

ПОДГОТОВКА И АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЯ АДГЕЗИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ БИОКЕРАМИКИ КЛЕТОК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

К. В. Данилко[✉], В. А. Солнцев, Р. В. Плотницкий, А. В. Михайлова, А. Р. Билялов, С. С. Чугунов, М. Ф. Галаутдинов, В. Н. Акбашев, И. Ш. Ахатов
Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в настоящее время позволяет анализировать поверхности различных материалов, в том числе эукариотических клеток. Способность клеток различных тканей организма прикрепляться и расти на поверхности материалов для имплантации служит важной характеристикой их биосовместимости. СЭМ позволяет напрямую визуализировать характер контакта клеток с поверхностью. Однако методика подготовки проб к анализу традиционно требует высокой степени обезвоживания образца и применения токсичного тетраоксида оsmия. Целью работы было провести оптимизацию методики подготовки животных клеток, растущих на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ. В работе предложена методика подготовки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, выращенных на поверхности трех типов биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ. Она включает фиксацию с помощью альдегида, спиртовое обезвоживание, подкрашивание красителем Гимзы и высушивание с последующим напылением золота. Предложен также алгоритм поиска прикрепленных клеток на поверхности пористого и шероховатого материала. Данный подход позволяет быстро подготовить клетки к СЭМ-анализу без использования высокотоксичных реагентов.

Ключевые слова: биокерамика, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка, напыление, мезенхимальные стволовые клетки

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российской научного фонда № 23-15-20042. Работа выполнена на оборудовании, приобретенном за счет средств программы «Приоритет 2030».

Вклад авторов: К. В. Данилко — планирование исследования, разработка протоколов исследования, анализ результатов, проведение СЭМ, подготовка черновика рукописи; В. А. Солнцев, Р. В. Плотницкий — культивирование клеток, подготовка к СЭМ; А. В. Михайлова — проведение СЭМ, анализ результатов; А. Р. Билялов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; С. С. Чугунов — планирование исследования, анализ литературы; М. Ф. Галаутдинов — сбор, анализ, интерпретация данных; В. Н. Акбашев — анализ литературы, подготовка рукописи; И. Ш. Ахатов — планирование исследования, редактирование рукописи.

✉ Для корреспонденции: Ксения Владимировна Данилко
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; kse-danilko@yandex.ru

Статья получена: 13.11.2025 **Статья принята к печати:** 04.12.2025 **Опубликована онлайн:** 17.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.072

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PREPARATION AND PROCEDURE FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY EXAMINATION OF CELLS ADHERED TO BIOCERAMIC SURFACES

Danilko KV[✉], Solntsev VA, Plotnitsky RV, Mikhailova AV, Bilyalov AR, Chugunov SS, Galautdinov MF, Akbashev VN, Akhatov ISh
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Scanning electron microscopy (SEM) enables the analysis of surfaces of various materials, including eukaryotic cells. The ability of cells of various body tissues to attach and grow on the surface of implantation materials is an important characteristic of their biocompatibility. SEM visualizes how cells adhere to the surfaces. However, sample preparation for SEM analysis traditionally requires extensive dehydration and the use of toxic osmium tetroxide. This study aimed to optimize the process of preparing animal cells grown on the surface of bioceramic samples for SEM analysis. We propose a new SEM analysis preparation method for mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue cultured on the surface of three types of bioceramics. The method includes fixation with aldehyde, alcohol dehydration, staining with Giemsa dye, drying, and gold spraying. We also propose an algorithm for detecting cells attached to the surface of a porous and rough material. This approach accelerates the preparation of cells for SEM analysis and eliminates the need for highly toxic reagents.

Keywords: биокерамика, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка, спреттеринг, мезенхимальные стволовые клетки

Funding: the work was supported by grant No. 23-15-20042 from the Russian Science Foundation. The study utilized the equipment purchased under the "Priority 2030" program.

Author contribution: Danilko KV — study planning, development of study protocols, analysis of results, conducting SEM analysis, manuscript drafting; Solntsev VA, Plotnitsky RV — cell culturing, preparation for SEM; Mikhailova AV — conducting SEM analysis, analysis of results; Bilyalov AR — study planning, literature analysis, interpretation of data, manuscript drafting; Chugunov SS — study planning, literature analysis; Galautdinov MF — data collection, analysis, interpretation; Akbashev VN — literature analysis, manuscript drafting; Akhatov IS — study planning, manuscript editing.

✉ Correspondence should be addressed: Ксения В. Данилко
Ленина, 3, Уфа, 450008, Россия; kse-danilko@yandex.ru

Received: 13.11.2025 **Accepted:** 04.12.2025 **Published online:** 17.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.072

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) позволяет визуализировать поверхности различных материалов. В последнее время этот метод находит все большее применение для изучения биологических объектов и характера взаимодействия эукариотических клеток с органическими и

неорганическими материалами, в частности керамическими имплантатами [1].

Биокерамические материалы занимают важное место среди современных биосовместимых конструкций, используемых в регенеративной медицине, травматологии-

ортопедии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии. Благодаря своей химической инертности, биосовместимости и способности к остеоинтеграции они широко применяются при создании костных имплантатов, остеопластических композиций и тканеинженерных каркасов. Наиболее изученные представители этой группы — гидроксиапатит, трикальцийфосфат и различные композиции на их основе [2]. Морфология и микрорельеф поверхности биокерамики в значительной степени определяют характер адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток, что напрямую влияет на качество интеграции имплантата с тканями организма [3].

Оценка взаимодействия клеток с поверхностью биоматериала требует применения высокоточных методов визуализации, способных воспроизвести топографию образца на микронном и субмикронном уровнях. Традиционные методы световой и флуоресцентной микроскопии позволяют лишь косвенно оценивать состояние клеток и их распределение, но не дают представления о характере контакта между клеточной мембраной и поверхностью материала. В этом отношении сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является оптимальным инструментом, обеспечивающим визуализацию клеточных структур с высоким пространственным разрешением и глубиной резкости. Метод позволяет детально рассматривать форму клеток, состояние их цитоплазматических выростов, характер прилегания к поверхности и степень формирования внеклеточного матрикса [4].

Однако применение СЭМ для анализа биологических образцов сопряжено с рядом методических трудностей. Основные ограничения — высокий процент содержания воды в клетках, отсутствие электрической проводимости и склонность к разрушению при высушивании [5]. Для предотвращения деформации клеточной структуры требуются фиксация и постепенная дегидратация, что традиционно достигается с использованием токсичных веществ, таких как глутаровый альдегид и тетраоксид осмия, и многоступенчатых процедур критической сушки. Тетраоксид осмия относится к высокотоксичным соединениям, что требует организации особых условий для обеспечения безопасности. Протокол сушки в критической точке требует подбора условий для каждого конкретного материала и типа клеток и занимает около 24 ч. Кроме того, большинство существующих протоколов ориентированы на исследование плоских стеклянных или металлических подложек, тогда как биокерамические образцы обладают выраженной микрорельефной и пористой поверхностью, что осложняет поиск клеток и снижает воспроизводимость результатов [6, 7].

Токсичность реагентов, длительность подготовки и высокая стоимость оборудования (в частности, установки для критической сушки с диоксидом углерода) делают подобные протоколы малопригодными для рутинных лабораторных исследований. При этом сохранение морфологических особенностей клеток и обеспечение качественной визуализации при минимальных изменениях исходной структуры остаются критически важными условиями для корректной интерпретации данных [8]. Следовательно, возникает необходимость в разработке более простой, экономичной и безопасной схемы пробоподготовки клеточных образцов для СЭМ-анализа, которая обеспечивала бы высокую воспроизводимость результатов и хорошее качество изображений без применения токсичных соединений и дорогостоящих технологий.

Особое значение имеет создание алгоритма, позволяющего надежно фиксировать и визуализировать клетки, выращенные на поверхности биокерамики, с сохранением их формы, целостности мембранных и элементов цитоскелета. Такая методика должна быть адаптирована к особенностям материала, обладать технологической простотой и не требовать сложного оборудования. Реализация этих условий позволит значительно расширить возможности рутинной морфологической оценки биосовместимых материалов и повысить доступность СЭМ-анализа в лабораторной практике [9].

Цель нашей работы — оптимизация методики подготовки животных клеток, растущих на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов биокерамики

Подробно методика изготовления биокерамических образцов описана нами ранее [10]. Для эксперимента использовали три вида образцов биокерамических материалов. Материал для 3D-печати на основе аллотрансплантата, полученный из кадаверной костной ткани человека, предварительно подвергли прокаливанию, измельчили в порошок микронного размера для создания фотополимеризуемой суспензии и использовали в процессе аддитивного производства на основе цифровой обработки света. Для аддитивно изготовленных образцов гидроксиапатита и трикальцийфосфата после печати проводили термическую обработку — спекание при различных температурах для удаления влаги и органических компонентов связующей системы. Все образцы представляли собой цилиндры диаметром 3,6–4,5 мм и высотой 1,9–2,6 мм.

Стерилизация

Стерилизацию проводили с помощью нагревания образцов в сухожаровом шкафу до 180 °C в течение 60 мин. После стерилизации образцы размещали в лунках культурального планшета в боксе микробиологической безопасности 2-го класса («Ламинарные системы», Россия).

Подготовка клеток

Мезенхимальные стволовые клетки человека из жировой ткани (МСК ЖТ) (Биолот, Россия) культивировали в среде DMEM (Capricorn, Германия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Biowest, Франция) и 2% L-глутамина (Servicebio, Китай) до достижения ими 90% покрытия дна культурального планшета. Далее клетки снимали с помощью 0,25%-го раствора трипсина («Биолот», Россия), промывали 1 раз раствором фосфатно-солевого буфера без кальция и магния (ФСБ, Панэко, Россия) и снова ресуспенсировали в полной культуральной среде.

Посев клеток в планшеты

После ресуспенсирования МСК рассевали по 5000 клеток на лунку 96-луночного культурального планшета в концентрации 100 000 клеток на 1 мл. Для этого 50 мкл суспензии наносили на центр цилиндрического образца и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °C, содержании 5% CO₂ в воздухе в условиях влажной среды для прикрепления клеток к поверхности. Для каждого типа

образцов готовили по две лунки планшета. По истечении времени адгезии в каждую лунку добавляли по 150 мкл полной культуральной среды и оставляли клетки для пролиферации на образцах биокерамики в течение 7 суток в условиях СО₂-инкубатора.

Мезенхимальные стволовые клетки, адгезированные к поверхности после культивирования, были готовы к анализу с помощью СЭМ.

Подготовка клеток на поверхности биокерамики к СЭМ

Промывка образцов

Необходимые реагенты: фосфатно-солевой буфер без кальция и магния.

Этапы промывки

1. По истечении времени культивирования во все анализируемые лунки добавляли по 500 мкл ФСБ для промывания образцов керамики от остатков питательной среды.

2. Жидкость аккуратно отбирали.
3. Процедуру повторяли дважды.

Фиксация и дегидратация образцов

Необходимые реагенты: глутаровый альдегид 2,5% по объему в деионизированной воде; физиологический раствор (NaCl, 0,9%); этанол 50% (здесь и далее готовили разведения из 95%-го этанола разбавлением деионизированной водой по объему); этанол 70%; этанол 80%; этанол 90%; этанол 95%; этанол 99% надкупоросный.

Этапы фиксации

1. В каждую лунку добавляли по 300 мкл 2,5%-го глутарового альдегида на 30 мин. Объем глутарового альдегида в 10 раз превышал объем образца для фиксации.

2. Глутаровый альдегид удаляли и добавляли к образцам 10-кратный объем физиологического раствора для промывания.

3. Удаляли жидкость полностью.
4. Процедуру промывания повторяли дважды.

Этапы дегидратации

5. После удаления жидкости проводили дегидратацию клеток. Добавляли этанол 50% до полного покрытия образца.

6. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

7. Удаляли этанол 50% и добавляли этанол 70% до полного покрытия образца.

На данном этапе можно прервать протокол и хранить образцы при температуре +4 °C в закрытом состоянии для предотвращения испарения спирта.

8. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

9. Удаляли этанол 70% и добавляли этанол 80% до полного покрытия образца.

10. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

11. Удаляли этанол 80% и добавляли этанол 90% до полного покрытия образца.

12. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

13. Удаляли этанол 90% и добавляли этанол 95% до полного покрытия образца.

14. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

15. Удаляли этанол 95% и добавляли этанол 99% до полного покрытия образца.

16. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

17. После завершения фиксации образец высушивали на воздухе и переходили к окрашиванию или хранили образцы до использования.

Окрашивание

Процедуру окрашивания клеток на поверхности керамического образца использовали для их визуализации, поскольку в процессе культивирования, перемещения, промывания и фиксации образцы могут переворачиваться в лунках. Клетки же преимущественно будут располагаться на поверхности образца, обращенной в сторону жидкости в лунке, но не к ее дну. Окрашенные клетки можно рассмотреть невооруженным глазом либо в световой микроскоп для выбора ориентации образца при монтировании на столик для СЭМ.

Необходимые реагенты: раствор красителя Гимзы, Панэко, Россия.

Этапы окрашивания

1. Образец полностью покрывали раствором красителя Гимзы.

2. Инкубировали 2 мин при комнатной температуре.

3. Заполняли лунку деионизированной водой для промывания.

4. Покачивали планшет в течение 2 мин.

5. Жидкость полностью удаляли и промывали лунки большим объемом водопроводной воды до просветления жидкости.

6. Жидкость полностью удаляли и снова промывали образец деионизированной водой в течение 2 мин.

7. Жидкость удаляли, а окрашенный образец высушивали на воздухе и хранили в закрытом планшете до использования.

Напыление

Необходимое оборудование: настольная установка магнетронного напыления DSR1 (Nanostructured coatings Co, Иран).

Этапы напыления

1. Керамические образцы закрепляли на алюминиевые столики для СЭМ диаметром 1 см с помощью электропроводящей ленты.

2. Предварительная окраска по Гимзе позволяла визуализировать участки, содержащие клетки, окрашенные в сине-фиолетовый цвет. Поверхность с такой окраской ориентировали вверх, без окраски — вниз и фиксировали к электропроводящей ленте.

3. Далее на образцы наносили слой золота толщиной 20–30 °А с помощью напылительной установки в автоматическом режиме.

Анализ поверхности с помощью СЭМ

Необходимое оборудование: сканирующий электронный микроскоп KYKY-EM6900LV (KYKY Technology Co., Ltd. Китай).

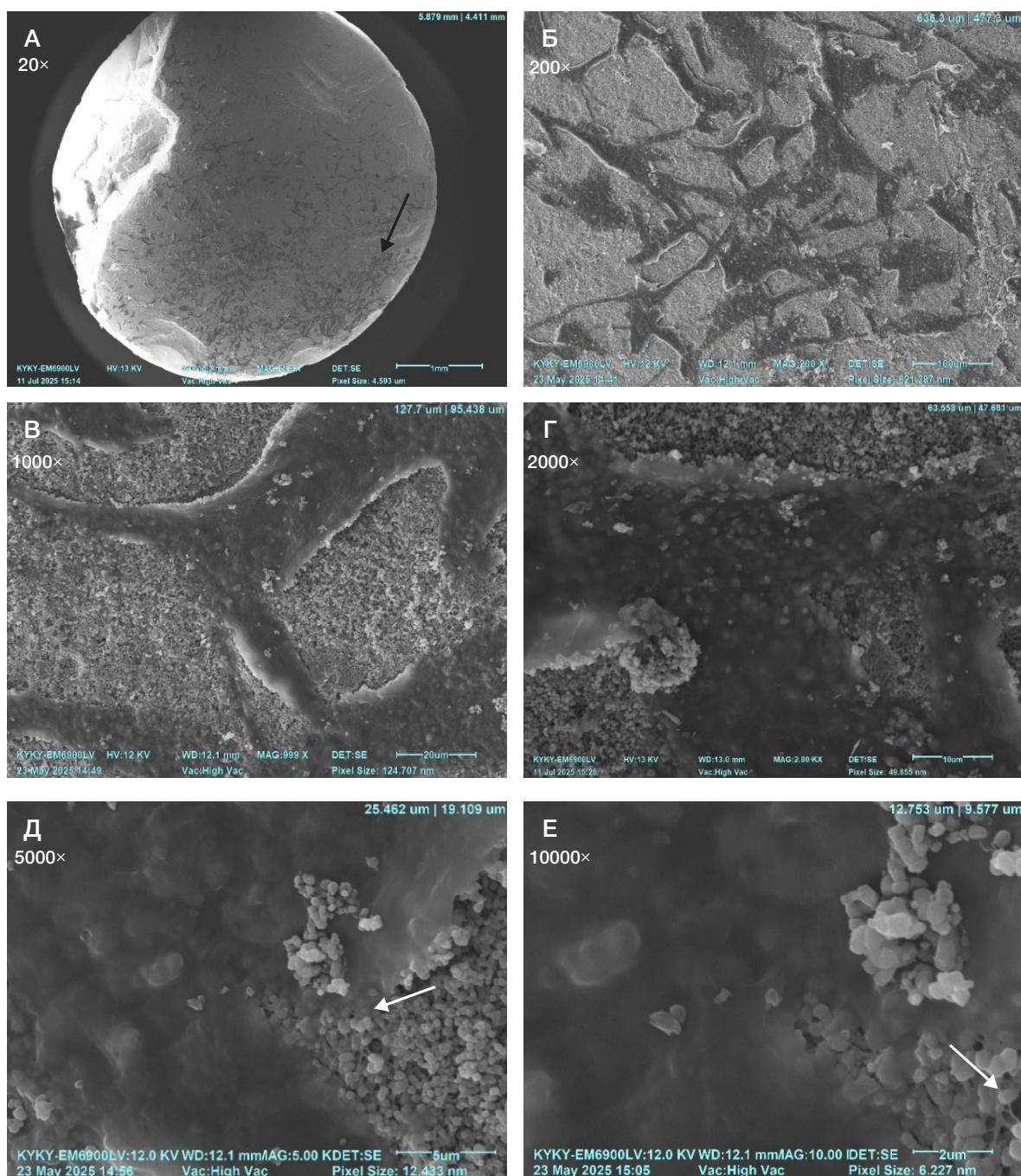


Рис. 1. Сканограммы поверхности образцов трикальцийфосфата после спекания при 800 °C с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. Черной стрелкой показаны темные клетки на поверхности цилиндрического образца трикальцийфосфата, белой стрелкой — тонкие выросты мембранны. Клетки крупные, образуют скопление, сильно распластаны, контактируют между собой широкими выростами, поверхность клеток ровная, гладкая, просматриваются тонкие выросты мембранны под телом клетки и по периферии. Увеличение от 20× до 10 000×

Этапы анализа

1. Разместили столики с закрепленными образцами в рабочей камере микроскопа.
2. Установили режим высокого вакуума, напряжение 11–13 кВ, рабочее расстояние 10–14 мм, использовали детектор SE электронов.
3. Провели поиск образца и его центрирование на минимальном увеличении (рис. 1А).
4. Окрашенные красителем Гимзы клетки визуализируются как более темные структуры на поверхности (рис. 1А, черная стрелка).
5. Выбирали отдельные наиболее темные участки на поверхности образца керамики, устанавливали увеличение 2000× или 5000× и настраивали изображение

для подтверждения наличия клетки на данном темном участке. Примечание: данный этап необходим, поскольку более темными могут выглядеть также отдельные участки материала биокерамики.

6. При обнаружении в области темных фрагментов морфологических отличий от частиц биокерамики выбирали меньшее увеличение (200× или 500×) и проводили поиск объектов, отвечающих параметрам клетки (рис. 1Б).

7. В случае обнаружения клетки или группы клеток с помощью данного алгоритма, наблюдали структуры с темной мембраной, практически ровной поверхностью, под которой визуализировались очертания частиц материала керамики или выросты, тяжи разной длины как под телом клетки, так и в области ее внешних краев. Поверхность

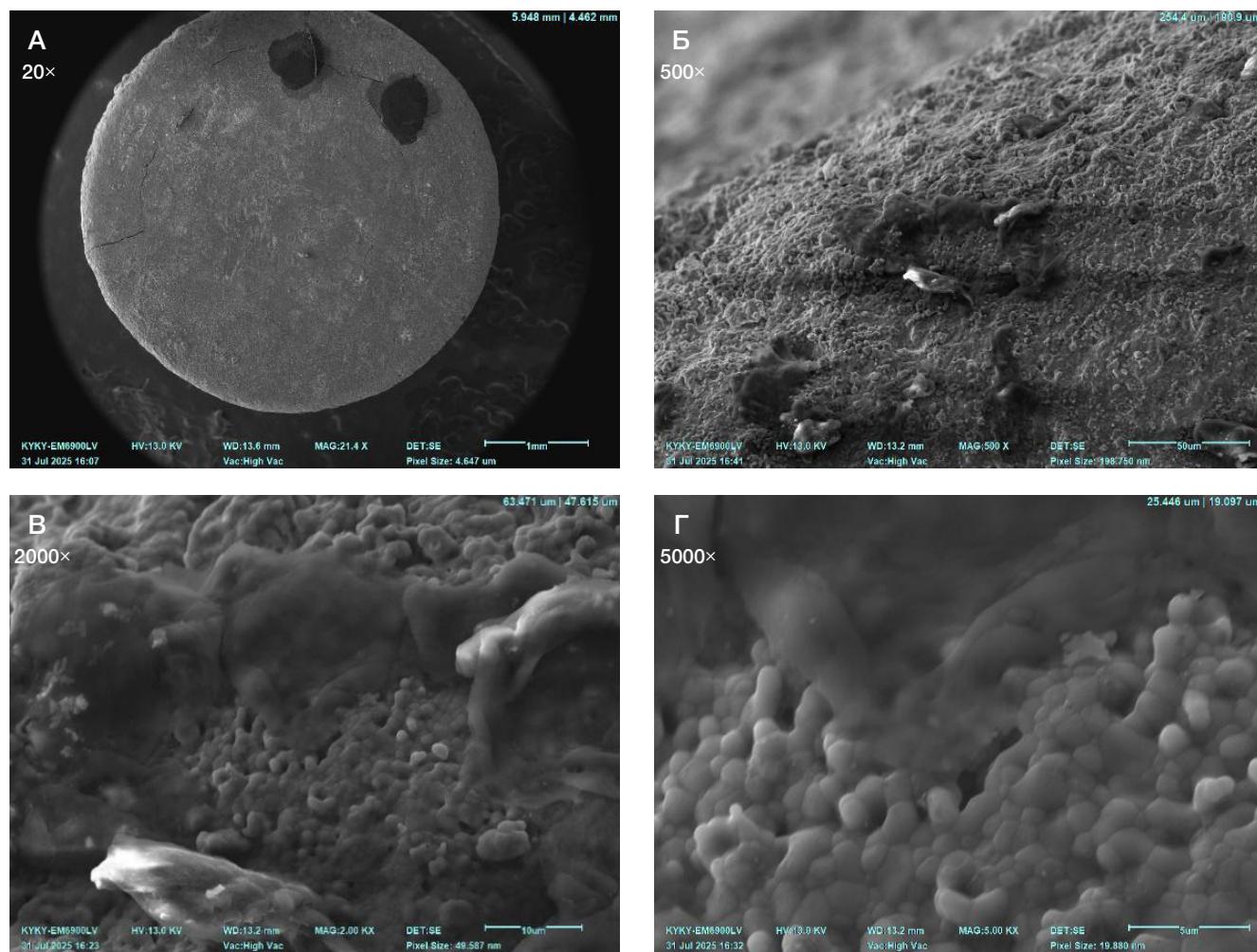


Рис. 2. Сканограммы поверхности образцов гидроксиапатита после спекания при 1250 °С с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. Поверхность клеток складчатая, гладкая, наблюдается эффект наползания тела клетки. Увеличение от 20x до 5000x

клетки могла быть менее ровной в зависимости от характера ее роста и качества обезвоживания материала (рис. 1–4).

8. После визуального обнаружения клетки проводили сканирование и получали изображение при условном увеличении 200x, 500x, 2000x, 5000x, 10 000x (рис. 1–4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования биосовместимости с помощью СЭМ было подготовлено 15 образцов на трех типах материалов. Использованный в работе подход позволил обнаружить клетки на поверхности всех образцов из обработанного костного аллогенного материала человека, гидроксиапатита и трикальцийфосфата (рис. 1–5). Анализ поверхности материала с помощью СЭМ позволил охарактеризовать клеточную морфологию: размеры и форму клеток, однородность поверхности или ее шероховатость, наличие выростов краевой зоны клетки и их длину, наличие выростов под телом клетки, количество клеток на образце.

Среди обнаруженных нами клеток можно выделить несколько морфологических вариантов, характеризующих степень прикрепления клеток к поверхности материала (рис. 5): 1) высокая степень адгезии — крупные, распластанные по поверхности клетки с очень мелкими складками, под которыми можно различить очертания частиц материала поверхности, с длинными тонкими

выростами плазматической мембранны по краям клетки и под ее телом; 2) средняя степень адгезии — клетки распластанные, с мелкими неровностями поверхности, средних размеров, с небольшим числом широких и тонких выростов мембранны в основном по периферии клетки; 3) низкая степень адгезии — относительно некрупные, плоские клетки, имеющие хорошо заметные складки, хорошо заметные регулярные неровности поверхности, без выростов мембранны под телом клетки и по периферии, очертания гранул материала не просматриваются.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что предложенный алгоритм подготовки клеточных культур, выращенных на поверхности биокерамических образцов, обеспечивает сохранение морфологии клеток и достоверную визуализацию зон их взаимодействия с материалом при помощи СЭМ. В отличие от классических схем пробоподготовки, требующих сложного оборудования, длительной подготовки проб и токсичных реагентов, предложенный подход основан на последовательной фиксации и мягкой дегидратации образцов, что делает метод применимым в условиях стандартной лаборатории. Ранее описанные методики, несмотря на применение похожей схемы дегидратации [11], часто приводили к деформации мембранны и потере клеточных псевдоподий вследствие изменения поверхностного

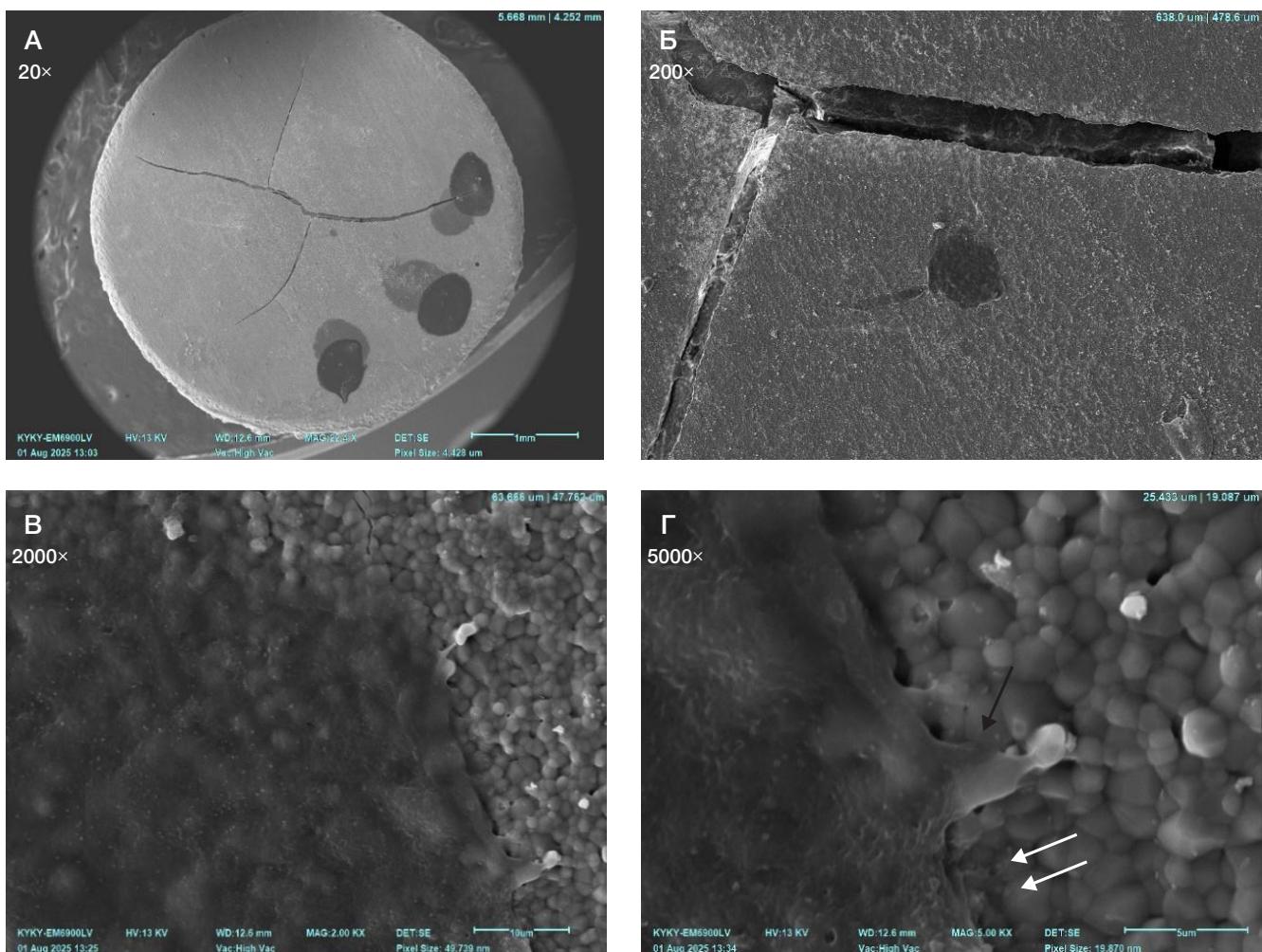


Рис. 3. Сканограммы поверхности образцов трикальцийфосфата после спекания при 1250 °C с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. Чёрная стрелка — широкая псевдоподия. Белая стрелка — тонкий вырост с расширением на конце. Увеличение 20x–5000x. Высокая степень адгезии клетки, она плотно прилегает к поверхности, сильно уплощена, под телом клетки просматривается контур гранул материала, поверхность имеет мелкие углубления, наблюдаются выросты различной толщины по периметру клетки и просматриваются под ее телом

натяжения при обработке образцов. Современные исследования указывают, что даже минимальные различия в микрорельефе и пористости биокерамики могут существенно влиять на адгезию и пространственную ориентацию клеток [12]. В нашем исследовании фиксация с последовательной дегидратацией в градиенте этанола при комнатной температуре позволила избежать подобных искажений и сохранить естественные контуры клеток и микроструктуру материала. Часто применяемая сушка препарата в критической точке является относительно трудоемкой и продолжительной по времени процедурой [13]. В нашем исследовании удалось ограничиться дегидратацией и последующим плазменным напылением золота для обеспечения токопроводимости образца.

Особое значение имеет использование ориентационной окраски раствором красителя Гимзы перед напылением. Этот прием позволил точно позиционировать участки с адгезированными клетками и значительно сократил время поиска зон интереса при электронно-микроскопическом анализе. Подобная комбинация методов визуализации ранее не была описана в отношении биокерамических подложек и может быть полезна при морфологических исследованиях других типов материалов.

Анализ микроскопических изображений показал сохранение характерной для мезенхимальных стволовых клеток формы, наличие периферических выростов и

выраженных контактных зон с поверхностью керамики. На образцах трикальцийфосфата клетки демонстрировали более плотную адгезию и формирование протяженных мембранных выростов, что согласуется с данными о высокой биосовместимости кальций-фосфатных материалов и их стимулирующем влиянии на остеогенную дифференцировку [14]. В то же время на аллогенном материале наблюдалась вариабельность формы клеток, которая зависела от температуры обработки материала и, вероятно, обусловлена неоднородностью структуры поверхности.

Предложенный протокол сочетает воспроизводимость, технологическую простоту и безопасность. Он может быть адаптирован для анализа других типов клеток и подложек, что расширяет возможности морфологической оценки клеточно-материальных интерфейсов в биомедицинских исследованиях и разработке остеointегрирующих имплантатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование имеет ряд ограничений. Прежде всего, анализ носил преимущественно качественный характер и не включал количественную морфометрию клеточных структур, что могло бы повысить объективность оценки. Кроме того, работа выполнена на одной клеточной модели —

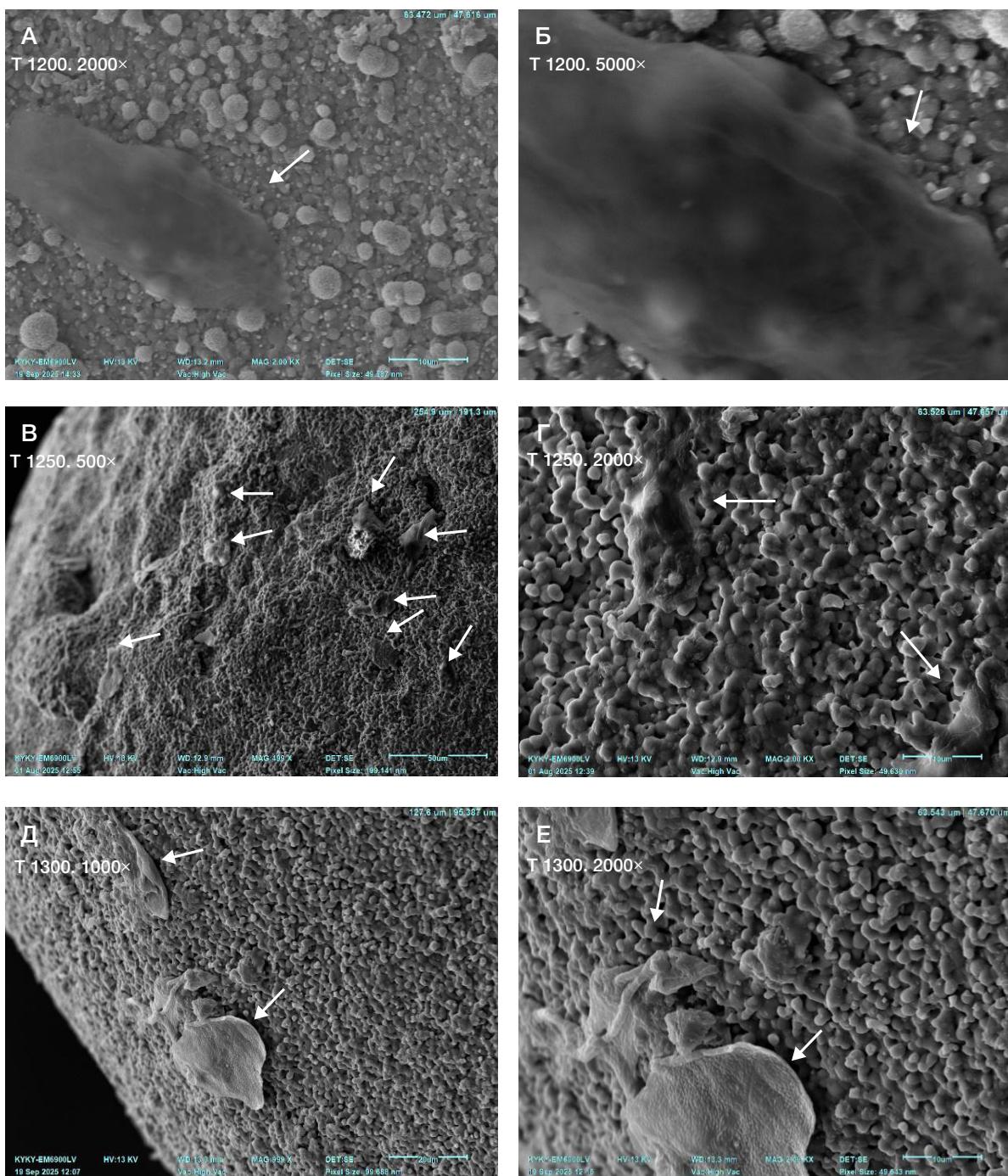


Рис. 4. Характер роста клеток на образцах из костного аллотрансплантата с различными физическими параметрами обработки. Сканограммы. T1200 — температура спекания 1200 °C, T1250 — температура спекания 1250 °C, T1300 — температура спекания 1300 °C. Наблюдается разная степень адгезии клеток к материалу. Белые стрелки указывают на клетки на поверхности материала аллотрансплантата. **А, Б.** Максимальная степень адгезии — клетки плотно прилегают к поверхности, сильно уплощенные, под телом клетки просматривается контур гранул материала, поверхность гладкая, со слабо заметными складками, наблюдаются выросты различной толщины, преимущественно тонкие по периметру клетки и просматриваются под ее телом. **В, Г.** Средняя степень адгезии — клетки прилегают к поверхности, в отдельных зонах края клетки приподняты, поверхность имеет хорошо заметные складки, выросты клетки преимущественно широкие. **Д, Е.** Низкая степень адгезии — клетки слабо распластаны, края клеток заметно приподняты по всему периметру, поверхность клетки имеет мелкие бугорки, отсутствуют выросты.

мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани человека; для подтверждения универсальности метода требуется проверка на других типах клеток.

Исследование проведено в условиях *in vitro*, что ограничивает возможность прямого переноса полученных данных на ткани *in vivo*. Также не рассматривалось влияние отдельных физико-химических параметров биокерамики на качество визуализации и сохранность клеточной морфологии, что может стать предметом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

В работе предложена методика подготовки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, выращенных на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ и проведения самого анализа. Предложенный в работе подход требует не более 1 ч для подготовки клеток к анализу с помощью СЭМ, с учетом этапа высушивания образца, не требует использования токсичных солей тяжелых металлов, позволяет получить

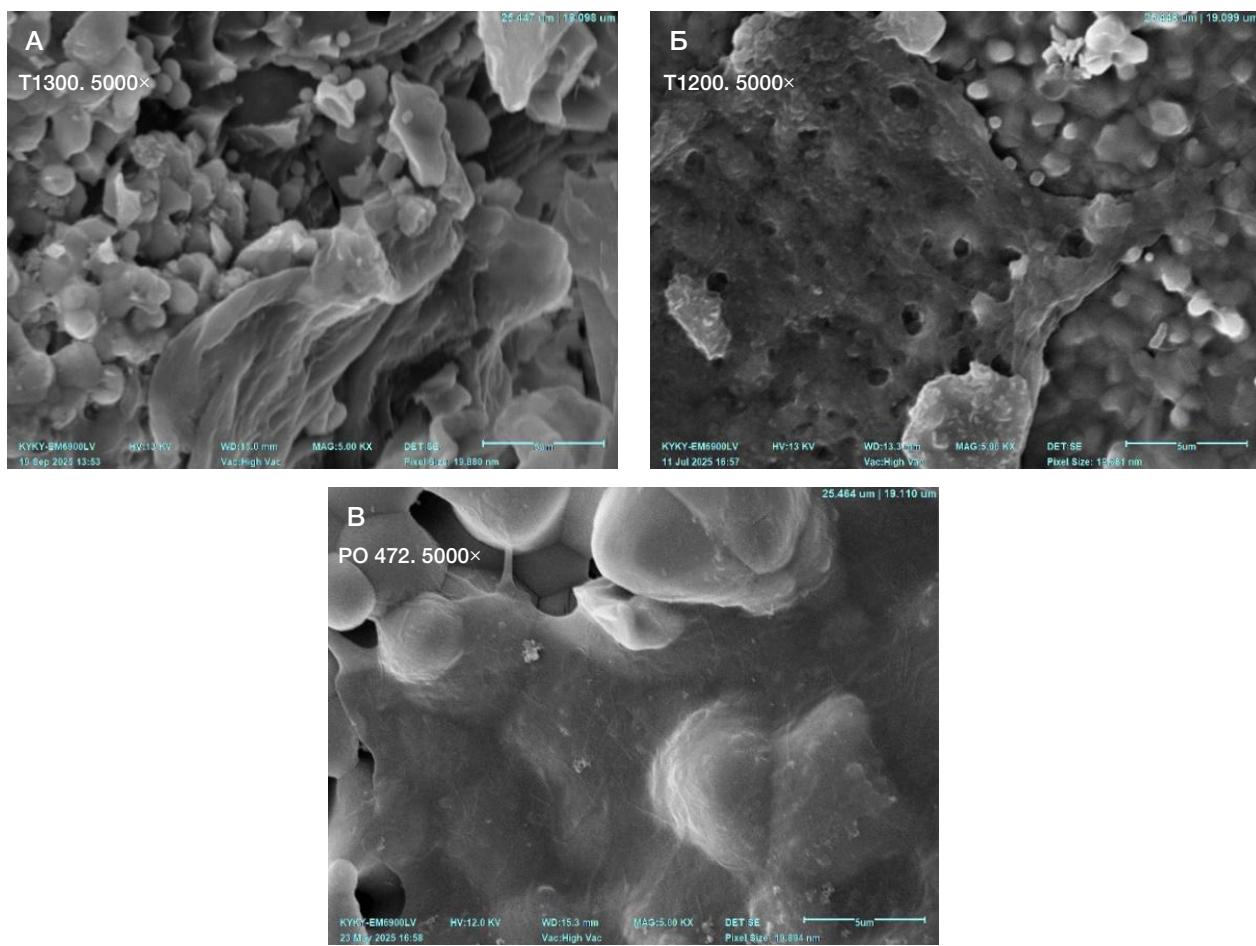


Рис. 5. Морфологические особенности мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на поверхности образцов из трикальцийфосфата. Сканограммы. **А.** Складчатая поверхность клетки, гладкая, низкая степень распластанности, адгезия в отдельных точках, отсутствуют выросты тела клетки. **Б.** Клетка распластана, практически полностью адгезирована, поверхность бугристая, наблюдаются широкие и отдельные тонкие выросты в небольшом количестве по периферии. **В.** Клетка сильно распластана, полностью адгезирована, поверхность ровная, наблюдаются широкие и тонкие выросты в большом количестве под телом клетки и по периферии. T1200, T1300 — температура спекания материала при изготовлении образцов в °С. РО 472 — маркировка лабораторного образца

стабильные воспроизводимые результаты. Применение окраски образцов по Гимзе значительно облегчает поиск клеток на поверхности и способствует правильной ориентации образца для исследования. Описанный вариант

пробоподготовки может быть использован и для обработки любых других животных клеток, адгезированных к поверхности любого материала, при условии его устойчивости к обработке глутаровым альдегидом и этанолом.

Литература

1. Zhang Y, Shen Y, Peng F, Jiang C, Li W, Miao H, Huang F, Zeng Y. Method for acquiring accurate coordinates of the source point in electron backscatter diffraction. *J Microsc.* 2021; 284 (3): 233–243. DOI: 10.1111/jmi.13055. PubMed PMID: 34383320.
2. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. 2017; 10 (4): 334. DOI: 10.3390/ma10040334. PubMed PMID: 28772697.
3. Kim SE, Park K. Recent Advances of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1250: 177–88. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7_12. PubMed PMID: 32601945.
4. Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T. Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure. *Front Neuroanat.* 2021; 15: 759804. DOI: 10.3389/fnana.2021.759804. PubMed PMID: 34955763; PMCID: PMC8693767.
5. Qu Y, Pan H, Peng R, Niu J, Li C. Interference illumination of three nonzero-order beams for LCOS-based structured illumination microscopy. *J Microsc.* 2019; 275 (2): 97–106. DOI: 10.1111/jmi.12806.. PubMed PMID: 31087655.
6. Bray DF, Bagu J, Koehler P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech.* 1993; 26 (6): 489–95. DOI: 10.1002/jemt.1070260603. PubMed PMID: 8305726.
7. Fakhrullin R, Nigmatzyanova L, Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci Total Environ.* 2021; 772: 145478. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478. PubMed PMID: 33571774.
8. Orhan EO, Bahadir D, Akgün C, Aktaş S. Scanning electron microscopic evaluation of the efficacy of 5% ethylenediaminetetraacetic acid for smear layer removal. *Microsc Res Tech.* 2021; 84 (2): 253–60. DOI: 10.1002/jemt.23582. PMID: 32905662.
9. Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19 (2): 855–9. DOI:

- 10.1007/s10856-007-3005-x. Epub 2007 Aug 1. PubMed PMID: 17665126.
10. Bilyalov A, Piatnitskaia S, Rafikova G, et al. The effect of sterilization methods on the cytotoxicity of ceramic medical implants. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2025; 1: 77–84. DOI: 10.24075/brsmu.2025.009.
 11. Ullah N, Guhar D, Khan S. Preparation and topographical studies of various biological specimens using alternate method to critical point drying: Scanning electron microscopy. *J Microsc*. 2025; 299 (1): 25–35. DOI: 10.1111/jmi.13412. PubMed PMID: 40171741.
 12. Skliarenko Y, Kolomiiets VV, Balatskyi VV, et al. The impact of the physicochemical properties of calcium phosphate ceramics on biocompatibility and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes*. 2024; 17, 295. DOI: 10.1186/s13104-024-06937-y.
 13. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Lagonegro P, Trevisi G, et al. Preparation of hybrid samples for scanning electron microscopy (SEM) coupled to focused ion beam (FIB) analysis: A new way to study cell adhesion to titanium implant surfaces. *PLOS ONE*. 2022; 17 (8): e0272486. DOI: 10.1371/journal.pone.0272486.
 14. Gou Y, Qi K, Wei Y, Gu Z, Xie H. Advances of calcium phosphate nanoceramics for the osteoinductive potential and mechanistic pathways in maxillofacial bone defect repair. *Nano TransMed*. 2024; 3: 100033. DOI: 10.1016/j.ntm.2024.100033.

References

1. Zhang Y, Shen Y, Peng F, Jiang C, Li W, Miao H, Huang F, Zeng Y. Method for acquiring accurate coordinates of the source point in electron backscatter diffraction. *J Microsc*. 2021; 284 (3): 233–243. DOI: 10.1111/jmi.13055. PubMed PMID: 34383320.
2. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. 2017; 10 (4): 334. DOI: 10.3390/ma10040334. PubMed PMID: 28772697.
3. Kim SE, Park K. Recent Advances of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1250: 177–88. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7_12. PubMed PMID: 32601945.
4. Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T. Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure. *Front Neuroanat*. 2021; 15: 759804. DOI: 10.3389/fnana.2021.759804. PubMed PMID: 34955763; PMCID: PMC8693767.
5. Qu Y, Pan H, Peng R, Niu J, Li C. Interference illumination of three nonzero-order beams for LCOS-based structured illumination microscopy. *J Microsc*. 2019; 275 (2): 97–106. DOI: 10.1111/jmi.12806.. PubMed PMID: 31087655.
6. Bray DF, Bagu J, Koegler P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech*. 1993; 26 (6): 489–95. DOI: 10.1002/jemt.1070260603. PubMed PMID: 8305726.
7. Fakhrullin R, Nigmatzyanova L, Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci Total Environ*. 2021; 772: 145478. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478. PubMed PMID: 33571774.
8. Orhan EO, Bahadır D, Akgün C, Aktaş S. Scanning electron microscopic evaluation of the efficacy of 5% ethylenediaminetetraacetic acid for smear layer removal. *Microsc Res Tech*. 2021; 84 (2): 253–60. DOI: 10.1002/jemt.23582. PMID: 32905662.
9. Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19 (2): 855–9. DOI: 10.1007/s10856-007-3005-x. Epub 2007 Aug 1. PubMed PMID: 17665126.
10. Bilyalov A, Piatnitskaia S, Rafikova G, et al. The effect of sterilization methods on the cytotoxicity of ceramic medical implants. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2025; 1: 77–84. DOI: 10.24075/brsmu.2025.009.
11. Ullah N, Guhar D, Khan S. Preparation and topographical studies of various biological specimens using alternate method to critical point drying: Scanning electron microscopy. *J Microsc*. 2025; 299 (1): 25–35. DOI: 10.1111/jmi.13412. PubMed PMID: 40171741.
12. Skliarenko Y, Kolomiiets VV, Balatskyi VV, et al. The impact of the physicochemical properties of calcium phosphate ceramics on biocompatibility and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes*. 2024; 17, 295. DOI: 10.1186/s13104-024-06937-y.
13. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Lagonegro P, Trevisi G, et al. Preparation of hybrid samples for scanning electron microscopy (SEM) coupled to focused ion beam (FIB) analysis: A new way to study cell adhesion to titanium implant surfaces. *PLOS ONE*. 2022; 17 (8): e0272486. DOI: 10.1371/journal.pone.0272486.
14. Gou Y, Qi K, Wei Y, Gu Z, Xie H. Advances of calcium phosphate nanoceramics for the osteoinductive potential and mechanistic pathways in maxillofacial bone defect repair. *Nano TransMed*. 2024; 3: 100033. DOI: 10.1016/j.ntm.2024.100033.