



На правах рукописи

Курочкин Максим Андреевич

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АДРЕСАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ**

Специальность 03.01.02 — Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание учёной степени

кандидат физико-математических наук

Саратов – 2018

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского», г. Саратов.

Научный руководитель:

Федосов Иван Владленович,

кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

Официальные оппоненты:

Беликов Андрей Вячеславович,

доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры лазерной фотоники и оптоэлектроники, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»

Михаил Алексеевич Ходорковский,

кандидат физико-математических наук, руководитель НИК «Нанобиотехнологии», ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук», 410049, Россия, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Защита состоится «26» декабря 2018 г. в 16-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») по адресу: 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29, а также на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ»:

<http://www.spbstu.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук:



Линькова Наталья Сергеевна

Актуальность работы. Одной из актуальных задач современной медицины XXI века является развитие персонализированных методов профилактики, диагностики и лечения патологических состояний. Задачи персонализированной медицины неразрывно связаны с развитием различных полимерных интеллектуальных систем доставки биологически активных веществ. В настоящее время полимерные носители широко используются в биомедицинских приложениях, таких как адресная доставка лекарственных средств, репродуктивная и регенеративная медицина, антибактериальная и противораковая терапия, тканевая инженерия, а также для задач контроля экспрессии генов клеточных культур. Существует широкий спектр целевых систем доставки биологически активных веществ таких, как визикулы гидрогеля, полимерные или липосомальные микрокапсулы для адрессации действующих агентов в проблемные зоны биологических тканей (зоны воспаления, злокачественные новообразования и т.д.), позволяющие не только контролируемо высвобождать инкапсулированные агенты посредством лазерного, электрического, магнитного, ультразвукового или биохимического воздействия, но и визуализировать целевые участки биологических тканей.

Метод последовательной адсорбции (ПА) альтернативно заряженных полиэлектролитных слоёв широко применяется для синтеза полимерных функциональных самоорганизующихся систем таких, как многослойные плёнки и многослойные микрокапсулы. Метод последовательной адсорбции позволяет варьировать в широком диапазоне толщину (жесткость и проницаемость) и состав, стенки полимерных носителей, а также функционализировать многослойные системы, флуоресцентными красителями, флуоресцентными (квантовые и карбоновые точки) и металлическими наночастицами (золото, серебро). В результате, достигается возможность управлять физико-химическими свойствами полимерных многослойных систем посредством внешних электромагнитных полей.

Суспензионные микроносители имеют ряд ограничений, связанных с проблемами контроля распределение микроносителей в живых системах. Однако, применение магнитных наночастиц, для функционализации оболочки микрокапсул, позволяет неинвазивно концентрировать магнитные микрокапсулы в целевой области биологической ткани *in vivo*, под действием внешнего градиентного магнитного поля. Клетки способны интернализировать полимерные микрокапсулы посредством эндоцитоза, что открывает возможность для контроля перемещения клеточных носителей функционализированных магнитными микрокапсулами, при помощи градиентного магнитного поля.

В 2007 году, Sylvain Martel и др. продемонстрировал возможность контролировать перемещение металлической сферы, диаметром 1,5 мм, в пределах сегмента сонной артерии свиньи *in vivo*, при помощи градиентных катушек МРТ системы.

В 2014 году, Pierre Couponneau и др. продемонстрировал адресацию крупных (50 мкм) биополимерных магнитных микрокапсул в печени кролика, при помощи градиентных катушек МРТ системы, для задач трансартериальной химиоэмболизации (инкапсулированный доксирубицин). Капсулы вводились через катетер в печёночную артерию, после чего при помощи градиентного магнитного поля задавалось направление потока магнитных биополимерных капсул в левую или правую ветвь печёночной артерии, в результате чего капсулы возможно было локализовать либо в левой, либо в правой печёночной доле. Тем не менее, пространственная разрешающая способность градиентных МРТ катушек не позволяет концентрировать магнитные микрокапсулы локально, в пределах сосудистого сегмента, а подобные размеры микрокапсул не позволяют их вводить в системный кровоток, так как это может привести к закупорке сосудов (эмболия).

Микроциркуляторное русло является транспортной системой, отвечающей за своевременную доставку питательных веществ и кислорода к тканям через кровь, с последующим удалением побочных продуктов метаболизма. Аномальный кровоток и модификация гемореологических характеристик крови в соответствии с конфигурацией кровеносных сосудов имеют критическое значение для диагностики сосудистых патологических состояний, на их ранних стадиях. На сегодняшний день существует запрос не только на качественную визуализацию полимерных микроносителей в сосудистых сетях, но и на количественную оценку реакции кровеносных сосудов на введение инородных тел (микроносителей).

Метод анемометрии по изображению частиц (PIV от англ. particle image velocimetry) заключается в пространственной визуализации распределения мгновенной скорости потока жидкости путем анализа двух и более последовательно зарегистрированных изображений перемещающихся частиц-трассеров. Трассеры, как правило, не различимы между собой, поэтому для оценки локальной скорости потока используется среднее смещение группы трассеров в пределах некоторой области конечного размера, именуемой «расчетная область» (РО). Наиболее распространенным способом при этом является оценка взаимной корреляционной функции изображений одной и той же расчетной области, зарегистрированных в два последовательных момента времени. Смещение максимума корреляционной функции соответствует среднему по расчетной области перемещению частиц в плоскости изображения, и, следовательно, средней скорости потока.

В контексте задач модификации таких крупных объектов, как клеточные подложки, поверхности медицинских имплантов и т.д., наиболее подходящими носителями биологически активных веществ, являются биополимерные наноплёнки. Полимерные трёхмерные микроструктурированные плёнки (ПТМП), с массивом микроконтейнеров (М) на их внешней поверхности, являются новым типом полимерных носителей, которые представляют собой полимерную наноплёнку, с массивом трёхмерных уединённых полых микроконтейнеров на её поверхности. ПТМП могут изготавливаться как методами последовательной адсорбции, так и методами микролитографии, что позволяет варьировать физикохимические свойства стенок микроконтейнеров ПТМП. Также ПТМП плёнка позволяют герметично инкапсулировать как низкомолекулярные так и высокомолекулярные водорастворимые биологически активные вещества в уединённых микроконтейнерах на поверхности ПТМП плёнки. В результате достигается возможность равномерно распределять биологически активные вещества по поверхности плёнки в виде небольших одинаковых кластеров, которые возможно активировать как по одиночке так и целыми группами посредством лазерного излучения, ультразвукового воздействия, механического воздействия или электромагнитными полями.

Наиболее перспективным методом активации процессов высвобождения инкапсулированных биологически активных компонентов, являются лазерные фототермические методы воздействия. Основными достоинствами лазерных оптических методов активации полимерных микроносителей является возможность селективно воздействовать на целевой полимерный микроноситель в пределах биологического окна прозрачности биоткани. С появлением биоразлагаемых оптических волокон, становится актуальными задачи не только по активации единичных полимерных микроносителей, посредством сфокусированного лазерного излучения, но и задачи связанные с активацией групп кластеров полимерных микроносителей глубоко в биологических тканях, при помощи лазерного излучения подведённого через оптическое волокно.

Целью работы являлась разработка и апробация методов неинвазивной адресации, и активации полимерных микроносителей в живых системах. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработка и апробация физических методов визуализации и магнитного захвата полимерных многослойных флуоресцентных микрокапсул, функционализированных магнитными наночастицами, в разветвлённых сетях кровеносных сосудов брыжейки крысы.
2. Разработка и апробация методов магнитного захвата модельных клеток МА-104, поглотивших магнитные флуоресцентные многослойные микрокапсулы, для формирования жизнеспособной клеточной колонии в стеклянном фантоме кровеносного сосуда.
3. Разработка неинвазивных оптических методов визуализации динамики микропотоков крови разветвлённой сети сосудов методами адаптивного корреляционного PIV анализа (Particle Image Velocimetry) для визуализации и контроля движения полимерных/клеточных носителей.
4. Разработка метода фототермической лазерной активации полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её внешней поверхности, в фантоме мягких тканей, на основе агарозного геля, при помощи оптического многомодового волокна.
5. *In situ* лазерная инфракрасная активация клеточной подложки, на основе полимерной трёхмерных микроструктурированных плёнки, с массивом микроконтейнеров на её внешней поверхности, для доксициулин-индуцированной активации экспрессии зелёного флуоресцентного белка (Green Fluorescence Protein) у единичных клеток.

Основные положения выносимые на защиту

1. *In vivo* адресация магнитных многослойных микрокапсул, под действием градиентного магнитного поля, происходит в зонах изгибов и ветвлений васкулатурной сети.
2. Клетки способны поглощать магнитные флуоресцентные многослойные микрокапсулы и формировать жизнеспособную клеточную колонию по действием градиентного магнитного поля.
3. Использование полимерных трёхмерных микроструктурированных плёнок с массивами полых контейнеров, в качестве клеточной подложки, позволяет активировать, посредством фототермического лазерного воздействия, как единичные микроконтейнеры, для доксициклин-индуцированной активации экспрессии зелёного флуоресцентного белка единичных клеток, так и группы микроконтейнеров полимерной трёхмерной микроструктурированной плёнки, для задач управляемого релиза инкапсулированного вещества внутри мягких тканей.
4. Установлено, что единичный микроконтейнер полимерной трёхмерной микроструктурированной клеточной подложки способен выступать в качестве носителя доксициклина, высвобождение которого способно стимулировать экспрессию зелёного флуоресцентного белка, по меньшей мере, в одной клетке.

Научная новизна

1. В данной диссертационной работе впервые была реализована методика адресации флуоресцентных многослойных микрокапсул в потоке крови *in vivo* при помощи электромагнитного пинцета в пределах выбранного сосудистого сегмента васкулатурной сети.

2. Впервые была реализована методика магнитного захвата модельных клеток МА-104, поглотивших магнитные флуоресцентные многослойные микрокапсулы, в стеклянном фантоме кровеносного сосуда. В результате была сформирована жизнеспособная клеточная колония в месте неразрушающего магнитного воздействия.
3. Разработана безмаркерная методика визуализации сосудистых сетей на основе корреляционных алгоритмов для построения карт скоростей крови в сосудистых сетях. Разработана методика маскирования границ сосудов на основе методов локальной бинаризации яркостных картин кровеносных сосудов.
4. Разработана методика фототермической активации полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, при помощи инфракрасного лазерного воздействия через многомодовое оптическое волокно. Лазерная фототермическая активация микроструктурированной полимерной плёнки производилась внутри фантома мягких тканей.
5. Впервые была продемонстрирована система лазерной инфракрасной фототермической активации единичных микроконтейнеров трёхмерных микроструктурированной плёнки, с последующим высвобождением инкапсулированного доксициклина. Разработана методика доксициклин-индуцированной активации экспрессии зелёного флуоресцентного белка у единичных клеток, на клеточной подложки, на основе полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности.

Практическая значимость

Диссертационная работа выполнена при поддержке следующих научных фондов:

1. Грант Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации (исполнитель).
2. Грант РНФ № 16-15-10252 «Разработка технологии мониторинга проницаемости васкулярных барьеров на основе мульти-масштабного анализа переходных процессов по данным оптических методов визуализации» (2016-2018, исполнитель).
3. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности № 3.1586.2017/ПЧ при поддержке Минобрнауки РФ «Квантификация физических закономерностей регуляции кровотока в микроциркуляторной сети методами оптического мониторинга и численного моделирования» (2017-2019, исполнитель).

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается применением современных методов исследования таких, как оптическая флуоресцентная микроскопия, оптическая конфокальная флуоресцентная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Основные результаты диссертационной работы были опубликованы в высокорейтинговых научных журналах, пройдя независимую экспертную оценку (ACS applied materials & interfaces – IF – 7.504; Journal of Controlled Release IF – 7.786). Представленные результаты находятся в соответствии с результатами, полученными другими авторами, работающих в области нано- и биомедицинских технологий.

Апробация работ

Основные результаты работы были представлены на научных семинарах, научных школах, всероссийских и международных конференциях, в том числе:

1.Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,” Study of thermal source light spatial coherence” SFM 2011, Saratov State University, Saratov, Russia. 2.Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,”Particle Image Velocimetry for blood micro circulate studies” SFM 2012, Saratov State University, Saratov, Russia. 3.Kurochkin M.A, “ Система для прижизненной цифровой визуализации и микроанемометрии капиллярного кровотока”УМНИК, Устный доклад, SSU, Russia, 2013. 4.Kurochkin M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,” Real time Particle Image Velocimetry for blood microcirculation studies” SFM 2013, Saratov State University, Saratov, Russia. 5.Kurochkin M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,” Advanced digital image processing for \textit{in vivo} capillaries network flux analysis” SFM 2014, Saratov State University, Saratov, Russia. 6.Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,” Advanced digital image processing for in vivo analysis of blood flow in capillary network,” Asia Communications and Photonics Conference (ACP), China, Shanghai, 2014. 7.Курочкин М.А., Тимошина П.А., Федосов И.В., Тучин В.В.,” Прижизненная цифровая микроскопия для анализа динамики кровотока в сети капилляров,” VII Съезд Российского фотобиологического общества, Россия, пос. Шепси, 2014. 8.Е.С. Стюхина, М.А. Курочкин, И.В. Федосов, В.В. Тучин, Д.Э. Постнов, «Оценка динамических характеристик капиллярного кровотока методами окклюзионной фотоплетизмографии и капилляроскопии», материалы VII съезда Российского фотобиологического общества, Пушкино, 92 (2014). 9.Kurochkin M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., “Computational side of micro-circulation assessment by PIV,” Saratov Fall Meeting – SFM’14 Microscopic and Low-Coherence Methods in Biomedical and Non-Biomedical Applications VII, Russia, Saratov, 2015.

Личный вклад

Большая часть экспериментальных результатов была получена лично соискателем, а также совместно с коллегами научных групп в рамках сотрудничества при выполнении совместных проектов. Вклад соискателя заключается в разработке и апробации методов магнитной адресации полимерных магнитных микрокапсул *in vitro* и *in vivo*, при помощи магнитного пинцета. Разработка и апробация методов магнитного захвата клеток, поглотивших магнитные микрокапсулы, в стеклянном капилляре. Разработка методов морфологического анализа васкуляторных сетей на основе корреляционных алгоритмов PIV анализа. Изготовление полимерной трёхмерной микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности и оптической системы лазерного ИК воздействия через многомодовое оптическое волокно, для задач фототермической активации групп микроконтейнеров в толще фантома мягких тканей. Разработка и апробация методов фототермической адресации биологически активных веществ к единичным клеткам, на полимерной микроструктурированной клеточнойложке.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 научные работы, в изданиях, включенных в перечень рекомендованных ВАК, получено 3 свидетельства об интеллектуальной собственности.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованных источников (155 наименования), списка сокращений и списка рисунков. Диссертация изложена на 152 страницах и содержит 59 рисунков.

Основное содержание работы

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, описано краткое содержание, структура и объем диссертации, апробация работы и личный вклад автора.

В **Главе 1** рассмотрены полимерные многослойные микроносители для задач адресной доставки биологически активных веществ к целевым участкам живых систем, при помощи градиентного магнитного поля. В первом параграфе была описана методика синтеза многослойных полимерных микроносителей посредством последовательной адсорбции разнозаряженных пар полианионов и поликатионов. Во втором параграфе приводился краткий обзор основных типов полимерных микрокапсул. В третьем параграфе были рассмотрены основные методы инкапсуляции биологически активных веществ. В четвёртом параграфе рассмотрены методы визуализации и контроля распределения полимерных носителей в живых системах. Последний параграф посвящен методам прижизненной визуализации сетей кровеносных сосудов.

В **Главе 2** продемонстрированы оригинальные алгоритмы морфологического анализа кровеносных сетей, а также методы расчёта полей скоростей крови по полученным маскам сети сосудов, методами корреляционного PIV анализа.

В качестве объекта исследований использовалась капиллярная сеть хориоаллантоисной оболочки 12-14 дневного куриного эмбриона породы Кросс “супер Ник”. Скорлупа удалялась со стороны воздушной камеры. Далее удалялась наружная и внутренняя подскорлупные оболочки, открывая доступ к капиллярной сети хориоаллантоисной оболочки. Для предотвращения высыхания поверхности капиллярной сети, а так же для выравнивания поверхности исследуемого участка биоткани использовался квадратный участок покровного стекла, толщиной 170 мкм и размером 15x15 мм.

Концентрация эритроцитов в различных участках капилляра неоднородна, и поэтому движение крови в капилляре хорошо заметно в виде перемещения участков различной яркости вдоль осевой линии капилляра. Это явление позволяет оценить скорость течения крови в капилляре, используя корреляционные алгоритмы. Для оценки смещения эритроцитов вдоль капилляров вычислялась корреляционные функции для соответствующих расчётных зон. Функции корреляции единичной расчётной зоны представляется в виде:

$$\Phi_k(m,n) = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^p f_k(i,j) g_k(i+m, j+n), \quad (1)$$

где $f_k(i,j)$ и $g_k(i,j)$ - распределение значений интенсивности соответствующих расчётных областей размерами $p \times q$ пикселей двух последовательных кадров.

Предложенный алгоритм апробировался на модели стеклянного канала. Модель изготавливалась из стеклянной капиллярной трубочки с внутренним диаметром 50 мкм, приклеенной к предметному стеклу. Для уравнивания капиллярных сил, по обе стороны от капилляра клеивались цилиндрические трубки с внутренним диаметром 1 мм. Размер частиц-трассеров составлял 1,5 мкм. Разность давления на концах стеклянного капилляра измерялась при помощи водяного манометра.

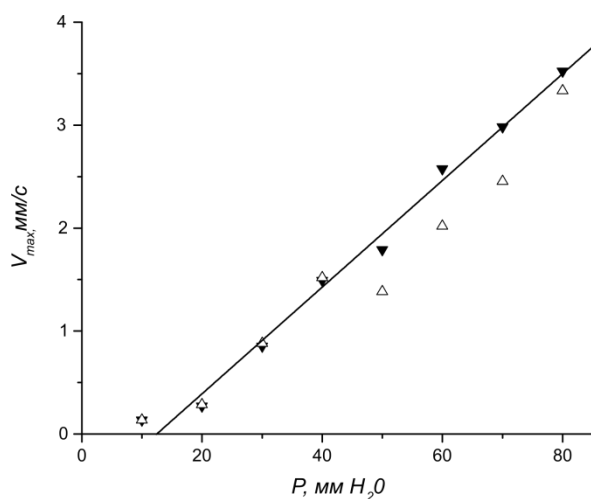


Рис.1. Треугольникам с заполнением соответствуют измеренные значения скорости по водному мениску. Треугольникам без заполнения соответствуют расчётные значения скорости методом PIV анализа. Прямая - линейная регрессия измеренных значений скорости.

В качестве помпы, для нагнетания давления в систему, использовался инсулиновый шприц. Давление в системе изменялось с шагом в 10 мм вод. ст. Во время каждого измерения регистрировалась серия изображений движения частиц-трассеров в капилляре диаметром 50 мкм, а также движение водного мениска в концевой стеклянной трубке диаметром 1 мм. Скорость движения водного мениска соответствует средней скорости течения в канале, а скорость частиц трассеров в центральной части канала – максимальной скорости течения в нем. Таким образом, объём жидкости, протекающей через поперечное сечение потока в единицу времени:

$$Q = V_{\text{cp}} S, \quad (2)$$

где V_{cp} - средняя скорость потока, S - площадь поперечного сечения потока. Согласно формуле 2 средняя скорость в капилляре будет в 400 раз больше средней скорости потока во вклеенной в канал цилиндрической трубке. Для ламинарного течения в цилиндрической трубе справедливо равенство:

$$V_{\text{cp}} = 0,5 V_{\text{макс}}, \quad (3)$$

где $V_{\text{макс}}$ - максимальное значение скорости потока. Методом PIV измерялось максимальное значение скорости и согласно формуле 3 рассчитывалось среднее значение скорости потока суспензии микросфер. Данные расчёта скорости движения частиц-трассеров нормировались и сопоставлялись со средним значениями скорости водного мениска. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Для того чтобы контрастировать эритроциты на фоне прилегающей биоткани использовалось монохроматическое кольцевое освещение на длине волны 470 нм.

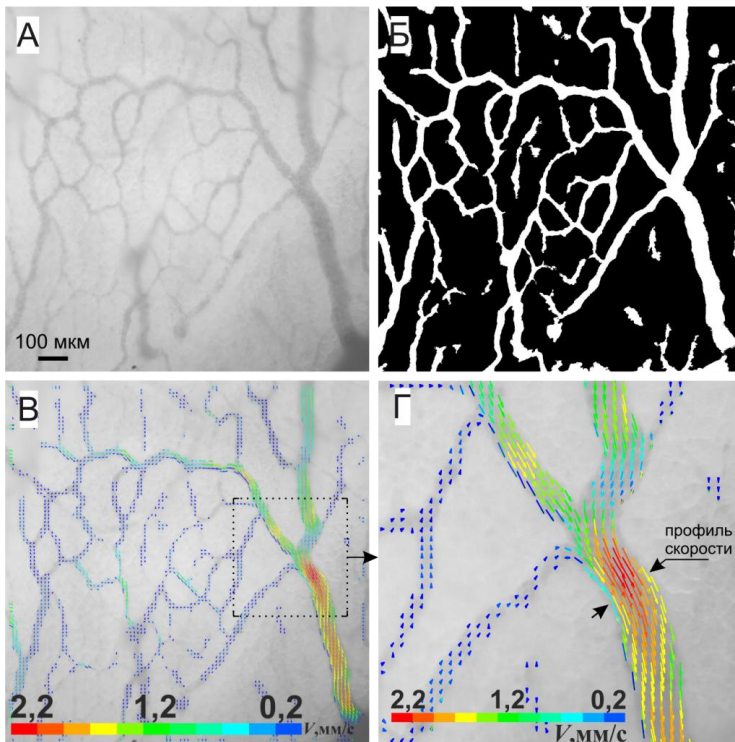


Рис. 2. Изображение капиллярной сети хориоаллантаическая оболочка куриного эмбриона (а). Маска капиллярной сети (б). Адаптивное PIV по рассчитанной маске капиллярной сети (в). Увеличенный сегмент изображения (г)

Чтобы отделить участки капиллярной сети от неподвижного фона использовался адаптивный алгоритм Ниблэка, который основывается на расчёте локального среднего значения и стандартное отклонение интенсивности элементов изображения в пределах анализируемого окна.

$T(x,y)=m(x,y)+ks(x,y)$ (4), где $T(x,y)$ - является локальным порогом бинаризации, $m(x,y)$ - среднее значение яркости участка изображения, $s(x,y)$ - стандартное отклонение значения яркости изображения в некоторой окрестности рассматриваемой точки, k – коэффициент Ниблэка.

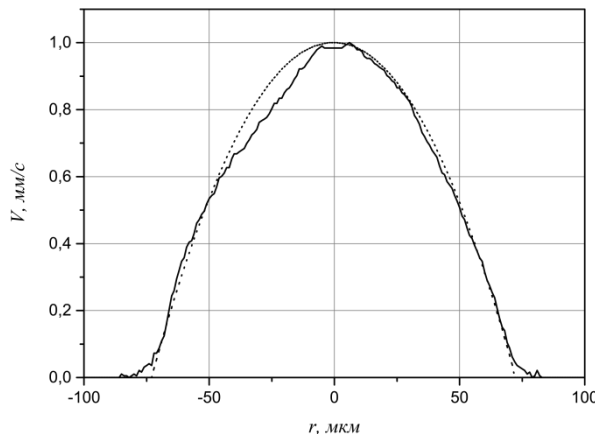


Рис. 3. Сплошная линия соответствует нормированному измеренному поперечному профилю скорости крови PIV методом в обозначенной зоне рис. 2г. Пунктирная линия соответствует нормированному параболическому профилю скорости ламинарного потока жидкости по Пуазейлю.

Далее элементы изображения, характеризующие шум, компенсировались операцией эрозии всего изображения. Далее бинарное изображение проверялось на устойчивость к 10 итерациям эрозии для удаления точечных элементов изображения.

Для увеличения точности метода определения границ капилляров, маска капиллярной сети рассчитывалась по серии из 50 бинаризованных изображений. Далее из каждого изображения капиллярной сети ХАО вычиталась полученная маска, инвертированная по значениям яркости. Поэтому оставались лишь те участки изображения, что соответствуют участкам разветвлённой сети капилляров. Полученная маска применялась для адаптивной раскладки расчётных зон PIV анализа (Рис. 2).

В Главе 3 впервые продемонстрирован подход магнитного захвата многослойных микрокапсул в биологических тканях.

Многослойные микрокапсулы (Рис. 4) приготавливались посредством метода последовательного ионного наложения разнозаряженных полиэлектролитов PАН и PSS на ядрах CaCO_3 . Ядра на основе карбоната кальция были синтезированы при помощи совместного осаждения солей 1М раствора CaCl_2 (0,615 мл) и 1М раствора Na_2CO_3 (0,615 мл) с добавлением 2,5 мл раствора RITC-BSA. Далее на полученные флуоресцентные ядра поочерёдно наносились разнозаряженные слои полиэлектролитов PАН и PSS. Концентрация водного раствора составляла 1 мг/мл. Для того, чтобы капсулы реагировали на магнитное поле, вместо одного из слоев PSS наносился слой наночастиц Fe_3O_4 (0,5 мг/мл), а дополнительный слой RITC-BSA добавлялась к общему числу слоёв оболочки капсулы для увеличения её общего флуоресцентного сигнала. Затем, матричные ядра растворяли в 0,2 М растворе EDTA (pH 7,3), в результате чего получалась суспензия полых магнитных флуоресцентных капсул. Концентрация полученной суспензии микрокапсул была рассчитана с помощью счетной камеры (гемоцитометр) и составляла $2,45 \cdot 10^8 \text{ мл}^{-1}$.

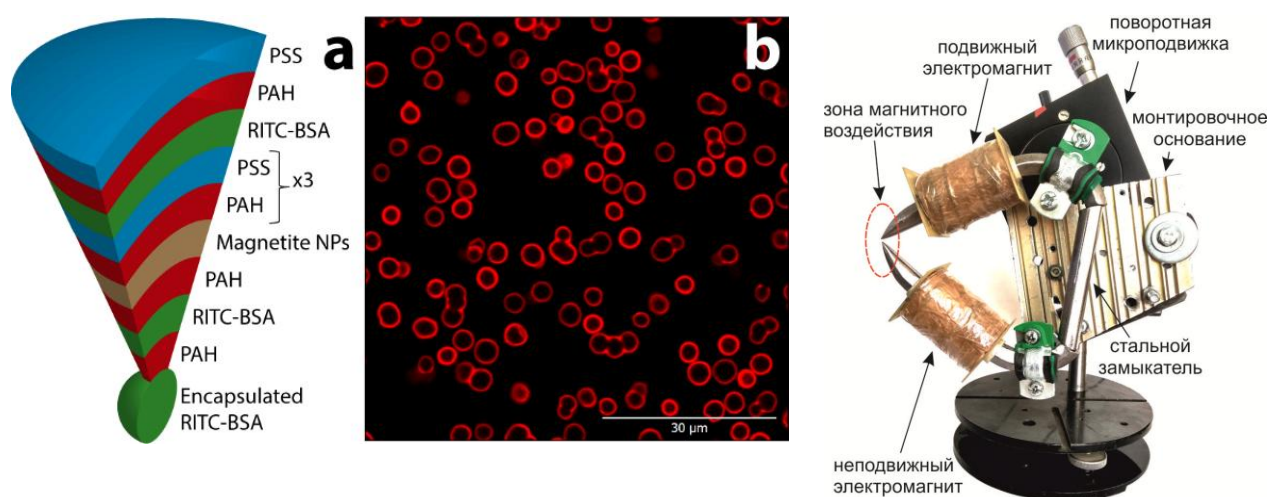


Рис. 4. Схематическое представление структуры оболочки магнитных флуоресцентных микрокапсул (а) и их конфокальное изображения (б). Электромагнитный пинцет (с).

Стрелка обозначает направление кровотока. Белые пятна во всей области потока соответствуют свечению микрокапсул. Большое белое пятно на капиллярной стенке соответствует микрокапсульному агрегату, образованному капсулами, захваченными магнитным полем. Накопление капсул вблизи магнитного наконечника является явным свидетельством их магнитного отклика на неоднородное магнитное поле. Капсулы аккумулируются точно в области наибольшего магнитного поля, где оно достигает значениям 200 мТл.

Количество захваченных капсул может контролироваться магнитным полем, как это показано на флуоресцентных изображениях рисунка (Рис. 5). Эти данные позволяют нам оценить приблизительное количество захваченных капсул и следовательно динамику их накопление. Согласно СЭМ-изображениям средний размер капсулы составляет около 3 мкм, что соответствует площади 7 мкм^2 .

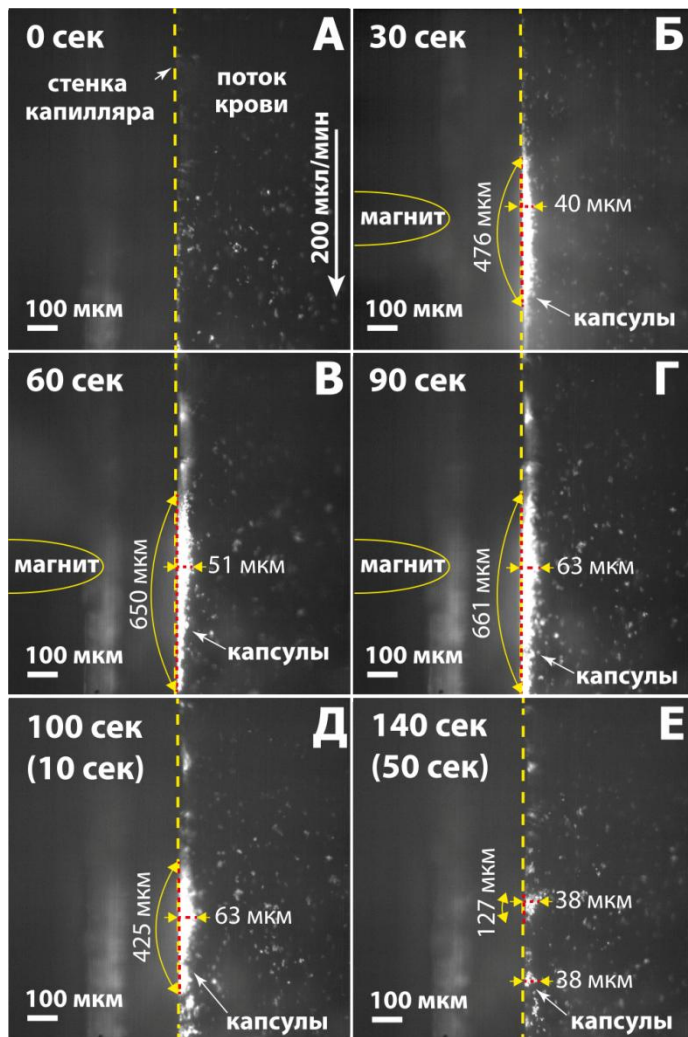


Рис. 5 Визуализация *in vitro* микрокапсул, движущихся в потоке цельной крови крысы без магнита (а), улавливание капсул с помощью постоянного магнита через 30, 60 и 90 с после применения магнитного поля (б-г) и соответственно (д и е) - после удаления магнита. Капсулы хорошо видны в виде белых областей вблизи стеклянной капиллярной стенки.

В свою очередь, площадь агрегатов капсул может быть представлена как сумма прямоугольников и прямоугольных треугольников. Таким образом, можно вычислить, что около 2700 капсул были захвачены за первые 30 секунд, а затем около 2800 капсул за 60 с и далее около 4500 капсул за 90 секунд магнитного воздействия.

Эксперименты *in vivo* по визуализации и улавливаю капсул в кровотоке проводился на брыжеечных микрососудах: артериолах, венах и капиллярах. На рисунке (Рис. 5) показаны изображения микрокапсул, захваченных магнитным полем в разветвлённой сети сосудов брыжейки крысы. Следует отметить, что в отличие от магнитного захвата *in vitro* капсулы остаются на стенке кровеносных сосудов после выключения

Дальнейшие эксперименты *in vivo* показывают, что капсулы обычно захватываются магнитным полем в изгибах и бифуркациях кровеносных сосудов (Рис. бг-е), где капсула замедляется, попадая в пристеночные потоки плазмы крови, что в свою очередь облегчает их механическое проникновение в стенку сосуда магнитного поля.

Проводился гистологический анализ ткани брыжейки после введения микрокапсул и воздействия магнитным полем. На рисунке 6 показан типичный образец взятых гистологических фрагментов. Можно четко различать продольное сечение большой вены, её стенок (а), эритроциты (б) и небольших капилляров (с).

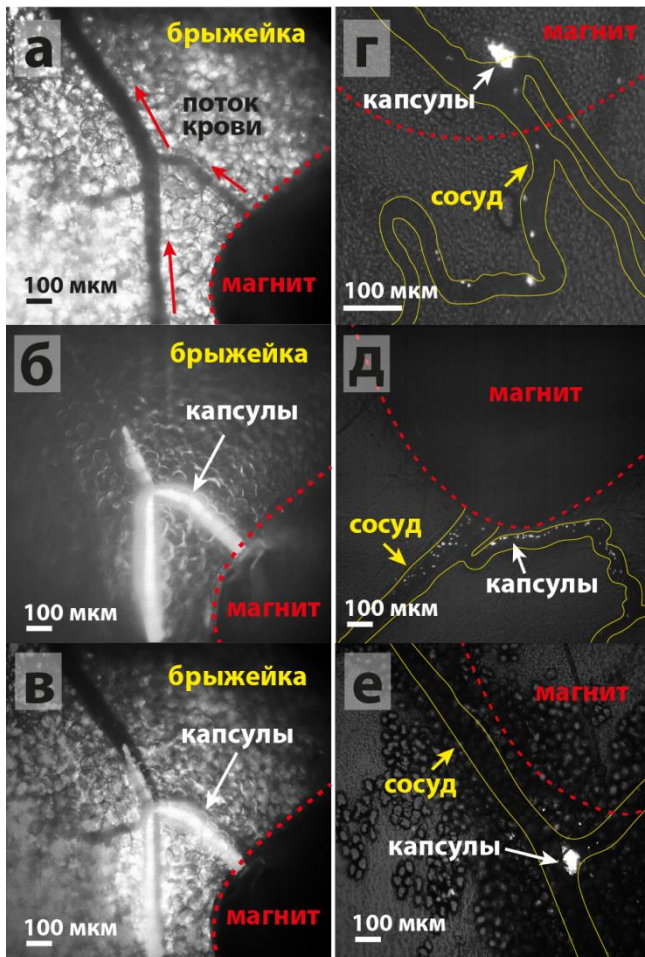


Рис 6. Визуализация *in vivo* и захват микрокапсул в сосудах брыжейки; (а-в) захвата капсул в Y-разветвленном микрососуде: (а) светлопольное изображение микрососудов (б) флуоресцентный канал визуализации на длине волны возбуждения 532 нм (в) комбинированное изображение сосудов и флуоресценции микрокапсул; (г-е) Дополнительные эксперименты *in vivo* по захвату капсул в изгибах и бифуркациях микрососудистого русла брыжейки (желтые линии на г-е обозначают стенку микрососуда).

Гистологический анализ показывает накопление микрокапсул вдоль стен больших сосудов, но с сохранением просвета вен. Однако также обнаружено, что капсулы заполняют некоторые небольшие брыжеечные капилляры (с), хотя количество заблокированных капилляров незначительно.

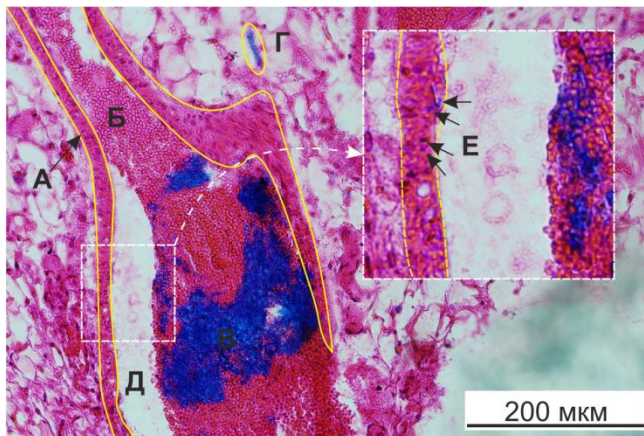


Рис 7. Типичный гистологический срез брыжейки крысы после магнитного захвата капсул: (а) стенка вены, отмеченная желтыми линиями; (б) эритроциты; (в) агломерация микрокапсул; (г) небольшой капилляр, заполненный микрокапсулами; (е) микрокапсулы проникшие через эндотелий в стенку вены в зоне (д).

Вставка на рисунке 6 показывает увеличенный участок стенки вены (е). Видно, что небольшая часть капсул проникает через эндотелий в стенку кровеносного сосуда. Показано, что магнитная локализация микрокапсул в биоткани не блокирует кровотока в крупных сосудах, что подтверждается на гистологических срезах (Рис. 7) и посредством PIV анализа кровотока до и после воздействия градиентного магнитного поля (Рис. 8). Это можно объяснить неоднородностью магнитного поля в зазоре между магнитами, которое притягивают капсулы к противоположным краям сосуда.

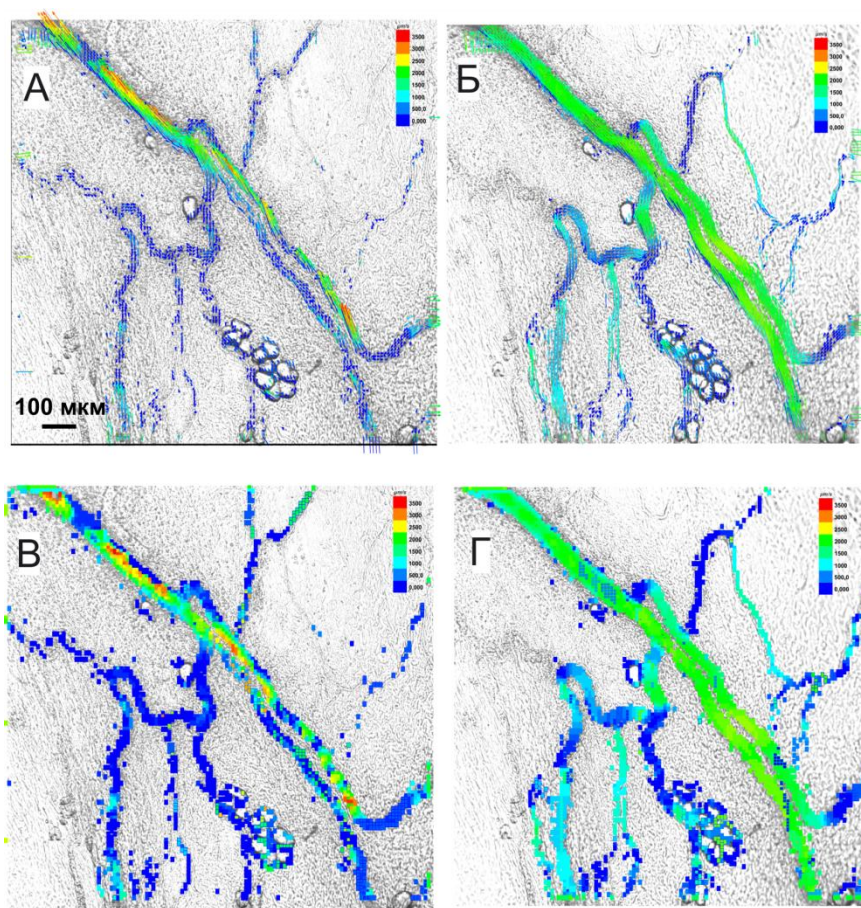


Рис. 8. Карта распределения скоростей крови сети сосудов брыжейки крысы до (а,в) и после (б,г) введения многослойных магнитным микрокапсул в системный кровотока, с последующим магнитным захватом микрокапсул, посредством магнитного пинцета.

Представленные экспериментальные данные демонстрируют потенциал многофункциональных капсул как дистанционно контролируемых систем доставки в биологических системах (например, различные виды рака кишечника). Было обнаружено, что внешнее магнитное поле удерживает капсулы в кровотоке, в зонах изгибов и ветвлений васкулатурной сети. Показано, что в зоне магнитного воздействия кровотока не блокируется после введения и магнитного захвата многослойных микрокапсул.

В **Главе 4** продемонстрирована методика формирования жизнеспособной клеточной колонии в стеклянном канале, посредством магнитной локализации клеток, поглотивших магнитные микрокапсулы, при помощи магнитного пинцета.

В рамках данной диссертационной работы, использовалась клеточная линия MA-104 (эмбриональная почка, макака резус). Все клетки высевались отдельно в колбах для тканевых культур и культивировались в модифицированной среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, SigmaAldrich) дополненной 1% противогрибковым коктейлем из пенициллина-стрептомицина с антимикробным препаратом 2 мМ L-глутамин и 10% фетальной бычьей сывороткой. В клеточной инкубаторе поддерживалась температура 37°C и 5% концентрация CO₂. Клеточная среда заменялась каждые 3 дня. Культуры клеток с 75-85% слиянием собирались с использованием 0,25% трипсина и подсчитывались с помощью гемоцитометра.

Клетки помещались в 24 или 96-луночные планшеты. На следующий день заменялась клеточная среда и добавлялась суспензия микрокапсул при соотношениях 5 и 100 капсул на единичную клетку.

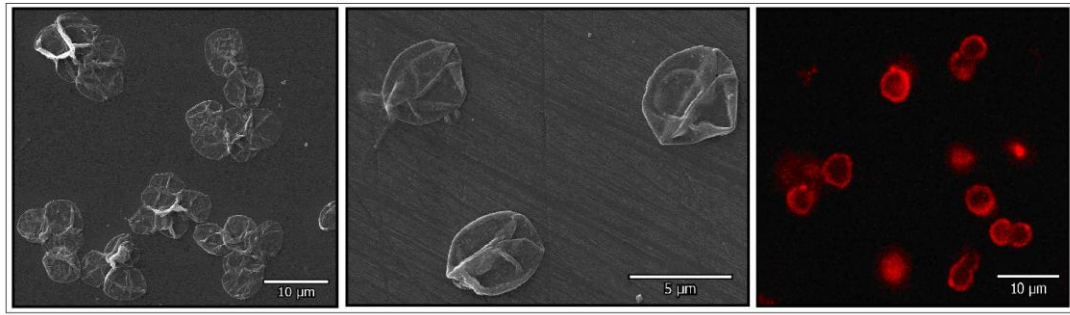


Рис .9. СЭМ изображения флуоресцентных магнитных микрокапсул (а,б). Конфокальные изображения микрокапсул (в)

Клетки инкубировались (Innova CO-170, New Brunswick Scientific) в течение 4 часов при температуре 37°C вместе с добавленными капсулами. Далее в каждую лунку клеточного планшета добавляли 10 мкл флуоресцентного красителя (AlamarBlue, Sigma-Aldrich) и затем измеряли спектрофотометром (Gemini XPS Microplate Reader, Molecular Devices) интенсивность свечения клеток. Эксперимент показывает способность метаболически активных клеток превращать реагент AlamarBlue в флуоресцентный колориметрический индикатор.

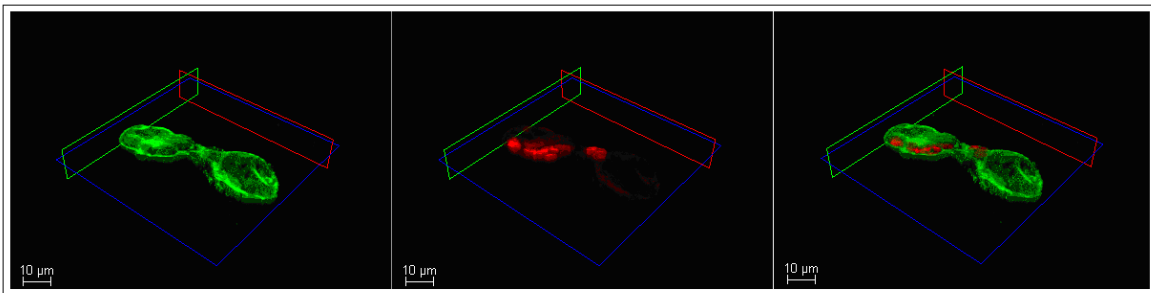


Рис .10. Конфокальная 3D реконструкция изображений клеток МА-104 с интернализованными микрокапсулами. Клетки мечены кальцеином (а); TRITC флуоресценция микрокапсул (б); Положение капсул в живое клетке (в).

Смесь живых клеток МА-104 в специальном клеточном питательном растворе прокачивалась через стеклянный канал с помощью шприцевой помпы (однонаправленные инфузионные насосы Cole-Parmer, Англия) с параметрами объемного расхода 200 мкл/с.

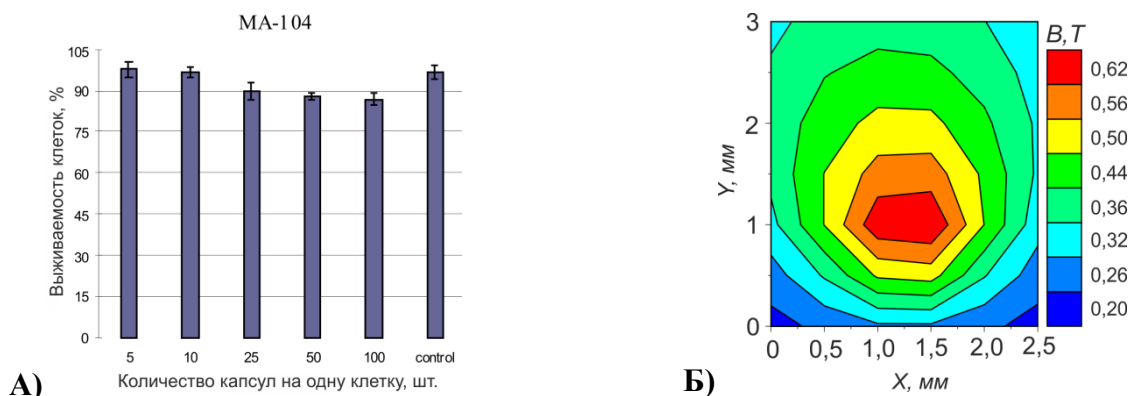


Рис .11 Тест цитотоксичности микрокапсул для клеточной линии МА-104 (а). Распределение магнитного поля в зазоре электромагнитного пинцета (б).

Подобная скорость потока жидкости соответствует характерным физиологическим скоростям венул и артериол. Капилляр был помещен в зазор между электромагнитными наконечниками таким образом, что тень нижнего наконечника не перекрывает микроскопическое поле зрения в области потока суспензии клеток. После заполнения

капилляра с помощью клеточной суспензии, электромагнит включался, в результате чего, в зоне наибольшего напряжения магнитного поля захватывался массив клеток.

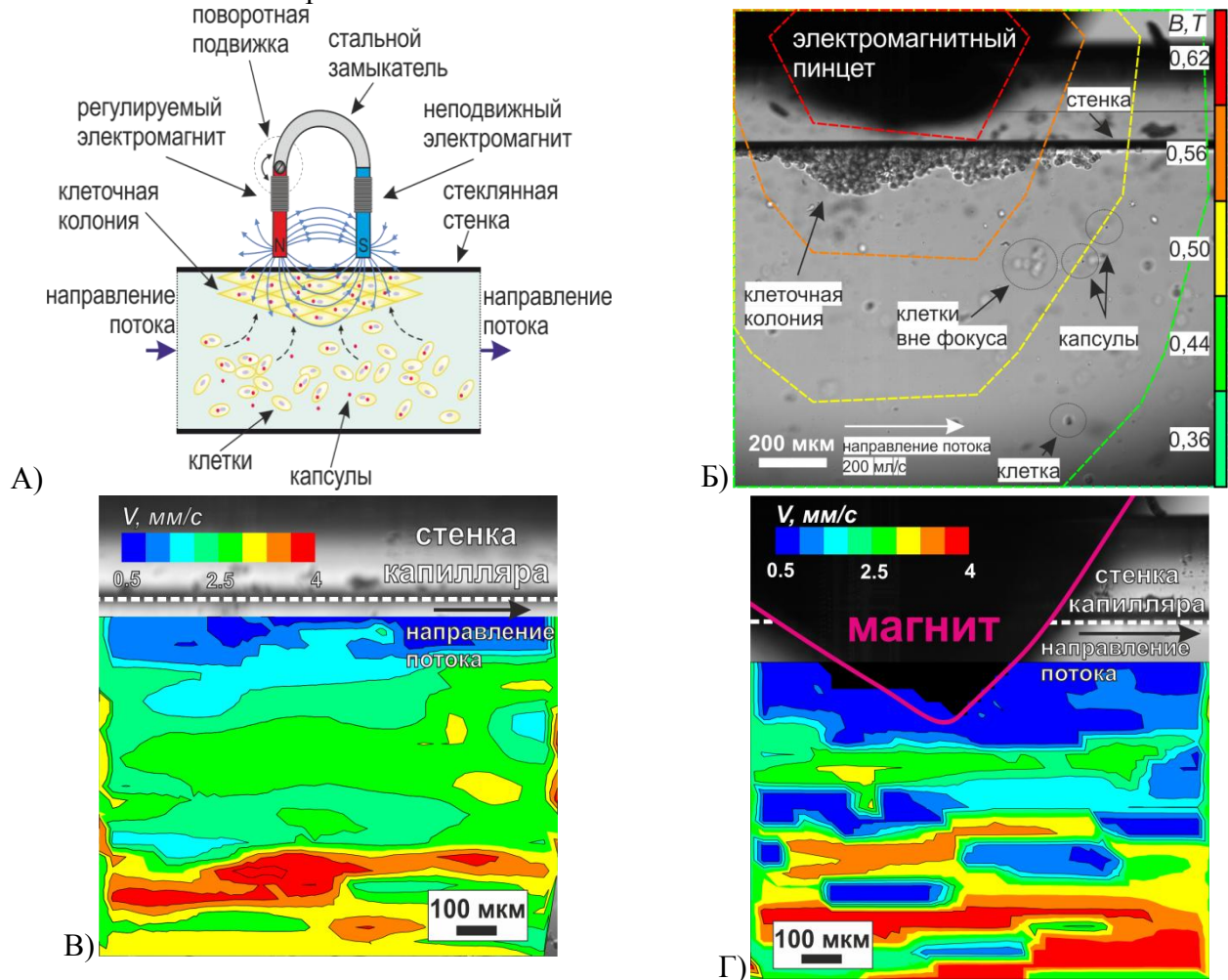


Рис 12. Экспеимент по магнитному захвату клеток МА-104 с магнитными микрокапсулами в стеклянном капилляре, при помощи магнитного пинцета (а). Карта распределения магнитной индукции (б). Поля скоростей до и после магнитного захвата (с) и (д).

На рисунке 12 представлена клеточная колония, образованная градиентным магнитным полем. Время магнитного воздействия составляло 5 секунд. На рисунке 12Б представлена карта магнитной индукции магнитного пинцета относительно захваченной колонии клеток.

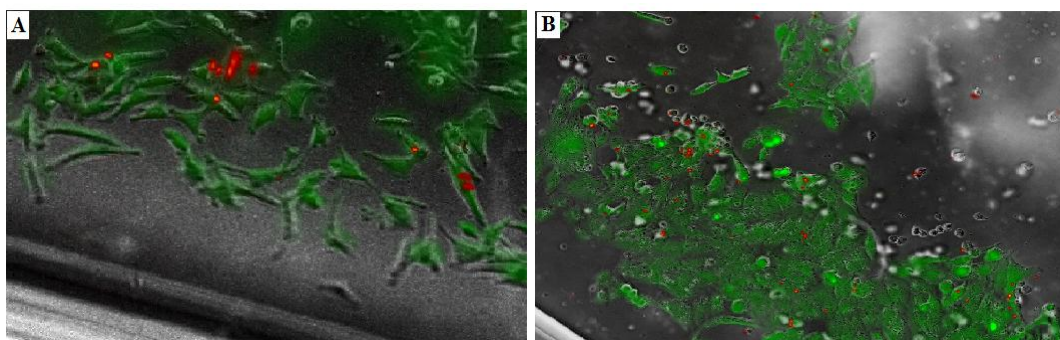


Рис 13. Клеточная колония 24 и 96 часов после эксперимента

Показано, что клеточная колония сформирована в зоне с градиентом магнитным полем порядка 180 Т/м. Карта скоростей потока суспензии клеток в стеклянном канале до и после магнитного воздействия представлена на рисунке 12в,д. Измеренная локальная скорость потока клеток представлена в виде цветового градиента, где минимальное значение локальной скорости потока клеток 0,5 мм/с кодируется синим цветом, а максимальная скорость 4 мм/с

кодируется красным цветом. Положение магнитных концентраторов, относительно стеклянного канала, выделена фиолетовым контуром в верхней части рисунка 12б.

После формирования клеточной колонии (МА-104) стеклянный канал с клетками помещался в чашку Петри с клеточным питательным раствором. В течение пяти дней, рост клеток контролировался с использованием кальцеинового красителя и флуоресцентной визуализации. На рисунке 13 показаны захваченные клетки в стеклянном канале через 24 и 96 часов, соответственно, после эксперимента.

В Главе 5 проведено исследование процессов фототермического лазерного ИК воздействия, на полимерные трёхмерные микроструктурированные плёнки, с массивом полых микрочтейнеров на их поверхности, через многомодовое оптическое волокно, в фантоме мягких тканей.

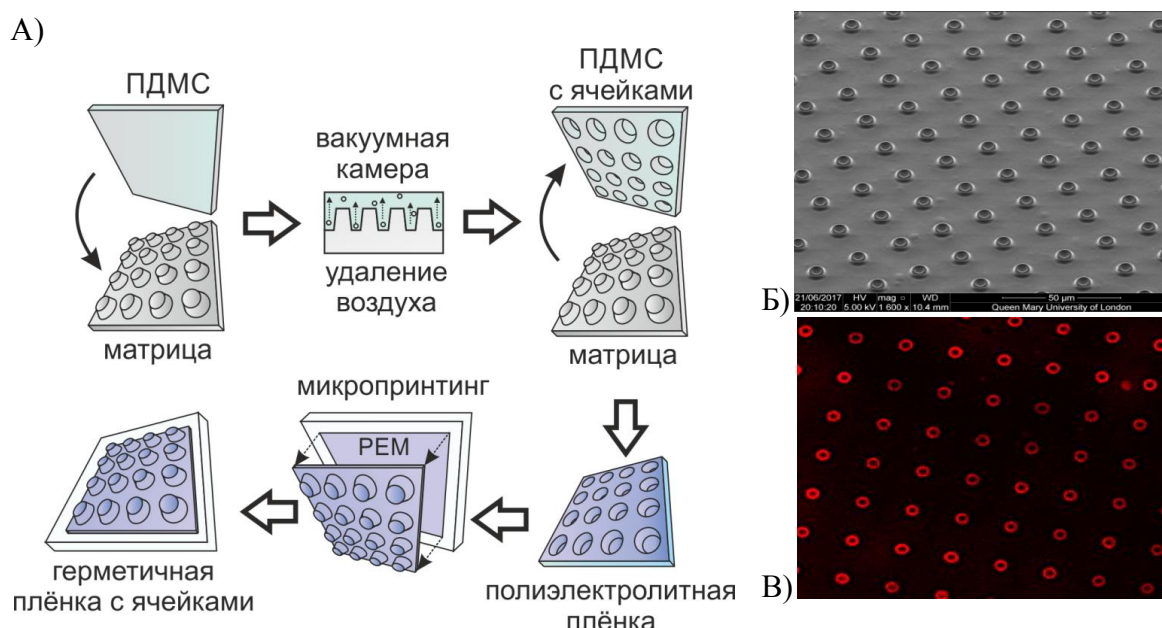


Рис 14. Процесс изготовления полимерной плёнки с массивом полых трёхмерных контейнеров, методом полианионной сборки (А). Сэм изображения ПТМП (Б). Флуоресцентные изображения ПТМП (В)

Полимерная трёхмерная микроструктурированная плёнка изготавливалась в пять этапов (рисунок 14) Сначала изготавливалась положительная кремниевая мастер-маска (Shenzhen semiconductor, Shenzhen, Китай) с массивом одинаковых выпуклых паттернов, используя метод лазерной трёхмерной литографии. Далее с полученной положительной мастер-маски делался негативный ПДМС оттиск. Затем на ПДМС матрицу адсорбировалось 40 бислоёв разнозаряженных полиэлектролитов PDADMAK/PSS методом полианионной сборки (адсорбционная система Riegler & Kirstein GmbH, Германия)). Адсорбция полиэлектролитов производилась в растворе NaCl с ионной силой 0,5 М при концентрации полиэлектролитов 2 мг/мл. Каждый слой полиэлектролитов адсорбировался 10 минут, после чего образец промывался трижды по 6 минут в деионизированной воде (Milli-Q Plus 185, Millipore).

На следующем этапе, пористая поверхность полиэлектролитов герметизировалась гидрофобным 0,5% раствором PLA, который растворяли в хлороформе. В результате, получалась плёнка с массивом открытых вогнутых лунок, в которые помещались активные вещества посредством метода осаждения вещества из жидкой фазы.

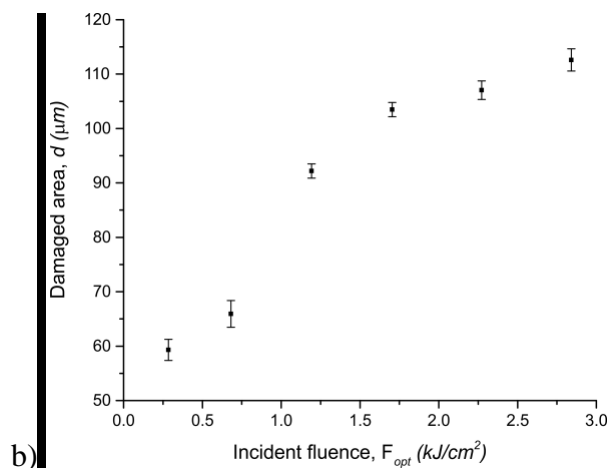
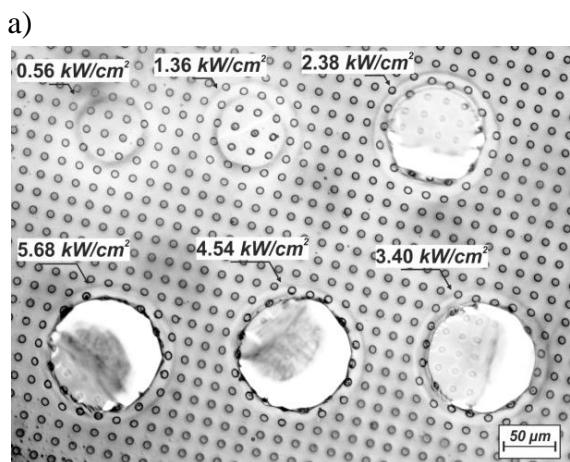


Рис 15. Характерные паттерны фототермического повреждения сухих полиэлектролитных трёхмерных плёнок.

Для проверки герметичности контейнеров, в качестве модельного активного биологического вещества использовался Родамин В. Далее на твёрдое будущее основание плёнки также адсорбировалось 40 бислоёв разнозаряженных полиэлектролитов PDADMAC/PSS, герметизированных 0,5% раствором PLA. Последний этап изготовления плёночного полимерного носителя заключался в микропринтинге плёнки, вместе с преципитатом, с поверхности негативной ПДМС маски на твёрдой печатной базе с полимерными слоями. В результате получалась наноплёнка с герметичными контейнерами, форма которых совпадает с формой выпуклых паттернов искомой кремниевой мастер-маски. В данном проекте единственный микроконтейнер полиэлектролитной плёнки имел форму усечённого конуса высотой 4 мкм и диаметрами оснований 10 мкм и 7 мкм соответственно. В среднем, каждый контейнер может содержать порядка 10 пг биоактивного вещества, что в сумме даёт 360 мкг на 100 мкм^2 площади 3D плёнки.

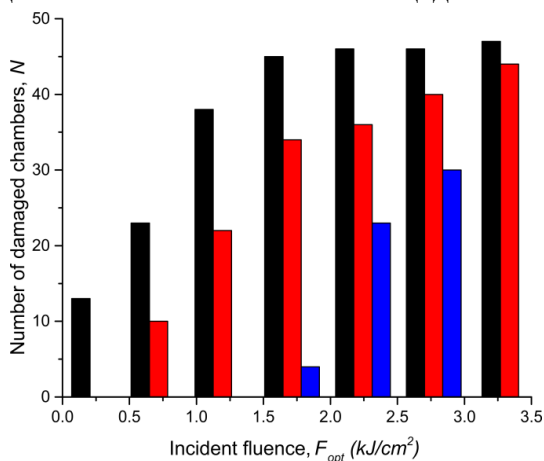


Рис. 16. Зависимость между количеством поврежденных микроконтейнеров PSS/PDADMAC ПТМП и плотностью мощности ИК лазера (расстояние 100 мкм). Черные столбики - количество повреждённых сухих микроконтейнеров, красные столбики - количество повреждённых микроконтейнеров в деионизированной воде, синие столбики - количество повреждённых микроконтейнеров в 1% агарозном геле.

Для придания плёнке фоточувствительных свойств, на внешнюю поверхность плёнки напылялись в вакууме частицы золота при помощи коммерческой системы напыления (SC 7620, Quorum, Laughton, Великобритания). На первом этапе сухая ПТМП активировалась в воздушной среде. ПТМП помещалась на предметный столик инвертированного микроскопа. Затем оптическое волокно, вклеенное в изогнутую под 45° иглу, располагалось ортогонально к образцу на высоте 100 мкм, при помощи трёхмерного микроманипулятора. Время экспозиции лазерного излучения во составляло 0,5 с.

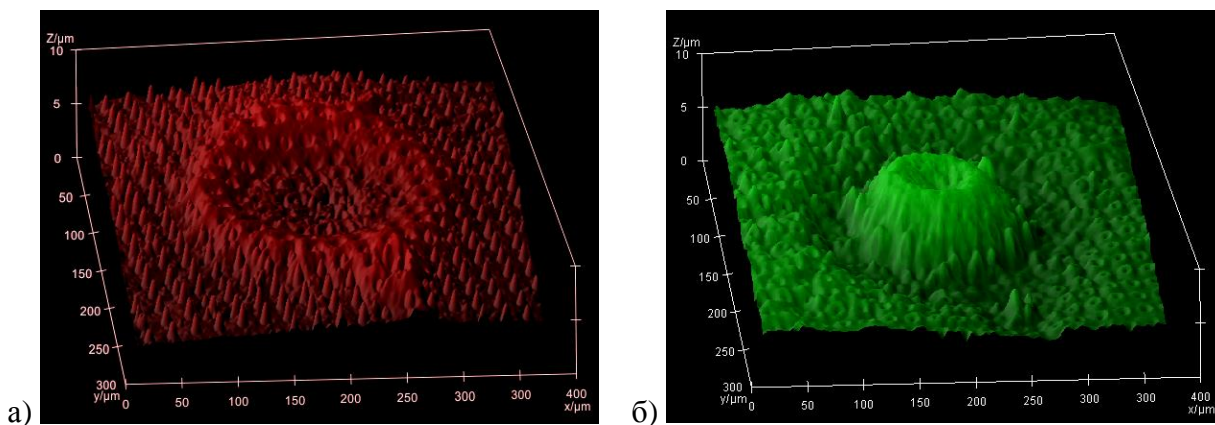


Рис 17. Конфокальные изображения PSS/PDADMAC ПТМП в 1% агарозном геле после лазерного ИК воздействия через многомодовое оптическое волокно (3D реконструкция). Плотностью мощности лазерного воздействия составляла $5,6 \text{ кВт/см}^2$. Красный канал флуоресценции (а) соответствует свечению инкапсулированного родамина В. Зелёный канал флуоресценции (б) соответствует свечению FITC растворённого в 1% агарозном геле. Распределение флуоресцентного сигнала на (а), является перевёрнутым в пространстве относительно оси Z таким образом, что центральная выпуклая область (д) флуоресцентного сигнала FITC “накрывает” вогнутую область расплавленной полимерной плёнки.

В зоне лазерного воздействия наблюдается круговая область флуоресценции, вышедшего из полимерных ячеек родамина В, интенсивность которой значительно падает ближе к её центральной части (рисунок 17а,в). Напротив, флуоресцентный сигнал от красителя FITC, растворённого в агарозном геле, имеет максимальное значение интенсивности в центральной части зоны лазерного воздействия, находясь внутри кольца флуоресценции вышедшего из ячеек родамина В (рисунок 16б,г). Пространственная 3D реконструкция флуоресцентного сигнала родамина В и FITC показала, что аналогичное распределение сигнала флуоресценции связано с изменением геометрии поверхности облучённого образца. В центральной части зоны лазерного ИК воздействия образовалась впадина, окружённая выпуклым кольцом, сформированным смесью расплавленного полимера и флуоресцентного преципитата родамина В (рисунок 16д). Сформированная впадина была заполнена гидрогелем с красителем FITC (рисунок 16е). Полная ширина на уровне половинной амплитуды лазерного пучка составляла 75 мкм на расстоянии 100 мкм от поверхности образца. На рисунке 16 представлены конфокальные изображения и 3D реконструкции PSS/PDADMAC ПТМП в 1% агарозном геле после лазерного ИК воздействия через многомодовое оптическое волокно.

По перспективам данные плёнки могут переменяться для покрытия поверхностей титановых костных имплантов, для фототермической активации пролонгированной антибактериальной терапии.

В Главе 6 продемонстрирован метод адресации биологически активных веществ к единичным клеткам, при помощи фототермической ИК активации микроструктурированных биополимерных плёнок.

ПТМП обеспечивает контролируруемую инкапсуляцию химически активных компонентов в виде небольших кластеров, равномерно распределённых по поверхности полимерной плёнки.

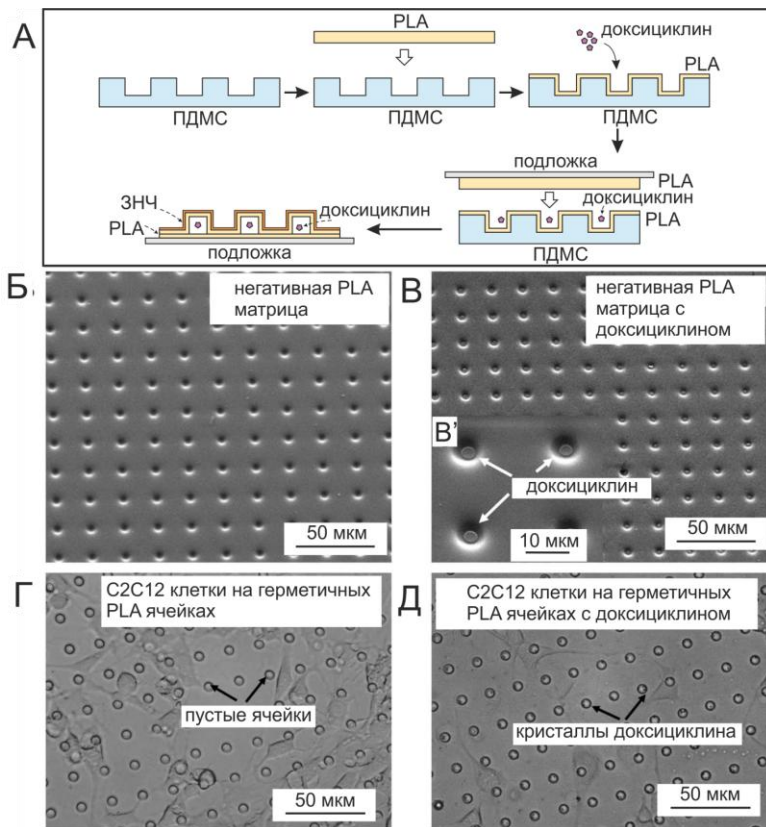


Рис 18. Схематическое представление основных этапов синтеза PLA биополимерной ПТМП посредством метода микропечати (а), СЭМ изображения пустой негативной PLA матрицы, до процесса микропечати (б), СЭМ изображения PLA матрицы, до процесса микропечати, с преципитированными кристаллами доксициклина (в), пустая ПТМП плёнка с C2C12 клеточной колонией (г), ПТМП плёнка с доксициклином и с C2C12 клеточной колонией (д)

Полимерные плёнки находят своё применение для контролируемой доставки лекарственных средств, в качестве антикоррозионных покрытий, для задач микроэлектроники, тканевой инженерии и сохранения продуктов питания.

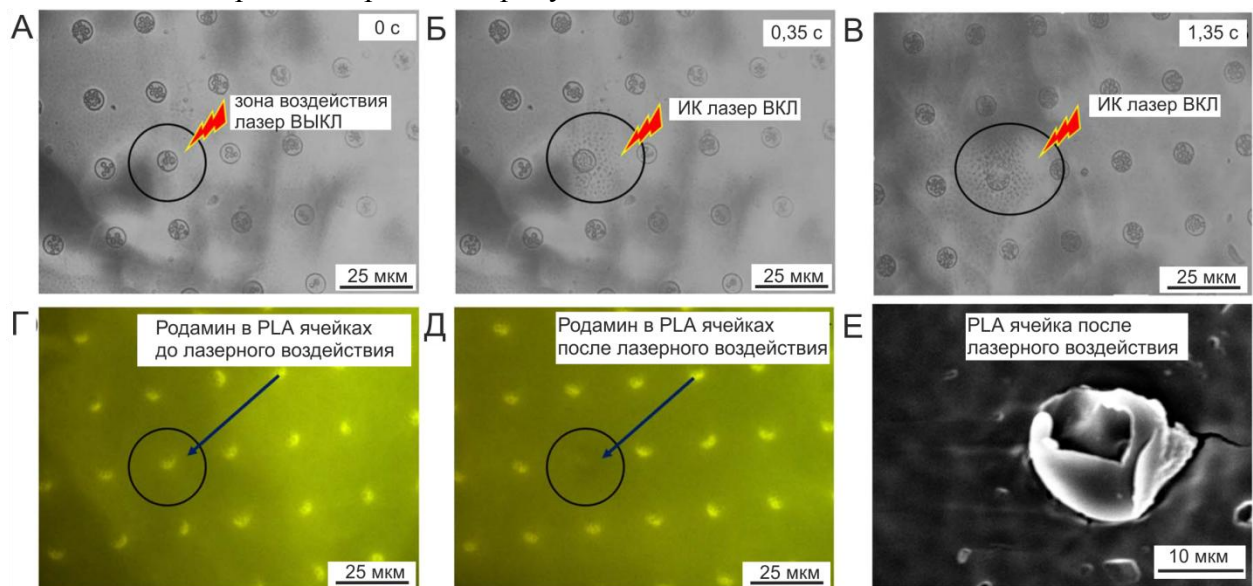


Рис 19. Фототермическая активация 2% PLA микроконтейнера ПТМП, посредством сфокусированного лазерного ИК пучка. Светлопольное изображение ПТМП, до лазерного воздействия (а), Светлопольное изображение ПТМП, после 0,35 с лазерного воздействия (б), Светлопольное изображение ПТМП, после 1,35 с лазерного воздействия (в), Флуоресцентное (RhV) изображение ПТМП, до лазерного воздействия (г), Флуоресцентное изображение ПТМП, после лазерного воздействия (д), СЭМ изображение единичного микроконтейнера ПТМП, после лазерного воздействия (е).

Целями данной работы было использование ПТМП плёнки в качестве клеточного субстрата, для задач экспрессии специфических доксициклин-зависимых генов ЗФБ, единичных модифицированных клеток C2C12, посредством целевой фототермической

активации уединённых микроконтейнеров ПТМП с инкапсулированным доксициклином. В результате ЗФБ модифицированные клетки C2C12, после воздействия DOX активируют экспрессию ЗФБ посредством тетрациклин-зависимого промотора P_{tet} , активированного rtTA-2SM2 , который в свою очередь активно отключается в отсутствие DOX путём связывания репрессора tet-R-KRAB.

Для изготовления ПТМП с массивом пустых микроконтейнеров, использовался биополимер PLA (гранула 3 мм, $M_w \sim 60\,000$, Sigma-Aldrich, Германия). Биополимер PLA растворяли в 1, 2, 3 и 5 %мас. в хлороформе. Негативный ПДМС штамп быстро погружался на 5 с в раствор PLA при помощи CO_2 газовой подвижки (80 мм/с). Извлечение ПДМС штампа из раствора PLA осуществлялось за счёт перемещения линейной подвижки шаговым двигателем (0,05-4 мм/с).

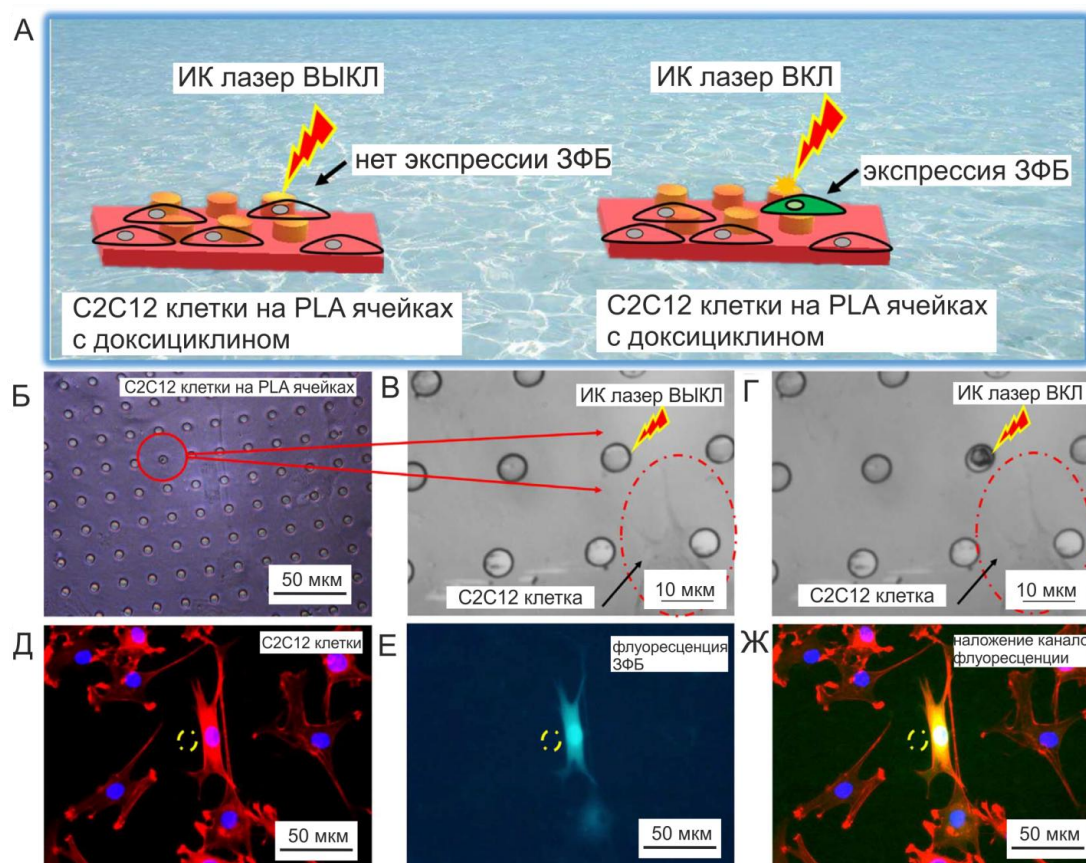


Рис 20. Дизайн эксперимента по фототермической активации экспрессии ЗФБ единичных генетически модифицированных клеток на ПТМП клеточном субстрате (а), 10х светлпольное изображение ПТМП с клеточной колонией, до лазерного воздействия (б), зона лазерного воздействия на единственный микроконтейнер ПТМП возле C2C12 клетки, до фототермической активации (в), зона лазерного воздействия на единственный микроконтейнер ПТМП возле C2C12 клетки, после фототермической активации (г), конфокальные флуоресцентные изображения прокрашенных ядер и цитоскелета клеточной колонии в зоне фототермической активации микроконтейнера ПТМП (д), конфокальные флуоресцентные изображения ЗФБ клеточной колонии в зоне фототермической активации микроконтейнера ПТМП (е), наложение флуоресцентных каналов (ж).

Далее, трёхмерные ячейки ,полученной PLA плёнки, загружались биологически активными компонентами посредством ко-преципитации и затем печатались на поверхность покровного стекла, обработанного по той же технологии, биополимером PLA. Ко-преципитация карго веществ производилась путём погружения ПДМС штампа со слоем PLA в водные растворы RhB (0,2 мг/мл) или DOX (10 мг/мл), при ультразвуковом воздействии в течение 30 с,

при частоте 37 кГц, мощности $0,087 \text{ Вт/см}^2$ Elmasonic 15H (Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Германия).

Затем с поверхности образца убиралась лишняя влага безворсовой салфеткой, для предотвращения образования кристаллов RhB или DOX в пространстве между несущими ячейками. Количество загруженного вещества в единичный микроконтейнер полимерной трёхмерной PLA плёнки составило $12,5 \pm 6 \text{ пг}$ флуоресцентного красителя RhB или $2 \pm \text{ мкг}$ активного вещества на 1 см^2 (160.000 микроконтейнеров).

Для того, чтобы 3D плёнку возможно было активировать ИК лазерным излучением, на поверхность ПТМП напылялись в вакууме золотые наночастицы (SC 7620, Quorum, Laughton, Великобритания).

Установлено, что единичный ПТМП микроконтейнер способен экспрессировать ЗФБ по меньшей мере в одной клетке. Чтобы избежать высвобождения избыточного количества доксицилина, следует избегать активации нескольких бизлежащих микроконтейнеров и сохранять минимальное расстояние по меньшей мере двух МК друг от друга. В экспериментах активации нескольких соседних МК ПТМП приводило к экспрессии ЗФБ в нескольких не целевых клетках, в поле зрения микроскопа.

Этот эффект объясняется тем, что из нескольких МК высвобождается значительное количество DOX. Другие расхождения между позицией флуоресцентных клеток и открытым МК объясняются миграцией клеток, которая может составлять до 15 мкм. Поэтому для определения концентрации экспозиции биологически активного вещества важно учитывать начальную восприимчивость клетки, а не её текущее положение на клеточной подложке.

В **Заключении** сформулированы основные результаты и выводы работы. Основные результаты диссертационной работы заключаются в следующем:

1. Разработана и апробирована методика адресации флуоресцентных многослойных микрокапсул в потоке крови *in vivo* при помощи электромагнитного пинцета в пределах выбранного сосудистого сегмента васкулатурной сети. Также было показано, что многослойные микрокапсулы захватывались магнитным пинцетом в сосудистых сетях брыжейки крысы, в зонах с наличием изгибов и ветвлений сосудистых сегментов. Было показано, что в зоне воздействия магнитного поля, после введения в кровоток, остановки кровотока не произошло.
2. Реализована методика магнитного захвата модельных клеток MA-104, поглотивших магнитные флуоресцентные многослойные микрокапсулы, в стеклянном фантоме кровеносного сосуда. В результате была сформирована жизнеспособная клеточная колония в стеклянном канале, в месте неразрушающего магнитного воздействия.
3. Разработана безмаркерная методика визуализации сосудистых сетей на основе корреляционных алгоритмов для построения карт скоростей крови в сосудистых сетях. Разработаны оригинальные алгоритмы стабилизации изображений сосудистых сетей. Разработана методика маскирования границ сосудов на основе методов локальной бинаризации яркостных картин сосудов.
4. Разработана методика фототермической активации полимерной трёхмерной микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, при помощи ИК лазерного воздействия через многомодовое оптическое волокно внутри фантома мягких тканей.
5. Разработана система лазерного ИК фототермической активации единичных микроконтейнеров полимерной трёхмерной микроструктурированной плёнки с последующим релизом инкапсулированного доксицилина. Разработана методика доксицилин-индуцированной активации ЗФБ экспрессии единичных клеток на клеточной подложке на основе полимерной

трёхмерной микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности.

Список публикаций по теме исследования

1. Voronin, D. V., Sindeeva, O. A., **Kurochkin, M. A.**, Mayorova, O., Fedosov, I. V., Semyachkina-Glushkovskaya, O., Dmitry A.G., Tuchin, V. V., Sukhorukov, G. B., In vitro and in vivo visualization and trapping of fluorescent magnetic microcapsules in a bloodstream //ACS applied materials & interfaces. – 2017. – Т. 9. – №. 8. – С. 6885-6893.
2. Vidiashева, I. V., Abalymov, A. A., **Kurochkin, M. A.**, Mayorova, O., Lomova, M. V., German, S. V., Dmitry N.K., Mikhail N.Z., Dmitry A.G., Andre G.S., Tuchin, V. V., Sukhorukov, G. B., Transfer of cells with uptaken nanocomposite, magnetite-nanoparticle functionalized capsules with electromagnetic tweezers //Biomaterials science. – 2018. – Т. 6. – №. 8. – С. 2219-2229.
3. Gai, M., **Kurochkin, M. A.**, Li, D., Khlebtsov, B. N., Dong, L., Tarakina, N., Poston R., Gould D.J., Frueh J., Sukhorukov, G. B. ,In-situ NIR-laser mediated bioactive substance delivery to single cell for EGFP expression based on biocompatible microchamber-arrays //Journal of Controlled Release. – 2018. – Т. 276. – С. 84-92.
4. **Kurochkin, M. A.**, Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Blood flow velocity measurements in chicken embryo vascular network via PIV approach //Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10716. – С. 107160H.
5. **Kurochkin M. A.**, Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Micro-PIV quantification of capillary blood flow redistribution caused by laser-assisted vascular occlusion //Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS). – International Society for Optics and Photonics, 2016. – Т. 9917. – С. 99171T.
6. **Kurochkin M. A.**, Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Advanced digital methods for blood flow flux analysis using μ PIV approach //Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – Т. 9448. – С. 94481A.
7. **Kurochkin M. A.**, Fedosov I. V., Tuchin V. V. In-vivo study of blood flow in capillaries using μ PIV method //Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XV; and Laser Physics and Photonics XV. – International Society for Optics and Photonics, 2014. – Т. 9031. – С. 903107.
8. Stiukhina, E. S., **Kurochkin, M. A.**, Klochkov, V. A., Fedosov, I. V., & Postnov, D. E. Tissue perfusability assessment from capillary velocimetry data via the multicompartiment Windkessel model //Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – Т. 9448. – С. 94481K.
9. **Kurochkin, M. A.**, Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V. Adaptive μ PIV for visualization of capillary network microcirculation using Niblack local binarization //Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10336. – С. 103360W.
10. Postnikov, E. B., Tsoy, M. O., **Kurochkin, M. A.**, & Postnov, D. E., A fast method for the detection of vascular structure in images, based on the continuous wavelet transform with the Morlet wavelet having a low central frequency //Saratov Fall Meeting 2016: Laser Physics and Photonics XVII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data III. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10337. – С. 103370X.
11. Stiukhina, E. S., **Kurochkin, M. A.**, Fedosov, I. V., & Postnov, D. E., Highly localized laser-induced vascular responses //Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10717. – С. 107171Z.
12. Стюхина Е.С., **Курочкин М.А.**, Федосов И.В., Постнов Д.Э., Лазер-индуцированные сосудодвигательные реакции на хориоаллантоисной мембране // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 71–78.