческой периодонтальной связки в цементобластоподобные клетки. В композитах графен обеспечивает дифференцирующую способность, в то время как фиброин не вызывает воспалительной реакции после их имплантации, что также обеспечивает лучшую управляемость и 3D-характеристики [82].

Водные растворы фиброина шелка (SF) и альгината натрия (SA) различной концентрации были использованы для покрытия поверхностей искусственных

связок из фиброиновых волокон (SFALS) *in vitro* SFALs для осаждения фосфата кальция (CaP). Покрытие SF/SA обладает отличным потенциалом для ускорения остеоинтеграции искусственных связок, имплантированных в костные туннели [83].

Три вида матриксов из фиброина шелка: нановолоконные матриксы, изготовленные с помощью электроспиннинга, губки, сформированные методом лиофилизации, и пористые пленки исследовались в качестве подложки для адгезии и пролиферации клеток остеокарциномы MG-63. По результатам исследований можно заключить, что данные биоконструкции биосовместимы и способствуют адгезии клеток, а значит, являются перспективными матриксами, которые могут быть использованы для пролиферации остеобластоподобных клеток для инженерии костной ткани [84].

Трехслойный матрикс из фиброина шелка и гидроксиапатита характеризуется хондральным слоем с продольно ориентированной микротрубчатой структурой, костным слоем с трехмерной пористой структурой и промежуточным слоем с плотной структурой. Конструкция обладает хорошей биосовместимостью для поддержки роста, пролиферации и инфильтрации стволовых клеток жировой ткани. Гистологическое и иммуногистохимическое окрашивание, а также полимеразная цепная реакция в реальном времени (ОТ-ПЦР) подтверждают, что стволовые клетки можно стимулировать к дифференцировке в сторону хондроцитов или остеобластов *in vitro* в присутствии хондрогенной или остеогенно-индуцированной культуральной среды соответственно. Промежуточный слой может играть изолирующую роль, предотвращая смешивание клеток внутри хондрального и костного слоев друг с другом. Таким образом, трехслойные костно-хрящевые матриксы могут эффективно поддерживать образование хрящевой и костной ткани *in vitro* и потенциально применимы для тканевой инженерии остеохондральных дефектов *in vivo* [85].

Микроносители из фиброина шелка и желатина использовались в качестве каркаса для культивирования клеток для восстановления костной ткани. Совместимость и пролиферация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на материале из фиброина шелка и желатина были впервые подтверждены в двумерном формате, а затем на микроносителях. Показано, что фиброин шелка сам по себе

характеризуется плохой клеточной адгезией, однако добавление желатина улучшает адгезию, пролиферацию клеток. Данные микроносители поддерживают адгезию и жизнеспособность клеток при остеогенной дифференцировке МСК [85]. Эти микроносители потенциально могут быть использованы в качестве инъекционной системы доставки терапевтических клеток или наполнителя, который может стимулировать пролиферацию и дифференцировку резидентных МСК для устранения небольших костных дефектов, где несущая способность не является обязательным условием. Дополнительным преимуществом систем на основе носителей является возможность расширения производства терапевтических клеток перед использованием, применяя перемешиваемый биореактор. Использование микроносителей в качестве строительных блоков может позволить разработать макроскопическую конструкцию ткани путем формирования из нескольких микроносителей фиксированной архитектуры, содержащих клетки, для создания ряда искусственных тканей [86].

Матриксы из фиброина шелка, функционализированные механическими факторами роста (MGF) и трансформирующим ростовым фактором (TGF-β3) , усиливают рекрутирование эндогенных стволовых клеток и способствуют регенерации суставного хряща *in situ*, тем самым обеспечивая новую стратегию восстановления хряща [87].

Многие исследования нацелены на остеогенную дифференциацию, но хрящевые клетки маловероятно могут быть индуцированы для остеогенеза, и монофазные матриксы не в состоянии одновременно хорошо восстанавливать как хрящевые, так и субхондральные повреждения. Созданы двухфазные композитные матриксы из SF/CS-SF/CS/nHA для применения при остеохондральных дефектах. Для их создания объединены хондроцитарная фаза SF /CS (фиброин шелка/хитозан), которая необходима для хондрогенной дифференцировки, и остеобластная фаза SF/CS/nHA (фиброин шелка/хитозан/наногидроксиапатит), служащая для остеогенной дифференциации и регенерации кости. Костные мезенхимальные стволовые клетки хорошо пролиферируют на поверхности матриксов, экспрессируя коллаген двух типов, обнаруживается несформированный внеклеточный матрикс,

интегрированный с полимерным матриксом. Эффективность матриксов была подтверждена путем их имплантации в место повреждения бедра с травмой хряща у кроликов. С помощью микрокомпьютерной томографии показано, что происходит регенерация как хондральных, так и субхондральных слоев, а также в имплантированных матриксах наблюдается экспрессия коллагена типа I и II, что доказывает перспективность клинического использования данных конструкций в тканевой инженерии [88].

Нетканые матриксы на основе шелка характеризуются хорошей биосовместимостью с человеческими кератиноцитоподобными клетками C4-I, которые быстро прикреплялись к микроволокнам и росли на них, метаболизируя глютамин и выделяя лактат, при отсутствии обнаруживаемого количества провоспалительного IL-1β (интерлейкин 1, бета) *in vitro*. С другой стороны, прикрепленные к нетканым материалам клетки C4-I сохраняли неизменную секрецию TNF-α (фактора некроза опухоли), которая опосредовала их собственную аутокринную выработку митогенного амфирегулина по сравнению с их аналогами, прикрепленными к пластику. При подкожной имплантации данных конструкций в созданный карман в подкожной клетчатке у мышей они способствовали созданию соединительной ткани *in vivo*, снабженной сосудистой сетью и населенной фибробластами, которые продуцировали тонкие коллагеновые фибриллы и внеклеточный матрикс, а в конце третьего месяца – несколько спорадических PGC (многоядерные гигантские клетки). В той же конечной точке не было обнаружено никаких признаков какой-либо воспалительной, иммунологической, фиброзной или инкапсулирующей реакции, что соответствовало отсутствию какой-либо FBR (реакции на инородное тело) в месте трансплантации. Важно отметить, биофизические свойства этих матриксов близки к человеческой коже. Это позволяет предположить, что они могут интегрироваться в новую тканеинженерную соединительную ткань, не изменяя ее нормальной консистенции и эластичности, и в то же время препятствуя любой гипертрофии и ретракции рубца благодаря наличию микроволокон фиброина шелка. Таким образом, нетканые матриксы на основе шелка являются перспективными для

создания тканеинженерной кожи и соединительной ткани в целом, регенерации и восстановления в клинических условиях у людей и в ветеринарной медицине [89].

Матриксы из фиброина шелка с добавлением желатиновых микросфер и антибиотика гентамицин сульфата обладают антимикробным действием против кишечной палочки, золотистого стафилококка и синегнойной палочки, способствуют постепенному высвобождению лекарственного средства, характеризуются хорошими ранозаживляющими свойствами, что подтверждается в экспериментах *in vitro* и *in vivo* на крысах. Матриксы являются эффективными для лечения глубоких инфицированных ожогов, а также перспективным терапевтическим средством при ожогах тяжелой степени [90].

Композитные трубчатые трансплантаты, изготовленные из гидрогеля, состоящего из фиброина шелка, перешитого с пероксидазой хрена, с включенными частицами β-трикальцийфосфата, могут использоваться в качестве перспективных наполнителей костных туннелей. Они поддерживают остеогенную активность клеток с точки зрения экспрессии генов-маркеров, связанных с остеогенезом. Разработанные фиброиновые трансплантаты обладают адекватными структурными, химическими и биологическими свойствами для их использования в качестве наполнителей костных туннелей, способных успешно контактировать с тканью передней крестообразной связки, одновременно стимулируя регенерацию костной ткани для более быстрой остеоинтеграции [91].

Разработан тканеинженерный сосудистый трансплантат с использованием материала на основе шелка для замены брюшной венозной системы. В экспериментах на крысах нижняя полая вена заменена трансплантатом на основе фиброина шелка (длиной 10 мм, диаметром 3 мм, n = 19, группа SF). Показатели проходимости через 1 и 4 недели и гистологические реакции сравнивались с таковыми при использовании сосудистых трансплантатов из политетрафторэтилена (n = 10, группа ePTFE). Уровень проходимости через 1 и 4 недели после замены в группе SF составил 100,0% и 94,7%, а в группе ePTFE - 100,0% и 80,0% соответственно. Достоверной разницы между группами выявлено не было (p = 0,36). В отличие от трансплантата из политетрафторэтилена CD31-положительные

эндотелиальные клетки покрывали всю поверхность просвета сосудистого трансплантата на основе фиброина через 4 недели, что указывает на лучшую эндотелизацию. Таким образом, доказана эффективность использования фиброина шелка для создания сосудистых трансплантатов [92].

Исследование *in vivo* на свиньях показало эффективность бесклеточного трубчатого двухслойного трансплантата на основе фиброина шелка в качестве альтернативного мочевыводящего канала в модели отведения мочи у свиней [93].

Матрикс, сформированный из фиброина шелка и гидрогеля из бесклеточного матрикса мочевого пузыря, витализированный стволовыми клетками жировой ткани (ASC), был разработан для регенерации мочевого пузыря в экспериментах на крысах. Матрикс обладал хорошими механическими свойствами, что позволило ему сохранять форму и использоваться для сшивания. Матриксы были обернуты в сальник для стимулирования неоваскуляризации, а затем использованы для регенерации мочевого пузыря, при этом в контрольной группе использовалась цистотомия. Гистологическое окрашивание и иммуногистохимический анализ подтвердили, что присутствие сальника может способствовать васкуляризации каркаса. Окраска гематоксилином и эозином, а также окрашивание по Массону показали, что матрикс регенерирует стенку мочевого пузыря. Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил, что такая имплантация с участием стволовых клеток жировой ткани может способствовать регенерации гладких мышц, нейронов и кровеносных сосудов и восстановлению физиологических функций. Такие результаты говорят о перспективности использования матриксов из фиброина шелка для стимуляции регенерации стенки мочевого пузыря и восстановления его физиологической функции в модели повреждения мочевого пузыря у крыс [94].

Нановолокна из фиброина шелка и поли(L-лактид-ко-е-капролактона) (SF/P(LLA-CL)) значительно способствуют пролиферации фибробластов, а фактор роста эндотелия сосудов, секретируемый фибробластами, засеянными в нановолокнах SF/P(LLA-CL), был более чем в семь раз выше, чем этот показатель в нановолокнах P(LLA-CL) [95]. Кондиционированная среда фибробластов в группе SF/P(LLA-CL) стимулировала большее количество эндотелиальных клеток

пупочной вены человека (HUVEC) к образованию капилляроподобных сетей и способствовала более быстрой миграции HUVEC. Через 3 недели восстановления площадь кровеносных сосудов в группе SF/P(LLA-CL) была значительно больше, чем в группе P(LLA-CL). Больше регенерированных аксонов и шванновских клеток также наблюдалось в группе SF/P(LLA-CL), что согласовывалось с результатами по кровеносным сосудам. Нервный канал из SF/P(LLA-CL) усиливает регенерацию периферических нервов за счет улучшения ангиогенеза внутри канала. Таким образом, фиброин шелка нашел своё применение и в области нейронной инженерии мягких тканей, поскольку его свойства подходят для стимулирования роста нейронов и регенерации нервных волокон [95].

Биосовместимость, замечательные механические характеристики, контролируемая деградация и возможность производства материалов на основе шелка в нескольких форматах привели к расширению использования этого материала в регенеративной медицине. Шелк обладает замечательными биологическими свойствами, а побочные продукты, полученные в результате его разложения, обладают противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Этот материал может быть использован для контролируемого высвобождения факторов и лекарственных препаратов [96], а также для инкапсуляции и имплантации биологических объектов, обладающих терапевтической активностью [97].

Таким образом, можно заключить, что материалы на основе шелка весьма перспективны и имеют широкий спектр применения в различных областях регенеративной медицины и тканевой инженерии. Одной из задач данной работы является изучение и характеризация трехмерной наноструктуры скаффолдов, полученных с использованием фиброина шелка и обладающих высоким регенеративным потенциалом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Изготовление образцов пористых биодеградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка

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

Для получения водного раствора фиброина в 1 мл раствора $CaCl_2$:C_2H_5OH:H_2O, приготовленного из расчета 389 мг $CaCl_2$, 388 мкл C_2H_5OH и 544 мкл H_2O на 1 мл, вносили навеску фиброина массой 25 мг/мл. Нагревали на водяной бане при 40°С в течение 4 часов. После чего производили диализ раствора против бидистиллированной воды и спектрофотометрическое определение концентрации фиброина в полученном после диализа растворе при длине волны 280 нм по формуле D=ECL, где E – коэффициент экстинкции, равный 1,07.

Образцы пористых биодеградируемых скаффолдов из фиброина шелка были получены методом электроспиннинга [57]. Для этого выполнялось растворение навески фиброина шелка в 1,1,1,2,2,2-гексафторизопропаноле из расчета 50 мг\мл при температуре 30°С в течение 2 суток. С помощью шприца объемом 2 мл набирали 500 мкл полученного раствора и напыляли с помощью установки в течение 2 часов на поверхность металлической пластины со следующими параметрами: напряжение – 6-8 кВ, диаметр форсунки – 300 мкм, расстояние между форсункой и пластиной – 7-10 см, скорость подачи раствора – 0,1 мл\ч. Затем полученный скаффолд в течение 12 часов высушивался на воздухе и отделялся с помощью скальпеля от поверхности пластины.

2.2 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. На первом этапе частицы печени инкубировали в растворе натрий-фосфатного буфера (далее НФБ) с pH=7.4 в течение часа с трехкратной сменой буфера. Далее производили децеллюляризацию печени человека путем инкубации частиц в лизирующих растворах при перемешивании со скоростью 300 об/мин по схеме:

а) НФБ pH=7.4, содержащий 0,1% додецилсульфата натрия и 1% тритона X-100. Инкубацию производили в течение двух суток с пятикратной сменой раствора.

б) НФБ pH=7.4, содержащий 0,025% трипсина. Инкубацию производили в течение суток с пятикратной сменой раствора.

в) НФБ pH=7.4, содержащий 0,1% додецилсульфата натрия и 2% тритона X-100. Инкубацию производили в течение двух суток с пятикратной сменой раствора.

г) НФБ pH=7.4, содержащий 0,025% трипсина. Инкубацию производили в течение суток с пятикратной сменой раствора.

д) НФБ pH=7.4, содержащий 0,1% додецилсульфата натрия и 3% тритона X-100. Инкубацию производили в течение двух суток с пятикратной сменой раствора.

е) НФБ pH=7.4, содержащий 0,025% трипсина. Инкубацию производили в течение суток с пятикратной сменой раствора.

ж) НФБ 7.4. Инкубацию производили в течение двух суток с пятикратной сменой раствора для удаления детергентов.

Децеллюляризованная печень человека представляла собой полупрозрачный межклеточный матрикс (рисунок 23). Гистологический анализ не выявил клеточного материала в децеллюляризованном матриксе.

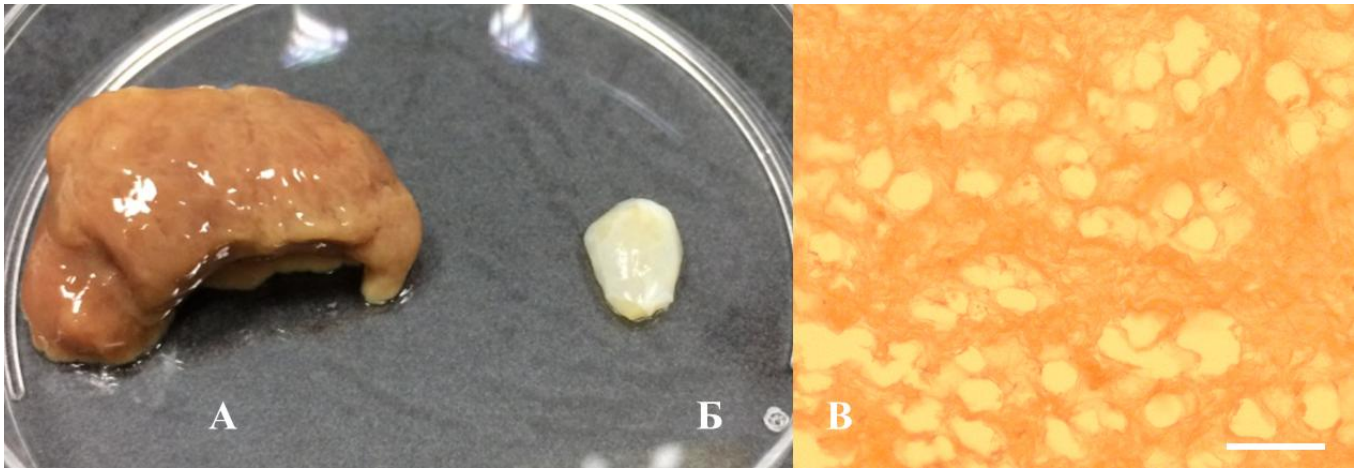


Рисунок 23 – А – внешний вид нативной ткани печени человека, отмытой от крови, Б – внешний вид децеллюляризованной ткани печени человека, В – децеллюляризованная печень человека, окраска гематоксилин-эозином, масштабный отрезок 100 мкм

Анализ концентрации остаточной ДНК в децеллюляризированной ткани печени по сравнению нативной тканью определяли при помощи спектрофотометрии, как описано в [98]. Также был проанализирован размер остаточных фрагментов ДНК методом гель-электрофореза. Полученные результаты представлены на рисунке 24. В полученных образцах децеллюляризованной ткани печени человека не обнаружено фрагментов ДНК, длина которых составляла бы более 200 пар нуклеотидов, при этом концентрация ДНК в образцах децеллюляризированной ткани печени составляет менее 0.7% от концентрации ДНК в нативной ткани. Эти данные свидетельствуют об успехе децеллюляризации.

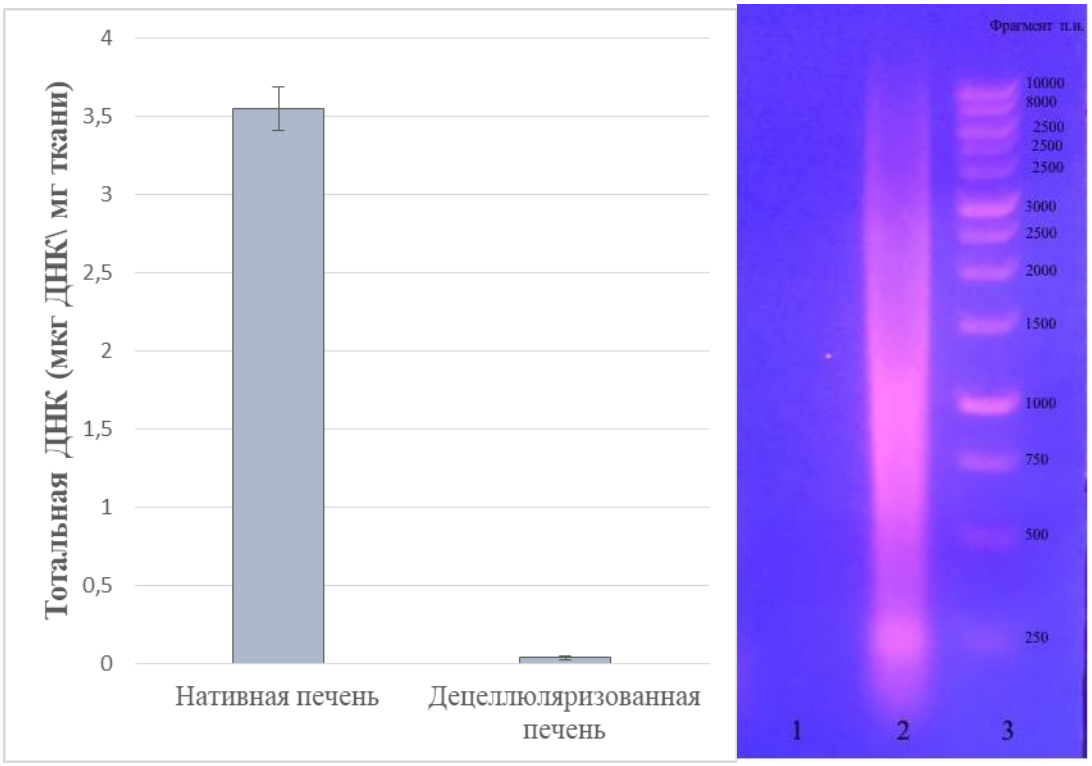


Рисунок 24 – Сравнение концентраций остаточной ДНК в образцах нативной и децеллюляризованной ткани печени человека. Электрофорез: 1 – дорожка образца децеллюляризованной ткани печени человека, 2 – дорожка нативной ткани печени человека, 3 – дорожка маркера. Указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых экспериментов

Для получения образцов лиофилизированного внеклеточного матрикса печени человека фрагменты децеллюляризованной печени в течение 30 минут инкубировали в пробирке в бидистиллированной воде, далее переносили на чашку Петри, убирая избыток воды, и замораживали при температуре -80^{0}C в течение одного часа. Затем производилось сублимационное высушивание образцов с использованием лиофильной сушки IlShinBioBase FD8580 (IlShinBioBase Co. Ltd., Южная Корея). Полученные фрагменты измельчали до размеров 2×2 мм, после чего в течение 30 минут проводилась их стерилизация ультрафиолетовым излучением с длиной волны 253,7 нм с использованием источника ультрафиолета Philips TUV 15W/G15 (Philips Lighting B.V., Нидерланды).

Для получения микрочастиц полученную децеллюляризованную ткань печени человека переносили в пробирку и объем доводили до 15 мл раствором 15% глицерина в PBS (pH = 7,4). Затем ткань инкубировали 20 мин и центрифугировали

10 мин при 8500 g. Осадок измельчали в жидком азоте с использованием предварительно охлажденного пестика и ступки в течение 15 мин. Полученные частицы переносили в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 35 мл дистиллированной водой при перемешивании. Выделение необходимой фракции микрочастиц выполнялось путем осаждения и центрифугирования.

После оседания полученной взвеси частиц в течение суток отбирали верхнюю 1/3 взвеси осевших частиц, которую центрифугировали 10 мин при 1355 g дважды. Затем супернатант центрифугировали 10 мин при 720 g. Полученный супернатант центрифугировали по 10 мин при 12100 g 4 раза. После каждого центрифугирования супернатант отбирали полностью и полученный осадок разбавляли бидистиллированной водой [99].

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. На рисунке 25 представлено СЭМ-изображение полученных микрочастиц внеклеточного матрикса.

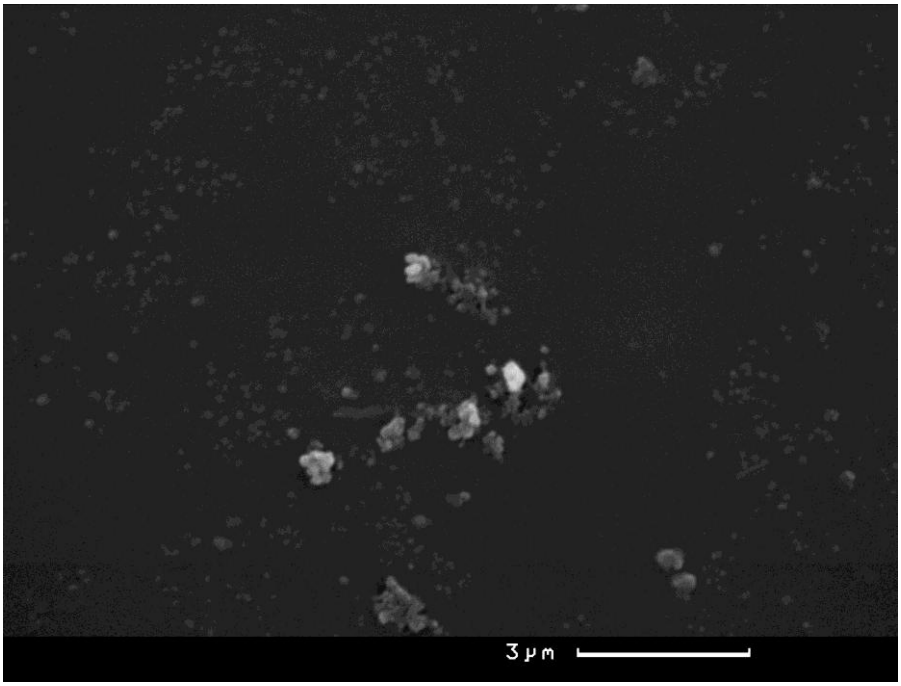


Рисунок 25 – Электронно-микроскопическое изображение микрочастиц внеклеточного матрикса печени человека, размерный отрезок 3 мкм

Для исследований скаффолдов методом флуоресцентной сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии микрочастицы внеклеточного матрикса предварительно были окрашены флуоресцентным красителем FITC. Раствор FITC в ДМСО с концентрацией 0,1 мг/мл вносился в суспензию микрочастиц (на 200 мкл суспензии 4 мкл стокового раствора FITC). Образцы с красителем инкубировались в течение 2 часов в темноте, после чего суспензию микрочастиц отмывали 1 раз бидистиллированной водой, затем 3 раза раствором НФБ pH=6.

Автор благодарит М. М. Боброву и Л. А. Сафонову за содействие в получении биоматериалов на основе внеклеточного матрикса печени.

2.3 Изготовления пористых биодеградируемых композитных скаффолдов на основе фиброина шелка

Для изготовления биодеградируемых композитных скаффолдов был использован раствор фиброина шелка с концентрацией 20 мг/мл, содержащий 1% ДМСО с добавлением микрочастиц децеллюляризованной печени человека со средним размером 1 мкм с концентрацией 33 мг/мл, и 96-луночный планшет. Для получения скаффолда вносили по 75 мкл раствора заданного состава в каждую лунку, после чего планшет замораживали при температуре -20°С в течение семи суток. По истечении времени заморозки скаффолды размораживали, для чего в каждую лунку добавляли 500 мкл 96% этилового спирта и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. Затем производили смену спирта и инкубировали в течение 60 минут. Далее отделяли скаффолды, снова производили смену спирта и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. После этого спирт удаляли и инкубировали скаффолды в течение 15 минут в бидистиллированной воде. Последнюю процедуру проводили 4 раза, после чего переносили скаффолды в 70% спирт, предварительно дегазируя в центрифуге на скорости 3000 об/мин в течение 7 минут.

2.4 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. Кипятили на водяной бане в течение 40 минут в растворе с добавлением двууглекислого натрия для очистки нитей от серицина и других примесей. Затем промывали 3600 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 раза по 30 минут в бидистиллированной воде, промывая после каждого кипячения 3600 мл дистиллированной воды. После чего высушивали в сушильном шкафу. 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. Нагревали на водяной бане при 40°С в течение 4 часов. После растворения фиброина шелка производили четырехкратный диализ раствора против бидистиллированной воды. Определение концентрации фиброина в полученном после диализа растворе выполнялось с использованием спектрофотометра Thermo Genesis 10 UV (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 280 нм (коэффициент молярной экстинкции фиброина 1,07).

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. Фотография полученного скаффолда, содержащего микрочастицы децеллюляризованной ткани печени человека, показана на рисунке

26. При получении пленок на основе фиброина шелка без микрочастиц суспензия микрочастиц не вносилась.



Рисунок 26 – Скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека

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

Для изготовления препарата для СОЗНТ при помощи скальпеля вырезали фрагменты скаффолдов размером 1,5 × 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°С. Затем производили три отмывки образцов в натрий-фосфатном буфере по 10 минут. После этого производили дегидратацию образцов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

а) р-р этанола 30% – 10 мин;

б) р-р этанола 50% – 10 мин;

в) р-р этанола 70% – 10 мин;

г) р-р этанола 80% – 10 мин;

д) р-р этанола 96% – 10 мин.

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°С в течение 12 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60°С.

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

2.6 Изготовление скаффолдов в виде плёнок, содержащих мышиные фибробласты 3T3, и скаффолдов, содержащих клетки гепатокарциномы человека HepG2

Образцы биодеградируемых скаффолдов в виде пленок из фиброина шелка были получены методом полива. Для изготовления пленки 150 мкл раствора заданного состава, аналогично описанному в разделе 2.4, наносили на дно лунок 48-луночного культурального планшета и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре. Общая концентрация белка в пленке составляла 20 мг/мл. После высыхания раствора фиброина в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора фибронектина с концентрацией 10 мкг/мл и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре.

Перед культивированием клеток скаффолды в виде пленок подвергали стерилизации: обрабатывали 70%-ным этанолом в течение 30 минут, затем облучали ультрафиолетом в течение 30 минут. После этого в лунки планшета вносили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 15 минут, после чего производили смену фосфатно-солевого буфера. Данную процедуру

повторяли три раза. Далее в лунки планшета вносили по 300 мкл среды инкубации на 30 минут.

В экспериментах использовали клеточные линии мышиных фибробластов 3Т3 и гепатокарциномы человека Hep-G2. Мышиные фибробласты 3Т3 культивировали в пластиковых флаконах в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина при 37˚С, 5% CO_2. Смену культуральной среды производили каждые 48 часов. Монослой клеток дезагрегировали с помощью раствора трипсина-Версена, производили подсчет клеток в камере Горяева и рассаживали в соотношении 1/3. Клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 культивировали в пластиковых флаконах в смеси 1:1 среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и среды DMEM Ham’s F12, содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 0,324 мг/мл глутамина и 10 мг/мл гентамицина при 37°С, 5% CO_2. Смену культуральной среды производили каждые 48 часов. Монослой клеток дезагрегировали с помощью раствора трипсина-Версена, производили подсчет клеток в камере Горяева и рассаживали в соотношении 1/3.

Для получения образцов с клетками для исследований методом СОЗНТ суспензию клеток в среде инкубации переносили в подготовленные лунки 48-луночных планшетов из расчета 2000 клеток на лунку в 500 мкл среды инкубации. Планшеты инкубировали в термостате при 37˚С и 5% CO_2 [100].

2.7 Изготовление образцов клеток печени крысы породы Wistar, культивированных на скаффолдах в виде плёнок из фиброина шелка

Перед культивированием клеток были подготовлены скаффолды в виде пленок в 48-луночном культуральном планшете, аналогично описанным в разделе 2.6.

Выделение клеток печени крысы производили следующим образом. В эксперименте использовали мужских особей крыс возрастом 1 год породы Wistar (вес особи 250-350 г.). Крысу усыпляли при помощи ингаляционного наркоза с

применением диэтилового эфира. Далее крысу помещали брюхом вверх на операционный стол и расправляли лапы. Пинцетом, оттягивая кожу на брюхе, ножницами делали продольный разрез кожи на средней линии брюшной стороны тела от полового отверстия до грудины. Кожу отворачивали и закрепляли. Затем вскрывали брюшную полость, сделав продольный разрез по средней линии, мышечные лоскуты отворачивали в стороны. Производили забор печени, отсекая полые вены, портальную вену, печеночные артерии и вены. После забора печень помещали в стерильный 0,9% раствор хлорида натрия и отмывали от крови. Далее печень переносили во вторую порцию стерильного 0,9% раствора хлорида натрия и измельчали печень с помощью ножниц на фрагменты размером 5×5мм, а затем обмывали каждый фрагмент печени раствором 0,9% хлорида натрия при помощи шприца без иглы. Полученный раствор переносили в пробирку, перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут при 1770g и температуре -5°C. Супернатант удаляли, к полученному осадку добавляли культуральную среду, перемешивали и суспензию клеток переносили в предварительно подготовленные 48-луночные планшеты. Клетки инкубировали в термостате при 37˚C и 5% CO2 в течение 2 дней.

Автор благодарит М. М. Боброву и Л. А. Сафонову за содействие в получении образцов клеток печени.

2.8 Пробоподготовка скаффолдов в виде пленок с культивированными клетками для исследований методами сканирующей зондовой и оптической нанотомографии

Для исследований клеток на скаффолдах методом флуоресцентной сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии клетки предварительно окрашивали флуоресцентными красителями FITC и DAPI. Лунки дважды промывали стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, затем вносили раствор DAPI с концентрацией 3 мкг/мл и инкубировали 5 минут при 37 ˚C. Затем производили две короткие отмывки стерильным 0,9% раствором хлорида натрия, после чего в лунки вносили 2,5% раствор глутарового альдегида в натрий-

фосфатном буфере (pH=7,4) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4°C. Далее производили одну короткую отмывку стерильным 0,9% раствором хлорида натрия и одну короткую отмывку раствором карбонат-бикарбонатного буфера (pH=9.0). После чего раствор FITC в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл вносили в лунки и инкубировали в течение 40 минут в темноте, после чего производили две короткие отмывки раствором карбонат-бикарбонатного буфера (pH=9.0).

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

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

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

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

2.9 Окраска фрагментов печени крысы FITC и пробоподготовка к исследованиям методами флуоресцентной оптической нанотомографии

Для подготовки образцов печени крысы для исследований методами ФОНТ из печени крысы вырезали фрагменты размеров 2 мм на 2 мм. Образцы фиксировали в 4% растворе формалина на фосфатно-солевом буфере в течение 12 часов.

Далее фрагменты печени однократно отмывали от формалина фосфатно-солевым буфером по 10 минут, затем трехкратно карбонат-бикарбонатным буферным раствором по 10 минут. Далее образцы инкубировали в растворе FITC в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл в течение 2 часов. После этого образцы трехкратно отмывали карбонат-бикарбонатным буферным раствором по 10 минут.

Для изготовления препарата для СОЗНТ производили дегидратацию образцов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

а) р-р этанола 30% - 10 мин;

б) р-р этанола 50% - 10 мин;

в) р-р этанола 70% - 10 мин;

г) р-р этанола 80% - 10 мин;

д) р-р этанола 96% - 10 мин.

Далее производили три отмывки образцов пропиленоксидом по 10 минут, а затем инкубировали в смеси пропиленоксида и эпоксидной среды в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образцы переносили в смесь пропиленоксида и эпоксидной среды в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем образцы заключали в эпоксидную среду, инкубировали в термостате при 45°С в течение 12 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60°С.

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

2.10 Анализ образцов методом сканирующей зондовой нанотомографии

Трехмерный СЗМ-анализ образцов выполнялся с использованием специализированного 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).

2.11 Анализ структуры образцов методом сканирующей электронной микроскопии

Исследуемые образцы для сканирующей микроскопии фиксировали в растворе 2,5% глутарового альдегида в фосфатно-солевом буфере в течение 2 часов в темноте при +4°С. Далее фиксированные образцы отмывали 5 раз по 5 минут в фосфатно-солевом буфере. Затем образцы обезвоживали проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией (10%-30%-50%-70%-80%-96%), инкубируя 30 минут в каждом, и переносили в ацетон. Образцы высушивали методом перехода критической точки ($T_{кр.}co_2$=31˚С, $p_{кр.}co_2$=72,8 кг/см^2) с помощью прибора K850 (Quorum Technologies, Великобритания). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 10 нм в атмосфере аргона при ионном токе 20 мА и давлении 1 мбар с помощью вакуумной напылительной установки Q150R ES (Quorum Technologies, Великобритания), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 (Tescan, Чехия) при рабочем напряжении 15 кВ. Изображения получали с использованием программного обеспечения Tescan VegaTC (Tecsan, Чехия).

2.12 Получение и пробоподготовка полистирольных микросфер, покрытых монослоем полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек, для исследований методами флуоресцентной оптической нанотомографии

2.12.1 Функционализация поверхности полистирольных микросфер

10% водный раствор полистирольных микросфер (ПСМ) (Magsphere) функционализировали катионным полиэлектролитом полиэтиленимином (ПЭИ) посредством электростатического взаимодействия. ПЭИ (5%) в 0,15 мМ NaCl добавляли к раствору ПСМ и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Функционализированные ПСМ очищали от несвязанного ПЭИ центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин) и диспергацией в 0,15 мМ NaCl.

2.12.2 Функционализация поверхности полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек

Покрытие квантовых точек (КТ) типа ядро-оболочка CdSe/ZnS цистеином осуществлялось в соответствии с методом, описанным в работе Парра и других авторов [101]. КТ структуры ядро/оболочка CdSe/ZnS (3 мг) очищали от триоктилфосфин оксида путем трехкратного диспергирования в хлороформе (500 мкл) и осаждения метанолом (800 мкл). Очищенные КТ редиспергировали в хлороформе (1 мл). К дисперсии КТ по каплям добавляли DL-цистеин в метаноле (25 мг/мл, 200 мкл) и энергично перемешивали с последующим центрифугированием (8000 об/мин, 5 мин) и удалением хлороформа. После промывки метанолом для удаления избытка DL-цистеина посредством центрифугирования (16000 об/мин, 10 мин, 3 раза) осадок КТ сушили в вакууме и редиспергировали в воде Milli-Q с добавлением по каплям 1М NaOH (20 мкл), а затем фильтровали с помощью шприцевого фильтра Anotop 25 Plus (0.02 мкм, Whatman).

2.12.3 Нанесение монослоя квантовых точек на поверхность полистирольных микросфер

КТ, покрытые цистеином, добавляли к ПСМ, функционализированным ПЭИ в 0,15 мМ NaCl, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Не связавшиеся КТ удаляли путем диспергирования подготовленных ПСМ в 0,5% растворе Tween-20 центрифугированием (2000 об/мин, 5 мин КТ) и переносили в воду Milli Q. Чтобы предотвратить отделение КТ от поверхности ПСМ, добавляли глутаровый альдегид для сшивания соседних аминогрупп DL-цистеина на поверхности ПСМ. ПСМ, покрытые однородным монослоем полупроводниковых флуоресцентных КТ, хранили в виде раствора в воде Milli Q.

2.12.4 Подготовка образца полистирольных микросфер с квантовыми точками, залитого в полимерный блок

Процедура подготовки образца ПСМ/КТ в твердом полимерном блоке проводилась следующим образом. Аликвоту образца ПСМ/КТ (40 мкл) высушивали при температуре 38 ℃ в течение 4 часов. Высушенный образец диспергировали в 400 мкл Lowicryl HM20 (Polysciences, Inc., США) и помещали в вакуумный эксикатор на 30 минут. Данная процедура необходима для удаления остатка воды, которая негативно влияет на дальнейший процесс полимеризации – возможно растрескивание заливочной среды, образование пузырей и неполная полимеризация. Затем объем Lowicryl HM20 доводили до 1.5 мл, пробирку плотно закрывали во избежание попадания избытка воздуха и помещали под УФ лампу 366 нм на 48 часов до полной полимеризации.

Автор благодарит Д. О. Соловьеву и С. В. Сизову (ИБХ РАН) за содействие в получении и пробоподготовке образцов ПСМ/КТ для исследований.

2.13 Пробоподготовка и исследование флуоресцентных полимерных микрокапсул, кодированных квантовыми точками и магнитными наночастицами

2.13.1 Характеризация наночастиц

Гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности и поверхностный заряд (ζ-потенциал) наночастиц анализировались с помощью методов динамического рассеяния света и лазерного доплеровского электрофореза с использованием прибора Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Малверн, Великобритания) с углом детектора 173°, оснащённого He-Ne-лазером с длиной волны 633 нм. Измерения проводились при температуре 25°C. Для обработки данных использовалось программное обеспечение Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Малверн, Великобритания). Все водные растворы были приготовлены с использованием воды Milli-Q (18,2 мОм·см), полученной с помощью системы очистки воды Direct-Q (Millipore, Франция) и дополнительно отфильтрованной через стерильные фильтры Millex-GV с порами размером 0,22 мкм (Millipore, Ирландия).

2.13.2 Подготовка срезов микрокапсул

Суспензию микрокапсул последовательно обезвоживали 30, 50, 70 и 95%-ным водным раствором этанола, а затем трижды обрабатывали абсолютным этанолом (Acros Organics, США) для обеспечения полного обезвоживания. Каждый этап обезвоживания длился 15 мин. Обезвоженные образцы микрокапсул переносили в смесь эпоксидная среда-этанол 1:1 на 12 ч, а затем в смесь эпоксидная среда -этанол 3:1 в течение 3 часов. Затем образцы были перенесены на чистую заливочную эпоксидную среду, и эпоксидные блоки полимеризовали при 45°C в течение 12 часов и при 60°C в течение 72 часов. После полимеризации блоки разрезали на ультрамикротоме Reichert-Jung Ultracut (Leica Microsystems

GmbH, Вена, Австрия) с целью получения ультратонких срезов для исследования с помощью микроскопа.

Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30).

2.13.3 Исследование микрокапсул с помощью атомно-силовой микроскопии

Исследования с помощью сканирующей зондовой микроскопии приготовленных образцов микрокапсул были проведены с использованием методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полуконтактном режиме и магнитно-силовой микроскопии (МСМ). Измерения проводились с использованием комбинированной системы, которая включает в себя специализированную измерительную головку СЗМ, интегрированную с ультрамикротомом Reichert-Jung Ultracut (Leica Microsystems GmbH, Вена, Австрия). Для разрезания образцов использовался алмазный нож Ultra AFM 35 (Diatome) AG, Биль, Швейцария), толщина среза составила 60 нм. Сразу после среза поверхность образца исследовалась иглой СЗМ без каких-либо перемещений образца или его извлечения из ультрамикротома. Подробно комбинированная система СЗМ-ультрамикротом описана в [50].

Поверхность разрезанного блока анализировали с помощью АСМ (топография) и МСМ (распределение намагниченности). Магнитные измерения проводились в двухпроходном режиме: сканирование выполняется при первом проходе в полуконтактном режиме АСМ; в течение второго прохода магнитный зонд поднимали на 17,5 нм над поверхностью, а затем было получено фазовое изображение, отображающее распределение магнитных сил. Для измерений МСМ использовали магнитные кантилеверы MFM_HC (Tipsnano OÜ, Таллинн, Эстония) с покрытием зонда CoCr и резонансной частотой 64,2 кГц. Для

измерений АСМ и МСМ размер сканирования был установлен на 512 × 512 пикселей при частоте сканирования 0,85 Гц.

2.13.4 Исследование микрокапсул с помощью трансмиссионной электронной микроскопии

Наночастицы и срезы микрокапсул толщиной 70 нм переносили на медную сетку с формвар/углеродным покрытием с размером ячеек 200 мкм (Agar Scientific, Великобритания). Анализ образцов проводился с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония), оснащенного электронной пушкой с ускоряющим напряжением 200 кВ и катодом LaB6.

2.13.5 Исследование микрокапсул с помощью флуоресцентной микроскопии

Срезы толщиной 120 нм были перенесены на покровное стекло и исследованы под флуоресцентным микроскопом Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием ртутной лампы HBO100 мощностью 100 Вт для возбуждения и флуоресцентного фильтра 45 HQ TexasRed (полоса возбуждения 560/40 нм, полоса эмиссии 630/75 нм) (Carl Zeiss, Germany). Флуоресцентные изображения были получены с помощью объектива Carl Zeiss EC Plan-Neofluar100x/1.30 Oil Ph3 и иммерсионного масла Immersol 518F (Carl Zeiss, Germany). Изображения были проанализированы и обработаны с помощью пакетов программного обеспечения Zen (Carl Zeiss, Germany) и Fiji (пакет обработки изображений на основе ImageJ).

Автор благодарит Г. О. Нифонтову, П. С. Самохвалова и И. Р. Набиева (НИЯУ МИФИ) за содействие в получении образцов микрокапсул и проведении исследований методом ТЭМ.

2.14 Пробоподготовка образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 для исследований внутриклеточного распределения доксорубицина 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 $см^2$ флаконах (SPL Lifesciences) в CO_2-инкубаторе (HERAEUS B5060 EK/CO2, 5% CO_2, 37°C). Каждые 2-4 дня, когда клетки образовывали плотный монослой на дне культурального флакона, проводили пересев клеток и замену культуральной среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Для этого декантировали из флакона всю старую культуральную среду и отмывали от остатков раствором трипсина-ЭДТА. Затем для открепления клеток с поверхности флакона добавляли трипсин-ЭДТА и оставляли на 3-5 мин в CO_2-инкубаторе (5% CO_2) при 37°C. Далее инактивировали действие раствора трипсина-ЭДТА добавлением культуральной среды (10% FBS) и суспендировали клетки. Полученную клеточную суспензию переносили в пробирку и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, надосадочную жидкость аккуратно декантировали. К осадку добавляли свежую культуральную среду (10% FBS), аккуратно суспендировали клетки и возвращали в культуральный флакон часть клеток, необходимую для дальнейших исследований или культивирования. 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 CO_2-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. Надосадочную жидкость удаляли, а сухой остаток клеток ресуспендировали в 1 мл глутарового альдегида (2,5%, PBS) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4°С. Затем проводили троекратную отмывку образцов центрифугированием (1000 об/мин) в натрий-фосфатном буфере по 10 минут. После отмывки проводили дегидратацию образцов последовательной проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

1. 30% раствор этанола - 10 мин.
2. 50% раствор этанола - 10 мин.
3. 70% раствор этанола - 10 мин.
4. 80% раствор этанола - 10 мин.
5. 96% раствор этанола - 10 мин.

Далее проводили три отмывки образцов от этанола центрифугированием (1000 об/мин) в пропиленоксиде по 10 минут. Далее проводилась непосредственно процедура заливки клеток эпоксидной смолой. Для заливки образцов использовали эпоксидную среду (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемую с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис- (диметиламинометил)-фенола (DMP-30). Отмытые клетки инкубировали в смеси пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образцы центрифугировали и перенесли в смесь пропиленоксида и эпоксидной смолы в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Затем, после центрифугирования, образцы заключали в эпоксидную смолу и инкубировали в термостате при 45°С в течение 12 часов, после чего температуру повышали до 60°С и продолжали инкубацию в течение 48 часов. После инкубации образцы остывали при комнатной температуре.

2.15 Пробоподготовка образцов нервной ткани мыши для исследований методами флуоресцентной оптической нанотомографии

Для получения и пробоподготовки образцов нервной ткани использовалась следующая методика. В первую очередь были получены переживающие срезы гиппокампа мыши. Животное анестезировалось изофлураном, выполнялась декапитация. Далее происходило извлечение гиппокампа, который впоследствии закреплялся в специальном агаровом блоке для соблюдения необходимой ориентации, позволяющей минимально повредить функциональные связи и максимально сохранить структуру клеток. Выполнялась нарезка переживающих срезов толщиной 350 мкм в растворе, соответствующем по составу спинномозговой жидкости, содержащем (в мМ) 124 NaCl, 3 KCl, 2,4 $CaCl_2$, 2,4 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 1,25 NaH_2PO_4, 10 глюкозы, pH 7,4. В течение всего процесса нарезки производилась карбогенизация раствора смесью кислорода и углекислого газа. С помощью хирургических инструментов аккуратно, но быстро извлекали гиппокамп и помещали в агаровом блоке в чашу вибротома, заполненную вышеописанным раствором, при температуре +4°C и насыщенным карбогеном (95 % O_2 + 5 % CO_2, pH 7.4, осмолярность 295 мОсм). Поскольку при нарезке клеточные структуры подвергаются стрессу, после нарезки срезы инкубировали в аналогичном растворе, но с повышенным содержанием глюкозы, содержащим (в мМ) 127 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 25 $NaHCO_3$ и 25 D-глюкозы), в специальной ванночке в течение не менее 1 ч при температуре 22°C . 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 пермеабилизации. После пермеабилизации 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 был использован стандартный подход – 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). Далее образцы были размещены в индивидуальные эппендорфы в растворе фосфатного буфера и помещены на хранение при температуре +5°C.

Фиксация образцов в акрилатной среде (Lowicryl HM20) проводилась по следующей методике. 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. Затем образцы заливали небольшим количеством Lowicryl и помещали в вакуумный эксикатор на 30 минут с последующим постепенным сбросом давления. Данная процедура необходима для удаления остатка этилового спирта, который негативно влияет на дальнейший процесс полимеризации - возможно растрескивание заливочной среды, образование пузырей и неполная полимеризация. 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.

2.16 Оценка регенеративного потенциала в модели по заживлению полнослойной кожной раны крысы *in vivo*

Эксперимент *in vivo* проводили в модели заживления кожного покрова крысы породы Wistar. Эксперимент выполнялся на трех группах животных по 5 крыс в каждой (Таблица 1).

Таблица 1 – Экспериментальные группы животных

группа 1	отрицательный контроль, рана не покрывалась каким-либо материалом, способствующим регенерации кожи
группа 2	экспериментальная, рана покрывалась фрагментами лиофилизированного внеклеточного матрикса печени человека
группа 3	экспериментальная, рана покрывалась пленкой на основе фиброина шелка с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека

Все манипуляции производили под ингаляционным эфирным наркозом, обеспечиваемым с помощью эксикатора из расчета 50 мг/кг, при этом животные находились на спонтанном дыхании. Крысу фиксировали на операционном столе, на спине в области лопаток выщипывали шерсть, кожу обрабатывали 70% спиртом. При нанесении круглой раны диаметром 14 мм хирургическими ножницами затрагивались все слои кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Раны обрабатывались 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата, далее раны крыс из контрольной группы покрывали стерильной марлевой повязкой. На раны животных экспериментальных групп размещали образцы изделий, затем рану смачивали 0,05% водным раствором хлоргексидин биглюконата и также покрывали стерильной марлевой повязкой. В группе 2 на поверхности раны распределяли частицы лиофильно высушенного матрикса печени так, чтобы рана была закрыта на 70%. В группе 3 изделия в виде пленок распределяли на слегка подсушенной ра-

не, расправляя края пленки, до полного смачивания пленки на ране. Все крысы размещались в одиночных клетках, с полным доступом воды и пищи. Оценку заживления кожных покровов для экспериментальных групп проводили на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый и 23-ий день эксперимента, для контрольной- на 3-ий, 9ый, 14-ый, 18-ый, 23-ий, 28-ой, 35-ый, 40-ой день. Изображения ран получали с помощью фотокамеры Nikon D5100 18-105 VR Kit с объективом Nikon AF-S DX 18-105 mm f/3,5-5,6 G ED VR (Nikon, Япония). По достижению полного закрытия раны (визуальная оценка) производили забор образцов кожи для гистологического анализа тканей с окраской гематоксилином и эозином. Образцы кожи размером 20×20 мм, фиксировали с помощью смеси формалина, этанола и уксусной кислоты в объемном соотношении 4:1:0,3.

Автор благодарит М.М.Боброву, Л.А.Сафонову и Н.П.Можейко за помощь в выполнении экспериментов *in vivo* и анализ их результатов.

2.17 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 (<X>) 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% ($p<0,05$).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АППАРАТНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

Анализ литературных данных, существующих измерительных методик и полученных ранее результатов, приведенный в Главе 1, показывает, что 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 ОЗНТ.

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 ФОМ надо проводить *in situ* одновременно в пределах одного цикла среза ультрамикротома, 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.

Таким образом, задачу данного раздела можно сформулировать как поиск и разработку аппаратного решения для получения флуоресцентных изображений изучаемых объектов с высоким разрешением как в плоскости поля зрения, так и по глубине (с малой глубиной резкости), *in situ* в цикле среза ультрамикротома.

В качестве одного из перспективных подходов к решению данной задачи был выбран метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF).

3.1 Флуоресцентная оптическая нанотомография полного внутреннего отражения: объединение техник флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ультрамикротомии

В данном разделе мы рассмотрим подход для решения вышеописанной задачи, основанный на объединении методик ультрамикротомии (выполнение последовательных сверхтонких срезов образца) и TIRF, что дает возможность визуализации 3D-ультраструктуры объектов на основе результатов послойного TIRF-сканирования (томографии) образца в режиме в рамках единой измерительной процедуры. Совмещение методик возможно за счет ключевой особенности: использования специализированного алмазного ножа ультрамикротома как для получения физических срезов, так и в качестве TIRF-призмы. Стоит отметить, что использование ножа микротома в качестве оптического элемента для получения микроскопического изображения уже было представлено в работах [102,103] и получило название Knife-edge scanning microscopy (KESM). Однако свет в данной методике направлялся непосредственно сквозь срезы и TIRF-подход не использовался, вследствие чего толщина получаемых оптических и физических срезов была более 500 нм, что, в свою очередь, не давало выигрыша в разрешении, хотя и позволило увеличить объем 3D реконструкции.

Отличие предлагаемого в данной работе подхода состоит в том, что в данном случае возбуждающее флуоресценцию образца излучение будет направлено в алмазный нож в режиме полного внутреннего отражения. При этом сам нож находится в непосредственной (несколько нанометров) близости от образца. Предлагаемый метод позволит получать трехмерные TIRF изображения с аксиальным разрешением лучше дифракционного предела – за счет детектирования флуоресценции, возбужденной экспоненциально затухающими волнами,

возникающими при полном внутреннем отражении от ближайшей к образцу грани ножа. После получения оптического среза толщиной менее 100 нм выполняется очередной физический сверхтонкий срез поверхности образца с помощью ультрамикротома. В результате многократного повторения данной процедуры получается серия оптических срезов, на основе которой будет восстановлено 3D-TIRF изображение исследуемого объекта. Основным преимуществом описанного подхода является отсутствие принципиальных (за исключением общего времени проведения эксперимента) ограничений на количество выполняемых срезов, а значит, реконструкция изображения объектов происходит без потерь аксиального разрешения при теоретически не ограниченной глубине реконструкции.

Непосредственной целью данной работы является экспериментальная и теоретическая оценка реализуемости нового подхода к 3D-TIRF-микроскопии и достижимого аксиального разрешения, для чего были произведены предварительные расчёты рабочих параметров системы, и собрана модель установки для выполнения экспериментов на модельных образцах.

3.1.1 Предварительные расчеты

Для выполнения сверхтонких срезов методом ультрамикротомии используются алмазные ножи (показатель преломления n=2.4), представляющие собой, по сути, треугольные призмы со стандартными используемыми углами между гранями 35° или 45° и сверхострым срезающим ребром.

Чрезвычайно высокий показатель преломления алмаза позволяет использовать кристалл ножа в качестве призмы для TIRF-микроскопии в широком диапазоне углов падения возбуждающего излучения.

Геометрию и оптические свойства алмазного ножа ультрамикротома необходимо учитывать при выборе наиболее подходящего объектива. Главной характеристикой объектива является числовая апертура, от которой зависит диапазон рабочих углов.

Из геометрических соображений мы можем рассчитать максимальный рабочий угол падения света на первую грань ножа α, при котором лучи на второй грани испытывают полное внутреннее отражение. Критический угол полного внутреннего отражения для ножа ультрамикротома:

$$\theta c = \sin^{-1}\frac{n_1}{n_2} = 24.6^0 \quad (1),$$

где n_1=1 – показатель преломления воздуха, а n_2=2.4 –показатель преломления алмаза. Интенсивность I затухающей волны у поверхности выражается формулой:

$$I = I_0 \exp(-\frac{z}{d}) \quad (2),$$

где z – перпендикулярное расстояние от поверхности, а d – глубина затухания, определяемая выражением:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi n_2}\left[\frac{\sin^2\theta}{\sin^2\theta_c} - 1\right]^{-\frac{1}{2}} \quad (3),$$

где λ_0 это длина волны излучения, а θ – угол его падения на поверхность.

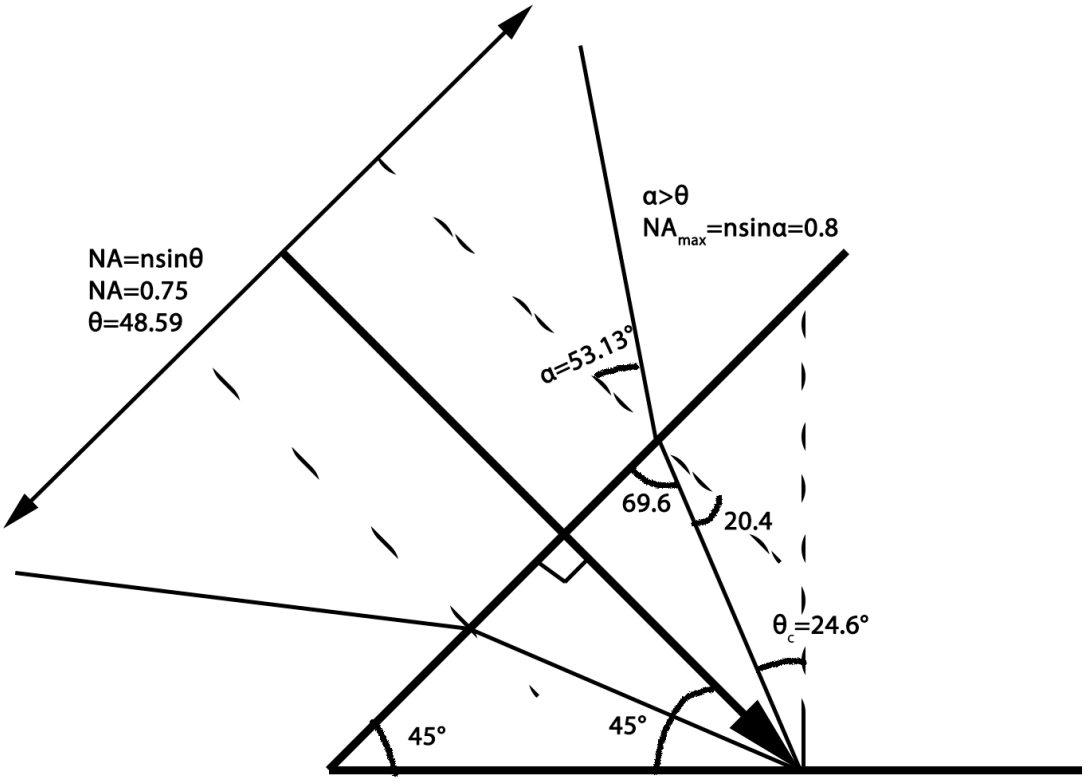


Рисунок 27 – Схема входа лучей из объектива в нож ультрамикротома

На схеме, представленной на рисунке 27, обозначены углы падения лучей, проходящих через нож, относительно нормали. Исходя из расчётов по представленной схеме, максимальный рабочий угол падения луча, при котором на второй грани будет происходить полное внутренне отражение, для угла раствора ножа 45º составляет α=53.13º, при этом минимальный угол (против часовой стрелки в проекции на рисунке 3.1.1) может составлять до -90°. Отсюда также можем получить, например, что для угла раствора ножа 45º при использовании сфокусированного пучка (например, в конфокальной схеме) значение предельно возможной числовой апертуры для использования в данной конструкции составляет NA_{max}=0.8 для случая оси объектива, перпендикулярной первой грани ножа.

Возбуждающее освещение образца в нашем случае происходит с помощью ртутной лампы, что позволяет одновременно возбуждать образцы с различными люминесцентными маркерами. При этом для создания изображения с правильным распределением исследуемых объектов требуется равномерное возбуждение всех его участков. По этой причине используется схема Келлеровского освещения с апохроматическим объективом, и, как следствие, можно считать, что все используемые длины волн падают на грань алмазного ножа под прямым углом. Таким образом, для ножей с углом раствора режущей кромки в 35° и 45° свет падает под углами 55° и 45° градусов соответственно. Воспользовавшись формулами 2 и 3 можно сравнить глубину проникновения поля в каждом случае.

Взяв за глубину проникновения эванесцентного поля длину, на которой она спадает в e раз, получим 80 и 105 нм для ножей с углами 35° ножа и 45° соответственно (рисунок 28). Также стоит учесть, что разные длины волн в спектре ртутной лампы будут проникать в образец по-разному. На рисунке 29 представлено сравнение глубины проникновения поля для трех основных длин волн возбуждения в видимой области для случая ножа 45°.

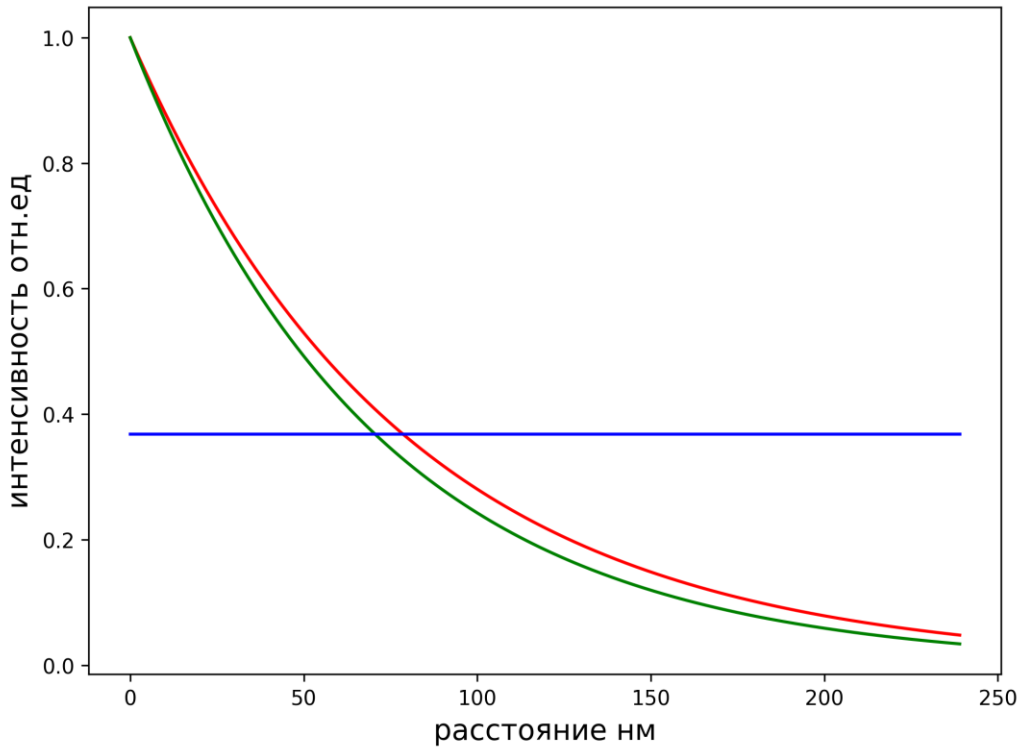


Рисунок 28 – Сравнение глубины проникновения поля для 45° ножа (синий) и 35° ножа (оранжевый). Синяя линия обозначает снижение интенсивности в e раз

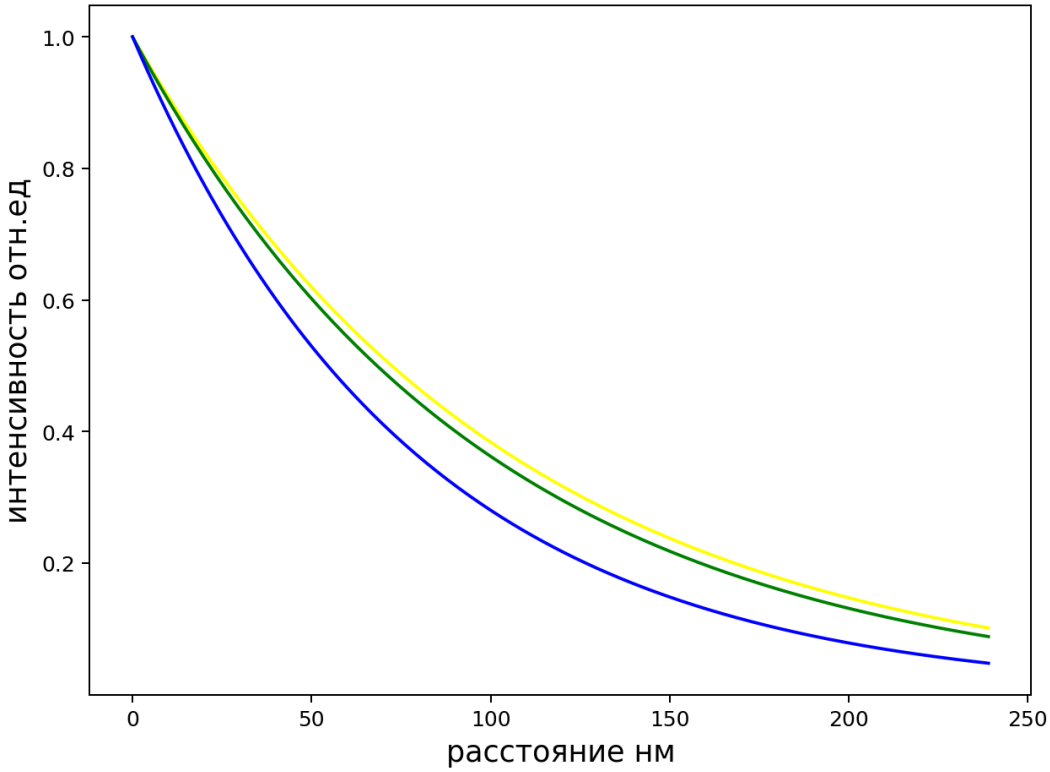


Рисунок 29 – Сравнение глубины проникновения для длин волн 435(синий), 546(зеленый) и 579 (желтый) нм

Важно отметить, что ультрамикротомирование при помощи алмазного ножа даёт возможность выполнять последовательные сверхтонкие срезы образцов толщиной от 25 нм, и разумным выбором для метода 3D-TIRF является шаг в районе 100-150 нм. Следовательно, как видно из приведенного рисунка, влияние различия глубин проникновения полей от разных длин волн на вид получаемых 2D-флуоресцентных изображений каждого очередного среза не столь существенно, поскольку толщина выполняемых ультрамикротомом срезов меньше глубины проникновения любого из них.

3.1.2 Разработка инструментального комплекса флуоресцентной оптической нанотомографии

В основе разработанного комплекса 3D-TIRF лежит созданная ранее установка [50,63], объединяющая методики флуоресцентной микроскопии, ультрамикротомии, а также сканирующей зондовой микроскопии. Для реализации методики 3D-TIRF был разработан специализированный прямой оптический флуоресцентный микроскоп и система его прецизионного позиционирования по трем координатам и по углу наклона оптической оси. Принципиальная оптическая схема разработанного флуоресцентного микроскопа соответствует представленной на рисунке 1. Конструктивная модель специализированого прямого флуоресцентного микроскопа представлена на рисунке 30.

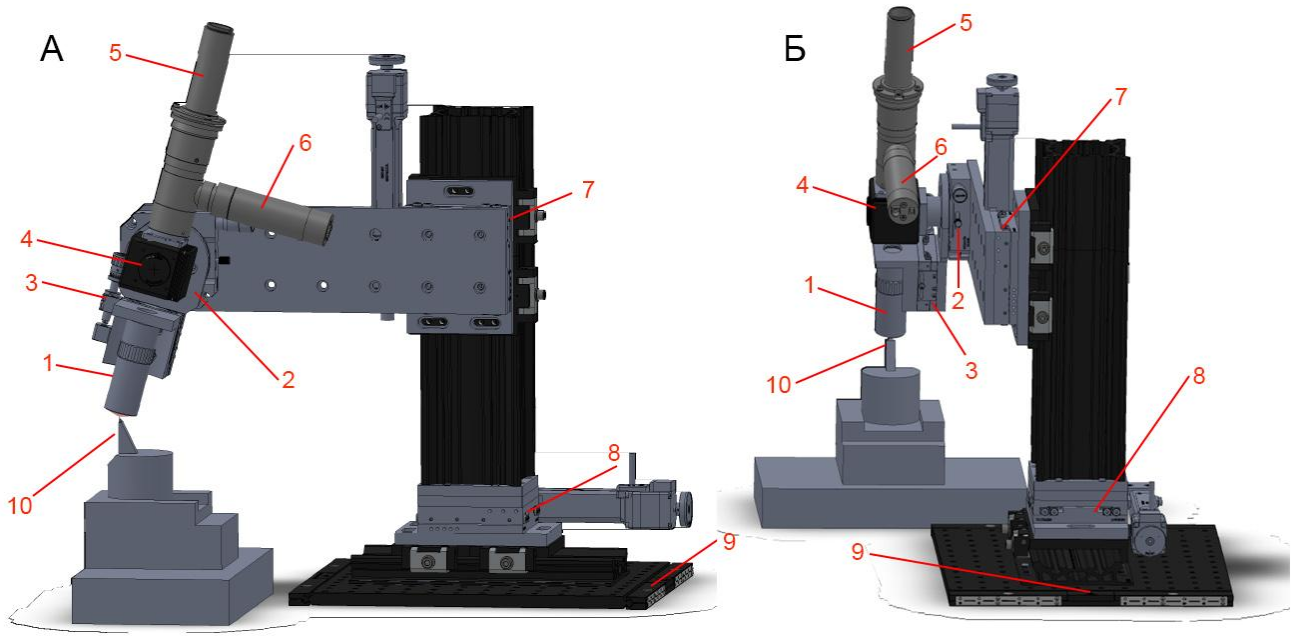


Рисунок 30 – Модель специализированного прямого флуоресцентного микроскопа для реализации методики флуоресцентной оптической нанотомографии. А – вид сбоку, Б – вид сзади. Обозначения: 1 – объектив, 2 – прецизионная угловая подвижка, 3 – прецизионная аксиальная микроподвижка для точной фокусировки, 4 – 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 ультрамикротома

Также была решена задача сопряжения флуоресцентного микроскопа с XYZ-нанопозиционером (пьезостейджем) модуля сканирующей зондовой микроскопии (рисунок 31). Исходя из результатов предварительных расчетов, геометрия и оптические свойства ножа ультрамикротома 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 0º (вертикальное расположение) до 45º (перпендикулярно первой грани ножа), как показано на рисунке 31. Важно отметить, что возможность широкого варьирования угла наклона оптической оси объектива по отношению к внешней грани алмазной призмы в вертикальной плоскости является важным параметром данной системы, увеличивающим ее адаптируемость под различные экспериментальные условия. Так же разработанная система сопряжения прямого оптического флуоресцентного микроскопа позволяет проводить его грубую фокусировку вдоль оптической оси в широком (до 10 мм) диапазоне с помощью шагового мотора и плавную фокусировку с точностью до 1 мкм с помощью однокоординатного пьезопозиционера.

Исследуемый образец располагается на сканирующем XYZ-пьезостейдже, закрепленном на подвижной консоли ультрамикротома таким образом, что одна из его координат (X) параллельна кромке алмазного ножа. Ранее, в контексте методик совмещения сканирующей зондовой микроскопии и ультрамикротомии, такая система была подробно описана в нашей работе [50]. Использование XYZ-пьезостейджа системы как в качестве сканирующего устройства, так и в качестве устройства подвода образца обеспечивает высокоточное совмещение поверхности образца с гранью алмазного ножа. Перемещение с нанометровой точностью вдоль оси Z (перпендикулярно плоскости среза) позволяет зондировать экспоненциально затухающее поле, возбуждающее флуоресценцию, с целью нахождения оптимальных соотношений между разрешением по глубине и интенсивностью TIRF-сигнала.

Для получения среза образца нож ультрамикротома должен располагаться под углом 2-10 градусов к поверхности образца, и это приводит к тому, что эффективное возбуждение TIRF возникает только в узкой полосе вблизи его кромки, где нож и образец находятся на наименьшем расстоянии друг от друга.

Таким образом, возникает «полоса контрастности», совпадающая с направлением X. Последовательность «полос контрастности», полученная при сканировании плоскости среза образца вдоль направления Y (перпендикулярно кромке ножа), с использованием специального программного обеспечения, написанного в среде Piton 3.8, складывается в его 2D-флуоресцентное изображение. Дополнительное сканирование по оси X может быть использовано в случае, если размер образца больше поля зрения объектива. Набор 2D-флуоресцентных изображений, полученных в результате последовательных срезов и сканирований вдоль оси Y, далее преобразуется с помощью программы ImagePro Plus 6.0 в трехмерный массив данных представляющий собой 3D-флуоресцентное изображение исследуемого образца.

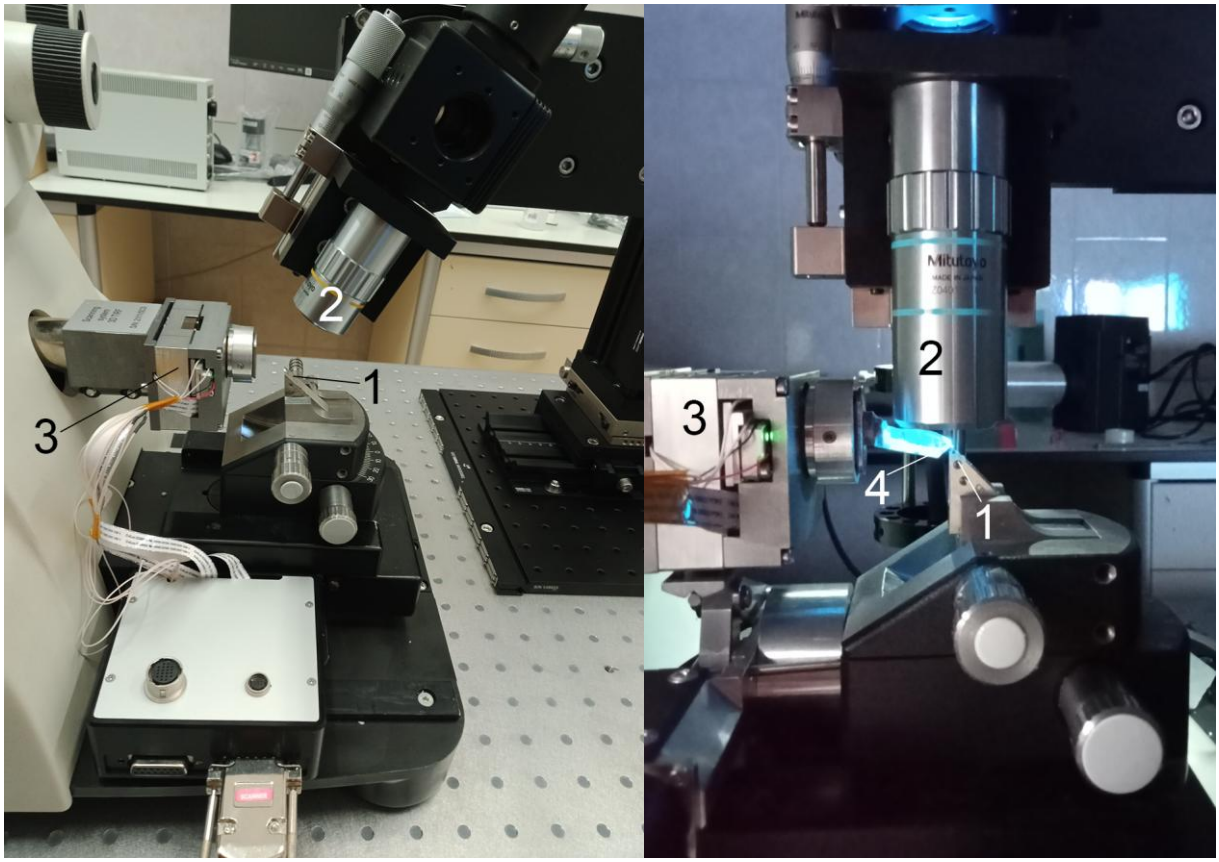


Рисунок 31 – Экспериментальная установка для методики флуоресцентной оптической нанотомографии полного внутреннего отражения (слева – наклонное, справа – вертикальное положение объектива): 1 – алмазный нож ультрамикротома, 2 – объектив флуоресцентного микроскопа, 3 – XYZ-пьезостейдж, установленный на подвижной консоли ультрамикротома, 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-пьезостейджа 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 ультрамикротома или микроскопа TIRF системы в режиме яркого поля с объективом меньшей кратности.

5) Микроскоп с объективом ×50 подводится к ножу с помощью моторизированной подвижки так, чтобы задняя грань ножа была в фокусе. При этом с использованием XYZ-пьезостейджа 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 ультрамикротома.

9) Многократный повтор п.п. 2-8.

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

3.1.3 Результаты тестовых исследований

В качестве тестового образца для практического исследования возможностей микроскопии 3D-TIRF были выбраны полистирольные микросферы (ПСМ) 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. Таким образом, можно считать, что исследуемым объектом является флуоресцентная сфера диаметром 5 мкм и бесконечно малой (относительно аксиального разрешения прибора) толщиной. Для проведения измерений массив ПСМ/КТ был залит в среду Ловикрил, позволяющую легко выполнять срезы ультрамикротомом и, соответственно, проводить их полную 3D-реконструкцию. Методики получения и пробоподготовки образцов ПСМ/КТ описаны подробно в разделе 2.12.

Первой задачей, которая была выполнена на разработанной установке 3D-TIRF, было сравнение теоретического и экспериментального распределений эванесцентного поля вдоль оси Z. Для этого был проведен срез экспериментального образца, после чего к плоскости среза было подведена кромка ножа ультрамикротома до появления отчетливой «полосы контрастности». Далее образец отводился от ножа с шагом в 10 нм, и записывались флуоресцентные изображения образца в «полосе контрастности». Глубина проникновения поля оценивалась по относительной яркости изображений кластеров КТ на поверхности ПСМ. Теоретическая зависимость строилась для длины волны 436 нм, что соответствует одной из длин волн ртутной лампы, которой в дальнейшем проводилось возбуждение флуоресценции КТ. Сравнение этой зависимости и данных, полученных экспериментально, приведено на рисунке 32. Для построения приведенной экспериментальной зависимости величина интенсивности флуоресценции КТ усреднялась по четырем визуально ярким областям (кластерам КТ) в «полосе контрастности» на каждом изображении, что и определяло величину погрешности измерений, приведенную на рисунке 32.

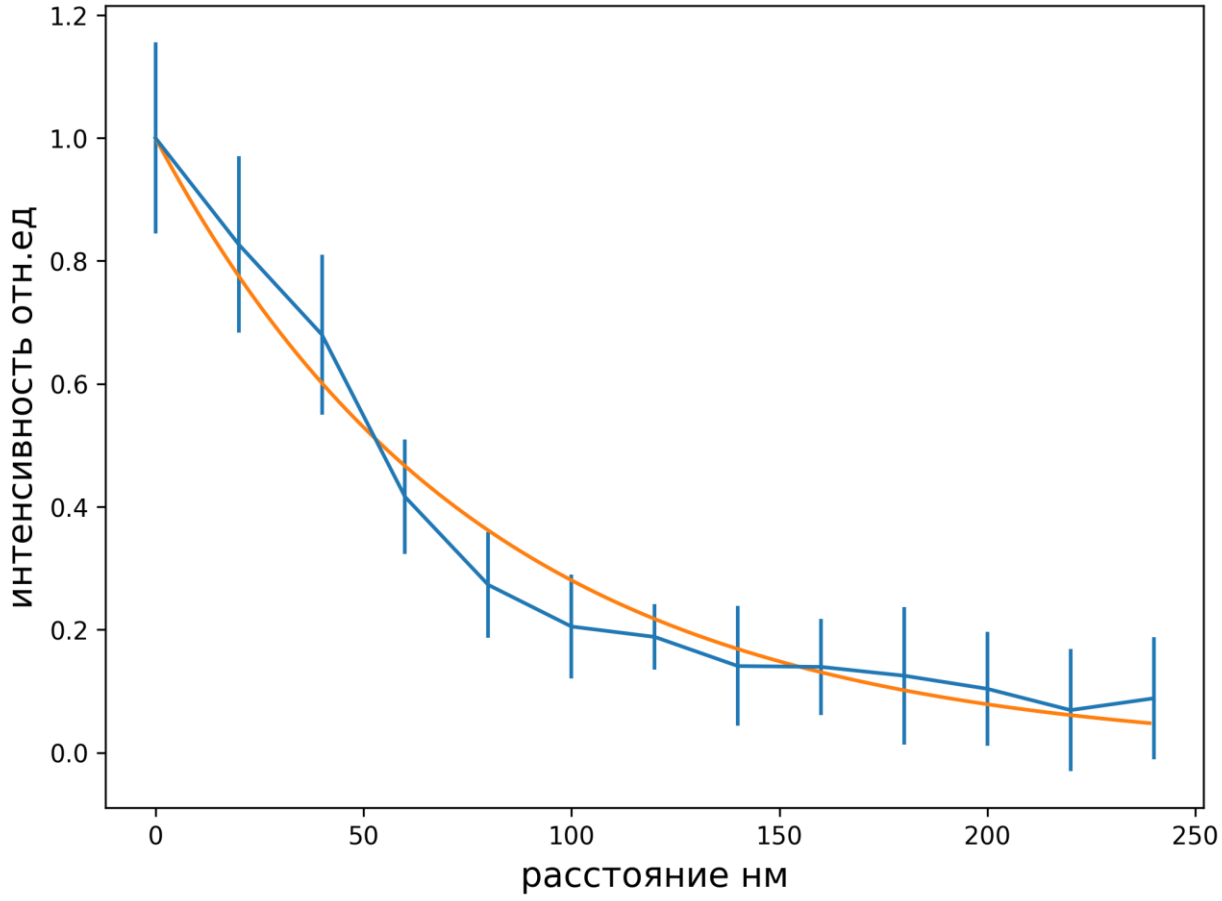


Рисунок 32 – Сравнение экспериментальной (синий) и теоретической (оранжевый) зависимостей интенсивности эванесцентных волн от расстояния от поверхности ножа по оси Z

Из приведенных данных видно, что с точностью до погрешности измерений теоретическая и экспериментальная зависимости совпадают, что прежде всего говорит об адекватной работе созданной системы возбуждения/сбора флуоресценции в режиме TIRF. Кроме того, полученные экспериментальные зависимости в дальнейшем будут использоваться для подбора параметров проведения эксперимента и интерпретации его результатов.

На следующем этапе была выполнена реконструкция объёмного флуоресцентного изображения образцов ПСМ/КТ в режиме TIRF-нанотомографии. Для этого, 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 пикселов – «полос контрастности» вблизи лезвия ножа, полученных при растровом сканировании образцом по оси Y с шагом 100 нм. Шаг сканирования пьезостейджем по оси Y соответствовал физическому размеру пиксела, получаемого на исходных флуоресцентных изображениях. На рисунке 33 (левая панель) показан пример одного из полученных интегрированных 2D-TIRF изображений. Получение каждого из изображений заняло около 40 секунд. Различимые на изображении круговые структуры соответствуют срезам отдельных микросфер, на поверхности которых находятся флуоресцирующие квантовые точки.

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 33 (правая панель).

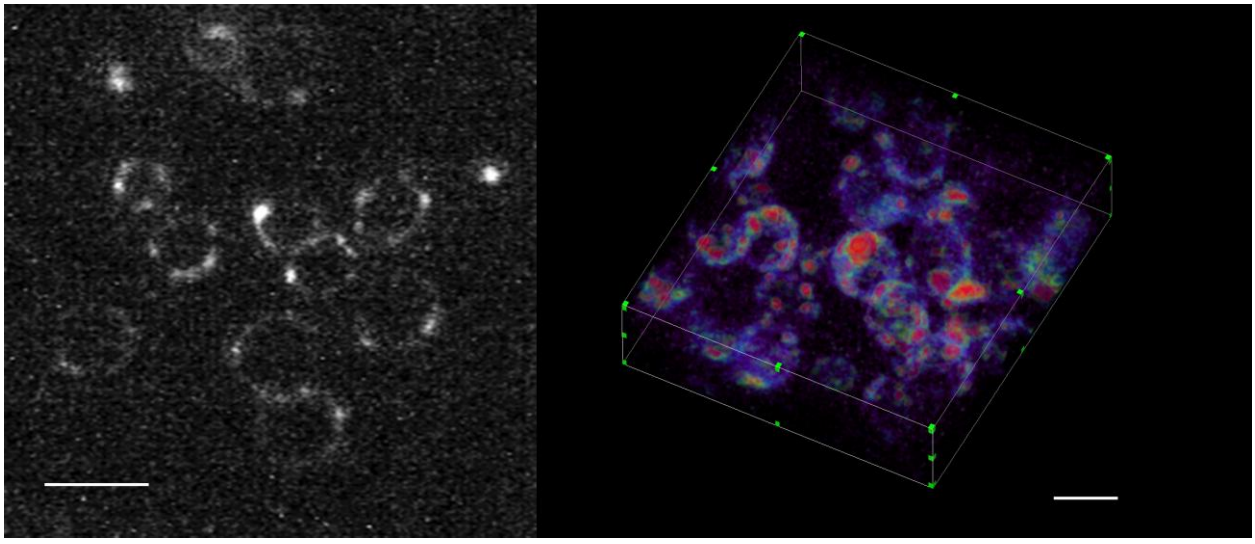


Рисунок 33 – Левая панель – флуоресцентное изображение образца полистирольных микросфер с нанесенным оптически тонким (несколько нанометров) поверхностным слоем квантовых точек структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) с длиной волны испускаемой флуоресценции в районе 530 нм. Размер изображения 25,6×25,6 мкм;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

3.1.4 Обсуждение результатов

Основной целью работ, представленных в данном разделе, является демонстрация новой концепции 3D-флуоресцентной микроскопии с аксиальным разрешением, преодолевающим дифракционный предел и не имеющей практических ограничений по глубине реконструкции образца. В основе предлагаемого подхода лежит объединение методики традиционной TIRF-микроскопии и ультрамикротомии как метода послойного восстановления объемной структуры. Уникальной особенностью предложенного метода является непосредственно использование алмазного ножа ультрамикротома в качестве TIRF-призмы. Излучение ртутной лампы традиционного прямого (upright) флуоресцентного микроскопа через объектив с достаточно высокой числовой апертурой (NA=0.75) направлено в алмазный нож в режиме полного внутреннего отражения от той его грани, которая находится в непосредственной (несколько нанометров) близости от срезанной поверхности образца. В данной области образуется «полоса контрастности» - наиболее яркое и контрастное TIRF-изображение образца, представляющее собой полосу, вытянутую вдоль кромки ножа. Аксиальное разрешение «полосы контрастности» превышает дифракционный предел за счет детектирования флуоресценции, возбужденной экспоненциально затухающими волнами, возникающими при полном внутреннем отражении возбуждающего излучения от ближайшей к образцу грани алмазного ножа ультрамикротома. Сканирование в направлении перпендикулярном грани алмазного ножа позволяет набрать необходимый набор «полос контрастности» для составления полного 2D-TIRF изображения плоскости среза образца. Далее

следует очередной срез поверхности образца ультрамикротомом, и процедура получения 2D-TIRF изображения нового слоя повторяется. Далее из массива двумерных TIRF-изображений формируется 3D-флуоресцентное изображение исследуемого образца.

Непосредственной задачей, которая была решена в данной работе, была теоретическая и экспериментальная оценка реализуемости предложенного подхода, разработка алгоритма выполнения измерений в режиме 3D-TIRF-микроскопии и выполнение тестового эксперимента, демонстрирующего ее потенциальные возможности.

В ходе выполнения теоретических оценок в качестве TIRF-призм были рассмотрены два типа алмазных ножей для ультрамикротомии, используемые на практике – с углами между гранями 35° или 45°. Было показано, что для предполагаемого к использованию длиннофокусного объектива с числовой апертурой 0,75 и рабочим отрезком 5.2 мм (Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected×50) для обоих типов алмазных ножей при использовании Келлеровского возбуждения флуоресценции 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 при возможности менять угол наклона оптической оси объектива в диапазоне 45°. Также в ходе теоретических расчетов было определено влияние угла раствора ножа и спектрального состава возбуждающего излучения на его проникновение в глубину образца. Глубиной проникновения считалась величина, на которой интенсивность эванесцентных волн убывает в *e* раз. Было установлено, что глубины проникновения для ножей с углами 35° ножа и 45° составили 80 и 105 нм соответственно. При этом глубина проникновения наибольшей («красной») из рассмотренных длин волн на ноже с углом 45° (максимальная рассмотренная глубина проникновения) составляет величину около 110 нм. Общим выводом из всех проведенных исследований является рекомендация наиболее оптимального шага ультрамикротомирования при проведении послойного восстановления образца, которая составляет величины в диапазоне от 100 нм (практически все

волны ослаблены в *e* раз) до 150нм. Увеличение шага среза более 150 нм не приводит к существенному ослаблению влияния эванесцнетного возбуждения и, следовательно, к увеличению аксиального разрешения.

Справедливость полученных теоретических оценок была подтверждена при проведении сравнения теоретического и экспериментального распределений эванесцентного поля вдоль оси Z на разработанной установке 3D-TIRF. При этом полученные экспериментально и теоретические зависимости совпали с точностью до погрешности измерений. Следующей очевидной задачей являлось получение 3D-TIRF реконструкции образца, демонстрирующего возможности метода и его применимость. В качестве модельного образца была выбрана полимерная не флуоресцирующая сфера (полистирол), покрытая оптически тонким (несколько нанометров) поверхностным слоем флуоресцирующего агента - монослой полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS). Модельные образцы были залиты в среду Ловикрил, позволяющую легко выполнять срезы ультрамикротомом. Важно отметить, что возможность выполнения равномерных и гладких срезов при ультрамикротомировании является одним из главнейших условий, накладываемых на исследуемые данным методом образцы. В ходе проведения тестовых измерений в режиме 3D-TIRF была получена объемная реконструкция флуоресцирующих сфер, адекватная в том смысле, что внутренняя часть изображений микросфер абсолютно не засвечена паразитным флуоресцентным фоном, характерным для конфокальных изображений подобных объектов и вызванным плохим аксиальным разрешением конфокальной микроскопии. Паразитного флуоресцентного фона не наблюдается и в центрах 2D-TIRF изображений, использованных для восстановления 3D-TIRF изображения, и общее разрешение метода определяется в основном латеральным разрешением метода. Таким образом, можно сделать вывод о том, что нами разработана методика восстановления 3D-флуоресцентных изображений с аксиальным разрешением, преодолевающим дифракционный предел, и не имеющая фундаментальных ограничений по глубине реконструкции. Последнее

из указанных обстоятельств выгодно отличает 3D-TIRF от всех, разработанных на данный момент методик оптического 3D-анализа.

К недостаткам же разработанного метода можно отнести техническую сложность и необходимость специализированной программной пост-обработки полученных данных для получения двумерных изображений перед выполнением трехмерной реконструкции. Для ускоренного флуоресцентного скрининга сверхтонких срезов нами был разработан метод флуоресцентной нанотомографии серийных срезов *in situ*, который представлен в следующем разделе.

3.2 Флуоресцентная нанотомография серийных срезов *in situ*

В предлагаемом подходе используется та же конструкция прямого флуоресцентного микроскопа, совмещаемого с областью выполнения срезов ультрамикротома при помощи прецизионной трехкоординатной и угловой подвижки, что и для методики 3D-TIRF, рассмотренной в предыдущем разделе. 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 ПЭМ-образцов полученные сверхтонкие срезы находятся на поверхности воды, удерживаемые силами поверхностного натяжения (см. рисунок 34). Оптическая ось флуоресцентного микроскопа устанавливается вертикально, и объектив фокусируется на последнем выполненном срезе (см. рисунок 35). 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×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).

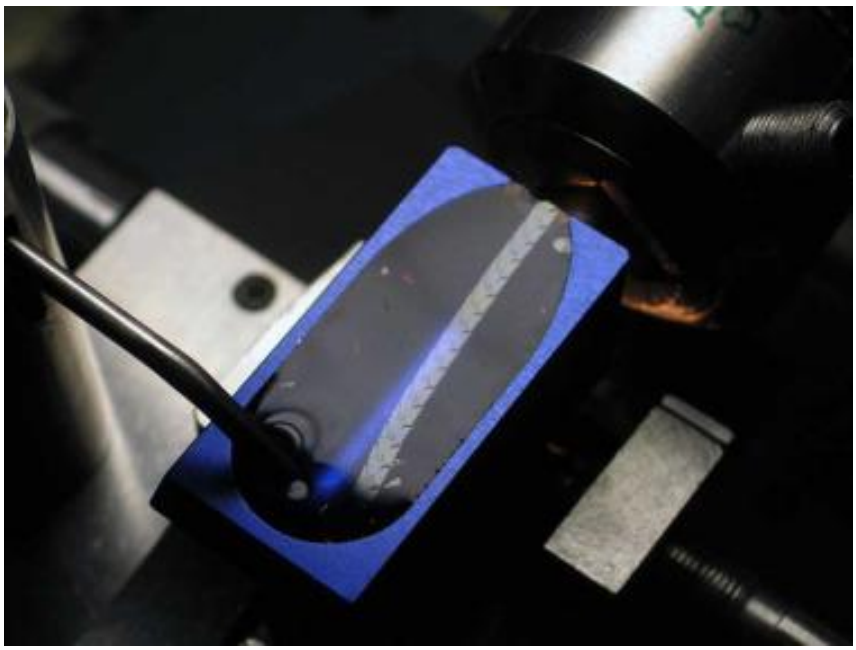


Рисунок 34 – Алмазный нож ультрамикротома с ванночкой и сверхтонкими срезами на поверхности воды

В качестве флуоресцентных фильтров в представленных далее экспериментах используется набор фильтров Thorlabs MDF-FITC (фильтр возбуждения 475 ± 17.5 нм, фильтр эмиссии 530 ± 21.5 нм) для сменного флуоресцентного кубика DFM1T1 (Thorlabs Inc., США). Для возбуждения флуоресценции используется излучение ртутной лампы U-LH100HG (Olympus Co., Япония) мощностью 100 Вт, вводимое в оптическую систему при помощи гибкого жидкостного световода.

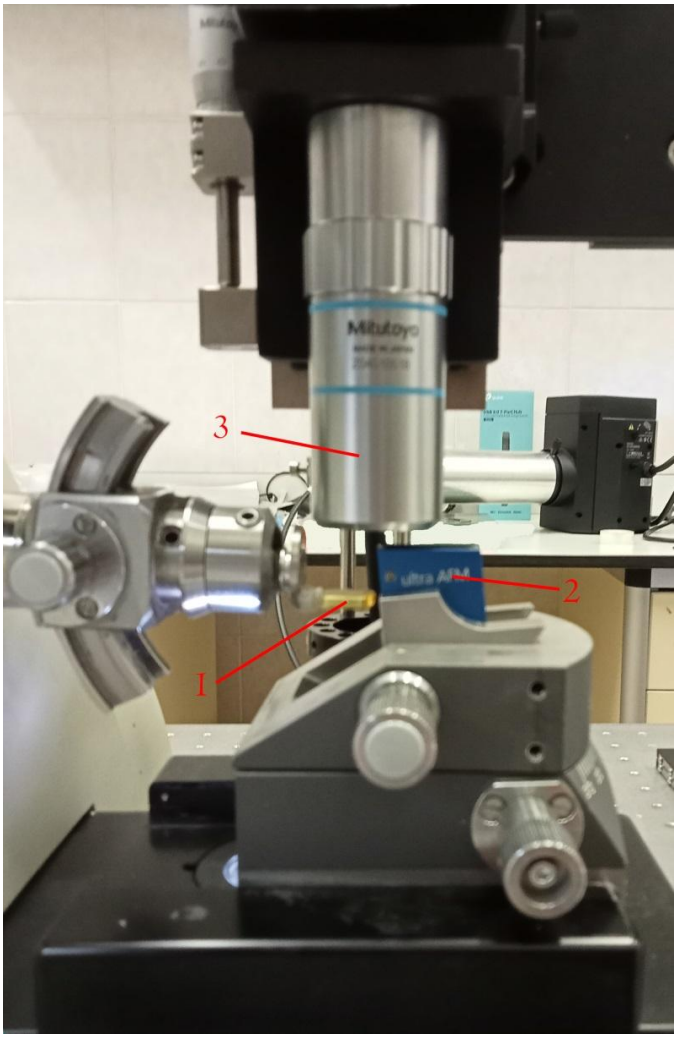


Рисунок 35 – Установка для флуоресцентной оптической нанотомографии: 1 – образец, 2 – нож ультрамикротома с ванночкой, 3 – объектив флуоресцентного микроскопа

Общий вид системы показан на рисунке 36. Система оснащена прецизионными подвижками микроскопа по всем трем координатам, что позволяет эффективно с достаточной точностью позиционировать объектив, наводиться и фокусироваться на область интереса на срезе на поверхности воды в ванночке ножа. Для позиционирования микроскопа по вертикали, в том числе фокусировки, и горизонтального подвода/отвода по направлению к образцу, используются подвижки Thorlabs XT955D-250, а для перемещения оптической системы в направлении, параллельном кромке ножа ультрамикротома (восток-запад), вся система установлена па оптическую платформу-подвижку Thorlabs TBB3030/M.

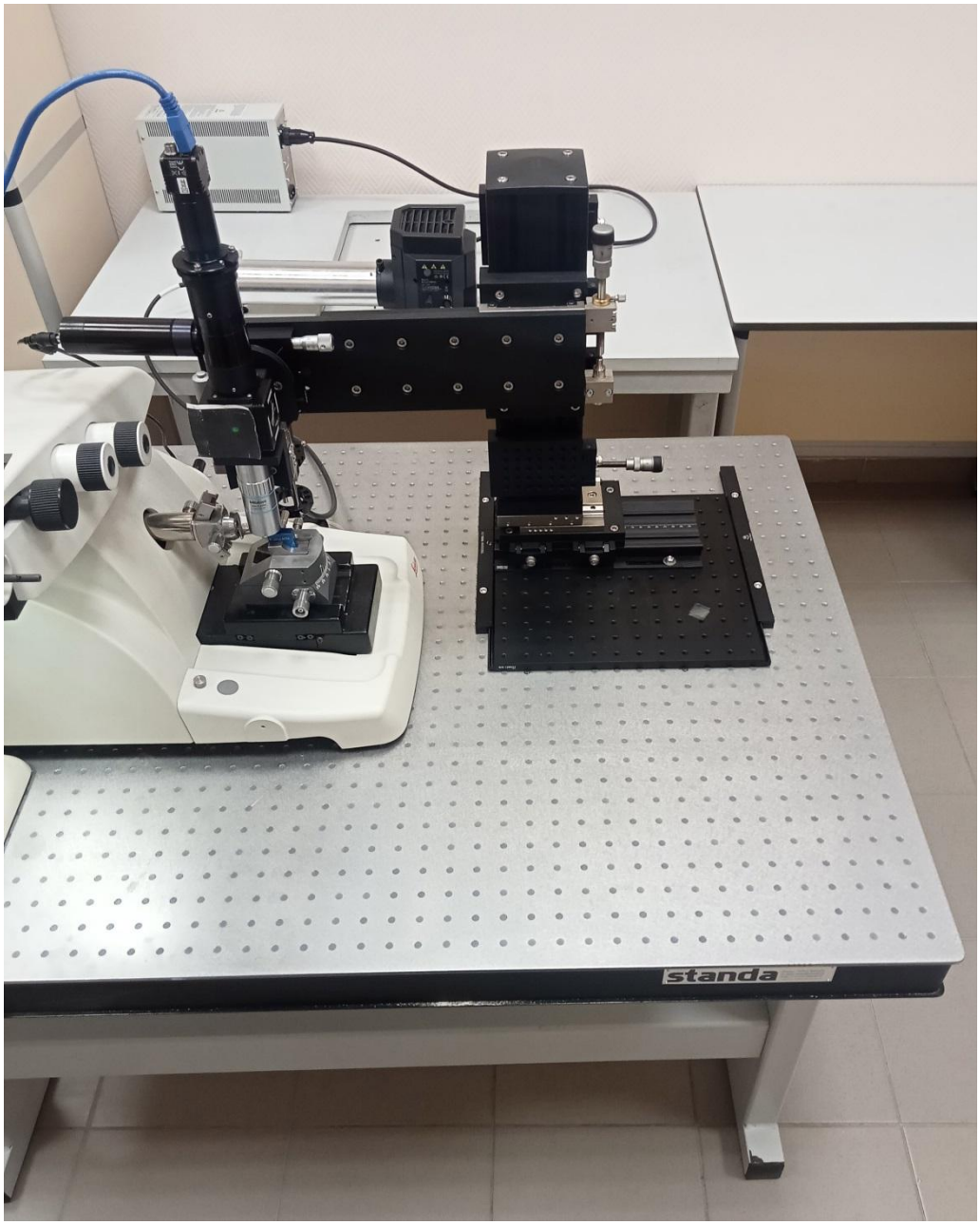


Рисунок 36 – Общий вид системы для флуоресцентной оптической нанотомографии, объединяющей ультрамикротом и вертикально-ориентированный прямой флуоресцентный микроскоп, установленный на прецизионной трехмерной подвижке. Объектив ×50, NA=0,75

Для получения адекватных трехмерных реконструкций необходимо, чтобы все участки области интереса на получаемых изображениях находились в фокусе. Данная проблема является достаточно актуальной, учитывая низкую глубину резкости используемого высокоапертурного объектива (Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected×50), и то обстоятельство, что исследуемые срезы находятся на поверхности воды, которая может не совпадать с горизонтальной плоскостью за

счет поверхностного натяжения вблизи ножа, а также изменений уровня воды в процессе измерений.

Проведенные эксперименты показали, что собственная система перистальтического насоса ультрамикротома Reflexomat позволяет выравнивать поверхность воды вблизи алмазного ножа с достаточной точностью, чтобы область интереса на срезе находилась в фокусе в случае, если ее размеры не превышают нескольких десятков мкм. Также прецизионная угловая подвижка (Standa 7R129), позволяющая с высокой точностью изменять угол наклона оптической оси микроскопа, дает возможность корректировать расфокусировку, вносимую отклонением угла наклона водной поверхности от горизонтали вблизи кромки ножа.

В случае исследований более обширных областей поверхности возможно эффективное использование программно-аппаратных средств увеличения глубины резкости объектива флуоресцентного микроскопа. Так, программный пакет ZEN 2.3 (Zeiss, Германия) позволяет получать резкое по всей площади изображение при помощи нескольких съемок объекта с разной фокусировкой. На рисунке 37 для сравнения показаны два характерных изображения срезов образца ткани печени крысы породы Вистар, полученных по методике, приведенной в разделе 2.9. На рисунке 37А приведено изображение, полученное с помощью камеры Sentech STC-MCA5MUSB3 (Omron Sentech Co. Ltd., Япония) без использования дополнительных программных средств увеличения глубины фокуса, в то время как на рисунке 37Б представлено изображение, полученное с помощью камеры Axiocam 305 color (Zeiss, Германия) с применением опции дополнительного увеличения глубины фокуса программного пакета ZEN 2.3. На приведенных изображениях видно, что без применения подобных средств значительная часть изображения может оказаться не в фокусе, что было бы неприемлемо для задачи трехмерной реконструкции всего фрагмента ткани. Однако использование данной функции позволяет в тех же условиях получить всюду резкое флуоресцентное изображение размером более 150 мкм.

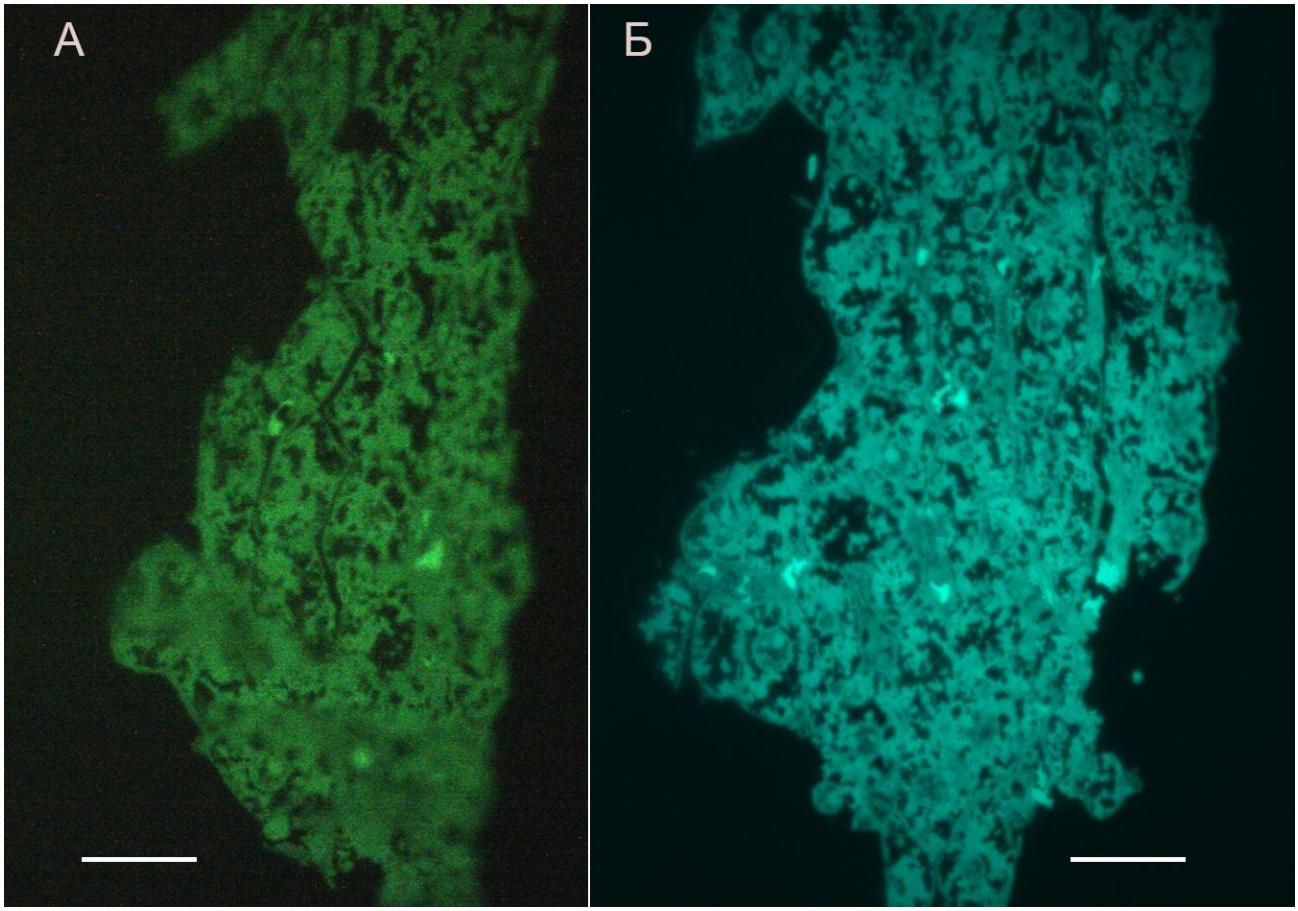


Рисунок 37 – Флуоресцентные изображения срезов образца печени крысы, окрашенной FITC. А – изображение, полученное без программного увеличения глубины резкости; Б – изображение, полученное с применением программного увеличения глубины резкости (ZEN). Размерный отрезок 20 мкм

В следующем разделе более подробно рассматривается применение данной системы для выполнения трехмерных ФОНТ-реконструкций структуры образцов на примере анализа ткани печени крысы.

3.3 Анализ ткани печени крысы породы Wistar методом флуоресцентной нанотомографии серийных срезов *in situ*

В данном разделе представлены исследования трехмерной структуры образцов фрагментов печени крысы породы Вистар, маркированных флуоресцентным красителем FITC. Методика получения и пробоподготовки образцов печени подробно описана в разделе 2.9.

Трехмерный ФОНТ-анализ залитых в эпоксидную среду образцов ткани печени крысы породы Wistar выполнялся с использованием специализированного флуоресцентного микроскопа, комбинированного с ультрамикротомом, описанного в предыдущем разделе. 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. Последовательные флуоресцентные изображения каждого среза были получены с использованием вертикально расположенного объектива ×50 с числовой апертурой 0,75 и рабочим отрезком 5.2 мм в режиме эпифлуоресценции с возбуждающим излучением, полученным от ртутной лампы, с использование схемы Кёллеровской засветки поля зрения. На рисунке 38 приведено одно из флуоресцентных изображений среза, на котором визуализируются гепатоциты, являющиеся структурной единицей печени. В клетках можно различить плазматическую мембрану, ядра (от 1 до 2 в клетке) с ядрышком, цитоплазму. Клетки разделены между собой синусоидной сетью.

На рисунке 39 приведено увеличенное изображение участка сверхтонкого среза ткани печени крысы, демонстрирующее, что латеральное разрешение флуоресцентной микроскопии в данном случае не превосходит 500 нм.

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 рисунках 40 и 41.

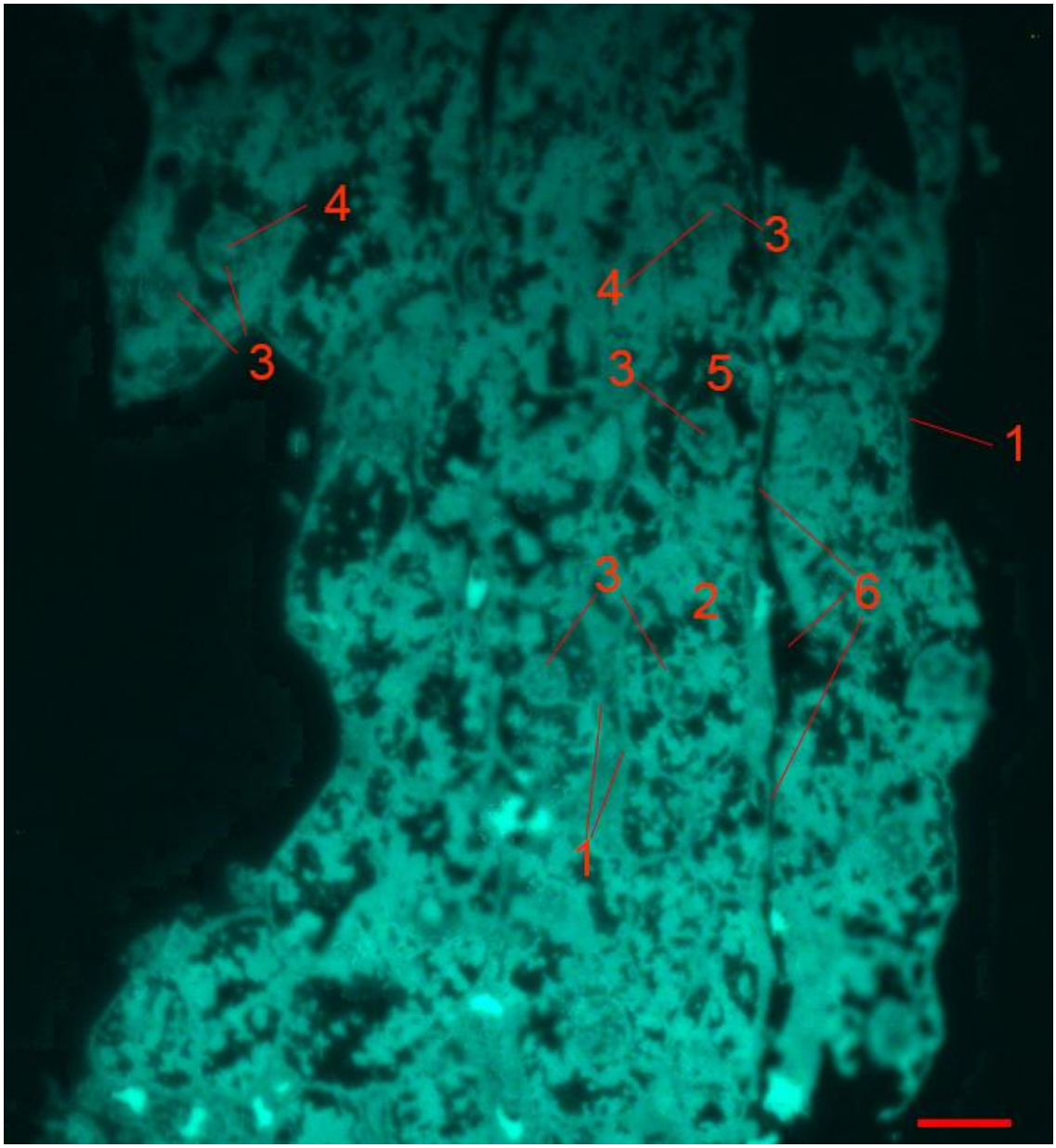


Рисунок 38 –- Флуоресцентное изображение среза образца ткани печени крысы, окрашивание FITC, толщина среза 120 нм, размерный отрезок – 20 мкм; объектив ×50 NA=0,75; цифрами обозначены: 1 – цитоплазматическая клеточная мембрана, 2 – цитоплазма, 3 – ядро, 4 – ядрышко, 5 – внутриклеточные органеллы, 6 – синусоидные капилляры

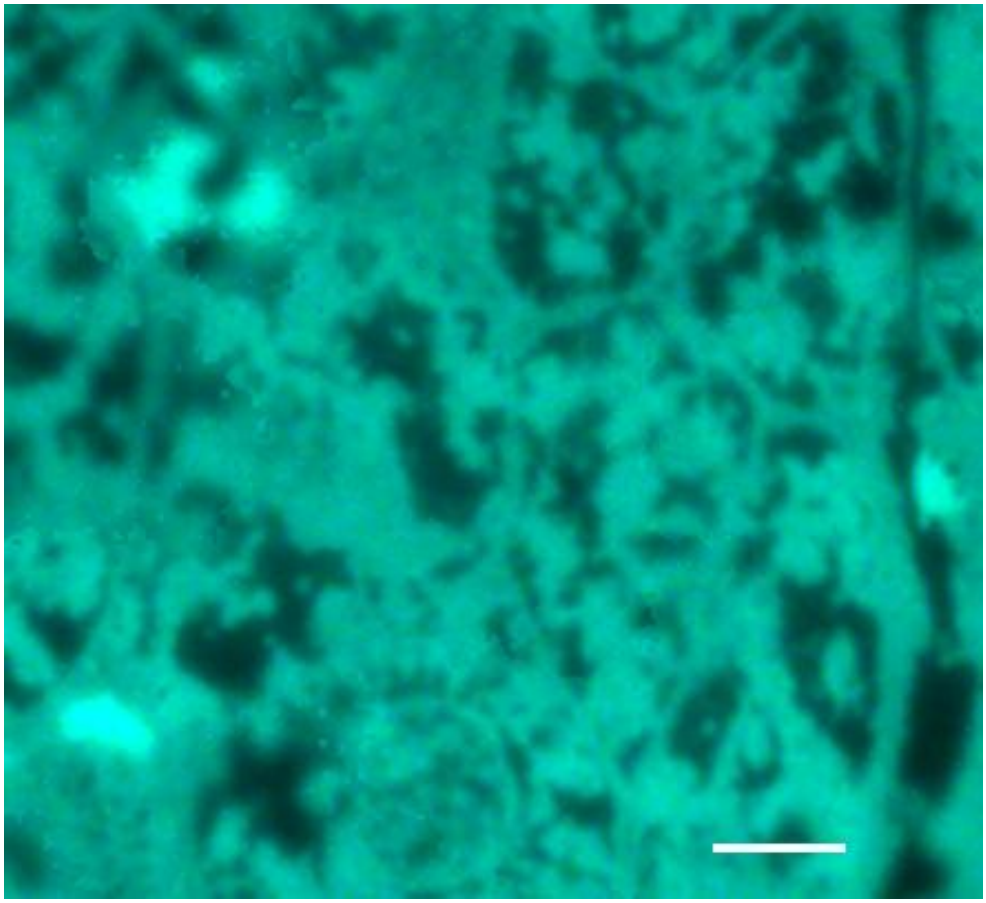


Рисунок 39 – Флуоресцентное изображение среза образца ткани печени крысы, окрашивание FITC, толщина среза 120 нм, размерный отрезок – 5 мкм; объектив ×50 NA=0,75; латеральное разрешение не хуже 500 нм

Для наглядности на данных рисунках выполнены поперечные сечения объемной реконструкции виртуальными вертикальными плоскостями, позволяющие оценить разрешение реконструкции по глубине и связность полученной объемной структуры, определяющую корректность реконструкции. На вставке на рисунке 41 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. Возникающая неоднородность слоев (полос) вызывается разницей в яркости полученных изображений и может быть скорректирована дополнительным выравниванием.

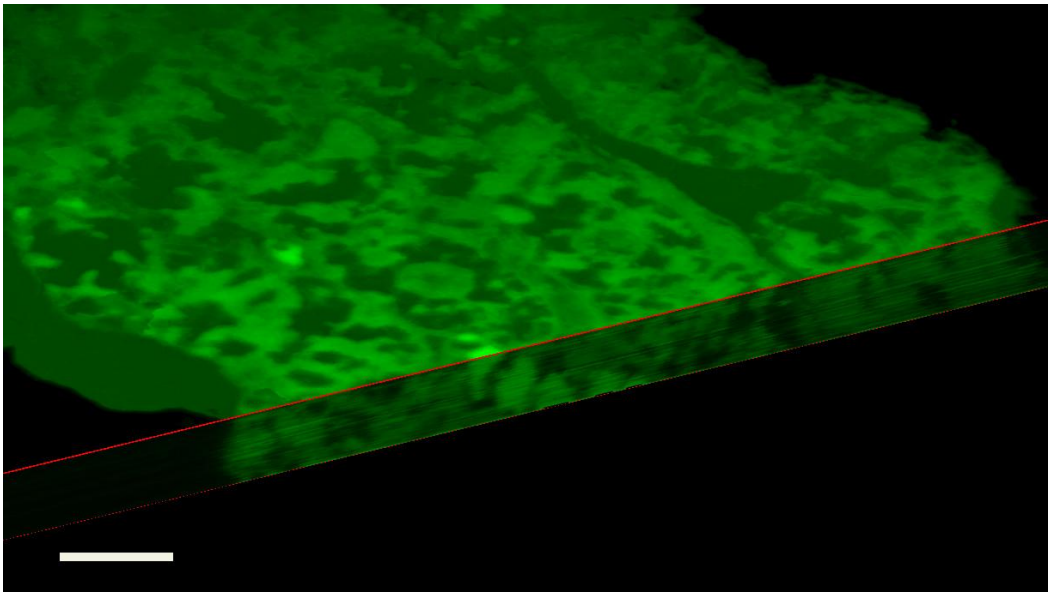


Рисунок 40 – Трехмерная реконструкция фрагмента ткани печени крысы на основе последовательных флуоресцентных изображений срезов, окрашивание FITC, объектив ×50 NA=0,75; 50 последовательных срезов толщиной 120 нм, размерный отрезок – 5 мкм

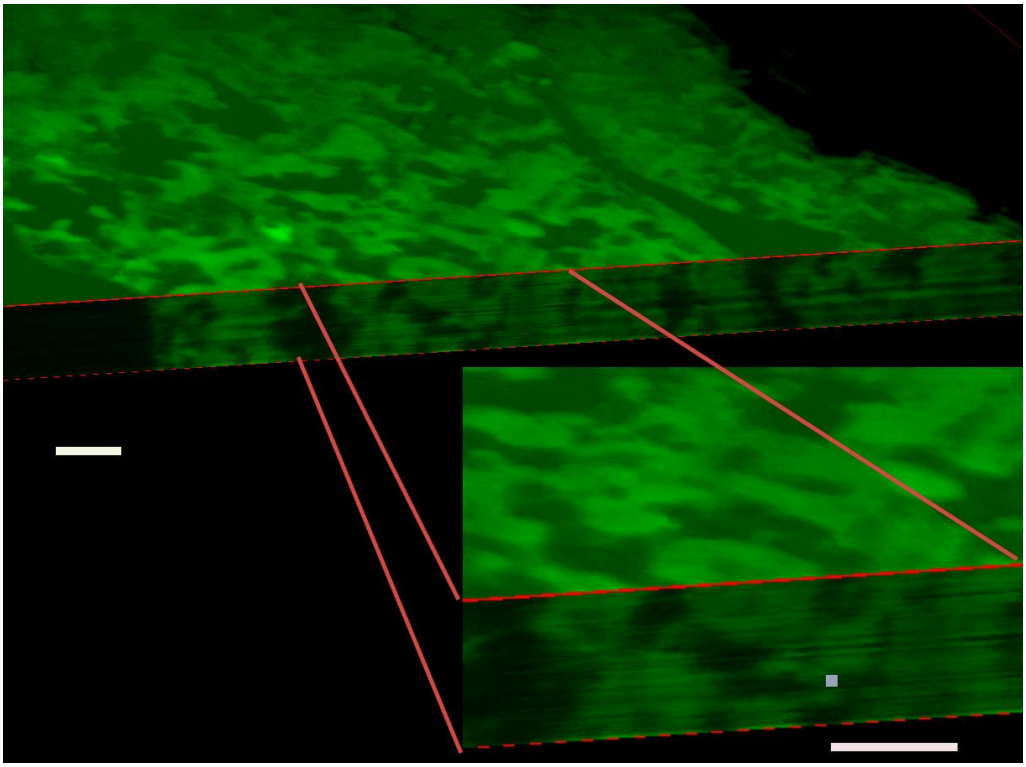


Рисунок 41 – Трехмерная реконструкция фрагмента ткани печени крысы на основе последовательных флуоресцентных изображений срезов, окрашивание FITC, объектив ×50 NA=0,75; 50 последовательных срезов толщиной 120 нм, размерные отрезки – 5 мкм; квадрат во вставке - 500 × 500 нм (порядка длины волны излучения)

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.

ГЛАВА 4. 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 [104, 105, 22], включая искусственные нервные проводники [106]. При этом важнейшими компонентами нейронных цепей и наиболее распространенными глиальными клетками в центральной нервной системе являются астроциты. Эти клетки отвечают за осуществление метаболической поддержки нейронов, поддержание гомеостаза, регуляцию мозгового капиллярного кровотока; нейрон-астроцитарные взаимодействия лежат в основе синаптической передачи и контроля синаптической пластичности, а также играют важную роль в процессах регенерации нервных тканей и иннервации [107,108,109]. Эффективность выполнения этих функций во многом зависит от морфологических характеристик астроцитов. Хорошо развитые протоплазматические астроциты содержат многочисленные отростки, имеющие сложную разветвленную форму. При нормальных физиологических процессах, таких как развитие и старение мозга, а также при патологических процессах, например, эпилепсии, болезни Альцгеймера, наблюдаются значительные изменения в нейрон-астроцитарных взаимодействиях. В частности, данные изменения регулируются отростками астроцитов [110]. Обнаружение и изучение этих микроструктур стало возможно только благодаря инновационным подходам в микроскопии. Критически важным для понимания и дальнейшего исследования этих структур является возможность разрешить ультратонкие детали самих астроцитов и областей их контактов с другими структурами [110]. Мелкие астроцитарные отростки имеют нано-размеры, что исключает использование световой микроскопии без

дополнительного маркирования ткани флуоресцентными метками и обуславливает необходимость использования методов микроскопии высокого разрешения [111]. Современные подходы позволяют сочетать различные методы визуализации и манипулирования тканями для получения трехмерной картины таких сложных структур, как астроциты [112,113,114].

Однако данные различных взаимодополняющих методов получения изображений с большим пространственным разрешением требуют разработки не только процедур накопления данных, но и методик идентификации элементов на изображениях, алгоритмов восстановления трехмерных структур.

4.1 Анализ трехмерных структур астроцитов в нервной ткани мыши

Для проведения экспериментов по исследованию астроцитарных морфологических особенностей была использована линия мышей 5xFAD. Данная линия характеризуется наличием нескольких мутаций в тех генах, которые связаны с болезнью Альцгеймера. Это тройная мутация в гене, кодирующем белок APP, и двойная мутация в гене пресенилина. Данная трансгенная линия воспроизводит основные признаки болезни Альцгеймера, такие как накопление бета-амилоидных бляшек, развитие глиоза, наличие нейродегенерации, явное нарушение памяти, сказывающееся на поведении животных, и может быть применимой в качестве модели болезни Альцгеймера. Ниже представлены результаты исследований нервной ткани мышей линии 5xFAD возрастом 3-4 месяца на досимптоматической стадии. Разработанные методы и результаты исследования морфологии астроцитов данной линии могут в дальнейшем применяться для выявления возможных терапевтических мишеней при разработке новых лекарственных препаратов.

В качестве заливочных сред для выполнения срезов биологических образцов ультрамикротомом, например, могут использоваться эпоксидные смолы или акрилатные среды. Для подготовки образцов печени крысы, меченых FITC, исследование которых описано в предыдущем разделе, использовалась

эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium, Sigma-Aldrich, Cat.№ 45345), смешиваемая с равным по массе количеством отвердителя заливочной среды (додеценилянтарный ангидрид DDSA) и 4% по массе 2,4,6-трис-(диметиламинометил)-фенола (DMP-30). Однако данная эпоксидная среда обладает заметной автофлуоресценцией в видимом диапазоне (см. рисунок 42), что может помешать получать качественные флуоресцентные изображения меченых областей образца с меньшей концентрацией флуорофоров.

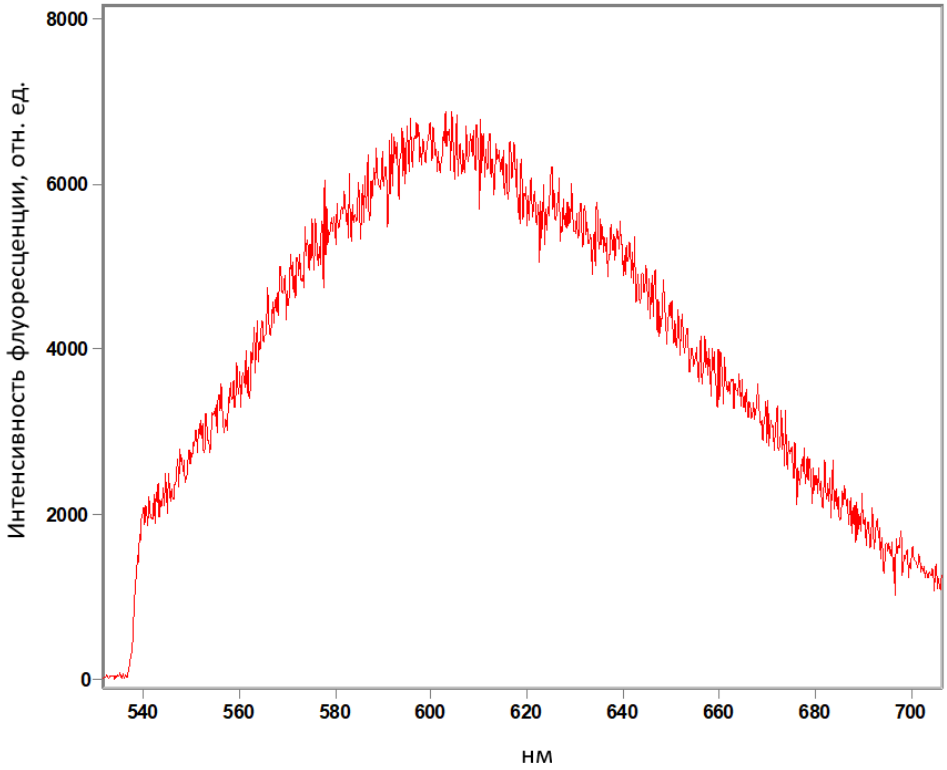


Рисунок 42 – Спектр флуоресценции эпоксидной заливочной среды. Условия получения спектра: лазер 532 нм, мощность 2 мВт, объектив с числовой апертурой 0,95 (воздушный), время накопления 0,3 сек

Чтобы исключить фоновую засветку, мы выбрали для заливки образцов нервной ткани мыши акрилатную заливочную среду Lowicryl HM20, которая не обладает автофлуоресценцией. Данная среда является трехкомпонентной (Сшиватель, Мономер, Инициатор), и твердость получаемых блоков зависит от количества сшивающего агента, добавляемого в смесь мономера и инициатора (чем больше концентрация сшивающего агента, тем выше твердость блоков). Для снижения хрупкости блоков, которая может препятствовать получению

качественных срезов, варьировали концентрацию сшивающего агента. В итоге было определено оптимальное количество сшивающего агента для HM20, которое в нашем случае составило 5 мас.%. Получившиеся образцы хорошо полимеризовались, а готовые блоки при подготовке к измерениям не крошились и качественно срезались алмазным ножом ультрамикротома. Детальные протоколы получения и подготовки образцов нервной ткани мыши приведены в разделе 2.15.

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 маркёра астроцитарного цитоскелета [13, 115]. 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. В результате окрашивания на GFAP на полученных флуоресцентных изображениях детектируются вытянутые структуры иногда с нечетко прокрашенным центром (ядро астроцита, как правило, не прокрашивается), что позволяет применять его для однозначного сегментирования тела астроцита на полученном флуоресцентном изображении.

На рисунке 43 приведено обзорное флуоресцентное изображение блокфейса образца ткани радиального слоя гиппокампа мыши, окрашенного на GFAP и залитого в среду Lowicryl, после среза ультрамикротомом, полученное при помощи системы флуоресцентной оптической нанотомографии с использованием объектива Mitutoyo M Plan Apo ×10 (числовая апертура 0.28). Данное изображение позволяет выбрать область интереса со значительным количеством астроцитов на поверхности (находящихся в фокальной плоскости) и привести срезаемую и исследуемую площадь блокфейса образца в соответствие с данной выбранной областью.

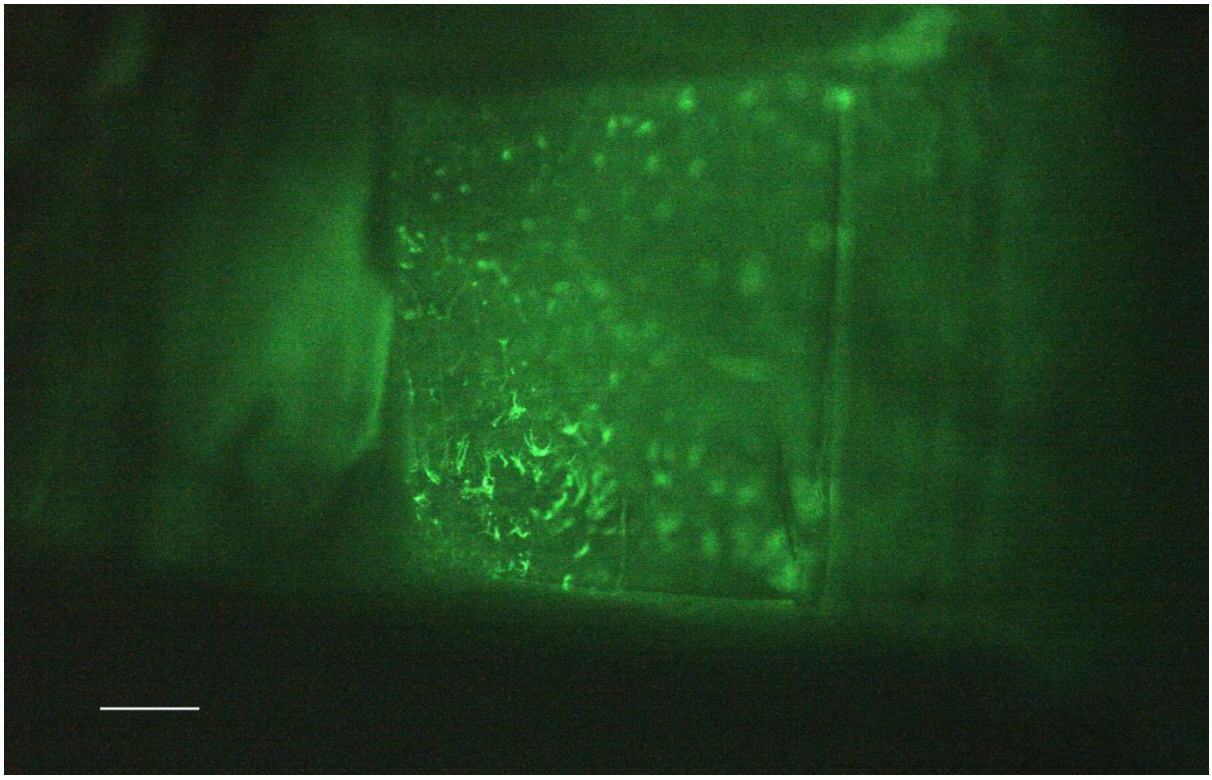


Рисунок 43 – Обзорное изображение блокфейса образца ткани гиппокампа мыши, окрашенного на GFAP и залитого в среду Lowicryl, объектив ×10, размерный отрезок 100 мкм

Следующим шагом являлось проведение трехмерной реконструкции и анализа полученных с помощью метода *in situ* оптической нанотомографии серий флуоресцентных изображений пространственного распределения GFAP в астроцитах нервной ткани. На рисунке 44 показано одно из исходных флуоресцентных изображений среза нервной ткани толщиной 150 нм в ванночке ножа ультрамикротома вблизи кромки лезвия, полученное с использованием объектива Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected×50, камеры Axiocam 305 color (Zeiss, Германия) и программного пакета ZEN 2.3 (Zeiss, Германия). Увеличение и чувствительность оптической системы в данном случае полностью соответствует условиям, в которых выполнялась трехмерная реконструкция фрагмента ткани печени крысы (раздел 3.3). В центральной области среза мы видим ряд астроцитарных отростков. Пиксельный размер получаемых изображений составляет 2464×2056, что позволяет выполнять реконструкцию в области интереса, не теряя в разрешении.

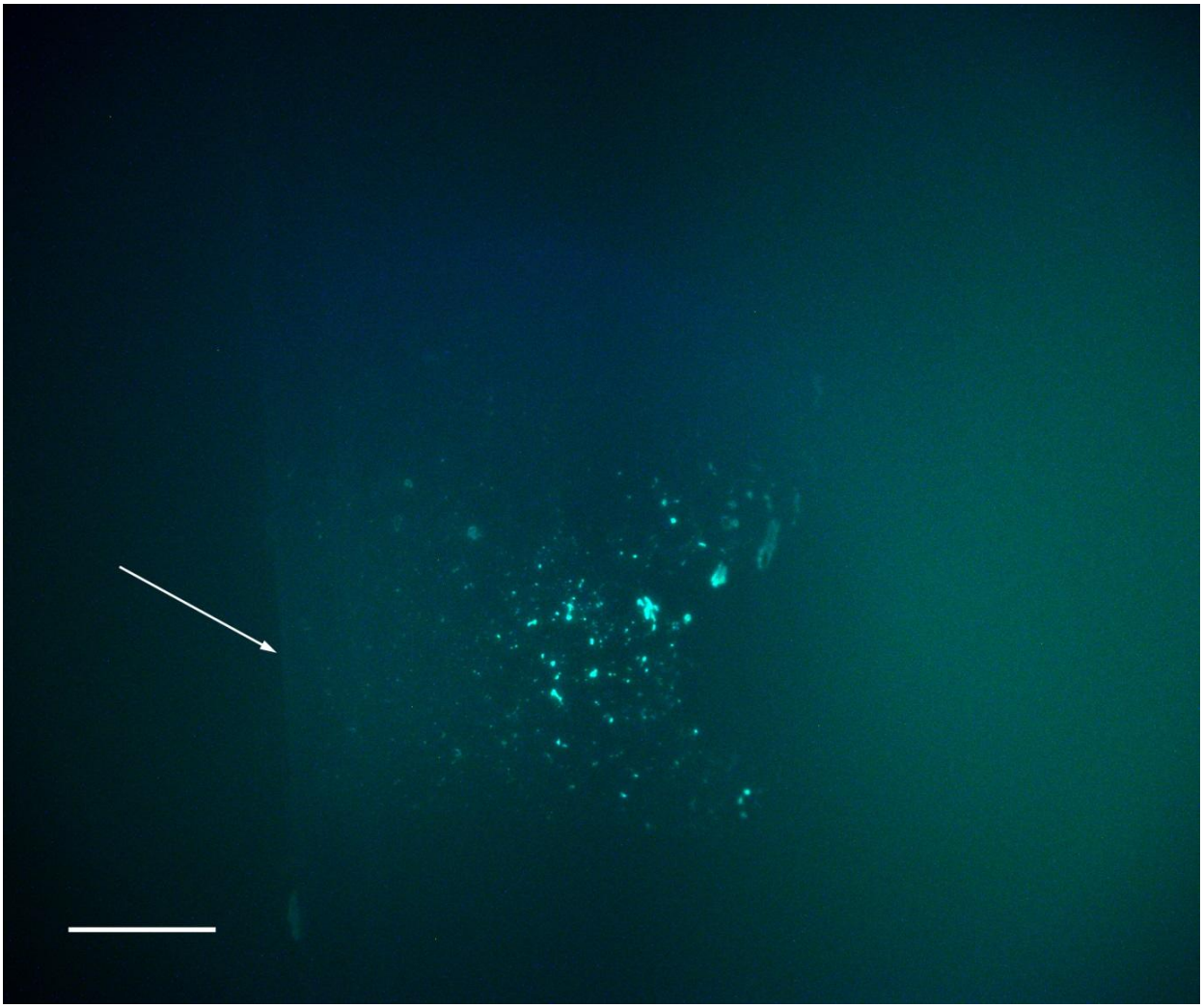


Рисунок 44 – Флуоресцентное изображение среза нервной ткани окрашенной на GFAP, размерный отрезок 50 мкм. Стрелкой указана кромка лезвия алмазного ножа

На рисунке 45 приведено кадрированное флуоресцентное изображение области интереса размером 419×363 пиксела, контрастированное и переведенное в черно-белый режим для упрощения сегментации отростков астроцитов. Это одно из 62 последовательных изображений данной серии, полученных на срезах толщиной 150 нм, использованное для трехмерной реконструкции.

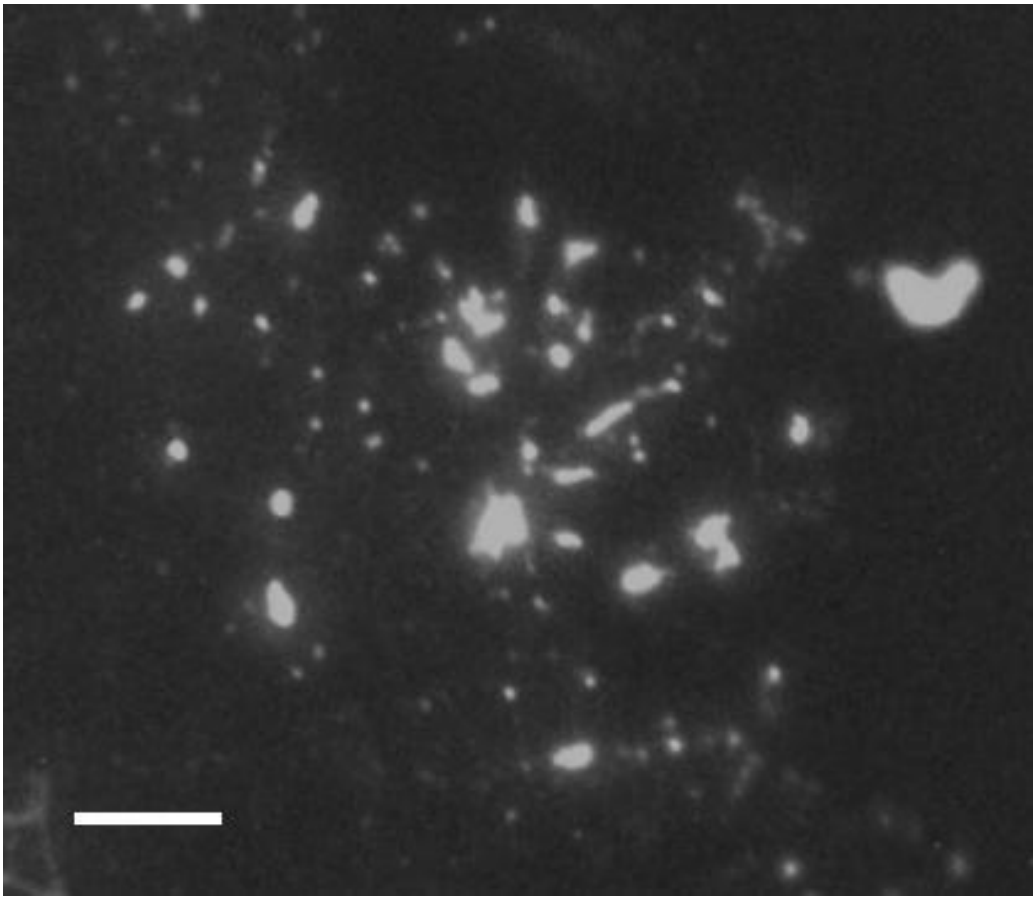


Рисунок 45 – Флуоресцентное изображение области интереса (419×363 пиксела) на срезе нервной ткани. Размерный отрезок 10 мкм

Полученная в результате интеграции данной изображений трехмерная реконструкция в объеме 39270 мкм^3 показана на рисунке 46. 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.

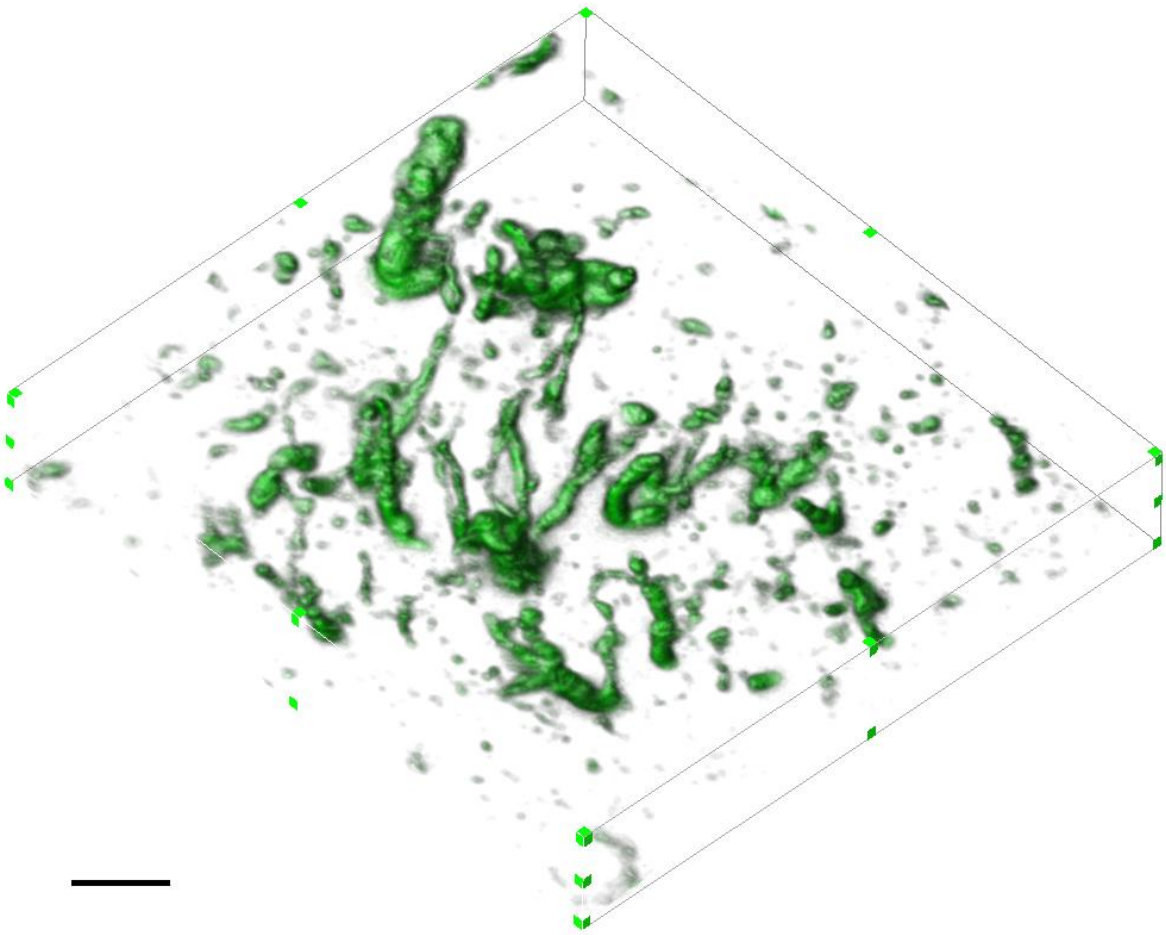


Рисунок 46 – Трехмерная реконструкция распределения астроцитарных участков в объеме (окрашивание на GFAP), 62 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем 69,8×60,5×9,3 мкм (419×363×62 пиксела), размерный отрезок 10 мкм

Используемый пакет программного обеспечения позволил выполнить сегментацию отдельных астроцитов и отростков и вычислить некоторые их интегральные количественные характеристики. Трехмерная реконструкция с выделенными изоповерхностями, соответствующими отдельным трехмерным объектам, представлена на рисунке 47.

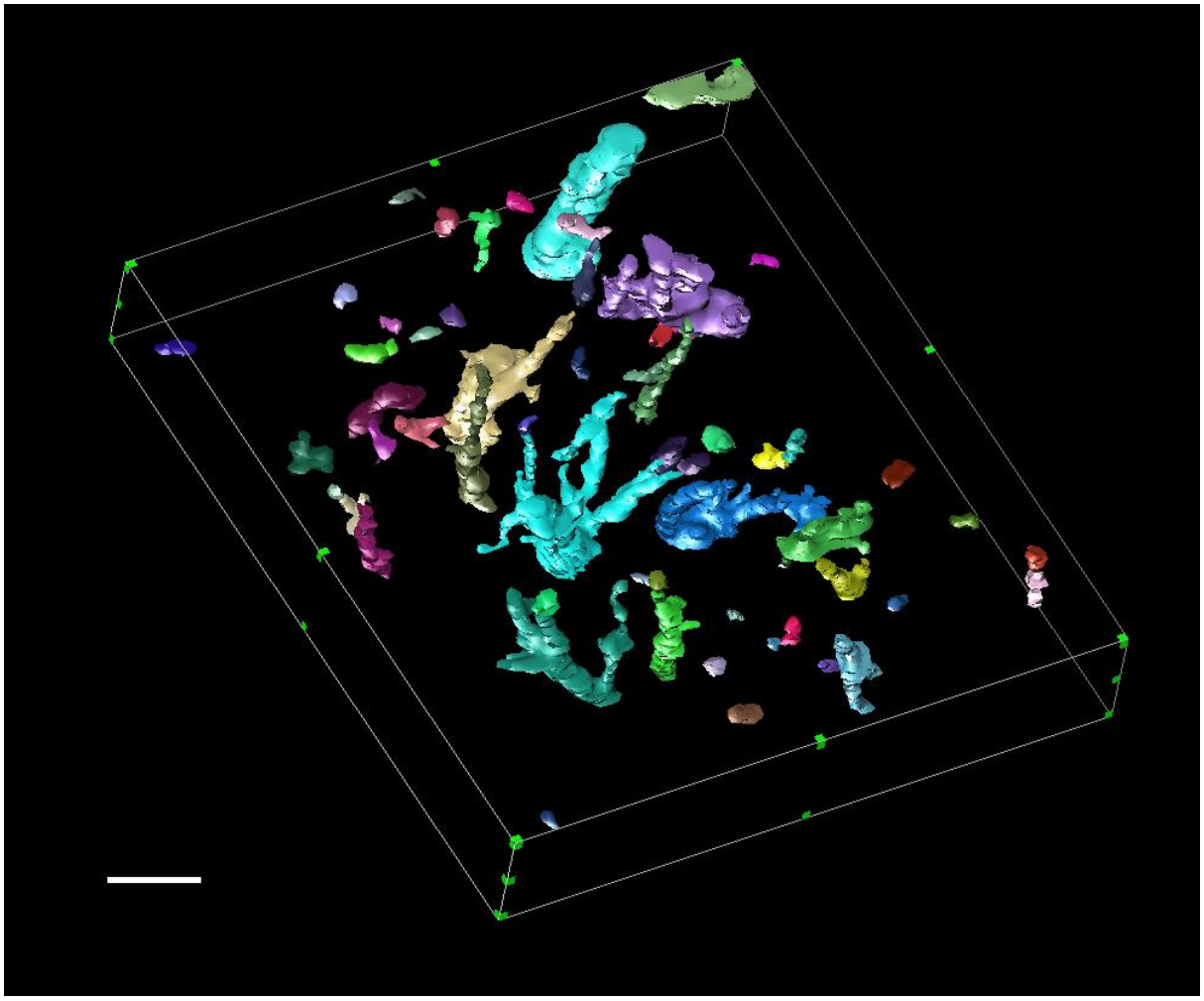


Рисунок 47 – Трехмерная реконструкция распределения астроцитарных участков в объеме с выделенными изоповерхностями, соответствующими отдельным трехмерным объектам, 62 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем 69,8×60,5×9,3 мкм (419×363×62 пиксела), размерный отрезок 10 мкм

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 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), полученных с использованием метода серийной сканирующей электронной микроскопии блокфейса (см. раздел 1.8). Приведенная в работе [116] оценка среднего отношения площади поверхности к объему астроцитов в нервной ткани мыши составляет 4,39 ± 0,3 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 [115].

Необходимо отметить, что данные величины, особенно V_f, чрезвычайно чувствительны к порогу сегментирования астроцитов (threshold) – уровню относительной интенсивности флуоресценции, по которому производится отсечка астроцитарных участков на изображениях, поэтому вычисление адекватных величин данных параметров требует аккуратного подхода к заданию пороговых значений. Также проанализированный нами объем области интереса значительно меньше изученного в упоминаемых работах, поэтому возможны статистические флуктуации полученных результатов.

Однако более интересным направлением с точки зрения задач настоящего исследования является не накопление большого объема данных для статистической обработки, а изучение возможностей разрабатываемой технологии. В частности, представленные выше результаты флуоресцентных измерений и трехмерной реконструкции свидетельствуют о необходимости повышения увеличения и разрешения оптической системы для выполнения трехмерных реконструкций одиночных астроцитов.

Использование для получения флуоресцентных изображений камеры Sentech STC-MCA5MUSB3 (Omron Sentech Co. Ltd., Япония) с меньшим, чем у камеры Axiocam 305 color (Zeiss, Германия), размером матрицы, позволяет улучшить пиксельное разрешение изображений в 1.66 раз, до величины 100 нм на пиксел. Несмотря на более низкую чувствительность и отсутствие возможностей программного увеличения глубины фокуса в этом случае, использование данной конфигурации позволяет повысить эффективное увеличение системы для получения трехмерных реконструкций отдельных астроцитов.

На рисунках 48 и 49 показаны полученные флуоресцентные изображения отдельных астроцитов. Изображение на рисунке 49 кадрировано с большим увеличением.

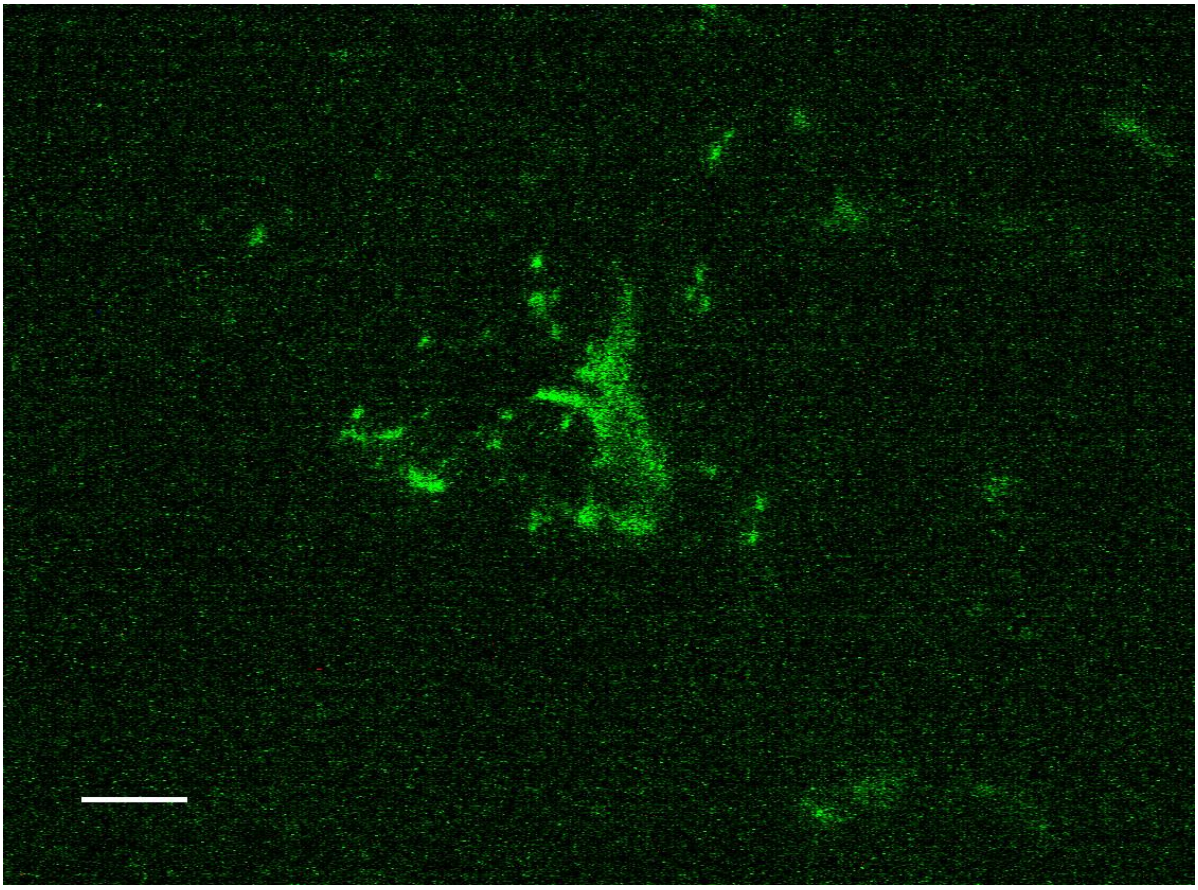


Рисунок 48 – Флуоресцентное изображение области интереса, содержащей астроцит (1125×831 пиксел) на срезе нервной ткани. Размерный отрезок 10 мкм

Наблюдаемые на приведенных изображениях темные, не прокрашенные на GFAP округлые области внутри астроцитов, скорее всего, соответствуют клеточным ядрам. Необходимо отметить, что полученные отдельные двумерные флуоресцентные изображения срезов из полученных серий не дают полного представления о трехмерной структуре отростков, что подчеркивает важность нанотомографических исследований нервных тканей.

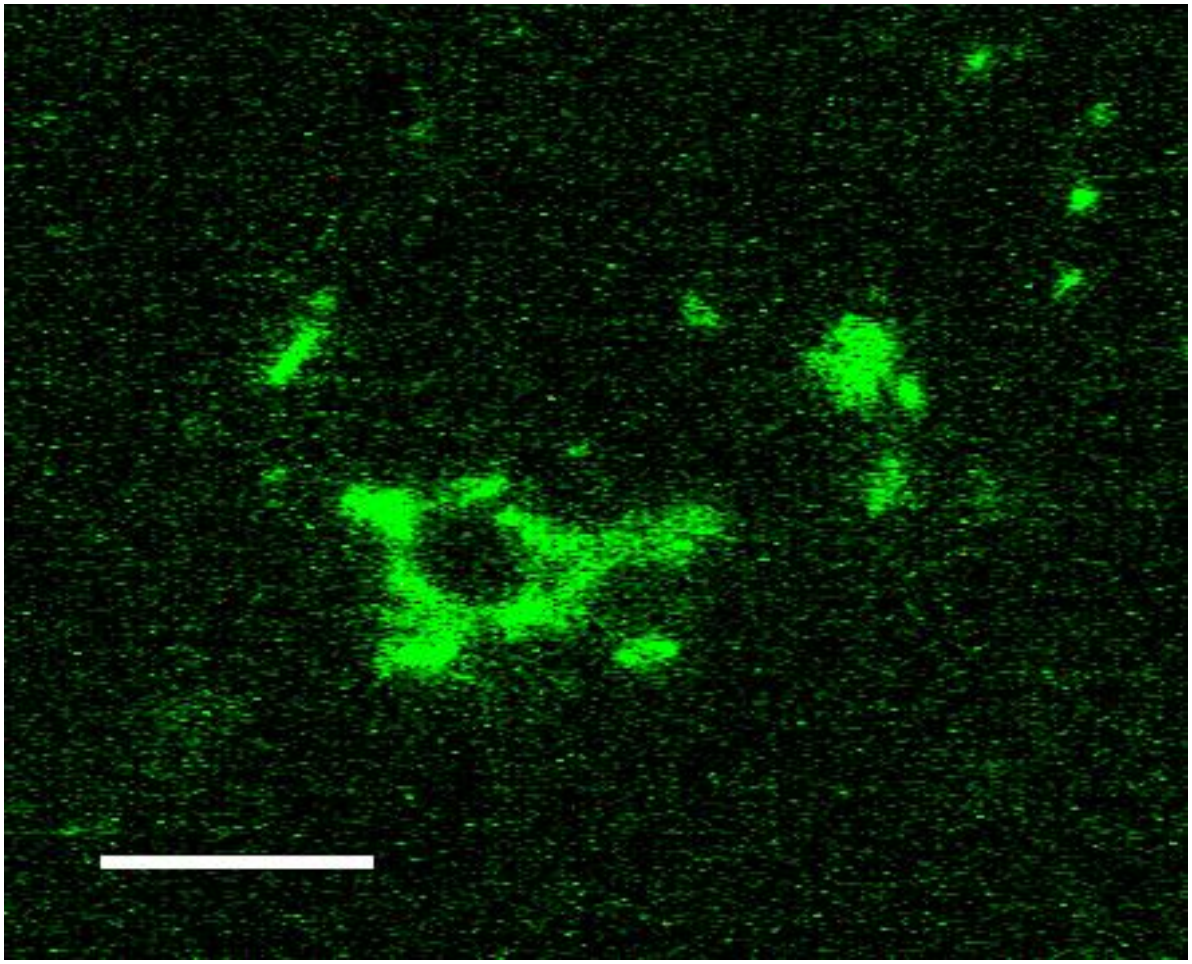


Рисунок 49 – Флуоресцентное изображение области интереса, содержащей астроцит (442×357 пиксел) на срезе нервной ткани. Размерный отрезок 10 мкм

На рисунках 50 и 51 представлены трехмерные реконструкции астроцитов, полученные на основе серий из 34 и 60 флуоресцентных изображений последовательных срезов соответственно. На приведенных реконструкциях видно, что разработанный подход позволяет реконструировать форму отростков астроцитов в трехмерном пространстве.

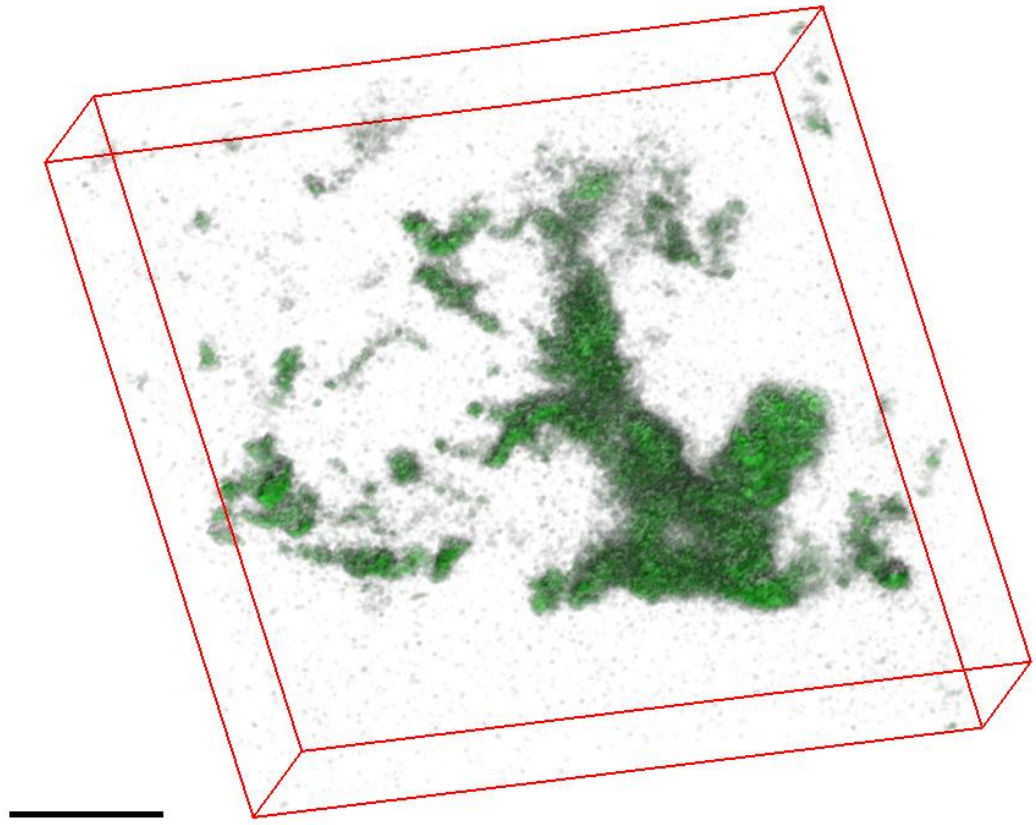


Рисунок 50 – Трехмерная реконструкция распределения астроцитарных участков в объеме (окрашивание на GFAP), 34 среза толщиной 150 нм, реконструированный объем 47,1×43,0×5,1 мкм (471×430×34 пиксела), размерный отрезок 10 мкм

Так как в данном случае флуоресцентный сигнал детектируется от сверхтонких срезов, толщина которых гораздо меньше, чем глубина резкости объектива, то отношение сигнал/шум может быть ниже, чем при обычной флуоресцентной микроскопии. Дополнительная сегментация и построение изоповерхностей при помощи программного обеспечения позволяет построить трехмерные модели отдельных астроцитов.

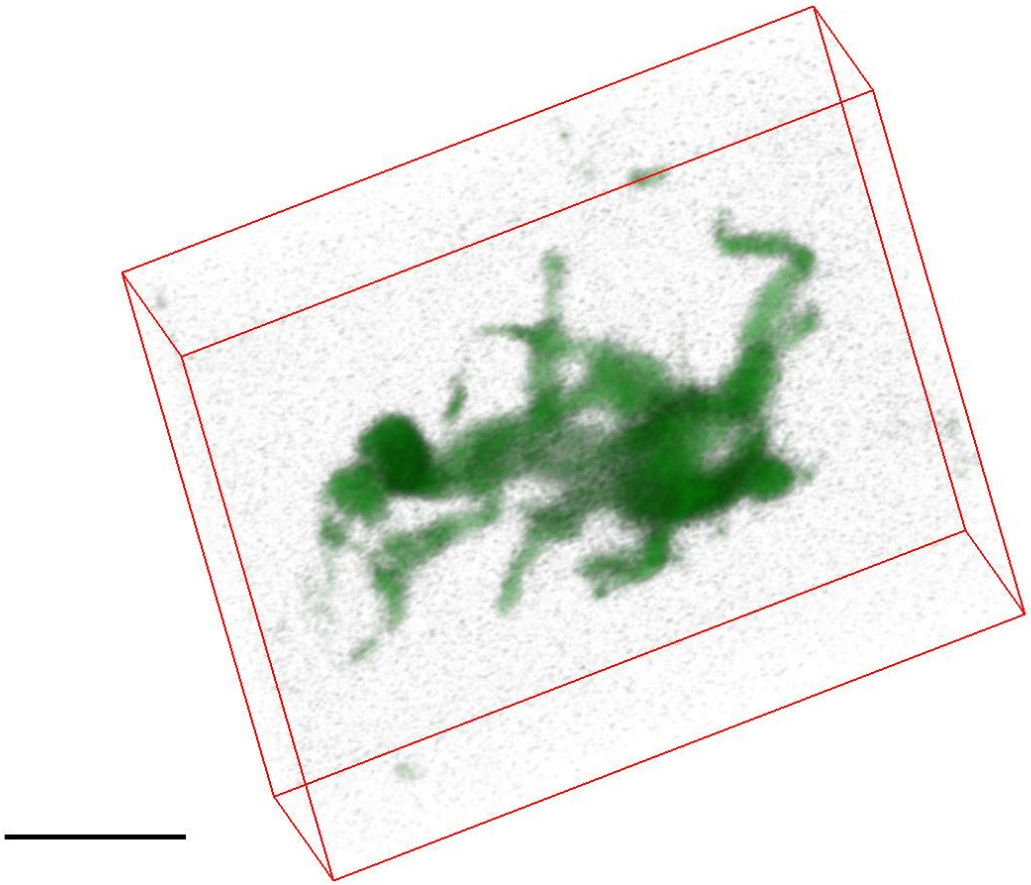


Рисунок 51 – Трехмерная реконструкция астроцита (окрашивание на GFAP), 60 срезов толщиной 150 нм, реконструированный объем 33,9×28,4×9,0 мкм (339×284×90 пикселов), размерный отрезок 10 мкм

На рисунке 52 представлена полученная трехмерная изоповерхность астроцита, реконструкция которого показана на рисунке 51. Особый интерес представляют возможности томографического реконструирования наиболее тонких отростков астроцита, указанных на рисунке 52 стрелкой. На рисунке 53 показано также сегментированное увеличенное 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.

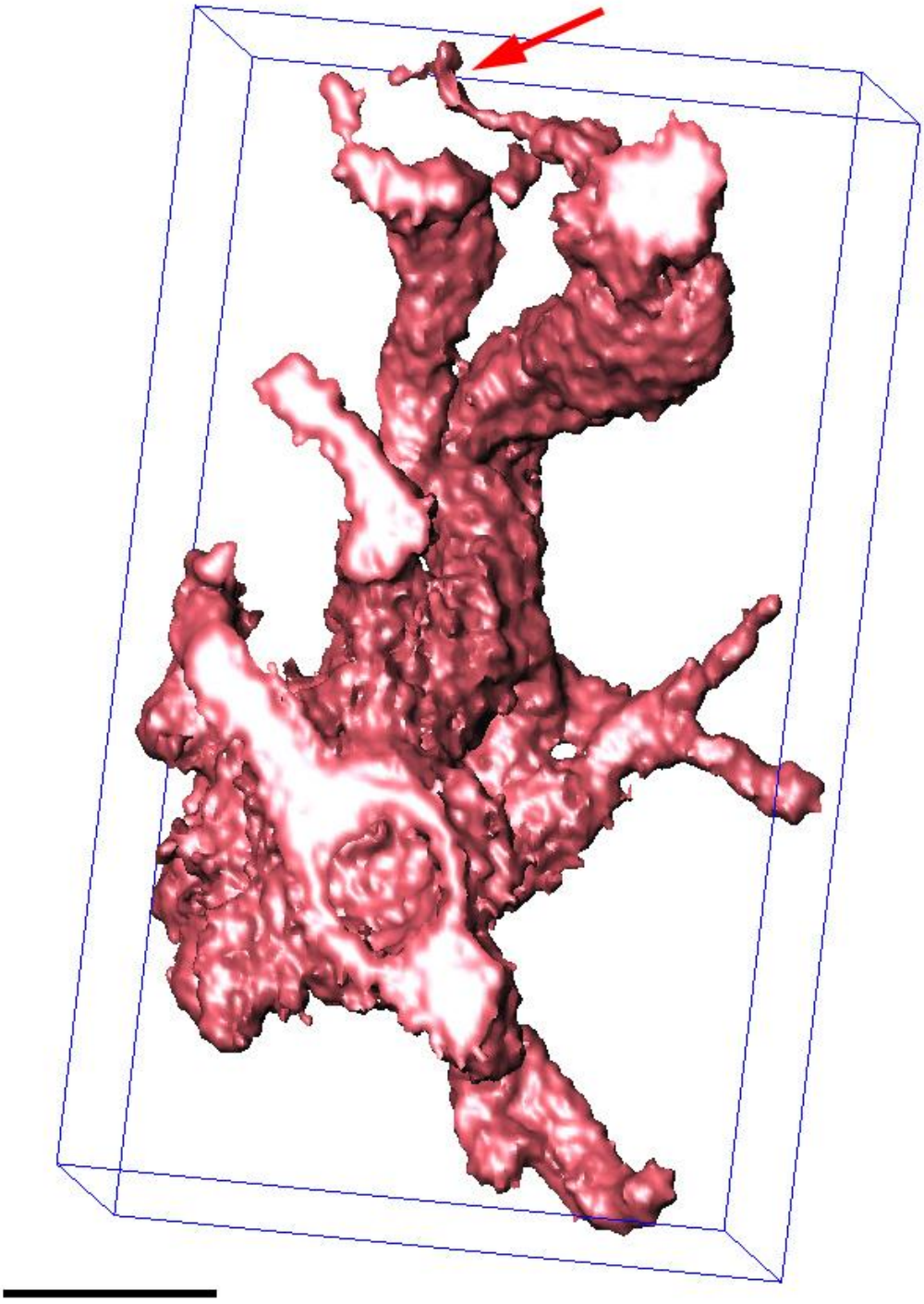


Рисунок 52 – Трехмерная изоповерхность астроцита в объеме 27,2×15,7×9,0 мкм (272×157×90 пикселов), размерный отрезок 5 мкм

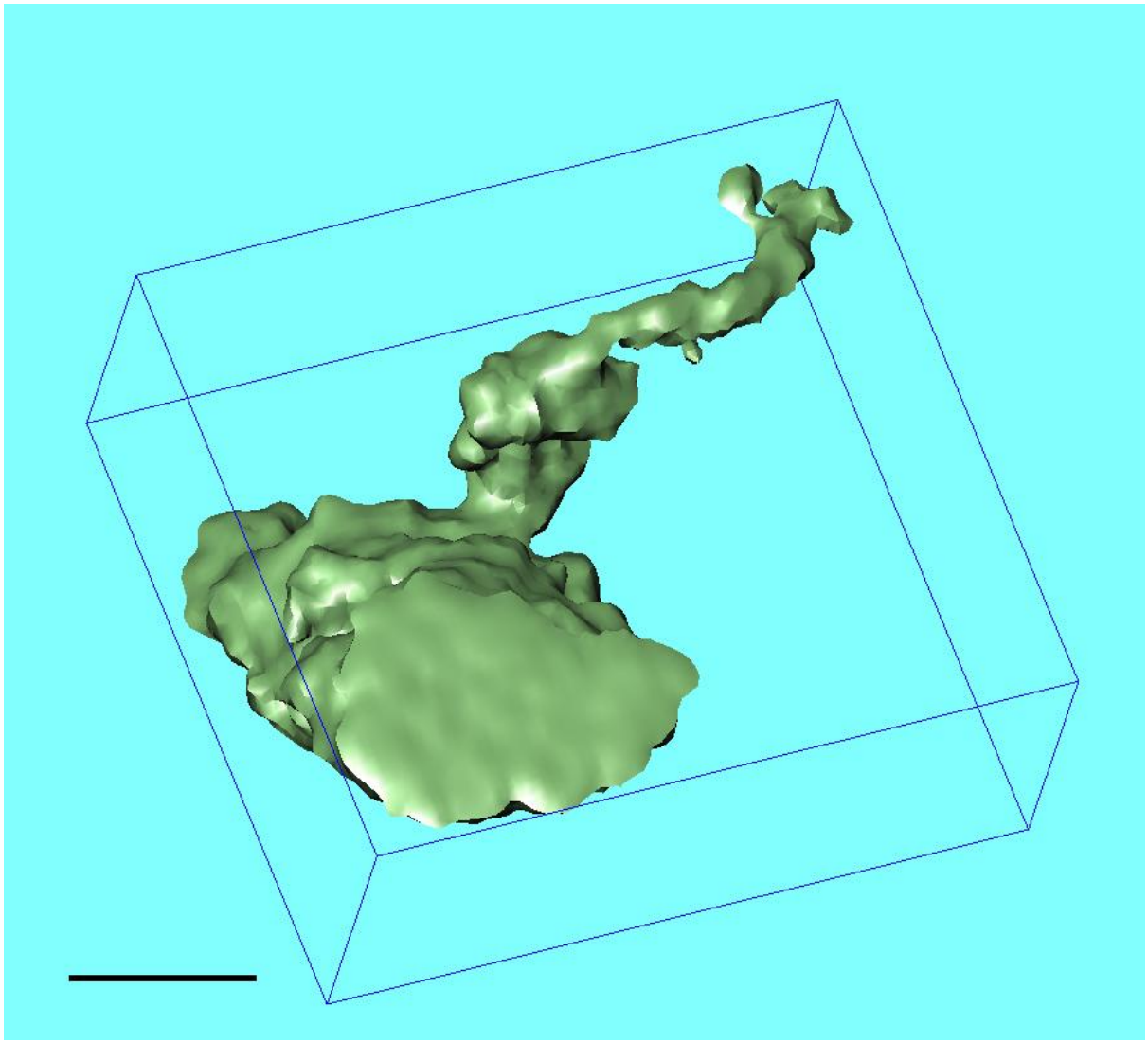


Рисунок 53 – Трехмерная изоповерхность участка астроцита с тонким отростком в объеме 7,9×7,2×3,0 мкм (79×72×30 пикселов), размерный отрезок 2 мкм

На рисунке 54 представлено продольное сечение 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.

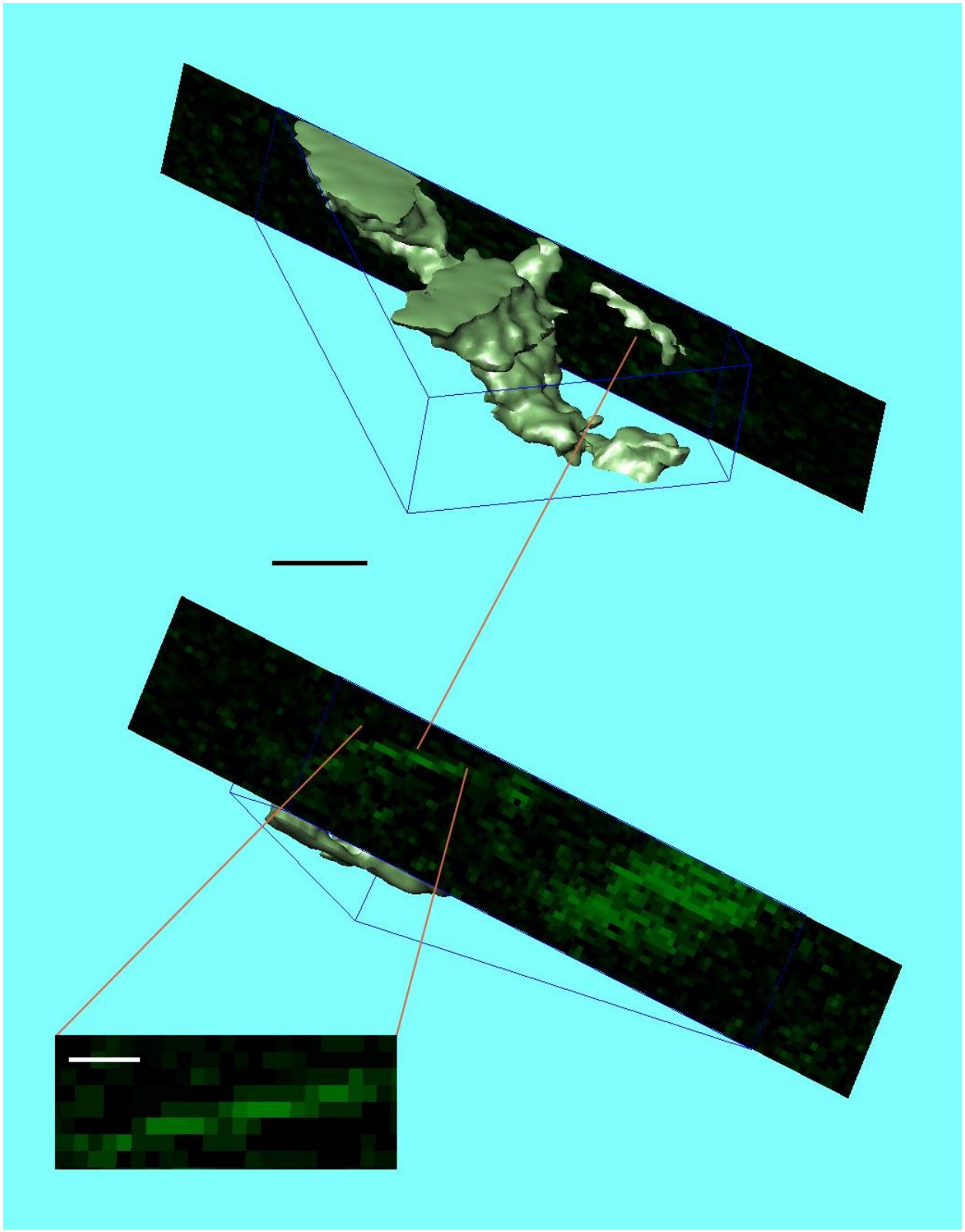


Рисунок 54 – Продольное сечение трехмерной реконструкции тонкого отростка астроцита наклонной плоскостью, размерный отрезок 2 мкм, размерный отрезок на вставке – 500 нм

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.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ МИКРО- И НАНОСТРУКТУР ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОКАПСУЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ЗАДАЧ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕРАНОСТИКИ

Флуоресцентная визуализация широко используется для исследования и наблюдения за переносом, распределением и взаимодействием процессов в отдельных клетках, тканях и целом организме за счет высокой чувствительности, простоты и возможности обработки полученных данных в реальном времени. Анализируемые образцы должны обладать сами по себе отчетливой, яркой и стабильной фотолюминесценций, либо помечаться флуорофорами. Полупроводниковые нанокристаллы, называемые квантовыми точками (КТ), доказывают свою эффективность в качестве флуоресцентных нанозондов, обладающих множественными преимуществами в сравнении с органическими красителями [117,118,119].

Квантовые точки являются привлекательными нанометками для флуоресцентного маркирования, оптического кодирования при доставке лекарств [120], систем обнаружения клеток благодаря таким уникальным фотофизическим свойствам, как широкий спектр поглощения, узкий, симметричный, регулируемый по размеру спектр стабильной фотолюминисценции [121], высокий квантовый выход, огромные двухфотонные коэффициенты экстинкции и высокая фотостабильность [122,123]. Время жизни флуоресценции квантовых точек значительно выше, чем у обычных органических красителей, что обеспечивает возможность *in vitro* и *in vivo* визуализации [124,125]. Вместе с тем вредный химический состав, нестабильные коллоидные свойства существенно ограничивают использование квантовых частиц в качестве диагностических и контрастирующих агентов, а так же для доставки лекарственных веществ [126,127]. Инкапсуляция наночастиц в микро- и наноносители снижает возможную токсичность благодаря полимерному покрытию, которое ограничивает их непосредственный контакт с биологическими системами, в том числе и на клеточном уровне [128,129].

В качестве многофункциональных тераностических инструментов для использования в контролируемых системах доставки лекарств, сенсорах, диагностике и биоимиджинге разработаны микрокапсулы на основе полиэлектролитов [130,131,132].

Подобные микрокапсулы могут использоваться в задачах регенеративной медицины [134] для адресной доставки трансплантируемых клеток [134], лекарственных препаратов (в том числе противоопухолевых препаратов [135] и антибиотиков [136]), ростовых факторов, в том числе стимулирующих ангиогенез при регенерации тканей [137], и невирусной доставки генетических векторов, в том числе для задач тканевой инженерии и регенерации костной ткани [138,139].

Послойное полимерное покрытие твердого ядра с его последующим растворением позволяет получить микрокапсулы с адаптируемым размером, формой и поверхностными свойствами. Полимерная оболочка или внутренняя часть этих микрокапсул могут быть функционализированы флуоресцентными красителями, лекарствами и антителами, а также полупроводниковыми, металлическими (плазмонными) или магнитными наночастицами (МНЧ) [140,141]. Интеграция плазмонных, флуоресцентных и/или магнитных наночастиц в оболочку микрокапсулы определяет ее чувствительность к внешним триггерам, таким как свет, микроволны или магнитные поля, что, в свою очередь, обеспечивает транспортировку, визуализацию и контролируемое высвобождение содержимого микрокапсул [142,143,144]. Кодированные квантовыми точками полиэлектролитные микрокапсулы считаются перспективными биосовместимыми инструментами для визуализации [145]. Встраивание квантовых точек в полиэлектролитную оболочку дополнительно улучшает коллоидную стабильность и фотостабильность, делает их еще более устойчивыми к фотообесцвечиванию из-за пространственного ограничения и их изоляции от микросреды [146,147].

Одновременное кодирование микрокапсул квантовыми точками и магнитными наночастицами позволяет визуализировать управляемую магнитным полем транспортировку кодированных микрокапсул [148,149], что определяет высокий потенциал использования таких систем в дистанционно управляемом

биоимиджинге и в качестве агентов доставки лекарств [150]. Чтобы являться эффективными агентами для длительного биоимиджинга, микрокапсулы с квантовыми точками и магнитными наночастицами должны обеспечивать стабильную количественно измеримую фотолюминесценцию в условиях постоянного облучения. Однако появление электрически заряженных полимерных фрагментов в приготовленной послойно полиэлектролитной оболочке микрокапсулы, содержащей квантовые точки и магнитные наночастицы, приводит к фотоиндуцированному КТ-полимер или КТ-МНЧ переносу заряда. Перенос заряда провоцирует изменение светового излучения квантовых точек, которое наблюдается как «фотозатемнение» или «фотоосветление» [151,152,153]. Оптическая стабильность квантовых точек на несколько порядков выше, чем у органических красителей, однако их фотолюминесцентное излучение при световом облучении зависит от условий возбуждения и может изменяться в зависимости от взаимодействия с зарядами окружающей среды. Эти фотоиндуцированные эффекты на уровне отдельной квантовой точки называются фотолюминесцентной прерывистостью (также известной как мерцание или мигание) и являются взаимно обратимыми, так как связаны с миграцией возбужденных носителей заряда из ядра КТ в состояние поверхностной ловушки и наоборот [154].

В ходе выполнения работы было проанализировано влияние структурных и физико-химические параметров микрокапсул, дуально кодируемых с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц, включенных в послойно сформированную полиэлектролитную оболочку микрокапсул, на стабильность и фотолюминесцентные свойства. Были использованы панели 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 [155,156].

5.1 Послойная сборка полиэлектролитных микрокапсул и их кодирование с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц

Приготовленные водорастворимые КТ, солюбилизированные с карбокси- и сульфгидрильными концевыми производными полиэтиленгликоля (ПЭГ), характеризуются максимальной флуоресценцией при 593 нм и узким распределением гидродинамического диаметра (ГДД) (рисунок 55). Водорастворимые КТ обладают низким индексом полидисперсности (0.25 ± 0.02), который указывает на формирование гомогенной группы коллоидных наночастиц после процедуры очистки и солюбилизации. Магнитные наночастицы, использованные в исследовании, имеют больший размер (10.91 ± 1.21 нм), чем средний физический диаметр квантовых частиц (6.37 ± 0.50 нм), определяемый с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (рисунок 56), тогда как их средний гидродинамический диаметр, измеренный динамическим рассеянием света (17.83 ± 0.42 нм), был аналогичен водорастворимым квантовым частицам (16.49 ± 0.72 нм).

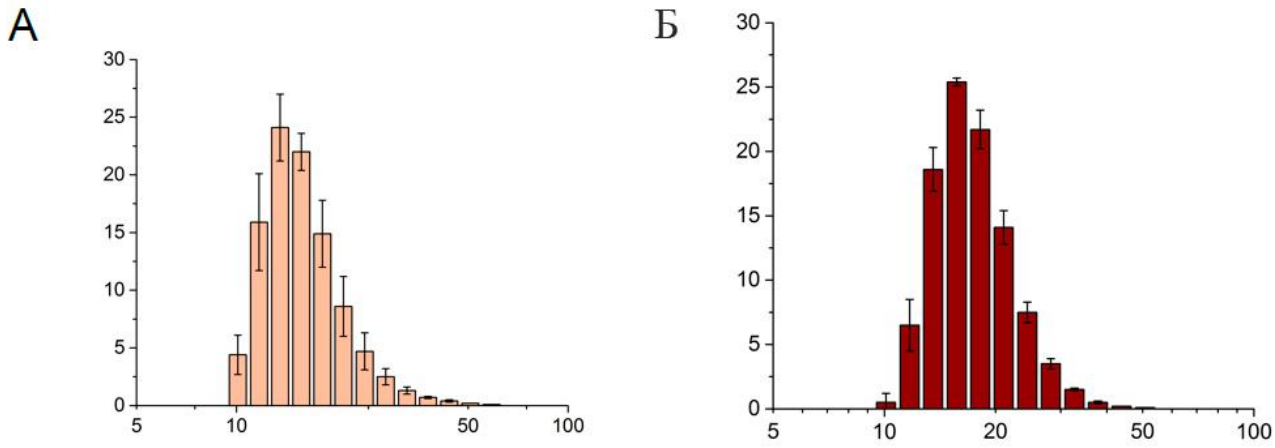


Рисунок 55 – Распределения гидродинамических диаметров квантовых точек и магнитных наночастиц. (А) Водорастворимые квантовые точки (ядро/оболочка CdSe/ZnS) в водной среде; (Б) магнитные наночастицы на основе оксидов железа (II, III) в водной среде

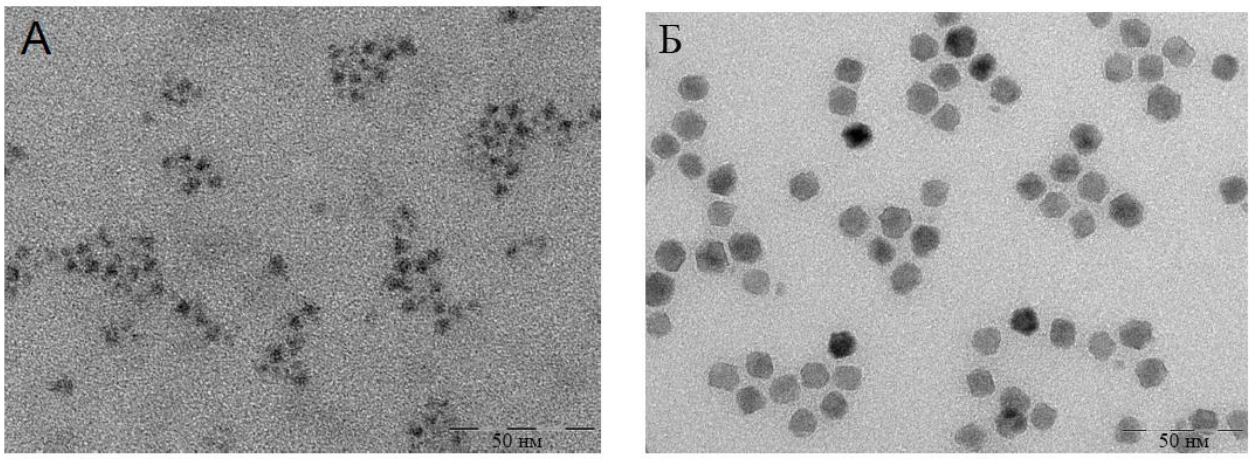


Рисунок 56 – Изображения, синтезированных квантовых точек с ядром/оболочкой CdSe/ZnS (А) и магнитных наночастиц из карбоксилированного оксида железа (II, III) (Б), полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Масштабный отрезок 50 нм

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 [157]. 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 (рисунок 57А).

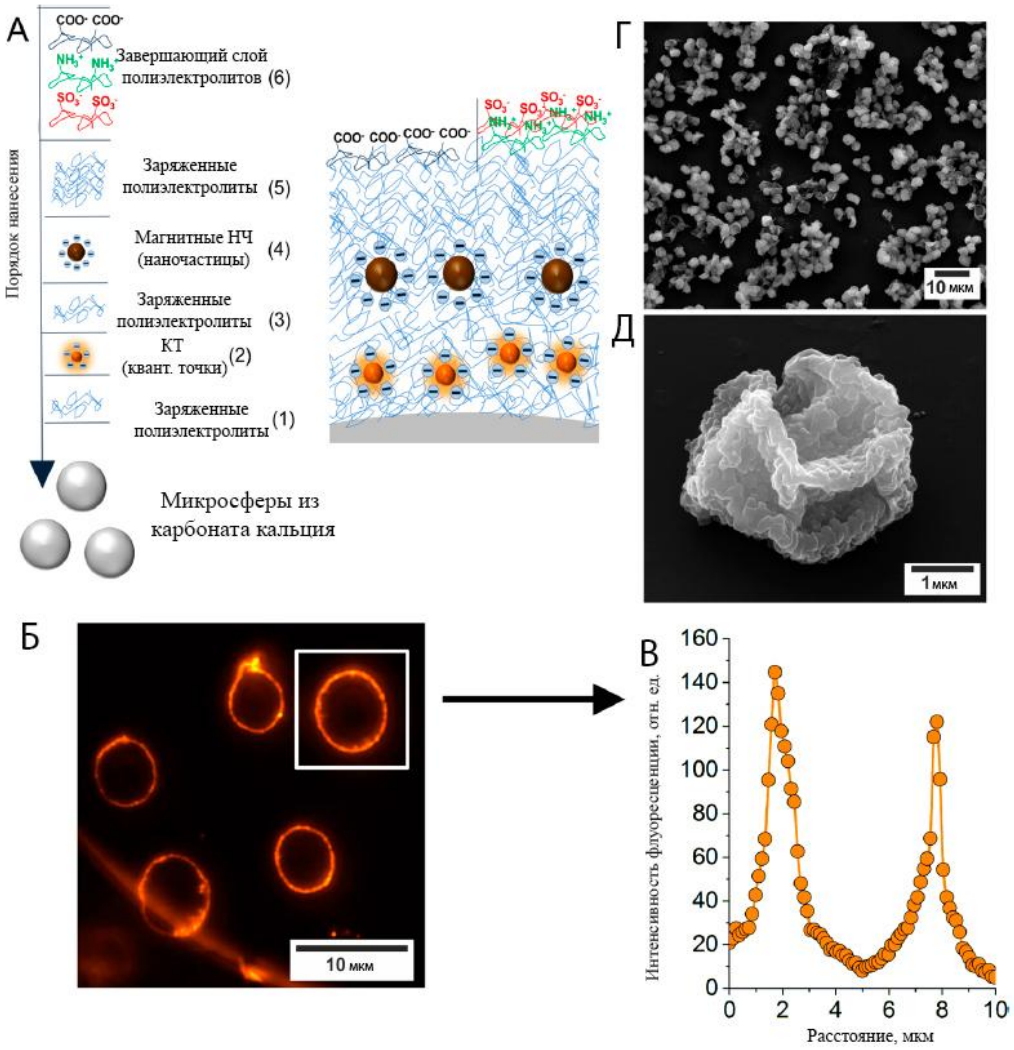


Рисунок 57 – Дизайн и характеристики полиэлектролитных микрокапсул, кодированных квантовыми точками и магнитными наночастицами. (А) Схематическое изображение послойного осаждения различных составляющих микрокапсул (слева) и поперечный вид структуры микрокапсулы (справа). (Б) Изображение срезов микрокапсул с помощью флуоресцентной микроскопии. (В) Интенсивность фотолюминесценции выбранной микрокапсулы. (Г) Изображение с помощью сканирующей электронной микроскопии микрокапсул, кодированных с помощью квантовых точкек и магнитных наночастиц. (Д) Электронно-микроскопическое изображение одной микрокапсулы.

Впоследствии мягкие микрокапсулы с полой конструкцией изготовлены путем растворения ядра карбоната кальция с использованием ЭДТА в качестве комплексообразователя с кальцием [158]. Флуоресцентное мечение микрокапсул с КТ во время послойной самосборки («слой-за-слоем») в среднем включает (8,9 ± 0,1) × 10^6 КТ на микрокапсулу.

Срезы микрокапсул, кодированных наночастицами, под объективом флуоресцентного микроскопа представляют собой объекты кольцевидной формы с полой структурой и размерами от 3,2 до 6,9 мкм, демонстрирующие яркую флуоресценцию по окружности (рисунок 57Б, рисунок 58). Спектр флуоресценции микрокапсул имеет один максимум при 595 нм, соответствующий водорастворимым КТ; смещения максимума флуоресценции из-за наличия магнитных наночастиц в оболочке не наблюдалось (рисунок 59). Анализ профиля интенсивности выбранной оболочки микрокапсулы выявил два максимальных значения интенсивности сигнала, соответствующие крайним точкам диаметра микрокапсулы (рисунок 57В). Наблюдаемый спад сигнала флуоресценции между максимальными значениями в профиле интенсивности и внутренней полой областью микрокапсул на флуоресцентном изображении эффективно выявляет иммобилизацию квантовых точек внутри полиэлектролитной оболочки.

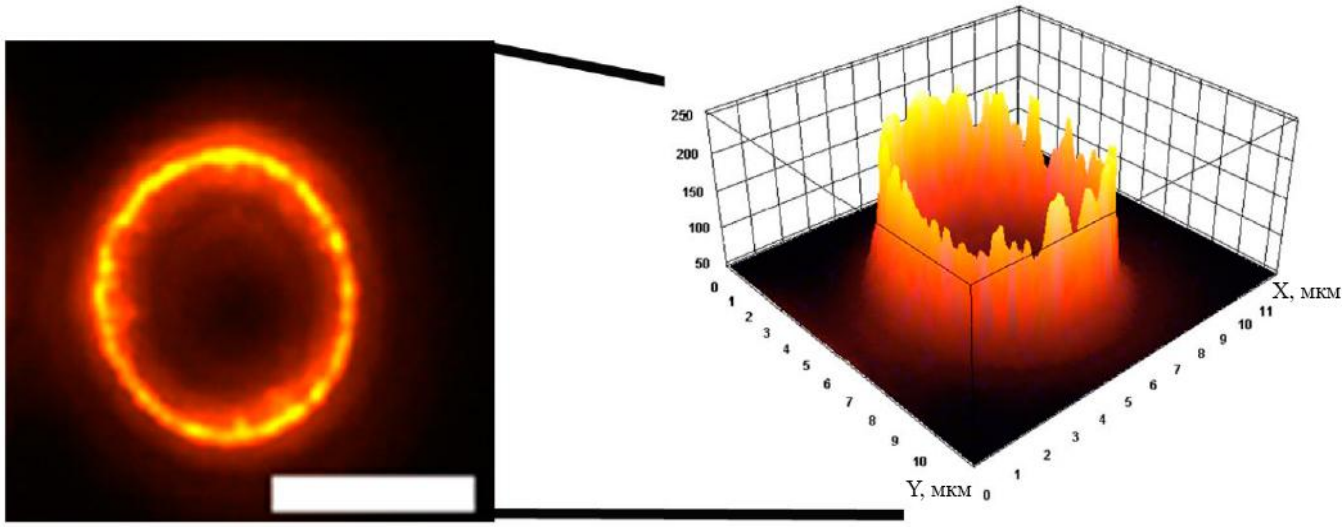


Рисунок 58 – Распределение сигнала интенсивности флуоресценции микрокапсулы, кодированной с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц. Шкала составляет 5 мкм

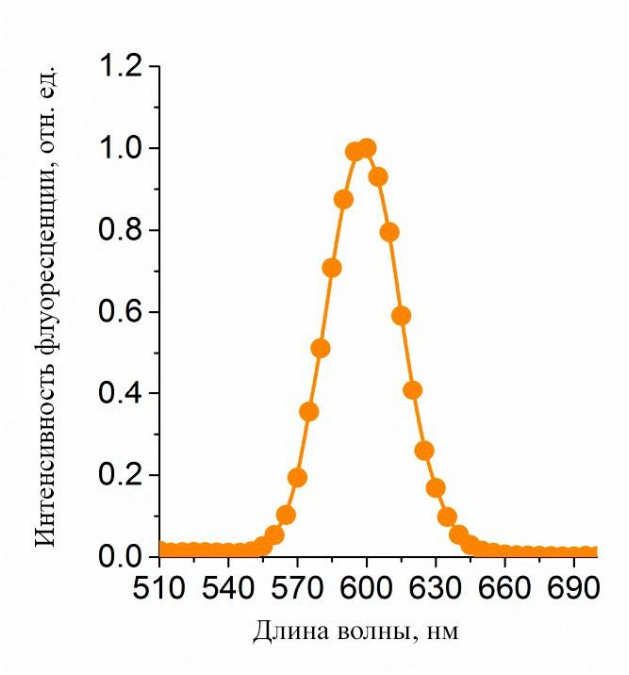


Рисунок 59 – Типичный спектр фотолюминесценции, полученный от 2,5 × 10^7 микрокапсул, кодированных с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц

Полиэлектролитные микрокапсулы анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), чтобы выявить морфологию поверхности и внешнюю структуру микрочастиц. Как видно на рисунках 57Г, Д, микрокапсулы (проанализированные с помощью СЭМ в сухом виде) характеризуются свернутым состоянием, без твердого ядра и с зернистой поверхностью, которая определяется доменной структурой интерполимерного комплекса полиэлектролитов ПАГ/ПСН [159].

5.2 Структура внутренних слоев наночастиц и флуоресцентные характеристики полиэлектролитных микрокапсул, кодированных квантовыми точками и магнитными наночастицами

Фотоиндуцированные процессы переноса заряда, а также яркость и стабильность флуоресцентного сигнала микрокапсул при облучении [153,160] могут также зависеть от относительной пространственной организации МНЧ и КТ внутри полимерной оболочки, а точнее от расстояния между слоями КТ и МНЧ.

Топография и относительное распределение КТ и МНЧ внутри оболочки микрокапсул исследованы с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и магнитно–силового режима сканирующего зондового микроскопа (СЗМ). Для этого были выполнены ультратонкие срезы микрокапсул, залитых эпоксидной смолой. Изображения поверхности образцов микрокапсул, залитых эпоксидной смолой, 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 60А, 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 60Б).

Изображение МСМ показывает однородное и достаточно однородное распределение МНЧ внутри полимерной оболочки. 2D и 3D-визуализация объединенных изображений АСМ и МСМ (рис. 60В, Г соответственно) показывают предполагаемое расположение МНЧ на поверхности оболочки микрокапсул и их четкое отделение от области локализации КТ.

На рисунке 60Д показаны сравнительные распределения магнитных и немагнитных наночастиц в полимерной оболочке как функция их расстояния от поверхности микрокапсулы. Эти участки были получены на основе анализа относительных площадей, занятых наночастицами в топографии АСМ и магнитно-силовых изображениях. 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.

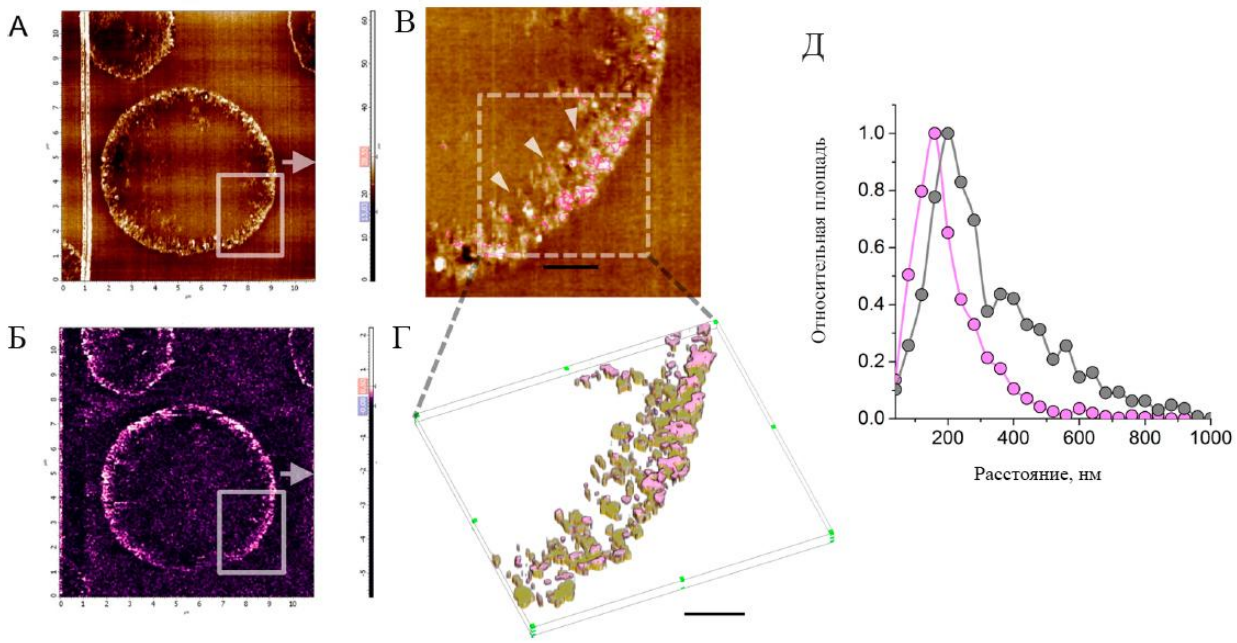


Рисунок 60 – Данные сканирующей зондовой микроскопии по визуализации и обработке изображений микрокапсулы, залитой в эпоксидную смолу, разрезанной ультрамикротом. На панели (А) показаны реконструированные изображения атомно-силовой микроскопии. Панель (Б) показывает восстановленное магнитно-силовое изображение 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 [155]

Стоит отметить, что данные АСМ и электронной микроскопии согласуются между собой. Микрофотографии среза микрокапсулы с электронной микроскопии показывают присутствие остатков микрошариков карбоната кальция, локализованные в области перед оболочкой и областях с КТ, а также в областях с МНЧ внутри полиэлектролитной оболочки микрокапсулы (рисунок 61, 62).

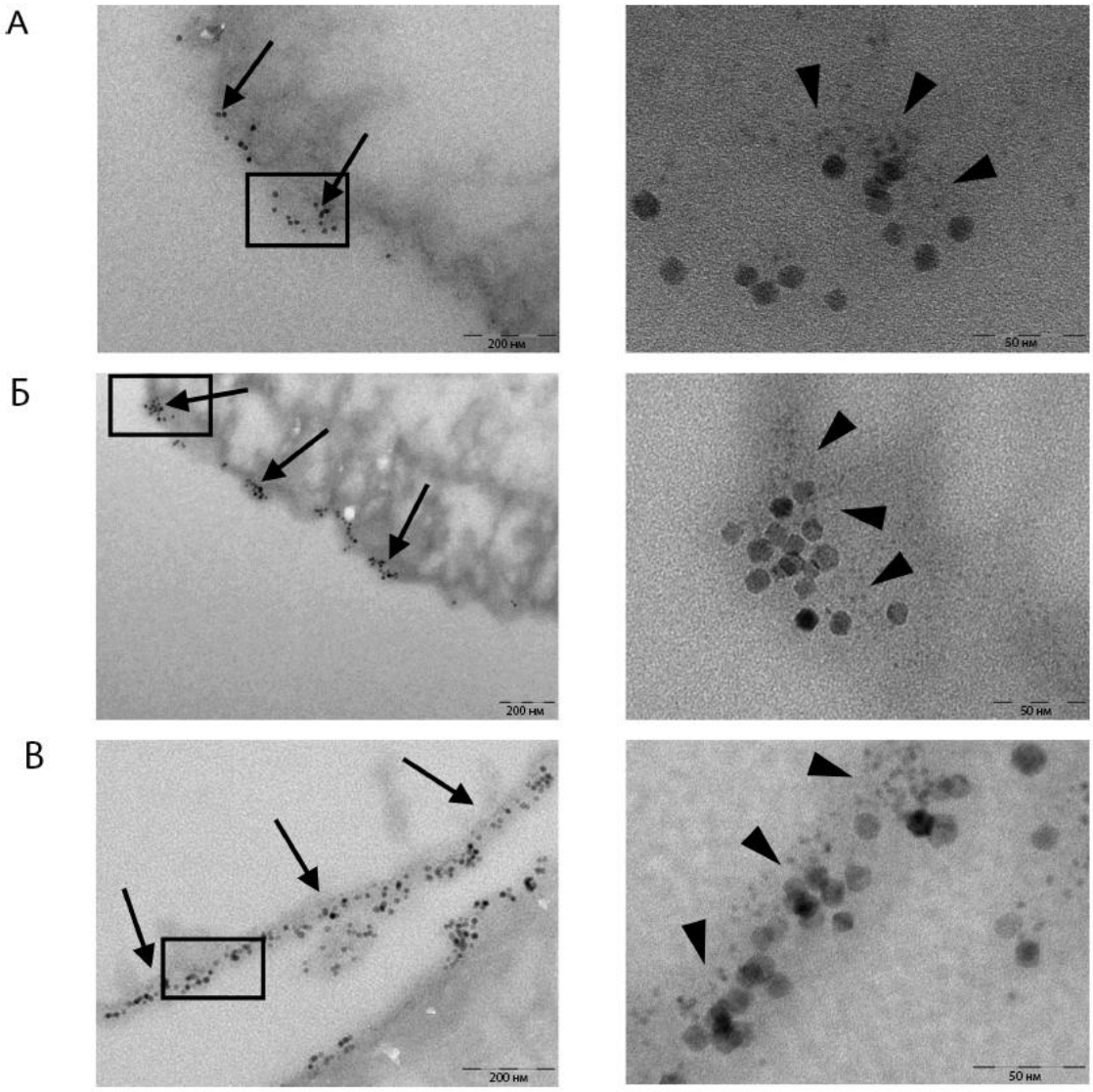


Рисунок 61 – Электронно-микроскопические изображения срезов полиэлектролитных микрокапсул, дуально кодированных слоями квантовых точек и магнитных наночастиц, которые разделены полиэлектролитными слоями поли(аллиламин гидрохлорида) (А), поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия)/поли(аллиламин гидрохлорида) (Б) и (поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия))2/поли(аллиламин гидрохлорида) (В). На правых панелях представлены области интереса, выделенные в рамки, соответствующие изображениям на левых панелях. Длинные стрелки на левых панелях указывают расположение наночастиц внутри полиэлектролитной оболочки; большие стрелки на правых панелях указывают квантовые точки и магнитные наночастицы. Магнитные наночастицы можно отличить от квантовых точек как более крупные темные круглые пятна. Квантовые точки представлены в виде более мелких серых точек. Масштабные линейки на левой панели — 200 нм. Масштабные линейки на правых панелях составляют 50 нм [155]

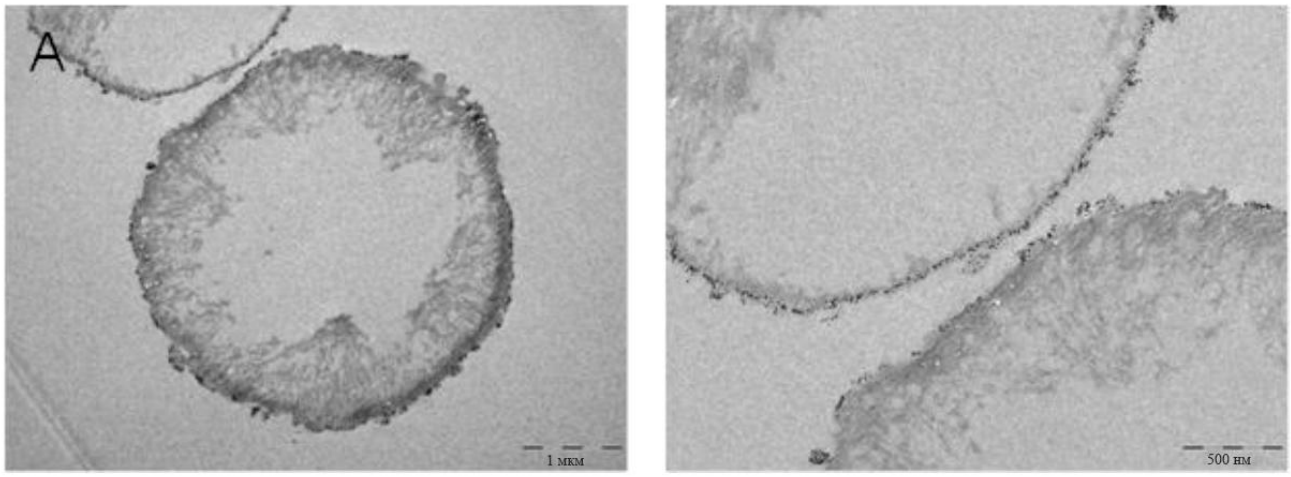


Рисунок 62 – Электронно-микроскопические изображения среза одной микрокапсулы (А) и фрагмента оболочки (Б) микрокапсулы, кодированной с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц. Слои квантовых точек и магнитных наночастиц разделены полиэлектролитными слоями поли(аллиламин гидрохлорид)/поли(4-стиролсульфонат натрия)/поли(аллиламин гидрохлорида). Масштабные линейки равны 1 мкм (А) и 500 нм (Б)

Видно, что КТ образуют неоднородные многослойные сборки, что можно объяснить неравномерностью первоначального распределения положительно заряженного полимера ПАГ, изначально адсорбировавшегося на шероховатой поверхности микрошариков (рисунок 61, 63) [121]. Данные ТЭМ показывают, что разделение КТ и МНЧ с монослоем ПАГ (рисунок 61А, 63) или со слоями полиэлектролита ПАГ/ПСН/ПАГ (рисунок 61Б) не идеально и привело к совместной сборке осажденных слоев разных наночастиц. В то время как использование $(ПАГ/ПСН)_2ПАГ$ слоёв позволило более эффективно разделить слои с квантовыми точками и магнитными наночастицами (рисунок 61В). Однако осаждение полиэлектролитной последовательности, состоящей из $(ПАГ/ПСН)_2ПАГ$, обеспечило полимерное взаимодействие между наночастицами ~10 нм, как определено анализом ТЭМ-изображения. При нанесении $(ПАГ/ПСН)_2ПАГ$ ожидалось формирование полимерной прослойки между наночастицами толщиной ~4–5 нм согласно ранее полученным данным при АСМ-исследованиях пленки из $(ПАГ/ПСН)_2ПАГ$ с наночастицами золота [161] и в результате анализа ТЭМ-изображения толщины двух бислоев ПАГ/ПСН, нанесенных на поверхность наночастиц серебра [162]. Разница в два раза между полученными данными и

изложенными в литературе может объясняться возможными изменениями в структуре оболочки микрокапсулы вследствие алкогольной дегидратации и обезвоживания микрокапсулы в результате заливки в эпоксидную смолу при изготовлении срезов.

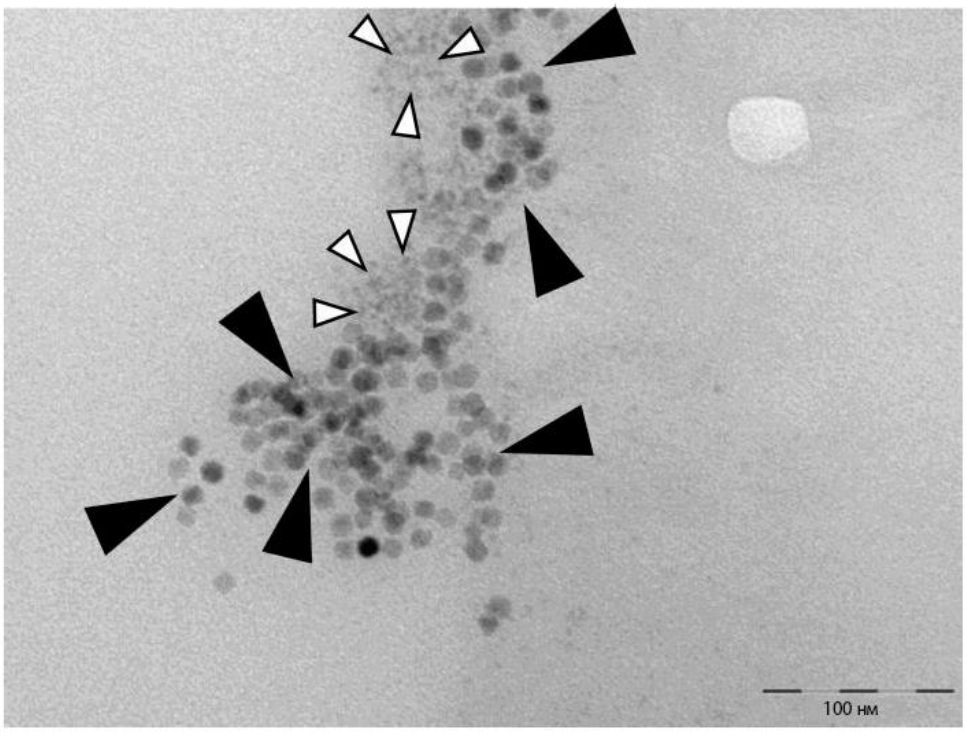


Рисунок 63 – Электронно-микроскопическое изображение среза микрокапсулы, кодированной с помощью квантовых точек и магнитных наночастиц, разделенных монослоем полициклических ароматических углеводородов. Большие черные стрелки указывают на локализацию магнитных наночастиц, маленькие белые стрелки показывают скопления квантовых точек. Масштабная линейка равна 100 нм

Как отрицательно, так и положительно заряженные микрокапсулы с КТ и МНЧ хранят в 0,5 мкл сверхчистой воды при +4°С в темноте, при этом они сохраняют целостность и не проявляют каких-либо сдвигов спектров флуоресценции в течение 1 месяца хранения при описанных условиях. Однако в случае отрицательно заряженных микрокапсул как наиболее перспективных образцов с улучшенными свойствами фотолюминисценции не наблюдается заметных изменений в спектре фотолюминисценции, которые свидетельствовали бы об ухудшении состояния микрокапсул даже после их длительного хранения (в течение 11 месяцев) в тех же условиях.

Представленные данные могут открыть путь к дальнейшему развитию инструментов биовизуализации и доставки лекарств на основе КТ с улучшенными флуоресцентными свойствами, дающие расширенный флуоресцентный сигнал при длительном непрерывном облучении.

5.3 Обсуждение результатов: инструменты биоимиджинга на основе полиэлектролитных микрокапсул, кодированных флуоресцентными полупроводниковыми наночастицами

Разработка флуоресцентных полимерных микро- и наночастиц для использования в качестве носителей для целевой доставки лекарств, белков и молекул нуклеиновых кислот имеет особое значение в области биоимиджинга и тераностических агентов [163,164,165]. Квантовые точки (КТ) – это полупроводниковые коллоидные кристаллы размером от 2 до 10 нм, пиковая длина волны флуоресценции которых зависит от их физического размера [122]. Широкий спектр поглощения и узкий симметричный спектр флуоресценции, положение которого зависит от размера наночастиц, позволяет использовать один источник излучения для возбуждения флуоресценции в наборе КТ с различными полосами флуоресценции, которые можно использовать для мультиплексного детектирования. Поэтому КТ являются очень привлекательными и перспективными флуорофорами для диагностики и визуализации [122].

Использование полиэлектролитных микрокапсул в качестве носителей различных функциональных компонентов позволяет разрабатывать системы, реагирующие на различные физические (ультразвук, магнитное поле, лазерное или оптическое излучение) или химические (pH, ионная сила микроокружения, полярность растворителей) стимулы [166,167]. Полиэлектролитные микрокапсулы получают методом послойного напыления противоположно заряженных полимерных полиэлектролитов на сферическую матрицу. Последующее растворение матрицы образует полую структуру, стабильная полимерная мембрана которой состоит из интерполимерного комплекса

полиэлектролитов [168,169,170]. Техника послойной адсорбции полиэлектролитов позволяет использовать различные функциональные компоненты, в том числе магнитные, металлические (золото или серебро), флуоресцентные (например, КТ) наночастицы для их включения в полимерную мембрану и толщу мембраны, которую необходимо контролировать по мере ее формирования [171,172].

Микрокапсулы с флуоресцентными метками являются перспективными биоимиджинговыми агентами, которые можно использовать для мониторинга их транспорта и доставки *in vitro* и *in vivo* [173,174]. Доступный метод флуоресцентного мечения (оптического кодирования) микрокапсул – это конъюгация полимеров или физическое смешивание с флуоресцентными метками [175,176]. Флуоресцентные компоненты, определяющие оптические свойства микрокапсул, также можно вводить внутрь несколькими способами: либо при помощи нанесения слоев полимеров, маркированных флуоресцентными красителями, на матричные микрочастицы, такие как микросферы из карбоната кальция, либо с использованием диффузии флуоресцентных соединений через полимерную мембрану уже после растворения микрочастицы, за счет варьирования параметров pH или ионной силы [177]. Однако оптическое кодирование полиэлектролитных микрокапсул с флуоресцентными нанокристаллами более перспективно благодаря своим уникальным оптическим свойствам и эффективности в биоимиджинге [178].

Известные способы кодирования путем включения КТ в полимерную мембрану полиэлектролитных микрокапсул – это использование растворимых в воде квантовых точек с низкомолекулярным лигандом, например, тиогликолевой кислотой или цистеином [179,180]. Целью данного исследования была разработка высокостабильных флуоресцентных полиэлектролитных микрокапсул, оптически кодируемых водорастворимыми CdSe/ZnS (ядро/оболочка) КТ, поверхность которых была дополнительно модифицирована тиольным производным полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащим карбоксильную концевую группу, а

также оценка характеристик флуоресценции и структуры полученных флуоресцентных микрокапсул.

Полученные микрокапсулы, кодированные КТ, имеют сферическую форму и характеризуются узким распределением по размерам (рисунок 64), средний размер составляет 4,45 ± 0,65 мкм. Этот размер сравним с размером эритроцитов, будучи даже меньше их [181]. Полимерная мембрана микрокапсул представляет собой гибкую структуру, склонную к деформации. При внутривенном введении микрокапсулы такого размера не могут проникать через гематоэнцефалический барьер, что позволяет отслеживать транспортировку и распределение оптически кодированных микрокапсул в организме [182,183]. Однако в локализациях с повышенной проницаемостью(стенки кровеносного сосуда, например), в зонах воспаления и опухолевого роста микрокапсулы могут проникать во внесосудистое пространство, что, как ожидается, обеспечит визуализацию и мониторинг целенаправленной доставки [184,185,186,187].

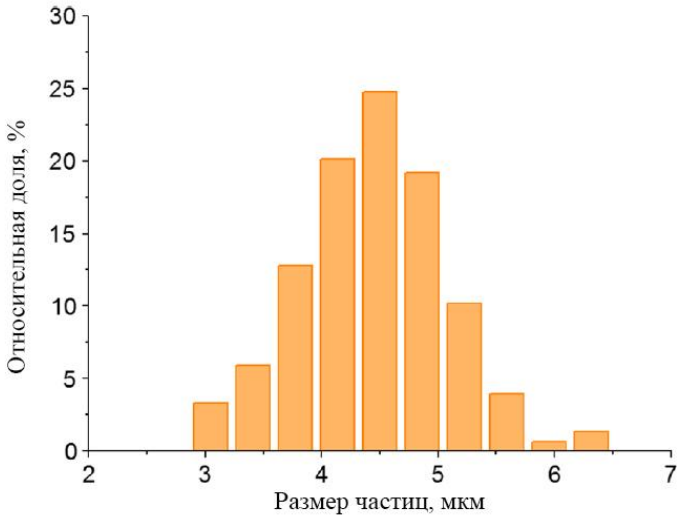


Рисунок 64 – Распределение по размерам полиэлектролитных микрокапсул, оптически кодированных квантовыми точками, где количество проанализированных микрокапсул составляло 600

Изготовленные микрокапсулы характеризуются пиком флуоресценции при длине волны 590 нм, который соответствует пику исходных водорастворимых КТ, используемых для оптического кодирования микрокапсул. Это указывает на то, что полимерные полиэлектролиты, составляющие мембрану микрокапсул, не влияют на

флуоресцентные свойства, в частности, на максимум флуоресценции квантовых точек в микрошариках и полученных из них микрокапсулах (рисунок 65).

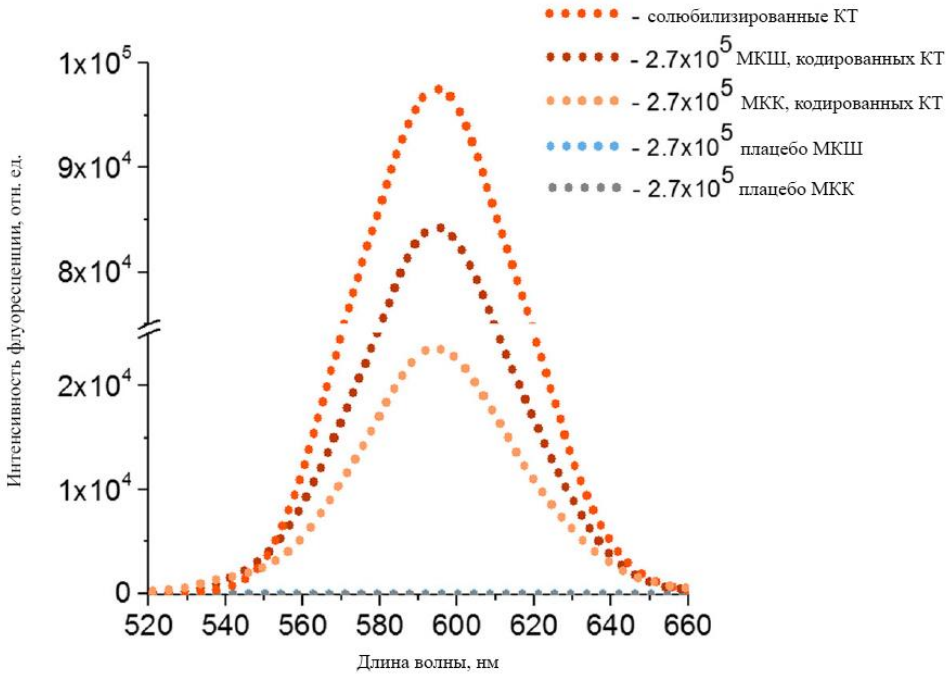


Рисунок 65 – Влияние внедрения квантовых точек в полимерную мембрану микрошариков и микрокапсул на их флуоресцентные характеристики: показан спектр флуоресценции раствора квантовых точек, содержащего 2,241 мг квантовых точек; это соответствует количеству квантовых точек, используемому для оптического кодирования микрокапсул

Микрофотографии участков полиэлектролитных микрокапсул, кодированных КТ, представленные на рис. 66, демонстрируют, что микрокапсулы полые, обнаружен яркий флуоресцентный сигнал, излучаемый полимерными мембранами, содержащими КТ. Эти данные подтверждают эффективность процедуры, используемой для растворения сердцевины, и демонстрируют яркий сигнал флуоресценции изготовленных микрокапсул, который может быть обнаружен с помощью соответствующих фильтров Texas Red и PE в случае флуоресцентной микроскопии. Полученные полиэлектролитные микрокапсулы, содержащие КТ в полимерной оболочке, обладают более высокими флуоресцентными свойствами по сравнению с полиэлектролитными микрокапсулами, меченными обычными красителями, такими как изотиоцианат

флуоресцеина (FITC) или аминофлуоресцеин [175,188]. В противном случае микрокапсулы, содержащие КТ, используя послойный метод, получат яркость сопоставимую или даже хуже, чем у микрошариков, содержащих органические красители, полученных с использованием метода набухания. Яркость определяется продуктом коэффициента затухания и квантовым выходом. Квантовый выход водорастворимых квантовых точек при комнатной температуре составляет около 40%, что сопоставимо с таковым для органических красителей [121,189,190], в то время как угасание КТ почти в 100 раз больше, чем у органических красителей. В противном случае, из-за большого размера КТ, их количество в оболочке микрокапсулы может быть несопоставимо с количеством молекул органических красителей. С другой стороны, кодирование микрокапсул с помощью КТ обеспечивает такое важное сравнительное преимущество, как полное отсутствие фотообесцвечивания. Кроме того, квантовые точки разных цветов (размеров) могут возбуждаться излучением с одинаковой длиной волны. Таким образом, использование КТ разных цветов для кодирования микрокапсул может обеспечить практически неограниченное количество спектрально разрешенных оптических кодов [123].

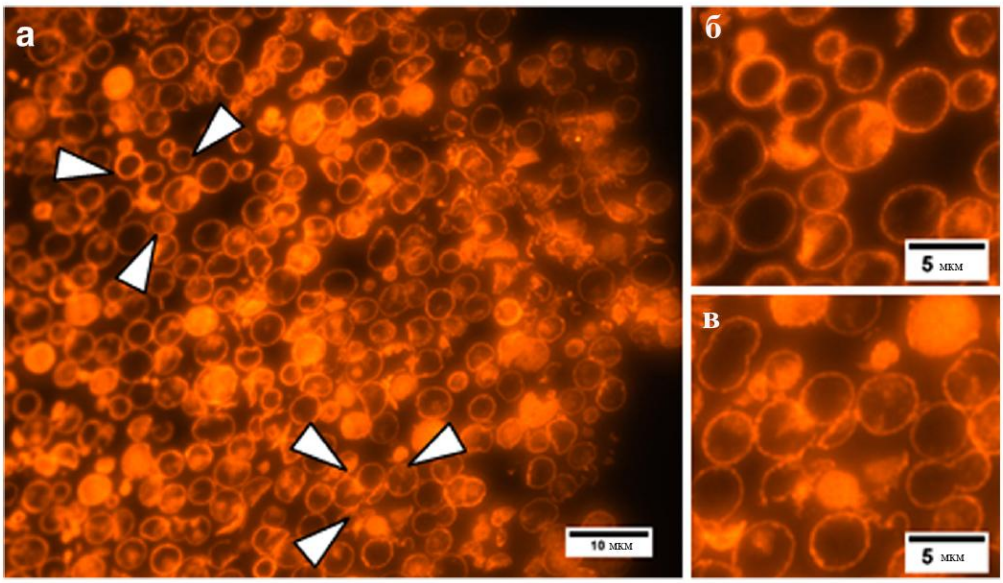


Рисунок 66 – Микрофотографии срезов полиэлектролитных микрокапсул, кодированных квантовыми точками. Стрелки в (а) указывают области, показанные в (б, в) при большем увеличении [156]

ГЛАВА 6. 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.

Актуальность таких исследований можно продемонстрировать на примере разработок противоопухолевых препаратов. Ежегодно в мире тестируется около 10000 прототипов противоопухолевых лекарств [191]. При этом только 7% от всех потенциальных противоопухолевых препаратов, вступивших в первую фазу клинических испытаний, впоследствии внедряется в клиническую практику [192]. Этот факт может свидетельствовать прежде всего о недостаточно высокой прогностической способности существующих методов тестирования. На первом этапе длительного пути внедрения лекарства в клинику для изучения цитотоксичности потенциальных терапевтических агентов и носителей для их доставки в большинстве лабораторий используют модели *in vitro* на основе различных опухолевых клеточных линий человека и животных. Понимание взаимодействия носителей лекарств с ультраструктурой клеток и влияния таких взаимодействий на поглощение носителей имеет первостепенное значение для разработки эффективных средств адресной доставки лекарств [193]. Важность этой информации обусловлена тем, что мишени для многих терапевтических препаратов против нескольких патологий локализованы в субклеточных компартментах. Кроме того, способ ввода лекарственного средства (прямой или посредством эндоцитоза) часто определяет эффективность, кинетику и конечный пункт назначения самого препарата. Несмотря на то, что классические

эндоцитарные пути, такие как фагоцитоз, макропиноцитоз, клатрин-опосредованные и кавеол-зависимые пути, достаточно хорошо изучены, непосредственное влияние ультраструктуры клеток на внутриклеточный транспорт фармацевтических препаратов по-прежнему остается неизвестным. Недостаток этой информации в первую очередь определяется отсутствием аналитических методик, которые могли бы картировать по спектральным или другим характеристическим признакам трехмерное распределение лекарственных препаратов во внутриклеточном пространстве и оценивать функциональную колокализацию препарата с клеточными структурами [194].

Применение разработанной нами уникальной технологии СОЗНТ позволяет исследовать микро- и наноструктуру клеток и тканей методами СЗМ в сочетании с коррелятивным картированием распределений флуоресцентных агентов в объеме изучаемых образцов [100].

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 [194].

6.1 Анализ внутриклеточного распределения доксорубицина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 методом корреляционной сканирующей флуоресцентно-зондовой нанотомографии

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.

Для исследований методами сканирующей зондовой и флуоресцентной нанотомографии образцы суспензии клеток были дегидратированы при помощи проводки по спиртам с увеличивающейся концентрацией, а затем залиты в эпоксидную среду. Отметим, что в данном случае, в отличие от экспериментов, описанных в главе 7, были использованы суспензии клеток, не адгезированных на какие-либо клеточные носители.

Сверхтонкие срезы образцов клеток были получены с использованием ультрамикротома Leica UC6 с алмазным ножом Diatome AFM 35 2.0 mm. Для подтверждения эффективности методики образцы клеток MCF-7 с доксорубицином, внедренные в эпоксидную смолу, были исследованы методом СОЗНТ, для чего при помощи ультрамикротома были выполнены срезы образца толщиной 120 нм. Полученные с применением набора флуоресцентных фильтров Texas Red (полоса возбуждения 542 – 582 нм, полоса эмиссии 604 – 644 нм) флуоресцентные изображения среза образца (см. рисунок 67, 68) показали, что флуоресценция доксорубицина сохраняется после проведения процедуры внедрения клеток в эпоксидные смолы, однако распределение доксорубицина внутри клетки обладает значительной неоднородностью. На рисунке 69 приведены коррелятивные СЗМ- и ФОМ изображения среза, где видна целостность клеточной структуры, заключенной в эпоксидную смолу.

Также была исследована внутриклеточная локализация доксорубицина, загруженного в наноносители. Трехслойные полиэлектролитные нанокапсулы, загруженные доксорубицином, были получены с помощью аналогичного упоминаемому ранее в главе 5 метода послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов, в данном случае сульфата декстрана (DS) и полиаргинина (Parg), на сферические частицы карбоната кальция, как описано в работе по разработке многослойных полиэлектролитных капсул [20]. Для уменьшения размера капсулы прогревали в течение 1 ч при 90 °C.

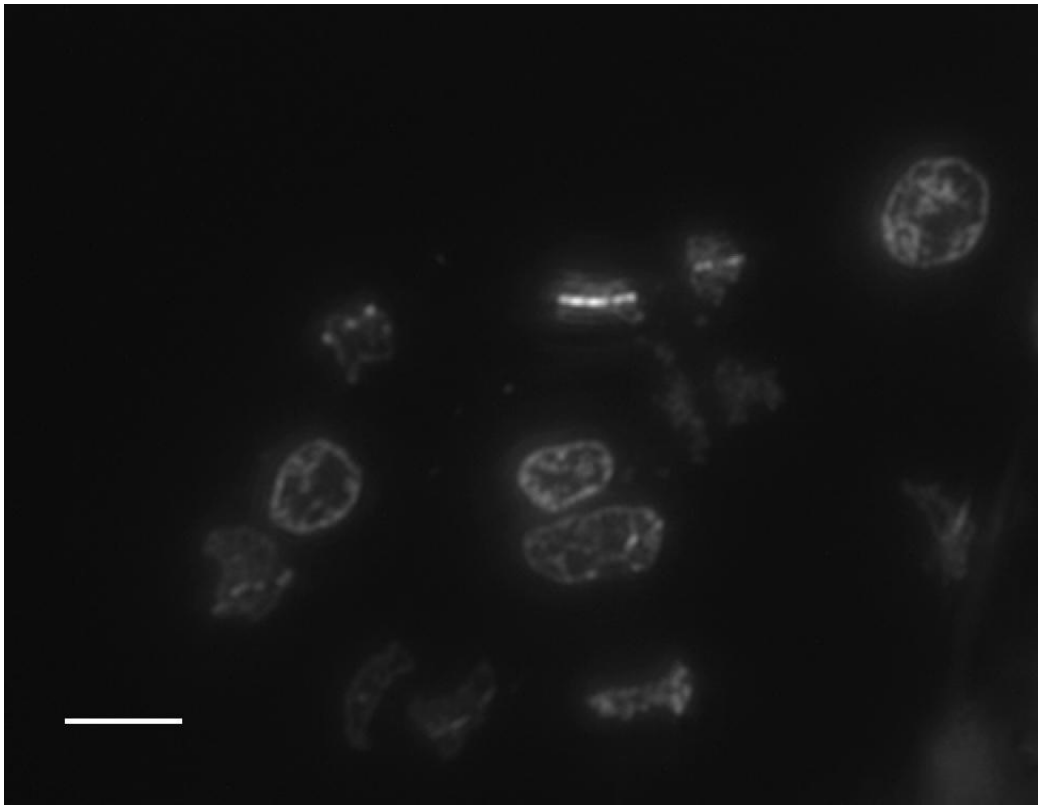


Рисунок 67 – Флуоресцентное изображение среза образца клеток MCF-7, загруженных доксорубицином, размерный отрезок 10 мкм

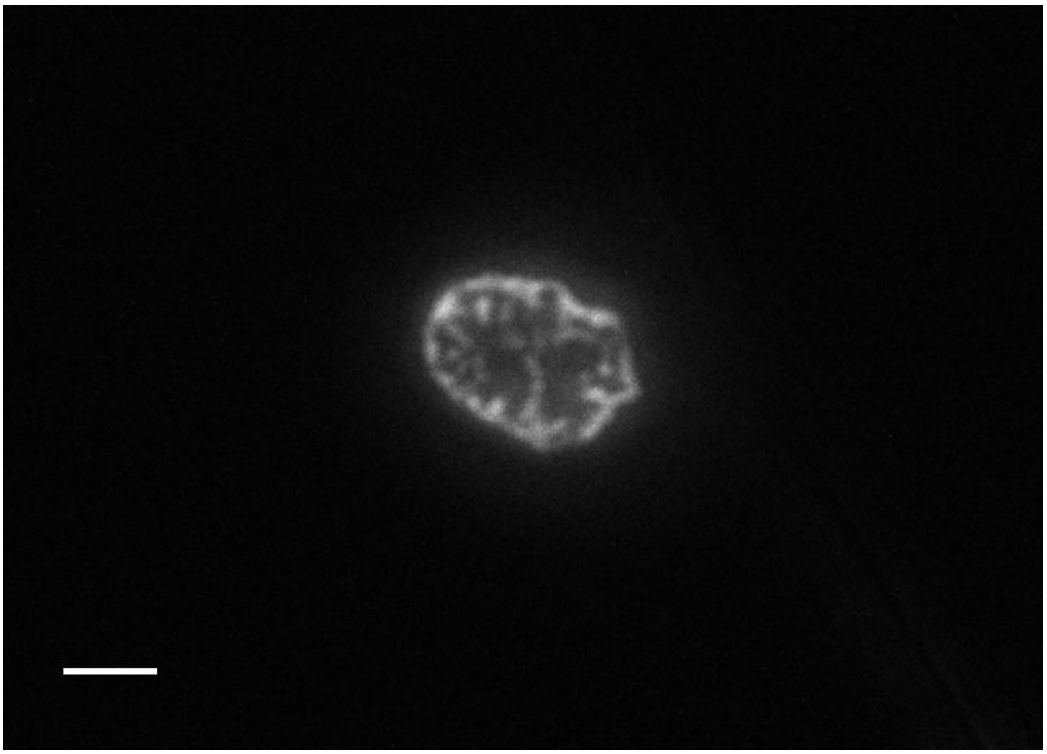


Рисунок 68 – Флуоресцентное изображение среза клетки MCF-7, загруженных доксорубицином, размерный отрезок 5 мкм

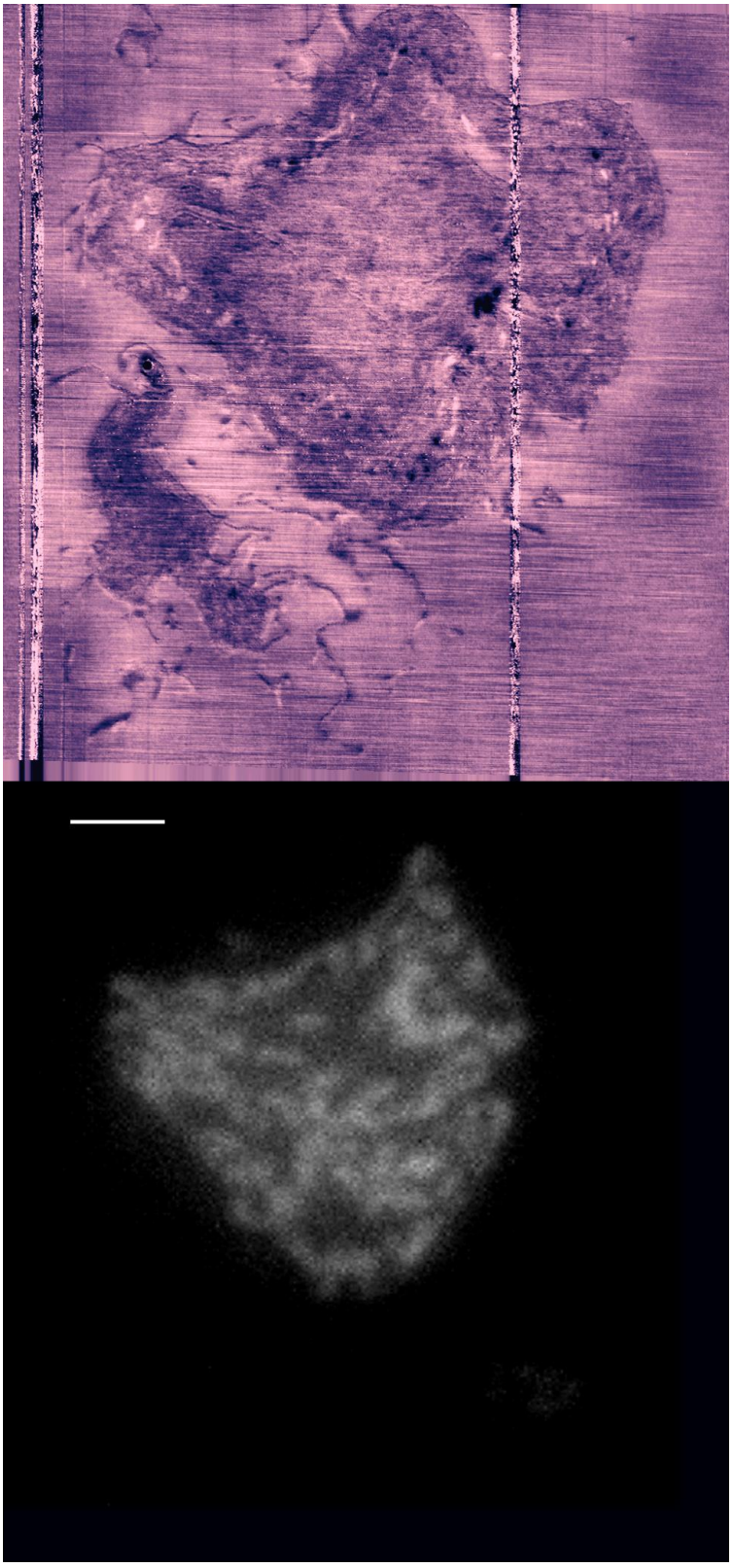


Рисунок 69 – Коррелятивные зондово-микроскопическое (вверху) и флуоресцентное (внизу) изображения поверхности среза образца клеток MCF-7. Размер изображений 15×15 мкм, размерный отрезок 2 мкм

Это позволило снизить средний размер капсул с 550±100 до 290±60 нм за счет сжатия полиэлектролитных (полимерных) слоев. Загрузку доксорубицина в капсулы проводили в различных условиях (варьировали время и температуру), при этом было обнаружено, что массовая доля не зависела от условий и составляла 30 ± 7%. Это соответствует приблизительно 10 млн. молекул доксорубицина на одну капсулу.

Было проведено коррелятивное исследование методами СЗМ и флуоресцентной микроскопии клеток, загруженных доксорубицином в наноносителях со временем инкубации 15 мин. и 1 ч, а также меченых кальцеином. Для этого были выполнены срезы образцов клеток, внедренных в эпоксидную смолу, толщиной 120 нм, после чего срезы образцов были также исследованы с использованием флуоресцентного микроскопа, а поверхность образцов после срезов – проанализирована при помощи СЗМ. Полученные коррелятивные изображения распределений флуоресцентных маркеров и наноморфологии, полученной при помощи СЗМ, представлены на рисунках 70 и 71 соответственно. Можно отметить, что распределение доксорубицина в клетке, инкубированной в течение 1 ч, заметно более однородно, чем в клетке, инкубированной 15 мин. При этом наблюдаемые ультраструктурные детали клетки, регистрируемые СЗМ, в данном случае также лишь отчасти совпадают с морфологией распределения флуоресцентных маркеров. Полученные результаты подтверждают вывод о том, что коррелятивная флуоресцентная микроскопия поверхности образца необходима для адекватной локализации области измерений и интерпретации полученных результатов.

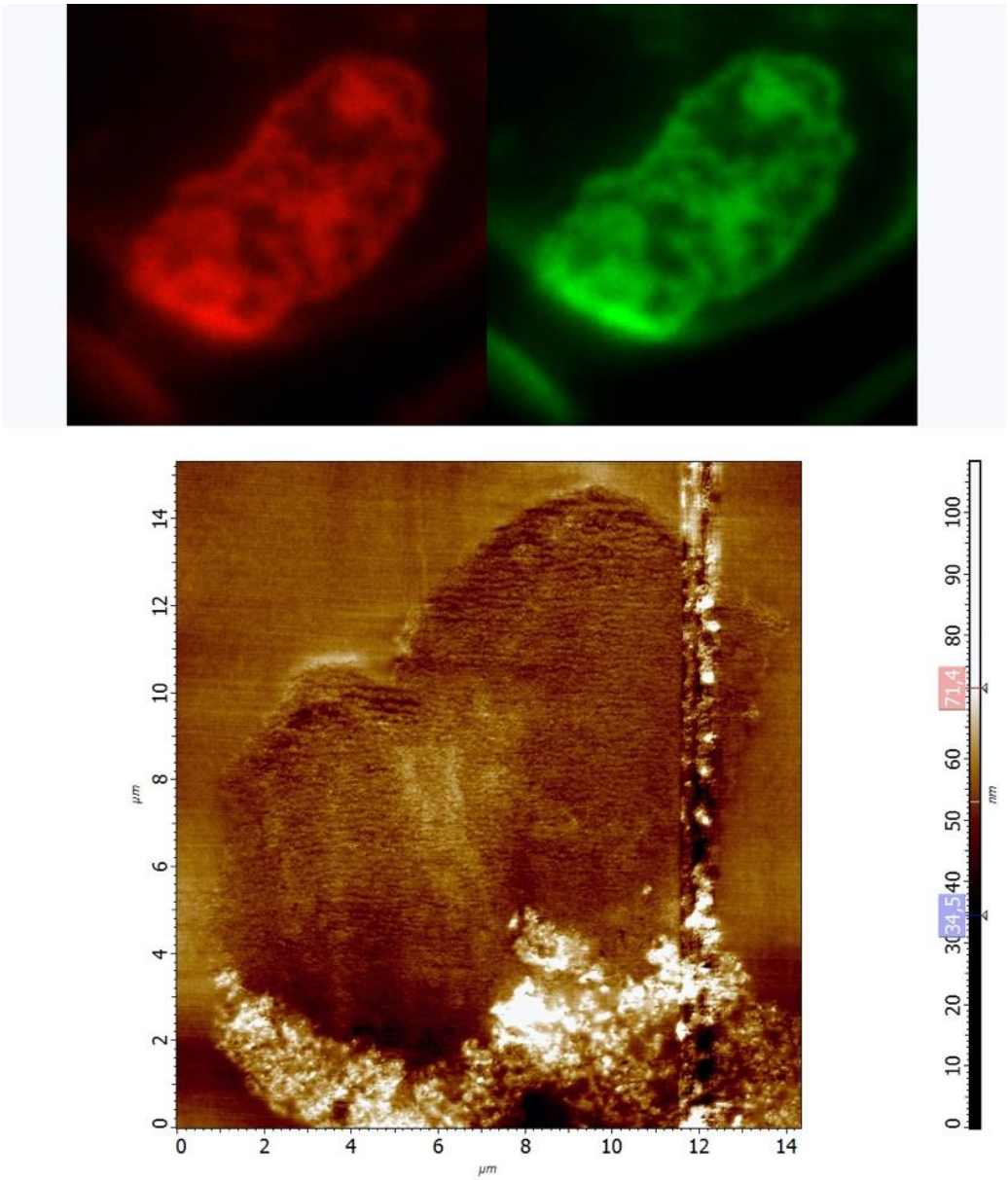


Рисунок 70 – Флуоресцентные изображения распределений доксорубицина (красный) и кальцеина (зеленый) на поверхности среза образца клеток MCF-7 в эпоксидной смоле (вверху) и коррелятивное зондово-микроскопическое изображение (внизу). Время инкубации 15 мин

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 с использованием длиннофокусного объектива 50X Mitutoyo Plan Apo HR (Mitutoyo, Япония) с числовой апертурой 0.75 и набора флуоресцентных фильтров Texas Red с полосой возбуждения 542 – 582 нм и полосой эмиссии 604 – 644 нм.

В качестве источника возбуждающего излучения использовалась ртутная лампа HB100 мощностью 100 Вт. После получения серии коррелятивных флуоресцентных изображений 3D структура фрагмента клетки была реконструирована при помощи программного пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (MediaCybernetics Inc.).

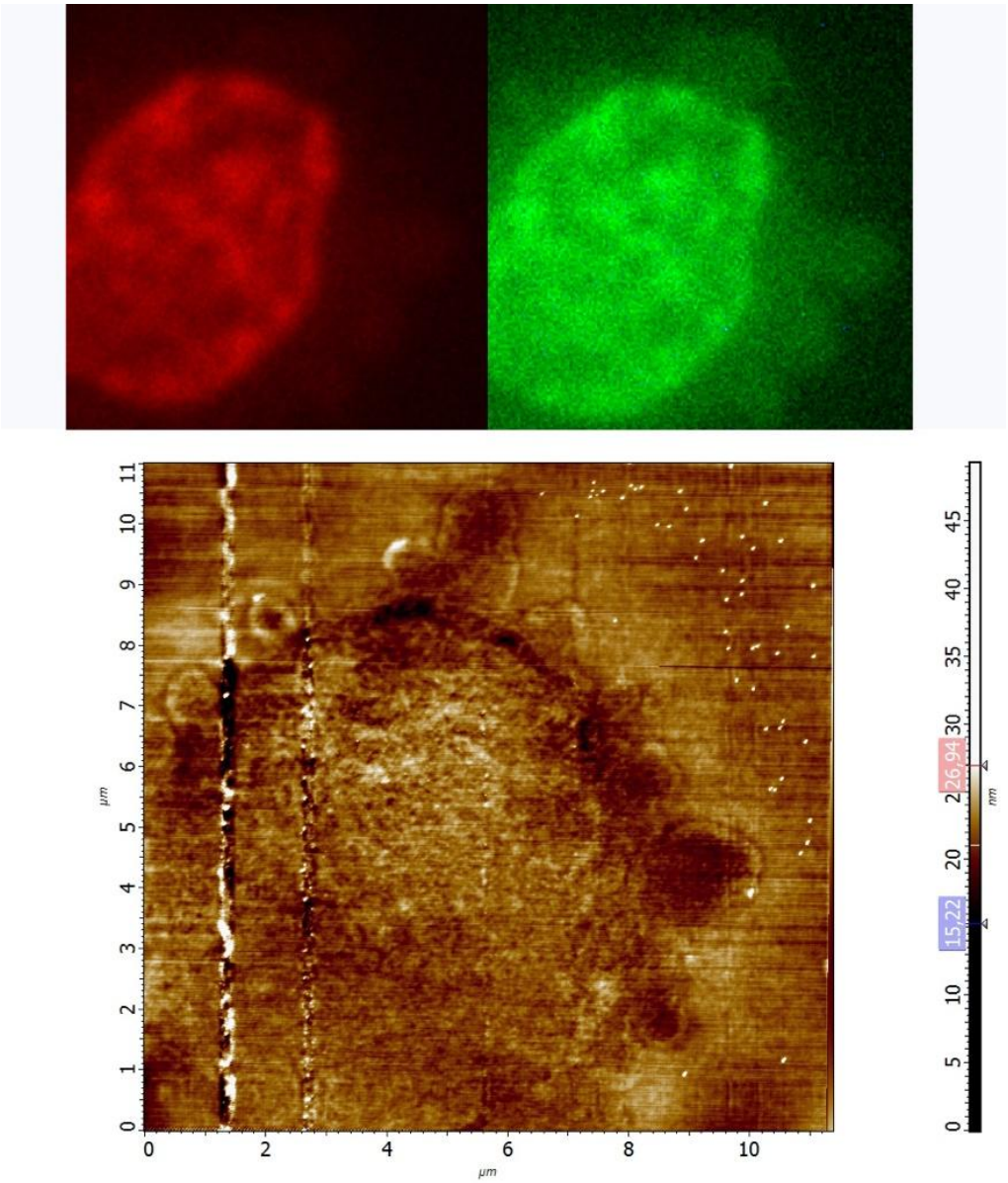


Рисунок 71 – Флуоресцентные изображения распределений доксорубицина (красный) и кальцеина (зеленый) на поверхности среза образца клеток MCF-7 в эпоксидной смоле (вверху) и коррелятивное зондово-микроскопическое изображение (внизу). Время инкубации 1 ч

СЗМ-измерения на поверхности образца после среза проводились в полуконтактном режиме с использованием кремниевых зондов-кантилеверов Etalon HA_HR (Tipsnano, Эстония) с резонансной частотой 390 кГц и радиусом кривизны острия зонда менее 10 нм.

При выполнении СЗМ-измерений поверхность образца сканировалась острием кремниевого зонда, вибрирующего на резонансной частоте балки кантилевера с амплитудой в несколько десятков нм. Отслеживание изменений амплитуды и фазы колебаний кантилевера, обусловленных взаимодействием зонда с поверхностью при сканировании, позволяет с использованием соответствующих цепей обратной связи получать информацию как о наномасштабной топографии поверхности, так и об ее локальных вязкоупругих свойствах [195]. Следует отметить, что, как показывают предыдущие исследования биологических образцов и различных наноматериалов, СЗМ-измерения на поверхности образцов после ультрамикротомии выявляют топографические особенности поверхности с диапазонами вариации высоты в единицы и десятки нм, ассоциируемые с ультраструктурой исследуемых объектов [196, 197]. Появление наномасштабных особенностей рельефа на поверхности неоднородного образца может быть связано с релаксацией внутренних напряжений поверхности после среза алмазным ножом ультрамикротома [198].

На рисунке 72 показано одно из полученных флуоресцентных изображений клетки MCF-7 и визуализация трехмерной реконструкции распределения доксорубицина в клетке на основе полученных данных. На трехмерной реконструкции выделяется связная структура распределения, что может служить критерием успешности использованного 3D-метода. Стоит отметить, что разрешение полученной реконструкции по координате Z (аксиальному направлению) соответствует толщине среза (120 нм), что значительно превосходит разрешение существующих методов конфокальной микроскопии [194].

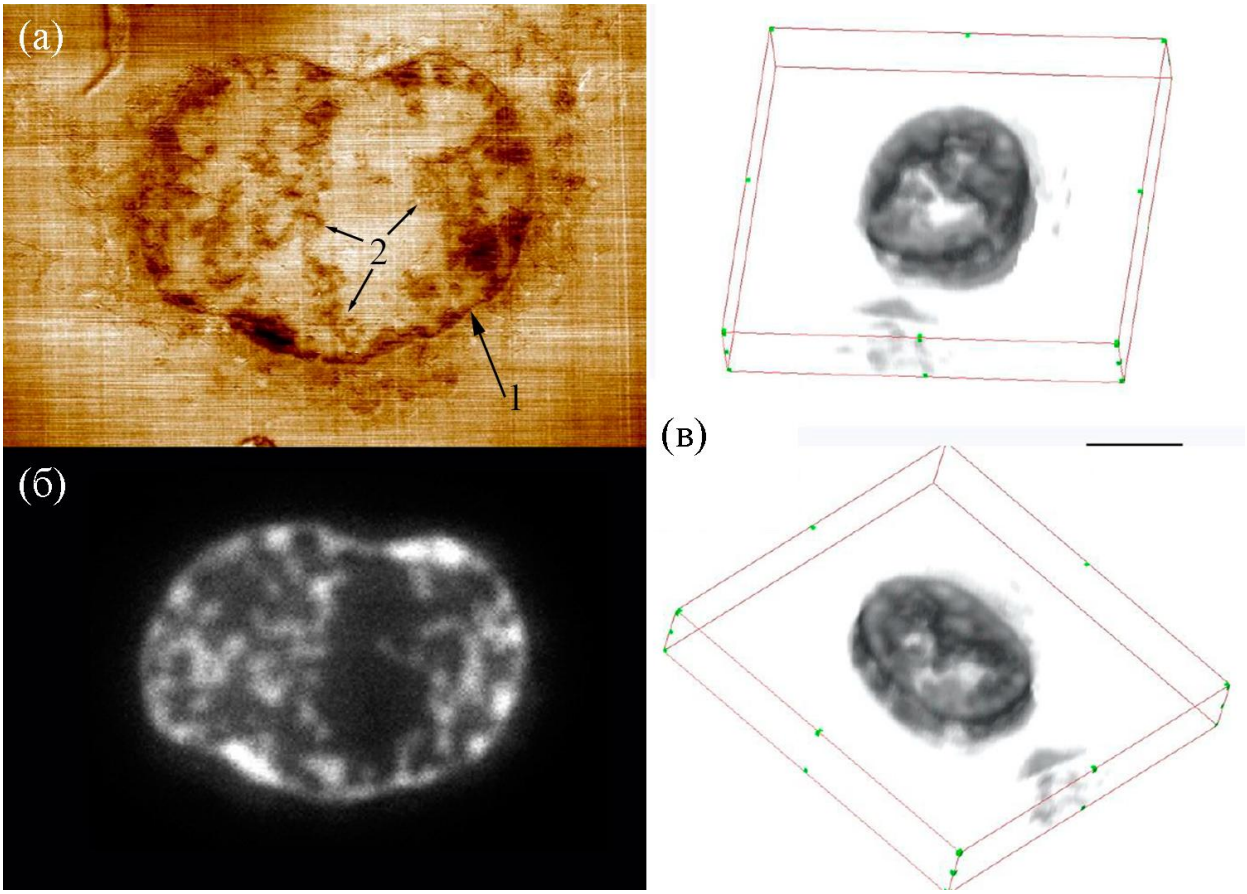


Рисунок 72 – Анализ образцов клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 с доксорубицином. а – зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза клетки MCF-7, размер скана 13,8 × 9,5 мкм, диапазон вариации высоты 33,5 нм, стрелками указаны: 1 – клеточная мембрана, 2 – примеры различимых 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 × 18,7 × 2,4 мкм, толщина среза 120 нм, размерный отрезок 5 мкм, представлена визуализация в двух ракурсах [194]

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 объёме, 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 72), и зон накопления доксорубицина, что, по всей видимости, указывает на накопление доксорубицина в отдельных клеточных компартментах, функциональное значение которых будет являться предметом дополнительного исследования. При этом доксорубицин практически полностью отсутствует в большей части объема цитоплазмы. Данные детали внутриклеточного распределения препарата было бы затруднительно проанализировать обычными методами флуоресцентной микроскопии в силу их недостаточной разрешающей способности по оси Z [194].

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 [194].

ГЛАВА 7. МИКРО- И НАНОМАСШТАБНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БИОСОВМЕСТИМЫХ СКАФФОЛДОВ И КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ 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. Одним из важных требований к микроскопии для исследования объектов в таких областях является возможность видеть распределение тех или иных маркеров, лекарственных средств в толще клетки и анализировать клеточные контакты, взаимодействие клетки с окружающей её средой для лучшего понимания происходящих в организме процессов.

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 [57, 67]. В ходе исследований показано, что скаффолды на основе фиброина успешно помогают в лечении кишечника [199], восстановление нервной [200] и костной ткани [201].

Данный биополимер хорошо себя проявляет как самостоятельно, так и в качестве клеточного носителя [202], поэтому был выбран как объект исследования с помощью уникальной технологии сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии (СОЗНТ), комбинирующей ультрамикротом и сканирующий

зондовый микроскоп (СЗМ) в одном устройстве в корреляции с методами флуоресцентной оптической микроскопии. Данная методика дает возможность получать качественно новую информацию о структуре биоматериалов, тканеинженерных конструкций, клеток и тканей со сверхвысоким разрешением, в корреляции с информацией о распределении флуоресцентных маркеров.

Объектами для отработки методик и исследования были выбраны биоинженерные конструкции (трехмерные скаффолды [203], плёнки [204]), представляющие собой имитацию микроархитектуры нативного внеклеточного матрикса тканей и органов, которые создают благоприятную среду для адгезии и пролиферации клеток. Физико-химические свойства конструкций позволяют проводить различные манипуляции для пробоподготовки образцов под исследования СОЗНТ, что позволяет рассматривать их как перспективные подложки для проведения исследований данным методом [204].

Существует множество биоматериалов, которые могут быть использованы для изготовления скаффолдов для культивирования клеток. Однако формирование конструкции из них сопряжено с трудностями. К таким материалам, например, относятся хитозан [205], желатин [206] или коллаген [207] и др.

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 децеллюляризированных тканей и органов, как поджелудочная железа [208], роговица [209], пуповина [210, 211], хрящ [212, 213], печень [98, 99, 214]. При этом компоненты децеллюляризованных тканей могут быть использованы для получения как мелкодисперсных, так и криоструктурированных матриксов [215].

В данной работе были выполнены исследования скаффолдов на основе фиброина шелка шелкопряда Bombyx mori и фрагментов децеллюляризированной ткани печени человека.

7.1 Исследование образцов пористых биодеградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка и биодеградируемых композитных скаффолдов на основе фиброина шелка, содержащих компоненты внеклеточного матрикса печени человека

В ходе выполнения работы был проведен трехмерный анализ структуры образцов пористых биодеградируемых скаффолдов на основе фиброина шелка и биодеградируемых композитных скаффолдов на основе фиброина шелка, содержащих компоненты внеклеточного матрикса печени человека. Методики получения данных скаффолдов приведены в разделах 2.2 – 2.4.

На рисунке 73 представлен пример СЭМ-изображения биодеградируемого скаффолда из фиброина шелка, который был получен с использованием технологии электроспиннинга [57], широко используемой для изготовления биосовместимых полимерных скаффолдов с заданными характеристиками, в том числе искусственных сосудов [216]. На изображении можно идентифицировать нити фиброина шелка средним диаметром 300 нм.

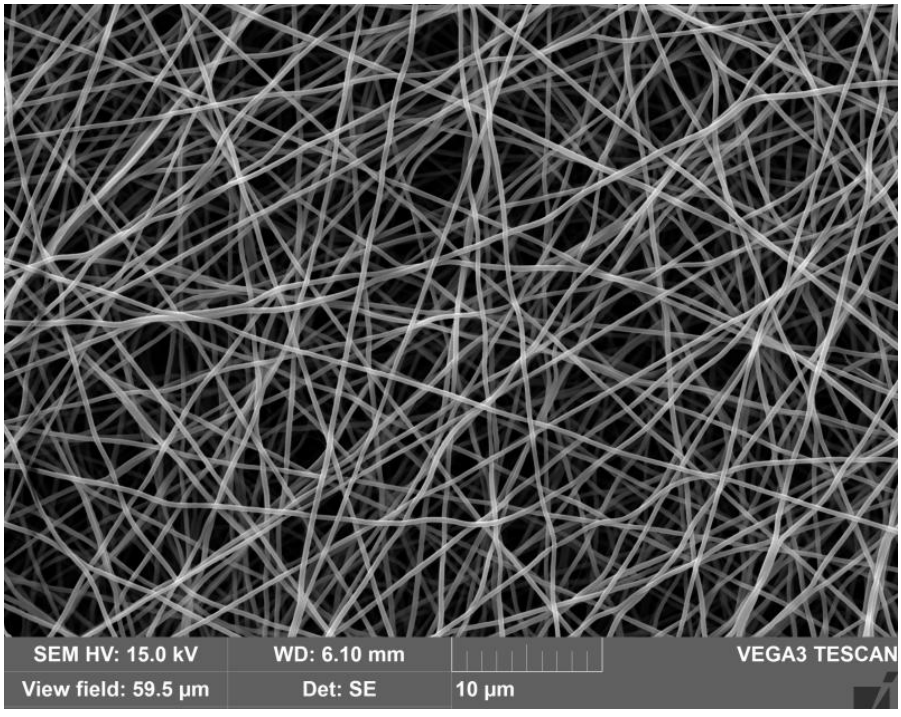


Рисунок 73 – Электронно-микроскопическое изображение биодеградируемого скаффолда из фиброина шелка, полученного с использованием технологии электроспиннинга, ув. ×10000

На рисунке 74 представлено флуоресцентное оптическое изображение данного скаффолда, использованное для коррелятивного анализа его трехмерной микро- и наноструктуры. Прямоугольником обозначена область, использованная для трехмерной реконструкции методом СОЗНТ.

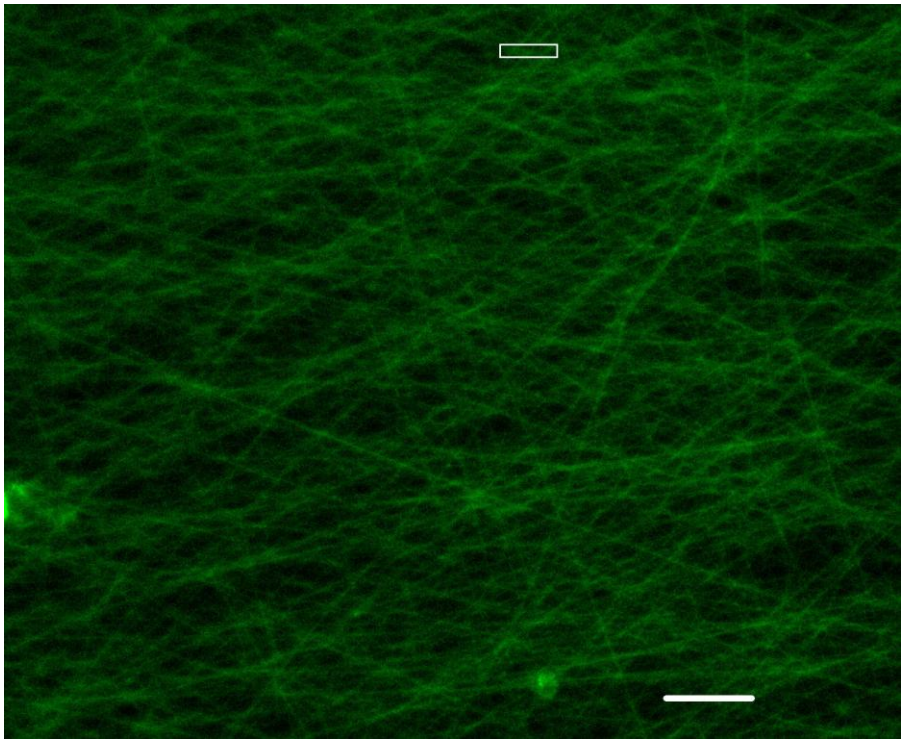


Рисунок 74 – Флуоресцентное оптическое изображение биодеградируемого скаффолда из фиброина шелка, изготовленного с использованием технологии электроспиннинга, размерный отрезок 20 мкм

На рисунке 75 представлено СЗМ-изображение (15×15 мкм^2) поверхности поперечного среза исследуемого образца биодеградируемого скаффолда, полученного методом электроспиннинга, после среза ультрамикротомом.

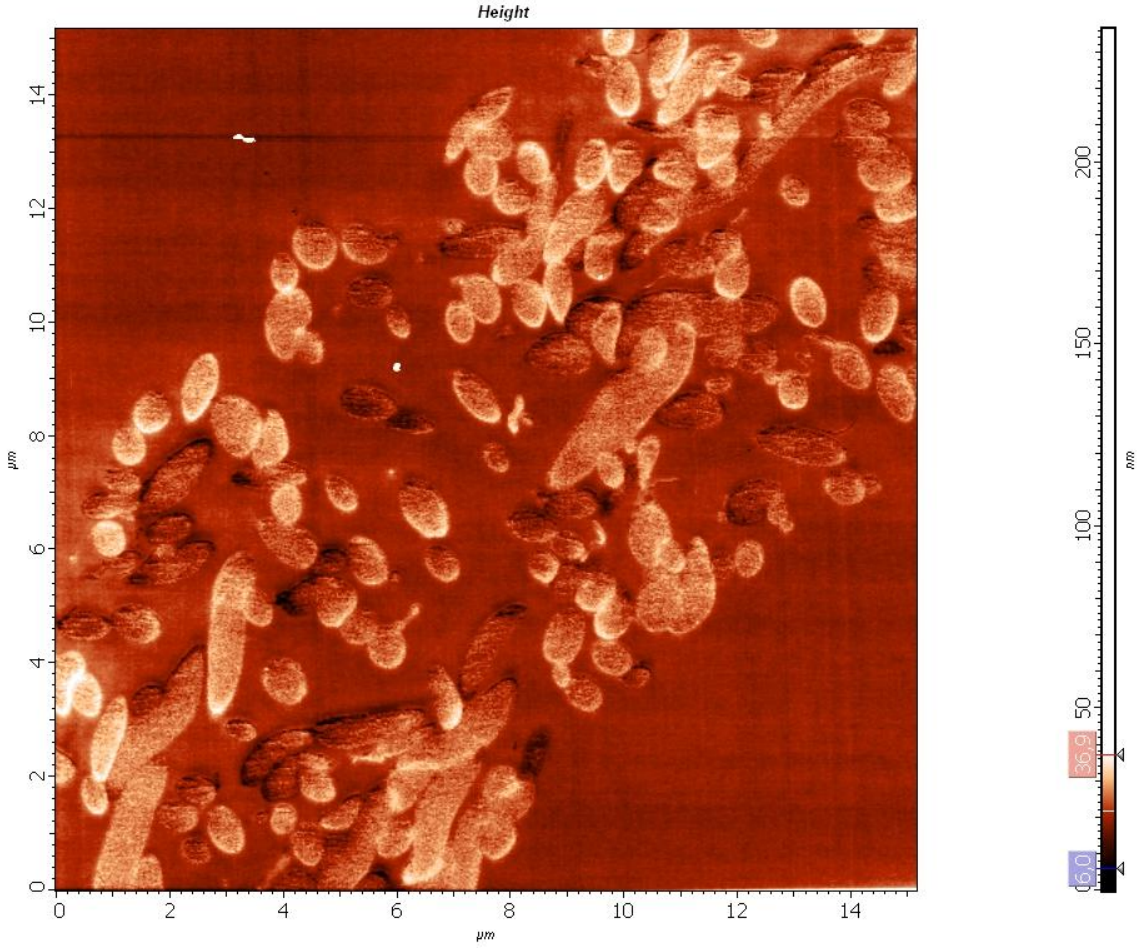


Рисунок 75 – Зондово-микроскопическое изображение поверхности поперечного среза образца биодеградируемого скаффолда, полученного методом электроспиннинга, после среза ультрамикротомом: размер скана 15×15 мкм^2, диапазон вариации высоты 30 нм

На рисунке 75 выделяются поперечные срезы цилиндрических волокон, пересекающих плоскость сканирования под разными углами. Увеличенное СЗМ изображение (2,0×2,0 мкм^2), представленное на рисунке 76, демонстрирует глобуляные структуры фиброина в объеме волокон с размером наноглобул в диапазоне 10-30 нм [57].

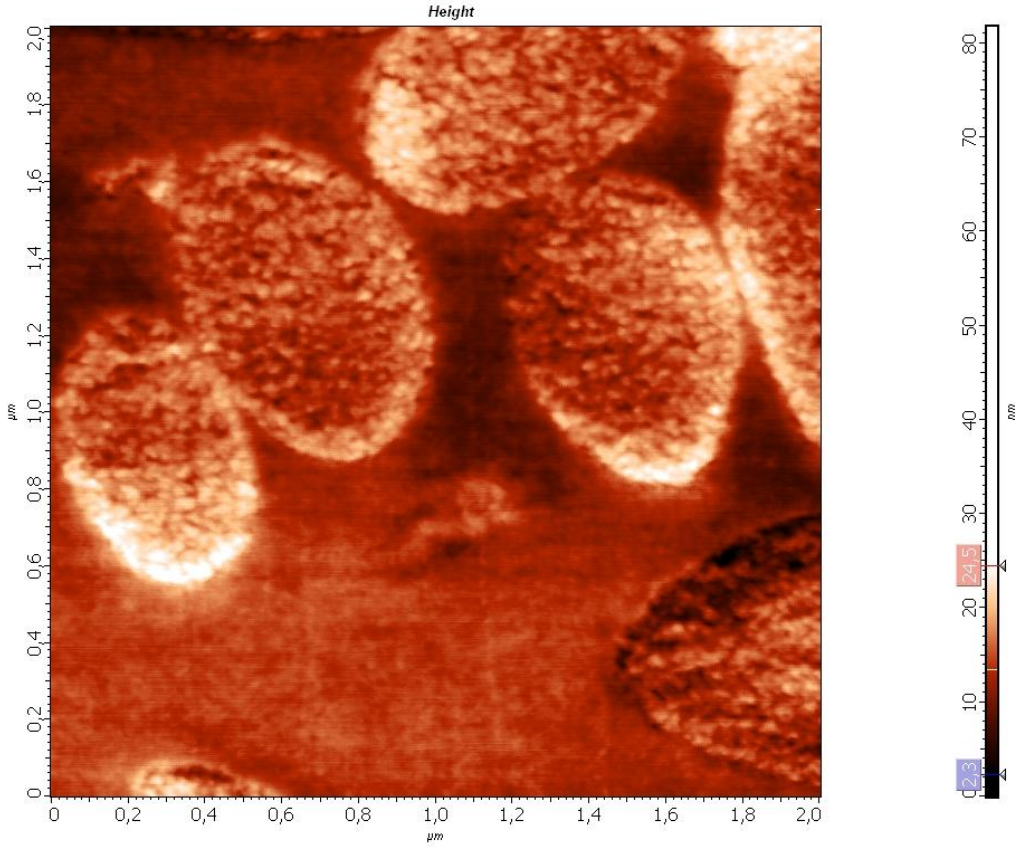


Рисунок 76 – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности поперечного среза образца биодеградируемого скаффолда, полученного методом электроспиннинга, после среза ультрамикротомом: размер скана 2.0×2.0 мкм^2, диапазон вариации высоты 28 нм [57]

Для оценки трехмерной морфологии данного участка биодеградируемого скаффолда была выполнена его трехмерная реконструкция при помощи метода СЗНТ [57]. Для этого было выполнено 15 последовательных срезов образца толщиной 150 нм и получено 15 последовательных АСМ-изображений участка скаффолда размером 16×16 мкм^2. Полученная визуализация трехмерной структуры скаффолда показана на рисунке 77.

Выполненная трехмерная реконструкция позволяет при помощи программного пакета Image Pro AMS 6.0 (MedyaCybernetics, Inc., США) напрямую определить такие важные параметры трехмерной морфологии скаффолда, как его объемная пористость и отношение поверхности к объему. Для данного скаффолда коэффициент объемной пористости составляет 81,3% при средней величине отношения поверхности к объему 37.2 мкм$^{-1}$. Столь высокие

значения данных параметров позволяют предположить высокую эффективность использования скаффолдов такого типа для целей регенеративной медицины.

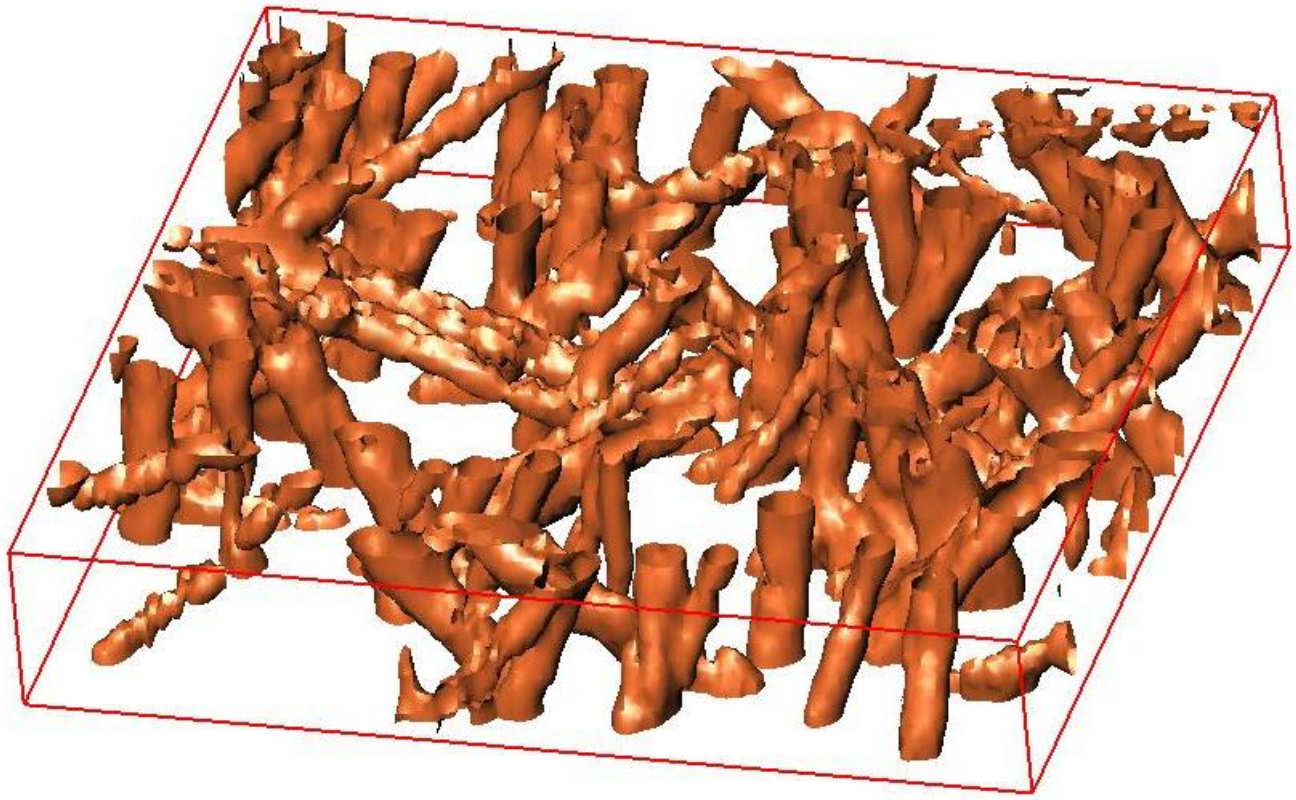


Рисунок 77 – Трехмерная реконструкция методом сканирующей зондовой нанотомографии фрагмента биодеградируемого скаффолда, полученного методом электроспиннинга: реконструированный объем – 13,7×12,7×2,25 мкм, 15 срезов толщиной 150 нм [57]

Также выполнено исследование микро- и наноструктуры пористых скаффолдов на основе фиброина шелка, изготовленных с применением техники замораживания-оттаивания. Были проанализированы как композитные скаффолды, в состав которых были включены микрочастицы внеклеточного матрикса печени человека, так и скаффолды без включений. На рисунке 78 приведено изображение среза пористого биодеградируемого скаффолда, полученное методом флуоресцентной оптической микроскопии.

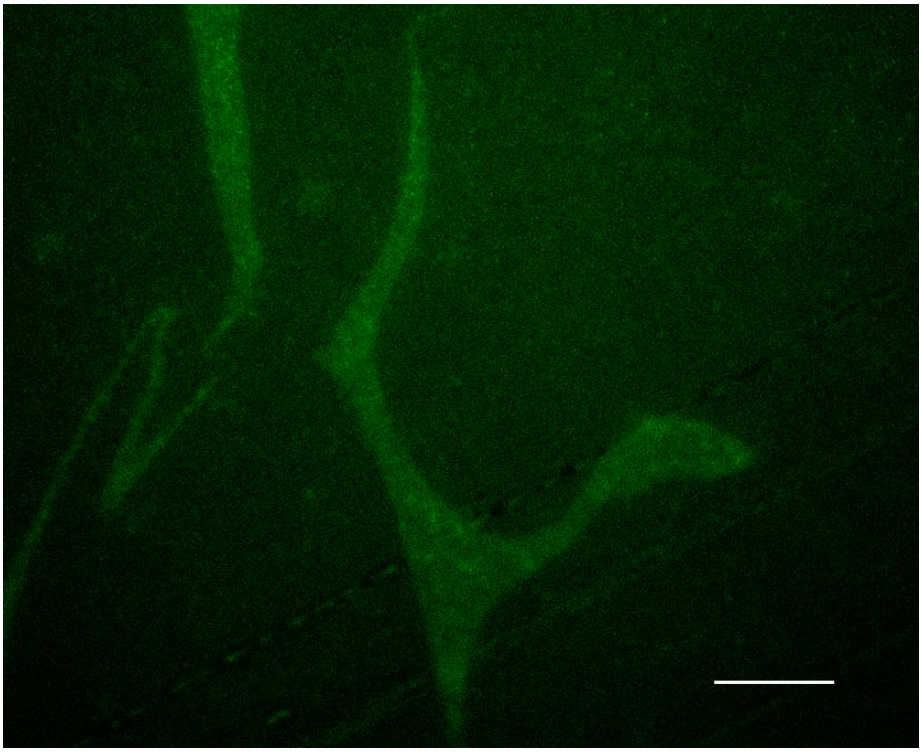


Рисунок 78 – Флуоресцентное оптическое изображение среза пористого биодеградируемого скаффолда на основе фиброина шелка, изготовленного при помощи техники замораживания-оттаивания, размерный отрезок 10 мкм

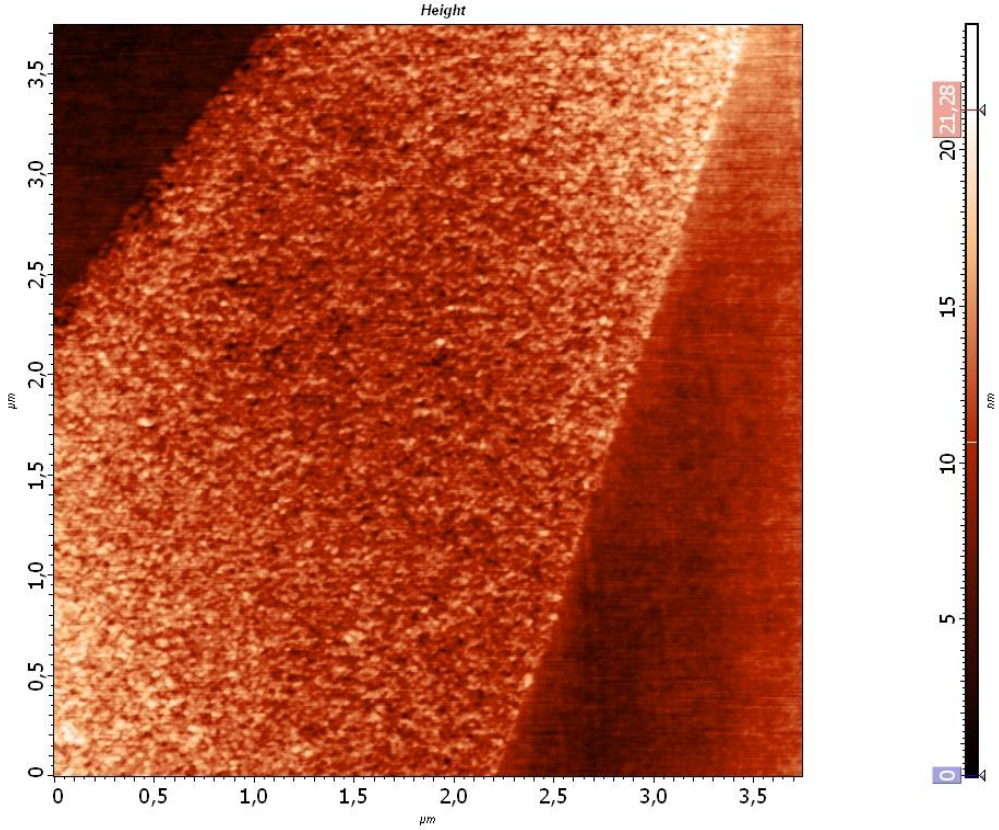


Рисунок 79 – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной печени человека: размер скана 3,7×3,7 мкм^2, диапазон вариации высоты 21 нм

На изображении можно выделить срезы стенок пористого скаффолда на основе фиброина шелка толщиной в несколько микрон. На рисунке 79 представлено СЗМ-изображение поверхности поперечного среза стенки пористого скаффолда из фиброина шелка. Данное изображение дает возможность охарактеризовать его внутреннюю структуру, состоящую из наноразмерных глобул. СЗМ-изображение более высокого разрешения позволяет определить размеры наблюдаемых глобул в диапазоне от 20 до 30 нм (рисунок 80).

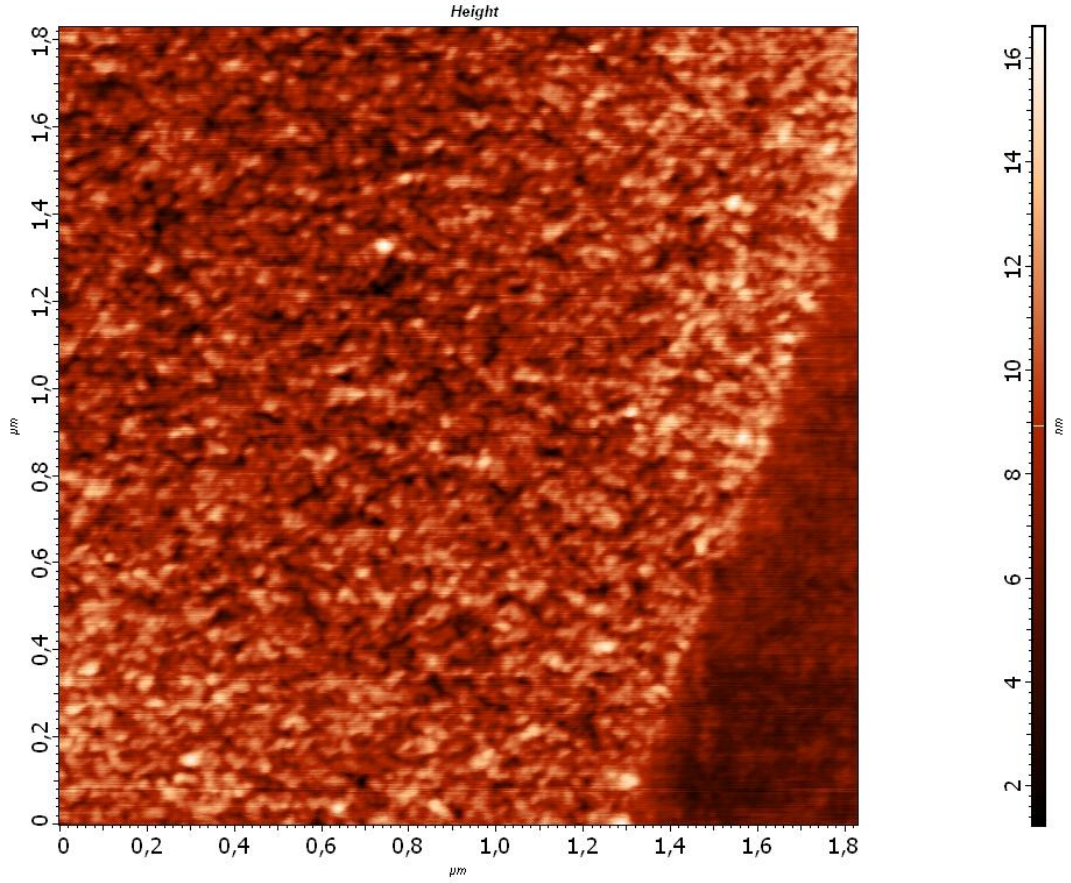


Рисунок 80 – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной печени человека: размер скана 1,8×1,8 мкм^2, диапазон вариации высоты 15 нм

Использование технологии сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии позволяет проводить корреляционный анализ распределений микровключений, меченых флуоресцентными маркерами, в объеме биоматериалов.

На рисунке 81 приведено изображение среза биодеградируемого композитного скаффолда с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, полученное методом флуоресцентной оптической микроскопии. На данном изображении идентифицируются микрочастицы внеклеточного матрикса, характеризующиеся более яркой флуоресценцией за счет окраски красителем FITC.

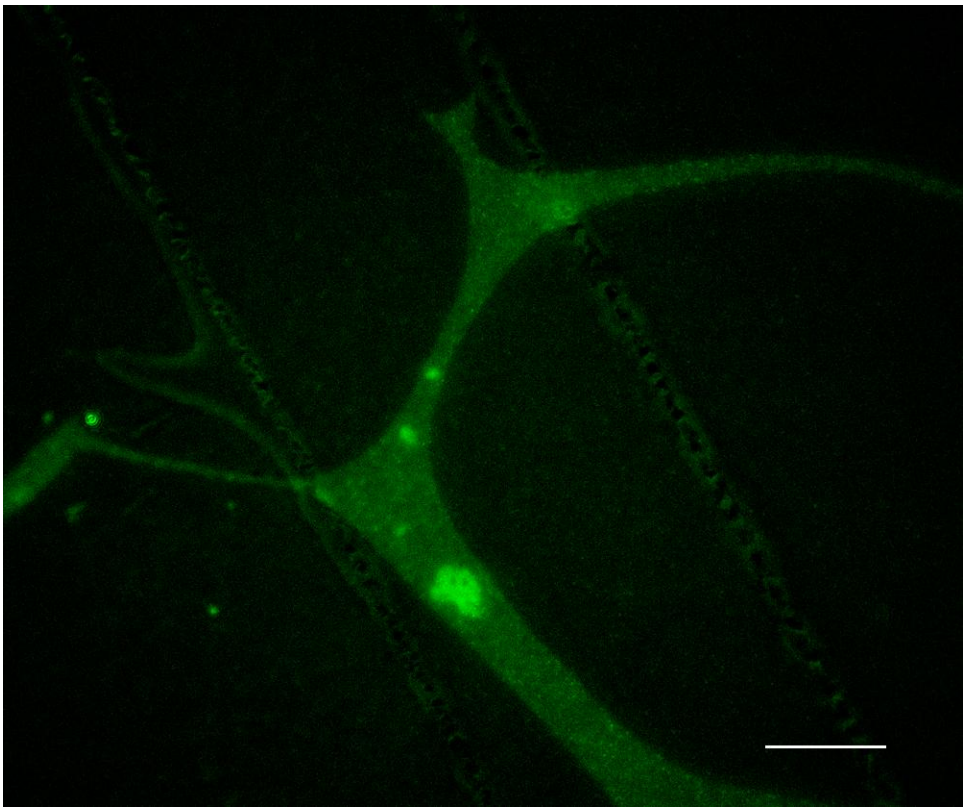


Рисунок 81 – Флуоресцентное оптическое изображение среза биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека, размерный отрезок 10 мкм

На рисунках 82, 83 приведены СЭМ-изображения поверхности среза биодеградируемого композитного скаффолда, на которых можно выделить микрочастицы децеллюляризованной печени человека. Размер детектируемых микрочастиц составляет от 0,5 до 1,2 мкм. Также полученные данные позволяют визуализировать наноструктуру микрочастиц внеклеточного матрикса в составе скаффолдов.

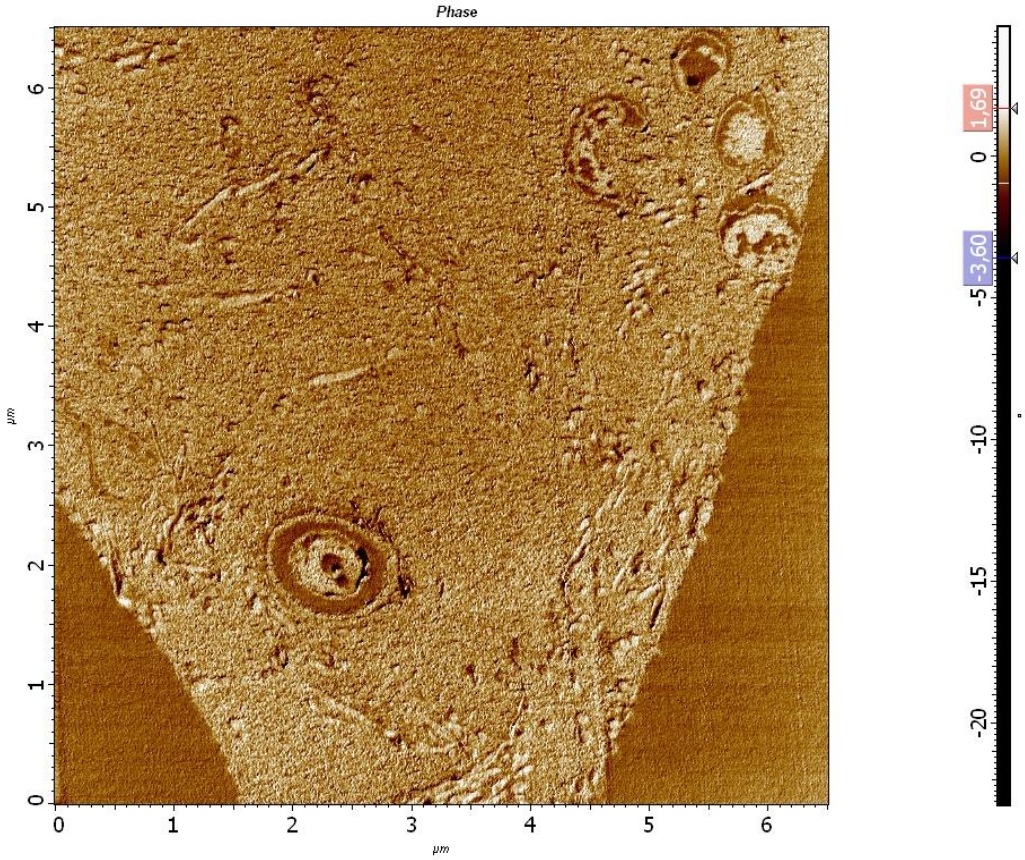


Рисунок 82 – Зондово-микроскопическое изображение поверхности среза композитного скаффолда на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека в режиме отображения фазы: размер скана 6,4×6,4 мкм^2, диапазон вариации фазы 5.3°

Применяемый метод флуоресцентной сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии позволяет выполнять корреляционный анализ структуры биоматериалов на основе данных флуоресцентной оптической микроскопии и сканирующей зондовой нанотомографии. На рисунке 84 приведены коррелятивные флуоресцентное и СЗНТ-изображения участка скаффолда, включающего микрочастицу внеклеточного матрикса печени человека.

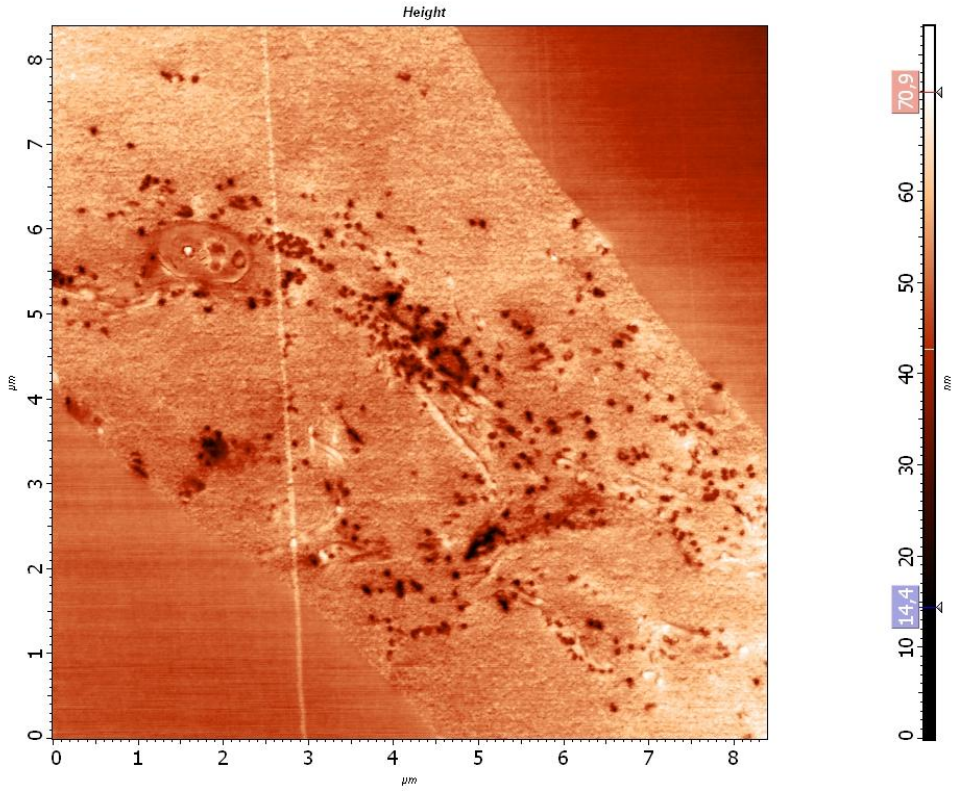


Рисунок 83 – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброина шелка с включенными в состав микрочастицами децеллюляризованной печени человека: размер скана 8,3×8,3 мкм, диапазон вариации высоты 55 нм

Трехмерная реконструкция данного участка скаффолда была выполнена при помощи метода СОЗНТ на основе 10 последовательных АСМ-изображений размером 10,0×10,0 мкм^2, полученных после последовательных сверхтонких (80 нм) срезов образца ультрамикротомом. Визуализация трехмерных данных позволяет определить особенности морфологии микрочастицы внеклеточного матрикса.

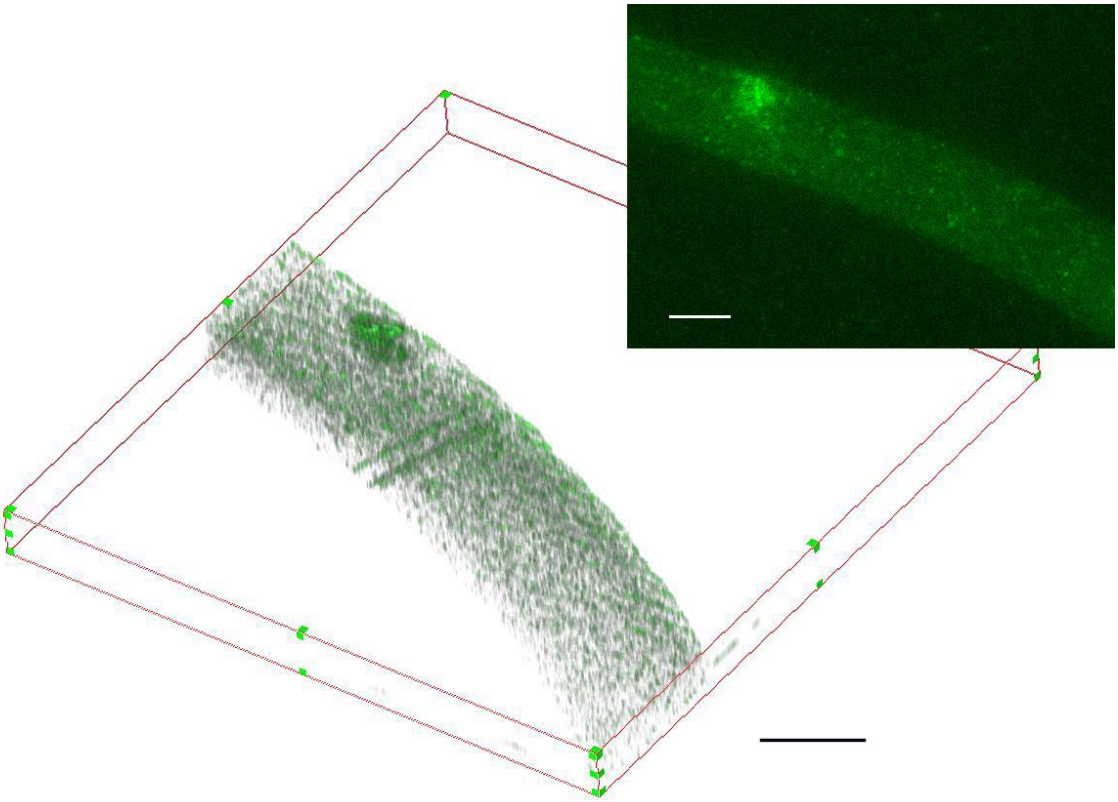


Рисунок 84 – Коррелятивные флуоресцентное изображение и трехмерная зондово-нанотомографическая -реконструкция участка биодеградируемого композитного скаффолда на основе фиброина шелка, включающего микрочастицу децеллюляризованной печени человека: 8,0×8,0×0,8 мкм^3, толщина среза 80 нм. Размерные отрезки 2 мкм

Отработанная методика исследования наномасштабных структур биодеградируемых композитных скаффолдов при помощи сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии применима для исследования трехмерных распределений биологически активных микро- и наночастиц в объеме скаффолдов и изучения особенностей их трехмерной структуры на микро- и наноуровне.

7.2 Структура образцов на основе лиофилизированных фрагментов децеллюляризованной ткани печени человека

Структура полученных лиофилизированных фрагментов межклеточного матрикса печени человека (см. раздел 2.2) была проанализирована с использованием сканирующей электронной микроскопии (рисунок 85).

Полученные СЭМ-изображения демонстрируют разветвленную высокопористую структуру фрагментов межклеточного матрикса печени человека с порами различных размеров. Средний размер макропор лежит в диапазоне 18-20 мкм. Структура лиофилизированного фрагмента межклеточного печени человека характеризуется менее разветвлённой системой пор, система микропор развита слабо, средний размер макропор составляет 20 мкм. Также стоит отметить более плотную структуру лиофилизированного матрикса по сравнению с рыхлой структурой децеллюляризованной ткани нативной печени.

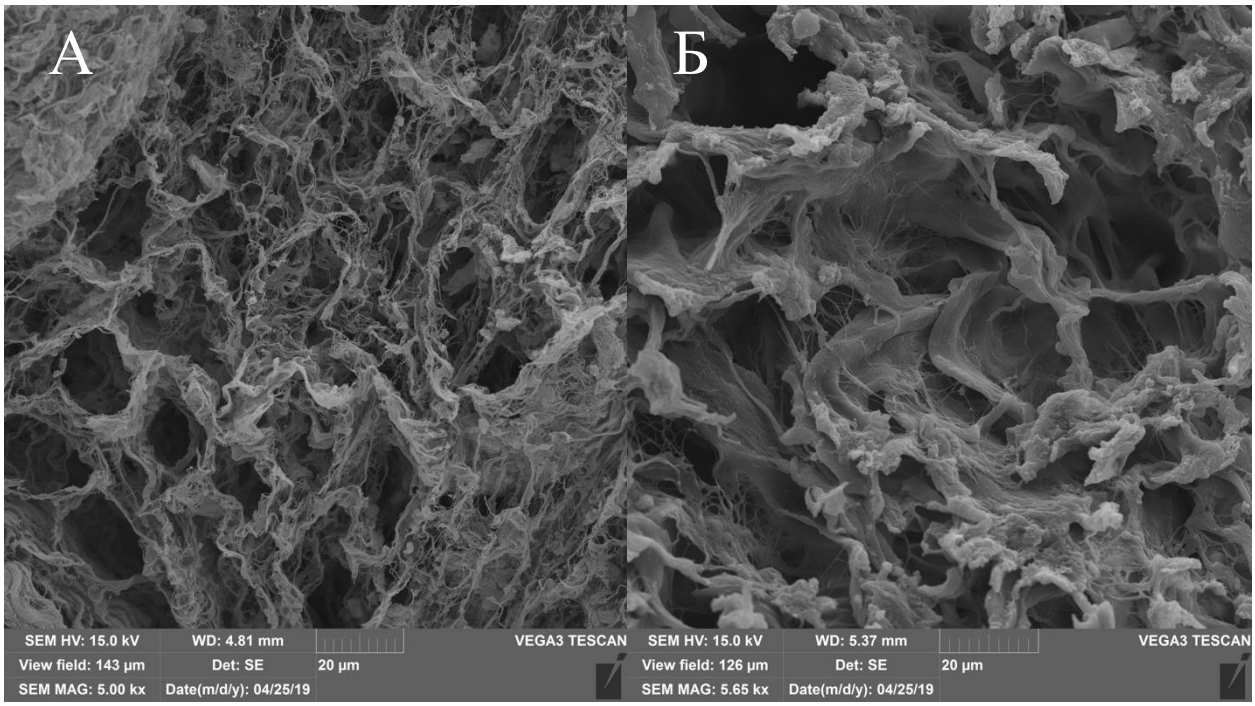


Рисунок 85 – Изображения поверхности образцов, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. А – изображение фрагмента внеклеточного матрикса ткани печени человека, Б – изображение поверхности лиофилизированного фрагмента внеклеточного матрикса печени человека

Был выполнен анализ наноструктуры полученных фрагментов децеллюляризованной ткани печени методами СЗНТ. Результаты СЗМ-анализа подтвердили данные, полученные с применением 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 (рис. 86Б, В). Также были показаны фрагменты сохранившегося капиллярного русла после децеллюляризации ткани.

На рисунке 86В приведено СЗМ-изображение поверхности среза фрагмента децеллюляризованной ткани печени человека после лиофилизации. Аналогично данным СЭМ, поверхность лиофилизированного матрикса характеризуется более плотной структурой по сравнению с матриксом без лиофилизации.

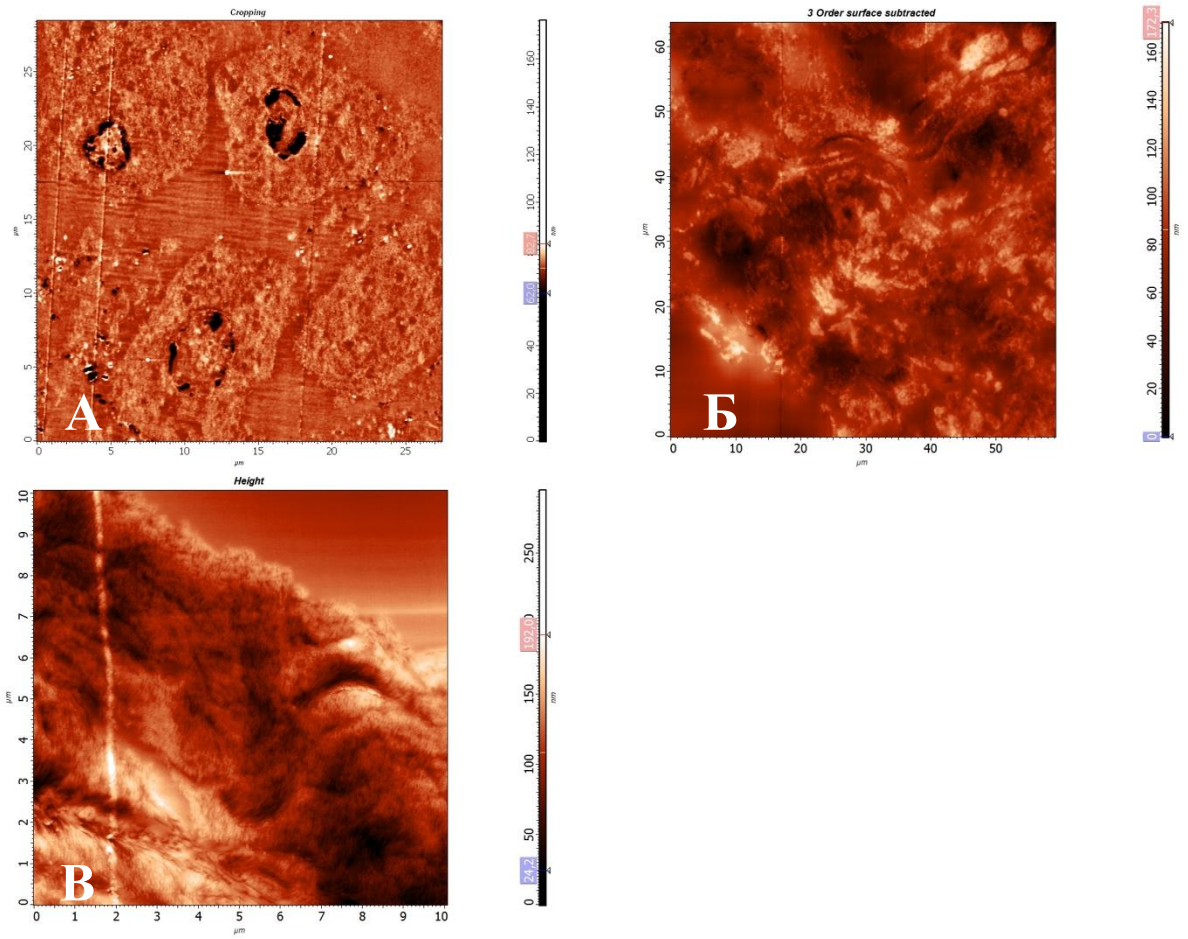


Рисунок 86 – Зондово-микроскопические изображения поверхностей образцов после среза ультрамикротомом: А – срез исходного образца ткани печени человека (28х28 мкм, диапазон вариации высоты 20 нм), Б – срез фрагмента децеллюляризованной ткани печени человека (63х63 мкм, диапазон вариации высоты 172 нм), В – срез образца фрагмента децеллюляризованной ткани печени человека после лиофилизации (10×10 мкм, диапазон вариации высоты 168 нм)

На рисунке 87А показана трехмерная реконструкция децеллюляризованного межклеточного матрикса ткани печени человека. Реконструированный объем

составил 57.0×50.0×6.0 мкм. Количественный анализ полученных трехмерных данных показал, что структура является высокопористой (степень объемной пористости 72.8 ± 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 87Б показана трехмерная реконструкция фрагмента децеллюляризованного внеклеточного матрикса ткани печени человека после лиофилизации. В данном случае объем реконструкции составил 54.3×53.0×6.0 мкм. Степень объемной пористости лиофилизированного матрикса составляет 60.5±8.2%, в то время как наношероховатость поверхности – 312.2 ± 42.4 нм. Снижение величин наношероховатости 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$^{-1}$.

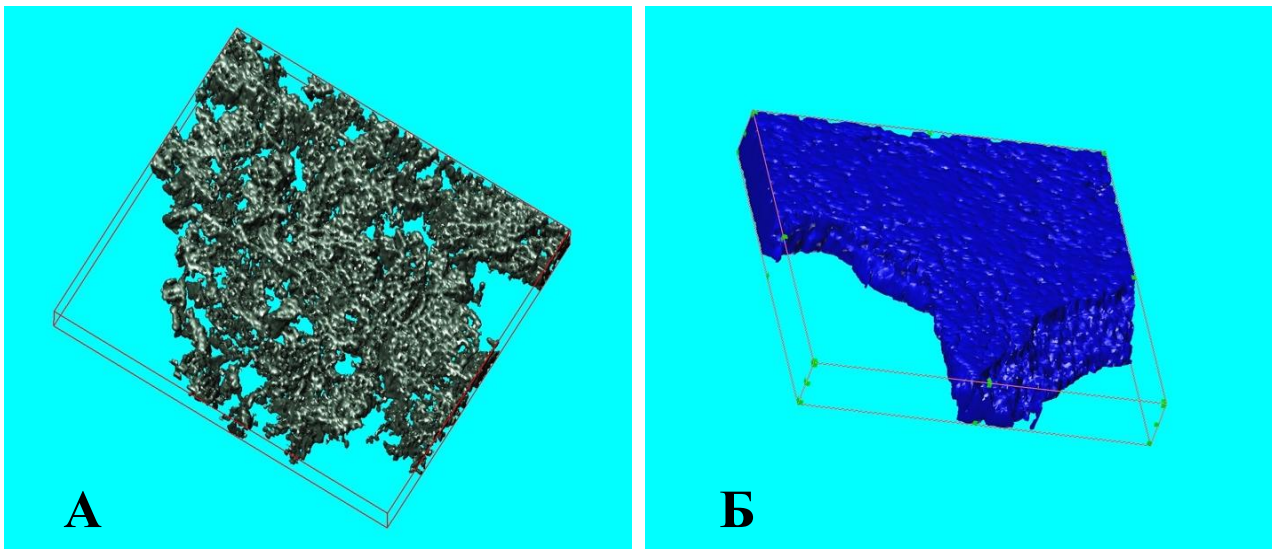


Рисунок 87 – Визуализации трехмерной структуры при помощи сканирующей зондовой нанотомографии: А – децеллюляризованная ткань печени человека, объем реконструкции – 57,0×50,0×6,0 мкм, 15 срезов толщиной 400 нм; Б – лиофилизированный фрагмент децеллюляризованной ткани печени человека, объем реконструкции – 54,3×53,0×6,0 мкм, 15 срезов толщиной 400 нм

7.3 Анализ наноструктурных особенностей пленок на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека

Пленки на основе фиброина шелка с включенными микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека были получены с использованием методик, приведенных в разделе 2.4.

Далее был выполнен анализ объемной микро- и наноструктуры полученных композитных скаффолдов, с применением технологии сканирующей зондовой нанотомографии. На рисунке 88 приведены СЗМ-изображения поверхности попоперечных срезов скаффолдов.

Микрочастицы децеллюляризованной ткани печени человека детектировались как на поверхности, так и в объеме фиброиновых пленок. Таким образом, часть микрочастиц может взаимодействовать с адгезирующимися на пленку клетками еще до начала процесса биодеградации, что указывает на эффективность метода получения композитных скаффолдов. Адгезия, пролиферация и дифференцировка клеток во многом определяется шероховатостью подложки [217,218,219]. 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 [220].

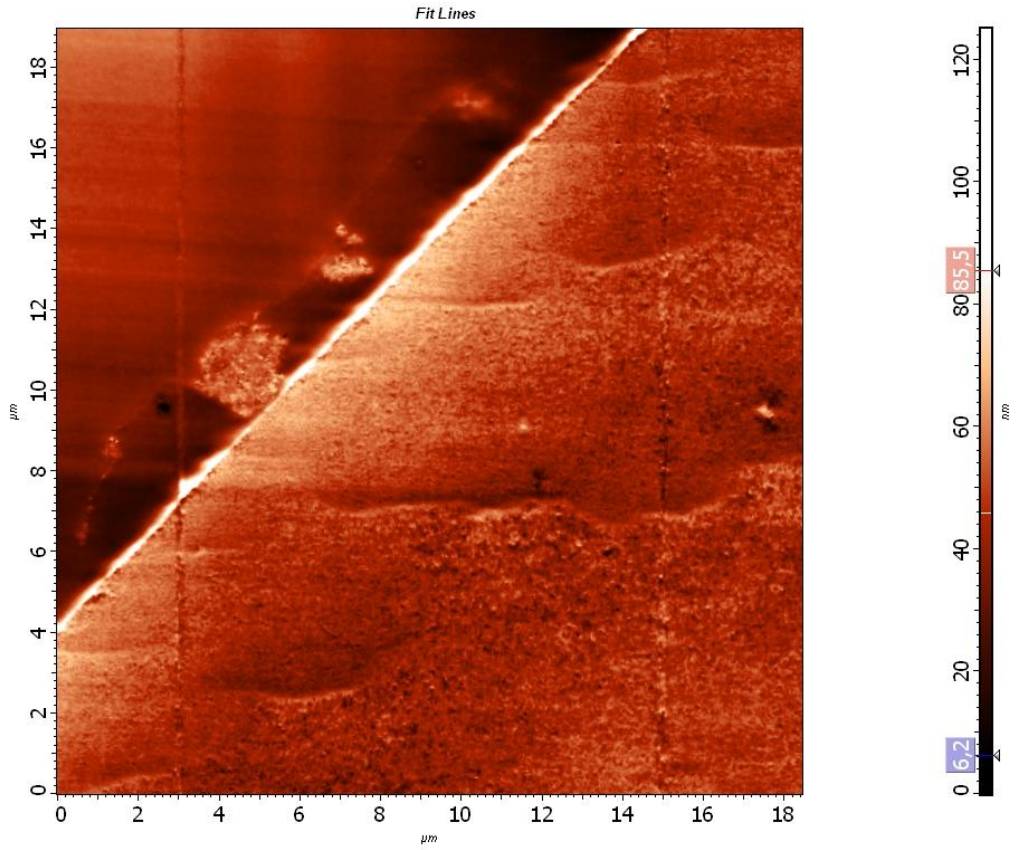


Рисунок 88 – Зондово-микроскопическое изображение поверхности поперечного среза пленки на основе фиброина шелка, с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека (область сканирования 18 × 19 мкм)

Количественный анализ полученных СЗМ-данных показал, что при добавлении микрочастиц внеклеточного матрикса печени шероховатость поверхности пленок возрастает до 5-кратного уровня. Полученные данные о шероховатости поверхностей пленок приведены в таблице 2.

Для количественного анализа наноструктурных особенностей пленки с микрочастицами были произведены их трехмерные СЗНТ-реконструкции. На рисунке 89 приведен пример трехмерной реконструкции участка пленки с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека на поверхности.

Таблица 2 Средняя шероховатость поверхности пленок (n = 6)

Состав пленки	**Средняя шероховатость R_a, нм**
фиброин шелка	36,5±10,6
фиброин шелка, с включенными в состав микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека	225,0±45,0

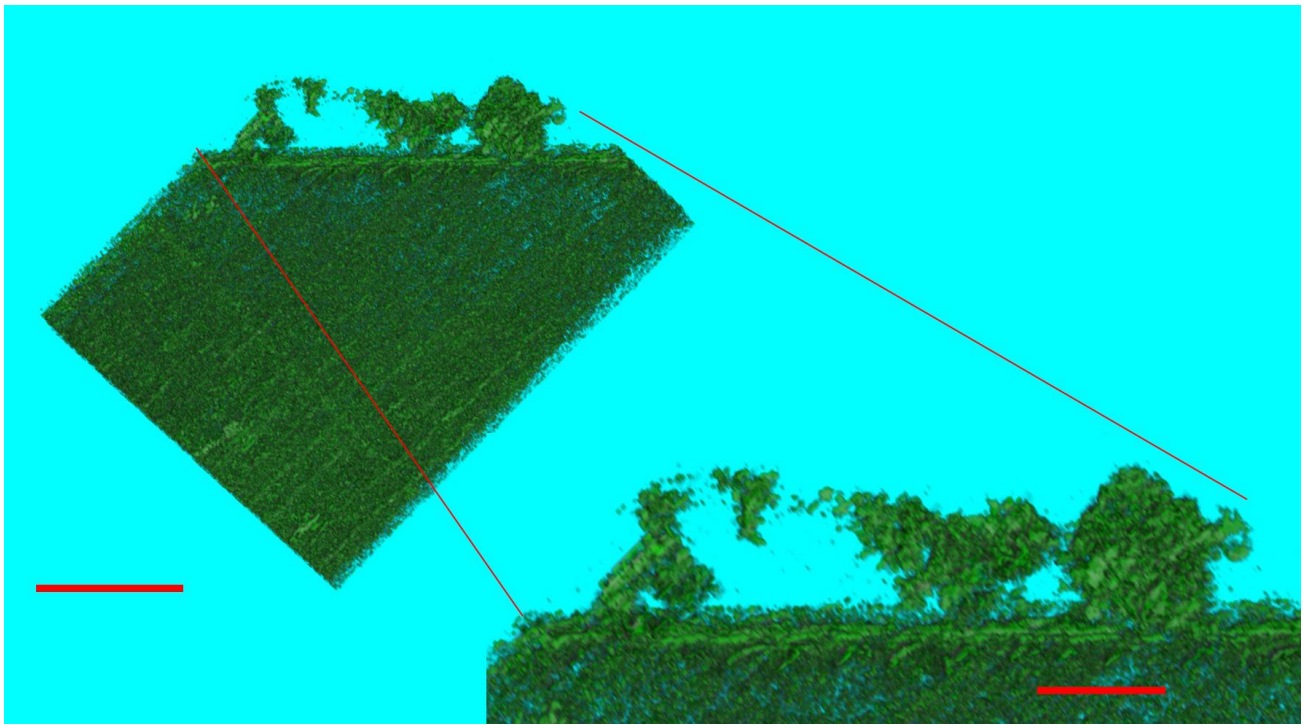


Рисунок 89 – Трехмерная реконструкция структуры скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с микрочастицами децеллюляризованной ткани печени человека (реконструированный объем 16,00 × 13,30 × 2,55 мкм, 17 срезов толщиной – 150 нм, размерный отрезок – 5 мкм, размерный отрезок на вставке – 2 мкм)

Полученные трехмерные данные позволили также напрямую рассчитать отношение объема микрочастиц децеллюляризованной ткани печени человека к объему фиброиновой пленки, которое составило 1.2%±0,4.

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 с использованием методики, описанной в разделе 2.16.

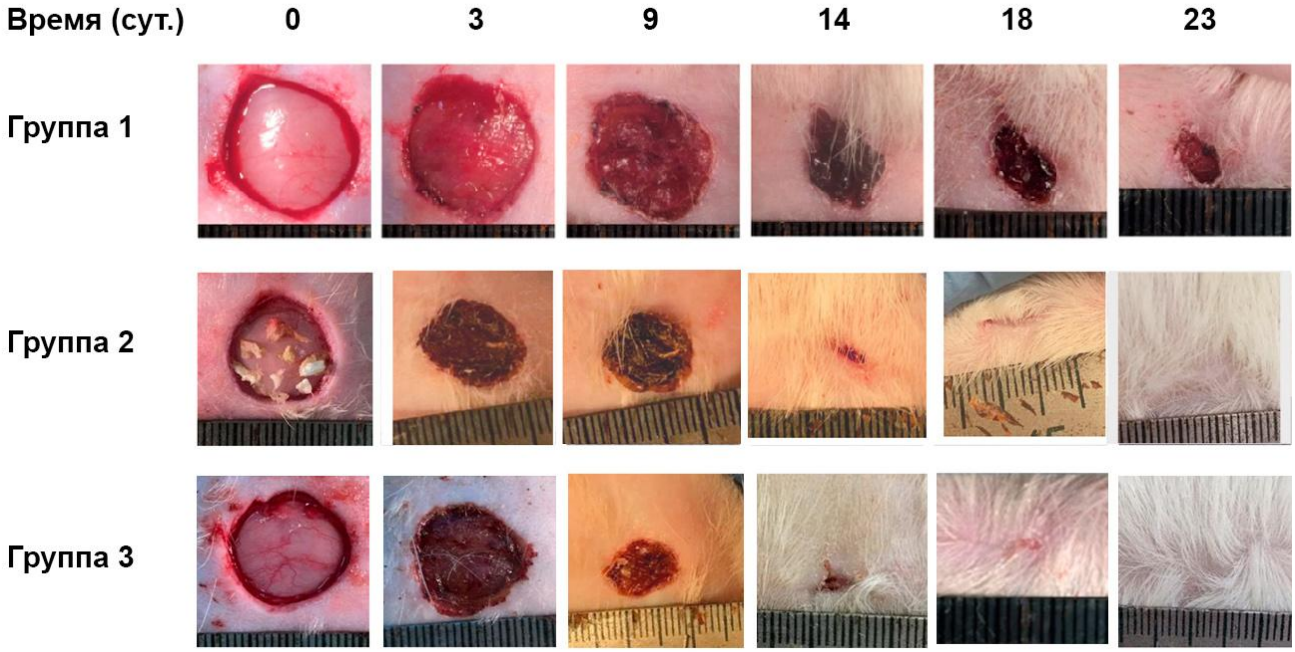


Рисунок 90 – Фотографии ран кожи крыс породы Вистар в зависимости от времени после начала эксперимента. Группа 1: контроль; группа 2: в качестве раневого покрытия использовали лиофилизированные фрагменты децеллюляризованной печени человека; группа 3: в качестве раневого покрытия использовали пленки на основе фиброина шелка с микрочастицами внеклеточного матрикса печени человека

На рисунке 90 представлены фотографии ран, полученные в ходе эксперимента. 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.

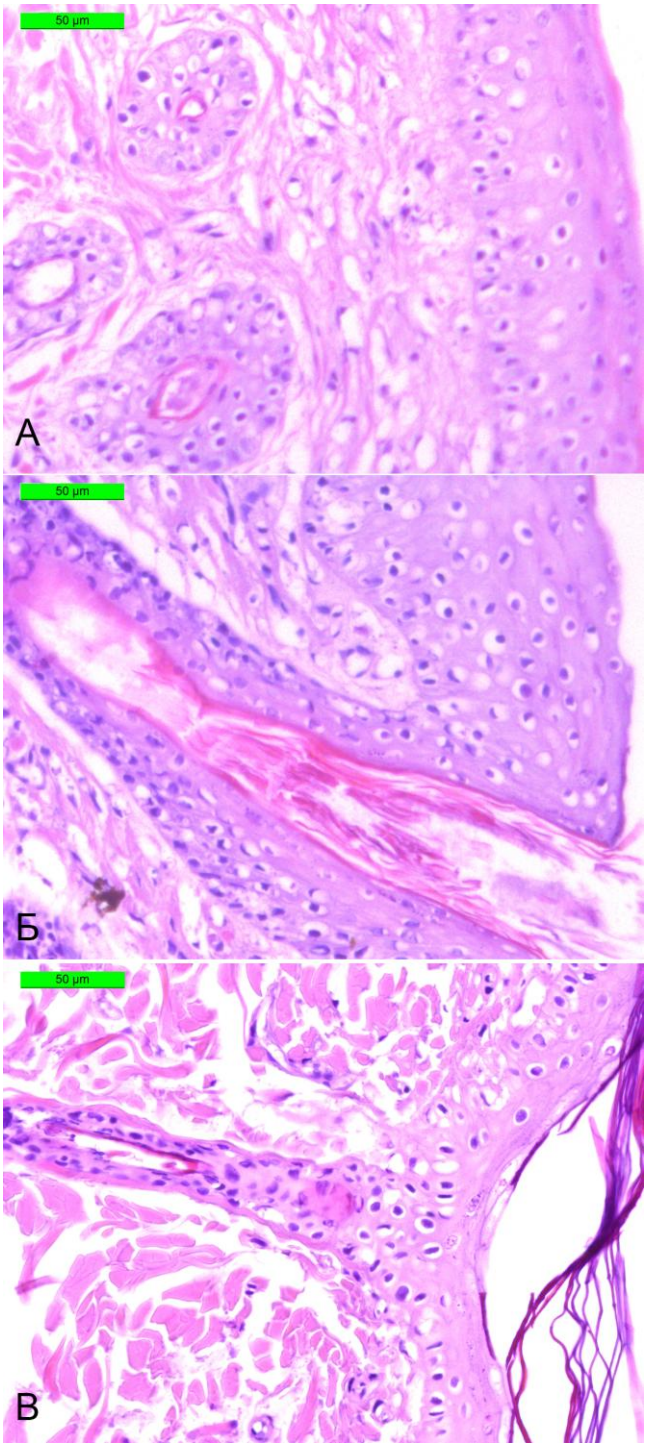


Рисунок 91 – Гистологический анализ кожных срезов после заживления полнослойных ран (окраска гематоксилином и эозином, размерный отрезок 50 мкм). А – группа 1 (контроль)[98], 40 суток; Б – группа 2, 18 суток; В – группа 3

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 91). Полученные данные свидетельствуют о достижении полного заживления ран на данных сроках. 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.

7.4 Трехмерный коррелятивный анализ распределения флуоресцентных маркеров, микро- и наноструктуры конструкций на основе скаффолдов, содержащих мышиные фибробласты 3T3, и конструкций на основе скаффолдов, содержащих клетки гепатокарциномы человека HepG2

В ходе выполнения работы была выполнен анализ образцов клеток линий мышиных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G2 на скаффолдах из фиброина шелка. Образцы были получены с применением методик, описанных в разделе 2.6.

На рисунке 92 приведено флуоресцентное изображение среза образца, скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем фибробластами, стрелкой указан фибробласт, выбранный для дальнейшего трехмерного анализа. Данный фибробласт был выбран исходя из оптимальных морфологических параметров адгезии и контакта с соседними клетками.

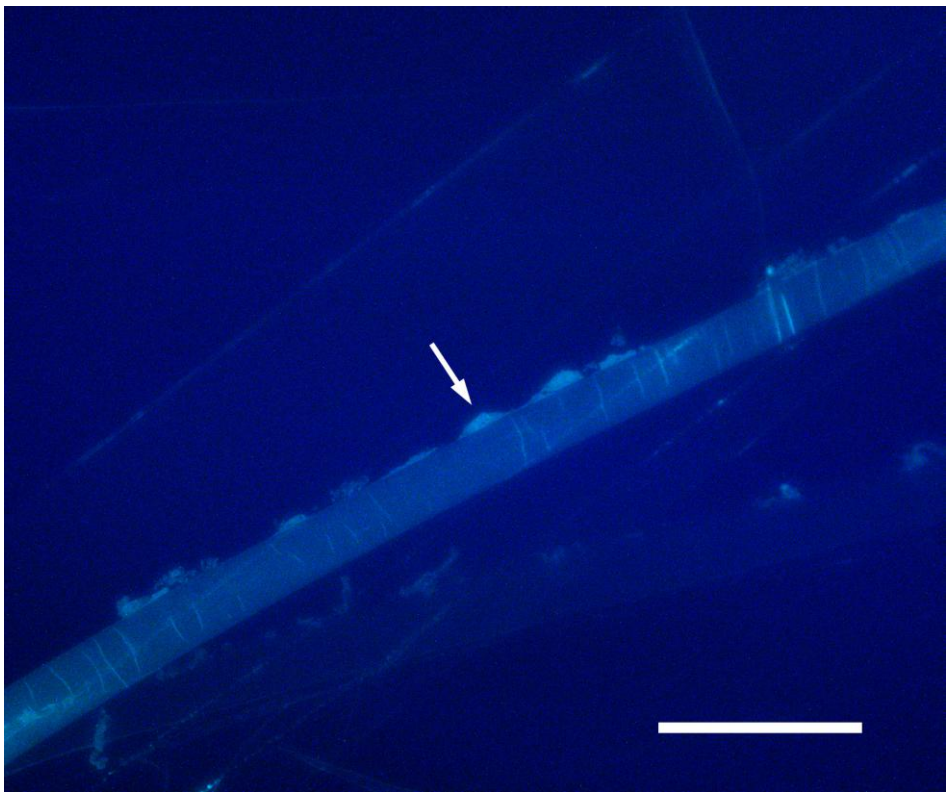


Рисунок 92 – Флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем мышиными фибробластами 3T3, окрашивание FITC, увеличение ×200, размерный отрезок – 100 мкм

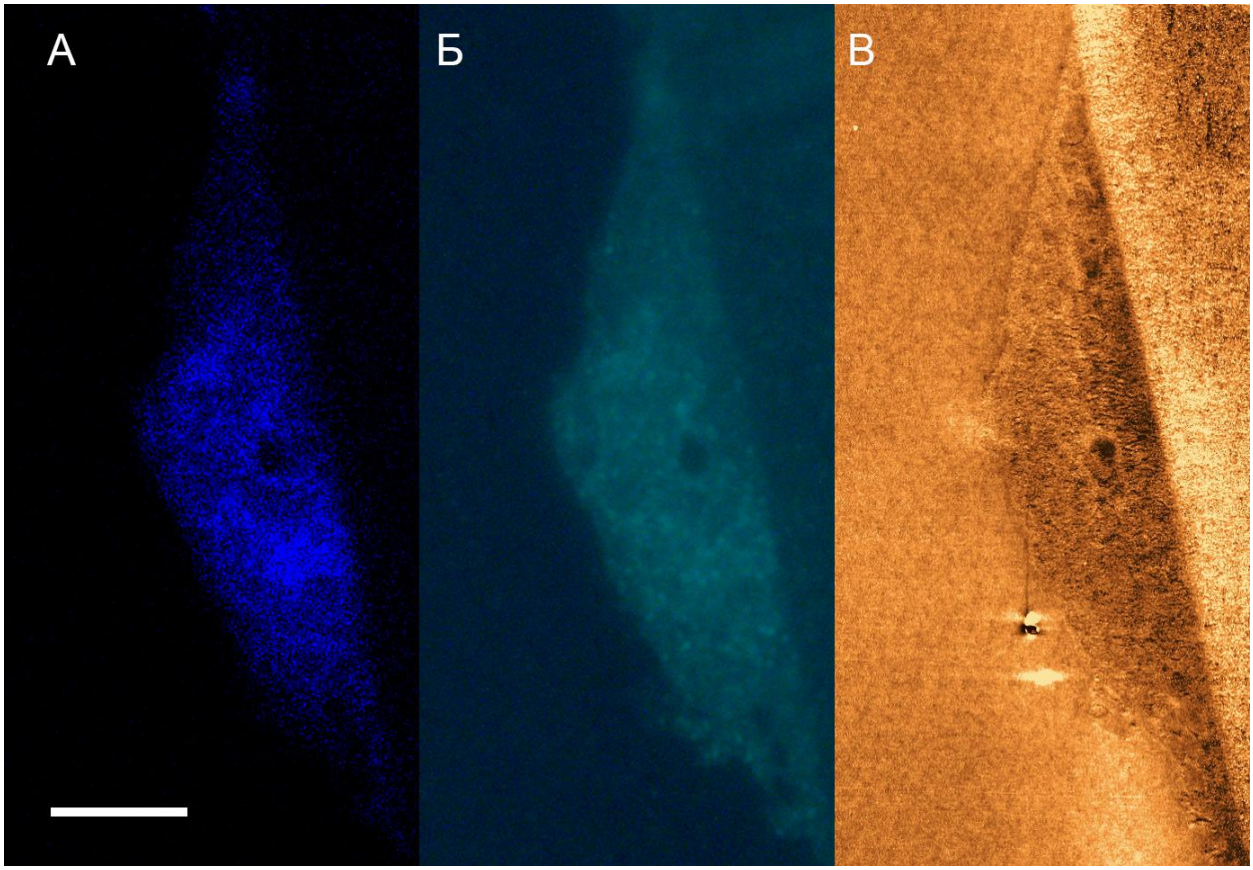


Рисунок 93 – Анализ образцов фибробластов 3T3, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. А – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированным фибробластом, окрашивание DAPI, увеличение ×1000: размер скана 32×15.4 мкм, размерный отрезок – 5 мкм; Б – коррелятивное флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированным фибробластом, окрашивание FITC, увеличение ×1000; В – коррелятивное зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированным фибробластом, диапазон вариации высоты 15 нм

На рисунке 93 представлены результаты коррелятивных измерений выбранного фибробласта – флуоресцентные изображения высокого разрешения, отображающие окрашивания DAPI и FITC и СЗМ-изображение того же участка клетки, адгезированной на скаффолд. По результатам анализа помимо ядра в клетке были обнаружены множественные включения белковой природы.

Анализ поверхности среза при помощи СЗМ позволяет значительно повысить разрешение по сравнение с оптическими методами. На рисунке 94 приведено СЗМ-изображение участка клетки, полученное в режиме отображения

фазы, которое позволяет выделить развитую систему мембран внутри клетки, в том числе мембрану клетки и мембрану ядра. Данное изображение также позволяет сделать вывод о том, что фибробласт образует плотный контакт со скаффолдом на основе фиброина шелка.

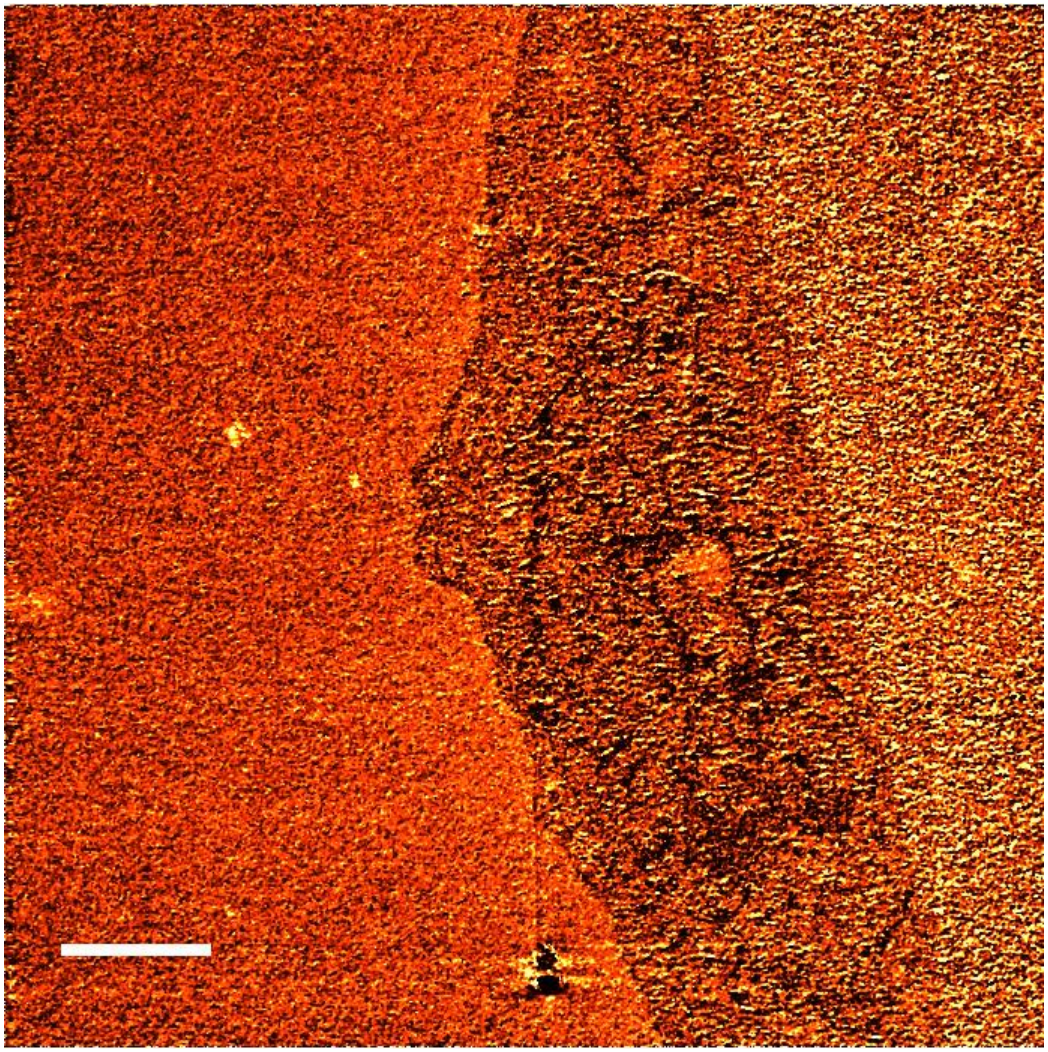


Рисунок 94 – Зондово-микроскопическое изображение поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированным фибробластом, метод отображения фазы; размер скана 15.0×15.0 мкм, размерный отрезок 2 мкм

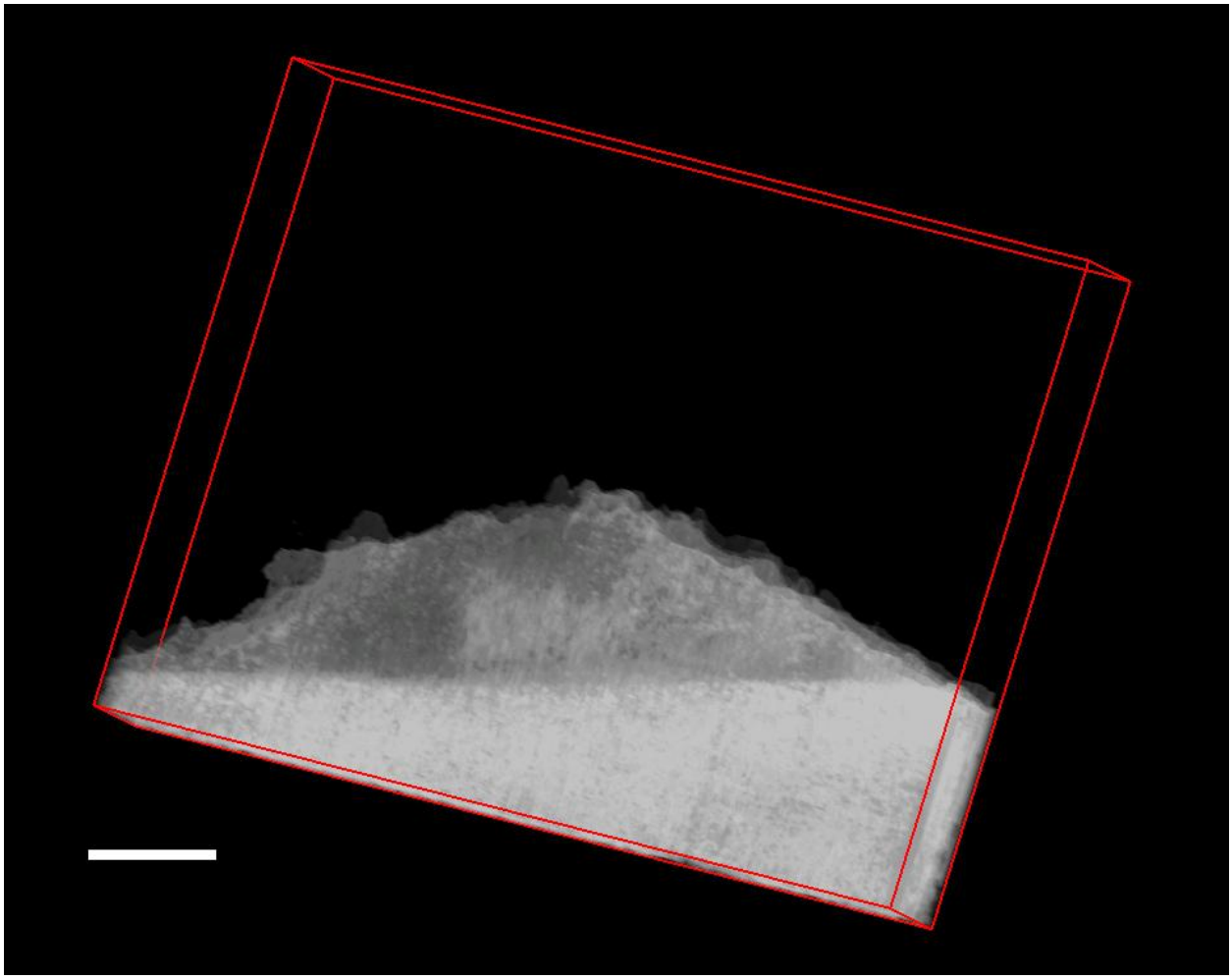


Рисунок 95 – Трехмерная зондово-нанотомографическая реконструкция фибробласта, адгезированного на скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, 31.0 ×25.0×2.4 мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм

Трехмерный анализ морфологии фибробласта, адгезированного на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка в виде пленки был выполнен при помощи метода СЗНТ.

Для трехмерной реконструкции фрагмента фибробласта было получено 16 последовательных СЗМ-изображений участка скаффолда с адгезированным фибробластом после последовательных срезов образца толщиной 150 нм. Размер каждого СЗМ-изображения составлял 32.0×32.0 мкм при растровом сканировании 512×512 точек. Полученная при помощи программного пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (MediaCybernetics Inc.) визуализация трехмерной структуры фибробласта показана на рисунке 95.

Совокупность данных, полученных в результате трехмерной реконструкции методом СОЗНТ, дает возможность вычислить ряд морфологических параметров изучаемых клеток, таких как средняя шероховатость поверхности клетки R_a, эффективная площадь поверхности σ и длина автокорреляции поверхности клетки L_1. Разработанные нами алгоритмы вычисления этих параметров на основе данных СЗНТ подробно описаны в [61]. Стоит отметить, что данные трехмерные параметры невозможно вычислить из двумерных данных, получаемых при помощи стандартных методов СЗМ, флуоресцентной или электронной микроскопии. Шероховатость поверхности клеточной мембраны является важным цитологическим параметром, задействованным в ряде клеточных механизмов, включая клеточную подвижность, адгезию и межклеточные контакты [121,122,123]. Она может служить чувствительным индикатором состояния клетки [124,125,126].

Параметры σ и L_1 характеризуют степень развитости и характерные латеральные размеры особенностей рельефа поверхности клетки соответственно. Данные параметры также важны для оценки состояния и биологической активности клетки [127].

Параметры, полученные в результате анализа трехмерной структуры фибробласта, адгезированного на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры фибробласта

R_a, нм	146.5 ± 14.8
σ, ед	1.21 ± 0.03
L_1, нм	248 ± 25

Также использованный метод позволяет вычислить максимальную толщину адгезированной клетки как высоту поверхности клетки над поверхностью скаффолда. В данном случае эта величина составляет 6.10 ± 0.1 мкм.

На рисунке 96 приведено флуоресцентное изображение среза образца скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем клетками гепатокарциномы человека Hep-G2, стрелкой указана клетка, для которой был выполнен коррелятивный трехмерный СОЗНТ-анализ.

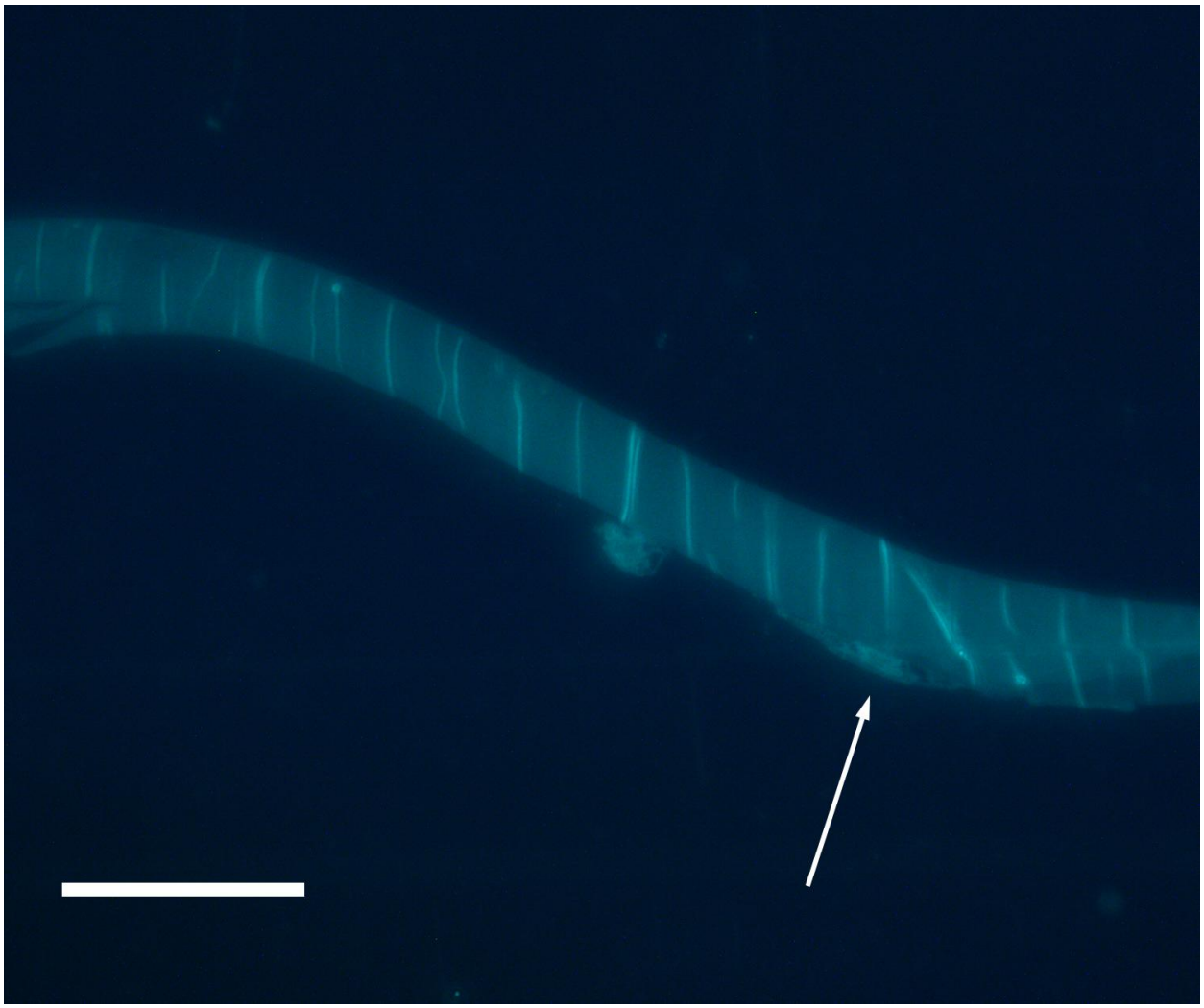


Рисунок 96 – Флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем клетками гепатокарциномы человека Hep-G2, окрашивание FITC, увеличение ×400, размерный отрезок – 50 мкм

Данная клетка характеризуется оптимальными морфологическими параметрами адгезии, что подтверждает ее пригодность для дальнейшего анализа с высоким разрешением.

Полученные коррелятивные флуоресцентные и СЗМ-изображения фрагмента клетки Hep-G2 позволяют выделить оформленное ядро, занимающее значительный внутренний объем клетки, внутри которого выделяются области хроматина, а также белковые структуры (рисунок 97) [100].

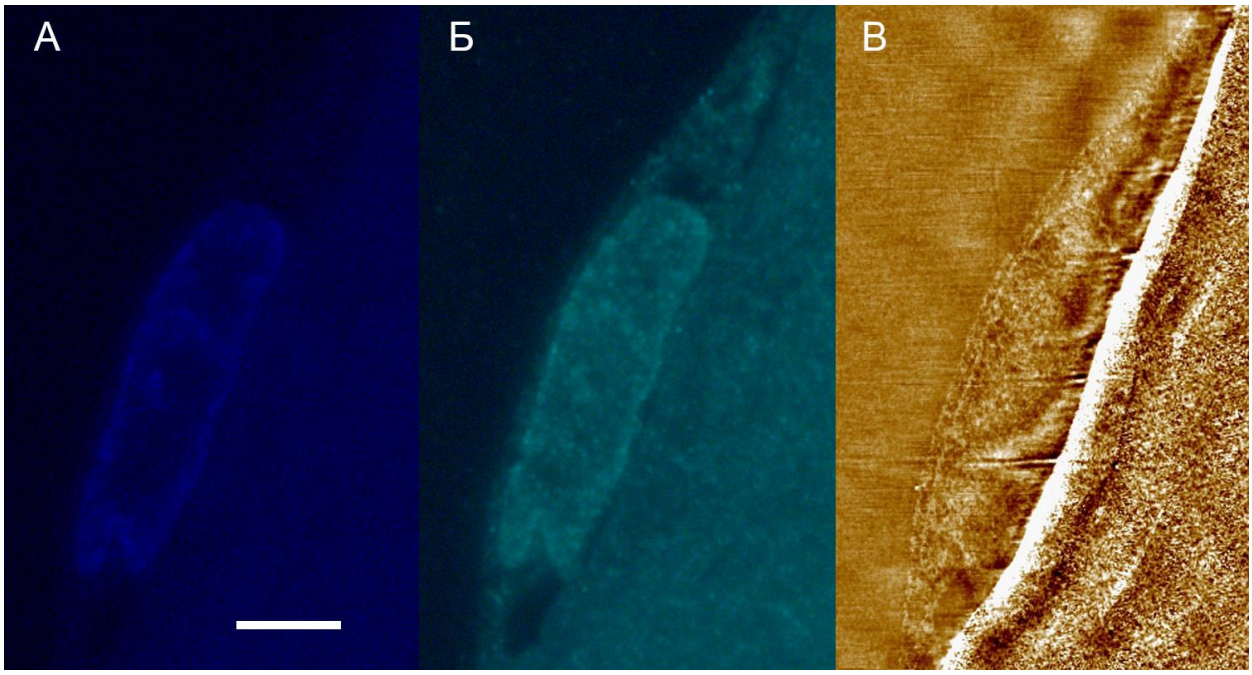


Рисунок 97 – Анализ фрагмента клетки гепатокарциномы человека Hep-G2, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. А – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой Hep-G2, окрашивание DAPI, увеличение ×1000: размер скана 32×20 мкм, размерный отрезок – 5 мкм; Б – коррелятивное флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой Hep-G2, окрашивание FITC, увеличение ×1000; В – коррелятивное зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой Hep-G2, диапазон вариации высоты 9 нм [100]

Трехмерная СЗНТ-реконструкция фрагмента указанной клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 была выполнена на основе 24 последовательных СЗМ-изображений данного участка скаффолда, полученных после последовательных срезов образца толщиной 150 нм. Размер каждого СЗМ-

изображения составлял 32.0×32.0 мкм при растровом сканировании 512×512 точек. На рисунке 98 представлена визуализация трехмерной структуры фрагмента клетки Hep-G2, полученная с использованием программного пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (MediaCybernetics Inc.) [100].

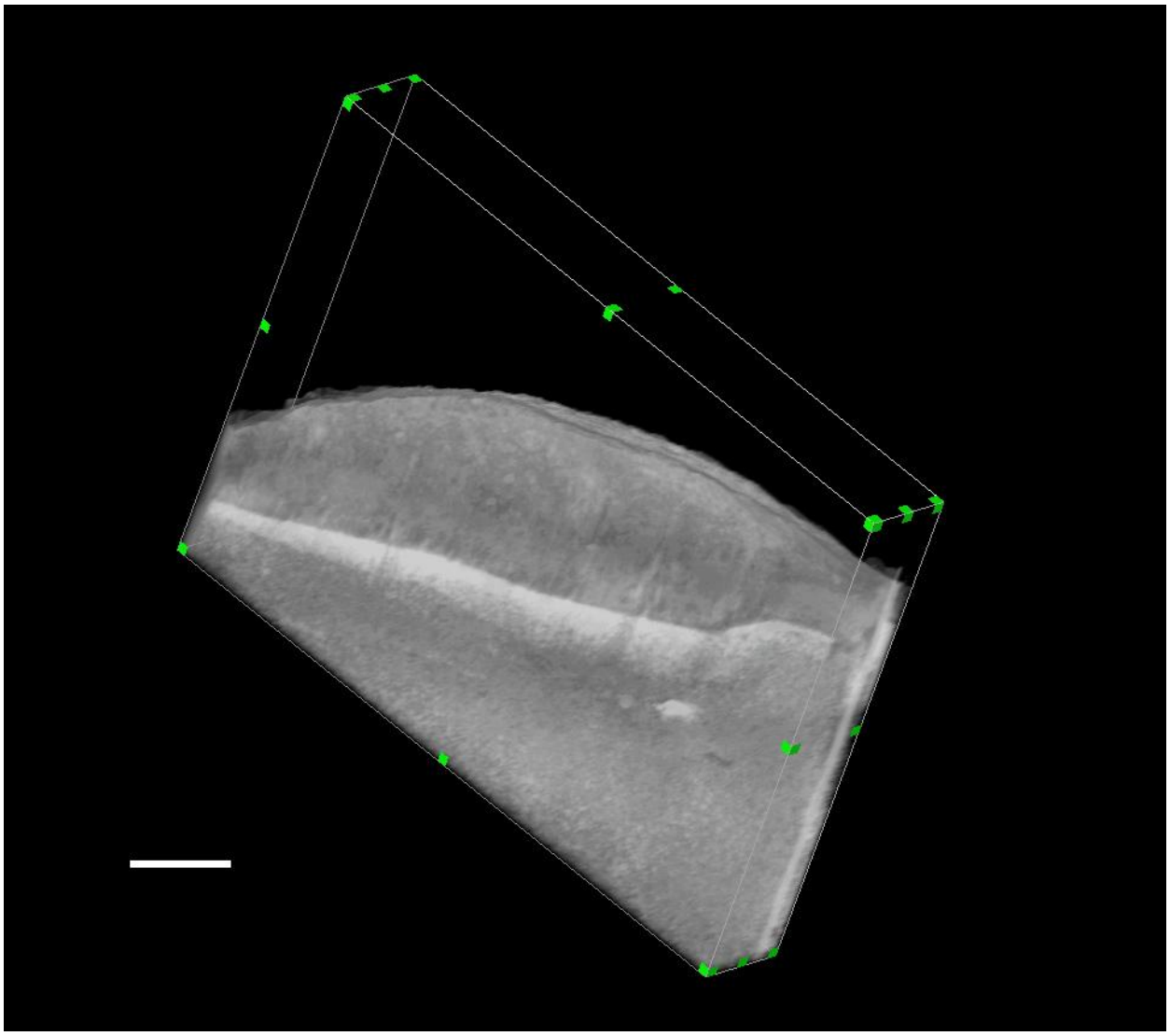


Рисунок 98 – Трехмерная зондово-нанотомографическая реконструкция фрагмента клетки гепатокарциномы человека Hep-G2, адгезированной на скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, 32.0 ×22.0×3.6 мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм [100]

Морфологические параметры, полученные в результате анализа трехмерной структуры фрагмента клетки гепатокарциномы человека Hep-G2, адгезированной на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры фрагмента клетки гепатокарциномы человека Hep-G2

R_a, нм	39.5 ± 5.8
σ, ед	1.08 ± 0.02
L_1, нм	324 ± 32

Необходимо отметить, что для проанализированной клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 количественные параметры, характеризующие степень шероховатости и развитости ее поверхности, значительно ниже, чем для фибробласта, адгезированного на аналогичный скаффолд на основе фиброина шелка. Это может быть связано с тем, что данная клетка плотнее адгезирует к субстрату.

Максимальная толщина адгезированной клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 в данном случае составляет 6.17 ± 0.1 мкм, в то время как минимальная толщина (в периферийной области) составляет 0.92 ± 0.1 мкм.

Анализ совокупности полученных данных и параметров морфологии клетки позволяют оценить объем ядра клетки Hep-G2 на уровне 940 ± 100 мкм^3, что составляет 7.3 ± 1.5% от общего объема клетки.

Разработанная технология исследования трехмерных характеристик наномасштабной морфологии фибробластов и клеток гепатокарциномы человека Hep-G2, адгезированных на биодеградируемые скаффолды на основе фиброина шелка, с использованием принципов сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной микро- и наноструктуры клеток и клеточно-инженерных конструкций различных типов [100].

7.5 Трехмерный корреляционный анализ распределения флуоресцентных маркеров и микро- и наноструктуры клеток печени крысы, культивированных на биодеградируемых скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка

В ходе выполнения работ была отработана методика пробоподготовки и были выполнены исследования образцов клеток печени крысы породы Wistar, культивированных на скаффолдах из фиброина шелка в виде плёнок.

После отделения залитых в эпоксидную смолу образцов скаффолдов от планшетов выполнялась локализация скаффолдов с клетками печени в плоскости образца с использованием флуоресцентной микроскопии. На основе анализа полученных изображений отбирались скаффолды для дальнейшего СОЗНТ-анализа, затем выполнялись первичные срезы образца ультрамикротомом в плоскости, перпендикулярной плоскости образца, и при помощи флуоресцентной микроскопии измерялось расстояние от плоскости среза до изучаемого скаффолда. В соответствии с выполненными измерениями производилась последовательность срезов контролируемой толщины, и выполнялись срезы изучаемого скаффолда с адгезированными клетками. На рисунке 99 приведено флуоресцентное изображение образца пленки на основе фиброина шелка с адгезированными на нем клетками печени, линией отмечена плоскость среза, стрелка указывает на область локализации клеток, в которой выполнялся СОЗНТ-анализ.

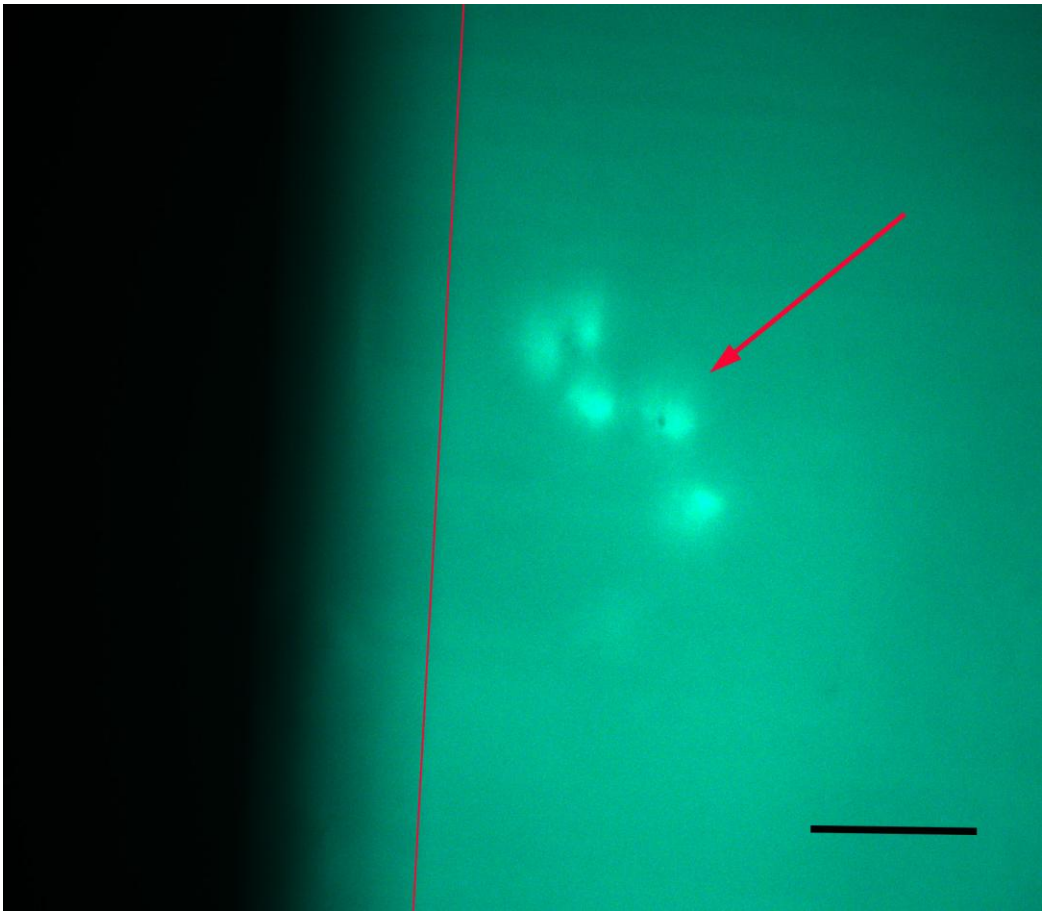


Рисунок 99 – Флуоресцентное изображение образца пленки фиброина шелка с адгезированными на ней клетками печени, окрашивание FITC, увеличение x200, размерный отрезок – 50 мкм

На рисунке 100 представлены изображения, полученные в ходе анализа образцов клеток печени, адгезированных на скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка. В ходе СЗМ-анализа (рисунок 100А) было выявлено наличие ядра, а также включения в виде липидной капли, занимающего значительный объем клетки. Полученные данные подтверждаются коррелятивными флуоресцентными изображениями. Распределение красителя DAPI подтверждает наличие ядра в клетке (рисунок 100В), в области липидной капли не наблюдается флуоресценция красителей (рисунок 100Б, В) [228].

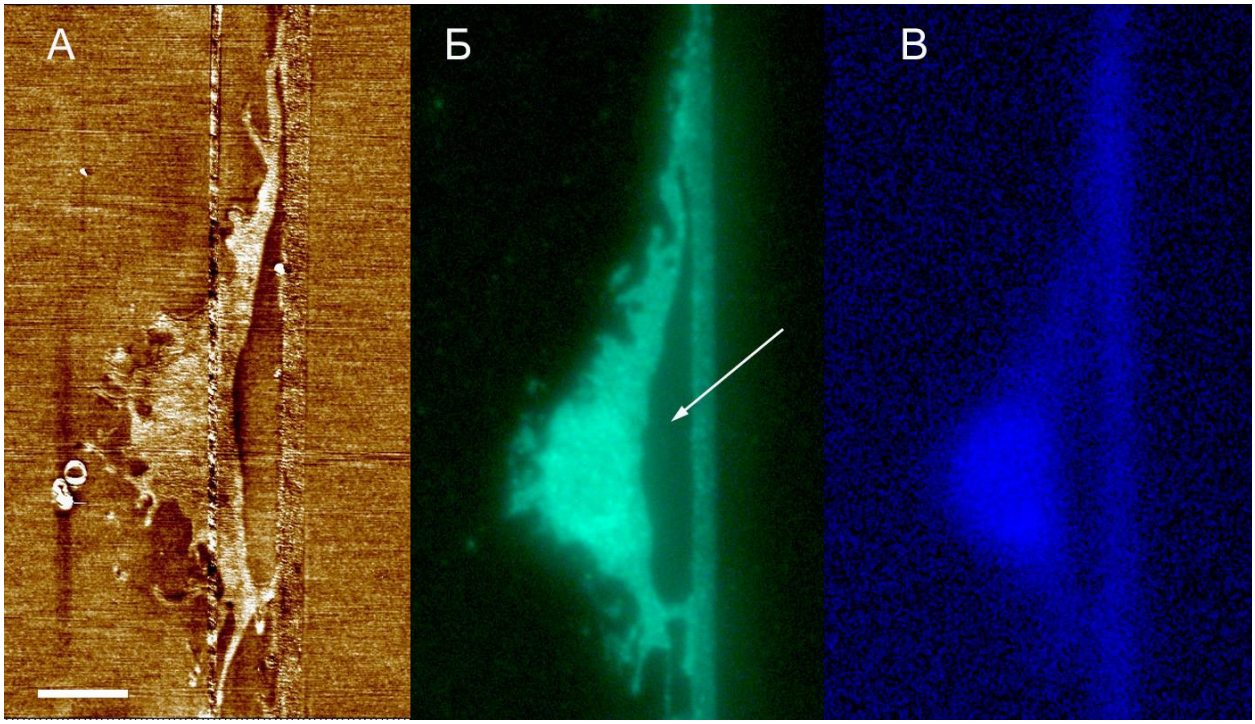


Рисунок 100 – Анализ образцов клеток печени, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. А – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана 25×12 мкм^2, диапазон вариации высоты 11 нм размерный отрезок – 3 мкм, Б – коррелятивное флуоресцентное изображение среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгези-рованной клеткой печени, окрашивание FITC, увеличение х1000, стрелкой указана липидная капля. В – коррелятивное флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени, окрашивание DAPI, увеличение ×1000 [228]

Дальнейший анализ структуры клеток первичной культуры клеток печени, адгезированных на скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок, выявил наличие большого количества включений. В ходе анализа изображений, представленных на рисунке 101, в структуре клеток печени были выявлены включения в виде липидных капель, в области которых не регистрируется флуоресценция (рисунок 101Б), и гранул гликогена (указаны стрелками на рисунке 101Б) [228].

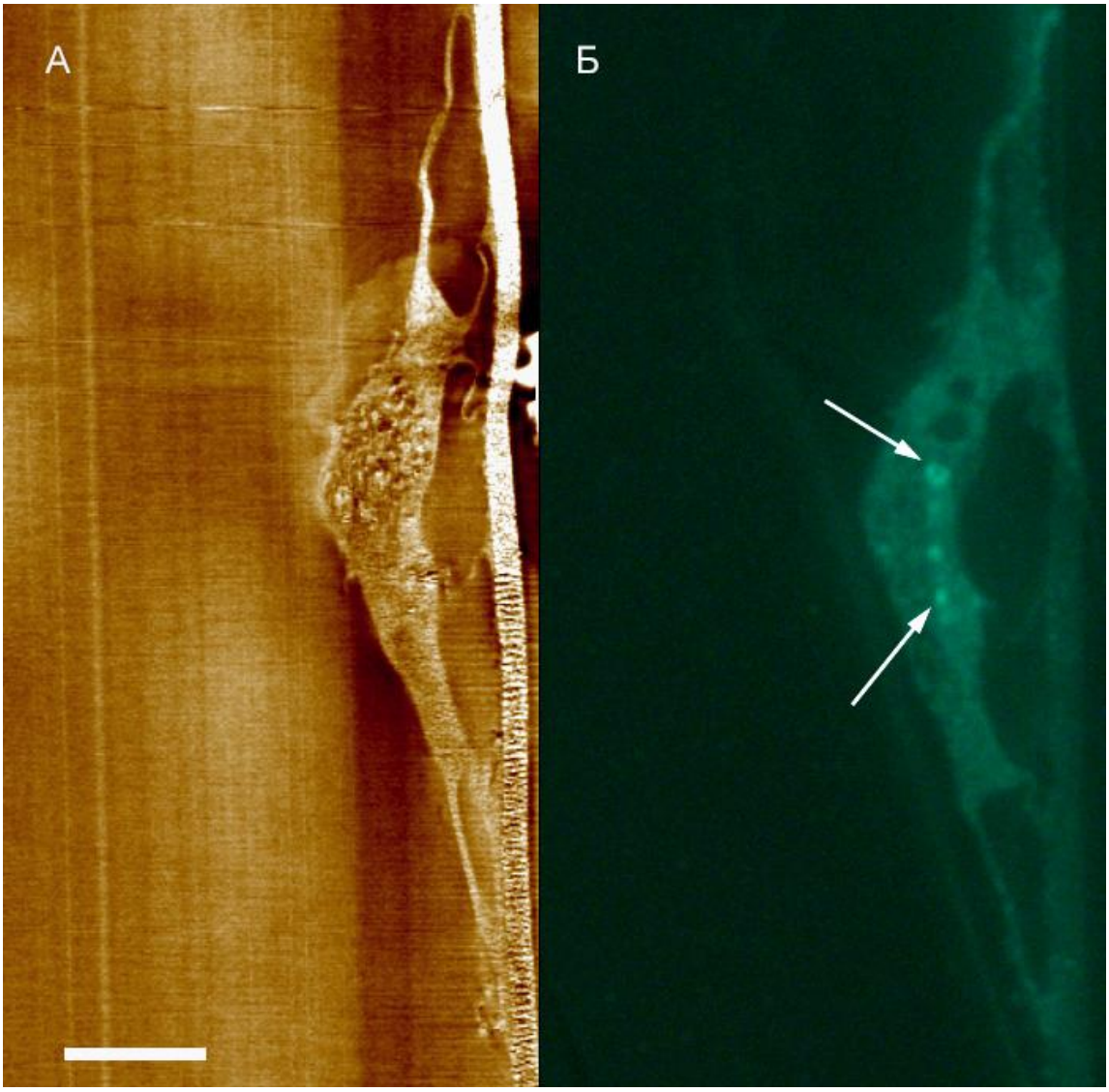


Рисунок 101 – Анализ образцов клеток печени, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. А – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана 32×15 мкм^2, диапазон вариации высоты 40 нм, размерный отрезок 4 мкм. Б – флуоресцентное изображение поперечного среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгези-рованной клеткой печени, окрашивание FITC, увеличение x1000, стрелками указаны гранулы гликогена [228]

Анализ структуры клеток первичной культуры клеток печени, адгезированных на скаффолды на основе фиброина шелка в виде пленок, с высоким разрешением выявил обширные участки цитоплазмы с неоднородной структурой (рисунок 102), наличие которых может свидетельствовать о высоком уровне метаболизма клеток за счет развитой системы эндоплазматического

ретикулума. Таким образом, скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка является подложкой, пригодной для культивирования первичных клеток печени.



Рисунок 102 – Зондово-микроскопическое изображение топографии поверхности среза скаффолда в виде пленки на основе фиброина шелка с адгезированной клеткой печени: размер скана 7×6 мкм^2, диапазон вариации высоты 20 нм, размерный отрезок 1 мкм

Для оценки трехмерной морфологии клетки печени, адгезированной на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка в виде пленки, была выполнена трехмерная реконструкция фрагмента клетки при помощи метода СЗНТ. Для этого было выполнено 14 последовательных срезов образца толщиной 200 нм и получено 14 последовательных СЗМ-изображений участка скаффолда размером 32×16 мкм^2. Полученная визуализация трехмерной структуры клетки печени показана на рисунке 103 [228].

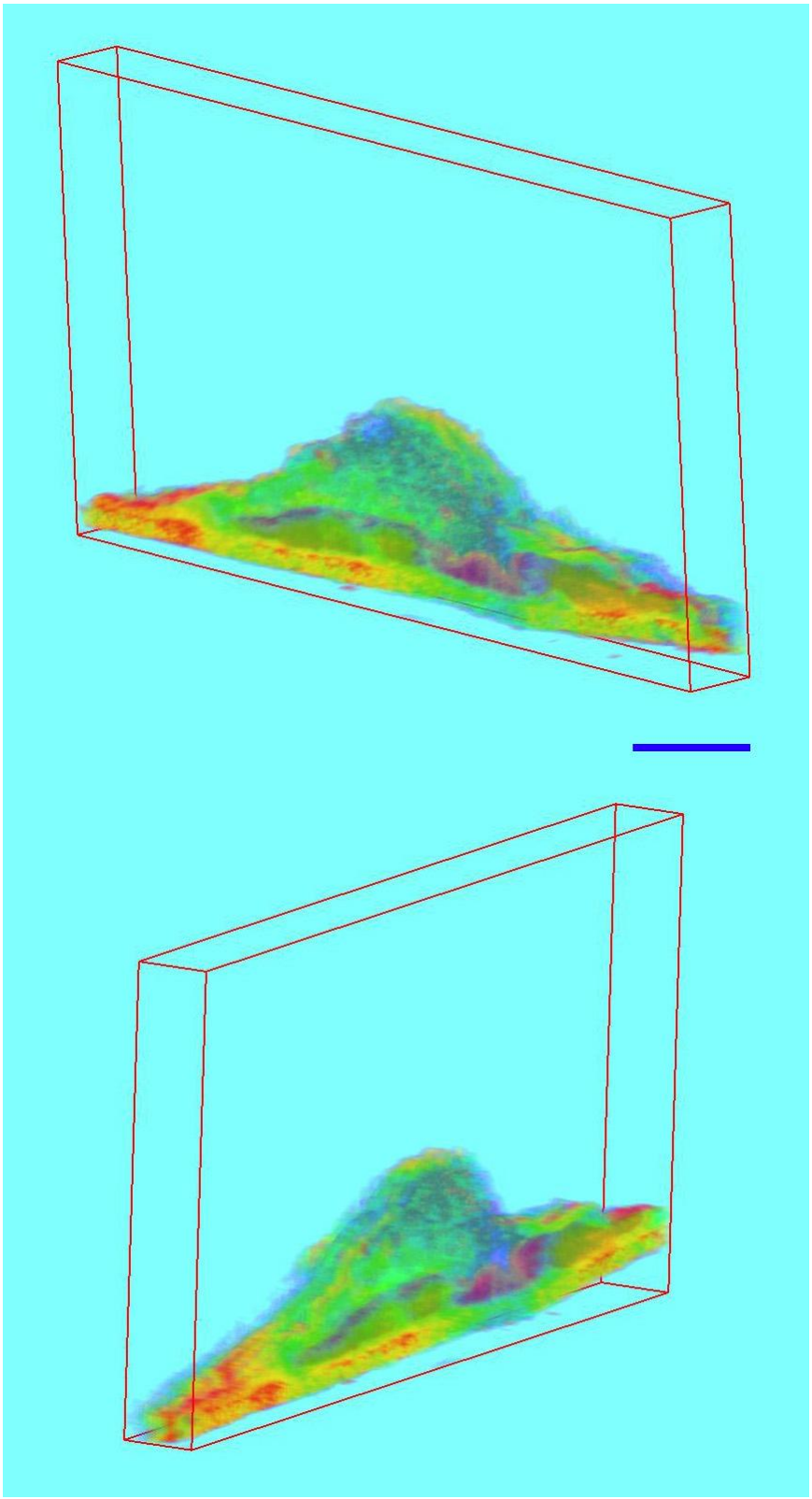


Рисунок 103 – Трехмерная зондово-нанотомографическая реконструкция клетки печени, адгезированной на скаффолд в виде пленки на основе фиброина шелка, 32,0 ×15,0×2,8 мкм^3, толщина среза 200 нм, размерный отрезок 5 мкм [228]

Анализ полученных трехмерных данных позволил определить морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры клетки печени. Так, средняя шероховатость поверхности клетки R_a составляет 124,8 ± 8,2 нм, в то время как эффективная площадь поверхности σ, вычисляемая, как отношение площади поверхности к площади ее двумерной проекции на плоскость, составляет 1,13 ± 0,02. Данный безразмерный параметр определяет степень развитости поверхности [61]. Также был определен параметр длины автокорреляции поверхности клетки L_1. Данный параметр соответствует характерному расстоянию, на котором формируется дисперсия измеряемых высот профиля трехмерного рельефа, и может служить оценкой характерных латеральных размеров особенностей рельефа [61]. Для полученной трехмерной реконструкции поверхности он составляет 305 ± 38 нм. Анализ объемного распределения липидных капель показал, что они занимают 28% объема реконструированного фрагмента клетки.

Отработанная нами методика исследования наномасштабных структур клетки печени, адгезированных на биодеградируемые скаффолды, при помощи сканирующей оптическо-зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной структуры клеток разных типов на микро- и наноуровне [228].

Использование техник сканирующей зондовой и оптической нанотомографии повышает эффективность разработок новых изделий тканеинженерных медицинских продуктов на основе биоматериалов для регенерации поврежденных тканей и органов.

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 ультрамикротома в качестве TIRF-призмы и режиме флуоресцентного анализа последовательных срезов образца *in situ* на поверхности воды ванночке алмазного ножа ультрамикротома. 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 доксорубицин. В работе представлены результаты исследования внутриклеточного распределения доксорубицина в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, загруженных доксорубицином с различным временем инкубации. Трехмерный анализ с высоким разрешением позволяет отметить высокую степень неравномерности распределения цитостатика. Разработанный подход к изучению внутриклеточного распределения доксорубицина 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 ультрамикротома 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*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю своего научного консультанта доктора биологических наук Ефимова Антона Евгеньевича и весь коллектив лаборатории бионанотехнологий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также профессора, академика РАН Готье Сергея Владимировича за всестороннюю помощь и поддержку при проведении настоящей работы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ГДД – гидродинамический диаметр

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КТ – квантовая точка

ЛКСМ – лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

МКК – микрокапсула

МКШ – микрошарик

МНЧ – магнитные наночастицы

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МСМ – магнитно-силовая микроскопия

НФБ – натрий-фосфатный буфер

ОМ – оптическая микроскопия

ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия

СЗНТ – сканирующая зондовая нанотомография

СОЗНТ – сканирующая оптическо-зондовая нанотомография

СЭМ-ФИП – сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком

ТЭМ – трансмиссионная электронной микроскопии

ПАГ – поли(аллиламин гидрохлорид)

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

ПСМ – полистирольные микросферы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭИ – полиэтиленимин

УМТ – ультрамикротом

ФОНТ – флуоресцентная оптическая нанотомография

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

APP – предшественник бета-амилоида

ASC – стволовые клетки жировой ткани

CaP – фосфат кальция

CS – хитозан

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DDSA – додеценилянтарный ангидрид

DMEM – модифицированная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMP-30 – диметиламинометил-фенол

DOX – доксорубицин

DS – декстран

ePTFE – политетрафторэтилен

FAK – киназа фокальных контактов

FB – фиброин шелка

FBR – реакция на инородное тело

FBS – телячья эмбриональная сыворотка

FIB – фокусированный ионный пучок

FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

GFP – зеленый флуоресцентный белок

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека

IL-1β – интерлейкин 1, бета

KESM – knife-edge scanning microscopy

MCF-7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека

MGF – механический фактор роста

NA – численная апертура

NCAM – молекула нейрональной клеточной адгезии

nHA – наногидроксиапатит

Parg – полиаргинин

PGC – многоядерные гигантские клетки

PLA – полилактид

P(LLA-CL) –поли(L-лактид-ко-е-капролактон)

RFP – красный флуоресцентный белок

SA – альгинат натрия

SBF-SEM – серийная сканирующая электронная микроскопия блокфейса

SEM – сканирующий электронный микроскоп

SFALS – искусственные связки из фиброиновых волокон

STED-микроскопия – (англ. Stimulated Emission Depletion Microscopy

STORM – микроскопия стохастической оптической реконструкции

STXM – сканирующая трансмиссионная рентгеновская спектромикроскопия

TGF-β3 – трансформирующий ростовой фактор

TIRF – флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения

TNF-α – фактора некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трансплантология и искусственные органы : учебник / под ред. акад. РАН С. В. Готье. — 2-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2021. — 319 с. : ил. ISBN 978-5-00101-381-5.

2. Блохин М. А. Рентгеновское излучение / Блохин М. А. // Физическая энциклопедия : [в 5 т.] / Гл. ред. А. М. Прохоров. — М. : Большая российская энциклопедия, 1994. — Т. 4: Пойнтинга — Робертсона — Стримеры. — С. 375—377.

3. Lider V. V. X-ray microscopy / Lider V. V. // Phys. Uspekhi. 2017. Vol. 60, No. 2. P. 187-203. doi:10.3367/ufne.2016.06.037830.

4. Soft X-ray spectromicroscopy for speciation, quantitation and nano-eco-toxicology of nanomaterials / Lawrence J. R., Swerhone G. D., Dynes J. J. [et al.] // J Microsc. 2016. Vol. 261, No. 2. P. 130-147. doi:10.1111/jmi.12156.

5. Penczek P. A. Fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections / Penczek P. A. // Methods Enzymol. 2010. Vol. 482. P. 1-33. doi:10.1016/S0076-6879(10)82001-4.

6. Electron tomography for heterogeneous catalysts and related nanostructured materials / Friedrich H., de Jongh P. E., Verkleij A. J., de Jong K. P. // Chem Rev. 2009. Vol. 109, No. 5. P. 1613-1629. doi:10.1021/cr800434t.

7. Lucas B. A. Visualizing everything, everywhere, all at once: Cryo-EM and the new field of structureomics / Lucas B. A. // Curr Opin Struct Biol. 2023. Vol. 81. P. 102620. doi:10.1016/j.sbi.2023.102620.

8. Murphy D. B. Thorn K. A quick guide to light microscopy in cell biology / Thorn K. // Mol Biol Cell. 2016. Vol. 27, No. 2. P. 219-222. doi:10.1091/mbc.E15-02-0088.

9. Murphy D. B. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging / Murphy D. B., Davidson M. W. — 2nd ed. — John Wiley & Sons, 2012. doi:10.1002/9781118382905.

10. Kiernan J. A. Fluorescence microscopy in life sciences / Kiernan J. A. // J Histotechnol. 2018. Vol. 41, No. 4. P. 195-196. doi:10.1080/01478885.2018.1514715.

11. Stockert J. C. Fluorescence Microscopy in Life Sciences / Stockert J. C., Blazquez-Castro A. // Bentham Science Publishers, 2017. doi:10.2174/9781681085180117010l.

12. Day R. N. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging / Day R. N., Davidson M. W. // Chem Soc Rev. 2009. Vol. 38, No. 10. P. 2887-2921. doi:10.1039/b901966a.

13. Blast shockwaves propagate Ca(2+) activity via purinergic astrocyte networks in human central nervous system cells / Ravin R., Blank P. S., Busse B. [et al.] // Sci Rep. 2016. Vol. 6. P. 25713. doi:10.1038/srep25713.

14. Dean K. M. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging / Dean K. M., Palmer A. E. // Nat Chem Biol. 2014. Vol. 10, No. 7. P. 512-523. doi:10.1038/nchembio.1556.

15. Hoffman R. M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo / Hoffman R. M. // Nat Rev Cancer. 2005. Vol. 5, No. 10. P. 796-806. doi:10.1038/nrc1717.

16. Pawley J. Handbook of Biological Confocal Microscopy / Pawley J. — Springer US, 2006.

17. Vesely P. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed. By James B. Pawley, Editor. Springer Science + Business Media, LLC, New York (2006). ISBN 10: 0-387-25921-X; ISBN 13: 978-0387-25921-5; hardback; 28 + 985 pages. Scanning. 2007;29(3):91. doi:10.1002/sca.20059.

18. Lucas F. The amino acid sequence in a fraction of the fibroin of Bombyx mori / Lucas F., Shaw J. T. B., Smith G. // Biochem J. 1957. Vol. 66, No. 3. P. 468-479. doi:10.1042/bj0660468.

19. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells / Rizzuto R., Brini M., Pizzo P. [et al.] // Curr Biol. 1995. Vol. 5, No. 6. P. 635-642. doi:10.1016/s0960-9822(95)00128-x.

20. Doxorubicin-loaded biodegradable capsules: Temperature induced shrinking and study of cytotoxicity in vitro / Trushina D. B., Akasov R. A., Khovankina A. V. [et al.] // J Mol Liq. 2019. Vol. 284. P. 215-224. doi:10.1016/j.molliq.2019.03.152.

21. In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds / M. M. Moisenovich, O. L. Pustovalova, A. Y. Arhipova [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2011. – Vol. 96. – № 1. – P. 125-131. doi:10.1002/jbm.a.32968.

22. Effect of Silk Fibroin on Neuroregeneration After Traumatic Brain Injury / M. M. Moisenovich, E. Y. Plotnikov, A. M. Moysenovich [et al.] // Neurochemical Research. – 2019. – Vol. 44. – № 10. – P. 2261-2272. doi:10.1007/s11064-018-2691-8.

23. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure / V. Balashov, A. Efimov, O. Agapova [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2018. – Vol. 68. – P. 214-222. doi:10.1016/j.actbio.2017.12.031.

24. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices / A. D. Elliott // Current Protocols in Cytometry. – 2020. – Vol. 92. – № 1. – P. e68. doi:10.1002/cpcy.68.

25. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology / D. Axelrod // Methods in Enzymology. – 2003. – Vol. 361. – P. 1-33. doi:10.1016/s0076-6879(03)61003-7.

26. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy / K. N. Fish // Current Protocols. – 2022. – Vol. 2. – № 8. – P. e517. doi:10.1002/cpz1.517.

27. Visualizing the in vitro assembly of tropomyosin/actin filaments using TIRF microscopy / M. Janco, I. Dedova, N. S. Bryce [et al.] // Biophysical Reviews. – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 879-885. doi:10.1007/s12551-020-00720-6.

28. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts / D. Torralba, F. Baixauli, C. Villarroya-Beltri [et al.] // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 2658. doi:10.1038/s41467-018-05077-9.

29. TIRF Microscopy as a Tool to Determine Exosome Composition / N. B. Martín-Cófreces, D. Torralba, M. Lozano-Prieto [et al.] // Methods in Molecular Biology. – 2021. – Vol. 2346. – P. 91-104. doi:10.1007/7651_2020_320.

30. High-resolution quantification of focal adhesion spatiotemporal dynamics in living cells / M. E. Berginski, E. A. Vitriol, K. M. Hahn, S. M. Gomez // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e22025. doi:10.1371/journal.pone.0022025.

31. R. Dixit. Studying plus-end tracking at single molecule resolution using TIRF microscopy / R. Dixit, J. L. Ross // Methods in Cell Biology. – 2010. – Vol. 95. – P. 543-554. doi:10.1016/s0091-679x(10)95027-9.

32. Yamamura H. New light on ion channel imaging by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy / Yamamura H., Suzuki Y, Imaizumi Y. // Journal of Pharmacological Sciences. – 2015. – Vol. 128. – № 1. – P. 1-7. doi:10.1016/j.jphs.2015.04.004.

33. Molecular assembly and dynamics of fluorescent protein-tagged single KCa1.1 channel in expression system and vascular smooth muscle cells / H. Yamamura, C. Ikeda, Y. Suzuki [et al.] // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2012. – Vol. 302. – № 8. – P. 1257-1268. doi:10.1152/ajpcell.00191.2011.

34. T. Koike. Methods for array tomography with correlative light and electron microscopy / T. Koike, H. Yamada // Medical Molecular Morphology. – 2019. – Vol. 52. – № 1. – P. 8-14. doi:10.1007/s00795-018-0194-y.

35. T. Böhm. Serial section Raman tomography with 10 times higher depth resolution than confocal Raman microscopy / T. Böhm, R. Moroni, S. Thiele // Journal of Raman Spectroscopy. – 2020. – Vol. 51. – № 7. – P. 1160-1171. doi:10.1002/jrs.5878.

36. C. Kizilyaprak. Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography / C. Kizilyaprak, Y. D. Stierhof, B. M. Humbel // Tissue and Cell. – 2019. – Vol. 57. – P. 123-128. doi:10.1016/j.tice.2018.09.006.

37. C. J. Peddie. Exploring the third dimension: volume electron microscopy comes of age / C. J. Peddie, L. M. Collinson // Micron. – 2014. – Vol. 61. – P. 9-19. doi:10.1016/j.micron.2014.01.009.

38. High-Resolution 3D Reconstruction of Human Oocytes Using Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy / Z. Trebichalská, J. Javůrek, M. Tatíčková [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – P. 755740. doi:10.3389/fcell.2021.755740.

39. Three-dimensional imaging of podocyte ultrastructure using FE-SEM and FIB-SEM tomography / T. Miyaki, Y. Kawasaki, Y. Hosoyamada [et al.] // Cell and Tissue Research. – 2020. – Vol. 379. – № 2. – P. 245-254. doi:10.1007/s00441-019-03118-3.

40. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons / C. Bosch, A. Martínez, N. Masachs [et al.] // Frontiers in Neuroanatomy. – 2015. – Vol. 9. – P. 60. doi:10.3389/fnana.2015.00060.

41. W. Denk Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure / W. Denk, H. Horstmann // PLoS Biology. – 2004. – Vol. 2. – № 11. – P. e329. doi:10.1371/journal.pbio.0020329.

42. Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) of Biological Tissue Samples / J. A. Courson, P. T. Landry, T. Do [et al.] // Journal of Visualized Experiments. – 2021. – Vol. 169. – P. e62045. doi:10.3791/62045.

43. E. Cocks. A guide to analysis and reconstruction of serial block face scanning electron microscopy data / E. Cocks, M. Taggart, F. C. Rind, K. White // Journal of Microscopy. – 2018. – Vol. 270. – № 2. – P. 217-234. doi:10.1111/jmi.12676.

44. Biological serial block face scanning electron microscopy at improved z-resolution based on Monte Carlo model / Q. He, M. Hsueh, G. Zhang [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 12985. doi:10.1038/s41598-018-31231-w.

45. Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy Reveals That Intercellular Nuclear Migration Occurs in Most Normal Tobacco Male Meiocytes / S. Mursalimov, N. Ohno, M. Matsumoto [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 672642. doi:10.3389/fpls.2021.672642.

46. Serial block-face imaging and its potential for reconstructing diminutive cell systems: a case study from arthropods / E. Lipke, T. Hörnschemeyer, A. Pakzad [et al.] // Microscopy and Microanalysis. – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 946-955. doi:10.1017/s1431927614000087.

47. Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells / C. J. Peddie, K. Blight, E.

Wilson [et al.] // Ultramicroscopy. – 2014. – Vol. 143. – P. 3-14. doi:10.1016/j.ultramic.2014.02.001.

48. X. Heiligenstein. One for All, All for One: A Close Look at In-Resin Fluorescence Protocols for CLEM / X. Heiligenstein, M. S. Lucas // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Vol. 10. – P. 866472. doi:10.3389/fcell.2022.866472.

49. Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples / A. E. Efimov, A. G. Tonevitsky, M. Dittrich, N. B. Matsko // Journal of Microscopy. – 2007. – Vol. 226. – Pt 3. – P. 207-217. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01773.x.

50. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography / A. E. Efimov, I. I. Agapov, O. I. Agapova [et al.] // Review of Scientific Instruments. – 2017. – Vol. 88. – № 2. – P. 023701. doi:10.1063/1.4975202.

51. Three-dimensional Electrical Property Mapping with Nanometer Resolution / Alekseev A., Efimov A., Lu K., Loos J. // Advanced Materials. 2009;21(48):4915-4919. doi:10.1002/adma.200901754.

52. Three-dimensional imaging of polymer materials by Scanning Probe Tomography / A. Alekseev, A. Efimov, J. Loos [et al.] // European Polymer Journal. – 2014. – Vol. 52. – P. 154-165. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.01.003.

53. Combined scanning probe nanotomography and optical microspectroscopy: a correlative technique for 3D characterization of nanomaterials / K. E. Mochalov, A. E. Efimov, A. Bobrovsky [et al.] // ACS Nano. – 2013. – Vol. 7. – № 10. – P. 8953-8962. doi:10.1021/nn403448p.

54. Three-dimensional Analysis of Nanomaterials by Scanning Probe Nanotomography / A. E. Efimov, O. Agapova, E. Mochalov, I. Agapov // Physics Procedia. – 2015. – Vol. 73. – P. 173–176.

55. 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography / A. E. Efimov, M. M. Moisenovich, V. G. Bogush, I.

I. Agapov // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4. – № 105. – P. 60943-60947. doi:10.1039/C4RA08341E.

56. А. Е. Ефимов. Исследование нано- и микроструктуры биоматериалов для регенеративной медицины методом сканирующей зондовой нанотомографии / А. Е. Ефимов, И. И. Агапов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 16. – № 3. – С. 109-116.

57. A Comparative Analysis of the Structure and Biological Properties of Films and Microfibrous Scaffolds Based on Silk Fibroin / L. Safonova, M. Bobrova, A. Efimov [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – № 1561. doi:10.3390/pharmaceutics13101561.

58. Silk Fibroin/Spidroin Electrospun Scaffolds for Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats / L. Safonova, M. Bobrova, A. Efimov [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – № 1704. doi:10.3390/pharmaceutics13111704

59. 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.

60. Analysis of native structures of soft materials by cryo scanning probe tomography / A. E. Efimov , H. Gnaegi , R. Schaller [et al.] // Soft Matter. – 2012. – Vol. 8. – № 38. – P. 9756–9760.

61. Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers / A. E. Efimov, O. I. Agapova, L. A. Safonova [et al.] // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – № 15. – P. 8808-8815. doi:10.1039/C6RA26516B.

62. Трехмерный анализ микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток методом сканирующей зондовой крио-нанотомографии / А. Ефимов, О. Агапова, Л. Сафонова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 19. – № 4. – С. 78-87. doi:10.15825/1995-1191-2017-4-78-87.

63. An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography / K. E. Mochalov, A. A. Chistyakov, D. O. Solovyeva [et

al.] // Ultramicroscopy. – 2017. – Vol. 182. – P. 118-123. doi:10.1016/j.ultramic.2017.06.022.

64. Scanning near-field optical nanotomography: a new method of multiparametric 3D investigation of nanostructural materials / A. E. Efimov, A. Y. Bobrovsky, I. I. Agapov [et al.] // Technical Physics Letters. – 2016. – Vol. 42. – № 2. – P. 171-174. doi:10.1134/S1063785016020231.

65. Инструментальное объединение конфокальной микроспектроскопии и 3D сканирующей зондовой нанотомографии / К. Мочалов, А. Чистяков, Д. Соловьева [и др.] // Наноиндустрия. – 2016. – Т. 7. – № 69. – С. 60-71.

66. Silk fibroin/collagen and silk fibroin/chitosan blended three-dimensional scaffolds for tissue engineering / K. Sun, H. Li, R. Li [et al.] // European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology. – 2015. – Vol. 25. – № 2. – P. 243-249. doi:10.1007/s00590-014-1515-z.

67. 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.

68. Insect silk: one name, many materials / T. D. Sutherland, J. H. Young, S. Weisman [et al.] // Annual Review of Entomology. – 2010. – Vol. 55. – P. 171-188. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085401.

69. Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract / Z. W. Zaoming, R. Codina, E. Fernández-Caldas, R. F. Lockey // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. – 1996. – Vol. 6. – № 4. – P. 237-241.

70. Self-Assembly of Recombinant Silk as a Strategy for Chemical-Free Formation of Bioactive Coatings: A Real-Time Study / L. Nilebäck, J. Hedin, M. Widhe [et al.] // Biomacromolecules. – 2017. – Vol. 18. – № 3. – P. 846-854. doi:10.1021/acs.biomac.6b01721.

71. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of Bombyx mori / P. Wadbua, B. Promdonkoy, S. Maensiri, S. Siri

// International Journal of Biological Macromolecules. – 2010. – Vol. 46. – № 5. – P. 493-501. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.03.007.

72. W. Ho. Single-molecule chemistry / W. Ho // The Journal of Chemical Physics. – 2002. – Vol. 117. – № 24. – P. 11033-11061. doi:10.1063/1.1521153.

73. Tanaka K. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by Bombyx mori / Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 1999. – Vol. 29. – № 3. – P. 269-276. doi:10.1016/s0965-1748(98)00135-0.

74. C. Vepari. Silk as a Biomaterial / C. Vepari, D. L. Kaplan // Progress in Polymer Science. – 2007. – Vol. 32. – № 8-9. – P. 991-1007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.

75. On the strength of β-sheet crystallites of Bombyx mori silk fibroin / Y. Cheng, L. D. Koh, D. Li [et al.] // Journal of the Royal Society Interface. – 2014. – Vol. 11. – № 96. – P. 20140305. doi:10.1098/rsif.2014.0305.

76. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering / J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, S. Hofmann // Acta Biomaterialia. – 2016. – Vol. 31. – P. 1-16. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.005.

77. Silk fibroin scaffolds: A promising candidate for bone regeneration / H. Wu, K. Lin, C. Zhao, X. Wang // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10. – P. 1054379. doi:10.3389/fbioe.2022.1054379.

78. M. Beena. Optically Clear Silk Fibroin Films with Tunable Properties for Potential Corneal Tissue Engineering Applications: A Process–Property–Function Relationship Study / M. Beena, J. M. Ameer, N. Kasoju // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7. – № 34. – P. 29634-29646. doi:10.1021/acsomega.2c01579.

79. B. Zuo. Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications / H. Zheng, B. Zuo // Journal of Materials Chemistry B. – 2021. – Vol. 9. – № 5. – P. 1238-1258. doi:10.1039/D0TB02099K.

80. Preparation and properties of calcium sulfate bone cement incorporated with silk fibroin and Sema3A-loaded chitosan microspheres / P. Wang, B. Pi, J. N. Wang [et al.] //

Frontiers of Materials Science. – 2015. – Vol. 9. – P. 203-215. doi:10.1007/s11706-015-0278-8.

81. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery / E. Wenk, A. J. Wandrey, H. P. Merkle, L. Meinel // Journal of Controlled Release. – 2008. – Vol. 132. – № 1. – P. 26-34. doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.005.

82. Silk-Fibroin and Graphene Oxide Composites Promote Human Periodontal Ligament Stem Cell Spontaneous Differentiation into Osteo/Cementoblast-Like Cells / M. Vera-Sánchez, S. Aznar-Cervantes, E. Jover [et al.] // Stem Cells and Development. – 2016. – Vol. 25. – № 22. – P. 1742-1754. doi:10.1089/scd.2016.0028.

83. Influence of silk fibroin/sodium alginate coatings on the mineralization of silk fibroin fiber artificial ligament prototypes / J.-w. Wu, M.-j. Liu, L. Wang, G.-p. Guan // Textile Research Journal. – 2020. – Vol. 90. – № 13-14. – P. 1590-1601. doi:10.1177/0040517519898156.

84. Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation / A. Varkey, E. Venugopal, P. Sugumaran [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2015. – Vol. 10 Suppl 1. – P. 43-51. doi:10.2147/ijn.s82209.

85. Integrated trilayered silk fibroin scaffold for osteochondral differentiation of adipose-derived stem cells / X. Ding, M. Zhu, B. Xu [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2014. – Vol. 6. – № 19. – P. 16696-16705. doi:10.1021/am5036708.

86. Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering / K. A. Luetchford, J. B. Chaudhuri, P. A. De Bank // Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications. – 2020. – Vol. 106. – P. 110116. doi:10.1016/j.msec.2019.110116.

87. Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)-β3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model / Z. Luo, L. Jiang, Y. Xu [et al.] // Biomaterials. – 2015. – Vol. 52. – P. 463-475. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.001.

88. Preparation of a biphase composite scaffold and its application in tissue engineering for femoral osteochondral defects in rabbits / S. Q. Ruan, L. Yan, J. Deng [et al.] // In-

ternational Orthopaedics. – 2017. – Vol. 41. – № 5. – P. 1049-1057. doi:10.1007/s00264-017-3522-2.

89. Biocompatible Silk Noil-Based Three-Dimensional Carded-Needled Nonwoven Scaffolds Guide the Engineering of Novel Skin Connective Tissue / A. Chiarini, G. Freddi, D. Liu [et al.] // Tissue Engineering Part A. – 2016. – Vol. 22. – № 15-16. – P. 1047-1060. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0124.

90. Therapeutic efficacy of antibiotic-loaded gelatin microsphere/silk fibroin scaffolds in infected full-thickness burns / Y. Lan, W. Li, Y. Jiao [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2014. – Vol. 10. – № 7. – P. 3167-3176. doi:10.1016/j.actbio.2014.03.029.

91. Bioinspired Silk Fibroin-Based Composite Grafts as Bone Tunnel Fillers for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction / V. P. Ribeiro, J. B. Costa, S. M. Carneiro [et al.] // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 697. doi:10.3390/pharmaceutics14040697.

92. Silk fibroin vascular graft: a promising tissue-engineered scaffold material for abdominal venous system replacement / S. Kiritani, J. Kaneko, D. Ito [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 21041. doi:10.1038/s41598-020-78020-y.

93. Evaluation of silk fibroin-based urinary conduits in a porcine model of urinary diversion / G. Gundogdu, T. Nguyen, S. H. Hosseini Sharifi [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – Vol. 11. – P. 1100507. doi:10.3389/fbioe.2023.1100507.

94. Bi-layer silk fibroin skeleton and bladder acellular matrix hydrogel encapsulating adipose-derived stem cells for bladder reconstruction / S. Xiao, P. Wang, J. Zhao [et al.] // Biomaterials Science. – 2021. – Vol. 9. – № 18. – P. 6169-6182. doi:10.1039/D1BM00761K.

95. Silk fibroin enhances peripheral nerve regeneration by improving vascularization within nerve conduits / C. Wang, Y. Jia, W. Yang, C. Zhang [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2018. – Vol. 106. – № 7. – P. 2070-2077. doi:10.1002/jbm.a.36390.

96. N. A. Nasrine. Silk fibroin-anastrozole loaded prolonged-release biodegradable nanomedicine: A promising drug delivery system for breast cancer therapy / N. A.

Nasrine, M. Gulzar Ahmed, S. Narayana // Materials Today: Proceedings. – 2022. – Vol. 68. – P. 56-65. doi:10.1016/j.matpr.2022.06.101.

97. Exosome-coated silk fibroin 3D-scaffold for inducing osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells / D. Kyung Kim, S. Lee, M. Kim [et al.] // Chemical Engineering Journal. – 2021. – Vol. 406. – P. 127080. doi:10.1016/j.cej.2020.127080.

98. Relation between micro- and nanostructure features and biological properties of the decellularized rat liver / M. M. Bobrova, L. A. Safonova, A. E. Efimov [et al.] // Biomedical Materials. – 2021. – Vol. 16. – № 4. – P. 045035. doi:10.1088/1748-605X/ac058b.

99. 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 [et al.] // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2313. doi:10.3390/pharmaceutics14112313.

100. Сканирующая оптическо-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.

101. Stimulation of Cysteine-Coated CdSe/ZnS Quantum Dot Luminescence by meso-Tetrakis (p-sulfonato-phenyl) Porphyrin / G. G. Parra, L. P. Ferreira, P. J. Gonçalves [et al.] // Nanoscale Research Letters. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 40. doi:10.1186/s11671-018-2449-x.

102. Knife-Edge Scanning Microscopy for Bright-Field Multi-Cubic Centimeter Analysis of Microvasculature / M. Pesavento, C. Miller, K. Pelton [et al.] // Microscopy Today. – 2017. – Vol. 25. – P. 14-21. doi:10.1017/S1551929517000645.

103. Knife-edge scanning microscopy for imaging and reconstruction of three-dimensional anatomical structures of the mouse brain / D. MAYERICH, L. ABBOTT, B. McCORMICK // Journal of Microscopy. – 2008. – Vol. 231. – № 1. – P. 134-143. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02024.x.

104. Innervation: the missing link for biofabricated tissues and organs / S. Das, W. J. Gordián-Vélez, H. C. Ledebur [et al.] // NPJ Regen Med. – 2020. – Vol. 5. – P. 11. doi:10.1038/s41536-020-0096-1.

105. Neuro–bone tissue engineering: emerging mechanisms, potential strategies, and current challenges / W. Sun, B. Ye, S. Chen [et al.] // Bone Research. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 65. doi:10.1038/s41413-023-00302-8.

106. Искусственный нервный проводник для направленного роста периферических нервов (кадаверное исследование) / А. Г. Федяков, Е. А. Немец, О. Н. Древаль [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Vol. 25. – № 2. – С. 99-106. doi:10.15825/1995-1191-2023-2-99-106.

107. Capacity of astrocytes to promote axon growth in the injured mammalian central nervous system / M. Hemati-Gourabi, T. Cao, M. K. Romprey, M. Chen // Frontiers in Neuroscience. – 2022. – Vol. 16. – P. 955598. doi:10.3389/fnins.2022.955598.

108. Transplantable living scaffolds comprised of micro-tissue engineered aligned astrocyte networks to facilitate central nervous system regeneration / C. C. Winter, K. S. Katiyar, N. S. Hernandez [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2016. – Vol. 38. – P. 44-58. doi:10.1016/j.actbio.2016.04.021.

109. Peripheral Nerve Injury-Induced Astrocyte Activation in Spinal Ventral Horn Contributes to Nerve Regeneration / C. Qian, D. Tan, X. Wang [et al.] // Neural Plasticity. – 2018. – Vol. 2018. – P. 8561704. doi:10.1155/2018/8561704.

110. B. Zhou. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases / B. Zhou, Y. X. Zuo, R. T. Jiang // CNS Neuroscience & Therapeutics. – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 665-673. doi:10.1111/cns.13123.

111. Ultrastructural view of astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts within the hippocampus / M. K. Conrad, A. Sydney, E. P. A. Emily [et al.] // bioRxiv. – 2020. – P. 2020.10.28.358200. doi:10.1101/2020.10.28.358200.

112. M. Morita. Modern Microscopic Approaches to Astrocytes / M. Morita // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5883. doi:10.3390/ijms24065883.

113. Correlative STED and Atomic Force Microscopy on Live Astrocytes Reveals Plasticity of Cytoskeletal Structure and Membrane Physical Properties during Polarized Migration / N. Curry, G. Ghézali, G. S. Kaminski Schierle [et al.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2017. – Vol. 11. – P. 104. doi:10.3389/fncel.2017.00104.

114. Volume Electron Microscopy Study of the Relationship Between Synapses and Astrocytes in the Developing Rat Somatosensory Cortex / T. Kikuchi, J. Gonzalez-Soriano, A. Kastanauskaite [et al.] // Cerebral Cortex. – 2020. – Vol. 30. – № 6. – P. 3800-3819. doi:10.1093/cercor/bhz343.

115. Heterogeneity and Development of Fine Astrocyte Morphology Captured by Diffraction-Limited Microscopy / D. Minge, C. Domingos, P. Unichenko [et al.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2021. – Vol. 15. – P. 669280. doi:10.3389/fncel.2021.669280.

116. 3D cellular reconstruction of cortical glia and parenchymal morphometric analysis from Serial Block-Face Electron Microscopy of juvenile rat / C. Calì, M. Agus, K. Kare [et al.] // Progress in Neurobiology. – 2019. – Vol. 183. – P. 101696. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101696.

117. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots / H. Hafian, A. Sukhanova, M. Turini [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 10. – № 8. – P. 1701-1709. doi:10.1016/j.nano.2014.05.014.

118. Highly sensitive single domain antibody-quantum dot conjugates for detection of HER2 biomarker in lung and breast cancer cells / T. Y. Rakovich, O. K. Mahfoud, B. M. Mohamed [et al.] // ACS Nano. – 2014. – Vol. 8. – № 6. – P. 5682-5695. doi:10.1021/nn500212h.

119. Cadmium Telluride Quantum Dots as a Fluorescence Marker for Adipose Tissue Grafts / C. J. Deglmann, K. Blazków-Schmalzbauer, S. Moorkamp [et al.] // Annals of Plastic Surgery. – 2017. – Vol. 78. – № 2. – P. 217-222. doi:10.1097/sap.0000000000000930.

120. In Vitro and in Vivo Visualization and Trapping of Fluorescent Magnetic Microcapsules in a Bloodstream / D. V. Voronin, O. A. Sindeeva, M. A. Kurochkin [et al.] //

ACS Applied Materials & Interfaces. – 2017. – Vol. 9. – № 8. – P. 6885-6893. doi:10.1021/acsami.6b15811.

121. Next-Generation Theranostic Agents Based on Polyelectrolyte Microcapsules Encoded with Semiconductor Nanocrystals: Development and Functional Characterization / G. Nifontova, M. Zvaigzne, M. Baryshnikova [et al.] // Nanoscale Research Letters. – 2018. – Vol. 13. – P. 204. doi:10.1186/s11671-018-2581-2.

122. Quantum-dot-based suspension microarray for multiplex detection of lung cancer markers: preclinical validation and comparison with the Luminex xMAP® system / R. Bilan, A. Ametzazurra, K. Brazhnik [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 44668. doi:10.1038/srep44668.

123. Engineering of Optically Encoded Microbeads with FRET-Free Spatially Separated Quantum-Dot Layers for Multiplexed Assays / R. S. Bilan, V. A. Krivenkov, M. A. Berestovoy [et al.] // ChemPhysChem. – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 970-979. doi:10.1002/cphc.201601274.

124. G. Ma. Background-free in vivo time domain optical molecular imaging using colloidal quantum dots / G. Ma // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2013. – Vol. 5. – № 8. – P. 2835-2844. doi:10.1021/am3028519.

125. Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of intracellular pH with quantum dot nanosensors / A. Orte, J. M. Alvarez-Pez, M. J. Ruedas-Rama // ACS Nano. – 2013. – Vol. 7. – № 7. – P. 6387-6395. doi:10.1021/nn402581q.

126. Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints / B. B. Manshian, S. J. Soenen, A. Al-Ali [et al.] // Toxicological Sciences. – 2015. – Vol. 144. – № 2. – P. 246-258. doi:10.1093/toxsci/kfv002.

127. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties / A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov [et al.] // Nanoscale Research Letters. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 44. doi:10.1186/s11671-018-2457-x.

128. Cancer Cell Targeting With Functionalized Quantum Dot-Encoded Polyelectrolyte Microcapsules / G. Nifontova, F. Ramos-Gomes, M. Baryshnikova [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2019. – Vol. 7. – P. 34. doi:10.3389/fchem.2019.00034.

129. Cytotoxicity of nanoparticle-loaded polymer capsules / C. Kirchner, A. M. Javier, A. S. Susha [et al.] // Talanta. – 2005. – Vol. 67. – № 3. – P. 486-491. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.042.

130. Gold Nanocluster Containing Polymeric Microcapsules for Intracellular Ratiometric Fluorescence Biosensing / A. Biswas, S. Banerjee, E. V. Gart [et al.] // ACS Omega. – 2017. – Vol. 2. – № 6. – P. 2499-2506. doi:10.1021/acsomega.7b00199.

131. Ultrasound-Triggered Delivery of Anticancer Therapeutics from MRI-Visible Multilayer Microcapsules / A. Alford, M. Rich, V. Kozlovskaya [et al.] // Advanced Therapeutics. – 2018. – Vol. 1. – № 5. – P. 1800051. doi:10.1002/adtp.201800051.

132. Focused ultrasound-mediated fluorescence of composite microcapsules loaded with magnetite nanoparticles: In vitro and in vivo study / M. V. Novoselova, D. V. Voronin, T. O. Abakumova [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2019. – Vol. 181. – P. 680-687. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.06.025.

133. Drug Delivery Systems in Regenerative Medicine: An Updated Review / A. Mansour, M. Romani, A. B. Acharya [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 695. doi:10.3390/pharmaceutics15020695.

134. Microencapsulation-based cell therapies / S. Marikar, A. El-Osta, A. Johnston [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2022. – Vol. 79. – P. 4300. doi:10.1007/s00018-022-04369-0.

135. Designing Functionalized Polyelectrolyte Microcapsules for Cancer Treatment / D. Kalenichenko, G. Nifontova, A. Karaulov [et al.] // Nanomaterials (Basel). – 2021. – Vol. 11. – № 11. – P. 3055. doi:10.3390/nano11113055.

136. Polyelectrolyte Multilayered Capsules as Biomedical Tools / A. Mateos-Maroto, L. Fernández-Peña, I. Abelenda-Núñez [et al.] // Polymers (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 3. – P. 479. doi:10.3390/polym14030479.

137. Development of L-Lysine-Loaded PLGA Microparticles as a Controlled Release System for Angiogenesis Enhancement / N. Gallo, S. Quarta, M. Massaro [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 479. doi:10.3390/pharmaceutics15020479.

138. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration / J. L. Santos, D. Pandita, J. Rodrigues [et al.] // Current Gene Therapy. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 46-57. doi:10.2174/156652311794520102.

139. Gene delivery using biodegradable polyelectrolyte microcapsules prepared through the layer-by-layer technique / J. L. Santos, A. Nouri, T. Fernandes [et al.] // Biotechnology Progress. – 2012. – Vol. 28. – № 4. – P. 1088-1094. doi:10.1002/btpr.1576.

140. Transfer of cells with uptaken nanocomposite, magnetite-nanoparticle functionalized capsules with electromagnetic tweezers / I. V. Vidiasheva, A. A. Abalymov, M. A. Kurochkin [et al.] // Biomaterials Science. – 2018. – Vol. 6. – № 8. – P. 2219-2229. doi:10.1039/C8BM00479J.

141. Multilayer Hydrogel Capsules of Interpenetrated Network for Encapsulation of Small Molecules / V. Kozlovskaya, J. Chen, O. Zavgorodnya [et al.] // Langmuir. – 2018. – Vol. 34. – № 39. – P. 11832-11842. doi:10.1021/acs.langmuir.8b02465.

142. Magnetically targetable microcapsules display subtle changes in permeability and drug release in response to a biologically compatible low frequency alternating magnetic field / D. Luo, R. N. Poston, D. J. Gould, G. B. Sukhorukov // Materials Scienc.e and Engineering: C. – 2019. – Vol. 94. – P. 647-655. doi:10.1016/j.msec.2018.10.031

143. Highly active antibody-modified magnetic polyelectrolyte capsules / D. Valdepérez, P. del Pino, L. Sánchez [et al.] // Journal of Colloid and Interface Science. – 2016. – Vol. 474. – P. 1-8. doi:10.1016/j.jcis.2016.04.003.

144. Programmed pH-Responsive Microcapsules for the Controlled Release of CdSe/ZnS Quantum Dots / W.-C. Liao, M. Riutin, W. J. Parak, I. Willner // ACS Nano. – 2016. – Vol. 10. – № 9. – P. 8683-8689. doi:10.1021/acsnano.6b04056.

145. In Vivo Whole Animal Fluorescence Imaging of a Microparticle-Based Oral Vaccine Containing (CuInSexS2–x)/ZnS Core/Shell Quantum Dots / M. G. Panthani, T. A. Khan, D. K. Reid [et al.] // Nano Letters. – 2013. – Vol. 13. – № 9. – P. 4294-4298. doi:10.1021/nl402054w.

146. AIE Nanoparticles with High Stimulated Emission Depletion Efficiency and Photobleaching Resistance for Long-Term Super-Resolution Bioimaging / D. Li, W.

Qin, B. Xu [et al.] // Advanced Materials. – 2017. – Vol. 29. – № 43. – P. 1703643. doi:10.1002/adma.201703643.

147. Long-term stability of CdSe/CdZnS quantum dot encapsulated in a multi-lamellar microcapsule / S.-Y. Park, H.-S. Kim, J. Yoo [et al.] // Nanotechnology. – 2015. – Vol. 26. – № 27. – P. 275602. doi:10.1088/0957-4484/26/27/275602.

148. Luminescent Polymer Microcapsules Addressable by a Magnetic Field / N. Gaponik, I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach // Langmuir. – 2004. – Vol. 20. – № 4. – P. 1449-1452. doi:10.1021/la035914o.

149. Encapsulation of Magnetic and Fluorescent Nanoparticles in Emulsion Droplets / S. K. Mandal, N. Lequeux, B. Rotenberg [et al.] // Langmuir. – 2005. – Vol. 21. – № 9. – P. 4175-4179. doi:10.1021/la047025m.

150. Magnetic Targeting and Cellular Uptake of Polymer Microcapsules Simultaneously Functionalized with Magnetic and Luminescent Nanocrystals / B. Zebli, A. S. Susha, G. B. Sukhorukov [et al.] // Langmuir. – 2005. – Vol. 21. – № 10. – P. 4262-4265. doi:10.1021/la0502286.

151. Ligand-Mediated Photobrightening and Photodarkening of CdSe/ZnS Quantum Dot Ensembles / V. Krivenkov, P. Samokhvalov, M. Zvaigzne [et al.] // The Journal of Physical Chemistry C. – 2018. – Vol. 122. – № 27. – P. 15761-15771. doi:10.1021/acs.jpcc.8b04544.

152. Quantum Dot Capped Magnetite Nanorings as High Performance Nanoprobe for Multiphoton Fluorescence and Magnetic Resonance Imaging / H.-M. Fan, M. Olivo, B. Shuter [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2010. – Vol. 132. – № 42. – P. 14803-14811. doi:10.1021/ja103738t.

153. L. Li. Photoinduced Vectorial Charge Transfer across Walls of Hollow Microcapsules / L. Li, H. Möhwald // Angewandte Chemie International Edition. – 2004. – Vol. 43. – № 3. – P. 360-363. doi:10.1002/anie.200352657.

154. Two types of luminescence blinking revealed by spectroelectrochemistry of single quantum dots / C. Galland, Y. Ghosh, A. Steinbrück [et al.] // Nature. – 2011. – Vol. 479. – № 7372. – P. 203-207. doi:10.1038/nature10569.

155. Controlling Charge Transfer from Quantum Dots to Polyelectrolyte Layers Extends Prospective Applications of Magneto-Optical Microcapsules / G. Nifontova, V. Krivenkov, M. Zvaigzne [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2020. – Vol. 12. – № 32. – P. 35882-35894. doi:10.1021/acsami.0c08715.

156. 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.

157. Controlled Rupture of Magnetic Polyelectrolyte Microcapsules for Drug Delivery / S.-H. Hu, C.-H. Tsai, C.-F. Liao [et al.] // Langmuir. – 2008. – Vol. 24. – № 20. – P. 11811-11818. doi:10.1021/la801138e.

158. Internal Structure of Matrix-Type Multilayer Capsules Templated on Porous Vaterite CaCO3 Crystals as Probed by Staining with a Fluorescence Dye / L. Jeannot, M. Bell, R. Ashwell [et al.] // Micromachines. – 2018. – Vol. 9. – № 11. – P. 547. doi:10.3390/micromachines9110547.

159. Comparison of the Structure of Polyelectrolyte Multilayer Films Exhibiting a Linear and an Exponential Growth Regime: An in Situ Atomic Force Microscopy Study / P. Lavalle, C. Gergely, F. J. G. Cuisinier [et al.] // Macromolecules. – 2002. – Vol. 35. – № 11. – P. 4458-4465. doi:10.1021/ma0119833.

160. Multilayer Microcapsules for FRET Analysis and Two-Photon-Activated Photodynamic Therapy / Y. Yang, H. Liu, M. Han [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – Vol. 55. – № 43. – P. 13538-13543. doi:10.1002/anie.201605905

161. C. Jiang. Collective and Individual Plasmon Resonances in Nanoparticle Films Obtained by Spin-Assisted Layer-by-Layer Assembly / C. Jiang, S. Markutsya, V. V. Tsukruk // Langmuir. – 2004. – Vol. 20. – № 3. – P. 882-890. doi:10.1021/la0355085.

162. P. Viswanathan. Nanoporous Silver Submicrocubes Layer by Layer Encapsulated with Polyelectrolyte Films: Nonenzymatic Catalysis for Glucose Monitoring / P. Viswanathan, Y. J. Kim, J. D. Hong // Langmuir. – 2020. – Vol. 36. – № 13. – P. 3452-3460. doi:10.1021/acs.langmuir.9b03972.

163. Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy / C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot [et al.] // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5. – № 2. – P. 1122-1140. doi:10.1021/nn102762f.

164. Hybrid Microparticles for Drug Delivery and Magnetic Resonance Imaging / D. Serrano-Ruiz, M. Laurenti, J. Ruiz-Cabello [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2013. – Vol. 101B. – № 4. – P. 498-505. doi:10.1002/jbm.b.32792.

165. Engineering Polymeric Microparticles as Theranostic Carriers for Selective Delivery and Cancer Therapy / K. Y. Win, E. Ye, C. P. Teng [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2013. – Vol. 2. – № 12. – P. 1571-1575. doi:10.1002/adhm.201300077.

166. Remote Control of Bioreactions in Multicompartment Capsules / O. Kreft, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald // Advanced Materials. – 2007. – Vol. 19. – № 20. – P. 3142-3145. doi:10.1002/adma.200701977.

167. Laser-Activated Polymeric Microcapsules for Ultrasound Imaging and Therapy: In Vitro Feasibility / G. Lajoinie, T. van Rooij, I. Skachkov [et al.] // Biophysical Journal. – 2017. – Vol. 112. – № 9. – P. 1894-1907. doi:10.1016/j.bpj.2017.03.033.

168. Polyelectrolyte Microcapsules for Biomedical Applications / B. G. De Geest, S. De Koker, G. B. Sukhorukov [et al.] // Soft Matter. – 2009. – Vol. 5. – № 2. – P. 282-291. doi:10.1039/B808262F.

169. M. Delcea. Stimuli-Responsive LbL Capsules and Nanoshells for Drug Delivery / M. Delcea, H. Möhwald, A. G. Skirtach // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2011. – Vol. 63. – № 9. – P. 730-747. doi:10.1016/j.addr.2011.03.010.

170. Polyelectrolyte Microcapsules with Potential for Cellular Delivery of Drugs / B. Tacheva, B. Parvanova, N. Sandev [et al.] // Science and Technology. – 2015. – Vol. 5. – P. 411-416.

171. Encapsulation Performance of Layer-by-Layer Microcapsules for Proteins / M.-L. De Temmerman, J. Demeester, F. De Vos, S. C. De Smedt // Biomacromolecules. – 2011. – Vol. 12. – № 4. – P. 1283-1289. doi:10.1021/bm101559w.

172. W. Tong. Layer-by-Layer Assembly of Microcapsules and Their Biomedical Applications / W. Tong, X. Song, C. Gao // Chemical Society Reviews. – 2012. – Vol. 41. – № 18. – P. 6103-6124. doi:10.1039/C2CS35088B.

173. Near-Infrared Fluorescent Materials for Sensing of Biological Targets / C. L. Amiot, S. Xu, S. Liang [et al.] // Sensors. – 2008. – Vol. 8. – № 5. – P. 3082-3105.

174. Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules / E. Kilic, M. V. Novoselova, S. H. Lim [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 44159. doi:10.1038/srep44159.

175. Polyelectrolyte Microcapsules and Coated CaCO3 Particles as Fluorescence Activated Sensors in Flowmetry / D. Haložan, U. Riebentanz, M. Brumen, E. Donath // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2009. – Vol. 342. – № 1. – P. 115-121. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.04.024.

176. A. Reisch. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging / A. Reisch, A. S. Klymchenko // Small. – 2016. – Vol. 12. – № 15. – P. 1968-1992. doi:10.1002/smll.201503396.

177. Chemosensors and Biosensors Based on Polyelectrolyte Microcapsules Containing Fluorescent Dyes and Enzymes / L. I. Kazakova, L. I. Shabarchina, S. Anastasova [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – Vol. 405. – № 5. – P. 1559-1568. doi:10.1007/s00216-012-6381-0.

178. Fluorescent Nanocrystal-Encoded Microbeads for Multiplexed Cancer Imaging and Diagnosis / A. Sukhanova, I. Nabiev // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2008. – Vol. 68. – № 1. – P. 39-59. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.05.006.

179. Highly Stable Fluorescent Nanocrystals as a Novel Class of Labels for Immunohistochemical Analysis of Paraffin-Embedded Tissue Sections / A. Sukhanova, L. Venteo, J. Devy [et al.] // Laboratory Investigation. – 2002. – Vol. 82. – № 9. – P. 1259-1261. doi:10.1097/01.LAB.0000027837.13582.E8.

180. Biocompatible Fluorescent Nanocrystals for Immunolabeling of Membrane Proteins and Cells / A. Sukhanova, J. Devy, L. Venteo [et al.] // Analytical Biochemistry. – 2004. – Vol. 324. – № 1. – P. 60-67. doi:10.1016/j.ab.2003.09.031.

181. J. Kim. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review / J. Kim, H. Lee, S. Shin // Journal of Computational Biology. – 2015. – Vol. 1. – P. 63-79.

182. Magnetic Resonance Imaging for Monitoring of Magnetic Polyelectrolyte Capsule In Vivo Delivery / Q. Yi, D. Li, B. Lin [et al.] // BioNanoScience. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 59-70. doi:10.1007/s12668-013-0117-2.

183. Near-Infrared-Activated Nanocalorifiers in Microcapsules: Vapor Bubble Generation for In Vivo Enhanced Cancer Therapy / J. Shao, M. Xuan, L. Dai [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – 2015. – Vol. 54. – № 43. – P. 12782-12787. doi:10.1002/anie.201506115.

184. D. M. McDonald. Significance of blood vessel leakiness in cancer / D. M. McDonald, P. Baluk // Cancer Research. – 2002. – Vol. 62. – № 18. – P. 5381-5385.

185. S. Azzi. Vascular Permeability and Drug Delivery in Cancers / S. Azzi, J. Hebda, J. Gavard // Frontiers in Oncology. – 2013. – Vol. 3. – doi:10.3389/fonc.2013.00211.

186. L. Claesson-Welsh Vascular permeability—the essentials / L. Claesson-Welsh // Upsala Journal of Medical Sciences. – 2015. – Vol. 120. – № 3. – doi:10.3109/03009734.2015.1064501.

187. Distribution of PEG-coated hollow polyelectrolyte microcapsules after introduction into the circulatory system and muscles of zebrafish / E. Borvinskaya, A. Gurkov, E. Shchapova [et al.] // Biology Open. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – doi:10.1242/bio.030015.

188. Comparative validation of a microcapsule-based immunoassay for the detection of proteins and nucleic acids / S. K. Verma, A. K. Albrecht, V. Siebecke [et al.] // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – № 7. – e0201009. doi:10.1371/journal.pone.0201009.

189. R. Sjöback. Absorption and fluorescence properties of fluorescein / R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 1995. – Vol. 51. – № 6. – P. L7-L21. doi:10.1016/0584-8539(95)01421-P.

190. A. K. Gaigalas. Measurement of the Fluorescence Quantum Yield Using a Spectrometer With an Integrating Sphere Detector / A. K. Gaigalas, L. Wang // Journal of

Research of the National Institute of Standards and Technology. – 2008. – Vol. 113. – № 1. – P. 17-28. doi:10.6028/jres.113.004.

191. Anticancer Drug Development / A. S. Narang, D. S. Desai. In: Y. Lu, R. I. Mahato, editors. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics. New York, NY: Springer US; 2009. p. 49-92.

192. Clinical development success rates for investigational drugs / M. Hay, D. W. Thomas [et al.] // Nature Biotechnology. – 2014. – Vol. 32. – № 1. – P. 40-51. doi:10.1038/nbt.2786.

193. Intracellular Drug Delivery: Mechanisms for Cell Entry / C. Garnacho // Current Pharmaceutical Design. – 2016. – Vol. 22. – № 9. – P. 1210-1226. doi:10.2174/1381612822666151216151021.

194. Исследование внутриклеточного распределения доксорубицина 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

195. AFM, Tapping Mode / H. Hölscher. In: B. Bhushan, editor. Encyclopedia of Nanotechnology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 99.

196. A. Zankel. Serial sectioning methods for 3D investigations in materials science / A. Zankel, J. Wagner, P. Poelt // Micron. – 2014. – Vol. 62. – P. 66-78. doi:10.1016/j.micron.2014.03.002.

197. N. Matsko. Atomic force microscopy applied to study macromolecular content of embedded biological material / N. Matsko // Ultramicroscopy. – 2007. – Vol. 107. – № 2-3. – P. 95-105. doi: 10.1016/j.ultramic.2006.05.009.

198. N. Matsko. AFM of biological material embedded in epoxy resin / N. Matsko, M. Mueller // Journal of Structural Biology. – 2004. – Vol. 146. – № 3. – P. 334-343. doi:10.1016/j.jsb.2004.01.010.

199. Silk fibroin-based nanotherapeutics: application in the treatment of colonic diseases / S. Gou, Y. Huang, J. Sung [et al.] // Nanomedicine (Lond). – 2019. – Vol. 14. – № 17. – P. 2373-2378. doi:10.2217/nnm-2019-0058.

200. Silk Fibroin: An Ancient Material for Repairing the Injured Nervous System / M. Yonesi, M. Garcia-Nieto, G. V. Guinea [et al.] // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 429. doi:10.3390/pharmaceutics13030429.

201. Silk Fibroin-Based Scaffold for Bone Tissue Engineering / J. H. Choi, D. K. Kim, J. E. Song [et al.] // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2018. – Vol. 1077. – P. 371-387. doi:10.1007/978-981-13-0947-2_20.

202. Микроносители в виде волокон из натурального шелка для культивирования клеток / М. М. Боброва, А. Е. Ефимов, О. И. Агапова, И. И. Агапов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 98-104. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-4-98-104.

203. Biodegradable porous scaffolds for the bone tissue regeneration / O. I. Agapova, T. V. Druzhinina, K. V. Trofimov [et al.] // Inorganic Materials: Applied Research. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 219-225. doi:10.1134/S2075113316020027

204. Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка / Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, О. И. Агапова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 6-13.

205. S. L. Levengood. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering / S. L. Levengood, M. Zhang // Journal of Materials Chemistry B. – 2014. – Vol. 2. – № 21. – P. 3161-3184. doi:10.1039/c4tb00027g.

206. Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: Towards natural therapeutics / S. Afewerki, A. Sheikhi, S. Kannan [et al.] // Bioengineering & Translational Medicine. – 2019. – Vol. 4. – № 1. – P. 96-115. doi:10.1002/btm2.10124.

207. C. Dong. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives / C. Dong, Y. Lv // Polymers (Basel). – 2016. – Vol. 8. – № 2. – P. 42. doi:10.3390/polym8020042.

208. Децеллюляризация фрагмента донорской поджелудочной железы для получения тканеспецифического матрикса / А. С. Пономарева, Л. А. Кирсанова, Н. В. Баранова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 1. – С. 123-133. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-123-133.

209. Сравнительный анализ протоколов децеллюляризации лентикулярной ткани роговицы / С. А. Борзенок, С. В. Костенев, А. В. Дога [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 137-146. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-2-137-146.

210. Биологические и функциональные свойства лиофилизированных форм тканеинженерных матриксов из пуповины человека / А. А. Кондратенко, Л. И. Калюжная-Земляная, Д. В. Товпеко [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25. – № 1. – С. 113-122. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-1-113-122.

211. Децеллюляризованная строма пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине: систематический обзор / Ю. Б. Басок, А. А. Кондратенко, Л. И. Калюжная [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25. – № 2. – С. 82-98. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-2-82-98.

212. Биосовместимые и функциональные свойства тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из децеллюляризованного хряща свиньи / Е. А. Немец, А. Э. Лажко, А. М. Григорьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24. – № 4. – С. 73-84. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-4-73-84.

213. Влияние трипсина на биохимические и функциональные свойства децеллюляризованного суставного хряща свиньи / А. Д. Кириллова, Е. А. Немец, А. М. Григорьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25. – № 3. – С. 76-86. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-76-86.

214. Особенности технологии децеллюляризации фрагментов печени человека как тканеспецифического мелкодисперсного матрикса для клеточно-инженерной конструкции печени / Е. А. Немец, Л. А. Кирсанова, Ю. Б. Басок [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. – № 4. – С. 70-77. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2017-4-70-77.

215. Биологические свойства макропористого криоструктурата на основе компонентов внеклеточного матрикса / Григорьев А. М., Басок Ю. Б., Белова А. Д. [и

др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2023;25(4):109-120. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-4-109-120.

216. Способ уменьшения хирургической пористости протезов кровеносных сосудов малого диаметра / Е. А. Немец, А. И. Хайруллина, В. Ю. Белов [и dpl.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25. – № 3. – С. 87-96. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-87-96.

217. Modulating cell adhesion to polybutylene succinate biotextile constructs for tissue engineering applications / V. P. Ribeiro, L. R. Almeida, A. R. Martins [et al.] // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2017. – Vol. 11. – № 10. – P. 2853-2863. doi:10.1002/term.2189.

218. Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface / M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, A. Khademhosseini // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – № 21. – P. 5230-5246. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.079.

219. Особенности адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на пленках из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата) с различной шероховатостью поверхности / В. А. Сургученко, А. С. Пономарева, А. Е. Ефимов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 72-77.

220. 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.

221. Mechanism of shape determination in motile cells / K. Keren, Z. Pincus, G. M. Allen [et al.] // Nature. – 2008. – Vol. 453. – № 7194. – P. 475-480. doi:10.1038/nature06952.

222. Lateral diffusion of receptor-ligand bonds in membrane adhesion zones: Effect of thermal membrane roughness / H. Krobath, G. J. Schütz, R. Lipowsky, T. R. Weikl // Europhysics Letters. – 2007. – Vol. 78. – № 3. – P. 38003. doi:10.1209/0295-5075/78/38003.

223. Two intertwined facets of adherent membranes: membrane roughness and correlations between ligand–receptors bonds / E. Reister, T. Bihr, U. Seifert, A. S. Smith // New Journal of Physics. – 2011. – Vol. 13. – № 2. – P. 025003. doi:10.1088/1367-2630/13/2/025003.

224. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique / D. P. Antonio, M. Lasalvia, G. Perna, V. Capozzi // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2012. – Vol. 1818. – № 12. – P. 3141-3148. doi:10.1016/j.bbamem.2012.08.001.

225. B. T. Kim. Functional nanoparticles translocation into cell and adhesion force curve analysis / H. Lee, M. Veerapandian, B. T. Kim, K. Yun, S. W. Seo // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – Vol. 12. – № 10. – P. 7752-7763. doi:10.1166/jnn.2012.6596.

226. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy / Y. Wang, C. Xu, N. Jiang [et al.] // Scanning. – 2016. – Vol. 38. – № 6. – P. 558-563. doi:10.1002/sca.21300.

227. Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes / M. Staykova, D. P. Holmes, C. Read [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). – 2011. – Vol. 108. – P. 9084-9088. doi:10.1073/pnas.1019292108.

228. Исследование микро- и наноструктуры клеток печени, культивированных на биодеградируемых скаффолдах на основе фиброина шелка, методом сканирующей зондовой оптической нанотомографии / О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, Л. А. Сафонова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 115-122. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-4-115-122.