

## ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИОННОГО КОНТРАСТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

**Р. А.МУХАМАДИЯРОВ<sup>1</sup>, В. В.СЕВОСТЬЯНОВА<sup>1</sup>, Д. К.ШИШКОВА<sup>1</sup>, М. В.НАСОНОВА<sup>1</sup>,  
С. Ф.ЗИНЧУК<sup>2</sup>, Ю. А.КУДРЯВЦЕВА<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

<sup>2</sup>*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Россия*

**Цель исследования.** Модификация метода сканирующей электронной микроскопии в обратно – рассеянных электронах для изучения биологических образцов, имеющих массивные металлические или минеральные включения.

**Материалы и методы.** В статье предложен альтернативный метод, не требующий приготовления срезов. Образцы для исследования (пластинки из никелида титана с окружающими тканями после субкутанной имплантации, эксплантированные стенты, эксплантированные эпоксиобработанные ксеноаортальные биопротезы клапанов сердца, эксплантированные биodeградируемые сосудистые графты из брюшной аорты крыс) заливали в эпоксидную смолу, полимеризовали, получали поверхностные шлифы блоков с образцами, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в обратно-рассеянных электронах.

**Основные результаты.** В результате предложенного нами метода образцы приобретали композиционный контраст и субклеточные структуры хорошо визуализировались при просмотре в сканирующем электронном микроскопе.

**Заключение.** Показана возможность исследовать микроструктурные особенности контактов между твердыми материалом и биологическими тканями, анализировать клеточный состав на границе имплант – живая ткань. Кроме того, этот метод универсален и может быть использован для изучения различного материала, особые преимущества он имеет при исследовании образцов с объемными металлическими и минеральными включениями. Еще одним достоинством метода является возможность исследования образцов, имеющих большую площадь поверхности, что невозможно при использовании метода трансмиссионной электронной микроскопии.

**Ключевые слова:** сканирующая электронная микроскопия, композиционный контраст, микроструктура поверхности.

## COMPOSITE CONTRAST USING TO RESEARCH BIOLOGICAL OBJECTS BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

**P. A.MUKHAMADIAROV<sup>1</sup>, V. V.SEVOSTIANOVA<sup>1</sup>, D. K.SHISHKOVA<sup>1</sup>,  
M. V. NASONOVA<sup>1</sup>, S. F.ZINCHUK<sup>2</sup>, U. A.KUDRYAVCEVA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russia.*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Educational Institution of higher professional education Kemerovo state medical university, Kemerovo, Russia*

**The purpose.** Modification of scanning electron microscopy method in backscattered electrons to research biological samples with massive metal or mineral inclusions.

**Materials and methods.** In the article the alternative method without cutting sections were supplied. Samples for researching (plates from NiTi surrounded by tissues after subcutal implantation, explanted stents, explanted epoxy covered xenoaortic bioprosthetic heart valves, explanted biodegradable vascular grafts from rats abdominal aorta) were embedded in epoxy resin, polymerized, made surface slices from blocks with samples, contrasted by uranyl acetate and lead citrate and researched in backscattered electrons.

**Results.** By using the proposed method samples acquired composite contrast and subcellular structures had good visualization in scanning electron microscopy.

**Conclusion.** Our research showed availability this method to research microstructural characteristics of contacts between hard material and biological tissues and to analyze cellular structure on implant- tissue border. Besides, this method is universal for researching different biological samples, and it has special advantages for research materials with volumetric metal and mineral inclusions. Another advantage of this method is ability to research samples with large square of surface, what can't be made by using transmission electron microscopy method.

**Keywords.** Scanning electron microscopy, composite contrast, microstructure of surface.

## Введение

Одним из направлений современной медицины является создание искусственных имплантатов и тканеинженерных конструкций для замещения повреждённых или утраченных тканей и органов, а также восстановления их функций [1, 2]. Важным вопросом в разработке протезов является изучение особенностей взаимодействия клеток организма с неорганическим материалом и тканевой реакции на имплантат. В свою очередь, взаимодействие материала протеза с тканями реципиента обуславливает его дальнейшую функциональность. Этот процесс проявляется, главным образом, на клеточном уровне. Поэтому инструментальная оценка реакции клеток на имплантированный материал имеет большое значение. Для этих целей широко применяют методы световой и электронной микроскопии. Вместе с тем, при использовании традиционных методов исследования встречаются проблемы, затрудняющие пробоподготовку изучаемого материала. Это может быть связано с наличием в составе имплантатов твердых материалов, препятствующих получению срезов. В частности, в их составе могут присутствовать металлические сплавы и керамика. При наличии в составе имплантируемых конструкции металлических элементов, имеющих малое поперечное сечение, возможным решением проблемы может быть заключение изучаемого материала в метакрилатные или эпоксидные смолы с последующей резкой ножом с высокой твердостью [3]. В случае более массивных включений вариантом решения может быть использование метода *sawing and grinding* (пилка с последующей шлифовкой). Способ основан на отпиливании тонкого среза образца, заключенного в смолу, прецизионной дисковой пилой с последующей шлифовкой и полировкой до необходимой толщины [4]. Однако при этом способе не всегда удается сохранить материал имплантата в составе среза, так как при малой толщине среза образец утрачивается в процессе полировки из-за разности механических свойств

материала графта и смолы.

Ранее нами был разработан способ получения гистологических образцов, заключённых в эпоксидные смолы, методом шлифовки-полировки без приготовления срезов [5]. Метод позволяет визуализировать биологические объекты с твердыми металлическими или минеральными включениями. Недостатком метода является то, что при наличии в материале образцов сложной формы лежащий под поверхностью материал при нижнем освещении через конденсор микроскопа дает тень, что часто не позволяет получить удовлетворительный уровень освещенности препарата.

Возможным решением этой проблемы может стать применение сканирующей электронной микроскопии в обратно – рассеянных электронах (SEM BSE) вместо световой микроскопии. При этом методе исследования пучок электронов падает на объект сверху, что исключает затенение образца. В результате получается изображение клеток, визуальное сходное с таковым при трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

## Цель работы

Продемонстрировать возможности применения метода композиционного контраста в модификации авторов для исследования структуры биологических объектов.

## Материал и методы исследования

### *Образцы для исследования*

#### *Удаленные стенты с окружающими тканями.*

Исследованы эксплантированные стенты фирм Pro-Kinetic, Omnilink, Racer, которые применяли при коррекции выводного отдела правого желудочка у 7 пациентов. Средний срок нахождения стента в организме составил 3 месяца (от 1 до 7 месяцев).

#### *Пластинки из никелида титана.*

Для изучения реакции тканей на никелид титан, как потенциальный материал для изготовления протезов и их деталей, осуществляли

имплантацию пластинок из данного металла подкожно крысам линии Wistar (массой 70-80 г). Операцию проводили под ингаляционным наркозом 2% изофлюрана в асептических условиях. Пластины из никелида титана размером 10 мм x 10 мм x 1 мм стерилизовали этиленоксидом и имплантировали в подкожные «карманы» на спине животного справа и слева вдоль позвоночника. Образцы (16 шт.) извлекали через один и три месяца.

#### *Створки биопротезов клапанов сердца.*

Исследованы эпоксиобработанные ксеноаортальные биопротезы клапанов сердца («Кем-Кор» и «Перикор», ЗАО «Неокор» г. Кемерово) в количестве 12 шт., эксплантированные из митральной позиции у восьми пациентов по причине развития кальциевой дегенерации. Средний срок функционирования биопротезов составил  $8,75 \pm 2,8$  года (от 6 до 12 лет). Для исследований эксплантированные ксеногенные клапаны целиком помещали в 4% забуференный параформальдегид, затем вырезали из них образцы для исследований.

Аутопсийный материал брали только при наличии договора информированного согласия на забор биоматериала.

#### *Биодеградируемые сосудистые графты.*

Изготовление биодеградируемых сосудистых графтов, а также их имплантацию в брюшную аорту крыс проводили согласно модели, описанной Севостьяновой В.В. (Sevostyanova et al, 2015). Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм изготавливали методом электроспиннинга из биодеградируемого полимера поликапролактона (polycaprolactone, PCL,  $M=80.000$ ) (Sigma-Aldrich, США).

PCL графты имплантировали в брюшную часть аорты крыс линии Wistar под ингаляционным наркозом 2% изофлюрана. Через 10 месяцев после имплантации графты выделяли вместе с прилежащими участками аорты. Всего изучено 8 образцов.

#### *Нативные органы крыс популяции Wistar.*

Сердца и печень крыс (5 шт.) извлекали после эвтаназии животных в атмосфере углекислого газа. Образцы сразу же переносили в 4% раствор параформальдегида охлажденный до 6 °С.

Всех животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа. Исследование проводили, соблюдая

принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986).

#### *Пробоподготовка материала*

##### *Фиксация образцов*

После эксплантации все образцы помещали в 4%-й раствор параформальдегида, приготовленный на 0,1 М натрий-фосфатном буфере и охлажденный до 6 °С. Через 1 час после предварительной фиксации образцы разрезали на фрагменты, которые переносили в свежую порцию фиксатора и оставляли на 24 часа при 6 °С.

Часть образцов, содержащих никелид титан, после фиксации раствором параформальдегида дополнительно фиксировали 2% водным раствором тетраоксида осмия в течение 12 часов.

##### *Обезвоживание образцов.*

Перед обезвоживанием все образцы промывали в двух сменах 0,1 М фосфатного буфера по 15 мин. в каждом. Далее осуществляли их обезвоживание, последовательно помещая в растворы этилового спирта возрастающей концентрации.

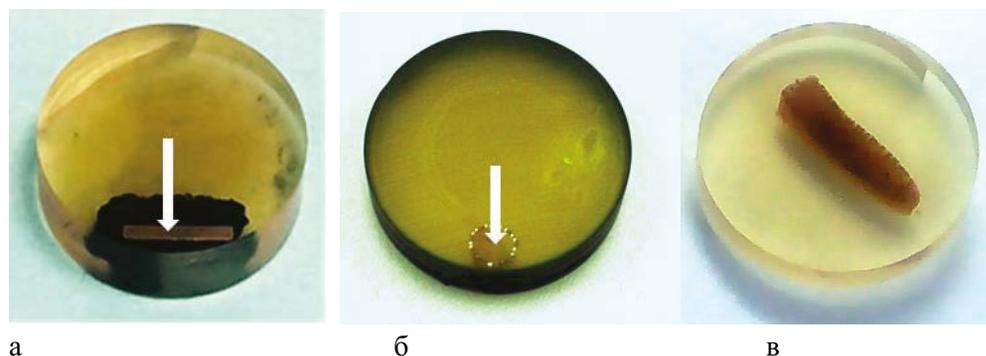
1. 30% этиловый спирт – 2 раза по 30 минут
2. 50% этиловый спирт – 2 раза по 30 минут
3. 70% этиловый спирт – 2 раза по 40 минут
4. 80% этиловый спирт – 2 раза по 60 минут
5. 95% этиловый спирт – 60 минут
6. 95% этиловый спирт – 120 минут
7. 100% этиловый спирт – 60 минут
8. 100% этиловый спирт – 60 минут

##### *Заключение образцов в эпоксидные смолы.*

Заключение образцов в эпоксидные смолы позволяет решить проблему различной плотности материала протеза и биологических тканей при шлифовке и полировке.

Обезвоженные образцы помещали в ацетон – 2 раза по 60 минут. Затем образцы выдерживали в смеси ацетона и смолы в соотношении 1:1 в течение 12 часов, после чего погружали в заливочную смолу и выдерживали в системе вакуумной импрегнации CitoVac (Struers, Дания) 12 часов. Пропитанные смолой образцы помещали в специальные формы (Fixi-Form, Struers) диаметром 25 мм для шлифовально-полировального станка TegraPol-11 (Struers, Дания), заливали свежей порцией смолы и оставляли в термостате при 37 °С. Через 12 часов проводили полимеризацию смолы в термостате при температуре 60 °С в течение 24 час.

Образцы, заключенные в смолу, показаны на рис. 1.



**Рисунок 1. Образцы, заключенные в эпоксидную смолу, подготовленные для исследования методом SEM BSE: а – пластина из никелида титана (показана стрелкой) вместе с окружающими тканями после подкожной имплантации (фиксация параформальдегид-тетраокись осмия), б – сосудистый стент с тканями после экплантации, стрелкой показан просвет сосуда, образованный стентом (фиксация в параформальдегиде), в – фрагмент печени крысы (фиксация в параформальдегиде)**

#### *Шлифовка и полировка образцов*

Полученные образцы шлифовали до участка, исследование которого было необходимо произвести, и полировали поверхность с использованием шлифовально-полировального станка TegraPol-11 (Struers, Дания). Шлифовку осуществляли, используя абразивные диски MDRondo (Struers) с различным размером абразивных зерен в следующем порядке: 800, 1000 и 1200 грита. Для полировки последовательно использовали диски, покрытые сукном (Struers), с различной упругостью в комбинации с суспензиями, содержащими монокристаллические алмазы (DP-SprayM, Struers) в следующей последовательности:

- 1). MDMol с 9 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 2). MDPan с 6 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 3). MDDur 3 мкм алмазной суспензией – 20 мин.;
- 4). MDNur без алмазной суспензии – 20 мин.

На рис. 1 показан стент после заключения в эпон-аралдит после шлифовки.

Так как биологические ткани после пропитки смолой становятся прозрачными и трудно различимы в блоке, для контроля глубины шлифовки использовали бинокулярный микроскоп Olimpus SZ2-ILST, Japan.

Далее шлифовали обратную сторону блоков таким образом, чтобы их плоские поверхности были параллельны. Шлифовку обратной сто-

роны выполняли до образца, а также удаляли его неинформативные участки, чтобы добиться минимальной толщины блоков. Для защиты поверхности, противоположной шлифуемой, от царапин и вмятин ее закрывали резиновой или матерчатой накладкой.

#### *Контрастирование образцов.*

Перед исследованием в электронном микроскопе все образцы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу.

Для контрастирования уранилацетатом каждый образец помещали в чашку Петри, на дне которой размещали смоченный водой бумажный фильтр. На поверхность образца наносили раствор уранилацетата и помещали в термостат при температуре 60°C на 60 мин. Затем образец промывали под струей дистиллированной воды, протирали мягкой тканью и высушивали на воздухе.

Для контрастирования цитратом свинца образцы также помещали в чашку Петри, на дне которой находилось несколько гранул гидроксида натрия для поглощения углекислого газа. На поверхность образца капали несколько капель цитрата свинца. Чашку Петри накрывали крышкой и оставляли на 10 мин. при комнатной температуре. После контрастирования образец отмывали в струе свежеприготовленной бидистиллированной воды.

#### *Сканирующая электронная микроскопия*

Для изучения методом SEM BSE все подготовленные образцы напыляли углеродом с использованием установки для вакуумного напыления

SC 7640 (Quorum Technologies, UK). Препараты исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа S 3400 N (Hitachi, Япония) в режиме регистрации обратно-рассеянных электронов.

#### *Трансмиссионная электронная микроскопия.*

Для исследований использовали те же сердца крыс, что для исследований методом SEM BSE. Выделенный фрагмент разрезали на кусочки объемом 1 мм<sup>3</sup> и фиксировали в 3% растворе глутарового альдегида на 0,1М фосфатном буфере в течение 1,5 ч при температуре 4°C с постфиксацией в 1% растворе O<sub>s</sub>O<sub>4</sub> на том же буфере в течение 1 ч. 10 мин. при 25°C. После обезвоживания в восходящих концентрациях этанола пробы переносили в 100 % ацетон. Для заливки использовали эпоксидную смесь Аралдит (Fluka). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-Nova (Швеция), далее их контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца (по Рейнольдсу). Просмотр осуществляли в электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss) при ускоряющем напряжении 80 Кв в Центре коллективного пользования приборами и оборудованием «Высокие технологии и аналитика наносистем» НГУ.

### Результаты

*Образцы со стенками после экплантации. На образце, представленном на рис. 3, материал стенки окружен по периметру плотной соединительной тканью.*

При исследовании методом световой микроскопии (рис. 2а) балки стента создавали препятствие лучу света от конденсора микроскопа, создавая затенение на изображении объекта. При исследовании методом композиционного контраста хорошо выявлялась внутренняя структура изучаемого образца (рис. 2б). Между тканью и балками стента наблюдали пространство, заполненное везикулярными структурами (рис. 2в). Пространство вокруг капсул заполнено рыхлой соединительной тканью, содержащей многочисленные сосуды различного диаметра. Фибробласты рыхлой соединительной ткани имели типичное строение с характерным внутриядерным распределением хроматина (рис. 2г). Кариолема у этих клеток не визуализировалась. Коллагеновые волокна в рыхлой соединительной ткани располагались разнонаправленно.

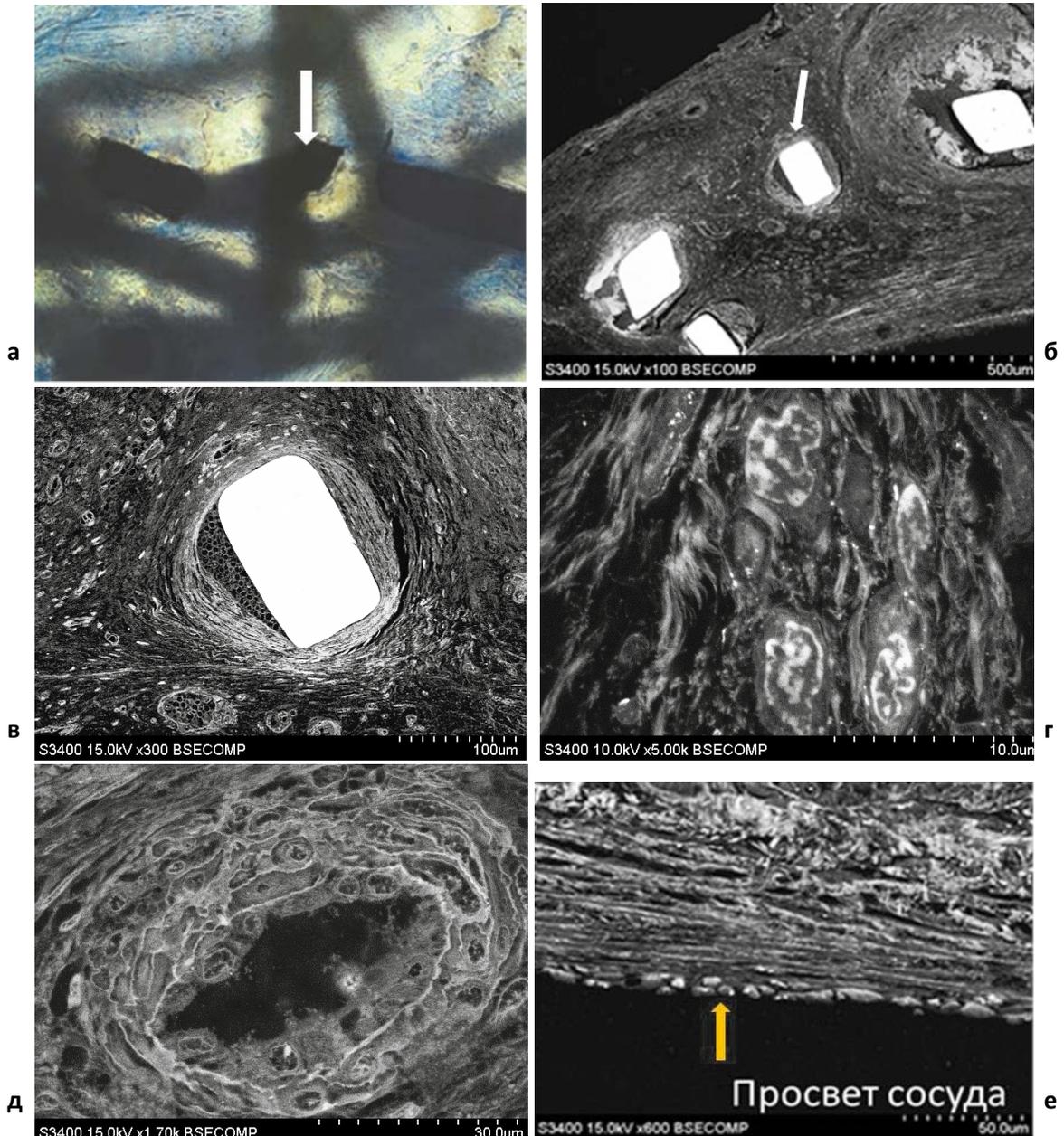
В структуре капилляров (рис. 2д) наблюдали слой эндотелиальных клеток, имеющих многочисленные выросты внутрь сосуда. Эндотелий был отделен сплошной внутренней эластической мембраной, за которой располагались клетки интимы. К эластической мембране прилегал плотный слой ткани из клеток, морфологически сходными с фиброцитами. Над плотной соединительной тканью присутствовала рыхлая соединительная ткань, содержащая собственные сосуды, идущие параллельно эндотелиальному слою.

В просвете сосуда была видна его трехмерная структура. Вероятно, 3D – эффект обусловлен тем, что на данном снимке в просвете сосуда отсутствовали клеточные элементы, связывающие в процессе контрастирования тяжелые металлы. Благодаря этому электроны, участвующие в формировании изображения, проникали на большую глубину и отражались от клеток, лежащих глубже от поверхности образца.

Со стороны кровеносного русла, образованного стентом, была видна эндотелиальная выстилка (рис. 2е). На разных участках эндотелий имел отличия в строении по количеству слоев клеток, их форме и структуре ядер. Непосредственно к эндотелиальному слою примыкал плотный слой ткани из клеток, морфологически сходных с фиброцитами. Над плотной соединительной тканью наблюдали рыхлую соединительную ткань, содержащую собственные сосуды, идущие параллельно эндотелиальному слою.

Образцы с пластинками никелида титана. Изображения, полученные данным методом, были визуально сходными с изображениями, полученными методами трансмиссионной электронной микроскопии, но имели относительно них негативный контраст. При инверсии цветов сходство между имиджами при TEM и SEM BSE значительно возрастало. Для удобства восприятия на рисунке 3 параллельно представлены имиджи в негативном и позитивном контрастах.

При увеличении x100 (рис. 3а, б) были хорошо различимы сама пластина, слой клеток, прилегающий к пластине, слой фиброзной ткани, содержащий многочисленные мелкие кровеносные сосуды и фиброзно-жировая ткань. При повышении увеличения возрастала детализация структуры объекта. При увеличении x2700 (рис. 3в, г) становился различимым монослой клеток, прилегающий непосредственно к боковой поверхности пластины. Это слой клеток был отде-

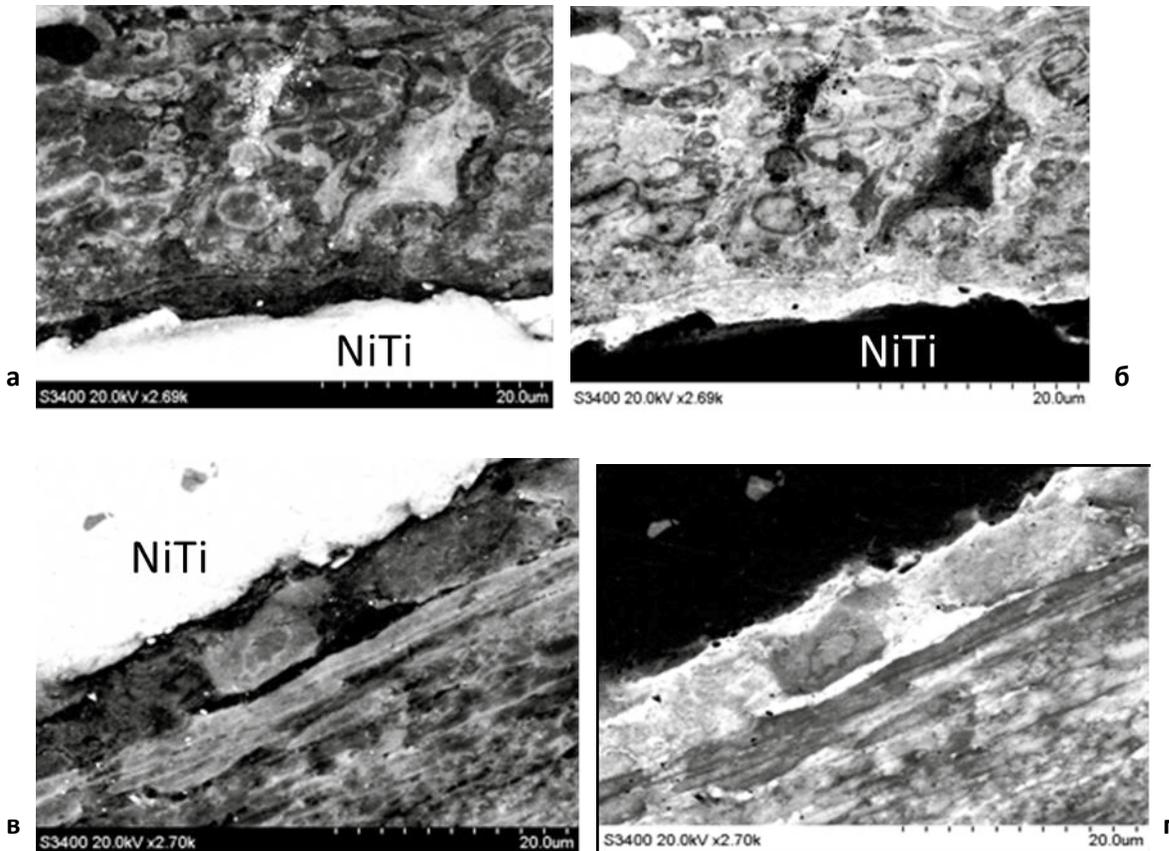


**Рисунок 2.** Стент из никелида титана после эксплантации: а – световая микроскопия общий вид (ув.: 100), б – SEM BSE общий вид, в – отдельная балка стента (SEM BSE), г – фибробласты (SEM BSE), д – капилляр (SEM BSE), е – эндотелий на границе с кровеносным руслом, сформированном при участии стента (SEM BSE). Белые стрелки – балки стента, желтая стрелка – эндотелий

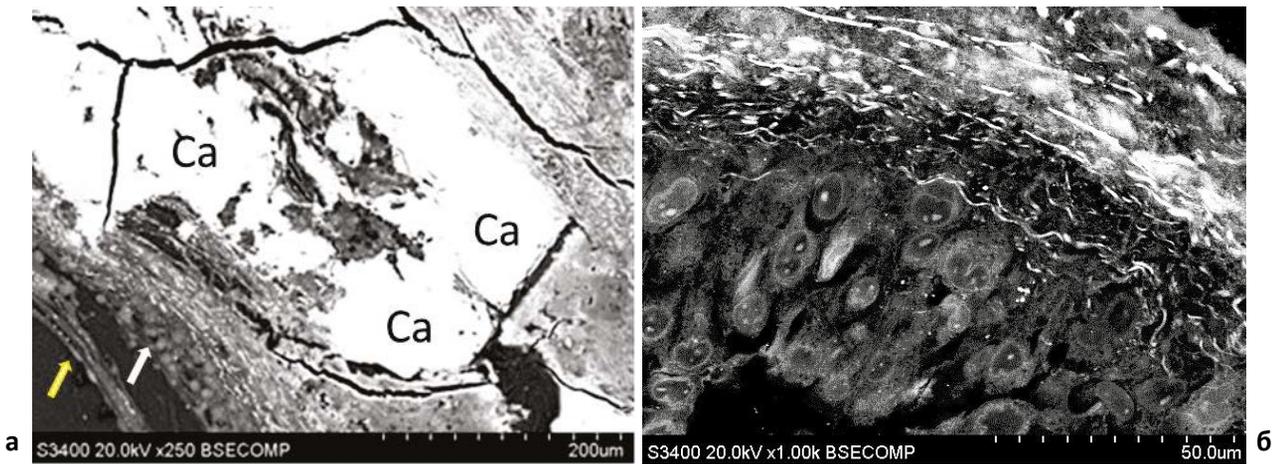
лен от располагающихся дальше тканей тонким слоем уплощенных клеток, морфологически схожих с фиброцитами. Были хорошо видны ядра и цитоплазма клеток, везикулярные частицы между поверхностью никелида титана и клетками. В некоторых участках между металлом и тканями встречались отдельные свободные моноцитарные клетки.

Эксплантированные образцы кальцифицированных створок биопротезов. На рис. 4а представ-

лен участок биопротеза, содержащий крупный кальциевый депозит, имеющий плотные контакты с окружающими тканями. Внутренняя часть депозита была неоднородной и содержала включения из остатков биологического материала. С наружной стороны заметно отслоение поверхностного слоя створки биопротеза. Между этим слоем и внутренним слоем створки присутствовали многочисленные клетки, имеющие морфологическое сходство с моноцитами (рис 4б).



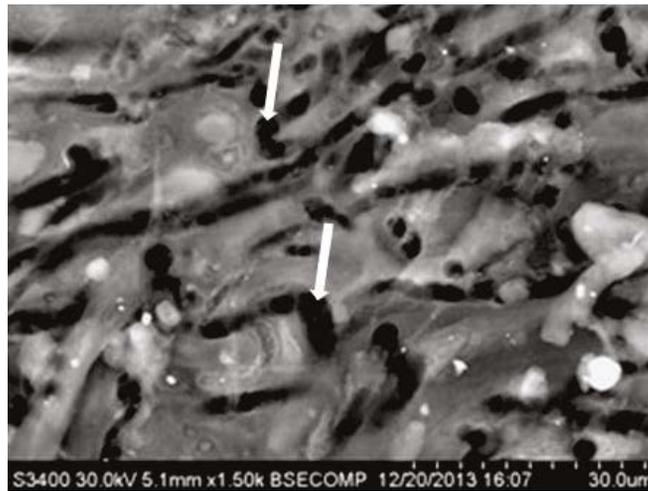
**Рисунок 3.** *Пластинки из никелида титана (NiTi) после 1 мес. подкожной имплантации. Слева исходные снимки, справа инвертированное изображение*



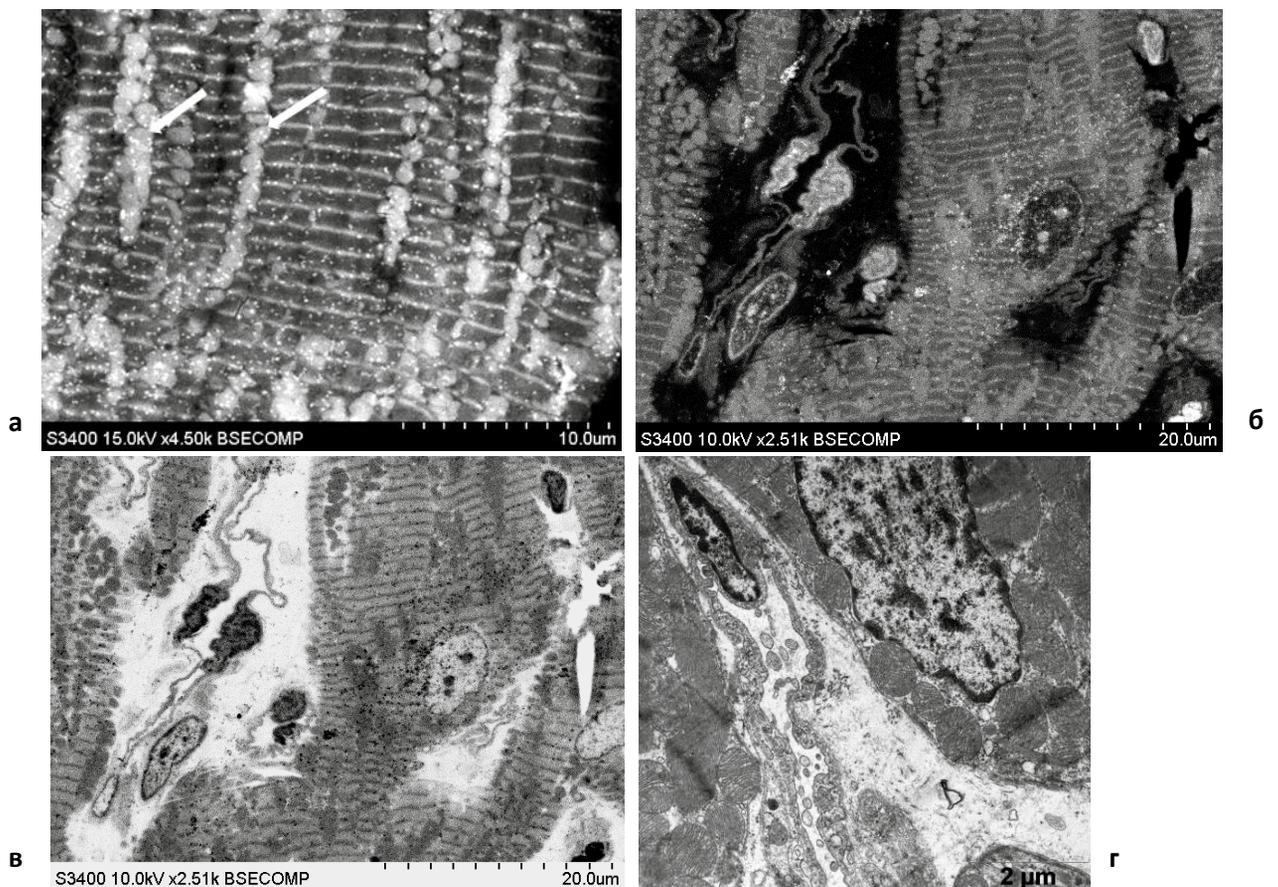
**Рисунок 4.** *Кальцифицированная створка биопротеза: а – кальциевый депозит в структуре створки, б – клетки на поверхности створки, желтая стрелка. Желтая стрелка – эндотелий, белая стрелка – моноциты в месте расслоения створки биопротеза*

Образцы, содержащие сосудистые графты малого диаметра из биодеградируемого полимера. В образцах графтов, стенка которых была сформирована из неориентированных волокон полимера, пространство между нитями было заполнено клеточным и неклеточным материалом,

образующим плотную структуру (рис. 5). Из-за того, что полимер при проводке растворяется в органических растворителях, на рисунке видны только пустые полости, ранее содержавшие волокна. Клетки имели различную форму и были морфологически схожи с фибробластами.



**Рисунок 5.** Сосудистый протез, сформированный из нитей полимера. Белые стрелки – остатки полимерных нитей



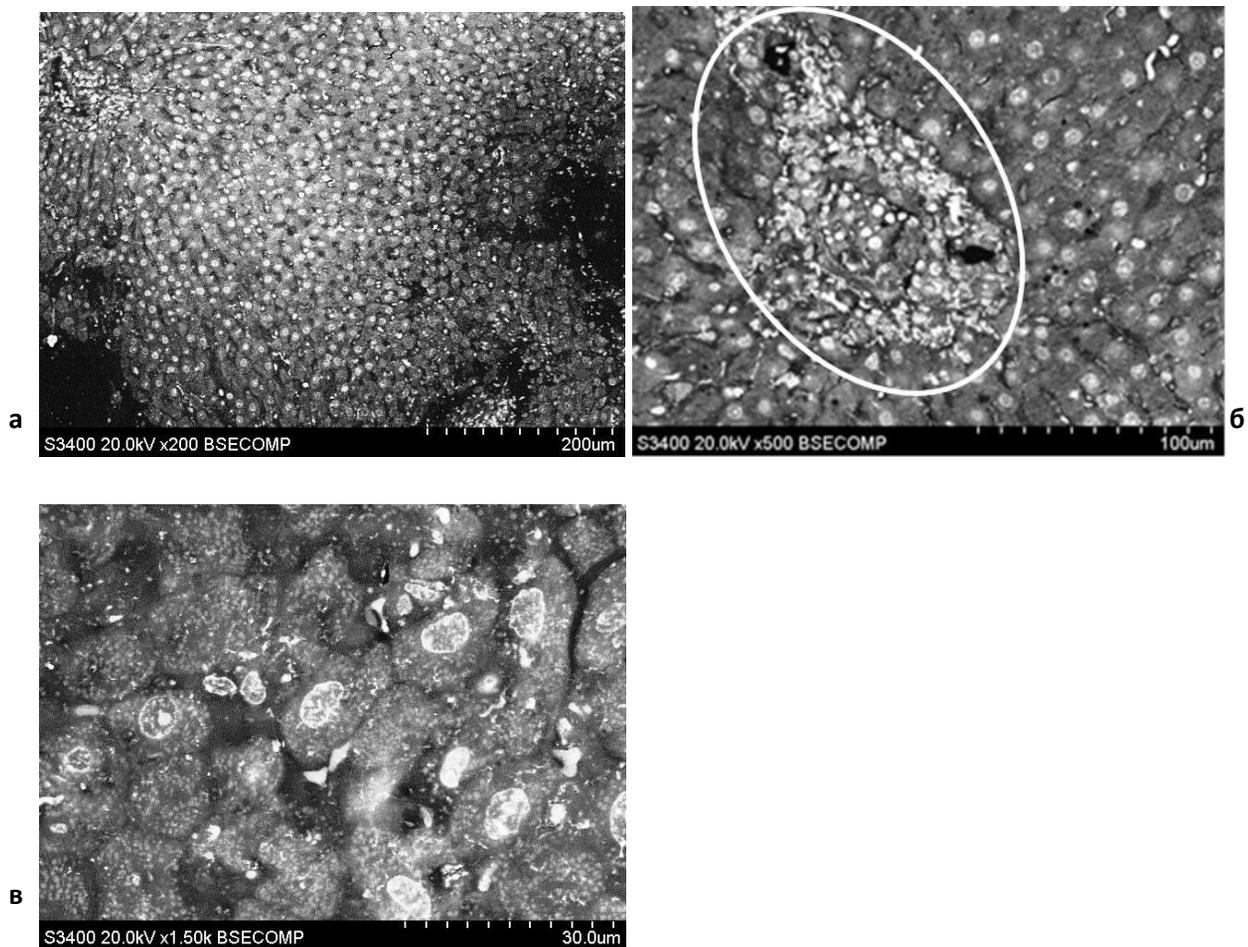
**Рисунок 6.** Визуализация структуры миокарда крысы, полученная методом SEM BSE (а-с) и TEM (г): а – поперечная исчерченность мышечных волокон; (стрелками указаны митохондрии) б – капилляры и кардиомиоциты; в – негативный вариант от бб; г – ультраструктура миокарда, полученная методом TEM

*Миокард крысы.*

На рисунке 6б показаны электронограммы препаратов миокарда крысы. При использовании метода SEM BSE наблюдали хорошую визуализацию поперечной испещренности мышечных волокон, между которыми находились митохондрии (рис.6). Митохондрии имели округлую форму, внутреннее мембранное строение митохондрий не визуализировалось. Ядра клеток эндотелия и кардиомиоцитов имели типичное строение (рис. 6б). На рис. 6а видна отечность перикапиллярного пространства, вызванная 30-минутной нормотер-

мической тотальной ишемией.

Для оценки эффективности визуализации образцов методом SEM BSE было выполнено сравнение изображений, полученных методами SEM BSE и ТЕМ. Результаты ТЕМ использовали в качестве стандарта. Так как эти методы дают изображения, являющиеся негативными относительно друг друга, для рис. 6б выполнили процедуру обращения цветов. На рисунке 6г показано изображение, полученное методом ТЕМ с участка гистологически сходного с таковым на рис. 6г.



**Рисунок 7. Визуализация строения печени крысы: а – печеночные балки, б – портальная триада (выделена белым овалом), в – гепатоциты и другие клетки печени**

*Печень крыс.* С использованием данного метода хорошо визуализировалось строение печени крыс (рис. 7). При увеличении  $\times 200$  были видны печеночные дольки и балки, центральные вены и другие структурные элементы. При увеличении  $\times 500$  (рис. 7б) была видна детальная структура печени, особенности строения портальной триады, печеночные балки, печеночные синусы, особенности строения ядер. При повышении

увеличения до  $\times 1500$  (рис. 7в) становилась видимой ультраструктура клеток, в частности ядра и митохондрии. Хорошо визуализировались структурные различия между клетками.

### Обсуждение

Использование SEM BSE для исследования гистологического строения различных биологи-

ческих объектов сравнительно новое и развивающееся направление в морфологии. Различные авторы использовали этот метод для исследования различных объектов: клеточного и субклеточного строения влажных образцов [6, 7], тканей вблизи костных имплантов [8], полутонких срезов [9], монослоя клеток [10].

Результаты нашего исследования подтвердили, что SEM BSE в представленной модификации позволяет получить изображения высокого качества с различных объектов. В отличие от метода световой микроскопии, объекты, лежащие ниже поверхности образца, не создавали препятствий для исследований. Отсутствие необходимости приготовления срезов значительно упрощает процедуру пробоподготовки материала. Метод имеет преимущества в случае необходимости изучения образцов, имеющих в своем составе массивные металлические или минеральные включения. Заключение образца в твердые смолы с последующей шлифовкой-полировкой позволяет использовать стандартные методы контрастирования материала, принятые для TEM биологических объектов.

Вместе с тем, разрешение метода значительно ниже, чем при обычном TEM. Конечный результат зависит от сочетания ряда факторов. В их числе: качество пропитки объекта эпоксидной смолой, протокол контрастирования объекта, режимы работы микроскопа (ускоряющее напряжение и ток пучка) и особенности структуры самого объекта исследования. Причина в том, что при SEM BSE, результат зависит от глубины проникновения пучка электронов до их отражения. При большой глубине можно получить информацию о внутренней структуре объекта, но при этом снижается разрешение (качество изображения). Теоретически, чем меньше глубина проникновения пучка, тем выше качество. На этот параметр можно влиять путем разработки протокола контрастирования объекта, обеспечивающего большую концентрацию элементов с высокой молекулярной массой в поверхностном слое объекта. Большое значение имеет также выбор оптимального режима для электронного пучка микроскопа. Качество изображения зависит как от ускоряющего напряжения, так и от тока пучка. Нам не удалось подобрать универсальный режим, пригодный для всех объектов, поэтому для каждого образца его приходилось подбирать индивидуально. При варьировании условий про-

смotra возможно подобрать режимы, которые позволят получить удовлетворительную визуализацию не только поверхности, но и трёхмерной структуры поверхностного слоя объекта.

Рассматриваемый метод универсален и может быть использован для изучения различного материала. Особые преимущества он имеет при исследовании образцов с объемными металлическими и минеральными включениями, позволяет исследовать структурные особенности контактов между твердым материалом и биологическими тканями. Еще одним достоинством метода является возможность исследования образцов, имеющих большую площадь поверхности, что невозможно при использовании методом TEM. В частности, мы успешно применили его при площади поверхности превышающей 1 см<sup>2</sup>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Сейфалян А.М., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Сергеева Е.А. и др. Сравнительное тестирование *in vitro* биодеградируемых сосудистых имплантов для оценки перспективы использования в тканевой инженерии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2015; 4: 34-41.
2. Michaelis S., Robelek R., Wegener J. Studying cell-surface interactions *in vitro*: a survey of experimental approaches and techniques. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 2012; 126: 33-66.
3. Attizzani, G.F., Bezerra, H.G., Chamié, D., Fujino, Y., Spognardi, A.M., Stanley et al. Serial evaluation of vascular response after implantation of a new sirolimus-eluting stent with bioabsorbable polymer (mistent): an optical coherence tomography and histopathological study. *J. Invasive Cardiol.* 2012; 24(11): 560-568.
4. Malik M., Gunn J., Holt C.M., Shepherd L., Francis S.E., Newman C.M.H et al. Intravascular stents: a new technique for tissue processing for histology, immunohistochemistry, and transmission electron microscopy. *Heart.* 1998; 80: 509-516.
5. Mukhamadiyarov R.A., Sevostyanova V.V., Shishkova D.K., Nokhrin A.V., Sidorova O.D., Kutikhin A.G. Grinding and polishing instead of sectioning for the tissue samples with a graft: Implications for light and electron microscopy. *Micron.* 2016; 85: 1-7. doi: 10.1016/j.micron.2016.03.005

6. Kamari Y., Cohen H., Shaish A., Bitzur R., Afek A., Shen S. et al. Characterisation of atherosclerotic lesions with scanning electron microscopy (SEM) of wet tissue. *Diabetes and vascular disease research*. 2008; 1: 44-47.

7. Thiberge S., Nechushtan A., Sprinzak D., Gileadi O., Behar V., Zik O. et al. Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions. *PNAS*. 2004; 101 (10): 3346–3351

8. Wierzchosa J., Falcionib T., Kiciakc A., Wolińskid J., Koczorowskie R., Chomickif P. et al. Advances in the ultrastructural study of the implant–bone interface by backscattered electron imaging. *Micron*. 2008; 39 (8): 1363–1370. doi:

10.1016/j.micron.2008.01.022.

9. Koga D., Kusumi S., Shodo R., Dan Y., Ushiki T. High-resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy. *Microscopy*. 2015; 64 (6): 387-394. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfv042>

10. Fernández-Segura E., Cañizares F. J., Cubero M. A., Revelles F., Campos A. Backscattered electron imaging of cultured cells: application to electron probe X-ray microanalysis using a scanning electron microscope. *Journal of microscopy*. 1997;188 (1): 72–78.

*Статья поступила 27.10.2016*

*Для корреспонденции:*

**Мухамадияров Ринат Авхадиевич**

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (3842) 64-45-56,

E-mail: rem57@rambler.ru

*For correspondence:*

**Muhamadiarov Rinat**

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,

650002, Russian Federation

Тел. +7 (3842) 64-45-56,

E-mail: rem57@rambler.ru