



УДК 616-076.4

ПРИМЕНЕНИЕ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2025 г. А. М. Сафонов*, **, #, А. В. Алтунина*, ***, И. С. Колпашников**,
Д. О. Соловьева*, В. А. Олейников*, **

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФГАОУ ВО “Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31

*** ФГАОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”,
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Поступила в редакцию 05.12.2024 г.

После доработки 16.12.2024 г.

Принята к публикации 17.12.2024 г.

Трехмерная микроскопия (3D-микроскопия) стала важным инструментом в клеточном анализе и биомедицинских исследованиях, предоставляя уникальные возможности для визуализации и изучения сложных биологических структур. Возможности различных типов микроскопии в изучении клеточных структур и макромолекулярных комплексов охватывают широкий диапазон масштабов, от исследования поведения и функций клеток в физиологических средах до понимания молекулярной архитектуры органелл. На каждом масштабе задача 3D-визуализации заключается в извлечении максимально возможного пространственного разрешения, минимизируя при этом повреждение живых клеток. Обзор освещает различные применения 3D-микроскопии в таких областях, как исследование раковых опухолей, изучение свойств и строения вирусов и бактерий, а также анализ микроструктур органов и имплантов. В онкологии 3D-визуализация позволяет детально исследовать клеточные взаимодействия, микросреду опухолей и их гетерогенность, что способствует лучшему пониманию механизмов метастазирования и устойчивости к терапии. В вирусологии 3D-методы помогают раскрыть структуру вирусов и их взаимодействие с клеточными компонентами, что имеет ключевое значение для разработки вакцин и противовирусных препаратов. Изучение бактерий с использованием 3D-микроскопии открывает новые горизонты в понимании их колонизации, биоразнообразия и патогенности. Кроме того, анализ микроструктур органов и имплантов с применением 3D-технологий улучшает качество и безопасность медицинских изделий. Наконец, интеграция 3D-микроскопии в процесс разработки лекарственных препаратов позволяет более точно оценивать эффективность и токсичность новых соединений на клеточном уровне. Таким образом, 3D-микроскопия представляет собой мощный инструмент для углубленного изучения биологических процессов и разработки инновационных решений в медицине.

Ключевые слова: 3D-микроскопия, 3D-визуализация, 3D-реконструкция, молекулярные взаимодействия, органоиды, злокачественные образования

DOI: 10.31857/S0132342325040037, **EDN:** LMWNIA

Сокращения: CLSM (confocal laser scanning microscopy) – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; CMV – цитомегаловирус; FIB-SEM (Focused Ion Beam Scanning EM) – СЭМ с фокусированным ионным пучком; LSM (light sheet fluorescence microscopy) – флуоресцентная микроскопия с освещением световым слоем; MERS-CoV (middle east respiratory syndrome coronavirus) – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома; PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) – точечная аккумуляция для визуализации в наноразмерной томографии; SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома; SEM – сканирующая электронная микроскопия; SIM (structured-illumination microscopy) – микроскопия структурированного освещения; ssTEM (serial sectioning TEM) – просвечивающая электронная микроскопия серийных срезов; STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) – стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия; АЗ – активные зоны; АСМ – атомно-силовая микроскопия; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ВПЧ – вирус папилломы человека; МК – мембранные контакты; ОМ – оптическая микроскопия; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ЭМ – электронная микроскопия; ЭТ – электронная томография.

Автор для связи: (эл. почта: andreo-6@mail.ru).

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	582
2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ	582
3. 3D-МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНОЙ АРХИТЕКТУРЫ	583
4. 3D-МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ РАКА	586
5. 3D-МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ	588
6. 3D-МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ОРГАНОВ	591
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	592
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	593

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проводится множество исследований, направленных на определение структуры биологических объектов на микро- и наноуровнях. Однако многие из существующих методов предоставляют информацию лишь о двухмерном строении, что не всегда достаточно для глубокого понимания процессов, происходящих в этих объектах. Современные технологии позволяют интегрировать массивы двухмерных данных для реконструкции 3D-изображений и карт различных свойств, что обеспечивает более полное представление о структуре биологических объектов и их функциональных процессах. 3D-визуализация находит применение в клеточном анализе, исследовании раковых опухолей, вирусологии, в изучении свойств и строения бактерий, микроструктур органов и имплантов, а также в разработке лекарственных препаратов. В настоящем обзоре мы предлагаем ряд примеров передовых исследований, показывающих важность применения объемной визуализации.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ МЕТОДОВ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Современные исследования различных биологических объектов зачастую требуют изучения их 3D-структуры. Для двумерной визуализации с использованием 3D-микроскопии применяются такие методы, как оптическая микроскопия (ОМ) [1], электронная микроскопия (ЭМ) [2] и сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) [3]. Каждый из этих подходов предоставляет уникальную информацию об исследуемых объектах и обладает своими преимуществами и недостатками. Методы ОМ, например, позволяют проводить анализ образцов в конфокальном режиме, однако характеризуются низким пространственным разрешением. В свою очередь, методы СЗМ и ЭМ характеризуются высоким пространственным

разрешением и позволяют распознавать внутреннюю структуру образца. Однако эти методы имеют ограниченное поле исследования и не дают информации о составе биологических объектов. За последние десятилетия появилось множество методов, позволяющих наблюдать биологические структуры и процессы с высоким уровнем детализации [4], также появилось множество различных 3D-методик, позволяющих восстанавливать 3D-изображения ультраструктуры биологических образцов [5].

В большинстве случаев подходы для получения данных о 3D-ультраструктурах с помощью электронной микроскопии основаны на получении последовательных сечений с накоплением массива 2D-данных [6]. Основные различия применяемых подходов заключаются в способе получения последовательных срезов, пространственном разрешении и объеме данных.

Первый метод 3D-микроскопии на базе поверхностной электронной микроскопии – ssTEM (serial sectioning TEM) [7–9], в котором применяется 3D-реконструкция образца с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) изображений ультратонких последовательных срезов. Метод матричной томографии схож с методом ssTEM, но серийные срезы визуализируются с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [10]. Электронная томография (ЭТ) также выступает высокоразрешающим 3D-методом [11], но с использованием создания виртуальных срезов материала образца [12–14]. Однако получение изображений методом сканирующей электронной микроскопии возможно не только с поверхности срезов, но и с поверхности самого образца, оставшегося после среза. На этом основан метод SBF-SEM (Serial Block-Face Scanning EM) и схожий метод СЭМ с фокусированным ионным пучком (FIB-SEM, Focused Ion Beam Scanning EM) [15–19], в котором для среза поверхности применяется

сфокусированный ионный пучок. На рис. 1 изображены схемы методов получения 3D-изображений с использованием ПЭМ и СЭМ [6].

Подход к получению 3D-изображений на базе СЗМ схож с вышеописанным методом СЭМ, которая требует получения серий последовательных срезов. 3D-реконструкция достигается за счет послойного наложения изображений полученного массива 2D-данных. Впервые подобный метод был осуществлен с использованием плазменного травления измеряемой поверхности, однако травление не позволяет проводить исследования на некоторых типах материалов, например, пористых. В качестве альтернативного метода удаления верхнего слоя с поверхности было предложено использование ультрамикротомы [20–23], который позволяет получать ультратонкие срезы с использованием алмазного ножа.

Оптическая микроскопия традиционно используется для визуализации биологических структур, в большинстве случаев применяется конфокальная флуоресцентная микроскопия и ее более усовершенствованные варианты [4, 24, 25]. Один из главных недостатков этого метода – низкое пространственное разрешение, однако в настоящее время имеется множество адаптированных методик сверхвысокого разрешения, с помощью которых можно не только получить 3D-визуализацию ультраструктуры, но и провести химический

анализ с нанометровым разрешением [26]. Среди них наиболее выделяется группа методов микроскопии визуализации одиночных молекул SMLM (Single-molecule localisation microscopy) [27, 28], которая выступает разновидностью флуоресцентной микроскопии и базируется на спонтанном “включении” и “выключении” определенных флуорофоров. К таким методикам можно отнести 3D-микроскопию стохастической оптической реконструкции STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) и др. [29], PALM (Photo-Activated Light Microscopy) [30], PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) [31, 32]. В отличие от методик визуализации одиночных молекул, методика микроскопии с истощением стимулированного излучения (Stimulated Emission Depletion, STED) использует сфокусированный лазерный луч, который сканирует изображение как конфокальный микроскоп двумя сфокусированными лазерами.

Описанные выше методы – далеко не единственные на данный момент инструменты для 3D-визуализации, однако их принципы мало отличаются.

3. 3D-МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНОЙ АРХИТЕКТУРЫ

Исследование 3D-структур в сверхвысоком разрешении открывает новые возможности в

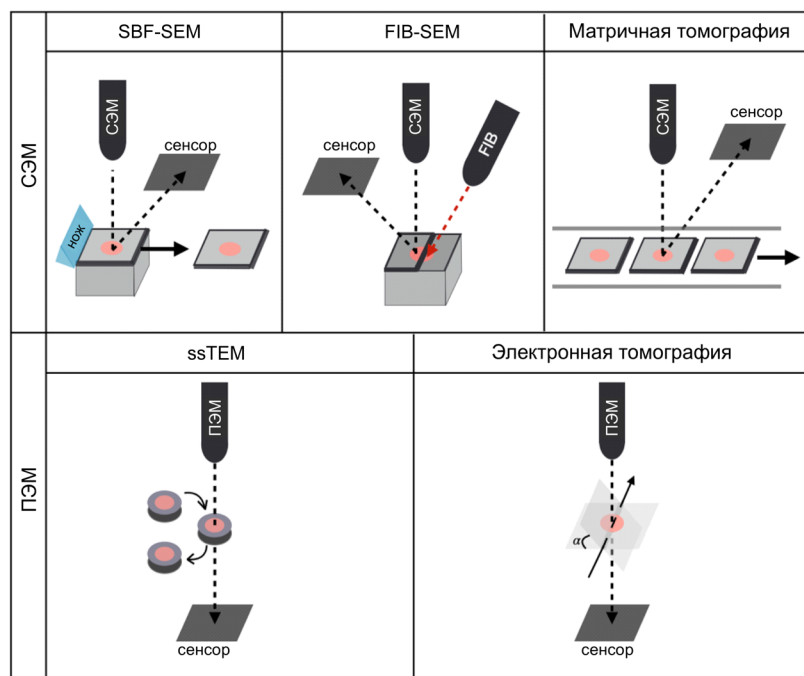


Рис. 1. Методы получения 3D-изображений с использованием ПЭМ и СЭМ.

изучении различных биологических явлений. Так, комбинирование метода ультратонких срезов и атомно-силовой микроскопии (АСМ) дает возможность изучить внутреннюю структуру клеток для исследования количества, морфологии и распределения органелл. Комбинирование методик АСМ и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) позволяет получить изображения клеточной мембраны, цитоплазмы, мембраны ядра, митохондрий и хроматина эмбриональных стволовых клеток [33, 34], что может облегчить изучение стадий пролиферации и дифференцировки стволовых клеток или соматических клеток на наноуровне. Метод АСМ делает возможным получение изображений с разрешением 5–10 нм, благодаря чему можно идентифицировать не только крупные структуры, такие как ядра, но и мелкие, такие как митохондрии и хроматин. В ходе исследований [33] было получено 3D-изображение 12 митохондрий на 10 последовательных срезах толщиной 60 нм каждый. Данные АСМ показывают различные кривые, внутреннюю пограничную мембрану, внешнюю мембрану, а также типичные места контакта между внешней мембраной и внутренней пограничной мембраной в некоторых митохондриях. Также наблюдались предсказуемые изменения в количестве, морфологии и распределении в клеточном компартменте для пяти митохондрий, 3D-изображение которых восстанавливалось из полученных данных (рис. 2).

В работе [35] получена 3D-реконструкция α -сателлитной ДНК вместе с кластерами центромерного белка А (CENP-A) [36] в хромосомах прометафазы человека [35]. Авторы восстановили общую архитектуру митотической центромеры. Для визуализации организации α -сателлитной ДНК, локализованной в центральной центромерной области внутри митотических хромосом в иммортализованных эпителиальных клетках сетчатки RPE-1, использовали комбинацию метода флуоресцентной гибридизации *in situ* для опре-

деления ориентации центромерных хромосом (Cen-CO-FISH) вместе с микроскопией структурированного освещения. В результате было выяснено, что при деполимеризации микротрубочек при остановке митоза организация CENP-A (белок центромер А) в митотических хромосомах имеет округлую форму, аналогичную структуре α -сателлитной ДНК, часто видимую в виде кольца, более толстого на внешней поверхности, ориентированного к границе раздела кинетохора–микротрубочка. Также эта структура наблюдалась при исследовании асинхронных клеток без коллемецида и других ядов для микротрубочек. Это позволяет сделать вывод о том, что наблюдаемая митотическая архитектура центромеры сохраняется при наличии или отсутствии натяжения, вызванного силами вытягивания микротрубочек. Кроме того, в анафазных хромосомах также наблюдались кольцевидные структуры, следовательно, такая структурная организация локуса центромеры в хромосомах человека может сохраняться после метафазы на протяжении всего развития митоза и выхода из него, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [37].

3D-реконструкция сверхвысокого разрешения позволяет определять четкие наноструктурные особенности распределения белка в клетках [38]. Подобные исследования крайне важны, поскольку представление о молекулярной организации белков и их взаимного расположения играет ключевую роль в понимании механизмов клеточного функционирования [39]. Например, технологию maS³TORM (multiplexed automated serial staining stochastic optical reconstruction microscopy, мультиплексная автоматизированная серийная окраска для стохастической оптической реконструкционной микроскопии) применили для изучения наноструктуры глутаматергического синапса и функционального значения актина и миозина. В качестве хорошо развитой глутаматергической модели выбрали самые большие синапсы слуховой

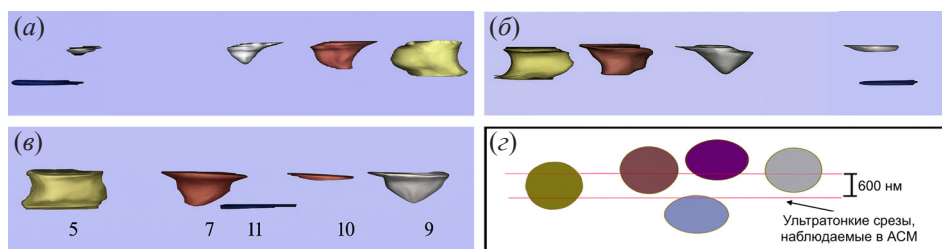


Рис. 2. Изменения формы отдельных митохондрий и их пространственного распределения в вертикальном направлении разрезания. Показаны 3D-модели пяти митохондрий в ориентации Р (а), А (б) и АР (в) соответственно; (г) – схематическое представление пространственного распределения и разделенных частей пяти митохондрий [33].

зоны мозга, называемые чашечкой Хельда [38]. Исследовали срезы ткани толщиной 400 нм, что достаточно для обнаружения в ней цельных структур. На мембранах, не содержащих активные зоны (АЗ), было найдено больше полимеризованного актина по сравнению с областями, расположенными вблизи АЗ. Это наблюдение соответствует функциональным исследованиям, которые демонстрируют, что динамика актина влияет на активность нейронов [40–43]. Кроме того, обнаружили, что локализация моторного белка миозина Va (MyoVa) коррелирует с маркером синаптических везикул Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGlut1) по всему пресинапсу. Это может означать, что он обладает дополнительными функциями: соединение синаптических везикул и/или привязка синаптических везикул к мембране. Такие связи могут быть реализованы посредством взаимодействий актин-зависимого моторного белка MyoVa и актина.

Также методом STORM анализировали внеклеточные везикулы (Extracellular vesicles, EVS) [44]. Эти структуры наноразмерны, что усложняет их исследование, однако они очень важны, т.к. секретируются всеми типами клеток и тесно вовлечены в тканевой гомеостаз. 3D-визуализация отдельных частиц позволяет оценить гетерогенность, структуру и сложность везикул. Благодаря технологии STORM были получены изображения с разрешением до 20 нм. Используя 3D-визуализацию, удалось идентифицировать субпопуляции поверхностных маркеров в гетерогенных смесях везикул, а также обнаружить мембранные микродомены на отдельных внеклеточных везикулах.

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) предоставляет возможность детектировать информацию о 3D-структуре образцов, даже без необходимости получения изображений серии тонких срезов. В исследовании [45] была проанализирована внутренняя структура экзоцитозных отверстий в синаптических пузырьках гибридных клеток нейробластомы и глиомы. На различных глубинах были выявлены отверстия диаметром 50–100 нм в пределах варикозных изменений этих клеток, а также наблюдались радиальные узоры на стенках и бугорчатые структуры в нижней части отверстий (рис. 3). Таким образом, АСМ позволяет исследовать тонкие структуры внутри экзоцитозных отверстий нервных клеток.

Также 3D-реконструкция методами АСМ может помочь решить проблему, возникающую при структурном анализе высокополиморфных и

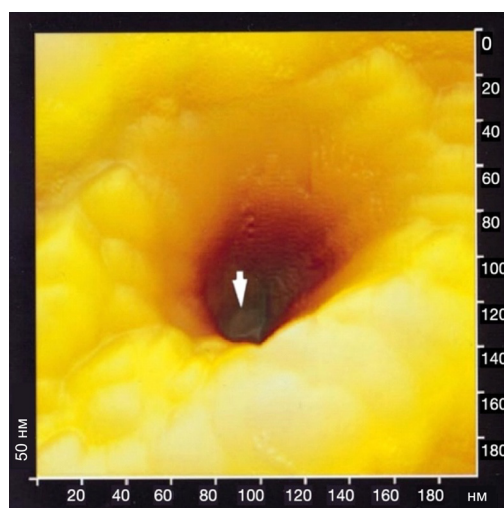


Рис. 3. Атомно-силовые микрофотографии клеток NG108-15. Стелка указывает на бугорчатые структуры внизу [45].

гетерогенных структур амилоидного белка [46]. Последовательный анализ АСМ-изображений позволяет реконструировать отдельные амилоидные нити, что может помочь определить структурно-функциональные взаимосвязи амилоидного полиморфа.

Комбинирование SIM с АСМ позволяет проводить одновременные измерения с отсутствием последующего усреднения данных, которое необходимо для устранения межклеточных различий в наблюдаемых сигналах [47]. Данное комбинирование методов позволяет рассчитать топографию образца в диапазоне предварительно определенного значения силы и реконструировать структуру поверхности клеток. Благодаря сочетанию этих методик были получены изображения 100-нм флуоресцентных сфер и фиксированных клеток остеосаркомы [48] (рис. 4).

Кроме того, для 3D-реконструкции живых клеток можно использовать метод сканирующей ионно-проводящей микроскопии (SICM) [49]. С помощью данной технологии визуализировали динамику актина в линии фибробластов, полученной из ткани почки зеленой обезьяны (COS-7), с субдифракционным разрешением. Детекция клеток упрощается в связи с тем, что нитчатый актин (f-актин) расположен в нижней части объема клетки и хорошо коррелирует с топографией границы клетки COS-7 [50]. Данная технология перспективна в изучении сложных биологических явлений.

Использование низкотемпературной АСМ и сканирующей туннельной микроскопии (СТМ) позволяет достоверно определить конформацию

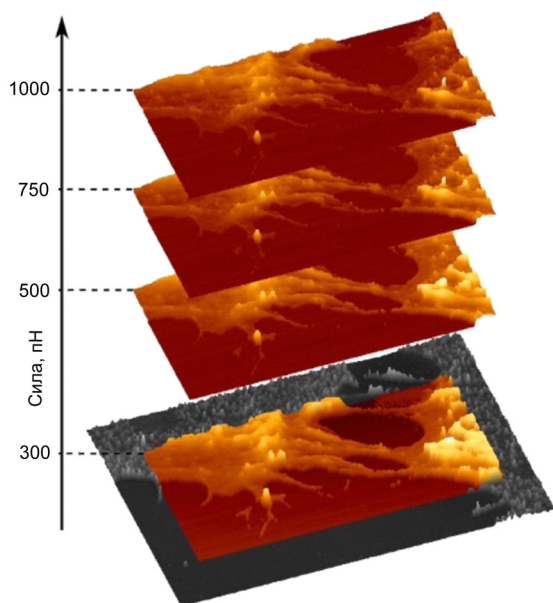


Рис. 4. Многомерное представление коррелированных наборов микроскопических данных. Запись полного набора кривых силы позволяет рассчитать топографию образца в диапазоне predetermined значений силы и реконструировать структуру поверхности клеток. Наложение при 300 пН с каналом SR-SIM приведено для учета точности пространственного наложения. XY-масштабы АСМ-рендеринга составляют 20.74 и 10.37 мкм соответственно, записанные с разрешением 256×128 пикселей. Изображения SR-SIM были получены с использованием NIS-Elements (v5.11.00), в то время как наложение данных SR-SIM и AFM было сгенерировано с помощью программного обеспечения для обработки данных (JPK Data Processing software (v6.1.120)) [47].

3D-молекул и центров адсорбции на атомной решетке. Например, в работе [51] продемонстрировано распределение 2-йодтрифенилена на серебре.

При помощи метода 3D-АСМ были выявлены структурные изменения у 80% клеток линии Raji, подвергшихся воздействию синусоидального магнитного поля (1 мТл, 50 Гц) в течение 64 ч [52]. Так, по АСМ-изображениям были выявлены морфологические различия между контрольной группой и клетками, которые подверглись облучению. В отличие от контрольной группы, облученные клетки почти не имели выступов на поверхности, а по прошествии 36-часового воздействия мембрана клеток все еще продолжала меняться, о чем свидетельствовало уплощение клеток и появление некоторой ряби на поверхности, которая становится хорошо различима в лимфобластах после 64-часового воздействия (рис. 5). Кроме того, по прошествии 64 ч клетки утратили сферическую форму.

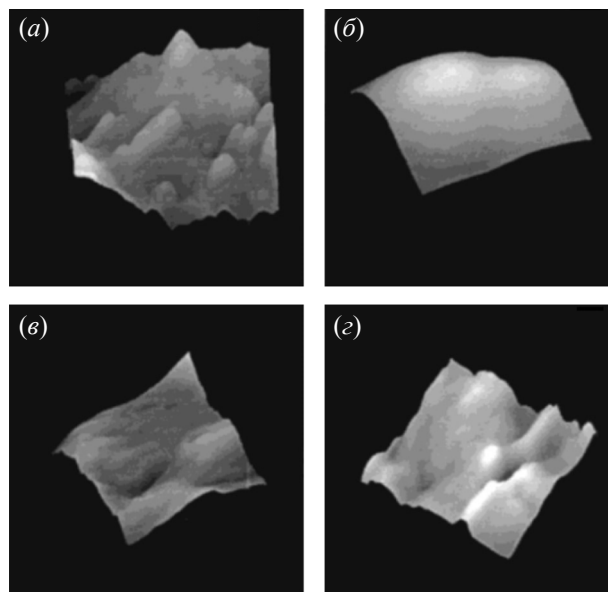


Рис. 5. 3D-АСМ-изображения (4×4 мкм) для части неэкспонированных (а) и экспонированных в течение, соответственно, 13 ч (б), 36 ч (в) и 64 ч (г) клеток Raji. Максимальная высота изображений составляет 280, 225, 141 и 116 нм соответственно; 80% клеток имели морфологию, описанную на панелях (б) и (г) [52].

4. 3D-МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ РАКА

Исследование трехмерных биологических структур может расширить понимание механизмов возникновения и развития злокачественных опухолей. Так, при помощи компьютерной томографии было визуализировано 3D-изображение ВПЧ-негативного плоскоклеточного рака миндалин стадии Т3 (рис. 6) [53]. Визуализация была проведена на основе биопсии и результатов экспрессии микроРНК в тканях. Красная область соответствует клинической опухолевой массе и перитуморальной ткани, которые расположены на расстоянии 1 см от макроскопически очерченного края опухоли, желтая область обозначает перитуморальную ткань на расстоянии 2 см от края опухоли. Полученное таким образом изображение позволяет улучшить планирование хирургического вмешательства и снизить риски возникновения рецидивов. В данном случае удаление только красной области приводит к высокому риску рецидива опухоли. Удаление же красной и желтой областей уменьшает вероятность локорегионального рецидива при резектабельных опухолях.

Для улучшения понимания развития злокачественных образований необходимо детально визуализировать структуру и типы взаимодействий

вия в опухолевых клетках. Так, при помощи 3D-АСМ были исследованы механические и структурные свойства экзосом из клеток остеосаркомы [54]. Силовые карты 3D-АСМ позволили увидеть ранее не идентифицированные субструктуры отдельных экзосом, что указывает на наличие отчетливых нанодоменов, выступающих из поверхности мембраны, которые, скорее всего, служат мембранно-ассоциированными белками (рис. 7).

Также с помощью 3D-картирования методом АСМ были исследованы наномеханические свойства экзосом. Было обнаружено, что наномеханические метастатические опухолевые клетки имели более низкий модуль Юнга, чем неме-

тастатические опухолевые клетки, что подтверждает общий принцип, согласно которому злокачественные клетки, как правило, более мягкие, чем их здоровые аналоги. На основе данных результатов было выдвинуто предположение, что метастатические опухолевые клетки могут использовать экзосомы для высвобождения белков, придающих жесткость, чтобы сохранить свою мягкость. Таким образом, жесткость экзосом в сочетании с их легкой доступностью практически во всех жидкостях организма дает им возможность служить неинвазивными биомаркерами для ранней идентификации изменений, вызванных наличием опухолей и других заболеваний.

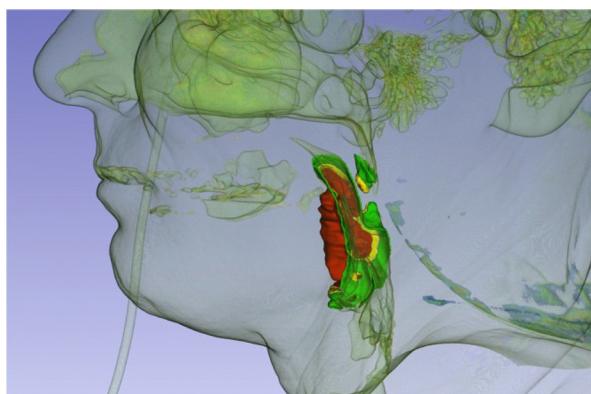


Рис. 6. 3D-изображение ВПЧ-негативного плоскоклеточного рака миндалин стадии Т3 с правой стороны – с анатомическим расширением в долину и инфильтрацией боковой стенки глотки (темно-оранжевый) – и перитуморальной слизистой оболочки на расстоянии 1 см от края опухоли (красный тон), на расстоянии 2 см (желтый) и 3 см (зеленый) от края опухоли в сагиттальной проекции [53].

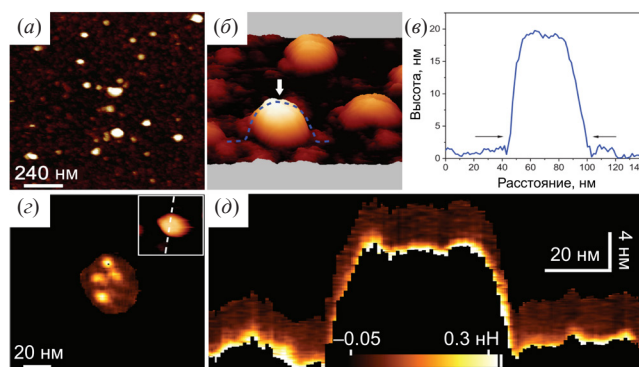


Рис. 7. Силовая карта 3D-АСМ, полученная от экзосом, выделенных из клеточной линии 143В в буферных условиях. (а) – 1.2×1.2 мкм – Обзорное АСМ-изображение экзосом, адсорбированных на модифицированной АPTES слюдяной подложке, на котором показаны различные объекты круглой формы с различными размерами от 40 до 120 нм; (б) – 3D-рендеринг АСМ-изображения экзосом. Экзосома, отмеченная белой стрелкой, была использована для анализа силового картирования; (в) – соответствующий профиль высоты вдоль пунктирной линии, выделенной на панели (б), показывает экзосому диаметром приблизительно 60 нм и высотой 18 нм; (г) – карта 2D-форсе, реконструированная по данным картографирования 3D-форсе, на которой четко видны четыре отчетливых выступающих элемента в центральной верхней части пузырька. Цветовая гамма была скорректирована для лучшей визуализации самой верхней части пузырька. Топографическое изображение экзосомы с помощью АСМ записывается одновременно с 3D-картой силы; (д) – профиль 2D-карты силы в плоскости X-Z, полученный по траектории, показанной на изображении-вставке на панели (г). В профиле силы можно выделить три выступающих элемента. Горизонтальная цветная полоса представляет силу в нН [54].

Благодаря 3D-АСМ были разработаны 3D-карты жесткости для фибробластов и клеток рака молочной железы [55]. Данный метод основан на вдавливании зонда в образец на различных глубинах и определении среднего модуля Юнга на различных глубинах, так появляется возможность создания 3D-карт среднего значения модуля Юнга, что позволяет определить границы исследуемых клеток и выявить распределение жесткости клеток в зависимости от глубины вдавливания. Таким образом, 3D-наномеханическая характеристика дает легко воспроизводимые результаты для диагностики рака. Ранее исследования показали, что диагностика рака может быть выполнена с использованием распределений модуля Юнга для нормальных/доброкачественных и раковых тканей [56]. С использованием АСМ выявлено, что в случае нормальных/доброкачественных тканей распределение жесткости состоит из одного-единственного пика, в то время как в раковых тканях определяются по меньшей мере два разных пика из-за размягчения раковых клеток (пик более низкой эластичности) и придания жесткости окружающей ткани (пик более высокой эластичности) [57].

Основная проблема лечения злокачественных заболеваний – их сложная диагностика на ранних стадиях. Однако большое количество трехмерных КТ-изображений позволило создать систему для определения рака легких на ранней стадии [58]. Данная система анализирует 3D-КТ-изображение и после предварительной обработки идентифицирует потенциальный раковый узел размером до 10 мм в диаметре на большом ($200 \times 400 \times 400$ мм) КТ-изображении.

Световая листовая флуоресцентная микроскопия позволяет восстанавливать сложную 3D-структуру кровеносных и лимфатических сетей, что позволяет проследить за распространением раковых клеток по организму [59, 60]. 3D-визуализация кровеносных сосудов также помогла оценить эффективность лечения [59] и микрососудистые повреждения как побочный эффект лечения рака [61].

Многофотонная микроскопия в сочетании с аналитическим конвейером SMART 3D (Spatial filtering-based background removal and Multi-channel forest classifiers-based 3D Reconstruction, удаление фона на основе пространственного фильтрации и 3D-реконструкция с использованием многоканальных лесных классификаторов) позволила выявить пространственный ландшафт экспериментальных метастазов в мозге, образованных клетками рака молочной железы,

и определить различия в пролиферации и специфический астроглиоз, связанный с метастазами [62].

Крупномасштабная 3D-визуализация при помощи конфокальной и двухфотонной микроскопии позволила установить, что при раке кожи различные формы заболевания возникают вследствие различий в биофизических и биологических ограничениях, при этом снижение жесткости базальной мембраны способствует развитию инвазивного плоскоклеточного рака [63].

3D-визуализация при помощи световой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была применена к 26 срезам поджелудочной железы, что позволило получить 3D-изображения нормальной ткани поджелудочной железы, внутриэпителиальной неоплазии поджелудочной железы, внутрипротоковых папиллярных муцинозных новообразований и инвазивных протоковых аденокарцином поджелудочной железы. 3D-визуализация позволила увидеть процессы, которые трудно представить в двух измерениях, например, инвазивную карциному, растущую в протоках поджелудочной железы и внутри венул, а также длинные тяжи опухолевых клеток, параллельные кровеносным сосудам [64].

5. 3D-МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ

Существует множество методов для визуализации 3D-структуры биологических объектов, применение которых может сыграть значительную роль в объяснении механизмов взаимодействия вирусов с клетками, а также указать на то, какие структурные и физиологические изменения происходят в этих процессах. Лучшее понимание результатов воздействия вирусов на клетки человека может сыграть важную роль в разработке противовирусных препаратов.

Так, при помощи СЭМ были обнаружены изменения эндоплазматического ретикула (ЭР) при заражении SARS-CoV-2 [65]. Причем ЭР был изменен таким образом, что на нем генерировались двухмембранные везикулы, которые служат платформой для репликации вируса [66]. Анализ 3D-изображений помог определить, что инфекция SARS-CoV-2 вызывает массивную пространственную реорганизацию цитоплазмы, а двухмембранные везикулы накапливаются в перинуклеарной области вместе с фрагментированными и уложенными мембранами аппарата Гольджи и пероксисомами. Также двухмембранные везикулы часто были связаны с

растянутыми ЭР-пластинками с узким просветом, что отличается от их связи при заражении SARS-CoV-1 и MERS-CoV [67]. Кроме того, в клетках, зараженных вирусом, было обнаружено повышенное содержание пероксисом, которые могут способствовать репликации вируса, например, снижая окислительный стресс, который может возникать в результате обширного ремоделирования клеточных эндосом SARS-CoV-2, или предоставляя дополнительные липиды, необходимые для образования двухмембранных визикул [68]. 3D-изображения могут нести новую информацию о связывании лекарств с клетками, зараженными вирусами. Так, при помощи ACM было обнаружено, что два лектина, CLEC4g и CD209c, прочно связываются с S-белком (Spike) при заражении SARS-CoV-2 [69]. 3D-изображения показали, что оба лектина могут связываться с гликаном на границе раздела RBD–ACE2 и, таким образом, препятствуют связыванию S-белками с поверхностями клеток. Такая связь значительно снижала уровень инфицирования SARS-CoV-2. Способность лектинов CLEC4G и mCD209c блокировать проникновение вируса SARS-CoV-2 перспективна для различных терапевтических вмешательств.

Получение и анализ 3D-изображений может сыграть важную роль при лечении ВИЧ. Конфокальная и флуоресцентная микроскопия плоскостного освещения (LSFM) позволяют при использовании оптического срезания интактных тканей и анализа изображений быстро восстанавливать пространственную информацию, содержащуюся в целых тканях, и количественно определять популяции иммунных клеток во время инфекции [70]. Эффективность заражения ВИЧ значительно увеличивается при передаче вируса через вирусологические синапсы между CD4⁺-Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки. Исследования с использованием ионной СЭМ,

электронной томографии и сверхразрешающей световой микроскопии [71] показали пространственную архитектуру межклеточных контактов и распределение вирионов ВИЧ в вирусологических синапсах, образованных между зрелыми дендритными клетками и Т-клетками. Объемная реконструкция набора данных показала, что инвагинации в зрелой дендритной клетке удерживают вирус в пространствах, сообщающихся с внешней средой, готовым к передаче Т-клеткам в функциональных вирусологических синапсах. Хотя механизмы передачи ВИЧ *in vivo* еще не полностью понятны, исследования *in vitro* указывают на важность клеточных контактов. Около 50% контактов в синапсах включают филоподиальные вставки, это может снижать эффективность нейтрализующих антител и требовать более высоких концентраций терапевтических препаратов для блокирования инфекции. Это подчеркивает необходимость разработки стратегий, направленных на ранние стадии инфицирования.

Методы криоэлектронной микроскопии и криоэлектронной томографии позволили получить 3D-изображения взаимодействия безоболочечного вируса Блутанг с везикулярной мембраной [72]. Анализ данных установил взаимодействие “ножки” вируса Блутанг и липосомальной мембраны, а также взаимодействие между стеблями белка внешнего капсида (VP5), кодируемого вирусом, и липосомальной мембраной (рис. 8).

При помощи 3D-электронной томографии исследовали тонопласты в растительных клетках при заражении различными вирусами [73]. Было показано, что тонопласты, индуцированные вирусами огуречной мозаики (CMV, Cucumber mosaic virus) и некроза табака (TNV-A^C), морфологически схожи, хотя эти вирусы сильно отличаются. Также было обнаружено, что в дополнение к тонопласту CMV может использовать мульти-

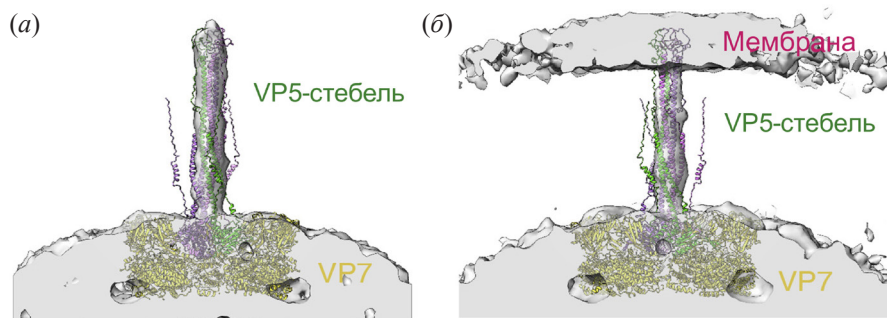


Рис. 8. Наложение гипотетической модели полноразмерного VP5-тримера и поверхностный вид усредненных карт субтомограмм стебля без мембраны (а) и стебля с мембраной (б) [72].

везикулярное тело (MVB) для создания фабрик репликации. Полученные результаты согласуются с ранее высказанной теорией о том, что вакуоль образуется из MVBs [74].

Получение 3D-изображений может дать большое количество информации о поверхностном строении бактерий. Например, организация поверхностных структур спор представителей различных видов бацилл *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. laterosporus* (*Br. laterosporus*) была детализирована с применением СЭМ [75]. Использование СЭМ позволило избежать обработки образца, в ходе которой поверхность бактерий могла повредиться или видоизмениться. В исследовании было выявлено, что споры *B. thuringiensis* и *B. cereus* имеют относительно гладкую поверхность и покрыты экоспориумом. Также анализировали два кристаллоносных штамма *Br. laterosporus* Lat 006 и IGM16-92. Их споры имеют характерный признак – канозвидное включение, прикрепленное к споре. Размеры каноз штаммов Lat006 и IGM16-92 составляли 0.5–0.6 и 0.25–0.4 мкм соответственно. Каноз было отчетливо видно на 3D-изображениях.

Анализ 3D-изображений позволил определить клеточное распределение стафилококкового белка щелочного шока 23 (Asp23), который совместим с образованием нитей [76]. С помощью СЭМ и серии последовательных ультратонких срезов по 50 нм удалось восстановить картину распределения Asp23 (рис. 9).

3D-реконструкции показали, что распределение Asp23 в мутанте *amaP* соответствует образованию кольцеобразных полимеров, как предполагает широкоугольная визуализация Asp23, помеченного Cerulean, а распределение Asp23 в клетках дикого типа подтвердило наблюдение, что во время деления клетки Asp23 не локализуется в перегородке, и показало, что Asp23 неравномерно распределен по клеточной мембране. Характер распределения Asp23 в мутанте *amaP* (кольцеобразный) и в клетках дикого типа (связанный с поверхностью) подтверждается статистическим анализом с использованием К-функции Райпле [77].

При помощи совмещения очистки и 3D-визуализации тканей с мультиплексным окрашиванием бактериальной рРНК был измерен состав микробиоты слизистой оболочки с таксономическим и высоким пространственным разрешением [78]. Также были получены 3D-изображения микробиоты после взаимодействия антибиотиков, что необходимо для понимания процесса изменения характера колонизации бактериями крипт кишечника. В слепой кишке была обнаружена широко распространенная колонизация щелей (образованных в результате слияния крипт) и неоднородная колонизация крипт. Аналогичным образом большая часть проксимального отдела толстой кишки мышей была равномерно покрыта слоями слизи и бактерий. 3D-визуализация и секвенирование показали,

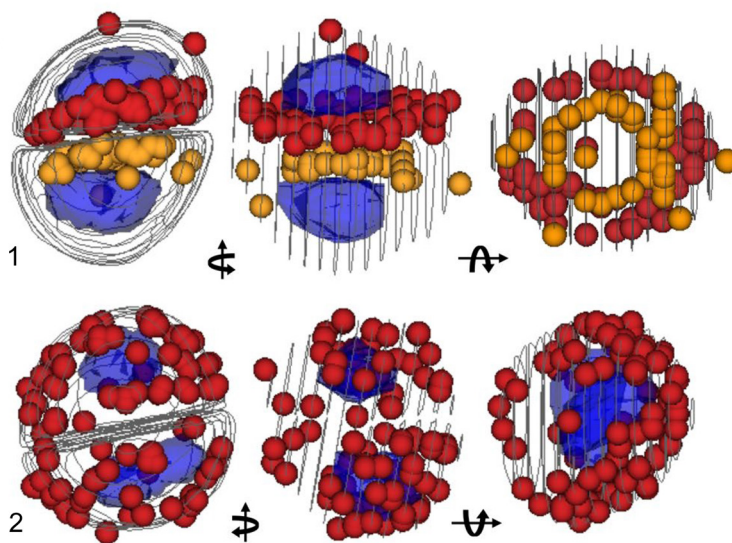


Рис. 9. 3D-реконструкция на основе СЭМ, оранжевые и красные сферы показывают распределение молекул Asp23, меченных иммуноглобулином, с учетом ошибки связывания 40 нм, мутантного *amaP* (1) и дикого типа (2). Синими элементами отмечено положение нуклеоидов. Линии указывают положение границы раздела клеточная стенка/клеточная мембрана [76].

что бактерии семейства *Muribaculaceae* могут играть важную роль в неоднородной колонизации крипт. Также было обнаружено, что в отсутствие *Muribaculaceae* и антибиотика крипты слепой кишки повторно колонизировались способом, сравнимым с колонизацией крипт, которые не подвергались воздействию антибиотиков. Кроме этого, анализ 3D-изображений дал информацию о том, что бациллы (*Lactobacillaceae*) были ближе к просветному концу крипт, чем бактероидеты и клостридии, независимо от воздействия ципрофлоксацина. Таким образом, 3D-визуализация микроорганизмов слизистой оболочки с таксономическим разрешением позволила выявить закономерности в их пространственном распределении на разных уровнях и позволила распознать пространственные закономерности, которые не изменились после уничтожения доминирующей бактерии и повторной колонизации крипт.

Также СЭМ помогла восстановить 3D-структуру простейшего паразита *Trypanosoma brucei* [79]. Информация о точном строении бактерий может служить ключом к созданию новых лекарственных форм для борьбы с ними.

Комбинирование 3D-АСМ- и СЭМ-изображений помогло установить, что гибель клеток неоднородна в пространстве и времени в течение формирования биопленки и, по-видимому, приводит к возникновению механических сил, которые могут генерировать макроскопические 3D-структуры [80]. В частности, количественное описание прямого взаимодействия между клеточными и механическими процессами показывает, что локализованная гибель клеток и образование складок представляют собой упорядоченный и контролируемый процесс во время развития биопленки. Любая микробная биопленка, которая демонстрирует рост и гибель клеток в сочетании с образованием ЕСМ (внеклеточного матрикса), будет подвержена механическим силам. Также было обнаружено, что образование складок в результате гибели клеток предполагает, что даже частичное уничтожение бактериальных клеток в биопленках может усилить образование складок.

6. 3D-МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ ОРГАНОВ

В настоящее время одно из самых популярных направлений, остро нуждающихся в 3D-методах визуализации, — это исследования органов и тканей. Например, многие исследования в области сосудистых заболеваний направлены на детальное понимание структуры и функции стенки

кровеносных сосудов. Использование физических методов дает информацию об эластичности и диаметре артерии, вследствие чего необходима 3D-визуализация с высоким пространственным разрешением. Ранее препарат аорты *en face*, также известный как люминальная поверхность аорты, исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [81, 82] и АСМ [83, 84]. Метод 3D-конфокальной рамановской микроскопии позволяет визуализировать данные в виде 3D-карт распределения [85]. Этот подход, использованный в исследовании [86], был направлен на многопараметрический анализ стенки сосуда, поэтому образцы стенки сосуда *en face* были подвергнуты последовательной 3D-рамановской и АСМ-визуализации, что впоследствии позволило провести прямую корреляцию химической структуры (рамановские данные) с морфологией поверхности (АСМ).

Также одно из популярных направлений исследований органов человека — изучение печени. Важная составляющая — формирование 3D-моделей, например, для оценки фиброза печени [87], стеатоза печени [88], колоректального рака [89], неалкогольного стеатогепатита [90], а также микроанатомии тканей [91] и органелл [92] такими методами, как мультифокальная микроскопия с использованием пространственного модулятора света [93]. Такие области, как мембранные контакты и эндоплазматический ретикулум, — частый объект для изучения печени. Мембранные контакты (МК) — области близкого расположения мембран, которые позволяют передавать клеточные сигналы и регулируют динамический обмен разнообразными биомолекулами между соседними органеллами без вовлечения слияния мембран. МК часто включают эндоплазматический ретикулум (ЭР), основное место синтеза липидов и хранения клеточного кальция, и особенно важны для органелл. В современных исследованиях, связанных с мембранными контактами, зачастую используются 3D-методы измерений [94–98]. Например, в статье [99] применили последовательную блоковую сканирующую электронную микроскопию (serial block face scanning electron microscopy, SB-EM) и электронную томографию (ЭТ) для визуализации биогенеза фагофора в трех измерениях и для определения взаимосвязи между фагофором и окружающими органеллами с высоким разрешением. Также были проведены исследования с использованием метода объемной электронной микроскопии (volume electron microscopy, vEM) для получения 3D-ультраструктурной взаимосвязи

между ЭР и их МК в гепатоцитах печени [100] и метода серийной секционной электронной томографии (ssET) для понимания роли контактов между ЭР и другими органеллами в липидном обмене печени [101].

Легкое – один из самых сложных органов в организме человека, структура которого довольно сложна [102], вследствие чего получение высококачественных микроскопических 3D-изображений затруднено. За последние десятилетия разработаны различные микроскопические и гистологические методы [103], однако получение клинически значимых данных для 3D-визуализации до сих пор представляет собой достаточно сложную задачу [104]. Органоиды – 3D-структуры, которые могут воспроизводить основные структурные и функциональные аспекты многих органов [105], вследствие чего органоиды представляют собой важный инструмент для исследований органов и поиска новых методов лечения, в том числе терапии различных легочных заболеваний [106–108]. В качестве методов для 3D-визуализации легочных органоидов используются различные неинвазивные методы микроскопии, такие как конфокальная, многофотонная лазерная сканирующая микроскопия и LSM, которые позволяют визуализировать общую архитектуру ткани в пределах одного биологического образца. В исследованиях [109, 110] был разработан подробный протокол для 3D-визуализации с высоким разрешением фиксированных и очищенных органоидов. Группа ученых [111] также использовала метод LSM, т.к. он позволяет визуализировать макроскопическую и мезоскопическую архитектуру цельных легочных тканей в трех измерениях. Однако CLSM определяет фенотипы и местоположение отдельных иммунных клеток в срезах легочной ткани. Авторы [111] представляют новый подход, где объединены эти два метода, что позволило им получить комплексную пространственную информацию об образце, а в исследовании [6] применялась объемная электронная микроскопия.

В развитии регенеративной медицины полимерные нановолокна играют уникальную роль [112, 113], т.к. скаффолды на их основе успешно используются для создания имплантов для замены мягких и эластичных тканей [114]. Взаимодействие клетки со скаффолдом существенно увеличивает степень свободы системы клетка–волоконно, и в исследовании [115] для построения детальной и механистической модели нанointерфейса клетка–волоконно его изучали с использованием методов CLSM [116], сканирующей зондовой

нанотомографии (СЗНТ) [21] и ПЭМ. В статье [117] сообщается об использовании сканирующей электронной микроскопии в сочетании со сфокусированным ионным пучком (FIB-SEM) для характеристики взаимодействий клеток с 3D-каркасами, полученными с помощью различных методов изготовления. Этот подход позволяет сохранять и получать высокое разрешение интерфейсов каркас–клетка (скаффолд–клетка), подчеркивая расположение плазматической мембраны, архитектуры и состав внеклеточного матрикса, а также клеточные структуры, играющие роль в адгезии клеток к поверхности. Также проводились исследования волокнистых биоматериалов на основе синтетических полимеров. Так, в статье [118] представлены результаты 3D-наноструктурных исследований особенностей биопечатного тканевого сфероиды, который взаимодействует с полиуретановым двухслойным биосовместимым каркасом. 3D-реконструкция позволяет количественно рассчитать важные морфологические параметры склеенных клеток, каркасов и границ раздела клетка–каркас. А в статье [119] с использованием метода FIB-SEM была получена 3D-визуализация взаимодействий клетка–нановолокно в рамках различных архитектур каркасов из нановолокон, полученных электроспиннингом, (PLGA) (D,L-лактид-когликолидная кислота) показала согласованное взаимодействие между остеобластами и поверхностями нановолокон, способствующее формированию филоподий остеобластов для успешного роста клеток. В качестве каркасов для электроспиннинга также используют биополимеры белковой породы, например, в статье [120] были получены новые данные о структуре и биологических свойствах каркасов из фиброина шелка/спидроина. Эти данные позволили получить новую информацию о структуре и биологических свойствах каркасов.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия применение методов 3D-микроскопии в области биомедицинских исследований значительно способствовало углубленному пониманию различных процессов на микро- и наноуровнях. Интеграция нескольких методов микроскопии и последующая 3D-визуализация открывают новые горизонты в изучении молекулярных взаимодействий, а также в ультраструктурных исследованиях тканей и органов. В ходе анализа множества работ, посвященных 3D-визуализации объектов с использованием методов электронной, оптической и сканирующей зондовой микроскопии,

а также их комбинаций в различных областях биологии, мы постарались подчеркнуть важность 3D-микроскопии для биомедицинских исследований. Среди методов, применяемых для 3D-визуализации, сканирующая электронная микроскопия занимает ведущее место, оставаясь ключевым инструментом для анализа биологических объектов. Перспективные исследования биологических структур с использованием 3D-методов открывают новые возможности для более глубокого понимания строения этих объектов, что, в свою очередь, может привести к созданию новых лекарственных препаратов и углублению наших знаний о процессах возникновения и развития заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10071 (<https://rscf.ru/project/23-24-10071/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ВАО, ДОС; написание статьи – АМС, АВА, ДОС; анализ данных – ИСК; администрирование проекта – ВАО, ДОС.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Northover A.S., Keatley S., Elliot A.D., Hobbs R.P., Yang R., Lymbery A.J., Godfrey S.S., Wayne A.F., Thompson R.C.A. // *Syst. Parasitol.* 2019. V. 96. P. 553–563.
<https://doi.org/10.1007/s11230-019-09870-y>
2. Franken L.E., Grünwald K., Boekema E.J., Stuart M.C.A. // *Small.* 2020. V. 16. P. e1906198.
<https://doi.org/10.1002/sml.201906198>
3. Bian K., Gerber C., Heinrich A., Müller D., Scheuring S., Jiang Y. // *Nat. Rev. Methods Primers.* 2021. V. 1. P. 36.
<https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>
4. Solovyeva D.O., Altunina A.V., Tretyak M.V., Mochalov K.E., Oleinikov V.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2024. V. 50. P. 1215–1236.
<https://doi.org/10.1134/S1068162024040356>
5. Mochalov K.E., Korzhov D.S., Altunina A.V., Agapova O.I., Oleinikov V.A. // *Act. Nat.* 2024. V. 16. P. 14–29.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27323>
6. Schneider J.P., Hegermann J., Wrede C. // *Histochem. Cell Biol.* 2020. V. 155. P. 241–260.
<https://doi.org/10.1007/s00418-020-01916-3>
7. Gay H., Anderson T.F. // *Science.* 1954. V. 120. P. 1071–1073.
<https://doi.org/10.1126/science.120.3130.1071>
8. Miranda K., Girard-Dias W., Attias M., de Souza W., Ramos I. // *Mol. Reprod. Dev.* 2015. V. 82. P. 530–547.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22455>
9. Kremer A., Lippens S., Bartunkova S., Asselbergh B., Blanpain C., Fendrych M., Goossens A., Holt M., Janssens S., Krols M., Larsimont J.-C., Guire C.M., Nowack M.K., Saelens X., Schertel A., Schepens B., Slezak M., Timmerman V., Theunis C., Brempt R.V.A.N., Visser Y., Guérin C.J. // *J. Microsc.* 2015. V. 259. P. 80–96.
<https://doi.org/10.1111/jmi.12211>
10. Beike L., Wrede C., Hegermann J., Lopez-Rodriguez E., Kloth C., Gauldie J., Kolb M., Maus U., Ochs M., Knudsen L. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. P. 830–852.
<https://doi.org/10.1038/s41374-019-0189-x>
11. McIntosh R., Nicastro D., Mastronarde D. // *Trends Cell Biol.* 2005. V. 15. P. 43–51.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.11.009>
12. Gan L., Jensen G.J. // *Q. Rev. Biophys.* 2012. V. 45. P. 27–56.
<https://doi.org/10.1017/S0033583511000102>
13. Irobalieva R.N., Martins B., Medalia O. // *J. Cell Sci.* 2016. V. 129. P. 469–476.
<https://doi.org/10.1242/jcs.171967>
14. Benjin X., Ling L. // *Protein Sci.* 2020. V. 29. P. 872–882.
<https://doi.org/10.1002/pro.3805>
15. Schneider J.P., Wrede C., Mühlfeld C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1089.
<https://doi.org/10.3390/ijms21031089>
16. Hegermann J., Wrede C., Fassbender S., Schliep R., Ochs M., Knudsen L., Mühlfeld C. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2019. V. 317. P. L778–L784.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00333.2019>

17. Steyer A.M., Ruhwedel T., Nardis C., Werner H.B., Nave K.-A., Möbius W. // J. Struct. Biol. 2020. V. 210. P. 107492.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107492>
18. Wrede C., Hegermann J., Muhlfeld C. // Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 2020. V. 318. P. F1246–F1251.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00097.2020>
19. Luckner M., Wanner G. // Microsc. Microanal. 2018. V. 24. P. 526–544.
<https://doi.org/10.1017/S1431927618015015>
20. Alekseev A., Efimov A., Lu K., Loos J. // Adv. Mater. 2009. V. 21. P. 4915–4919.
<https://doi.org/10.1002/adma.200901754>
21. Efimov A.E., Tonevitsky A.G., Dittrich M., Mat-sko N.B. // J. Microscopy. 2007. V. 226. P. 207–217.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01773.x>
22. Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., Agapov I.I. // RSC Advances. 2014. V. 4. P. 60943–60947.
<https://doi.org/10.1039/C4RA08341E>
23. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov A.E. // Ultramicroscopy. 2017. V. 182. P. 118–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
24. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. // Nat. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 1369–1377.
<https://doi.org/10.1038/nbt899>
25. Gugel H., Bewersdorf J., Jakobs S., Engelhardt J., Storz R., Hell S.W. // Biophys. J. 2004. V. 87. P. 4146–4152.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045815>
26. Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R. // Science. 2003. V. 300. P. 2061–2065.
<https://doi.org/10.1126/science.1084398>
27. Dyba M., Hell S.W. // Phys. Rev. Lett. 2002. V. 88. P. 163901.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.88.163901>
28. Westphal V., Kastrup L., Hell S.W. // Appl. Phys. B. 2003. V. 77. P. 377–380.
<https://doi.org/10.1007/s00340-003-1280-x>
29. Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. // Science. 2008. V. 319. P. 810–813.
<https://doi.org/10.1126/science.1153529>
30. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lip-pincott-Schwartz J., Hess H.F. // Science. 2006. V. 313. P. 1642–1645.
<https://doi.org/10.1126/science.1127344>
31. Sharonov A., Hochstrasser R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 18911–18916.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0609643104>
32. Jungmann R., Avendaño M.S., Woehrstein J.B., Dai M., Shih W.M., Yin P. // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 313–318.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2835>
33. Chen Y., Cai J., Zhao T., Wang C., Dong S., Luo S., Chen Z.W. // Ultramicroscopy. 2005. V. 103. P. 173–182.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2004.11.019>
34. Arthur J.S.C., Cohen P. // FEBS Lett. 2000. V. 482. P. 44–48.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02031-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02031-7)
35. Di Tommaso E., de Turreis V., Choppakatla P., Funabiki H., Giunta S. // Mol. Biol. Cell. 2023. V. 34. P. ar61.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E22-08-0332>
36. Altomose N., Logsdon G.A., Bzikadze A.V., Sidhwani P., Langley S.A., Caldas G.V., Hoyt S.J., Uralsky L., Ry-abov F.D., Shew C.J., Sauria M.E.G., Borchers M., Gershman A., Mikheenko A., Shepelev V.A., Dvorki-na T., Kunyavskaya O., Vollger M.R., Rhie A., Mc-Cartney A.M., Asri M., Lorig-Roach R., Shafin K., Lucas J.K., Aganezov S., Olson D., de Lima L.G., Potapova T., Hartley G.A., Haukness M., Kerped-jiev P., Gusev F., Tigyi K., Brooks S., Young A., Nurk S., Koren S., Salama S.R., Paten B., Rogaev E.I., Streets A., Karpen G.H., Dernburg A.F., Sulli-van B.A., Straight A.F., Wheeler T.J., Gerton J.L., Eichler E.E., Phillippy A.M., Timp W., Dennis M.Y., O'Neill R.J., Zook J.M., Schatz M.C., Pevzner P.A., Diekhans M., Langley C.H., Alexandrov I.A., Miga K.H. // Science. 2022. V. 376. P. eabl4178.
<https://doi.org/10.1126/science.abl4178>
37. Andronov L., Ouararhni K., Stoll I., Klaholz B.P., Hamiche A. // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 4436.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12383-3>
38. Klevanski M., Herrmannsdoerfer F., Sass S., Venkataramani V., Heilemann M., Kuner T. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 1552.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15362-1>
39. Borst J.G., Soria van Hoeve J. // Ann. Rev. Physiol. 2012. V. 74. P. 199–224.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153236>
40. Glebov O.O., Jackson R.E., Winterflood C.M., Owen D.M., Barker E.A., Doherty P., Ewers H., Bur-rone J. // Cell Rep. 2017. V. 18. P. 2715–2728.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.064>
41. Morales M., Colicos M.A., Goda Y. // Neuron. 2000. V. 27. P. 539–550.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00064-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00064-7)

42. Sankaranarayanan S., Atluri P.P., Ryan T.A. // *Nat. Neurosci.* 2003. V. 6. P. 127–135.
<https://doi.org/10.1038/nn1002>
43. Cingolani L.A., Goda Y. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. V. 9. P. 344–356.
<https://doi.org/10.1038/nrn2373>
44. McNamara R.P., Zhou Y., Eason A.B., Landis J.T., Chambers M.G., Willcox S., Peterson T.A., Schouest B., Maness N.J., MacLean A.G., Costantini L.M., Griffith J.D., Dittmer D.P. // *J. Extracell. Vesicles.* 2022. V. 11. P. e12191.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12191>
45. Tojima T., Yamane Y., Takagi H., Takeshita T., Sugiyama T., Haga H., Kawabata K., Ushiki T., Abe K., Yoshioka T., Ito E. // *Neuroscience.* 2000. V. 101. P. 471–481.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00320-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00320-1)
46. Chitty C., Kuliga K., Xue W.F. // *Biochem. Soc. Transactions.* 2024. V. 52. P. 761–771.
<https://doi.org/10.1042/BST20230857>
47. Gómez-Varela A.I., Stamov D.R., Miranda A., Alves R., Barata-Antunes C., Dambournet D., Drubin D.G., Paiva S., De Beule P.A.A. // *Scientific Rep.* 2020. V. 10. P. 1122.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57885-z>
48. Dambournet D., Hong S.H., Grassart A., Drubin D.G. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 546. P. 139–160.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00007-6>
49. Navikas V., Leitao S.M., Grussmayer K.S., Descloux A., Drake B., Yserentant K., Werther P., Herten D.P., Wombacher R., Radenovic A., Fantner G.E. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 4565.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24901-3>
50. Henderson E., Sakaguchi D.S. // *Neuroimage.* 1993. V. 1. P. 145–150.
<https://doi.org/10.1006/nimg.1993.1007>
51. Martin-Jimenez D., Ahles S., Mollenhauer D., Wegner H.A., Schirmeisen A., Ebeling D. // *Phys. Rev. Lett.* 2019. V. 122. P. 196101.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.122.196101>
52. Lisi A., Pozzi D., Pasquali E., Rieti S., Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Serafino A.L., Congiu-Castellano A., Ravagnan G., Giuliani L., Grimaldi S. // *Bioelectromagnetics.* 2000. V. 21. P. 46–51.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-186x\(200001\)21:1<46::aid-bem7>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(200001)21:1<46::aid-bem7>3.0.co;2-z)
53. Orosz E., Gombos K., Petrevszky N., Csonka D., Haber I., Kaszas B., Toth A., Molnar K., Kalacs K., Piski Z., Gerlinger I., Burian A., Bellyei S., Szanyi I. // *Scientific Rep.* 2020. V. 10. P. 40.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56429-4>
54. Yurtsever A., Yoshida T., Badami Behjat A., Araki Y., Hanayama R., Fukuma T. // *Nanoscale.* 2021. V. 13. P. 6661–6677.
<https://doi.org/10.1039/d0nr09178b>
55. Kontomaris S.V., Stylianou A., Georgakopoulos A., Malamou A. // *Nanomaterials.* 2023. V. 13. P. 395.
<https://doi.org/10.3390/nano13030395>
56. Plodinec M., Loparic M., Monnier C.A., Obermann E.C., Zanetti-Dallenbach R., Oertle P., Hyotyla J.T., Aebi U., Bentires-Alj M., Lim R.Y., Schoenenberger C.A. // *Nature Nanotechnol.* 2012. V. 7. P. 757–765.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2012.167>
57. Stylianou A., Lekka M., Stylianopoulos T. // *Nanoscale.* 2018. V. 10. P. 20930–20945.
<https://doi.org/10.1039/c8nr06146g>
58. Alakwaa W., Nassef M., Badr A. // *Int. J. Adv. Comp. Sci. Appl.* 2017. V. 8. P. 410–417.
<https://doi.org/10.14569/IJACSA.2017.080853>
59. Shen C.N., Goh K.S., Huang C.R., Chiang T.C., Lee C.Y., Jeng Y.M., Peng S.J., Chien H.J., Chung M.H., Chou Y.H., Hsieh C.C., Kulkarni S., Pasricha P.J., Tien Y.W., Tang S.C. // *EBioMedicine.* 2019. V. 47. P. 98–113.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.044>
60. Brown M., Assen F.P., Leithner A., Abe J., Schachner H., Asfour G., Bago-Horvath Z., Stein J.V., Uhrin P., Sixt M., Kerjaschki D. // *Science.* 2018. V. 359. P. 1408–1411.
<https://doi.org/10.1126/science.aal3662>
61. Craver B.M., Acharya M.M., Allen B.D., Benke S.N., Hultgren N.W., Baulch J.E., Limoli C.L. // *Environ. Mol. Mutagen.* 2016. V. 57. P. 341–349.
<https://doi.org/10.1002/em.22015>
62. Guldner I.H., Yang L., Cowdrick K.R., Wang Q., Alvarez Barrios W.V., Zellmer V.R., Zhang Y., Host M., Liu F., Chen D.Z., Zhang S. // *Scientific Rep.* 2016. V. 6. P. 24201.
<https://doi.org/10.1038/srep24201>
63. Fiore V.F., Krajnc M., Quiroz F.G., Levorse J., Pasolli H.A., Shvartsman S.Y., Fuchs E. // *Nature.* 2020. V. 585. P. 433–439.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2695-9>
64. Noë M., Rezaee N., Asrani K., Skaro M., Groot V.P., Wu P.H., Olson M.T., Hong S.M., Kim S.J., Weiss M.J., Wolfgang C.L., Makary M.A., He J., Cameron J.L., Wirtz D., Roberts N.J., Offerhaus G.J.A., Brosens L.A.A., Wood L.D., Hruban R.H. // *Am. J. Pathol.* 2018. V. 188. P. 1530–1535.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.04.002>

65. Cortese M., Lee J.Y., Cerikan B., Neufeldt C.J., Oorschot V.M.J., Köhrer S., Hennies J., Schieber N.L., Ronchi P., Mizzon G., Romero-Brey I., Santarella-Mellwig R., Schorb M., Boermel M., Mocaer K., Beckwith M.S., Templin R.M., Gross V., Pape C., Tischer C., Frankish J., Horvat N.K., Laketa V., Stanifer M., Boulant S., Ruggieri A., Chatel-Chaix L., Schwab Y., Bartenschlager R. // *Cell Host Microbe*. 2020. V. 28. P. 853–866.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.11.003>
66. Wolff G., Melia C.E., Snijder E.J., Bárcena M. // *Trends Microbiol.* 2020. V. 28. P. 1022–1033.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.009>
67. Knoops K., Kikkert M., Worm S.H., Zevenhoven-Dobbe J.C., van der Meer Y., Koster A.J., Mommaas A.M., Snijder E.J. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226>
68. Pekmezovic M., Mogavero S., Naglik J.R., Hube B. // *Trends Microbiol.* 2019. V. 27. P. 982–996.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.07.006>
69. Hoffmann D., Mereiter S., Jin Oh Y., Monteil V., Elder E., Zhu R., Canena D., Hain L., Laurent E., Grünwald-Gruber C., Klausberger M., Jonsson G., Kellner M.J., Novatchkova M., Ticevic M., Chablotz A., Wirnsberger G., Hagelkruys A., Altmann F., Mach L., Stadlmann J., Oostenbrink C., Mirazimi A., Hinterdorfer P., Penninger J.M. // *EMBO J.* 2021. V. 40. P. e108375.
<https://doi.org/10.15252/embj.2021108375>
70. Zhang T., Gupta A., Frederick D., Layman L., Smith D.M., Gianella S., Kieffer C. // *J. Vis. Exp.* 2021. V. 2021. P. e62441.
<https://doi.org/10.3791/62441>
71. Felts R.L., Narayan K., Estes J.D., Shi D., Trubey C.M., Fu J., Hartnell L.M., Ruthel G.T., Schneider D.K., Nagashima K., Bess J.W., Jr, Bavari S., Lowekamp B.C., Bliss D., Lifson J.D., Subramaniam S. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. V. 107. P. 13336–13341.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1003040107>
72. Xia X., Zhou Z.H. // *STAR Protoc.* 2022. V. 3. P. 101825.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101825>
73. Wang X., Ma J., Jin X., Yue N., Gao P., Mai K.K.K., Wang X.B., Li D., Kang B.H., Zhang Y.J. // *Integr. Plant Biol.* 2021. V. 63. P. 353–364.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13027>
74. Cui Y., Cao W., He Y., Zhao Q., Wakazaki M., Zhuang X., Jiang L. // *Nat. Plants.* 2018. V. 5. P. 14–17.
<https://doi.org/10.1038/s41477-018-0328-1>
75. Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Шевлягина Н.В., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р. // *Микробиология*. 2013. V. 82. P. 698–698.
<https://doi.org/10.7868/S0026365613060098>
76. Petersen I., Schlüter R., Hoff K.J., Liebscher V., Bange G., Riedel K., Pané-Farré J. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 125.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56907-9>
77. Baddeley A., Rubak E., Turner R. // *Spatial Point Patterns: Methodology and Applications with R*. 2017. V. 49. P. 815–817.
<https://doi.org/10.1007/s11004-016-9670-x>
78. Mondragón-Palomino O., Poceviciciute R., Lignell A., Griffiths J.A., Takko H., Ismagilov R.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2022. V. 119. P. e2118483119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2118483119>
79. Hughes L., Hawes C., Monteith S., Vaughan S. // *Protoplasma*. 2014. V. 251. P. 395–401.
<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0580-1>
80. Asally M., Kittisopikul M., Rué P., Du Y, Hu Z., Çağatay T., Robinson A.B., Lu H., Garcia-Ojalvo J., Süel G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 18891–18896.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212429109>
81. Peloquin J., Huynh J., Williams R.M., Reinhart-King C.A. // *J. Biomechan.* 2011. V. 44. P. 815–821.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.12.018>
82. Smith U., Ryan J.W., Michie D.D., Smith D.S. // *Science*. 1971. V. 173. P. 925–927.
<https://doi.org/10.1126/science.173.4000.925>
83. Kusche-Vihrog K., Urbanova K., Blanqué A., Wilhelmi M., Schillers H., Kliche K., Pavenstädt H., Brand E., Oberleithner H. // *Hypertension*. 2011. V. 57. P. 231–237.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163444>
84. Oberleithner H., Peters W., Kusche-Vihrog K., Korte S., Schillers H., Kliche K., Oberleithner K. // *Pflügers Arch.* 2011. V. 462. P. 519–528.
<https://doi.org/10.1007/s00424-011-0999-1>
85. Majzner K., Kaczor A., Kachamakova-Trojanowska N., Fedorowicz A., Chlopicki S., Baranska M. // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 603–610.
<https://doi.org/10.1039/c2an36222h>
86. Pilarczyk M., Rygula A., Kaczor A., Mateuszuk L., Maślak E., Chlopicki S., Baranska M. // *Vibrat. Spectroscopy*. 2014. V. 75. P. 39–44.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2014.09.004>
87. van Grunsven L.A. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 121. P. 133–146.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.004>
88. Caddeo A., Maurotti S., Kovooru L., Romeo S. // *Atherosclerosis*. 2024. P. 117544.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2024.117544>

89. Garbarino O., Lambroia L., Basso G., Marrella V., Franceschini B., Soldani C., Pasqualini F., Giuliano D., Costa G., Peano C., Barbarossa D., Annarita D., Salvati A., Terracciano L., Torzilli G., Donadon M., Faggioli F. // *Aging Cell*. 2023. V. 22. P. e13853.
<https://doi.org/10.1111/accel.13853>
90. Fan W., Li Y., Kunitomo K., Török N.J. // *J. Vis. Exp.* 2022. V. 180. P. e63106.
<https://doi.org/10.3791/63106>
91. Strauss O., Björkström N.K. // *Kupffer Cells: Methods and Protocols*. 2020. P. 55–63.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0704-6_7
92. Parlakgöl G., Arruda A.P., Pang S., Cagampan E., Min N., Güney E., Lee G.Y., Inouye K., Hess H.F., Xu C.S., Hotamışlıgil G.S. // *Nature*. 2022. V. 603. P. 736–742.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04488-5>
93. Amin M.J., Zhao T., Yang H., Shaevitz J.W. // *Scientific Rep.* 2022. V. 12. P. 16343.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-20664-z>
94. Monteiro-Cardoso V.F., Le Bars R., Giordano F. // *J. Visualized Exp.* 2023. P. e64750.
<https://doi.org/10.3791/64750>
95. Puhka M., Joensuu M., Vihinen H., Belevich I., Jokitalo E. // *Mol. Biol. Cell*. 2012. V. 23. P. 2424–2432.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0950>
96. Weigel A.V., Chang C.L., Shtengel G., Xu C.S., Hoffman D.P., Freeman M., Iyer N., Aaron J., Khuon S., Bogovic J., Qiu W., Hess H.F., Lippincott-Schwartz J. // *Cell*. 2021. V. 184. P. 2412–2429.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.035>
97. Friedman J.R., Voeltz G.K. // *Trends Cell Biol.* 2011. V. 21. P. 709–717.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.004>
98. Kittelmann M. // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1691. P. 15–21.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_2
99. Cardoen B., Vandevoorde K.R., Gao G., Ortiz-Silva M., Alan P., Liu W., Tiliakou E., Vogl A.W., Hamarneh G., Nabi I.R. // *J. Cell Biol.* 2023. V. 223. P. e202206109.
<https://doi.org/10.1083/jcb.202206109>
100. Biazik J., Ylä-Anttila P., Vihinen H., Jokitalo E., Eskelinen E.L. // *Autophagy*. 2015. V. 11. P. 439–451.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017178>
101. Chun Chung G.H., Gissen P., Stefan C.J., Burden J.J. // *J. Vis. Exp.* 2022. V. 184.
<https://doi.org/10.3791/63496>
102. Raimondi A., Ilacqua N., Pellegrini L. // *Methods in Cell Biology*. 2023. V. 177. P. 101–123.
<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.12.021>
103. Franks T.J., Colby T.V., Travis W.D., Tudor R.M., Reynolds H.Y., Brody A.R., Cardoso W.V., Crystal R.G., Drake C.J., Engelhardt J., Frid M., Herzog E., Mason R., Phan S.H., Randell S.H., Rose M.C., Stevens T., Serge J., Sunday M.E., Voynow J.A., Weinstein B.M., Whitsett J., Williams M.C. // *Proc. Am. Thoracic Soc.* 2008. V. 5. P. 763–766.
<https://doi.org/10.1513/pats.200803-025HR>
104. Schittny J.C. // *Histochem. Cell Biol.* 2018. V. 150. P. 677–691.
<https://doi.org/10.1007/s00418-018-1749-7>
105. Gómez-Gavito M.V., Sanderson D., Ripoll J., Desco M. // *Iscience*. 2020. V. 23.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101432>
106. Huch M., Koo B.K. // *Development*. 2015. V. 142. P. 3113–3125.
<https://doi.org/10.1242/dev.118570>
107. Shi R., Radulovich N., Ng C., Liu N., Notsuda H., Cabanero M., Martins-Filho S.N., Raghavan V., Li Q., Mer A.S., Rosen J.C., Li M., Wang Y.H., Tamblyn L., Pham N.A., Haibe-Kains B., Liu G., Moghal N., Tsao M.S. // *Clin. Cancer Res.* 2020. V. 26. P. 1162–1174.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1376>
108. Paolicelli G., Luca A., Jose S.S., Antonini M., Teloni I., Fric J., Zelante T. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 323.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00323>
109. Salahudeen A.A., Choi S.S., Rustagi A., Zhu J., van Unen V., de la O.S.M., Flynn R.A., Margalef-Català M., Santos A.J.M., Ju J., Batish A., Usui T., Zheng G.X.Y., Edwards C.E., Wagar L.E., Luca V., Anchang B., Nagendran M., Nguyen K., Hart D.J., Terry J.M., Belgrader P., Ziraldo S.B., Mikkelsen T.S., Harbury P.B., Glenn J.S., Garcia K.C., Davis M.M., Baric R.S., Sabbati C., Amieva M.R., Blish C.A., Desai T.J., Kuo C.J. // *BioRxiv*. 2020. V. 588. P. 670–675.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-3014-1>
110. van Ineveld R.L., Ariese H.C.R., Wehrens E.J., Dekkers J.F., Rios A.C. // *J. Visualized Exp.* 2020. P. e60709.
<https://doi.org/10.3791/60709>
111. Wu Y.C., Moon H.G., Bindokas V.P., Phillips E.H., Park G.Y., Lee S.S. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2023. V. 69. P. 13–21.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2022-0353MA>
112. Bouten C.V., Dankers P.Y., Driessen-Mol A., Pedron S., Brizard A.M., Baaijens F.P. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 221–241.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.007>

113. Kim P.H., Cho J.Y. // BMB Rep. 2016. V. 49. P. 26.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.1.165>
114. Repanas A., Andriopoulou S., Glasmacher B. // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2016. V. 31. P. 137–146.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.12.007>
115. Balashov V., Efimov A., Agapova O., Pogorelov A., Agapov I., Agladze K. // Acta Biomater. 2018. V. 68. P. 214–222.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.031>
116. Webb R.H. // Rep. Progress Phys. 1996. V. 59. P. 427.
<https://doi.org/10.1088/0034-4885/59/3/003>
117. Iandolo D., Pennacchio F.A., Mollo V., Rossi D., Dannhauser D., Cui B., Owens R.M., Santoro F. // Adv. Biosystems. 2019. V. 3. P. 1800103.
<https://doi.org/10.1002/adbi.201800103>
118. Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., Bobrova M.M., Parfenov V.A., Koudan E.V., Pereira F.D.A.S., Bulanova E.A., Mironov V.A., Agapov I.I. // eXPRESS Polymer Lett. 2019. V. 13. P. 632–641.
<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2019.53>
119. Stachewicz U., Qiao T., Ralinson S.C.F., Almeida F.V., Li W.Q., Cattell M., Barber A.H. // Acta Biomater. 2015. V. 27. P. 88–100.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.003>
120. Safonova L., Bobrova M., Efimov A., Davydova L., Tenchurin T., Bogush V., Agapova O., Agapov I. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. P. 1704.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101704>

Application of 3D Visualization in Biomedical Research

A. M. Safonov*, **, #, A. V. Altunina*, ***, I. S. Kolpashnikov**,
D. O. Solovieva*, and V. A. Oleynikov*, **

E-mail: andreo-6@mail.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** National Research Nuclear University MEPhI, Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

*** Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutskii per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

Three-dimensional microscopy (3D microscopy) has become an important tool in cellular analysis and biomedical research, providing unique opportunities to visualize and study complex biological structures. The capabilities of different types of microscopies in studying cellular structures and macromolecular complexes span a wide range of scales, from investigating cell behavior and function in physiological environments to understanding the molecular architecture of organelles. At each scale, the challenge of 3D imaging is to extract the highest possible spatial resolution while minimizing damage to living cells. This review highlights the various applications of 3D microscopy in areas such as cancer research, viruses, bacterial properties and structure, and organ and implant microstructure analysis. In the context of oncology, 3D imaging allows detailed investigation of cellular interactions, tumor microenvironment, and tumor heterogeneity, which contributes to a better understanding of the mechanisms of metastasis and resistance to therapy. In virology, 3D methods help to reveal the structure of viruses and their interactions with cellular components, which is of key importance for the development of vaccines and antiviral drugs. Studying bacteria using 3D microscopy opens up new horizons in understanding their colonies, biofouling, and pathogenicity. In addition, analyzing the microstructures of organs and implants using 3D technologies improves the quality and safety of medical devices. Finally, integrating 3D microscopy into the drug development process allows for more accurate assessment of the efficacy and toxicity of new compounds at the cellular level. Thus, 3D microscopy is a powerful tool for in-depth study of biological processes and the development of innovative solutions in medicine.

Keywords: three-dimensional microscopy, three-dimensional visualization, three-dimensional reconstruction, molecular interactions, organoids, malignancies