

ТРЕХМЕРНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ОКРАСКИ ТРИПАНОВЫМ СИНИМ

DOI: 10.17691/stm2025.17.5.04

УДК 611.132.2:004.93

Поступила 11.01.2025 г.



А.А. Бекетова, лаборант-исследователь лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;
О.В. Кирик, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;
Д.Э. Коржевский, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы; зав. отделом общей и частной морфологии
Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197022

Цель исследования — оценить возможность использовать окрашивание трипановым синим срезов миокарда человека для изучения коллагеновых волокон сердца и, в частности, их трехмерной реконструкции.

Материалы и методы. Срезы миокарда человека (n=9) окрашивали 1% водным раствором трипанового синего (Panreac, Испания) с предварительной обработкой фосфорномолибденовой кислотой (патентная заявка №RU 2024/22564). Для сравнения параллельные срезы окрашивали по аналогичной методике 2% водным раствором анилинового синего (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., Индия). Анализ полученных препаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия) и конфокального лазерного микроскопа LSM800 (Carl Zeiss AG, Германия). Трехмерную реконструкцию выполняли с помощью программного обеспечения ZEN-2012 (Carl Zeiss AG, Германия).

Результаты. Трипановый синий избирательно окрашивает коллагеновые волокна. При микроскопии проходящего света видимого диапазона наиболее четко визуализируются толстые рыхло расположенные волокна, в то время как тонкие волокна окрашиваются менее интенсивно и недоступны для детального изучения данным методом. Цитоплазма кардиомиоцитов остается неокрашенной. Анилиновый синий окрашивает тонкие волокна сравнительно более интенсивно, а также неспецифически окрашивает цитоплазму кардиомиоцитов.

Флуоресценцию коллагеновых волокон, окрашенных трипановым синим, возбуждали лазером с длиной волны 640 нм. Цитоплазма неокрашенных кардиомиоцитов автофлуоресцирует при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм. Трехмерная визуализация эндомизия показала, что он представляет собой сеть. Следовательно, стало возможно описание структур низшего порядка, входящих в состав толстых волокон. Помимо хода волокон трехмерная визуализация позволяет определить их поперечное сечение, дифференцируя его от тангенциального.

Заключение. Результаты исследования показали, что окрашивание трипановым синим срезов сердца человека является эффективным методом для выявления коллагеновых волокон, изучения их структуры на светооптическом уровне с помощью конфокальной лазерной микроскопии и создания детализированных трехмерных реконструкций. Преимущества данного метода по сравнению с другими способами трехмерной визуализации коллагеновых волокон заключаются в общедоступности реагентов, высокой избирательности окрашивания соединительнотканного матрикса, возможности получения контрастных и детализированных изображений изучаемых объектов с высоким разрешением.

Ключевые слова: трипановый синий; флуоресценция красителя; конфокальная лазерная микроскопия; коллагеновые волокна; миокард человека.

Как цитировать: Beketova A.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. Three-dimensional imaging of human myocardial collagen fibers using trypan blue staining. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2025; 17(5): 66, <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.5.04>

Для контактов: Бекетова Анастасия Алексеевна, e-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru

Three-Dimensional Imaging of Human Myocardial Collagen Fibers Using Trypan Blue Staining

A.A. Beketova, Laboratory Assistant Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology;
O.V. Kirik, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology;
D.E. Korzhevskii, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Science, Head of Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Head of the Department of General and Specific Morphology

Institute of Experimental Medicine, 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia

The aim of the study was to estimate the availability of trypan blue staining of human myocardium sections to investigate cardiac collagen fibers, in particular, their three-dimensional reconstructions.

Materials and Methods. Pretreated with phosphomolybdic acid sections of human myocardium (n=9) were stained with 1% aqueous trypan blue solution (Panreac, Spain) (patent application RU 2024/22564). Parallel sections were stained using the similar technique with 2% aqueous solution of aniline blue (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., India). The obtained preparations were analyzed using a light microscope Leica DM750 (Leica, Germany) and a confocal laser microscope LSM800 (Carl Zeiss AG, Germany). Three-dimensional reconstruction was performed using software ZEN-2012 (Carl Zeiss AG, Germany).

Results. Trypan blue appeared to stain collagen fibers selectively. Loose thick fibers were stained more intensively than thin fibers, which were not available for detailed examination with bright-field microscopy. The cytoplasm of cardiomyocytes remained unstained. Aniline blue appeared to stain thin fibers relatively more intensively, and its non-specifically stained the cytoplasm of cardiomyocytes.

Fluorescence of collagen fibers stained with trypan blue was excited with a 640 nm laser. Autofluorescence of the cytoplasm of cardiomyocytes was excited with a 488 nm laser. Three-dimensional reconstruction of endomysium showed that it was a net. Therefore, it became possible to describe the lower-order structures being the part of thick fibers. Three-dimensional reconstruction enabled to distinguish the orientation of the fibers and their cross section differentiating it from tangential one.

Conclusion. The study findings showed trypan blue staining of human cardiac section to be an effective method to reveal collagen fibers, study their structure with bright-field microscopy using confocal laser microscopy and perform detailed three-dimensional reconstructions. The advantages of the method compared with other techniques of three-dimensional imaging of collagen fibers consist in the accessibility of reagents, high staining selectivity of the connective tissue matrix, the ability to obtain contrast and detailed images of the studied objects with high resolution.

Key words: trypan blue; dye fluorescence; confocal laser microscopy; collagen fibers; human myocardium.

Введение

Коллагеновые волокна являются основным компонентом внеклеточного матрикса и определяют ряд его свойств и функций. Во-первых, коллаген — источник жесткости межклеточного вещества и органа в целом, т.е. он обеспечивает способность сопротивляться деформации [1, 2]. Это достигается за счет собственных механических свойств коллагенового волокна, обусловленных его молекулярной структурой, а также пространственной организации волокон. Во-вторых, молекулы коллагена имеют участки связывания молекул клеточной адгезии (интегринов), фибронектина и ламинина, а также гликозаминогликанов, совокупность которых регулирует жизнедеятельность клеток [3], в том числе путем осуществления процесса механотрансдукции [1, 4]. Ответы клеток на механические стимулы стали известны в основном благодаря работам, выполненным на куль-

турах клеток. Так, для культуры мезенхимальных стволовых клеток человека установлено, что сниженная механическая нагрузка на ткань обуславливает дифференцировку преимущественно в адипогенную, а не остеогенную линию [5]. Для культуры стволовых клеток поперечно-полосатых скелетных мышц показано, что придание субстрату эластических свойств, аналогичных свойствам нативного внеклеточного матрикса, позволяет сохранить способность данных клеток к самовоспроизведению, которую они обычно утрачивают *in vitro* [6]. В других работах была выявлена переориентация клеток остеосаркомы и активных фибрилл в цитоплазме относительно направления циклической нагрузки, частоты этой нагрузки и эластических свойств матрикса [7].

Ответ на механические сигналы не ограничивается реакциями на клеточном уровне и в конечном итоге приводит к изменению окружающего клетки матрикса — его ремоделированию. Данный процесс

наиболее активно изучается в контексте патологических состояний миокарда. Установлено, что увеличение преднагрузки на правый желудочек обуславливает изменение метаболизма коллагена в сердце с преобладанием его синтеза, что способствует увеличению массы миокарда за счет соединительнотканного компонента [8]. Показано, что существенное изменение внутрисердечной гемодинамики, развивающееся в результате атрезии трехстворчатого клапана, вызывает утолщение коллагеновых волокон разных уровней организации [9]. Утолщению подвергаются как волокна, окружающие сосуды и пучки кардиомиоцитов, так и волокна, образующие поперечные мостики между коллагеновыми чехлами отдельных кардиомиоцитов [9]. Важным направлением в исследовании волокон соединительной ткани является поиск терапевтически значимых молекулярных мишеней, воздействие на которые предотвращает или уменьшает фиброз [10, 11].

На сегодняшний день исследователям коллагенового матрикса доступен ряд способов его визуализации. Во-первых, это рутинные методы окраски. Так, окраска по Массону применяется для окрашивания коллагеновых волокон анилиновым синим ортохроматически. Такой подход эффективен для оценки площади фиброза [12]. Анилиновый синий также может использоваться в качестве монокрасителя [13]. Данная окраска предназначена для микроскопии проходящего света видимого диапазона, однако не подходит для конфокальной лазерной микроскопии, позволяющей создавать трехмерные реконструкции срезов. Аналогичным недостатком обладает и рутинный метод окрашивания пикрофуксином по Ван-Гизону: данные о том, что срезы, окрашенные таким способом, пригодны для изучения с помощью конфокального микроскопа, отсутствуют. Вторым методом является окрашивание пикросириусом красным [14], который, в отличие от анилинового синего, способен к флуоресценции [15]. Однако в работе [16], где, в частности, осуществляли трехмерную визуализацию коллагеновых волокон с использованием данного красителя, было показано, что его сродство к соединительной ткани существенно зависит от типа фиксации. В-третьих, метод генерации второй гармоники [17]. Он позволяет визуализировать расположение коллагеновых волокон в объеме образца и проводить вычисления для построения пространственных моделей соединительной ткани [12, 18]. И хотя данный метод разработан на базе мультифотонных микроскопов, он доступен не для всех представителей данного класса оптических приборов, что накладывает аппаратное ограничение на методику. В-четвертых, предлагается использование сканирующей электронной микроскопии, однако получение трехмерных изображений волокон межклеточного вещества требует предварительной процедуры децеллюляризации матрикса [9], что делает невозможным изучение взаимодействий клеток с матриксом.

Указанные выше недостатки существующих методик обуславливают поиск других решений. Альтернативой может служить окрашивание трипановым синим. Данный краситель до настоящего времени использовался для оценки выживаемости клеток в различных условиях за счет своей способности проникать исключительно в погибшие клетки [19], а также в хирургии органа зрения для визуализации структур глаза [20]. Кроме того, трипановый синий применяется для витального окрашивания соединительной ткани [21]. Поскольку данный краситель способен флуоресцировать, он представляется перспективным для окрашивания срезов с целью их дальнейшего изучения методом конфокальной лазерной микроскопии.

Цель исследования — оценить возможность использования окрашивания трипановым синим срезов миокарда человека для изучения коллагеновых волокон сердца и, в частности, их трехмерной реконструкции.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили срезы миокарда человека (n=9). Блоки фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов получены из архива гистологического материала отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины (архив создан на основании решения локального этического комитета, заключение №58-9/1-684 от 11.12.2009 г.). Были изготовлены срезы толщиной 5 мкм (n=18). Перед окрашиванием со срезов удаляли парафин с помощью ксилола и регидратировали в этаноле нисходящей концентрации.

Окрашивание трипановым синим (Panreac, Испания) проводили по следующей методике (патентная заявка №RU 2024/22564): на срезы наносили 1% водный раствор фосфорномолибденовой кислоты на 15 мин при комнатной температуре, который впоследствии удаляли. Далее, не промывая препараты, наносили 1% водный раствор трипанового синего на 5 мин при тех же условиях. После этого краситель со срезов удаляли и промывали их в воде. Окрашивание 2% водным раствором анилинового синего (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., Индия) выполняли по аналогичной методике. После окрашивания все срезы дегидратировали в изопропанол и ксилоле и заключали в перманентную среду Bio Mount HM (Bio-Optica, Италия).

Снимки препаратов получали с помощью светового микроскопа Leica DM750 и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica Microsystems, Германия; объектив Plan 10×/0.22), а также конфокального микроскопа LSM800 (Carl Zeiss AG, Германия; объектив Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27). Трехмерную реконструкцию осуществляли с использованием программного обеспечения ZEN-2012 (Carl Zeiss AG, Германия). Толщину волокон измеряли в программе

ImageJ с помощью встроенного инструмента «прямая линия» (straight) и функции «измерить» (measure). Статистическую обработку данных выполняли в Microsoft Excel (Microsoft, США).

Результаты

Окрашивание трипановым синим дает различную по контрастности картину при микроскопии проходящего света видимого диапазона и при конфокальной микроскопии (рис. 1, б, в). Визуально трипановый синий высокоизбирательно окрашивает волокна соединительной ткани. Интенсивность видимого окрашивания зависит от времени приготовления фосфорномолибденовой кислоты и красителя. Наилучший результат окрашивания достигается при использовании непосредственно перед окрашиванием. Краситель, приготовленный 3 мес назад, обладает сниженным сродством к соединительной ткани, что проявляется ее бледной окраской. Фосфорномолибденовая кислота в водном растворе даже при хранении в непрозрачной таре не обеспечивает высокой селективности окрашивания уже через неделю.

При микроскопии проходящего света видимого диапазона волокна разной толщины визуализированы неодинаково. Крупные коллагеновые волокна, имеющие в среднем толщину $7,583 \pm 3,426$ мкм, окрашиваются интенсивно. Тонкие, лежащие отдельно волокна, имеющие толщину в среднем $1,589 \pm 0,421$ мкм, окрашиваются слабо, а волокна, имеющие диаметр в среднем $0,557 \pm 0,174$ мкм, почти не окрашиваются. Наименьший выявленный диаметр волокна составил 0,279 мкм. Прослойки соединительной ткани, окружающие каждый кардиомиоцит (эндомизий), также окрашиваются, но при малом увеличении объектива рассмотреть их и тем более выявить волокна, их составляющие, не представляется возможным. Анилиновым синим данный тип волокон окрашивается сравнительно более интенсивно (рис. 1, а). Однако следует отметить, что анилиновый синий обладает некоторым, хотя и малым, сродством к цитоплазме кардиомиоцитов, окрашивая ее в серый цвет, что не характерно для трипанового синего.

Флуоресценция коллагеновых волокон, окрашенных трипановым синим, наблюдается при возбуждении лазером с длиной волны 640 нм (рис. 2). Цитоплазма неокрашенных кардиомиоцитов

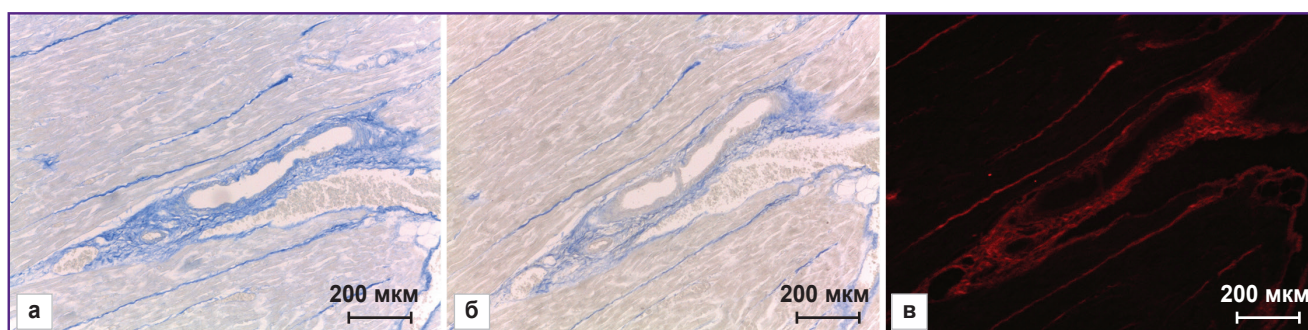


Рис. 1. Соединительная ткань миокарда человека:

а — окраска анилиновым синим, параллельный к б и в срез; б, в — окраска трипановым синим, один и тот же срез; а, б — микроскопия проходящего света видимого диапазона; в — конфокальная лазерная микроскопия; об. 10×

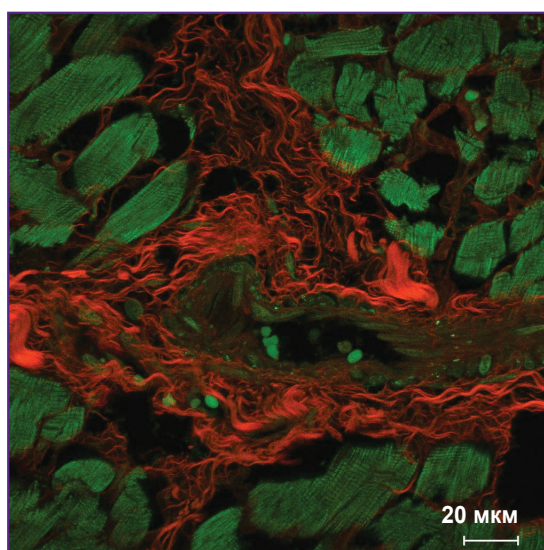


Рис. 2. Миокард человека при флуоресцентной окраске трипановым синим

Ортогональная проекция 18 оптических срезов толщиной 0,33 мкм. Красный — флуоресценция трипанового синего, связавшегося с коллагеновыми волокнами; зеленый — автофлуоресценция цитоплазмы кардиомиоцитов, эритроцитов и ядер гладкомышечных клеток мышечной оболочки сосуда; об. 63×

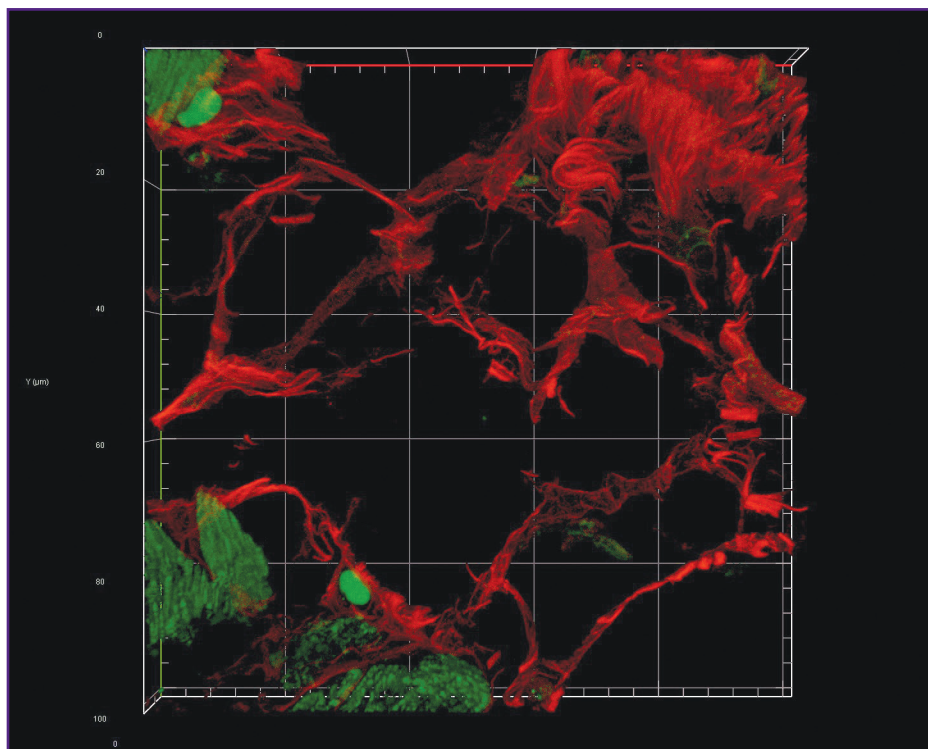


Рис. 3. Трехмерная реконструкция волокон соединительной ткани миокарда человека при окраске трипановым синим в пространстве по 19 неперекрывающимся оптическим срезам

Размеры по оси X — 100 мкм, по Y — 100 мкм, по Z — 6 мкм. Красный — флуоресценция трипанового синего, связавшегося с коллагеновыми волокнами; зеленый — автофлуоресценция цитоплазмы кардиомиоцитов; об. 63×

флуоресцирует при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм. Исходное изображение обладает высокой контрастностью и, следовательно, не требует тонкой настройки при обработке, что позволяет ускорить и упростить процесс анализа изображений с помощью программного обеспечения (ImageJ). Причем по сравнению с изображениями, полученными в ходе микроскопии проходящего света видимого диапазона, на изображениях, сделанных при помощи конфокального микроскопа, программа более избирательно и точно определяет коллагеновые волокна, включая самые тонкие, которые не были контрастно выявлены на светооптическом уровне. Интенсивность флуоресцентного сигнала от волокон диаметром более 0,4 мкм сопоставима с интенсивностью сигнала от волокон диаметром $4,0 \pm 1,0$ мкм. Наименьший выявленный диаметр волокна составил 0,201 мкм. Трехмерная визуализация эндомизия (рис. 3) показала, что он представляет собой сеть, элементы которой не могут быть дифференцированы как отдельные структуры. Это свидетельствует о том, что размеры элементов меньше разрешающей способности конфокального микроскопа. Для толстых волокон стало возможным дать описание структур низшего порядка, входящих в их состав (см. рис. 2).

Выявлено, что между близлежащими волокнами диаметром более 1,5 мкм располагаются волокна толщиной в среднем $0,315 \pm 0,040$ мкм, идущие косо-поперечно по отношению к более толстым. Помимо хода волокон трехмерная визуализация позволяет определить поперечное сечение коллагеновых волокон: оно имеет неправильную, близкую к овальной, форму. С учетом полного пространственного положения волокна становится очевидным, что данную форму имеет именно поперечное, а не тангенциальное сечение волокон, как можно было бы предположить, основываясь на одном оптическом срезе.

Обсуждение

Трипановый синий является общедоступным реагентом, используемым в медико-биологических исследованиях. Свое применение он находит в первую очередь в экспериментах, в которых необходимо оценить жизнеспособность клеток: как в культуре [22, 23], так и в многоклеточном организме на различных стадиях смоделированного патологического процесса [24]. Во-вторых, трипановый синий используют в хирургии глаза в целях визуализации физиологических и патологических структур, а именно внутренней

глиальной пограничной мембраны и эпиретинальной мембраны [25], передней части капсулы хрусталика [26], а также для выявления разрывов сетчатки [27] и контрастирования трабекулярной сети при микроинвазивной хирургии глаукомы [28].

В указанных выше цитологических методах, а также при витальном окрашивании соединительной ткани трипановым синим [21, 29] используется способность красителя окрашивать ткани как ортохроматически, так и с проявлением флуоресценции. Причем последнее свойство открывает возможности для применения широкого спектра методов флуоресцентной микроскопии, включая собственно флуоресцентную микроскопию, конфокальную лазерную микроскопию, конфокальную лазерную микроскопию повышенного разрешения, мультифотонную микроскопию и микроскопию сверхвысокого разрешения. Все перечисленные методы позволяют получать детализированные изображения с высоким разрешением, а современные программы обработки — выполнять трехмерную реконструкцию срезов.

Применение фосфорномолибденовой кислоты позволило нам получить селективно окрашенные соединительнотканые волокна. Данный прием используется в многоцветных окрасках по Массону [30], по Маллори [31], по Гейденгайну [32], по Слинченко [33], а также при окраске пикросириусом красным [15]. Как и анилиновый синий, трипановый синий относят к анионным красителям, имеющим основные группы, в частности аминогруппы [34]. В свою очередь фосфорномолибденовая кислота является поливалентным анионом и связывается с положительно заряженными структурами, препятствуя прямому действию анионных красителей. Связывание фосфорномолибденовой кислоты с различными структурами неодинаково: наиболее интенсивно она связывается с цитоплазмой клеток и менее интенсивно — с соединительноткаными волокнами, оставляя доступной для связывания с молекулой трипанового синего положительно заряженную аминокислоту гистидин [35]. Таким образом, предварительная обработка ткани фосфорномолибденовой кислотой обеспечивает связывание красителя только с коллагеновыми волокнами.

Сравнение результатов флуоресценции при окрашивании трипановым синим по предложенной нами методике с результатами при окрашивании пикросириусом красным, представленными в литературе [15, 36], показало, что трипановый синий позволяет получить высококонтрастные изображения, сопоставимые при окрашивании пикросириусом красным с предварительной обработкой фосфорномолибденовой кислотой. При этом нет существенных различий ни в размерах наименьших выявляемых волокон, ни в высокой контрастности выявляемых структур по отношению к фону. В случае окрашивания трипановым синим флуоресценция коллагеновых волокон характеризуется длиной волны, отличной от длины

волны флуоресценции цитоплазмы кардиомиоцитов, что позволяет получать эти сигналы изолированно. Благодаря данному обстоятельству такую окраску можно использовать как для избирательной визуализации коллагеновых волокон, так и для совизуализации клеток и соединительнотканного матрикса, их окружающих, причем без потери детализации структуры волокон.

Трехмерная реконструкция срезов, окрашенных пикросириусом красным, была выполнена в одной работе, где Н.Ж. Kim и соавт. [16] представили полный протокол изготовления препарата почки мыши, начиная с фиксации. Опубликованные авторами иллюстрации свидетельствуют о недостаточной специфичности связывания красителя с элементами внеклеточного матрикса почки, что особенно заметно при сравнении с результатами иммуногистохимической реакции на коллаген I типа на том же материале. При окрашивании трипановым синим флуоресценция детектируется исключительно от волокон соединительной ткани, морфологические характеристики которых соответствуют коллагеновым волокнам [37].

Трехмерная визуализация коллагеновых волокон методом генерации второй гармоники является эффективным способом изучения коллагена. Преимущества данного метода заключаются, во-первых, в возможности изучать как нативные, так и фиксированные и окрашенные ткани, а во-вторых, в получении изображений высокого разрешения [38]. Этот метод в большей степени применим к коллагену I типа, который имеет высокоупорядоченную структуру и способен генерировать вторую гармонику. Сигнал второй гармоники от коллагенов III, IV и V типов может быть сниженным по интенсивности или вовсе отсутствовать. В таком случае судить о содержании этих коллагенов можно либо по суммарному сигналу от образца, либо после окрашивания, например пикросириусом красным [17, 39]. Трипановый синий в свою очередь связывается как с коллагеновыми волокнами соединительной ткани, представленными преимущественно коллагеном I типа, так и с базальными мембранами клеток, представленными коллагеном IV типа. Следует отметить, что микроскопия генерации второй гармоники обладает высокой информативностью, однако ее реализация требует дорогостоящего и высокоточного оборудования, установка которого является сложной технической задачей. Это снижает доступность методики [40].

Ограничения исследования. Несмотря на указанные достоинства предлагаемой нами методики, следует обратить внимание и на ограничения доказательной базы проведенного исследования, которые связаны с отсутствием параллельного представления полученных данных с использованием дополнительных референсных методов, таких как многофотонная микроскопия в режиме генерации второй гармоники и иммуногистохимическое исследование на коллагены I и III типа.

Заключение

Результаты исследования показали, что окрашивание трипановым синим позволяет изучать структуру коллагеновых волокон сердца человека на светооптическом уровне с помощью флуоресцентной микроскопии, а также создавать детализированные трехмерные реконструкции данных волокон. Представленный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами трехмерной визуализации коллагеновых волокон, а именно: общедоступностью реагентов, высокой избирательностью окрашивания, возможностью получения контрастных и детализированных изображений изучаемых объектов с высоким разрешением.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2024-0015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Humphrey J.D., Dufresne E.R., Schwartz M.A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(12): 802–812, <https://doi.org/10.1038/nrm3896>.
- Smoluk L., Protsenko Y. Viscoelastic properties of the papillary muscle: experimental and theoretical study. *Acta Bioeng Biomech* 2012; 14(4): 37–44.
- Orgel J.P., San Antonio J.D., Antipova O. Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connect Tissue Res* 2011; 52(1): 2–17, <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.511353>.
- Potekhina Y.P., Filatova A.I., Tregubova E.S., Mokhov D.E. Mechanosensitivity of cells and its role in the regulation of physiological functions and the implementation of physiotherapeutic effects (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 12(4): 77–89, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.4.10>.
- Meyers V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T., McDonald J.M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J Bone Miner Res* 2005; 20(10): 1858–1866, <https://doi.org/10.1359/JBMR.050611>.
- Gilbert P.M., Havenstrite K.L., Magnusson K.E., Sacco A., Leonardi N.A., Kraft P., Nguyen N.K., Thrun S., Lutolf M.P., Blau H.M. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 2010; 329(5995): 1078–1081, <https://doi.org/10.1126/science.1191035>.
- Tondon A., Kaunas R. The direction of stretch-induced cell and stress fiber orientation depends on collagen matrix stress. *PLoS One* 2014; 9(2): e89592, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089592>.
- Bishop J.E., Rhodes S., Laurent G.J., Low R.B., Stirewalt W.S. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced

by pressure overload. *Cardiovasc Res* 1994; 28(10): 1581–1585, <https://doi.org/10.1093/cvr/28.10.1581>.

9. Sanchez-Quintana D., Climent V., Ho S.Y., Anderson R.H. Myoarchitecture and connective tissue in hearts with tricuspid atresia. *Heart* 1999; 81(2): 182–191, <https://doi.org/10.1136/hrt.81.2.182>.

10. Mishra P.K., Givvimani S., Chavali V., Tyagi S.C. Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(12): 2271–2276, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.004>.

11. González A., López B., Ravassa S., San José G., Díez J. The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross-linking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019; 1866(9): 1421–1432, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.06.001>.

12. Perestrelo A.R., Silva A.C., Oliver-De La Cruz J., Martino F., Horváth V., Caluori G., Polanský O., Vinarský V., Azzato G., de Marco G., Žampachová V., Skládál P., Pagliari S., Rainer A., Pinto-do-Ó P., Caravella A., Koci K., Nascimento D.S., Forte G. Multiscale analysis of extracellular matrix remodeling in the failing heart. *Circ Res* 2021; 128(1): 24–38, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317685>.

13. Nikitina I.A., Razenkova V.A., Fedorova E.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. Technology of combined identification of macrophages and collagen fibers in liver samples. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(3): 24–29, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.3.03>.

14. Junqueira L.C., Bignolas G., Brentani R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11(4): 447–455, <https://doi.org/10.1007/BF01002772>.

15. Dolber P.C., Spach M.S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 1993; 41(3): 465–469, <https://doi.org/10.1177/41.3.7679127>.

16. Kim H.J., Kim J., Choi J., Sun W. Chemical fluorescence-based dye staining for 3-dimensional histopathology analysis. *Anim Cells Syst (Seoul)* 2022; 26(2): 45–51, <https://doi.org/10.1080/19768354.2022.2049641>.

17. Cox G., Kable E., Jones A., Fraser I., Manconi F., Gorrell M.D. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *J Struct Biol* 2003; 141(1): 53–62, [https://doi.org/10.1016/s1047-8477\(02\)00576-2](https://doi.org/10.1016/s1047-8477(02)00576-2).

18. Wülfers E.M., Greiner J., Giese M., Madl J., Kroll J., Stiller B., Kohl P., Rog-Zielinska E.A., Fürmish H.E. Quantitative collagen assessment in right ventricular myectomies from patients with tetralogy of Fallot. *Europace* 2021; 23(23 Suppl 1): i38–i47, <https://doi.org/10.1093/europace/eaab389>.

19. Zanatta G., Steffens D., Braghirolli D.I., Fernandes R.A., Netto C.A., Pranke P. Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45(2): 125–130, <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500163>.

20. Dada V.K., Sharma N., Sudan R., Sethi H., Dada T., Pangtey M.S. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: comparative clinical study. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30(2): 326–333, [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(03\)00573-X](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(03)00573-X).

21. King L.S. Vital staining of the connective tissues.

- J Exp Med* 1938; 68(1): 63–72, <https://doi.org/10.1084/jem.68.1.63>.
22. Srivastava V.K., Singh R.K., Malhotra S.N., Singh A. To evaluate cytotoxicity of resin-based restorative materials on human lymphocytes by trypan blue exclusion test: an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2010; 3(3): 147–152, <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1070>.
23. Hammoudeh S.M., Hammoudeh A.M., Hamoudi R. High-throughput quantification of the effect of DMSO on the viability of lung and breast cancer cells using an easy-to-use spectrophotometric trypan blue-based assay. *Histochem Cell Biol* 2019; 152(1): 75–84, <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01775-7>.
24. Procel N., Camacho K., Verboven E., Baroja I., Guerrero P.A., Hillen H., Estrella-García C., Vizcaíno-Rodríguez N., Sansores-García L., Santamaría-Naranjo A., Romero-Carvajal A., Caicedo A., Halder G., Moya I.M. In vivo tracking and 3D mapping of cell death in regeneration and cancer using trypan blue. *Cells* 2024; 13(16): 1379, <https://doi.org/10.3390/cells13161379>.
25. Teba F.A., Mohr A., Eckardt C., Wong D., Kusaka S., Joondeph B.C., Feron E.J., Stalmans P., Van Overdam K., Melles G.R. Trypan blue staining in vitreoretinal surgery. *Ophthalmology* 2003; 110(12): 2409–2412, [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(03\)00716-4](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(03)00716-4).
26. Fridman G., Rizzuti A.E., Liao J., Rolain M., Deutsch J.A., Kaufman S.C. Trypan blue as a surgical adjunct in pediatric cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2016; 42(12): 1774–1778, <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2016.10.012>.
27. Jackson T.L., Kwan A.S., Laidlaw A.H., Aylward W. Identification of retinal breaks using subretinal trypan blue injection. *Ophthalmology* 2007; 114(3): 587–590, <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.05.079>.
28. Parker J.S., Parker A., Parker J.S. Trypan blue-assisted microinvasive glaucoma surgery. *J Cataract Refract Surg* 2017; 43(12): 1613, <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2017.10.031>.
29. Adams C.W., Bayliss O.B. Permeability of inner and outer layers of rat and rabbit aortic wall. Two new microscopic test with trypan blue. *Atherosclerosis* 1977; 26(4): 419–426, [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(77\)90112-5](https://doi.org/10.1016/0021-9150(77)90112-5).
30. Masson P. Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique. *J Tech Methods* 1929; 12: 75–90.
31. Mallory F.B. A contribution to staining methods: I. A differential stain for connective-tissue fibrillae and reticulum. II. Chloride of iron haematoxylin for nuclei and fibrin. III. Phosphotungstic acid haematoxylin for neuroglia fibres. *J Exp Med* 1900; 5(1): 15–20, <https://doi.org/10.1084/jem.5.1.15>.
32. Heidenhain M. Über die Mallorysche Bindegewebsfärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. *Z Wiss Mikrosk* 1915; 32: 361–372.
33. Слинченко Н.З. Быстрая и прочная окраска соединительной ткани, гиалина, фибрина и фибриноидов. *Архив патологии* 1964; 26: 84.
- Slinchenko N.Z. Rapid and stable staining of connective tissue, hyalin, fibrin and fibrinoids. *Архив патологии* 1964; 26: 84.
34. Puchtler H., Isler H. The effect of phosphomolybdic acid on the stainability of connective tissues by various dyes. *J Histochem Cytochem* 1958; 6(4): 265–270, <https://doi.org/10.1177/6.4.265>.
35. Everett M.M., Miller W.A. The role of phosphotungstic and phosphomolybdic acids in connective tissue staining. I. Histochemical studies. *Histochem J* 1974; 6(1): 25–34, <https://doi.org/10.1007/BF01011535>.
36. Weis S.M., Emery J.L., Becker K.D., McBride D.J. Jr, Omens J.H., McCulloch A.D. Myocardial mechanics and collagen structure in the osteogenesis imperfecta murine (oim). *Circ Res* 2000; 87(8): 663–669, <https://doi.org/10.1161/01.res.87.8.663>.
37. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* 2002; 65(2): 109–126, <https://doi.org/10.1679/aohc.65.109>.
38. Bancelin S., Aimé C., Gusachenko I., Kowalczyk L., Latour G., Coradin T., Schanne-Klein M.C. Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals. *Nat Commun* 2014; 5: 4920, <https://doi.org/10.1038/ncomms5920>.
39. Ajeti V., Nadiarykh O., Ponik S.M., Keely P.J., Eliceiri K.W., Campagnola P.J. Structural changes in mixed Col I/Col V collagen gels probed by SHG microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer. *Biomed Opt Express* 2011; 2(8): 2307–2316, <https://doi.org/10.1364/BOE.2.002307>.
40. Cicchi R., Pavone F.S. Probing collagen organization: practical guide for second-harmonic generation (SHG) imaging. *Methods Mol Biol* 2017; 1627: 409–425, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_27.