



БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2026. Т. 26, вып. 1. С. 45–52
Izvestiya of Saratov University. Physics, 2026, vol. 26, iss. 1, pp. 45–52
<https://fizika.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2026-26-1-45-52>, EDN: GIDNCY

Научная статья
УДК 577.3:535.8:535.012:53.06

Измерение коэффициента диффузии флуоресцентного красителя в тканях головного мозга мыши методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания

А. И. Дубровский[✉], А. В. Дмитренко, И. В. Федосов, О. В. Семячкина-Глушковская,
С. Б. Вениг

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Дубровский Александр Ильич, аспирант кафедры оптики и биофотоники Института физики, raskalkamal@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5897-9229>, AuthorID: 1091500

Дмитренко Александр Владимирович, магистрант кафедры физиологии человека и животных биоогического факультета, admitrenko2001@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9906-196X>

Федосов Иван Владленович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники Института физики, fedosov_optics@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3619-245X>, AuthorID: 142277

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета, glushkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, AuthorID: 667773

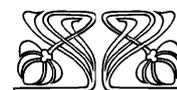
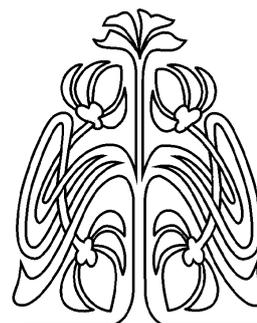
Вениг Сергей Борисович, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой материаловедения, технологии и управления качеством Института физики, Sergey.Venig@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4759-5828>, AuthorID: 287170

Аннотация. Диффузионный перенос вещества в тканях головного мозга до сих пор не изучен полностью и представляет большой интерес для современных исследователей в областях биофизики и биомедицины. Процессы диффузии и переноса вещества в тканях головного мозга связаны со свойствами межклеточного пространства центральной нервной системы. Целью данной работы явилась разработка метода измерения коэффициента диффузии, $\text{мкм}^2/\text{с}$, в тканях головного мозга лабораторных мышей *ex vivo* без использования фиксирующих агентов. Проиллюстрирована возможность использования метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания на основе мультифотонной микроскопии для анализа подвижности молекул флуоресцентного красителя в тканях головного мозга мышей. Представлены результаты экспериментального исследования динамики восстановления флуоресценции в срезе головного мозга мышей. Продемонстрирована методика составления карты молекулярной диффузии ткани головного мозга лабораторной мыши *ex vivo* на основе мультифотонной микроскопии с возможностью её применения при разнообразном положении в слоях образца в трёхмерном пространстве.

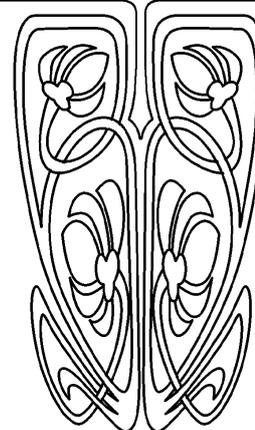
Ключевые слова: диффузия, восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания, мультифотонная микроскопия

Благодарности: Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-75-30001, <https://rscf.ru/project/23-75-30001/>).

Для цитирования: Дубровский А. И., Дмитренко А. В., Федосов И. В., Семячкина-Глушковская О. В., Вениг С. Б. Измерение коэффициента диффузии флуоресцентного красителя в тканях головного мозга мыши методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания //



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2026. Т. 26, вып. 1. С. 45–52. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2026-26-1-45-52>, EDN: GIDNCY

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Fuorescent dye diffusion coefficient measurement in murine brain tissues using the method of fluorescence recovery after photobleaching

A. I. Dubrovsky[✉], A. V. Dmitrenko, I. V. Fedosov, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, S. B. Venig

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Alexander I. Dubrovsky, paskalkamal@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5897-9229>, AuthorID: 1091500

Alexander V. Dmitrenko, admitrenko2001@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9906-196X>

Ivan V. Fedosov, fedosov_optics@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3619-245X>, AuthorID: 142277

Oxana V. Semyachkina-Glushkovskaya, glushkovskaya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, AuthorID: 667773

Sergey B. Venig, Sergey.Venig@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4759-5828>, AuthorID: 287170

Abstract. Background and Objectives: The molecular transport in the brain tissue is yet to be fully studied and presents great interest to the researchers in the fields of biophysics and biomedicine. Diffusion and molecular transport processes in brain tissues are defined by the properties of the intercellular space of the central nervous system. The object of this work is to develop a method for *ex vivo* quantitative measurements of diffusion in the brain tissues of laboratory mice. **Materials and Methods:** Multiphoton microscopy-based fluorescence recovery after photobleaching was applied in the analysis of fluorescent dye molecular mobility dynamics in mouse brain tissue. **Results:** The results of the fluorescence recovery dynamics analysis in an *ex vivo* slab of the mouse brain have been used for molecular diffusion mapping in a layer of brain tissues of a laboratory mouse. Diffusion coefficients in several sections of the layer of brain tissues have been calculated based on a simplified diffusion model and fluorescence recovery after photobleaching data. **Conclusion:** Fluorescence recovery after photobleaching with multiphoton microscopy are applicable in the creation of the molecular diffusion map in the brain tissue of a laboratory mouse.

Keywords: diffusion, fluorescence recovery after photobleaching, multiphoton microscopy

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 23-75-30001, <https://rscf.ru/project/23-75-30001/>).

For citation: Dubrovsky A. I., Dmitrenko A. V., Fedosov I. V., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Venig S. B. Fluorescent dye diffusion coefficient measurement in murine brain tissues using the method of fluorescence recovery after photobleaching. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2026, vol. 26, iss. 1, pp. 45–52 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2026-26-1-45-52>, EDN: GIDNCY

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Процессы переноса вещества в тканях головного мозга, связанные с ними явления [1–3] и полноценное представление о механизме и скорости диффузии вещества в межклеточном пространстве тканей головного мозга представляет большой интерес в области современных биомедицинских и биофизических исследований. Знание эффективных коэффициентов диффузии и диффузионных свойств также играет важную роль для исследований в области доставки сложных молекул в центральную нервную систему [4]. Измерение эффективного коэффициента диффузии в тканях головного мозга позволяет рассчитать распределение вещества в головном мозге, например, нейротрансмиттеров и нейромодуляторов [5].

Одним из наиболее подходящих методов для изучения (измерения) свойств (характеристик) биологических тканей является мультифотонная микроскопия. Мультифотонная микроскопия применяется в биомедицинских исследованиях [6–8]

для получения количественных и качественных характеристик биоткани, позволяет проводить визуализацию глубоких слоёв интактных образцов сильно рассеивающих тканей на глубине от 200 мкм до 2 мм (в зависимости от ткани), а также для создания трёхмерных моделей структур тканей за счёт визуализации последовательного набора тонких слоёв образца [6, 8]. Данный метод широко применяется для исследования головного мозга [1, 3, 9]. Мультифотонная микроскопия может быть использована совместно с методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для получения численных данных в рамках исследования свойств и параметров биологических образцов.

Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) является одной из разновидностей методов флуоресцентной микроскопии, применяемых в биомедицинских исследованиях для проведения количественных измерений. Метод FRAP основан на использовании эффекта фото-



обесцвечивания [10–13]. FRAP также относится к одним из самых распространённых методов для изучения подвижности молекул на клеточном и тканевом уровне, измерения собственной или молекулярной диффузии (или коэффициента диффузии в изотропном случае) растворённых веществ в биологических тканях [14]. Комбинация мультифотонной микроскопии и метода FRAP находит применение в современных исследованиях молекулярной диффузии [15, 16], в том числе связанных с молекулярной диффузией в биологических тканях волосковых клеток [17] и головного мозга [18].

Представляет интерес исследование возможности применения простого сочетания методик FRAP и мультифотонной микроскопии без использования микроинъекторов, светового листа, измерения поляризации флуоресценции, отслеживания траекторий движения наночастиц, наноструктур и квантовых точек [18] для составления двухмерной и трёхмерной карт молекулярной диффузии *ex vivo* тканей головного мозга лабораторных мышей на основе упрощённой модели диффузии в биологических тканях.

Цель данной работы заключается в разработке простого в реализации и минимального с точки зрения воздействия на исследуемый образец метода для измерения и составления двухмерной и трёхмерной карты значений эффективного коэффициента диффузии в *ex vivo* тканях головного мозга лабораторных мышей с возможностью последующей адаптации данного метода для проведения измерений *in vivo*. Основной задачей является получение численной информации о диффузии в слоях головного мозга *ex vivo* в виде карты коэффициента диффузии.

1. Материалы и методы

Для проведения эксперимента использовались срезы тканей головного мозга 6-месячных самцов белых BALB/c мышей. Экспериментальные животные были получены в питомнике «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (п.г.т. Андреевка, городской округ Солнечногорск, Московская область, Россия) и содержались в виварии научного медицинского центра ФГБОУ ВО «СГУ имени Н. Г. Чернышевского» в контролируемых условиях: температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность 55% и естественный световой режим (12/12 ч, свет/темнота). При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества

2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований. Период адаптации животных к условиям содержания в виварии составлял не менее 10 дней. Протокол эксперимента был утвержден локальной этической комиссией.

Осуществлялся коронарный срез для получения образца в виде сегмента головного мозга, включающего кору и подкорковые зоны толщиной 3 мм. Образец погружался в водный раствор 2%-ного флуоресцентного красителя декстран флуоресцеин изотиоцианата (70 кДа, Sigma-Aldrich, USA), помещённого в чашку Петри. По прохождении 15 мин образец погружался во вторую чашку Петри с физиологическим раствором. Покровное стекло располагалось на образце, полностью закрывая его. Чашка Петри с образцом располагалась на моторизированном микроскопном столике под объективом мультифотонного микроскопа Nikon A1R MP (Nikon Corp., Tokyo, Japan). В оптической системе микроскопа использовался объектив Nikon Plan Apo $\lambda 20\times/0.75$ (Nikon Corp., Tokyo, Japan) с 20-кратным увеличением и числовой апертурой 0.75.

Во время визуализации образца микроскоп сканировал 14 слоёв в образце с шагом 1.15 мкм. Источником излучения служил титан-сапфировый перестраиваемый лазер InSight X3 (Spectra-Physics, MKS Inc., USA), настроенный на длину волны излучения 970 нм. Точечное сканирование образца для визуализации осуществлялось в плоскости, параллельной плоскости среза, в области гипоталамуса головного мозга. Разрешение изображения было равно 1.22 мкм на пиксель в плоскости сканирования, а визуализация была ограничена областью размером 512 на 512 пикселей, 624.64 на 624.64 мкм.

Процесс фотообесцвечивания происходил на протяжении 30 с при 5-кратном увеличении мощности лазерного излучения. Линейные размеры области фотообесцвечивания составляли одну пятую от области визуализации в образце (124.93 мкм). Фотообесцвечивание производилось в каждом из 14 визуализируемых слоёв образца.

Предварительное сканирование образца проводилось перед процессом фотообесцвечивания для визуализации исходного состояния флуоресценции. Размер области предварительного сканирования составлял 512 на 512 пикселей (624.64 на 624.64 мкм) с разрешением 1.22 мкм на пиксель. Визуализация восстановления флуоресценции в области с фотообесцвечиванием

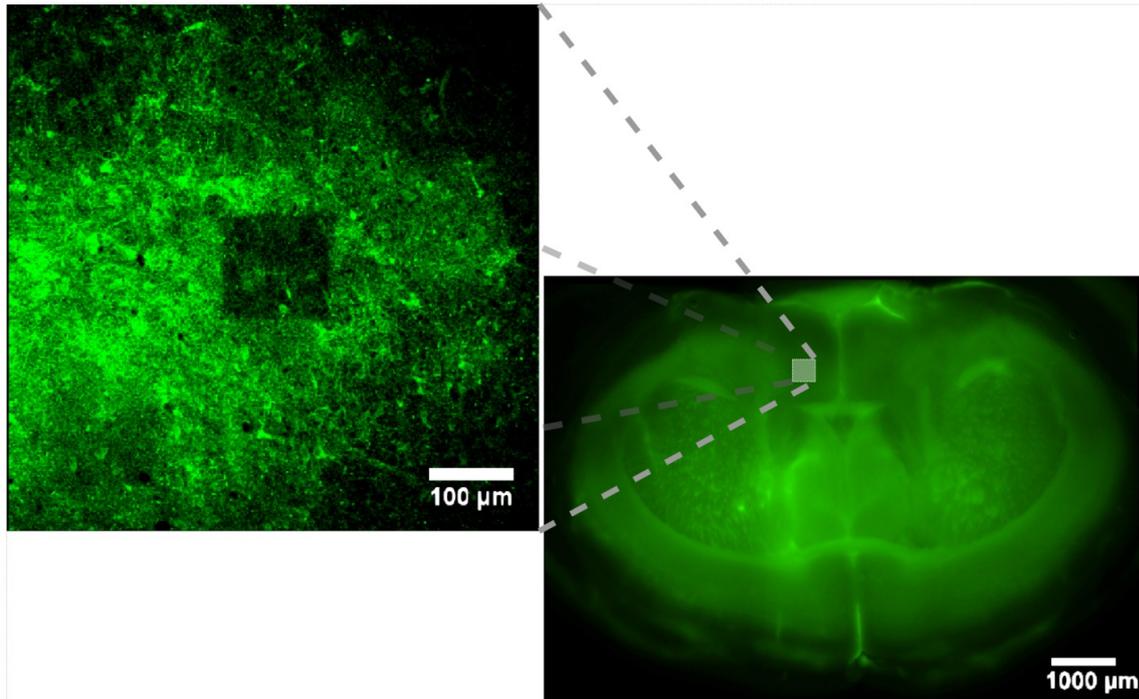


Рис. 1. Пример области с фотообесцвечиванием на образце среза головного мозга мыши (цвет онлайн)

Fig. 1. Example of a photobleached area in a murine brain slice (color online)

(рис. 1) производилась на протяжении 5 мин и начиналась сразу после завершения процесса фотообесцвечивания.

2. Результаты и их обсуждение

Измерение интенсивности флуоресценции в обесцвеченном участке производилось по полученным с временным интервалом 22.5 с наборам мультифотонных изображений в области с фотообесцвечиванием слоя образца. Для измерения значений интенсивности флуоресценции область с фотообесцвечиванием и окружающая её часть образца на мультифотонном изображении делилась на равные по линейным размерам квадратные поля со стороной 41.6 мкм; использовались средние значения яркости пикселей в данных полях.

Как следует из результатов измерений, интенсивность флуоресценции в области с фотообесцвечиванием восстанавливалась со временем, при этом интенсивность в прилегающих участках с течением времени уменьшалась. Данному процессу соответствовали средние значения интенсивности флуоресценции, которые увеличивались внутри области с фотообесцвечиванием (рис. 2, inner area) и уменьшались вдоль её внешней границы с течением времени (рис. 2, outer area).

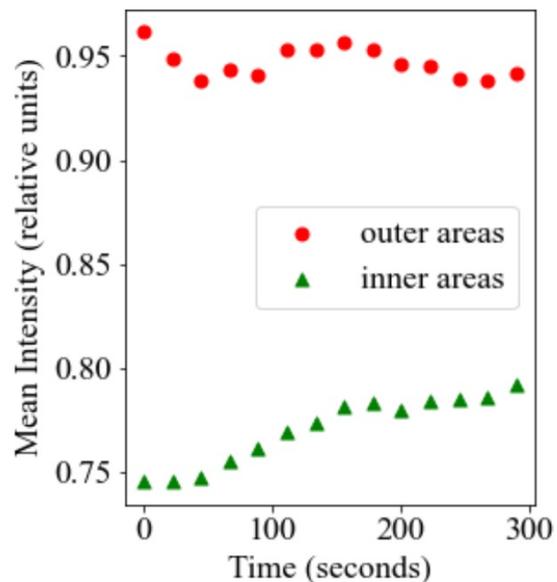


Рис. 2. Изменение среднего значения интенсивности флуоресценции в области с фотообесцвечиванием и вдоль её внешней границы с течением времени: «кружки» – внешняя граница, «треугольники» – внутренняя область (цвет онлайн)

Fig. 2. Change in the average fluorescence intensity in the photobleached area and along its boundary over time: «circles» are the outer border, «triangles» are the inner area (color online)

Для наглядности процесса восстановления флуоресценции на рис. 3 представлена мульти-

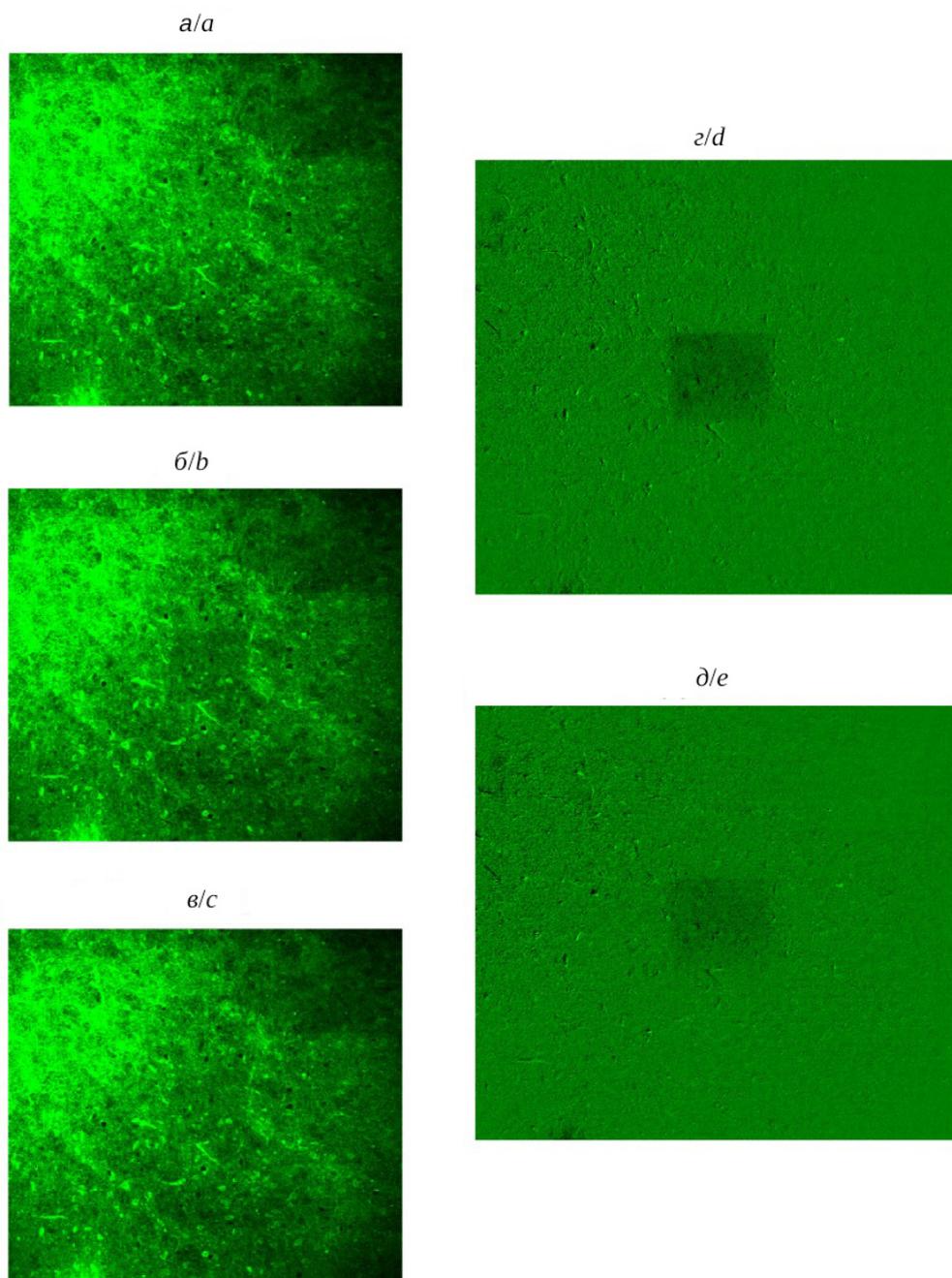


Рис. 3. Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (для слоя образца): *a* – изображение до фотообесцвечивания, *б* – изображение сразу после фотообесцвечивания, *в* – изображение через 290 с после фотообесцвечивания, *г* – изображение, полученное вычитанием яркостей пикселей изображения *a* из яркостей пикселей изображения *б*, *д* – изображение, полученное вычитанием яркостей пикселей изображения *a* из яркостей пикселей изображения *в* (цвет онлайн)

Fig. 3. Fluorescence recovery after photobleaching (for a sample layer): *a* – image before photobleaching, *b* – image immediately after photobleaching, *c* – image 290 s after photobleaching, *d* – image obtained by subtracting the pixel intensities of image *a* from the pixel intensities of image *b*, *e* – image obtained by subtracting the pixel intensities of image *a* from the pixel intensities of image *c* (color online)

фотонная визуализация слоя образца за период 290 с после фотообесцвечивания (рис. 3, а, б, в) и разностные изображения для процесса восстановления после фотообесцвечивания (рис. 3, г, д).

Полученные данные по восстановлению флуоресценции с течением времени позволили рассчитать коэффициент диффузии для различных по пространственному положению областей в об-



разце с помощью математической аппроксимации, использованной в работе [19].

Расчёт коэффициента диффузии опирался на упрощённое представление процесса. Средние значения интенсивности флуоресценции в относительных единицах (яркость пикселя на мультифотонном изображении) по каждому квадратному полю внутри и вблизи области с фотообесцвечиванием, в которой происходит восстановление флуоресценции, для каждой временной точки, нормировались с помощью значения средней интенсивности для квадратных полей с соответствующим положением в слое образца в момент до проведения процесса фотообесцвечивания. Нормированные значения интенсивностей из квадратных полей вычислялись по формуле [19]:

$$\frac{I(t)}{I_0} = 1 - be^{-kt}, \quad (1)$$

где I – интенсивность; t – время; I_0 – интенсивность до фотообесцвечивания; b – параметр фотообесцвечивания; k – коэффициент скорости обмена молекул. Коэффициент диффузии рассчитывался по формуле, использующей коэффициент скорости обмена молекул k [19]:

$$D = \frac{\gamma w^2}{4 \ln 2} k, \quad (2)$$

где D – коэффициент диффузии; $\gamma \approx 0.88$ – параметр [19]; w – радиус лазерного пучка, в данном случае рассматривается как параметр половины линейного размера области с фотообесцвечиванием, принимающий значение 62.46 мкм.

Рассчитанные значения коэффициента диффузии при сопоставлении с координатами областей в образце, использованных для их расчёта, позволяют получить двухмерную карту диффузии в слое образца (табл. 1). Значения коэффициентов диффузии из табл. 1 сопоставимы по порядку величины с аналогичными величинами, приведёнными в работе [20].

Было отмечено, что для разных полей в слое образца коэффициенты диффузии (ми. табл. 1) и разности между начальным и конечным значением относительной яркости флуоресценции (табл. 2) отражают различный характер протекания процессов диффузии и восстановления интенсивности флуоресценции с течением времени в них. Отрицательные значения коэффициента диффузии в полях *вдоль внешней границы области* (см. табл. 1, с пометкой «вне») с фотообесцвечиванием и положительные значения в полях в самой области (см. табл. 1, с пометкой «внутри») указывают на направление диффузии флуоресцентных молекул.

Диффузии, направленной на восстановление флуоресценции в области с фотообесцвечиванием, соответствуют положительные значения коэффициентов диффузии, а диффузии, связанной с уменьшением интенсивности флуоресценции в квадратных полях вдоль границы области с фотообесцвечиванием – отрицательные значения коэффициентов диффузии (табл. 1). Значения разности между начальным и конечным значением относительной яркости флуоресценции приобретали положительный или отрицательный знак по аналогичному принципу (табл. 2). В ходе процесса диффузии часть фотообесцвеченных флу-

Таблица 1 / Table 1

Коэффициенты диффузии (мкм²/с) в квадратных полях области с фотообесцвечиванием слоя образца и вдоль её границы

Diffusion coefficients (μm²/s) in square areas of the photobleached region of the sample layer and along its boundaries

По оси Y, мкм / Y-axis, μm	По оси X, мкм / X-axis, μm				
	Вне / Outside -83.28	Внутри / Inside -41.64	Внутри / Inside 0	Внутри / Inside 41.64	Вне / Outside 83.28
Вне / Outside -83.28	-1.41 ± 0.80	-1.10 ± 0.52	-1.05 ± 0.50	-0.84 ± 0.51	-2.72 ± 1.01
Внутри / Inside 41.64	-1.05 ± 0.40	0.94 ± 0.11	0.91 ± 0.07	0.87 ± 0.08	-0.20 ± 0.38
Внутри / Inside 0	-0.66 ± 0.41	0.88 ± 0.08	0.75 ± 0.06	0.97 ± 0.06	-0.24 ± 0.30
Внутри / Inside 41.64	-0.80 ± 0.59	1.28 ± 0.13	0.86 ± 0.08	0.97 ± 0.08	-0.07 ± 0.40
Вне / Outside 83.28	-0.5 ± 0.96	-0.76 ± 0.53	-0.89 ± 0.77	-0.54 ± 0.56	-0.52 ± 0.84



Таблица 2 / Table 2

Разность яркости (относительные единицы) в квадратных полях области с фотообесцвечиванием и вдоль её границы между начальным моментом времени и моментом времени 290 секунд
Brightness difference (relative units) in square areas of the photobleached region and along its boundaries between 0 and 290 seconds time points

Ось Y, мкм / Y-axis, μm	Ось X, мкм / X-axis, μm				
	Вне / Outside -83.28	Внутри / Inside -41.64	Внутри / Inside 0	Внутри / Inside 41.64	Вне / Outside 83.28
Вне / Outside -83.28	-0.025	-0.019	-0.037	-0.022	-0.019
Внутри / Inside 41.64	-0.022	0.047	0.054	0.047	-0.021
Внутри / Inside 0	-0.026	0.049	0.038	0.060	-0.013
Внутри / Inside 41.64	-0.022	0.052	0.025	0.036	-0.018
Вне / Outside 83.28	-0.023	-0.025	-0.029	-0.024	-0.016

оресцентных молекул перемещается за пределы области, а некоторое количество флуоресцентных молекул без фотообесцвечивания перемещается в данную область.

Заключение

Диффузия флуоресцентного красителя происходит в плоскости слоёв образца, поскольку сам образец головного мозга не пропитывается насквозь красителем за 15 мин, и во время визуализации восстановления флуоресценции в образец не вводится новый объём красителя; при этом фотообесцвечивание в образце проводится послойно. Диффузия в ортогональном к слоям образца направлении не происходит в значимом для данного случая объёме.

Полученный набор коэффициентов диффузии (см. табл. 1) показывает перемещение фотообесцвеченных молекул из самой области в прилегающие к её границам квадратные поля, обратный процесс для молекул без фотообесцвечивания, а также анизотропию в самом процессе диффузии молекул: в квадратных полях в правой нижней части области (относительно координат мультифотонного изображения) процесс диффузии идёт быстрее, чем в квадратных полях, расположенных ближе к левому верхнему углу области.

Таким образом, показано, что сочетание метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания с мультифотонной микроскопией позволяет визуализировать карту диффузии молекул в тканях головного мозга белой лабораторной мыши с течением времени. Полученные данные

указывают на наличие анизотропии в восстановлении флуоресценции. Анизотропные свойства перемещения молекул могут быть связаны со структурой межклеточного пространства и сосудистых систем головного мозга.

Полученные данные не дают полноценного представления о диффузии в тканях мозга, поскольку исследование было проведено *ex vivo*, наблюдаемые свойства и процессы отличались от тех, что могут происходить в живой ткани, однако результаты данной работы служат основой для создания методики исследования диффузии *in vivo* в тканях головного мозга. Результаты данного исследования могут найти применение в дальнейших исследовательских работах в области молекулярной диффузией и структуры головного мозга.

Список литературы / References

1. Blokhina I., Terskov A., Evsiukova A., Dubrovsky A., Adushkina V., Zlatogorskaya D., Dmitrenko A., Tuzhilkin M., Manzhaeva M., Krupnova V., Ilyukov E., Myagkov D., Tuktarov D., Popov S., Tzoy M., Shirokov A., Fedosov I., Semyachkina-Glushkovskaya O. Photodynamic opening of the blood-brain barrier affects meningeal lymphatics and the brain's drainage in healthy male mice. *Biomedical Optics Express*, 2024, vol. 15, iss. 10, pp. 6063–6072. <https://doi.org/10.1364/BOE.527892>
2. Du D., Fu W., Su S., Mao X., Yang L., Xu M., Yuan Y., Gao Y., Geng Z., Chen Y., Zhao M., Fu Y., Yin F., Han H. Remote regulation of molecular diffusion in extracellular space of Parkinson's disease rat model by subthalamic nucleus deep brain stimulation. *Cyborg and Bionic Systems*, 2025, vol. 6, art. 0218. <https://doi.org/10.34133/cbsystems.0218>



3. Mizuta K., Sato M. Multiphoton imaging of hippocampal neural circuits: Techniques and biological insights into region-, cell-type-, and pathway-specific functions. *Neurophotonics*, 2024, vol. 11, iss. 3, art. 033406. <https://doi.org/10.1117/1.Nph.11.3.033406>
4. Yong Y., Cai Y., Lin J., Ma L., Han H., Li F. Advancement in modulation of brain extracellular space and unlocking its potential for intervention of neurological diseases. *Med-X*, 2024, vol. 2, art. 6. <https://doi.org/10.1007/s44258-024-00021-7>
5. McCarty G., Dunaway L., Denison J., Sombers L. Neurotransmitter Readily Escapes Detection at the Opposing Microelectrode Surface in Typical Amperometric Measurements of Exocytosis at Single Cells. *Analytical Chemistry*, 2022, vol. 94, iss. 27, pp. 9548–9556. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00060>
6. Chen J., Li Z., Han Z., Kang D., Ma J., Yi Y., Fu F., Guo W., Zheng L., Xi G., He J., Qiu L., Li L., Zhang Q., Wang C., Chen J. Prognostic value of tumor necrosis based on the evaluation of frequency in invasive breast cancer. *BMC Cancer*, 2023, vol. 23, art. 530. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10943-x>
7. Lacin M., Yildirim M. Applications of multiphoton microscopy in imaging cerebral and retinal organoids. *Frontiers in Neuroscience*, 2024, vol. 18, art. 1360482. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1360482>
8. Ye M., Yu X., Yuan Y., He M., Xiong S., Li J., Wang Y., Li C., Xiong X., Deng H. Design a dual-response two-photon fluorescent probe for simultaneous imaging of mitochondrial viscosity and peroxynitrite in a thrombosis model. *Analytica Chimica Acta*, 2024, vol. 1287, art. 342088. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342088>
9. Safae M., Nishitani S., McFarlane I., Yang S., Sun E., Medina S., Squire H., Landry M. Dual infrared 2-photon microscopy achieves minimal background deep imaging in brain and plant tissues. *Advanced Functional Materials*, 2024, vol. 34, iss. 44, art. 2404709. <https://doi.org/10.1002/adfm.202404709>
10. Day C., Kang M. The utility of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to study the plasma membrane. *Membranes*, 2023, vol. 13, iss. 5, art. 492. <https://doi.org/10.3390/membranes13050492>
11. Parlow J., Rodler A., Gråsjö J., Sjögren H., Hansson P. FRAP analysis of peptide diffusion in extracellular matrix mimetic hydrogels as an in vitro model for subcutaneous injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, vol. 664, art. 124628. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124628>
12. Kenworthy A. What's past is prologue: FRAP keeps delivering 50 years later. *Biophysical Journal*, 2023, vol. 122, iss. 18, pp. 3577–3586. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.05.016>
13. Parlow J., Rodler A., Gråsjö J., Sjögren H., Hansson P. FRAP analysis of peptide diffusion in extracellular matrix mimetic hydrogels as an in vitro model for subcutaneous injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 2024, vol. 664, art. 124628. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124628>
14. Hashlamoun K., Abusara Z., Ramírez-Torres A., Grillo A., Herzog W., Federico S. Fluorescence recovery after photobleaching: direct measurement of diffusion anisotropy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2020, vol. 19, pp. 2397–2412. <https://doi.org/10.1007/s10237-020-01346-z>
15. Li M., Razumtcev A., Turner G., Hwang Y., Simpson G. Fast Diffusion Characterization by Multiphoton Excited Fluorescence Recovery while Photobleaching. *Analytical Chemistry*, 2023, vol. 95, iss. 38, pp. 14331–14340. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02638>
16. Elias T. M., Brown Jr. E. B., Brown III E. B. Expanding the applicability of multiphoton fluorescence recovery after photobleaching by incorporating shear stress in laminar flow. *Journal of Biomedical Optics*, 2023, vol. 28, iss. 7, art. 076502. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.28.7.076502>
17. George S., Steele C., Ricci A. A two-photon FRAP protocol to measure the stereociliary membrane diffusivity in rat cochlear hair cells. *STAR Protocols*, 2021, vol. 2, iss. 3, art. 100637. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100637>
18. Xu X., Ge X., Xiong H., Qin Z. Toward dynamic, anisotropic, high-resolution and functional measurement in the brain extracellular space. *Neurophotonics*, 2022, vol. 9, iss. 3, art. 032210. <https://doi.org/10.1117/1.Nph.9.3.032210>
19. Saito T., Deguchi S. Advancing FRAP for cell studies: Where there is a new method, there is a new field. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2023, vol. 18, no. 4, art. 23-00028. <https://doi.org/10.1299/jbse.23-00028>
20. Syková E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiological Reviews*, 2008, vol. 88, iss. 4, pp. 1277–1340. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2007>

Поступила в редакцию 18.09.2025; одобрена после рецензирования 30.11.2025; принята к публикации 19.12.2025; опубликована 31.03.2026

The article was submitted 18.09.2025; approved after reviewing 30.11.2025; accepted for publication 19.12.2025; published 31.03.2026