

НОВЫЙ МЕТОД ОБРАБОТКИ, ОКРАШИВАНИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТКАНЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ ИМПЛАНТАТЫ И ОЧАГИ ВНЕСКЕЛЕТНОЙ МИНЕРАЛИЗАЦИИ

DOI: 10.17691/stm2020.12.4.02

УДК 620.187:616.13–003.84–089–77

Поступила 11.09.2019 г.



Р.А. Мухамадияров, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;

Л.А. Богданов, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹;

С.В. Мишинов, к.м.н., старший научный сотрудник, врач-нейрохирург нейрохирургического отделения²;

А.Г. Кутихин, к.м.н., зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии¹

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Сосновый бульвар, 6, Кемерово, 650002;

²Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России, ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, 630091

Цель исследования — оценить эффективность использования оригинального метода обработки, окрашивания и визуализации тканей, содержащих целлюлозные медицинские изделия или их прототипы, а также очаги внескелетной минерализации, для их последующего изучения с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах.

Материалы и методы. После фиксации в 10% формалине (24 ч) биоматериал (пластина из никелида титана с окружающими тканями после подкожной имплантации, пластины из запатентованного титанового сплава с окружающими тканями после краниопластики, первичные и вторичные кальцифицированные атеросклеротические бляшки) постфиксировали 1% тетраоксидом осмия (12 ч) и затем окрашивали 2% водным раствором тетраоксида осмия (48 ч). Далее образцы окрашивали спиртовым раствором 2% уранилацетата (5 ч), обезвоживали изопропанолом (5 ч) и ацетоном (1 ч), пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (1:1, 6 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (24 ч) и далее проводили полимеризацию при 60°C. После шлифовки и полировки выполняли контрастирование цитратом свинца (7 мин), напыляли эпоксидные блоки углеродом и визуализировали образцы при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. Элементный состав изучали при помощи рентгеноспектрального микроанализа.

Результаты. Разработанный метод позволяет достичь высокого качества получаемых изображений на увеличениях до пяти тысяч раз, предоставляет возможность идентифицировать форму и структуру интактных металлических и минеральных включений, а также типировать окружающие их клетки, отличая по форме и цитоплазматическому содержанию клетки мезенхимального ряда и иммунокомпетентные клетки. Помимо толщины соединительнотканной капсулы и лейкоцитарной инфильтрации, метод дает возможность оценивать количество и площадь новообразованных сосудов малого калибра, являющихся суррогатным маркером воспаления.

Заключение. Представленный метод позволяет удовлетворительно исследовать структуру образцов, для которых невозможна или значительно затруднена резка, при этом качество полученного изображения на порядок превышает качество изображения, получаемого при световой микроскопии.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия; металлические имплантаты; стенты; минерализация сосудов; кальцификация сосудов; имплантация; биосовместимость.

Для контактов: Кутихин Антон Геннадьевич, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Как цитировать: Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Mishinov S.V., Kutikhin A.G. A novel technique for preparation, staining, and visualization of tissue with metal implants and extraskeletal calcification areas. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(4): 13–22, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.4.02>

English

A Novel Technique for Preparation, Staining, and Visualization of Tissue with Metal Implants and Extraskeletal Calcification Areas

R.A. Mukhamadiyarov, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental and Clinical Cardiology¹;

L.A. Bogdanov, Junior Researcher, Laboratory for Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental and Clinical Cardiology¹;

S.V. Mishinov, MD, PhD, Senior Researcher, Neurosurgeon, Neurosurgery Unit²;

A.G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental and Clinical Cardiology¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd, Kemerovo, 650002, Russia;

²Novosibirsk Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsivyan of the Ministry of Health of the Russian Federation, 17 Frunze St., Novosibirsk, 630091, Russia

The aim of the study was to evaluate the efficacy of a novel technique for preparation, staining, and visualization of tissues containing extra-skeletal mineralization areas, all-metal implants or their prototypes for their subsequent examination using scanning electron microscopy in the backscattered electron mode.

Materials and Methods. After fixation in 10% formalin (24 h), the biomaterial (a titanium nickelide plate with the surrounding tissues after subcutaneous implantation, patented titanium alloy plates with the surrounding tissues after cranioplasty, primary and secondary calcified atherosclerotic plaques) were fixed with 1% osmium tetroxide (12 h) and then stained with 2% aqueous solution of osmium tetroxide (48 h). The samples were further stained with 2% alcoholic uranyl acetate (5 h), dehydrated with isopropanol (5 h) and acetone (1 h), impregnated with a mixture of acetone and epoxy resin Epon (1:1, 6 h) and then embedded into a fresh portion of epoxy resin (24 h), which was followed by polymerization at 60°C. After grinding and polishing, epoxy blocks were counterstained with lead citrate (7 min) and sputter-coated with carbon, then the samples were visualized by scanning electron microscopy in the backscattered electron mode. The elemental composition was studied using X-ray microanalysis.

Results. The developed technique allows obtaining high-quality images at five thousand-fold magnifications, provides the possibility to identify the shape and structure of intact metal and mineral inclusions, and to type the surrounding cells, distinguishing mesenchymal and immunocompetent cells by shape and cytoplasmic content. Apart from connective tissue capsule thickness and leukocyte infiltration, this technique makes it possible to estimate the number and area of newly formed small-caliber vessels representing a surrogate marker of inflammation.

Conclusion. The proposed technique provides the possibility to investigate adequately the structure of samples when their sectioning is impossible or significantly complicated, with image quality remarkably higher than that obtained by light microscopy.

Key words: scanning electron microscopy; metal implants; stents; vascular mineralization; vascular calcification; implantation; biocompatibility.

Введение

Несмотря на активное развитие гистологических и иммуногистохимических методов, совершенствование методов визуализации, а также на разработку новых моделей световых, флуоресцентных и электронных микроскопов [1–3], до настоящего времени отсутствуют эффективные способы гистологического анализа тканей, содержащих цельнометаллические имплантаты и эктопические кальцификаты [4].

Наиболее часто используемыми металлическими имплантатами являются стенты [5, 6] и металличе-

ские пластины [7, 8]. Изучение биосовместимости перспективных сплавов металлов (к примеру, никелида титана) требует имплантации изготавливаемых из них прототипов медицинских изделий лабораторным животным с последующей оценкой формирования соединительнотканной капсулы, инфильтрации иммунокомпетентными клетками и неоваскуляризации [9, 10]. В то же время при резке на микротоме или криотоме вследствие несовпадения плотности тканей неизбежно происходит отделение металлических конструкций от окружающих тканей, что вызывает разрыв ткани и необратимо нарушает ее целостность. Подобная

проблема также наблюдается при наличии в тканях очагов внескелетной минерализации, которая характерна, к примеру, для атеросклероза [11], медиальной кальцификации сосудов [12] или кальцификации нативных [13] и протезных [14] клапанов сердца.

С другой стороны, рутинное гистологическое или иммуногистохимическое окрашивание требует визуализации посредством световой микроскопии, ограниченное разрешение которой не позволяет получать изображения высокого качества при увеличении более чем в 400 раз. Эта проблема не решается даже при использовании конфокальной микроскопии, которая, во-первых, не позволяет адекватно оценить структуру ткани, а во-вторых, как правило, также ограничена увеличением в 630 раз. Адекватная оценка неоваскуляризации, являющейся суррогатным маркером воспаления при имплантации прототипов медицинских изделий, при таком спектре увеличений достаточно затруднительна; кроме того, новообразованные сосуды малого калибра на практике далеко не всегда окрашиваются антителами к классическим эндотелиальным маркерам.

Таким образом, существует потребность в принципиально новом методе обработки, окрашивания и визуализации тканей, содержащих металлические имплантаты или очаги эктопической минерализации. Ранее нашей группой был разработан оригинальный метод длительного осмирования фиксированных в формалине тканей с их последующим обезвоживанием, окрашиванием уранилацетатом, заливкой в эпоксидную смолу, шлифовкой, полировкой и контрастированием цитратом свинца с дальнейшим использованием сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах [15]. Предлагаемый метод в силу применения красителей для просвечивающей электронной микроскопии и соблюдения принципов визуализации при сканирующей электронной микроскопии в режиме обратно-рассеянных электронов позволяет получать изображения, аналогичные просвечивающей электронной микроскопии, но с более низким разрешением (достаточным, однако, для адекватного гистологического анализа) [15].

Цель исследования — оценить эффективность использования оригинального метода обработки, окрашивания и визуализации тканей, содержащих цельнометаллические медицинские изделия или их прототипы, а также очаги внескелетной минерализации, для их последующего изучения с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах.

Материалы и методы

В качестве эталонных объектов исследования были выбраны: 1) пластина (10×10×1 мм) из никелида титана с окружающими тканями, извлеченная через 2 мес после подкожной имплантации крысе линии Wistar;

2) перфорированные пластины из оригинального запатентованного титанового сплава, извлеченные через 1 и 2 мес после ортотопической имплантации новозеландским белым кроликам в процессе краниопластики; 3) каротидная атеросклеротическая бляшка, полученная в результате эндалтерэктомии вместе с небольшим количеством интактной ткани внутренней сонной артерии у мужчины 60 лет вследствие гемодинамически значимой хронической ишемии головного мозга; 4) фрагмент стентированной внутренней сонной артерии, эксплантированный у мужчины 57 лет в результате повторной каротидной эндалтерэктомии вследствие рестеноза, также вызвавшего гемодинамически значимую хроническую ишемию головного мозга.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice), принципами Хельсинкской декларации (2013) и с соблюдением этических принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. До включения в работу от всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

После извлечения образцы тканей помещали в забуференный (pH=7,4) 10% водный раствор формалина («БиоВитрум», Россия). После суточной фиксации в формалине (смена раствора формалина через 12 ч) биоматериал постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в 0,1 М фосфатном буфере в течение 12 ч, затем окрашивали 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 ч. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80 и 95% этанол, все по две смены, каждая смена по 15 мин), окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, Швейцария) в 95% этаноле (5 ч), обезвоживали 99,7% изопропанолом («БиоВитрум») в течение 5 ч и ацетоном («Реахим», Россия) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences) в соотношении 1:1 (6 ч), после чего перенесли в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и далее проводили полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences) при 60°C. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, Дания). Контрастирование цитратом свинца выполняли по Рейнольдсу в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмыжкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия — 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200; Leica Biosystems, Германия). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах выполняли на

электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Для оценки элементного состава исследуемых образцов использовали метод рентгеноспектрального микроанализа, осуществленного с помощью энергодисперсионного спектрометра XFlash 4010 (Bruker Daltonics, Германия), входящего в состав сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi). Элементный анализ был осуществлен в условиях низкого вакуума (давление в камере микроскопа 20 Па) и при ускоряющем напряжении 15 кВ в режиме сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах без использования стандартных образцов. На цифровых микрофотографиях исследовали локализацию электронно-плотных включений (металлоконструкций и очагов минерализации), оценивали структурные особенности биологических тканей в составе исследуемых образцов, идентифицировали эндотелиальные клетки, клетки мезенхимального ряда (гладкомышечные клетки, фибробласты) и иммунокомпетентные клетки.

Результаты

Одним из широко используемых приложений для применения предлагаемого метода может быть исследование взаимодействия тканей лабораторных животных с металлическими имплантатами, в частности на классической модели подкожной имплантации прототипов медицинских изделий. К примеру,

вследствие значительной толщины пластин из никелида титана (1 мм) практически невозможно получать срезы извлеченных образцов с окружающими тканями. Последовательное использование шлифовки и полировки позволяет получить высокую сохранность биологических тканей без повреждения имплантата (рис. 1, а, б). По мере возрастания увеличения улучшалась детализация тонких структур образца. В частности, при увеличении в 1000 раз (рис. 1, в) появляется возможность оценить особенности строения тканей и структуры клеток, прилегающих к металлу. Непосредственно в месте контакта отмечали наличие небольшого щелевидного пространства, содержащего мелкие электронно-плотные гранулы. Вероятно, что образование щели и гранул является артефактом, связанным с процессами забора и обработки материала. Далее по направлению от имплантата уверенно идентифицировался слой плотной соединительной ткани, представленной фиброцитами, имеющими типичную структуру ядер и цитоплазмы. Характерной особенностью этого участка образца было отсутствие иммунокомпетентных клеток реципиента. К моменту забора образцов материал демонстрировал полную биосовместимость.

За слоем плотной соединительной ткани отмечали наличие обильной рыхлой соединительной ткани, причем переход между ними был резким. Следует отметить, что в слое рыхлой соединительной ткани, в отличие от плотной, присутствовали крупные кровеносные сосуды (см. рис. 1, в). Как правило, максимальное количество сосудов регистрировали вблизи контакта рыхлой и плотной соединительной ткани, а по мере удаления от имплантата плотность расположения сосудов снижалась. Крупные кровеносные сосуды имели типичную структуру (рис. 1, в) и демонстрировали отличия в структуре оболочек. Во всех сосудах отмечено наличие слоя эндотелия, однако у части сосудов за ним следовали несколько слоев округлых клеток с цитоплазмой, имеющей повышенную электронную плотность. Дальнейшее повышение увеличения позволяет детализировать структуру цитоплазмы и ядер, что дает возможность увеличить достоверность морфологической идентификации клеток.

Сходный с представленным результатом наблюдали при исследовании эксплантированных мини-пластин из титанового сплава, использовавшихся в качестве краниальных заплат в экспериментах на лабораторных крысах.

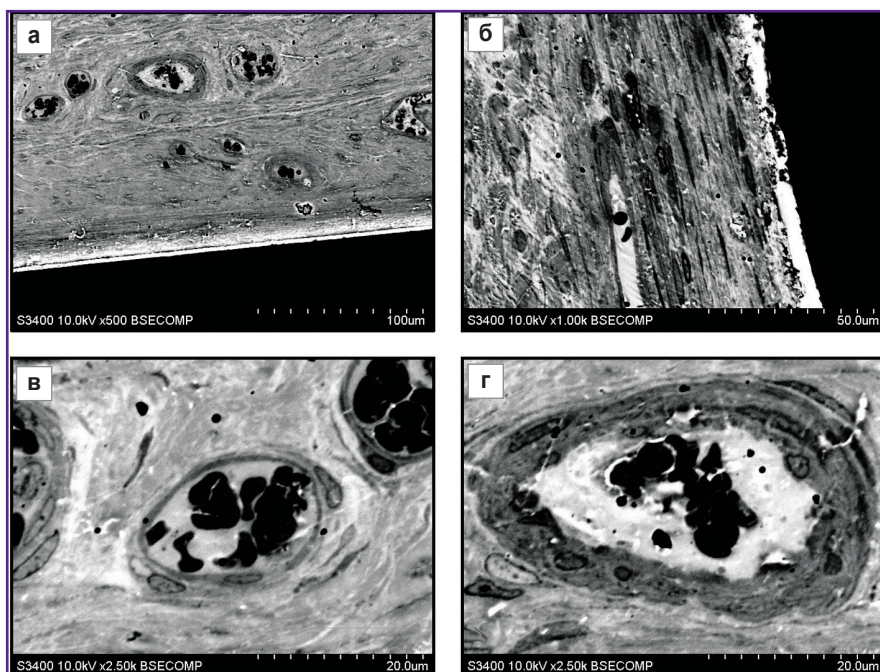


Рис. 1. Пластина из никелида титана, извлеченная через 2 мес после подкожной имплантации крысе Wistar

Визуализация барьера между пластиной и тканями (а — $\times 500$; б — $\times 1000$) и новообразованных сосудов (в, г — $\times 2500$)

Через 2 мес после выполнения краниопластики наблюдали образование слоя соединительной ткани вокруг структурных элементов пластин. На малых увеличениях (рис. 2, а, б) отмечали наличие слоя соединительной ткани, образованной удлинёнными клетками, расположенными параллельно поверхности пластины. При больших увеличениях (рис. 2, в, г) в составе ткани различали наличие двух слоёв. В слое, непосредственно прилегающем к пластине, отмечали рыхлое расположение клеток с большими прозрачными округлыми межклеточниками, а за этим слоем следовал слой вытянутых клеток с удлинёнными ядрами и цитоплазмой умеренной плотности. Переход между слоями был постепенным. На представленном участке образца наблюдали плотное прилегание клеток к материалу заплаты. Прилежающие клетки были различной формы (с преобладанием округлой) и содержали в цитоплазме мелкие гранулы.

В продолжение представленных экспериментов было изучено взаимодействие краниальных заплат с окружающими тканями на ранних сроках имплантации. Создание оболочки заплаты происходило неравномерно: вначале слой фиброзной ткани образовывался вдоль длинной поверхности заплаты, в то время как торцевая часть поверхности оставалась свободной. В этой области наблюдали обширное свободное пространство, не содержащее в своем составе структурных элементов и окруженное тонким слоем соединительной ткани, соединённой с отстоящим от торцевой поверхности тканевым массивом (рис. 3, а). В этой ткани отмечали присутствие кровеносных сосудов и различных типов клеток (рис. 3, б, в), в особенности макрофагов (рис. 3, г–е). Макрофаги имели типичное строение и содержали вакуоли с прозрачным содержимым (см. рис. 3, д, е). По всей вероятности, наличие макрофагов указывает на процессы продуктивного воспаления, вызванного имплантацией искусственного биоматериала.

Исследование гистологического материала, содержащего крупные минеральные включения, также представляет серьезные методические трудности. Очаги минерализации обладают высокой твердостью, механической прочностью и зачастую гетерогенны, что препятствует качественной резке. Замена резки процедурой шлифовки и полировки позволяет решить эту проблему. На рис. 4 показаны

результаты исследования минерализованного участка атеросклеротической бляшки. Минеральные отложения, визуализированные в этом участке, представляли собой крупные электронно-плотные включения внутри неоинтимы с неоднородной структурой (рис. 4, а). Очаг кальцификации окружен слоем слабоструктурированного вакуолизированного материала, обладающего умеренной электронной плотностью. Далее следуют несколько слоев гладкомышечных клеток.

Другим важным достоинством предлагаемого метода является возможность проведения элементного анализа с целью определения фазы фосфата кальция или иного другого минерала, что имеет значение для оценки зрелости минерала, давности формирования очага кальцификации и может влиять на стабильность атеросклеротической бляшки. Изучение результатов элементного анализа трех участков (рис. 4, б, в) показало, что в них присутствуют кальций, фосфор, кислород, натрий, магний и осмий.

В очаге минерализации (участок 1) преобладали кислород, кальций и фосфор, что указывает на его фосфатно-кальциевую природу. Стоит отметить, что постфиксация ткани осмием не приводила к артефактной контаминации им кальциевых включений и, соответственно, к смещению результатов элементного анализа.

В прилежащей к очагу кальцификации

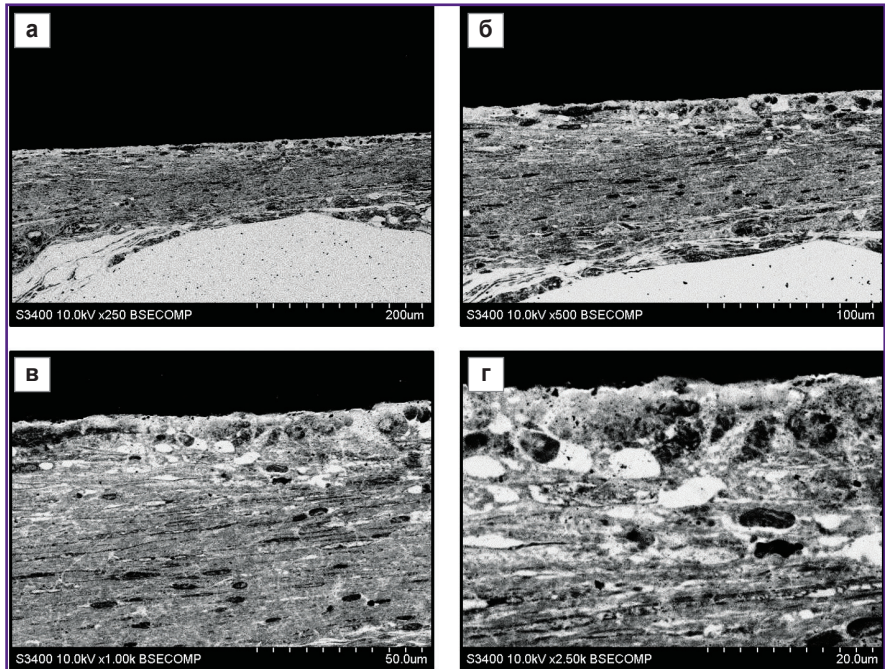


Рис. 2. Перфорированная пластина из оригинального запатентованного титанового сплава, извлеченная через 2 мес после внутричерепной имплантации новозеландским белым кроликам

Визуализация барьера между пластиной и тканями (а — $\times 250$; б — $\times 500$) и разграничение соединительной ткани на два слоя: в — нижележащий плотный, содержащий вытянутые клетки с удлинёнными ядрами, $\times 1000$; г — прилежащий к пластине, рыхлый с округлыми межклеточниками, $\times 2500$

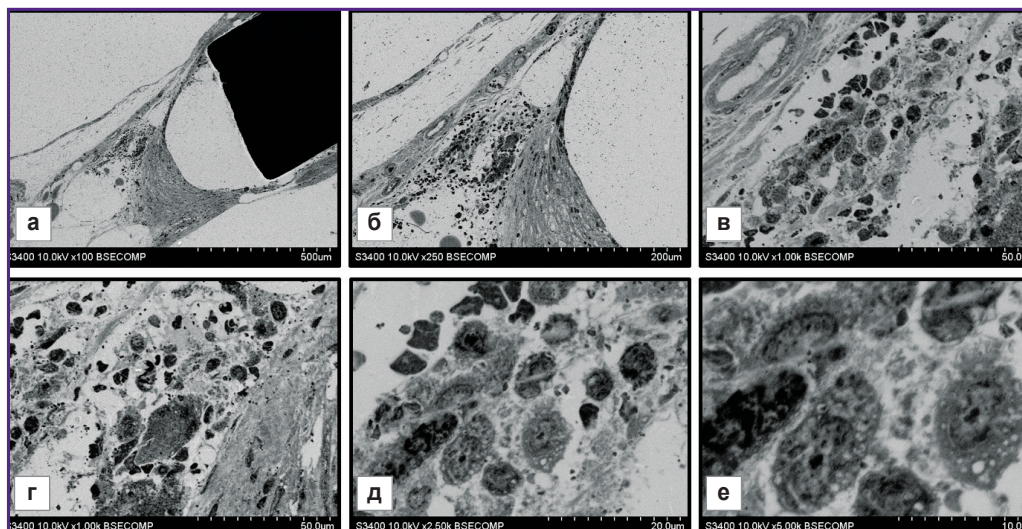


Рис. 3. Перфорированная пластина из оригинального запатентованного титанового сплава, извлеченная через 1 мес после внутричерепной имплантации новозеландским белым кроликом

Процесс образования соединительнотканной капсулы вокруг пластины в сочетании с окружающими тканями, $\times 100$; кровеносные сосуды и множественные клетки в окружающей ткани: б — $\times 250$; в — $\times 1000$; многочисленные макрофаги в очаге продуктивного воспаления: г — $\times 1000$; д — $\times 2500$; е — $\times 5000$

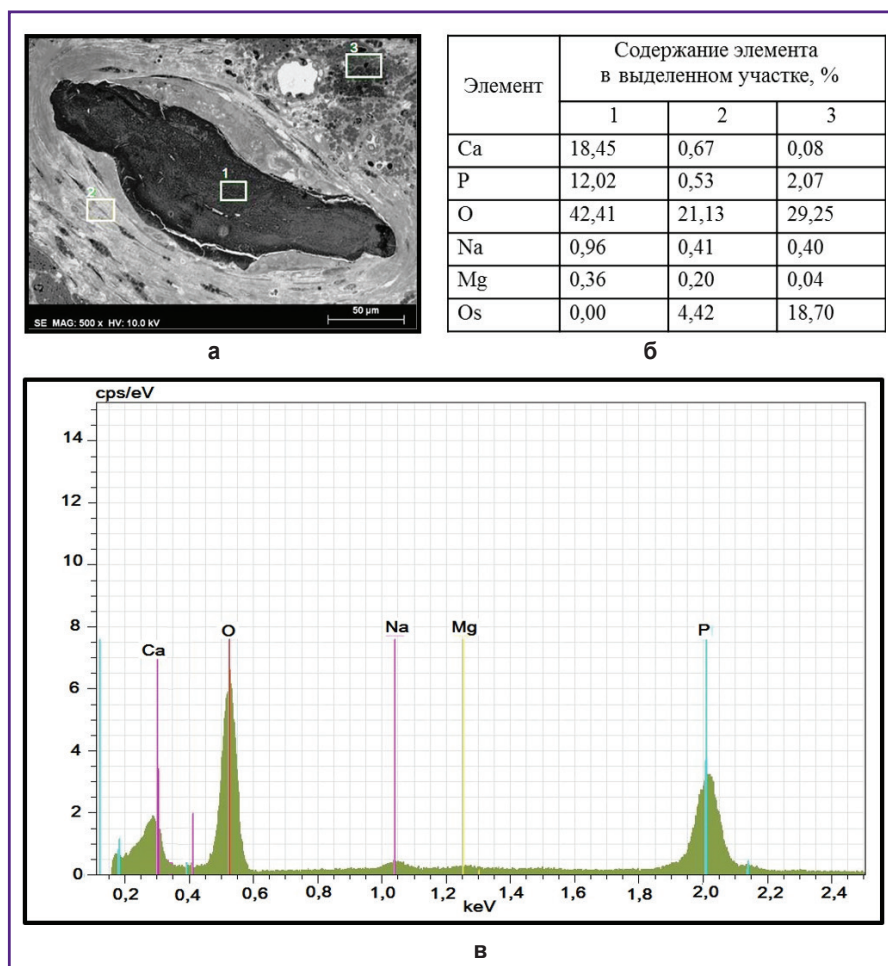


Рис. 4. Структура, клеточное окружение и химический состав очага минерализации в составе атеросклеротической бляшки:

а — кальцификат с окружающими тканями, $\times 500$; белыми прямоугольниками с цифрами 1, 2, 3 показаны области, в которых определяли элементный состав (участок 1 — непосредственно кальцификат; участок 2 — прилегающая к кальцификату плотная соединительная ткань; участок 3 — рыхлая соединительная ткань, обильно содержащая фосфолипиды); б — элементный состав отмеченных на микрофотографии участков; в — график рентгеновского микроанализа участка 1 (кальцификат)

соединительной ткани (участок 2) количество кальция и фосфора составляло около 0,5%, что является высоким показателем для биологической ткани и, возможно, отражает активно идущий метаболизм этих элементов в гладкомышечных клетках. Кроме того, в данном участке регистрировалось определенное содержание осмия (около 4%).

В рыхлой соединительной ткани (участок 3), также обладающей высокой электронной плотностью, содержание кальция по сравнению с прилегающей к очагу минерализации соединительной тканью было в 8 раз меньше, однако количество фосфора и осмия было выше в 4 раза. Большое содержание этих элементов позволяет предположить, что в данном случае высокая электронная плотность участка является признаком наличия значительного количества характерных для атеросклеротической бляшки фосфолипидов, так как они обладают высокой осмиофильностью и в их состав входит фосфор, но не кальций.

Таким образом, предлагаемый метод показал свою эффективность в исследовании биологических образцов с минеральными включениями, позволяя оценивать не только морфологические характеристики, но и элементный состав включений и окружающих их тканей. В случаях, когда нет необходимости изучать элементный состав образцов, можно идентифицировать минеральные включения, основываясь исключительно на морфологических признаках. При исследованиях на малых увеличениях (рис. 5, а, б) хорошо видна общая структура объекта и окружающих его тканей, а также локализация кровеносных сосудов. При повышении увеличения (рис. 5, в, г) происходит детализация окружения очага кальцификации, его гетерогенной структуры, окружающей его соединительнотканной капсулы, а также строения окружающих его клеток.

Особый интерес представляет использование данного метода для исследования образцов, содержащих одновременно металлические и минеральные включения. В частности, таким примером могут служить атеросклеротические бляшки, развившиеся после стентирования, с признаками рестеноза, содержащие минеральные включения (рис. 6, а, б). При тщательном заборе материала отмечали высокую сохранность слоев бляшки. Хорошо визуализировались стойки стента, окруженные слоем плотной соединительной ткани. В периферийном от просвета сосуда направлении наблюдался слой плотной соединительной ткани, представляющей собой остатки

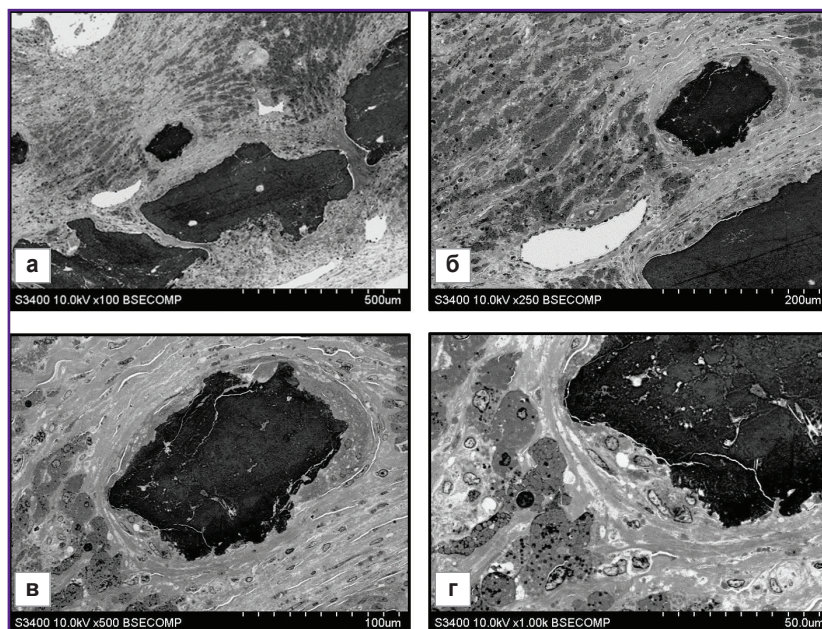


Рис. 5. Очаги минерализации с окружающими тканями в составе атеросклеротических бляшек:

а — общий вид кальцификатов и их локализация в структуре бляшки, $\times 100$; б — локализация крупного новообразованного кровеносного сосуда вблизи кальцификата, $\times 250$; в — соединительнотканная капсула вокруг кальцификата, $\times 500$; г — множественные клетки различной структуры вблизи кальцификата, $\times 1000$

слоя меди сосуда, присутствовавшей в его структуре до стентирования (см. рис. 6, а). Между элементами стента отмечали крупные кровеносные сосуды с тонкими стенками. Глубже стента, в направлении просвета сосуда был виден толстый слой неоинтимы, имеющий различную электронную плотность в радиальном направлении (см. рис. 6, б). На приведенных рисунках наблюдаются области с высокой электронной плотностью, которые на основании морфологических признаков можно идентифицировать как кальцифицированные участки.

При больших увеличениях хорошо визуализировались клетки, присутствующие в структуре образцов. В частности, на рисунках б, в и г представлены два различных участка бляшки, непосредственно контактирующие с кровеносным руслом и имеющие сохранные слои эндотелия. Эндотелиальные клетки отличались сходным строением, однако нижележащие клетки и ткани были различны. Так, в представленном на рис. 6, в сегменте под эндотелием наблюдали слой соединительной ткани, состоящий из плотных волокон, между которыми находились клетки, которые на основании морфологических признаков относили к гладкомышечным клеткам и макрофагам, при этом макрофаги содержали мелкие светлые вакуоли и лизосомы. По всей вероятности, в этом участке происходил процесс постепенного разрушения структуры плотной соединительной ткани. В варианте, представленном на рис. 6, г, под слоем эндотелия

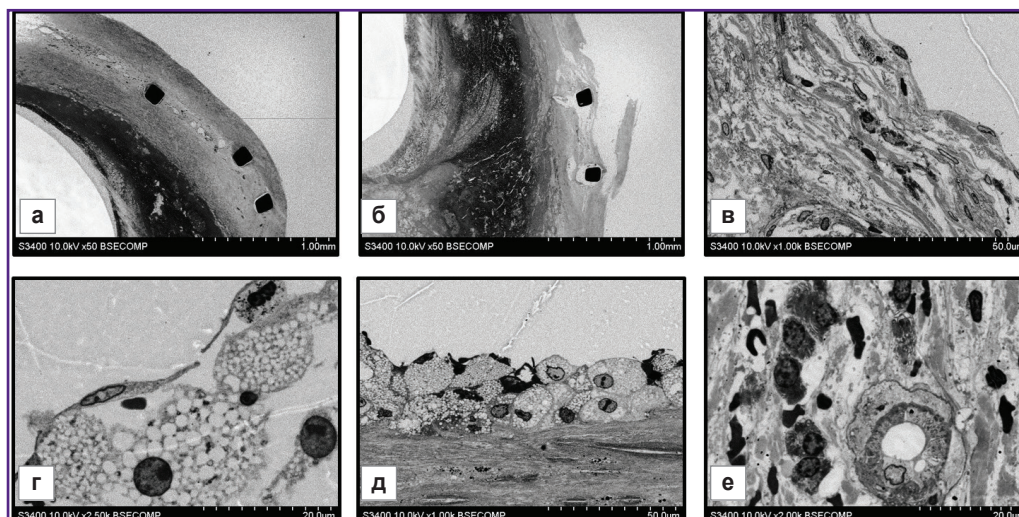


Рис. 6. Структура атеросклеротической бляшки, развившейся в сонной артерии после стентирования и развития рестеноза:

а, б — общий вид структуры удаленной бляшки, содержащей стент и очаги минерализации, $\times 50$; в — частично дезинтегрированная плотная соединительная ткань с соединительнотканскими и иммунокомпетентными клетками, $\times 1000$; г — сохранные эндотелиальные клетки с локализованными под ними пенстыми клетками, $\times 2500$; д — слой пенстых клеток и нижележащая плотная соединительная ткань с щелевидными пространствами, $\times 1000$; е — новообразованный кровеносный сосуд в неоинтимае с расположенными вокруг множественными клетками, $\times 2000$

находили рыхлую ткань с крупными межклеточными пространствами. Клетки, прилегающие к эндотелию, имели округлую форму, а также круглые ядра с тонким слоем хроматина, прилегающим к ядерной мембране и диффузно расположенным в центральной части ядра. Эти клетки имели морфологическое сходство с пенстыми клетками.

В направлении к периферии сосуда слой пенстых клеток примыкал к относительно сохраненному слою плотной соединительной ткани, в составе которой наблюдали присутствие клеток и щелевидных пространств (рис. 6, д). Внутренняя часть неоинтимы была неоднородной. В одной части ее пространства наблюдали отсутствие клеточных структур, в других частях отмечали наличие новообразованных кровеносных сосудов (так называемых *vasa plaquorum*), макрофагов, гладкомышечных клеток (рис. 6, е).

Обсуждение

Разработанный в данной работе оригинальный метод подготовки позволяет в значительной мере решить проблему исследования образцов, содержащих затрудняющие резку структурные элементы (к примеру, металлические или минеральные компоненты). Принципиальными в предлагаемом методе являются два аспекта: замена процедуры резки образца шлифовкой после его заливки в эпоксидную смолу и визуализация структуры образца не просвечивающей, а

сканирующей электронной микроскопией в обратно-рассеянных электронах. При этом изображения имеют практически полное визуальное сходство с получаемыми при помощи просвечивающей электронной микроскопии.

Несмотря на некоторую сложность понимания сути процесса, сам метод является достаточно простым и хорошо воспроизводимым. Для него не требуется специальных модификаций оборудования, высокого качества изображения удается достичь с применением серийных приборов (стандартных моделей растровых электронных микроскопов). В ходе процедур длительного осмирования, выдерживания в спиртовом растворе уранилацетата и контрастирования цитратом свинца удается получить более качественное изображение с высоким контрастом.

При использовании для пропитки изучаемых объектов низковязких эпоксидных смол (Эпон, смола Спурра) возможно исследовать образцы большого размера. В частности, в представленной работе использовались образцы, имеющие толщину свыше 5–7 мм. При соблюдении этого условия длина и ширина образца не имеют принципиального значения. Стоит отметить, что линейные размеры образца не влияют на качество шлифовки и полировки.

Благодаря этим особенностям предлагаемый метод предоставляет возможность детального исследования биологических структур, имеющих массивные, препятствующие резке твердые включения. Это позволяет

изучить структуру не только окружающих тканей, но и самих включений, что бывает необходимо, если заранее неизвестна природа объектов или они специально получены в качестве имплантата оригинальным методом (например, спеканием или 3D-печатью) и их структура определяет взаимодействие с биологическими тканями.

Приведенные результаты показали, что анализ полученных изображений позволяет удовлетворительно идентифицировать сами клетки и некоторые внутриклеточные структуры, в частности ядра, цитоплазму и вакуоли. Исходя из этих характеристик, а также формы и локализации клеток, можно идентифицировать не только их тип, но и образованные ими ткани, а также физиологическое состояние.

Ограничением рассматриваемого метода является относительно низкое разрешение: изображения высокого качества удается получить на предельном увеличении в пять тысяч раз, что на порядок уступает возможностям просвечивающих электронных микроскопов аналогичного класса. Это обусловлено тем, что изображение зависит от глубины слоя, на который проникают электроны. При отражении от глубоких слоев траектория рассеянных электронов отклоняется, что приводит к «смазыванию» изображения. Возможными вариантами решения этой проблемы могут быть совершенствование методов контрастирования образцов и оптимизация режимов визуализации.

Заключение

Представленный оригинальный метод обработки, окрашивания и электронно-микроскопической визуализации позволяет удовлетворительно исследовать структуру образцов, для которых невозможна или значительно затруднена резка. При этом качество полученного изображения на порядок превышает получаемое при световой микроскопии.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований Сибирского отделения РАН в рамках фундаментальной темы Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний №0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликта интересов.

Литература/References

1. Timmermans F.J., Otto C. Contributed review: review of integrated correlative light and electron microscopy.

Rev Sci Instrum 2015; 86(1): 011501, <https://doi.org/10.1063/1.4905434>.

2. Combs C.A., Shroff H. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr Protoc Neurosci* 2017; 79: 2.1.1–2.1.25, <https://doi.org/10.1002/cpns.29>.

3. Ryan J., Gerhold A.R., Boudreau V., Smith L., Maddox P.S. Introduction to modern methods in light microscopy. *Methods Mol Biol* 2017; 1563: 1–15, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6810-7_1.

4. 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, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.03.005>.

5. Sharma S.P., Dahal K., Khatra J., Rosenfeld A., Lee J. Percutaneous coronary intervention vs coronary artery bypass grafting for left main coronary artery disease? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Cardiovasc Ther* 2017; 35(3), <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12260>.

6. Calvet D., Mas J.L.; Carotid Stenosis Trialists' Collaboration. Symptomatic carotid stenosis: is stenting as safe and effective as carotid endarterectomy? *Curr Opin Neurol* 2017; 30(1): 22–27, <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000409>.

7. Zanotti B., Zingaretti N., Verlicchi A., Robiony M., Alfieri A., Parodi P.C. Cranioplasty: review of materials. *J Craniofac Surg* 2016; 27(8): 2061–2072, <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000003025>.

8. Rony L., Lancigu R., Hubert L. Intraosseous metal implants in orthopedics: a review. *Morphologie* 2018; 102(339): 231–242, <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2018.09.003>.

9. Лотков А.И., Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Кашин О.А., Кудряшов А.Н. Основные направления модификации поверхности металлических эндоваскулярных стентов в решении проблемы рестенозов (обзор, 1 часть). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2017; 6(1): 122–130, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-122-130>.

Lotkov A.I., Matveeva V.G., Antonova L.V., Kashin O.A., Kudryashov A.N. Surface modification of bare-metal stents for preventing restenosis (part 1). *Complex Issues of Cardiovascular Diseases* 2017; 6(1): 122–130, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-122-130>.

10. Лотков А.И., Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Кашин О.А., Кудряшов А.Н. Основные направления модификации поверхности металлических эндоваскулярных стентов в решении проблемы рестенозов (обзор, 2 часть). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2017; 6(3): 131–142, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-6-3-131-142>.

Lotkov A.I., Matveeva V.G., Antonova L.V., Kashin O.A., Kudryashov A.N. Surface modification of bare-metal stents for preventing restenosis (part 2). *Complex Issues of Cardiovascular Diseases* 2017; 6(3): 131–142, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-6-3-131-142>.

11. Wu M., Rementer C., Giachelli C.M. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93(4): 365–373, <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9712-z>.

12. Lanzer P., Boehm M., Sorribas V., Thiriet M., Janzen J.,

Zeller T., St Hilaire C., Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 2014; 35(23): 1515–1525, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu163>.

13. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Ovcharenko E.A., Kutikhin A.G. Development of calcific aortic valve disease: do we know enough for new clinical trials? *J Mol Cell Cardiol* 2019; 132: 189–209, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.05.016>.

14. Bre L.P., McCarthy R., Wang W. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes. *Curr Med Chem* 2014; 21(22): 2553–2564, <https://doi.org/10.2174/0929867321666131212151216>.

15. Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратнорассеянных электронах. *Фундаментальная и клиническая медицина* 2019; 4(1): 6–14, <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14>.

Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Histology and histopathology of blood vessels: backscattered scanning electron microscopy approach. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina* 2019; 4(1): 6–14, <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14>.