увеличивают число положительных результатов лечения [1]. Однако до настоящего момента в мире не существует зарегистрированного и активно применяющегося продукта или технологии на основе тканевой или клеточной инженерии. Имеющийся у нас опыт разработки и применения ТИК на основе биополимеров, заселенных аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) в экспериментах на животных показал их высокую биосовместимость и возможность использования для замещения дефектов мочевого пузыря [2, 3]. Однако мировой опыт применения аллогенных МСК для реконструкции структур урогенитального тракта на сегодняшний день представлен весьма скудно [4]. Поэтому разработка новых ТИК для реконструкции является актуальной проблемой современной медицины.

Материал и методы. Исследование выполнено на 4 взрослых кроликах-самцах породы «шиншилла». ТИК, состоящие из слоев полилактида и поликапролактона, заселенных аллогенными МСК, трансплантированы *in vivo* на модель острой травмы уретры кролика. Анестезиологическое пособие включало комбинированный препарат золетил (25 мг/кг внутривенно в краевую ушную вену) и миорелаксант рометар (2% раствор внутримышечно в объеме 1,0–1,5 мл). Животные выводились с использованием тех же препаратов в дозах в 3–4 раза превышающих терапевтическую. Сравнение проводили с интактными животными. Результаты оценивались лучевым и морфологическим способом, определяли жизнеспособность трансплантата и его интеграцию с нативной тканью.

Результаты исследования. Через 2 месяца на серии уретрограмм определяется нормальная проходимость мочеиспускательного канала без экстравазации контраста. При макроскопическом осмотре явления отторжения трансплантата не выявлены. Гистологически стенка уретры представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизирована и образована переходным эпителием и собственной пластинкой слизистой. Толщина переходного эпителия оказалась снижена и составляла $30,0 \pm 2,0$ мкм, что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов.

Обсуждение. Разработанная ТИК способна обеспечить поддержание адекватного просвета уретры в течение длительного времени, обладает физическими характеристиками (эластичность, растяжимость), позволяющими сохранять функцию не только отведения мочи, но и копулятивную, а также имеет прочностные характеристики, обеспечивающие возможность эффективной накладки хирургического шва без прорезывания лигатур и не активирует иммунные реакции против трансплантата.

Вывод. Разработанная ТИК может применяться для заместительной пластики уретры в эксперименте.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14–50–00068.

Литература:

1. Versteegden L.R.M. et al. Tissue engineering of the urethra: a systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. *European urology* 2017; 72(4):594–606.
2. Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Виноградова Т.И. и др. Экспериментальная реконструкция мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения. *Медицинский альянс*. 2016; 1:50–2.
3. Yudin N.M., Nashchekina Yu.A., Blinova M.I. et al. Experimental bladder regeneration using a poly-L-lactide/silk fibroin

scaffold seeded with nanoparticle-labeled allogenic bone marrow stromal cells. *Int. J. Nanomed.* 2016; 11:4521–33.

4. Муравьев А.Н., Орлова Н.В., Блинова М.И. и др. Тканевая инженерия в урологии, новые возможности для реконструкции мочевого пузыря. *Цитология* 2015; 57(1):14–8.

Градов О.В., Крюковских В.В.

FÜNFTE-MIAM-ТЕХНИКА ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ЭМБРИОЛОГИИ

Лаборатория биологического воздействия наноструктур ИНЭПХФ РАН, Москва, Россия

o.v.gradov@gmail.com

Gradov O.V., Krükowskikh V.V.

FÜNFTE-MIAM FOR BIOCHEMICAL EMBRYOLOGY PROBLEMS

Laboratory of biological effects of nanostructures INEPCP RAS, Moscow, Russia

Введение. Известно, что микроскопия с многими объективами для ввода-вывода световых пучков и «микроскопия светового листа», микроскопия в режиме селективного планарного освещения [1] широко используются в биологии развития, репродуктологии и эмбриологии в частности / в особенности. На данный момент разработаны схемы с четырьмя объективами, из которых 2 являются иллюминационными, 2 — регистрирующими (SiMView / Four-lens SPIM / MuVi-SPIM), с 3-мя объективами, из которых 2 иллюминационных, 1 — регистрирующий (mSPIM); с двумя объективами и дополнительным для SPIM-микроскопии посадкой на стандартный инвертированный микроскоп с его объективами, а иногда — и сохранением опорного источника пучка на стороне последнего (diSPIM — Dual Selective Plane Illumination Microscopy; Ti-diSPIM), но они не являются оптимальными с точки зрения углового 3D контроля образца. Последние версии, совместимые с инвертированными и редуционно-адаптированными металлографическими микроскопами, уже не предназначены для капиллярной микроскопии, а работают с пластиком / чашками Петри. Первые — имеют конфликт между входящим и выходящим пучками (неидентичность в тракте и невзаимозаменяемость объективов). В данных конструкциях изменения углов относительно ортогональной схемы невозможны или приводят к невоспроизводимости результатов (в случаях DIY-конструкций, отличных от OpenSPIM). Эффекты ориентации образца, в частности, эмбриона (во внешних полях и относительно источников, что может представлять сугубый биофизический интерес, либо относительно и коррелятивно к потоку химического агента — в случае т.н. «биохимической эмбриологии», связанной с выявлением, физиологической идентификацией агентов реакционно-диффузионных процессов морфогенеза либо веществ-аттрактантов клеток в их формирующей миграции и дифференцировке в экспериментальном эмбриогенезе) не могут быть изучены, когда по осям произведена ортогонализация, а возможность визуализации и измерений с некоторых углов ограничена. Нами была поставлена задача создания схем, пригодных для эмбриологических исследований на эмбрионе *Danio rerio* и подобных модельных объектах в капиллярной версии при возможности их визуализации в том числе с торца капилляра / области перфузии.

Материал и методы. Результаты. Исходя из представлений о редукации к сингулярным схемам,

простым прототипом был избран четырехобъективный тетраэдрический эквивалент SPIM — MIAM [Multiple Imaging Axis Microscopy] (рис. 1-а), геометрически неидентичный стандартным MIAM [Multispectral Imaging Autofluorescence Microscopy], однако позволяющий реализовывать их мультиплекслируемые (в т.ч. «хеометрические») режимы при работе в нашей модификации [4]. Мы отошли от жесткой тетраэдрической геометрии, реализовав вращение / движение вокруг оси (ближе к месту крепления объектива) тубусов SPIM в стандартной двухобъективной версии, параллельно навесив сверху полый держатель капилляра с ограниченным углом поворота, согласованного (как по углу, так и по высоте капилляра) с встроенным в держатель капилляра (в ряде случаев при сравнительно больших эмбриональных микропрепаратах заменяемого перфузионным шприцом) компактным тубусом-микроскопом от просмотрово-измерительного инструмента (для ядерных фотоэмульсий) "Pye Scientific Instruments" (W.G. Pye & Company Ltd). Источник светового пучка представлен сменным DPSS-лазером (в последней версии — турелью револьверного типа), однако предусмотрен и «цитометрический» вариант, где дополнительно используется лазерный пучок с нижней части шприца / капилляра. Общий вид оптической схемы представлен на рис. 1-б. Далее, в принципе, возможны два варианта регистрации: стереоскопический, когда оба горизонтальных тубуса сочленены с камерой, дающей анаглифическое лазерное изображение эмбриона в двух симметричных позициях (в случае использования соответствующих длин волн лазеров), и моноскопический — с одним регистрирующим тубусом при вращающемся капилляре. Примеры режимов использования двух тубусов также включают координированную регистрацию аналоговым (для обработки радиочастотного спектра сигнала и мониторинга формы волны на двухрежимном вектроскопе) и цифровым (для получения полноценных изображений) детектором (матрицами ПЗС и КМОП соответственно) на каждом катадиоптрическом оптическом канале объектива. Такой вариант показан на рис. 1в.

Рис. 1. Сопоставление схем MIAM, FÜNTE-MIAM и diSPIM / Ti-diSPIM

Выводы. Вышеперечисленные схемы, с точки зрения анализа подвижных биологических систем (и механики), получившие аббревиатуру "FÜNTE-MIAM", концептуально превосходят жесткую схему любой SPIM-надстройки над обычным микроскопом (рис. 1-г, 1-д), но при необходимости, имплементируемы в формате надстройки над предметным столом такого микроскопа.

Литература:

1. Huiskens J., Stainier D.Y. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* 2009; 136(12): 1963–75.
2. Weber M., Huiskens J. Omnidirectional microscopy. *Nature Methods* 2012; 9(7): 656–7.
3. Swoger J., Huiskens J., Stelzer E.H. Multiple imaging axis microscopy improves resolution for thick-sample applications. *Optics letters* 2003; 28(18): 1654–6.
4. Pini R., Basile V., Ambrosini S. et al. Healing process study of laser-welded corneal tissue by Multispectral Imaging Autofluorescence Microscopy (MIAM). *Proc. SPIE*. 2006.

Градов О.В., Оганесян В.А., Яблоков А.Г.

НОВЫЕ КОНФИГУРАЦИИ МУЛЬТИПОЗИЦИОННОГО LSFM- / SPIM-КАРТИРОВАНИЯ С РЕГУЛИРУЕМЫМ УГЛОВЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ И РЕПРОДУКТОЛОГИИ

*Лаборатория биологического воздействия
наноструктур ИНЭПХФ РАН, Москва, Россия*

o.v.gradov@gmail.com

Gradov O.V., Oganessian V.A., Jablov A.G.

NOVEL MULTI-ANGLE TECHNIQUES FOR LSFM / SPIM MAPPING OF EMBRYOLOGICAL SAMPLES AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY AIMS

*Laboratory of biological effects of nanostructures
INEPCP RAS, Moscow, Russia*

Введение. Известно, что методики микроскопии LSFM ("Light Sheet Fluorescence Microscopy") и, в частности, OPFOS ("Orthogonal Plane Fluorescence Optical Sectioning Microscopy") и SPIM ("Selective Plane Illumination Microscopy" и "Single Plane Illumination Microscopy"), всё более широко внедряются ныне в лабораторные и преклинические биомедицинские области. Методы SPIM особо актуализированы в биологии развития / эмбриологии и смежных ей областях, поскольку позволяют реализовывать глубинное профилирование живых эмбрионов *in situ* с получением трёхмерного изображения (подобное результатам рендеринга при компьютерной томографии) [1, 2]. Объектами, исследованными на данный момент, являются, преимущественно, малые в пространственном отношении эмбрионы: так, исследование специализации клеток вплоть до нейроморфогенеза проводят на нематодах *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* [3], а развитие позвоночных анализируют как на модельном объекте на эмбрионах *Danio rerio* [4]. Микроскопические схемы стандартных вариантов SPIM-микроскопов представлены на рис. 1. Можно видеть, что, при фиксированных объективах иллюминации и сбора микрофотоинформации, вращается собственно эмбрион в капилляре (либо перфузионном шприце). Это может приводить к артефактам, которые сами по себе способны сдвигать картину эмбрионального развития. Источником артефактов могут быть микровязкостные эффекты среды, конвективные (и конвекционно-химические; при массопереносе с биохимической реакцией) потоки, изменение ориентации движения клеток за счет сдвига источников стимуляции и хемотаксиса клеток при регулярном вращении координатной системы, в которой расположен