



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 1/36 (2021.08); G01N 23/046 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2020124899, 27.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2020

Дата регистрации:
06.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.07.2020

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2022 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 06.04.2022 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

123182, Москва, ул. Щукинская, 1, ФГБУ
"НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова"
Минздрава России, Научно-организационный
отдел

(72) Автор(ы):

Агапов Игорь Иванович (RU),
Агапова Ольга Игоревна (RU),
Боброва Мария Михайловна (RU),
Сафонова Любовь Александровна (RU),
Ефимов Антон Евгеньевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр трансплантологии
и искусственных органов имени академика
В.И. Шумакова" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И.
Шумакова" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2443805 C1, 27.02.2012.
ЕФИМОВ А.Е. ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ
МИКРО- И НАНОСТРУКТУРЫ
БИОМАТЕРИАЛОВ, КЛЕТОК И ТКАНЕЙ
МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ
ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ /
Диссертация на соиск. уч. степ. д.б.н., Москва,
2018. САФОНОВА Л.А. Разработка и
исследование 2D и 3D биodeградируемых
скаффолдов на основе фиброина шелка для
регенеративной медицины / (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ НАНОТОМОГРАФИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области нанотехнологии и может быть использовано для получения биологических образцов для исследований методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ). Способ получения биологического образца для исследования методом сканирующей зондовой нанотомографии включает заливку биологического образца в полимерную среду. При этом заливку

биологического образца проводят на подложке в виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда Bombyx mori толщиной 1-100 мкм, содержащей 5-100% фиброина шелка по массе. Изобретение обеспечивает сокращение времени получения биологического образца для исследований методом СЗНТ за счет сокращения манипуляций путем использования оригинальной подложки при заливке биологических образцов

в полимерную среду; сохранение целостности и структуры биологического образца за счет обеспечения его адгезии в процессе заливки в полимерную среду путем использования оригинальной подложки, обладающей необходимым запасом механической прочности;

обеспечение достаточного уровня биосовместимости подложки для получения образцов клеток млекопитающего за счет возможности культивирования клеток на подложке. 1 з.п. ф-лы, 4 ил.

(56) (продолжение):

Диссертация на соиск. уч. степ. к.б.н., Москва, 2019. САФОНОВА Л.А. и др. ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА ШЕЛКА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ ПОЛНОСЛОЙНОЙ РАНЫ КОЖИ У КРЫС / ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ, 2016, том XVIII, N 3, стр. 74-84. САФОНОВА Л.А. и др. Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка / Современные технологии в медицине, 2015, том 7, N 3, стр. 6-13.

R U 2 7 6 9 8 3 6 C 2

R U 2 7 6 9 8 3 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 1/36 (2021.08); *G01N 23/046* (2021.08)(21)(22) Application: **2020124899, 27.07.2020**(24) Effective date for property rights:
27.07.2020Registration date:
06.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: **27.07.2020**(43) Application published: **27.01.2022 Bull. № 3**(45) Date of publication: **06.04.2022 Bull. № 10**

Mail address:

123182, Moskva, ul. Shchukinskaya, 1, FGBU
"NMITS TIO im. ak. V.I. Shumakova" Minzdrava
Rossii, Nauchno-organizatsionnyj otдел

(72) Inventor(s):

**Agapov Igor Ivanovich (RU),
Agapova Olga Igorevna (RU),
Bobrova Mariya Mikhajlovna (RU),
Safonova Lyubov Aleksandrovna (RU),
Efimov Anton Evgenevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr transplantologii i
iskusstvennykh organov imeni akademika V.I.
Shumakova" Ministerstva zdravookhraneniya
Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS TIO im.
ak. V.I. Shumakova" Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) METHOD OF PRODUCING A BIOLOGICAL SAMPLE FOR ANALYSIS BY SCANNING PROBE NANOTOMOGRAPHY

(57) Abstract:

FIELD: nanotechnology.

SUBSTANCE: invention can be used to obtain biological samples for research by scanning probe nanotomography (SPNT). Method of producing a biological sample for analysis by scanning probe nanotomography involves pouring the biological sample into a polymer medium. Biological sample is filled on a substrate in the form of a film of silkworm silk fibroin *Bombyx mori* with thickness of 1–100 mcm, containing 5–100 % of silk fibroin by weight.

EFFECT: invention provides a reduction in the time required for obtaining a biological sample for analysis

by the SPNT method by reducing manipulations by using an original substrate when pouring biological samples into a polymer medium; maintaining the integrity and structure of the biological sample by ensuring its adhesion during the process of pouring into the polymer medium by using an original substrate having the required margin of mechanical strength; providing a sufficient level of biocompatibility of the substrate for obtaining mammalian cell samples due to the possibility of culturing the cells on the substrate.

1 cl, 4 dwg

Изобретение относится к области нанотехнологии и может быть использовано для получения биологических образцов для исследований методом сканирующей зондовой нанотомографии (СЗНТ).

Известен способ получения биологических образцов для исследований методом СЗНТ, включающий дегидратацию образцов с последующей заливкой в пластиковой ячейке для заливки образцов в полимерную среду, представляющую собой смесь смол с дальнейшей полимеризацией до твердого состояния [Luft J H., Improvements in epoxy resin embedding methods. The Journal of biophysical and biochemical cytology, vol. 9,2 (1961): 409-14. doi:10.1083/jcb.9.2.409]. После отвердевания полимерной среды образец отделяют от ячейки и исследуют методом СЗНТ.

Недостаток этого способа заключается в том, что в процессе отвердевания образец может оседать на дно ячейки, что может приводить к повреждению образца при отделении от поверхности ячейки, а, следовательно, к нарушению его структуры. Некоторые разновидности биологических образцов, такие как микроносители, микрочастицы, суспензии, необходимо позиционировать на подложках для их концентрирования в процессе получения образца, однако известный способ не включает в себя использование такой подложки.

Для исследования биологических образцов клеток зачастую необходимо адгезировать их на поверхности посуды для культивирования клеток, а затем производить заливку в полимерную среду.

Однако в этом случае для каждой задачи необходимо подбирать посуду, которая не будет разрушаться от воздействия дегидратирующих агентов, но в то же время будет позволять осуществление всех необходимых манипуляций при культивировании и заливке в полимерную среду, а также позволять отделение залитого образца от поверхности посуды без возможности его повреждений.

Это приводит к многостадийности процесса получения биологического образца, что может привести к гибели клеток в составе биологического образца или образованию артефактов в ходе заливки в полимерную среду и получению недостоверных данных в ходе анализа.

Техническая проблема заключается в необходимости создания универсальной и механически прочной подложки для заливки биологических образцов в полимерную среду, которая может обеспечивать как правильное позиционирование биологических образцов в процессе заливки, так и адгезию биологических образцов и структур в их составе.

Технический результат, достигаемый при осуществлении изобретения, заключается в

- сокращении времени получения биологического образца для исследований методом СЗНТ за счет сокращения манипуляций путем использования оригинальной подложки при заливке биологических образцов в полимерную среду;
- сохранении целостности и структуры биологического образца за счет обеспечения его адгезии в процессе заливки в полимерную среду путем использования оригинальной подложки, обладающей необходимым запасом механической прочности;
- обеспечении достаточного уровня биосовместимости подложки для получения образцов клеток млекопитающего за счет возможности культивирования клеток на подложке.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Заливку биологического образца в полимерную среду проводят на подложке в виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* толщиной 1-100 мкм,

содержащей 5-100% фиброина шелка по массе.

Существует вариант, в котором пленка из фиброина шелка дополнительно содержит добавку в количестве до 95% по массе.

Существует вариант, в котором для получения биологического образца, содержащего
5 клетки млекопитающего, их предварительно культивируют на подложке в виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* толщиной 1-100 мкм, содержащей 5-100% фиброина шелка по массе.

Изобретение поясняется следующими фигурами.

На Фиг. 1 изображена подложка из фиброина шелка, полученная методом полива
10 водного раствора фиброина шелка на поверхности полированного тефлона.

На Фиг. 2 изображена подложка из фиброина шелка, покрытая раствором коллагена, иммобилизованная на поверхности пластика.

На Фиг. 3 представлено изображение гепатоцита, полученное методом сканирующей
15 зондовой микроскопии, адгезированного на подложке из фиброина шелка, полученное методом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), размер скана $32 \times 15 \text{ мкм}^2$, диапазон вариации высоты 40 нм, размерный отрезок 4 мкм, стрелкой указана подложка из фиброина шелка.

На Фиг. 4 представлена трехмерная СЗНТ-реконструкция гепатоцита,
20 адгезированного на подложке из фиброина шелка, $32.0 \times 15.0 \times 2.8 \text{ мкм}^3$, толщина среза 200 нм, размерный отрезок 5 мкм.

Способ получения биологического образца для исследований методом СЗНТ осуществляется следующим образом.

Заливку биологических образцов в полимерную среду производят на подложке в
25 виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* толщиной 1-100 мкм, содержащей 5-100% фиброина шелка по массе (фиг. 1). Для этого в пластиковую ячейку для заливки помещают пленку из фиброина шелка, проводят дегидратацию биологического образца и заливку в полимерную среду.

Кроме этого существует вариант, в котором пленка из фиброина шелка
30 дополнительно содержит добавку в количестве до 95% по массе. Для этого в состав пленки из фиброина шелка вводят добавку путем введения в раствор фиброина шелка, из которого получают пленку, этого вещества в сухом виде или в виде раствора и перемешивают, например, с помощью автоматической пипетки или магнитной мешалки. Затем из раствора получают пленку, которую помещают в пластиковую ячейку для
35 заливки и проводят дегидратацию биологического образца и заливку в полимерную среду. В качестве добавки могут быть использованы, например, вещества, повышающие адгезию клеток (коллаген - фиг. 2, желатин, фибронектин и др.), вещества, регулирующие скорость деградации (хитозан, поликапролактон и др.), добавки, изменяющие пористость и шероховатость пленки (микрочастицы, наночастицы и др.), различные
40 низкомолекулярные вещества (соли, оксиды и др.).

Кроме этого существует вариант, в котором для получения биологических образцов, содержащих клетки млекопитающего, их предварительно культивируют на подложке из фиброина шелка. Для этого пленку из фиброина шелка размещают на поверхности посуды для культивирования клеток или помещают в среду инкубации.

Перед выполнением исследований методом СЗНТ могут быть осуществлены
45 предварительные срезы полученного биологического образца в требуемой плоскости при помощи ультрамикротомы. Толщина срезов может лежать в диапазоне от 10 до 1000 нм. Полученные срезы и поверхность образца могут быть также исследованы с применением методов сканирующей зондовой оптической нанотомографии (как

показано, например, в RU 2680726, C1), сканирующей зондовой микроскопии, электронной и флуоресцентной оптической микроскопии.

Образец для исследования методом СЗНТ получали следующим образом.

Подложку на основе фиброина шелка получали на поверхности чашки Петри диаметром 5 см. Для этого выделяли фиброин шелка из шелковых нитей 4-0 (Моснитки, Россия). Навеску шелка из нитей массой 1 г кипятили на водяной бане в 500 мл бидистиллированной воды с добавлением 1260 мг соды в течение 40 минут. Затем промывали 3,6 л дистиллированной воды. Далее трижды кипятили в 500 мл бидистиллированной воды 30 минут, промывая 3,6 л дистиллированной воды после каждого кипячения. Очищенный фиброин шелка сушили на воздухе при комнатной температуре. Далее получали водный раствор фиброина шелка. Для этого в раствор, приготовленный из расчета 389 мг CaCl_2 , 388 мкл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и 544 мкл H_2O на 1 мл раствора, вносили навеску фиброина массой 130 мг/мл. Нагревали на водяной бане при 40°C в течение 4 часов. После чего производили диализ раствора против бидистиллированной воды, в данном примере было проведено 5 смен диализа по 30 минут. Полученный после диализа водный раствор фиброина шелка наносили на дно чашки Петри и высушивали при комнатной температуре. Высушенный фиброин шелка растворяли в муравьиной кислоте из расчета 20 мг/мл при нагревании до 40°C на водяной бане в течение 30 минут. Полученный раствор наносили на дно чашек Петри диаметром 5 см из расчета 5 мл на чашку и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре. После высыхания раствора фиброина шелка на дно чашки Петри наносили по 1 мл раствора фибронектина с концентрацией 10 мкг/мл для повышения адгезии клеток и высушивали в течение двух суток при комнатной температуре.

Таким образом, получали подложку толщиной 1 мкм для подготовки образца гепатоцитов крысы породы Wistar. В чашке Петри с подложкой проводили выделение первичной культуры гепатоцитов крысы породы Wistar. Изолированные гепатоциты инкубировали в термостате при температуре 37°C и 5% углекислого газа в течение 24 часов. Затем проводили заливку образцов в полимерную среду (эпоксидную смолу). Для этого из чашки Петри отбирали среду инкубации и производили две короткие отмывки стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. После этого в чашку Петри вносили 2,5% раствор глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере (pH=7,4) и инкубировали в течение 2 часов в темноте при +4°C и двукратно отмывали стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Затем производили дегидратацию гепатоцитов проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией по схеме:

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

Образец отмывали трехкратно 100% этиловым спиртом по 10 минут, а затем инкубировали в смеси 100% этилового спирта и эпоксидной смолы в соотношении 1:1 в течение 30 минут, после чего образец переносили в смесь 100% этилового спирта и эпоксидной смолы в соотношении 1:2 и инкубировали в течение 30 минут. Для заливки образцов использовалась эпоксидная среда (Epoxy Embedding Medium kit, Sigma-Aldrich, Cat. №45359-1EA-F). Образец заключали в эпоксидную среду, инкубировали в термостате при 45°C в течение 24 часов, после чего продолжали инкубацию в течение 72 часов при температуре 60°C. Затем образец гепатоцитов на подложке в эпоксидной смоле отделяли

от дна чашки Петри с помощью скальпеля.

После отделения залитых в эпоксидную среду образцов клеток выполнялась локализация гепатоцитов с помощью флуоресцентного микроскопа. Затем выполнялись первичные срезы образца ультрамикротомом в плоскости, перпендикулярной плоскости
 5 образца и при помощи флуоресцентной микроскопии измерялось расстояние от плоскости среза до изучаемого скаффолда. В соответствии с выполненными измерениями производилась последовательность срезов образца контролируемой толщины.

На фиг. 3 приведено изображение образца гепатоцита, полученное методом сканирующей зондовой микроскопии, стрелка указывает на подложку из фиброина
 10 шелка. Для оценки трехмерной морфологии гепатоцита, адгезированного на подложке из фиброина шелка в виде пленки была выполнена трехмерная реконструкция фрагмента клетки при помощи метода СЗНТ. Для этого было выполнено 14 последовательных срезов образца толщиной 200 нм и получено 14 последовательных СЗМ-изображений участка скаффолда размером $32 \times 16 \text{ мкм}^2$. Полученная визуализация трехмерной
 15 структуры гепатоцита показана на фиг. 4.

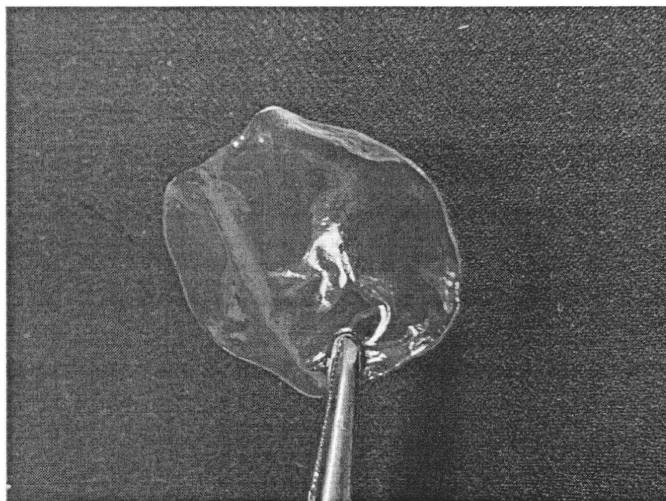
Таким образом, предлагаемый способ позволяет обеспечить правильное позиционирование биологического образца в процессе заливки и адгезию биологических структур в его составе при значительном сокращении количества манипуляций с
 20 биологическим образцом и сохранении его целостности.

(57) Формула изобретения

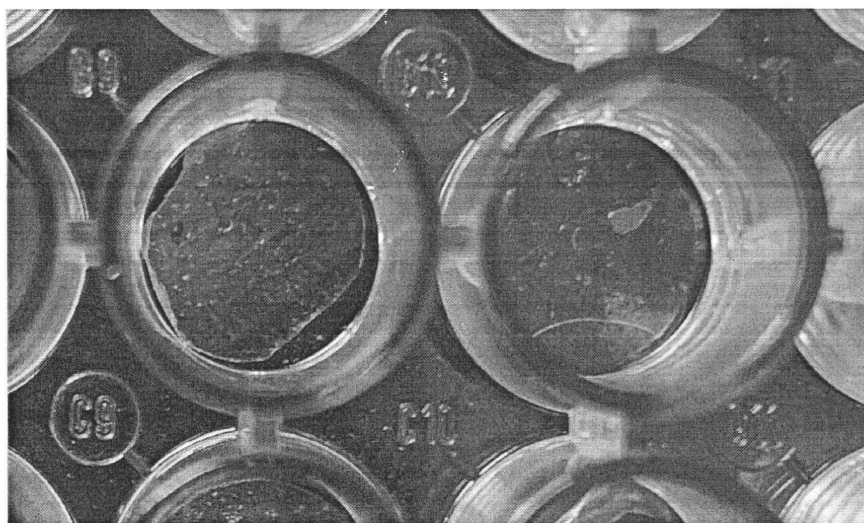
1. Способ получения биологического образца для исследования методом сканирующей зондовой нанотомографии, включающий заливку биологического образца в полимерную среду, отличающийся тем, что заливку биологического образца проводят на подложке
 25 в виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* толщиной 1-100 мкм, содержащей 5-100% фиброина шелка по массе.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для получения биологического образца, содержащего клетки млекопитающего, их предварительно культивируют на подложке в виде пленки из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori* толщиной 1-100
 30 мкм, содержащей 5-100% фиброина шелка по массе.

1

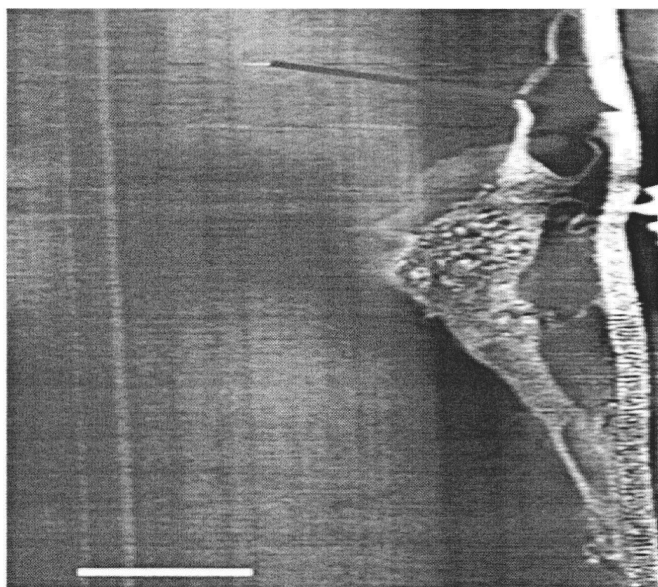


Фиг. 1

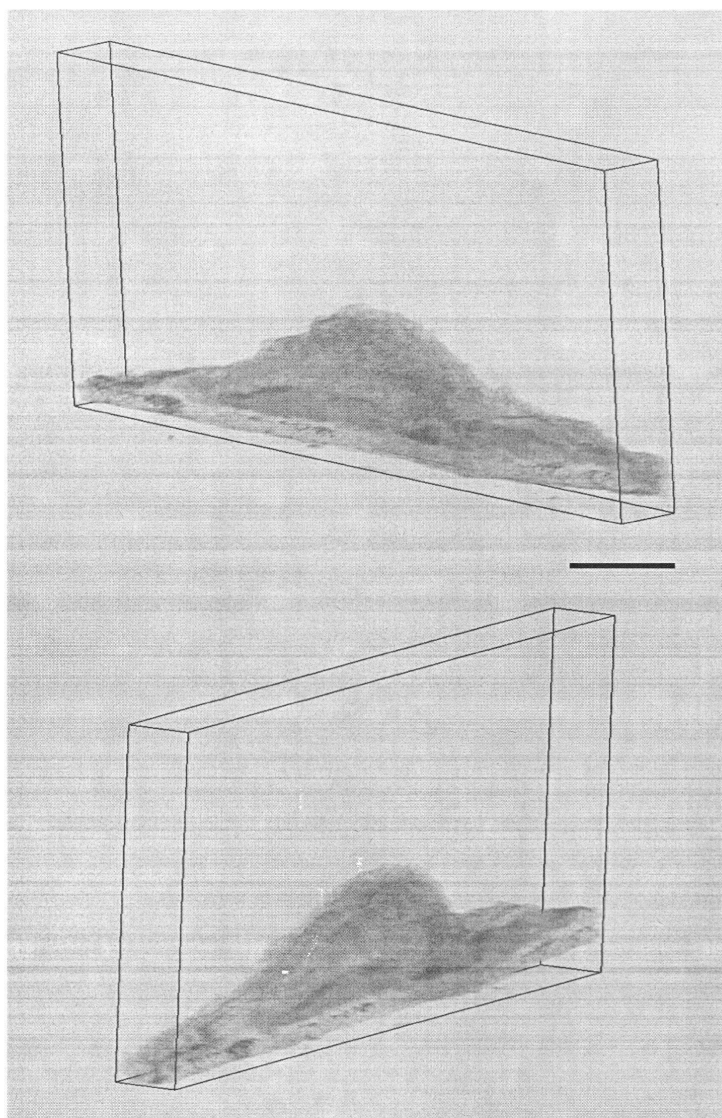


Фиг. 2

2



Фиг. 3



Фиг. 4