DOI: 10.22184/1993-7296.FRos.2024.18.8.640.648

Интравитальная микроскопия – окно в мир биопроцессов

М. Е. Степанов[1,2], А. А. Власов[1], П. А. Демина[1,3,4], Р. А. Акасов[1,2,3,4,7], Г. Бабаева[5], В. И. Юсупов[3,6], Т. В. Егорова[1,6], К. Р. Каримуллин[1,6], А. Н. Генералова[3,4], А. В. Наумов[1,6], Е. В. Хайдуков[1,2,3,4,7]

[1] *Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия.*

[2] *Российский научный центр хирургии им. академика Б. В. Петровского, Москва, Россия.*

[3] *Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.*

[4] *Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия.*

[5] *НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

[6] *Физический институт им. П. Н. Лебедева Российской академии наук, Троицкое обособленное подразделение, Москва, Троицк, Россия.*

[7] *Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия*

В статье показан потенциал практического использования метода оптической микроскопии дорсальной кожной складки в качестве эффективной технологии диагностики живых систем. Экспериментально доказано, что даже в базовой постановке представленный метод позволяет получать большой объем полезных исследовательских данных в условиях, максимально приближенных к нативным.

Степанов М.Е. 0000-0002-0332-1235
Власов А. А. 0000-0003-3899-3928
Демина П. А. 0000-0001-6349-2979
Акасов Р. А. 0000-0001-6486-8114
Бабаева Г. 0000-0001-5781-7925
Юсупов В. И. 0000-0002-9438-6295
Егорова Т. В. 0000-0002-3346-3242
Каримуллин К. Р. 0000-0001-6799-2479;
e-mail: kamil_karimullin@mail.ru
Генералова А. Н. 0000-0001-9646-1693
Наумов А. В. 0000-0001-7938-9802
Хайдуков Е. В. 0000-0002-3900-2949

Intravital Microscopy – A Window Into The World Of Bioprocesses

M. E. Stepanov[1,2], A. A. Vlasov[1], P. A. Demina[1,2,3,4], R. A. Akasov[1,2,3], G. Babaeva[5], V. I. Yusupov[3,6], T. V. Egorova[1,6], K. R. Karimullin[6], A. N. Generalova[3,4], A. V. Naumov[1,6], E. V. Khaydukov[1,2,3,4,7]

[1] *Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia.*

[2] *Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia.*

[3] *Kurchatov Complex of Crystallography and Photonics, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia.*

[4] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.*

[5] *Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia.*

[6] *P. N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Troitsk Branch, Moscow, Troitsk, Russia.*

[7] *D. I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow, Russia.* [*]

The article shows the potential of practical use of the dorsal skin fold optical microscopy method as an effective diagnostic technology for biosystems. It has been experimentally proved that even in the basic formulation, the presented method allows obtaining a large amount of useful research data in conditions as close as possible to native ones.

Keywords: life sciences, optical clearing agents, light-field microscopy in white light, dark-field fluorescence microscopy

The article is received: 14.11.2024
The article is accepted:02.12.2024

M. E. Stepanov 0000-0002-0332-1235
A. A. Vlasov 0000-0003-3899-3928
P. A. Demina 0000-0001-6349-2979
R. A. Akasov 0000-0001-6486-8114
G. Babaeva 0000-0001-5781-7925
V. I. Yusupov 0000-0002-9438-6295
T. V. Egorova 0000-0002-3346-3242
K. R. Karimullin 0000-0001-6799-2479;
e-mail: kamil_karimullin@mail.ru
A. N. Generalova 0000-0001-9646-1693
A. V. Naumov 0000-0001-7938-9802
E. V. Khaydukov 0000-0002-3900-2949

Ключевые слова: науки о жизни, оптические просветляющие агенты, светлопольная микроскопия в белом свете, темнопольная флуоресцентная микроскопия

Статья получена: 14.11.2024
Статья принята: 02.12.2024

ВВЕДЕНИЕ

В науках о жизни большой объем важной информации может быть получен только при непосредственном изучении живых систем с учетом всех сложных внутренних процессов и взаимодействий. В условиях *in vivo*, при сохранении межклеточных взаимодействий, транспорта веществ и сигналов можно надеяться на получение реальной картины процессов, протекающих в биологических тканях. Живой организм состоит из триллионов клеток [1], где каждая отдельная клетка является химической фабрикой, синтезирующей и утилизирующей одни вещества и стимулы для того, чтобы производить другие и передавать их дальше по цепочке одному из триллионов адресатов, а может быть, и всем сразу. И все это в абсолютном «молчании», с использованием лишь языка физико-химических «жестов». Тем не менее, изучать эту запутанную систему необходимо и возможно, и главным инструментом здесь оказываются фотоны, с одной стороны, позволяющие регистрировать информацию интуитивно понятным способом, с другой стороны, реализующие достаточное разрешение при анализе живой системы. Методы оптической спектроскопии и микроскопии являются одними из наиболее эффективных способов изучения структуры и динамики сложных молекулярных систем, наноструктур и материалов на их основе [2–9] и широко используются для диагностики и терапии в биологии и медицине [10–14].

Стандартом в области наблюдения является клеточная микроскопия, проводимая *in vitro* (от лат. «в стекле»), когда клеточный препарат изучается в реальном времени под большим увеличением в искусственно созданных условиях. Однако нетрудно понять, что большая часть информации, связанная с сигналами от других клеток (эндокринными – от далеких клеток, паракринными – от соседних), полностью теряется при таком подходе. Цельную картину взаимного влияния клеток друг на друга можно сохранить, если использовать *ex vivo* (лат.

INTRODUCTION

In life sciences, a large amount of important information can be obtained only by directly studying biosystems, considering all complex internal processes and interactions. Under in vivo conditions, while maintaining intercellular interactions, transport of substances and signals, one can hope to obtain a real picture of the processes occurring in biological tissues. A living organism consists of trillions of cells [1], where each individual cell is a chemical factory that synthesizes and disposes of some substances and stimuli to produce other ones and transfers them further down the chain to one of the trillions of recipients, or maybe all at once. And all this in absolute “silence”, using only the language of physico-chemical “gestures”. Yet, it is necessary and possible to study this intricate system, and photons turn out to be the main tool here, allowing information to be recorded in an intuitive way, on the one hand, and realizing sufficient resolution when analyzing a living system, on the other hand. Optical spectroscopy and microscopy methods are among the most effective ways to study the structure and dynamics of complex molecular systems, nanostructures and materials based on them [2–9] and are widely used for diagnostics and therapy in biology and medicine [10–14].

The standard in the field of observation is *in vitro* cell microscopy (from Latin “in glass”), when a cellular specimen is studied in real time under high magnification in artificially created conditions. However, it is not difficult to understand that most of the information associated with signals from other cells (endocrine – from distant cells, paracrine – from neighboring cells) is completely lost with this approach. A complete picture of the mutual influence of cells on each other can be preserved using *ex vivo* (lat. “from life”) histological approaches, when a fixed thin tissue sample is analyzed, but at the same time, there is obviously a loss of data on the development of processes over time.

From what has been said, in modern biology and medicine, approaches are extremely in demand that provide long-term monitoring of a living organism in real time at the level of its individual cells and/or cell systems, which is quite difficult to implement due to the limited penetration of radiation from the optical range of the spectrum in biological tissues. However, there are several methods to work around this problem. For example, clarification methods [15] can be used when the transparency of tissues (mainly integuments) for incident light

«из жизни») гистологические подходы, когда анализируется фиксированный тонкий образец ткани, но при этом со всей очевидностью происходит потеря данных о развитии процессов во времени.

Из сказанного ясно, что в современной биологии и медицине чрезвычайно востребованы подходы, обеспечивающие длительный мониторинг живого организма в режиме реального времени на уровне его отдельных клеток и/или систем клеток, что довольно сложно реализовать из-за сильного поглощения излучения оптического диапазона спектра в биологических тканях. Тем не менее, существует ряд методов, позволяющих обойти эту проблему. Например, можно использовать методы просветления [15], когда прозрачность тканей (в основном, покровов) для падающего света повышается благодаря модификации их структурных и оптических свойств путем иммерсии в биосовместимых оптических просветляющих агентах, выравнивающих показатели рассеивателей. Можно поступать иначе и сдвигать излучение в спектральные области, в которых оно слабо взаимодействует с тканями организма, в так называемые спектральные «окна прозрачности» тканей [15, 16], расположенные в ближнем инфракрасном или рентгеновском диапазоне спектра. Наконец, можно обойти проблему специальным выбором геометрии эксперимента – созданием реального окна для наблюдения. Все эти методы, объединенные под общим названием «интравитальная микроскопия» [17] (микроскопия живых систем), сегодня дают возможность достичь значительного прогресса в науках о жизни, поскольку они не нарушают картины сложного межклеточного взаимодействия [18] и обеспечивают наблюдение в реальном времени на уровне отдельных клеток и клеточных структур [19].

В данном обзоре мы демонстрируем пример реализации *in vivo* метода наблюдения лабораторных мышей с использованием оригинальной конструкции дорсальной кожной складки. В этой конструкции складка кожи на спине животного приподнимается над основной поверхностью тела и фиксируется специальной камерой с оптически прозрачным окном, что дает возможность проводить наблюдения общей продолжительностью до нескольких недель [20]. Показано, что даже в самой базовой конфигурации с использованием инвертированного оптического микроскопа можно наблюдать подкожные слои биологических тканей и кровеносные сосуды (вплоть до

increases due to modification of their structural and optical properties by immersion in biocompatible optical clearing agents that equalize the optical properties of diffusers. It is possible to do otherwise and shift radiation into spectral regions in which it weakly interacts with body tissues – into the so-called spectral "transparency windows" of tissues [15, 16] located in the near infrared or X-ray spectral range. Finally, you can get around the problem by choosing the geometry of the experiment to create a real window for observation. All these methods, combined under the general name "intravital microscopy" [17] (microscopy of biosystems), today make it possible to achieve significant progress in life sciences, since they do not disrupt the picture of complex intercellular interaction [18] and provide real-time observation at the level of individual cells and cellular structures [19].

In this paper, we demonstrate an example of an implementation of an *in vivo* method for observing laboratory mice using an original dorsal skinfold design. In this design, the fold of skin on the animal's back is lifted above the main surface of the body and fixed by a special camera with an optically transparent window, which makes it possible to conduct observations with a total duration of up to several weeks [20]. It is shown that even in the most basic configuration, using an inverted optical microscope, it is possible to observe subcutaneous layers of biological tissues and blood vessels (including capillaries), as well as register the processes occurring in them at the level of individual cells in real time.

1. THE METHOD OF EXPERIMENT

The experimental scheme is shown on Fig. 1. Microscopic studies were performed using an inverted fluorescence microscope Motic AE31E with an incandescent lamp as a white light source and a mercury lamp for fluorescence imaging. For additional labeling of biological tissues, a fluorescent dye Cy-5-amine with absorption (emission) maxima at wavelengths of 646 (662) nm was used. An appropriate set of spectral filters was used to excite and detect fluorescence. A Raptor Photonics camera (digital FALCON EMCCD FA285-CL) was used to register optical signals.

The dorsal chamber and the table compatible with a standard microscope were designed by us independently and made of biocompatible polycarbonate on a 3D printer [21]. The key difference of the dorsal chamber we used is the minimized weight of the device. It is well known that commercially

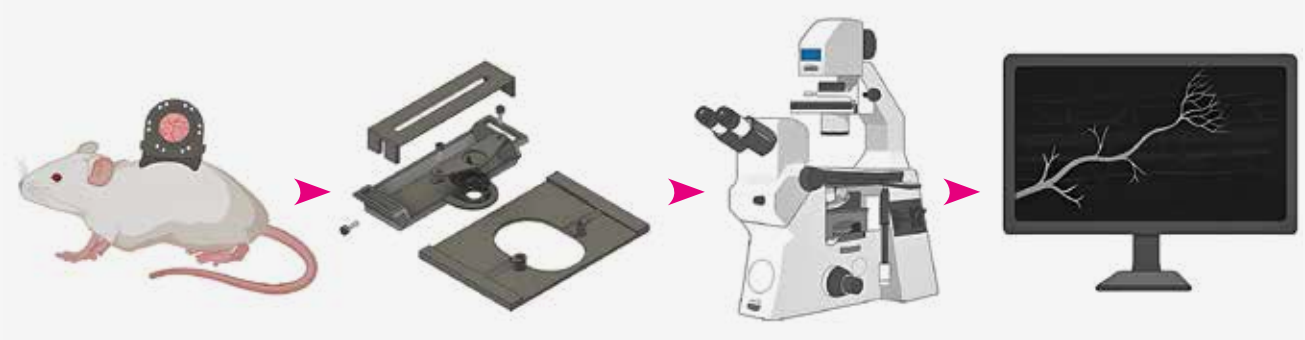

Рис. 1. *Схема эксперимента: мышь с установленной дорсальной камерой фиксируется на специальном столике, который устанавливается в микроскопе для проведения исследования. Для реализации этого подхода можно использовать стандартный оптический микроскоп, применяемый для исследования клеток и гистологии тканей*
Fig. 1. *Experimental scheme: a mouse with a dorsal chamber installed is fixed on a special stage, which is installed in a microscope for research. To implement this approach, a standard optical microscope can be used to study cells and tissue histology*

капилляров), а также регистрировать процессы, происходящие в них на уровне отдельных клеток в реальном масштабе времени.

1. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Схема эксперимента предоставлена на рис. 1. Микроскопические исследования проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Motic AE31E с лампой накаливания в качестве источника белого света и ртутной лампой для визуализации во флюоресцентном режиме. Для дополнительного маркирования биотканей использовали флуоресцентный краситель Cy-5-amine с максимумами поглощения (эмиссии) на длинах волн 646 (662) нм. Для возбуждения и детектирования флуоресценции использовали соответствующий набор спектральных фильтров. Для регистрации оптических сигналов использовали камеру Raptor Photonics (digital FALCON EMCCD FA285-CL).

Дорсальная камера и совместимый со стандартным микроскопом столик были спроектированы нами самостоятельно и изготовлены из биосовместимого поликарбоната на 3D-принтере [21]. Ключевым отличием использованной нами дорсальной камеры является минимизированный вес устройства. Хорошо известно, что коммерчески доступные титановые камеры достигают до 30–40% веса животного, что вызывает не только избыточное травмирование животных [22], но и приводит к существенным физиологическим изменениям в процессе наблюде-

available titanium chambers reach up to 30–40% of the animal's weight, which causes not only excessive injury to animals [22], but also leads to significant physiological changes in the observation process, for example, due to the production of the stress hormone corticosterone [23].

To prepare for the experiment, the dorsal chamber was surgically mounted on the mouse's back with fixation using a 5–0 monofil thread. All manipulations with animals were performed using general injection anesthesia by administering a combination of Zoletil-Xylazine drugs (20–40 mg/kg of Xylazine intramuscularly and 5–10 mg/kg of Zoletil intraperitoneally 10 minutes after Xylazine). To reduce light scattering, a thin layer of skin was resected on one side of the skinfold up to the muscular fascia. Microscopy was performed using a set of standard 4–40× micro lenses. The resulting images and videos were processed in the ImageJ program.

2. LIGHT-FIELD MICROSCOPY IN WHITE LIGHT

The results obtained using the brightfield technique are illustrated in Fig. 2. The technique makes it possible to observe various components of subcutaneous tissues: the vascular bed, as well as rounded subcutaneous fat cells (adipocytes). At the same time, the morphology of the vascular network can be traced almost to the scale of capillaries: the red marks show the sequential branching of a large vessel up to terminal arterioles

ния, например, из-за выработки гормона стресса кортикостерона [23].

Для подготовки к эксперименту дорсальную камеру хирургически устанавливали на спину мыши с фиксацией с помощью нити Монофила 5-0. Все манипуляции с животными проводили с применением общей инъекционной анестезии путем введения комбинации препаратов Золетил-Ксилазин (20–40 мг/кг Ксилазина внутримышечно и 5–10 мг/кг Золетила внутрибрюшинно через 10 минут после Ксилазина). Для уменьшения светорассеяния из исследуемой области удаляли тонкий участок кожи вплоть до мышечной фасции с одной из сторон кожной складки. Микроскопию проводили с использованием набора стандартных микрообъективов 4–40×. Полученные изображения и видео обрабатывали в программе ImageJ.

2. СВЕТЛОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ В БЕЛОМ СВЕТЕ

Результаты, полученные с использованием методики в светлом поле, иллюстрирует рис. 2. Видно, что методика позволяет наблюдать различные компоненты подкожных тканей: сосудистое русло, а также округлые подкожные жировые клетки (адипоциты). При этом морфология сосудистой сети прослеживается практически до масштаба капилляров: красными метками показано последовательное ветвление крупного сосуда вплоть до терминальных артериол (~15 мкм). Такая детализация дает возможность изучать многие патофизиологические процессы. Например, можно исследовать рост и развитие сосудов (ангиогенез) в ответ на повреждение или химический стимул либо патологическое образование в области дорсального окна. Кроме того, модель дает возможность прямого наблюдения вазодилатации и вазоконстрикции (соответственно, расширения или сужения просвета кровеносных сосудов) при химических или термических

(~15 μm). The detailed picture makes it possible to study many pathophysiological processes. For example, vascular growth and development (angiogenesis) can be investigated in response to damage or chemical stimulus, or pathological formation in the dorsal window area. In addition, the model makes it possible to directly observe vasodilation and vasoconstriction (respectively, dilation or narrowing of the lumen of blood vessels) under chemical or thermal influences or inflammation, which is extremely valuable, since usually such data are studied only indirectly [24]. Clear distinctness of vasa vasorum vessels which are thin vessels branching directly from large ones and feeding their walls and nearby tissues (branches are marked in Fig. 2a in green), – can be used to study some common vascular pathologies. For example, violations in their work hypothetically can cause inflammation in the walls of large vessels and lead to the development of atherosclerosis [25].

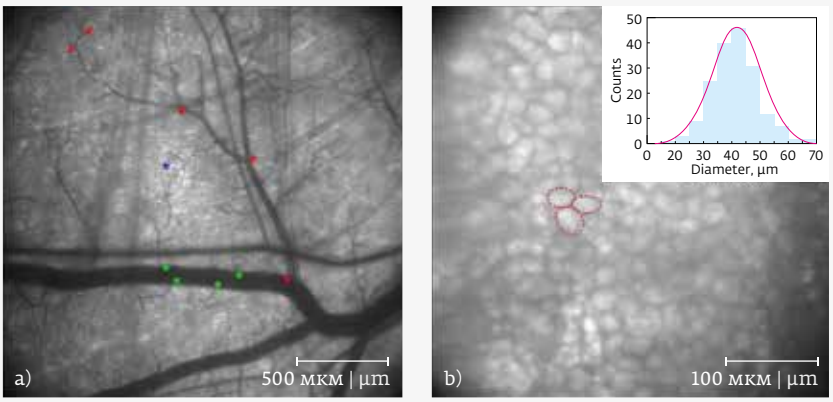

Рис. 2. *Изображение, созданное методом светлопольной микроскопии в белом свете, биоткани живой мыши в окне наблюдения дорсальной камеры: а) – полученное при низком увеличении (красными точками отмечено последовательное ветвление крупного сосуда, зелеными точками – сосуды vasa vasorum, синими точками – более глубокий слой адипозной (жировой) ткани; b) – полученное при более высоком увеличении (красным пунктиром отмечены элементы адипозной ткани (на вставке – статистика распределения по размерам отдельных адипоцитов)*

Fig. 2. *An image created by light-field microscopy in white light of the biological tissue of a living mouse in the observation window of the dorsal chamber: a) obtained at low magnification (red dots indicate sequential branching of a large vessel, green dots indicate vasa vasorum vessels, blue dots indicate a deeper layer of adipose (fat) tissue; b) obtained at a higher magnification (the red dotted line marks the elements of adipose tissue (in the insert – size distribution of adipocytes)*

воздействиях или воспалениях, что крайне ценно, так как обычно подобные данные изучаются лишь косвенно [24]. Четкая различимость сосудов типа vasa vasorum – тонких сосудов, ответвляющихся напрямую от крупных и питающих их стенки и близлежащие ткани (ответвления отмечены на рис. 2a зеленым цветом), – может быть использована для изучения некоторых распространенных патологий сосудов. Так, нарушения в их работе по одной из гипотез могут быть причиной возникновения воспалений в стенках крупных сосудов и приводить к развитию атеросклероза [25].

Как видно из рис. 2b, оказывается доступной для исследований также и адипозная (жировая) ткань. Это позволяет изучать ее физиологию, а также заболевания, связанные с нарушениями метаболизма, в т.ч. сахарный диабет [26]. Мы подсчитали статистику максимальных диаметров адипоцитов (рис. 2b) и обнаружили, что она соответствует нормальному закону распределения, при этом среднее значение размера элемента адипозной ткани 42 ± 12 мкм.

3. ТЕМНОПОЛЬНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Флуоресцентная микроскопия в широком поле позволяет существенно расширить круг изучаемых биопроцессов и получить ценные данные в режиме реального времени. Так, уже через несколько секунд после введения флуоресцентного красителя в кровоток малого животного в области дорсальной складки начинают заметно окрашиваться крупные сосуды с максимумом по

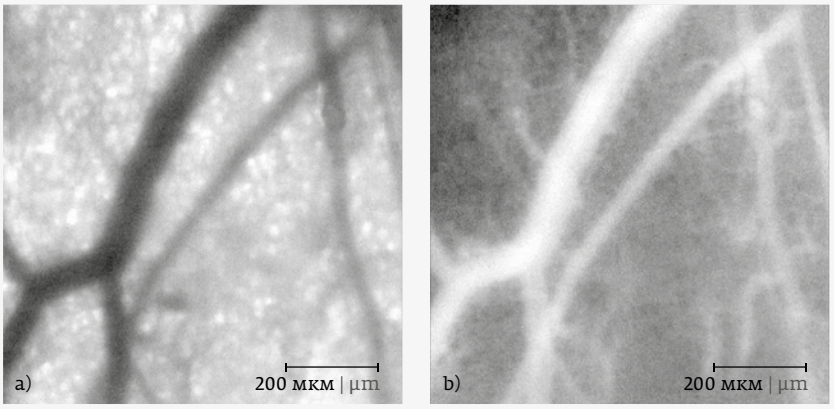

Рис. 3. *Изображение участка сосудистой сети при малом увеличении: a) – светлопольное; b) – флуоресцентное (окраска с помощью флуоресцентного красителя Cy-5-amine)*

Fig. 3. *Image of a section of the vascular network at low magnification: a) light-field; b) fluorescent (coloring with Cy-5-amine fluorescent dye)*

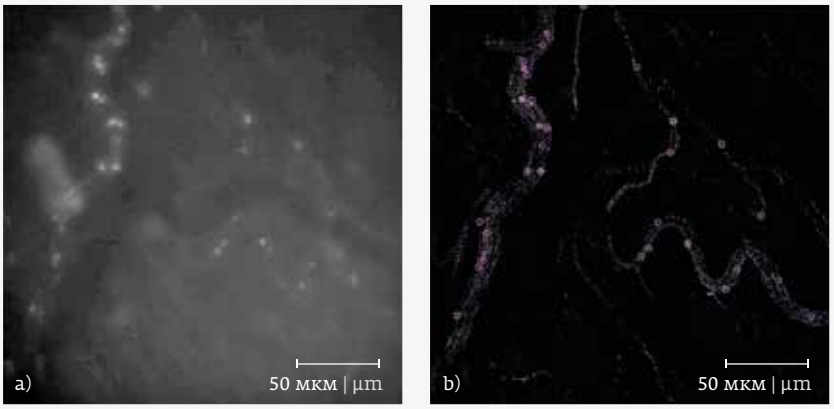

Рис. 4. *Определение траекторий движения отдельных клеток крови, непрерывно циркулирующих по артериолам и капиллярам: a) – изображение, полученное во время эксперимента, иллюстрирует положение индивидуальных окрашенных компонентов кровотока; b) – суммарное наблюдение (разверстка кадров за 30 секунд) за положением маркированных флюоресцентным красителем клеток крови (каждая фиолетовая окружность соответствует положению клеток, определяемых на отдельных кадрах рис. 4a)*

Fig. 4. *Determination of the trajectories of individual blood cells continuously circulating through arterioles and capillaries: a) the image obtained during the experiment illustrates the position of individual-colored components of the blood flow; b) total 30 sec-accumulated distribution of blood cells marked with fluorescent dye positions (each purple circle corresponds to the position of cells identified in individual frames on Fig. 4a)*

интенсивности на временных отрезках 3–5 минут. О детализации окрашивания можно судить по рис. 3, где в двух режимах показана одна и та же область дорсального окна при малом увеличении (объектив 4×).

На рис. 3b видно, что на характерном масштабе 20–30 мкм, примерно соответствующем размеру адипоцитов, во флуоресцентном режиме проявляется тонкая сетчатая структура окрашенной капиллярной сети. При большем увеличении (увеличение объектива 40×) возникает возможность наблюдения траекторий движения отдельных компонент крови (рис. 4), непрерывно циркулирующих по артериолам и капиллярам. Так в кадр размером 230×230 мкм^2 (рис. 4a) попадает одновременно от 20 до 40 индивидуальных клеток крови, движущихся по своим траекториям, то покидая область наблюдения, то вновь возвращаясь в нее. Если взять последовательный набор кадров наблюдения за временной интервал в 30 с и отметить точками в каждом из них регистрируемые клетки, то получится картина движения клеток (рис. 4b). Она отображает статистику регистрации частиц в разных частях кадра. Как показывает видеонаблюдение, этот интервал обеспечивает приблизительно двукратный запас времени на прохождение всего кадра самой медленно двигающейся клеткой. Помимо морфологии сосудистой сети, этот экспресс-анализ дает возможность качественно судить о средней скорости движения клеток: она ниже там, где точки (на рис. 4b) расположены плотнее. Также можно сделать качественные выводы и о наиболее «популярных» траекториях движения: точки расположены реже. Интересно отметить, что даже при расположении в одном сосуде траектории клеток не заполняют его полностью, оставляя пустоты.

Флуоресцентное окрашивание в *in vivo* эксперименте предоставляет обширные возможности для наблюдений, например, фармакокинетики препаратов, в т. ч. параметров экстравазации из кровотока в ткани [27] и средств доставки лекарств [28], работы клеток иммунной системы [29], микроциркуляции в опухолевых тканях [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение биологических процессов с помощью света сегодня широко распространено и рутинно используется как в *in vitro*, так и в *ex vivo* методиках. Однако как фотография уступает по количеству деталей видеофайлу, а видеозапись уступает реальному зрению, так и обычная микроско-

As can be seen from Fig. 2b, adipose (fat) tissue is also available for research. This allows us to study physiology, as well as diseases associated with metabolic disorders, including diabetes mellitus [26]. We calculated the statistics of maximum adipocyte diameters (Fig. 2b) and found that it corresponds to the normal distribution law, while the average size of the adipose tissue element is 42±12 μm.

3. DARK-FIELD FLUORESCENCE MICROSCOPY

Widefield fluorescence microscopy makes it possible to significantly expand the range of bioprocesses under study and to obtain valuable data in real time. Within a few seconds after the introduction of fluorescent dye into the bloodstream of a small animal, large vessels begin to noticeably fluoresce around the dorsal skinfold with a maximum intensity at times of 3 to 5 minutes. The coloring details can be evaluated on Fig. 3, where the same area of the dorsal window is shown in two modes at low magnification (4× lens).

Fig. 3b shows that at a characteristic scale of 20–30 μm, approximately corresponding to the size of adipocytes, a thin mesh structure of the colored capillary network appears in the fluorescent mode. At a higher magnification (magnification of the 40× lens), it becomes possible to observe the trajectories of individual blood components (Fig. 4) continuously circulating through arterioles and capillaries. Single 230×230 μm frame (Fig. 4a) can contain 20 to 40 individual blood cells moving simultaneously along their trajectories, leaving the observation area, then returning to it. If we take a set of sequential observation frames for a time interval of 30 seconds and mark the recorded cells with dots in each of them, we get a picture of cell movement (Fig. 4b). It displays statistics of particle registration in different parts of the frame. As video-observation shows, this time interval provides approximately double the time reserve allowing for the passage of the slowest moving cell through an entire frame. In addition to the morphology of the vascular network, this brief analysis makes it possible to qualitatively judge the average speed of cell movement: it is lower in regions where the dots (in Fig. 4b) are located more densely. It is also possible to draw qualitative conclusions about the most “popular” trajectories of movement: they are seen most distinctly. It is interesting to note that even being in one vessel, the trajectories of the cells do not fill it completely, leaving voids.

пия клеток или тканей содержит лишь малую часть богатой картины биологических процессов. Интравитальная микроскопия позволяет достичь прогресса в преодолении недостатков стандартных методик. Нами была реализована методика исследования в одном из ее базовых вариантов, и в данной работе мы продемонстрировали возможность наблюдения подкожных слоев ткани, в т. ч. сосудов и отдельных клеток крови в режиме реального времени. Тестовые эксперименты показали, что протекающие в биотканях процессы можно регистрировать длительное время вплоть до недели. Оценивая потенциал реализованной методики, мы рассчитываем на широкую кооперацию и внедрение этого многообещающего метода в повседневную исследовательскую практику как для фундаментальных исследований, так и для актуальных практических задач, например, для изучения фармакокинетики существующих и разрабатываемых лекарственных средств, оценки их взаимодействия с клетками организма (в т. ч. иммунными), процессов активной и пассивной доставки лекарственных средств.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках темы государственного задания Министерства просвещения РФ «Лазерные технологии для биомедицинских приложений» № 122122600055-2 в части проведения оптических наблюдений с помощью метода дорсальной камеры и темы государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» в части проведения исследований методами люминесцентной спектроскопии. Разработка конструкции дорсальной камеры и столика выполнена в рамках НИР по контракту № 749-ЭА-24-НИР от 25.06.2024 г. между Физическим институтом им. П. Н. Лебедева РАН и РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского.

REFERENCES

1. **Hu B. C.** The human body at cellular resolution: the NIH Human Biomolecular Atlas Program. *Nature*. 2019; 574(7777):187–92. DOI:10.1038/s41586-019-1629-x.
2. **Naumov A. V.** Low-temperature spectroscopy of organic molecules in solid matrices: from the Shpol'skii effect to laser luminescent spectromicroscopy for all effectively emitting single molecules. *Phys. Usp*. 2013;183(6):633–52. https://doi.org/10.3367/ufne.0183.201306f.0633
Наумов А. В. Спектроскопия органических молекул в твердых матрицах при низких температурах: от эффекта Шпольского к лазерной люминесцентной спектромикроскопии всех эффективно излучающих одиночных молекул. *УФН*. 2013;183(6):633–52. https://doi.org/10.3367/UFNr.0183.201306f.0633.
3. **Eremchev I. Y., Lozing N. A., Baev A. A., Tarasevich A. O., Gladush M. G., Rozhentsov A. A. et al.** Luminescence Microscopy of Single Quantum Dot Pairs with Nanometer Spatial Resolution. *JETP Letters*. 2018;108(1):30–37. https://doi.org/10.1134/S0021364018130076

Fluorescent staining in an *in vivo* experiment provides extensive opportunities for observations, for example, of the pharmacokinetics of drugs, including parameters of extravasation from blood flow to tissues [27] and drug delivery [28], the work of immune cells [29], microcirculation in tumor tissues [30].

CONCLUSION

The study of biological processes using light is widespread today and is routinely used in both *in vitro* and *ex vivo* techniques. However, just in the same way as photography is inferior in the number of details to a video file, and video recording is inferior to real vision, the standard microscopy of cells or tissues contains only a small part of the rich picture of biological processes. Intravital microscopy makes it possible to make progress in overcoming the shortcomings of standard techniques. We have implemented the research technique in one of its basic variants and demonstrated the possibility of observing subcutaneous tissue layers, including blood vessels and individual blood cells in real time. Test experiments have shown that the processes occurring in biological tissues can be recorded for a long time, up to weeks. Assessing the potential of the implemented technique, we count on broad cooperation and the introduction of this promising method into everyday research practice both in areas of basic research and actual biomedical practice, for example, to study the pharmacokinetics of existing and developing drugs, to assess their interaction with body cells (including immune cells), active and passive delivery processes of drugs.

CREDITS

The work was performed within the framework of the topic of the state assignment of the Ministry of Education of the Russian Federation "Laser Technologies for Biomedical Applications" No. 122122600055-2 in terms of conducting optical observations using the dorsal chamber method and the topic of the state assignment of the Kurchatov Institute Research Center in terms of conducting research using luminescent spectroscopy. The design of the dorsal chamber and the stage was developed within the framework of research under contract No. 749-ЭА-24-НИР dated 06/25/2024 between the P. N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences and the B. V. Petrovsky National Research Center of Surgery.

Еремчев И. Ю., Лозинг Н. А., Баев А. А., Тарасевич А. О., Гладуш М. Г., Роженцов А. А. и др. Люминесцентная микроскопия одиночных пар квантовых точек с нанометровым пространственным разрешением. *Письма в ЖЭТФ*. 2018;108(1):26–34. https://doi.org/10.1134/S0370274X18130064.

4. **Naumov A. V., Gorshelev A. A., Gladush M. G., Anikushina T. A., Golovanova A. V., Köhler J., Kador L.** Micro–Refractometry and Local–Field Mapping with Single Molecules. *Nano Letters*. 2018:18(10)6129–34. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b01753.
5. **Karimullin K. R., Arzhanov A. I., Eremchev I. Y., Kulnitskiy B. A., Surovtsev N. V., Naumov A. V.** Combined photon–echo, luminescence and Raman spectroscopies of layered ensembles of colloidal quantum dots. *Laser Physics*. 2019;29(12). https://doi.org/10.1088/1555–6611/ab4bdb.
6. **Karimullin K. R., Arzhanov A. I., Surovtsev N. V., Naumov A. V.** Electron–Phonon Interaction in Composites with Colloidal Quantum Dots: A Study by Luminescence Spectroscopy and Raman Scattering. *Optics and Spectroscopy*. 2023;131(10)995–999. https://doi.org/10.1134/S0030400X2310010
Каримуллин К. Р., Аржанов А. И., Суровцев Н. В., Наумов А. В. Электрон-фононное взаимодействие в композитах с коллоидными квантовыми точками: исследование методами люминесцентной спектроскопии и комбинационного рассеяния света. *Оптика и спектроскопия*. 2022;130(1):146–150. https://doi.org/10.21883/os.2022.01.51902.42–21.
7. **Eskova A. E., Arzhanov A. I., Magaryan K. A., Karimullin K. R., Naumov A. V.** Effect of Concentration on the Spectral–Luminescent Properties of Quantum Dots in Colloidal Solutions. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2020;84(1):40–3. https://doi.org/10.3103/S1062873820010116).
Еськова А. Е., Аржанов А. И., Магарян К. А., Каримуллин К. Р., Наумов А. В. Исследование влияния концентрации квантовых точек в коллоидном растворе на его спектрально–люминесцентные свойства. *Известия РАН. Серия физическая*. 2020;84(1):48–51. https://doi.org/10.31857/S036767652001012
8. **Arzhanov A. I., Savostianov A. O., Magaryan K. A., Karimullin K. R., Naumov A. V.** Photonics of semiconductor quantum dots: Applied aspects. *Photonics Russia*. 2022;16(2): 96–113. https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2022.16.2.96.112
Аржанов А. И., Савостьянов А. О., Магарян К. А., Каримуллин К. Р., Наумов А. В. Фотоника полупроводниковых квантовых точек: прикладные аспекты. *Фотоника*. 2022;16(2): 96–113. https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2022.16.2.96.112
9. **Generalova A. N., Demina P. A., Akasov R. A., Khaydukov K. V.** Photopolymerization in 3D printing of tissue–engineered constructs for regenerative medicine. *Russian Chemical Reviews*. 2023;92(2): RCR5068. https://doi.org/10.57634/RCR5068
Генералова А. Н., Демина П. А., Акасов Р. А., Хайдуков Е. В. Фотополимеризация в 3D–печати тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. *Успехи химии*. 2023;92(2): RCR5068. https://doi.org/10.57634/RCR5068
10. **Demina P. A., Khaydukov K. V., Rocheva V. V., Akasov R. A., Generalova A. N., Khaydukov E. V.** Technology of Infrared Photopolymerization. 2022. *Photonica Russia*. 2022;16(8)600–2. https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2022.16.8.600.602.
Демина П. А., Хайдуков К. В., Рочева В. В., Акасов Р. А., Генералова А. Н., Хайдуков Е. В. Технология инфракрасной фотополимеризации. *Фотоника*. 2022;16(8)600–2. https://doi.org/10.22184/1993-7296.FRos.2022.16.8.600.602.
11. **Bugay A. N.** Biological Action of Intense Laser Pulses at the Molecular Level. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2024;88(6)842–6. https://doi.org/10.1134/S1062873824706718.
12. **Leontyev A. V., Nurtdinova L. A., Mityushkin E. O., Shmelev A. G., Zharkov D. K., Andrianov V. V., Muranova L. N., Gainutdinov Kh.L., Nikiforov V. G.** Testing Nanosensors Based on NaYF4: Yb, Er for Measuring Temperature in Biological Media. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2024;88(6):853–8. https://doi.org/10.1134/S1062873824706731.
13. **Eremchev M. Yu.** Second Harmonic Generation as a Noninvasive Method to Study Molecular Processes on the Surface of Lipid Membranes (Brief Review). *JETP Letters*. 2023;118(4):288–95. https://doi.org/10.1134/S0021364023602245.
Еремчев М. Ю. Генерация второй гармоники как неинвазивный метод исследования молекулярных процессов на поверхности липидных мембран (миниобзор). *Письма в ЖЭТФ*. 2023;118(4):282–90. https://doi.org/10.31857/S1234567823160103
14. **Starodubtsev N. F., Denisenko V. I., Karimullin K. R., Kurdoglian M. S., Lysenko S. A., Naumov A. V., Tagabilev D. G., Yuryshev N. N.** Theoretical substantiation of the thermal mechanism of local oxygenation of biological tissue under the action of low-intensity near-infrared radiation. *Medical physics*. 2023;4:78–83. https://doi.org/10.52775/1810-200X-2023-99-100-4-78-83.
Стародубцев Н. Ф., Денисенко В. И., Каримуллин К. Р., Курдоглян М. С., Лысенко С. А., Наумов А. В., Тагабилев Д. Г., Юрышев Н. Н. Теоретическое обоснование теплового механизма локальной оксигенации биологической ткани под действием низкоинтенсивного излучения ближнего ИК диапазона. *Медицинская физика*. 2023;4:78–83. https://doi.org/10.52775/1810-200X-2023-99-100-4-78-83.
15. **Turchin I. V.** Methods of biomedical optical imaging: from subcellular structures to tissues and organs. *Phys. Usp*. 2016;59(5):487–501. https://doi.org/10.3367/UFNe.2015.12.037734.
Турчин И. В. Методы оптической биомедицинской визуализации: от субклеточных структур до тканей и органов. *Успехи физических наук*. 2016;186(5):550–67. https://doi.org/10.3367/UFNr.2015.12.037734
16. **Smith A. M., Mancini M. C., Nie S.** Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechnology*. 2009;4(11):710–1. https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326.
17. **Coste A., Oktay M. H., Condeelis J. S., Entenberg D.** Intravital Imaging Techniques for Biomedical and Clinical Research. *Cytometry A*. 2020;97(5)448–57. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23963.
18. **Kienle K., Lammermann T.** Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunol Review*. 2016;273(1):76–93. https://doi.org/10.1111/imr.12458.
19. **Jing Y., Zhang C., Yu B., Lin D., Qu J.** Super–Resolution Microscopy: Shedding New Light on In Vivo Imaging. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:746900. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.746900.
20. **Laschke M. W., Menger M. D.** The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *European Cells & Materials*. 2016;32:202–15. https://doi.org/10.22203/eCM.v032a13.
21. **Stepanov M. E., Vlasov A. A., Vinokurov I. A., Tagabilev D. G., Kotenko K. V., Khaydukov E. V., Naumov A. V., Yusupov V. I.** Device for fixing a small laboratory animal with a dorsal camera installed during microscopic examination. *Application for the invention of the Russian Federation*. 2024. No. 2024127009.
Степанов М. Е., Власов А. А., Винокуров И. А., Тагабилев Д. Г., Котенко К. В., Хайдуков Е. В., Наумов А. В., Юсупов В. И. Устройство для фиксации мелкого лабораторного животного с установленной дорсальной камерой при проведении микроскопического исследования. *Заявка на изобретение РФ*. 2024. № 2024127009.
22. **Xie W., Lorenz M., Poosch F., Palme R., Zechner D., Vollmar B., Grambow E., Struder D.** 3D–printed lightweight dorsal skin fold chambers from PEEK reduce chamber–related animal distress. *Scientific Reports*. 2022;12(1):11599. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13924-5.
23. **Sckell A., Leunig M.** The Dorsal Skinfold Chamber: Studying Angiogenesis by Intravital Microscopy. In: Murray C., Martin S. (eds) *Angiogenesis Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2009;467:305–17. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-241-0_19.
24. **Johnson J. M., Kellogg D. L. Jr.** Local thermal control of the human cutaneous circulation. *Journal of Applied Physiology*. 2010;109(4):1229–38. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00407.2010.
25. **Jarvilehto M., Tuohimaa P.** Vasa vasorum hypoxia: initiation of atherosclerosis. *Medical Hypotheses*. 2009;73(1):40–1. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.11.046.
26. **Kuhel D. G., Konaniah E. S., Basford J. E., McVey C., Goodin C. T., Chatterjee T. K., Weintraub N. L., Hui D. Y.** Apolipoprotein E2 accentuates postprandial inflammation and diet–induced obesity to promote hyperinsulinemia in mice. *Diabetes*. 2013;62(2):382–91. https://doi.org/10.2337/db12-0390.
27. **Honkura N., Richards M., Lavina B., Sainz–Jaspeado M., Betsholtz C., Claesson–Welsh L.** Intravital imaging–based analysis tools for vessel identification and assessment of concurrent dynamic vascular events. *Nature Communications*. 2018;9(1):2746. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04929-8.
28. **Giampetraglia M., Weigelin B.** Recent advances in intravital microscopy for preclinical research. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2021;63:200–8. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.05.010.
29. **Ishii M.** Intravital imaging technology reveals immune system dynamics in vivo. *Allergology International*. 2016;65(3):225–7. https://doi.org/ 10.1016/j.alit.2016.05.001.
30. **Lin Q., Choyke P. L., Sato N.** Visualizing vasculature and its response to therapy in the tumor microenvironment. *Theranostics*. 2023;13(15):5223–46. https://doi.org/10.7150/thno.84947.

МашЭкспо Сибирь

МЕЖДУНАРОДНАЯ ПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

3-6 МАРТА 2025

ОРГАНИЗАТОР СИБИРСКАЯ ВЫСТАВОЧНАЯ КОМПАНИЯ

ГЕОГРАФИЯ УЧАСТНИКОВ ВЫСТАВКИ:

175+ КОМПАНИЙ-УЧАСТНИЦ

30+ РЕГИОНОВ РОССИИ, РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ, КИТАЙ, ТУРЦИЯ

5 200+ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ПОСЕТИТЕЛЕЙ ИЗ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

ЯРМАРКА ВАКАНСИЙ

20+ КОМПАНИЙ-РАБОТОДАТЕЛЕЙ

500+ СОИСКАТЕЛЕЙ

ЛУЧШИЙ СВАРЩИК СИБИРИ

МЕЖРЕГИОНАЛЬНЫЙ КОНКУРС ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО МАСТЕРСТВА

40+ УЧАСТНИКОВ КОНКУРСА

10+ РЕГИОНОВ РОССИИ И РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ УЧАСТВУЮТ В КОНКУРСЕ

MASHEXPO-SIBERIA.RU

НОВОСИБИРСК ЭКСПОЦЕНТР