

DOI 10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14

ИССЛЕДОВАНИЕ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ АНАТОМИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ПРИ ПОМОЩИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБРАТНО-РАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ

МУХАМАДИЯРОВ Р.А., КУТИХИН А.Г.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

ORIGINAL RESEARCH

HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY OF BLOOD VESSELS: BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY APPROACH

RINAT A. MUKHAMADIYAROV, ANTON G. KUTIKHIN

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002), Russian Federation

Резюме

Цель. Изучить возможности применения оригинального метода длительной постфиксации тканей в тетраоксиде осмия и контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца с последующей заливкой в эпоксидную смолу для исследования гистологических и гистопатологических особенностей кровеносных сосудов.

Материалы и методы. В качестве эталонных объектов исследования были выбраны аорта крысы, полученная в результате каротидной эндартерэктомии пораженная атеросклерозом сонная артерия человека и полученный в результате тотальной хирургической коррекции тетрады Фалло стент. После суточной фиксации в 10% забуференном формалине сосуды были контрастированы 2% тетраоксидом осмия в течение 60 часов, дегидратированы посредством воздействия спиртов возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80 и 95%-ный этанол, 99,7% изопропанол, ацетон), пропитаны смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon-Araldite в соотношении 1:1 и заключены в вышеуказанную эпоксидную смолу с последующей шлифовкой и полировкой полимеризованных эпоксидных блоков. Контрастирование 2% уранилацетатом осуществляли во время про-

водки в 95% этаноле, контрастирование цитратом свинца по Рейнольдсу выполняли путем нанесения на поверхность шлифованного образца с последующей отмывкой. Далее проводилось напыление эпоксидных блоков углеродом и собственно визуализация образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах.

Результаты. Вышеописанная методика позволила обеспечить сохранность гистоархитектоники (интиму, медию, адвентицию и периваскулярную жировую ткань) и визуализировать с увеличением до пяти тысяч раз все основные структуры внутри сосудов (эндотелиальные клетки, эластические волокна, слои гладкомышечных клеток, фибробласты, клетки периваскулярной жировой ткани, vasa vasorum, лимфоидные фолликулы). Кроме того, с ее помощью оказалось возможным дифференцировать даже малокалиберные vasa vasorum от лимфоидных фолликулов. Это существенно расширяет возможности визуализации в сравнении с классической заливкой в парафин, рутинным окрашиванием и световой микроскопией (позволяющей добиться увеличения не более чем в четыреста раз, что не позволяет провести количественный анализ vasa vasorum и лимфоидных фолликулов). Кроме то-

го, в отличие от стандартного подхода, данная методика позволяет проводить полноценный анализ тканей, содержащих цельнометаллические имплантаты или массивные кальцификаты.

Заключение. Описанная методика может быть предложена для апробации в функцио-

нальных исследованиях по оценке физиологической и патологической неоваскуляризации, а также активации воспаления в адвентиции и периваскулярной жировой ткани.

Ключевые слова: аорта, стенты, эпоксидная смола, vasa vasorum, неоваскуляризация.

Abstract

Aim. To study the technical possibility of employing the original technique of long-term osmium tetroxide postfixation and uranyl acetate/lead citrate counterstaining with the following embedding into epoxy resin for the investigation of histological and histopathological features of the blood vessels.

Materials and Methods. The study was carried out on rat abdominal aorta, carotid atherosclerotic plaque excised during endarterectomy, and stent excised during total surgical correction of Fallot's tetralogy. After the 24-hour fixation in 10% neutral phosphate buffered formalin, samples were stained with 2% osmium tetroxide for 60 hours, dehydrated in ascending ethanol series (50, 60, 70, 80, and 95% ethanol, 99,7% isopropanol, acetone), impregnated into acetone : epoxy resin (Epon-Araldite, 1:1), and embedded into fresh epoxy resin with the following grinding and polishing of polymerised epoxy resin blocks. Counterstaining with 2% uranyl acetate was performed during the incubation in 95% ethanol while counterstaining with Reynolds' lead citrate was conducted after the grinding. Samples were then sputter coated with carbon and were finally visualised by back-scattered scanning electron microscopy.

Results. Our technique retained integrity of the blood vessels, preserving all vascular layers (intima, media, adventitia, and perivascular adipose tissue) and allowed visualisation of all vessel structures (endothelial cells, elastic fibers, smooth muscle cell layers, fibroblasts, perivascular adipose tissue cells, vasa vasorum, and lymphoid follicles) at x5000 magnification. In addition, it was possible to differentiate even small caliber vasa vasorum from lymphoid follicles. The developed technique considerably expands quality of visualization as compared to the conventional approach (paraffin embedding, routine histological staining, and light microscopy) with a limited magnification not permitting quantitative analysis of vasa vasorum and lymphoid follicles. Further, it makes possible to analyse tissues containing metal implants or large amounts of calcified tissue without their disintegration.

Conclusions. Our technique may be suggested for the evaluation of physiological and pathological neovascularisation and assessment of adventitial and perivascular inflammation.

Keywords: aorta, stents, epoxy resin, vasa vasorum, neovascularization.

◀ English

Введение

Несмотря на существующее многообразие вариантов гистологического исследования тканей (фиксация в формалине и заливка в парафин с последующей резкой на микротоме, заливка в криосреду и заморозка в жидком азоте с дальнейшей резкой на криотоме, резка незафиксированных и незамороженных тканей на вибротоме), специфического окрашивания различных компонентов тканей (рутинное гистологическое окрашивание, иммуноокрашивание на основе мечения антител пероксидазой хрена, флюорофорами или коллоидным золотом, контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца для электронной микроскопии) и методов визуализации тканей (световая микроскопия, эпифлюоресцентная микроскопия, кон-

фокальная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия, включая криоэлектронную микроскопию) [1-3], остается открытым вопрос оптимального способа получения изображений для анализа тканей, содержащих цельнометаллические имплантаты и эктопические кальцификаты, а также для анализа разделенных гистопатологических феноменов (к примеру, неоваскуляризации или воспаления внешней оболочки сосудов – адвентиции и периваскулярной (околососудистой) жировой ткани) [4].

Примерами тканей с металлическими имплантатами являются сосудистая ткань вокруг эксплантированных стентов или ткань вокруг имплантированных металлических пластин.

Так, для оценки биосовместимости сплавов металлов (наиболее распространенным из которых является активно применяемый для изготовления стентов никелид титана) необходима их предварительная имплантация лабораторным животным, результаты которой (общее состояние тканей вокруг имплантатов, выраженность воспаления, степень неоваскуляризации) в обязательном порядке оцениваются гистологически [5, 6]. Однако ни стенты, ни пластины механически не представляется возможным отделить от окружающих тканей без существенного нарушения их целостности либо подвергнуть резке на микротоме, криотоме или вибраторе. Аналогичная проблема заключается в обработке тканей с существенно затрудняющими резку эктопическими кальцификатами, декальцификация которых может привести к нарушению целостности окружающих тканей вследствие воздействия кислот и затруднить анализ фенотипа клеток вокруг очагов кальцификации.

Другой актуальной проблемой в гистологии и патоморфологии является то, что классическое гистологическое или иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов или криосрезов с последующей световой микроскопией, как правило, позволяют получать достаточно качественное изображение при увеличении не более чем до 400 раз, а иммунофлюоресцентное окрашивание даже при использовании конфокальной микроскопии – не более чем до 630 раз (даже в случае использования флагманских приборов существующих линеек микроскопов Carl Zeiss, Leica или Nikon). В то же время анализ таких структур, как *vasa vasorum* и лимфоидные фолликулы адвентиции и периваскулярной жировой ткани, даже при таком увеличении существенно затруднен вследствие их малой размерности [7, 8]. Решением данной проблемы могла бы стать просвечивающая электронная микроскопия, однако она позволяет визуализировать лишь очень небольшую площадь исходного материала (ультратонкие срезы толщиной до 500 нм), а пробоподготовка к ней технически не проста (затачивание больших и малых пирамид в эпоксидной смоле вручную под микроскопическим контролем при помощи микро/криотомного ножа, затачивание стеклянных ножей для ультрамикротомы, собственно ультрамикротомия и сбор срезов на медные сеточки, возможность плохого направления срезов) [9].

Также стоит отметить, что получение качественных изображений при помощи конфо-

кальной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии весьма трудоемко и времязатратно, вследствие чего данные методы не являются оптимальными для получения большого числа изображений с целью количественного анализа (а количество *vasa vasorum* и лимфоидных фолликулов в сосудах может идти на десятки и даже сотни в зависимости от калибра сосуда). Кроме того, в гистологическом анализе сосудов чрезвычайно важную роль играет вопрос равномерности распределения сделанных срезов по всей длине сосуда (так называемая «серийность» срезов), что сложно выполнить посредством ультрамикротомии. Конфокальная микроскопия парафиновых или криосрезов лишена подобного недостатка, однако иммунофлюоресцентное окрашивание (даже при использовании лишь одного антитела) само по себе сопряжено с вариабельностью качества окрашивания разными антителами и проблемой устранения фонового окрашивания («бэкграунда») [10]. Таким образом, более или менее все широко распространенные методы обработки, окрашивания и визуализации тканей сложно рассматривать как надежные для оценки неоваскуляризации и развития воспаления адвентиции и периваскулярной жировой ткани, хотя на данный момент «золотым стандартом» для анализа *vasa vasorum* является окрашивание антителами к маркеру эндотелиальных клеток CD31 (позволяющее в сочетании с ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом или гематоксилином дифференцировать их от тромбоцитов) [11], а для исследования лимфоидных фолликулов адвентиции и периваскулярной жировой ткани – окрашивание антителами к панлейкоцитарному маркеру CD45, маркеру Т-лимфоцитов CD3 и маркеру В-лимфоцитов CD19 [12, 13].

Цель исследования

Разработка оригинального метода «полного гистологического цикла» (обработка ткани – окрашивание – визуализация), который бы позволял, с одной стороны, анализировать ткани с цельнометаллическими имплантатами без их извлечения, а с другой стороны, получать качественные изображения на относительно высоком увеличении (несколько тысяч раз).

Материалы и методы

В качестве эталонных объектов исследования были выбраны брюшная аорта крысы (два

самца линии Wistar возрастом 3 месяца с массой тела 300 г – через пять недель после выполнения баллонной ангиопластики брюшной аорты и без оперативного вмешательства), полученная в результате каротидной эндартерэктомии пораженная атеросклерозом сонная артерия человека (мужчина 67 лет с гемодинамически значимой хронической ишемией головного мозга вследствие визуализированного при помощи ультразвукового исследования каротидного атеросклероза) и полученный в результате тотальной хирургической коррекции тетрады Фалло стент (девочка, 3 месяца). У пациентов либо их ответственных представителей предварительно было получено информированное согласие на участие в исследовании. Уход за лабораторными животными осуществлялся в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных [14], вывод животных из эксперимента производился посредством передозировки углекислого газа.

После суточной фиксации в двух сменах 10% забуференного формалина (через каждые 12 часов) сосуды были контрастированы 1% тетраоксидом осмия в 0,1М фосфатном буфере (12 г/л NaH_2PO_4 и 36 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) в течение 12 часов, 2% тетраоксидом осмия в указанном фосфатном буфере в течение 48 часов, дегидратированы посредством воздействия спиртов возрастающей концентрации (50, 60, 70, 80 и 95%-ный этанол, 99,7% изопропанол, ацетон, все по две смены, каждая смена по 15 минут), пропитаны смесью ацетона с

эпоксидной смолой Epon-Araldite в соотношении 1:1 в течение 6 часов и заключены в вышеуказанную эпоксидную смолу с последующей шлифовкой и полировкой полимеризованных при 60°C эпоксидных блоков до собственно образца. Контрастирование 2% уранилацетатом осуществляли во время проводки в 95% этаноле в течение 5 часов, контрастирование цитратом свинца по Рейнольдсу выполняли в течение 7 минут путем нанесения на поверхность шлифованного образца с последующей отмыжкой бидистиллированной водой. Далее проводилось напыление эпоксидных блоков углеродом (10-15 нм, EM ACE200, Leica) и собственно визуализация образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах с напряжением 10 кВ (Hitachi-S-3400N, Hitachi).

Результаты и обсуждение

Визуализация стенки брюшной аорты крыс позволила успешно идентифицировать ядра эндотелиальных клеток, имеющих классическую веретеновидную (вытянутую) форму, электронно-плотные эластические волокна (практически черного цвета), разграничивающие слои средней оболочки сосуда (медии) и отграничивающие ее от внутренней оболочки (интимы) и внешней оболочки (адвентиции), и ядра гладкомышечных клеток продолговатой или округлой формы (рисунки 1). При этом структура коллагеновых волокон адвентиции была легко отличима от эластических волокон медии и периваскулярной жировой ткани (рисунки 1). Раз-

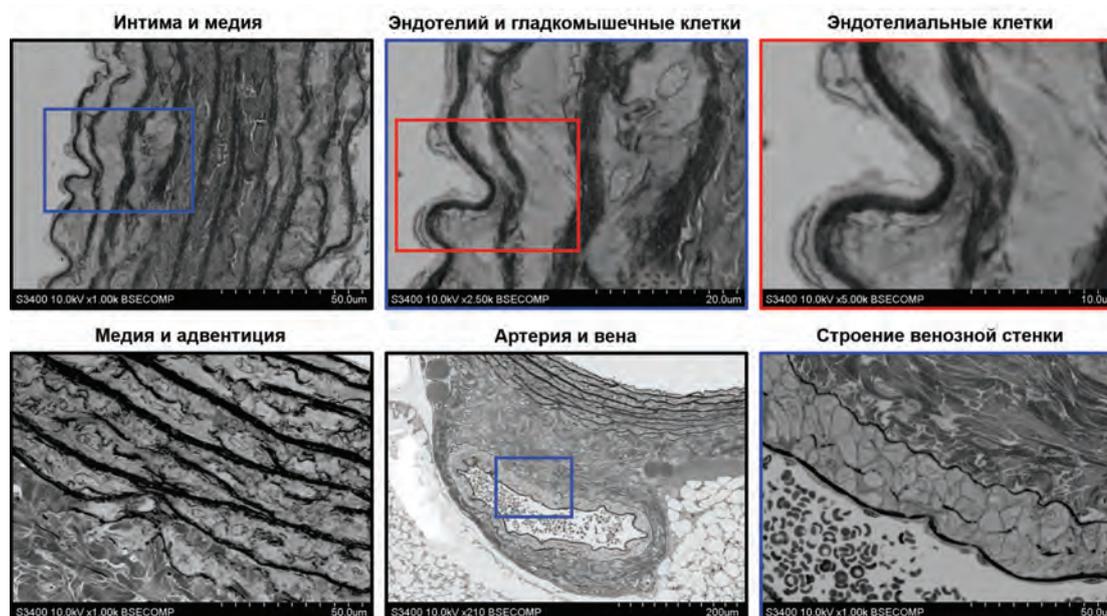


Рисунок 1.

Визуализация слоев стенки брюшной аорты крыс и дифференцировка артерии и сопутствующей вены

Figure 1.

Transversal visualisation of the rat abdominal aorta and clear distinction between artery and vein

личное строение средней оболочки артерий и вен (последние характеризовались присутствием лишь наружной и внутренней эластической мембраны без множественных слоев эластических волокон между ними, а также четко окрашенными плазматическими мембранами гладкомышечных клеток полигональной формы) было четко визуализируемо и позволило дифференцировать сосуды артериального и венозного типа (рисунки 1). Структура отдельных клеток (ядра и цитоплазма, а также плазматическая мембрана у некоторых типов клеток) была ясно видна на увеличении от 2500 до 5000 раз.

Высокое качество визуализации общей микроанатомии сосудистой стенки позволило продолжить анализ на уровне отдельных анатомических структур внутри самих артерий и вен и окружающей их периваскулярной жировой ткани – кровоснабжающих их vasa vaso-

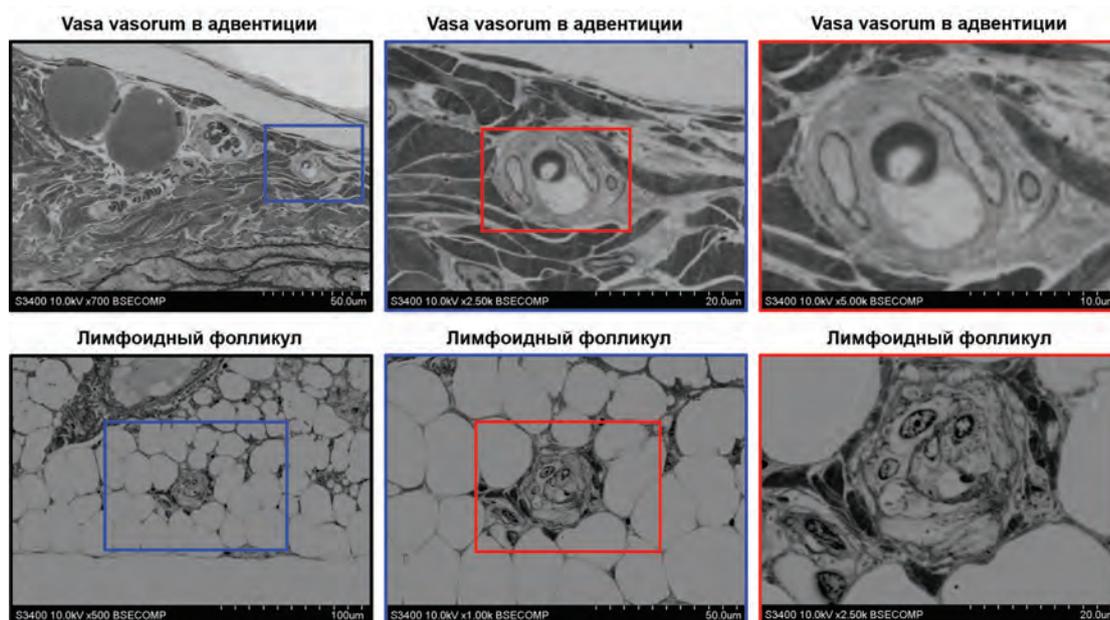
rum и отвечающих за воспалительный ответ на повреждение сосудистой стенки лимфоидных фолликулов. Vasa vasorum в адвентиции и периваскулярной жировой ткани были определяемы и детально характеризуются с увеличением до 5000 раз (рисунки 2). При этом вследствие малого калибра они могут не содержать эластических волокон и состоять лишь из монослоя эндотелиальных клеток и базальной мембраны; кроме того, их можно было различить по эритроцитам в сосудистом просвете (рисунки 2). В то же время последнее было характерно и для питающих лимфоидные фолликулы центральных капилляров, однако отличительной особенностью лимфоидных фолликулов было то, что они характеризовались скоплением радиально расположенных вокруг капилляров клеток, а также выраженной соединительнотканной оболочкой (рисунки 2).

Рисунок 2.

Визуализация vasa vasorum адвентиции и лимфоидных фолликулов периваскулярной жировой ткани

Figure 2.

Visualisation of adventitial vasa vasorum and lymphoid follicles within the perivascular adipose tissue



Одним из вариантов анализа структуры сосудов является приготовление *en face*-препаратов (развертка) вместо классической циркулярной ориентации. Преимуществом такого способа является то, что он в случае необходимости позволяет визуализировать полную поверхность слоя интереса (эндотелий, медиа, адвентиция, периваскулярная жировая ткань), при этом остальные слои не видны, поскольку расположены под слоем интереса. Особенно такая методика применима при анализе целостности эндотелия, поскольку при развертке сосуда верхним слоем в зависимости от ориентации оказывается

либо эндотелий, либо адвентиция/периваскулярная жировая ткань, что не требует дополнительных манипуляций с тканью. Развертка *en face* брюшной аорты крыс дала возможность визуализировать монослой эндотелиальных клеток, а также (в местах более глубокой шлифовки) адвентицию, содержащую множественные коллагеновые волокна, vasa vasorum с эритроцитами в сосудистом просвете и слоем формирующих сосуд эндотелиальных клеток, а также фибробластоподобные клетки (рисунки 3). Кроме того, успешно визуализировалась и периваскулярная жировая ткань (рисунки 3).

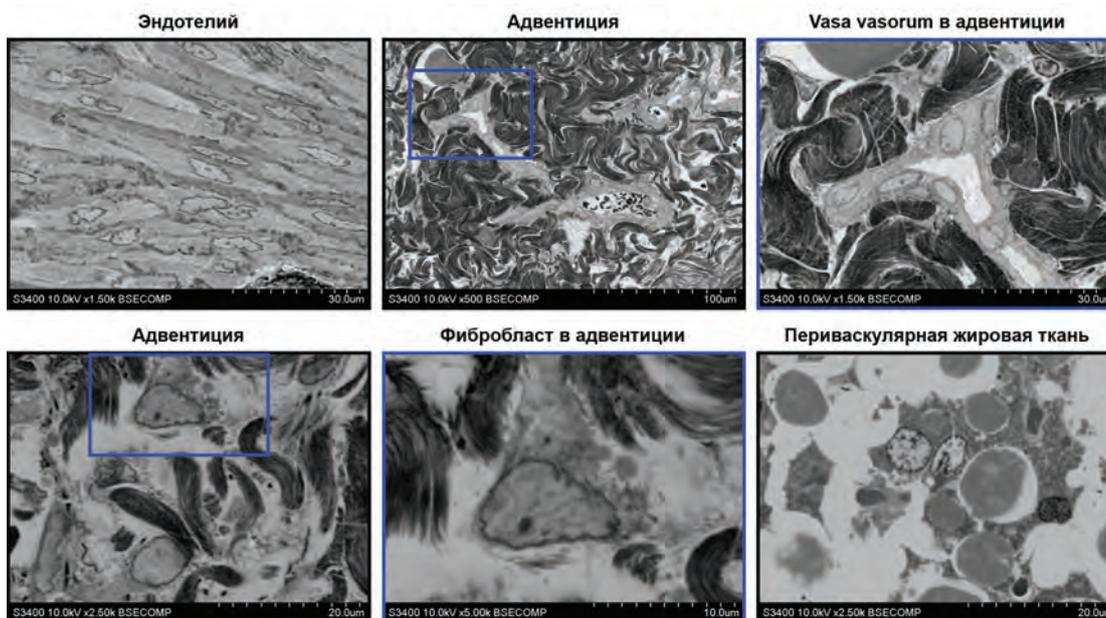


Рисунок 3.

Послойная визуализация брюшной аорты крысы при ее развертке (*en face*-ориентация)

Figure 2.

Layer-by-layer visualisation of the rat abdominal aorta (*en face* analysis)

Помимо изучения нормальной микроанатомии тканей важным критерием полезности метода является его применимость для исследования феноменов, возникающих при различных патологиях. К примеру, применительно к атеросклерозу таковыми в том числе являются неоваскуляризация, формирование пенистых клеток и кальцификация. Анализ атеросклеротических бляшек показал высокую сохранность гистологических структур, также подвергшуюся активной неоваскуляризации, с четким разделением неоинтимы и медиа вследствие качественной визуализации эластических волокон (рисунок 4). Новообразованные сосуды по своей структуре были схожими с *vasa vasorum*

нормальных аорт крыс и в некоторых участках характеризовались диапедезом (очагами проникновения эритроцитов вглубь ткани из просвета сосуда) (рисунок 4). Помимо сосудистых структур в неоинтима визуализировалось значительное количество макрофагов, содержащих липиды (пенистые клетки), причем их вид полностью совпадал с классической картиной просвечивающей электронной микроскопии; стоит отметить, что большая доля макрофагов неоинтимы липиды не содержала (рисунок 4). Анализ тканей вокруг очагов эктопической кальцификации в неоинтима выявил их полную сохранность (рисунок 4).

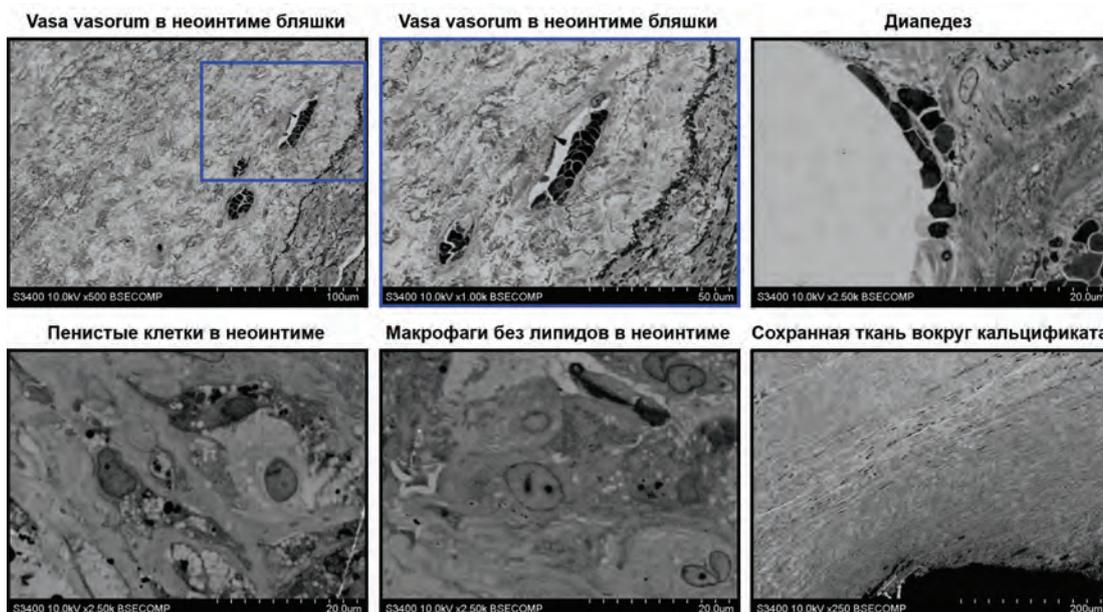


Рисунок 4.

Визуализация патологических феноменов при атеросклерозе (неоваскуляризация, формирование пенистых клеток и кальцификация)

Figure 4.

Visualisation of the atherosclerotic plaque (neovascularisation, foam cell formation, and calcification)

Наконец, важным достоинством разработанного метода является то, что он позволяет визуализировать окружающую цельнометаллические имплантаты ткань. Широко применяемым в клинической медицине примером таких тканей является окружающая стенты сосудистая ткань, которая может частично оставаться на стенте в случае необходимости его эксплантации. К примеру, при двухэтапной хирургической коррекции тетрады Фалло неоваскуляризация тканей легочной артерии при извлечении стента может отражать темпы ее роста, необходимого для легочной перфузии [15]. Заключение подобного стента в эпоксид-

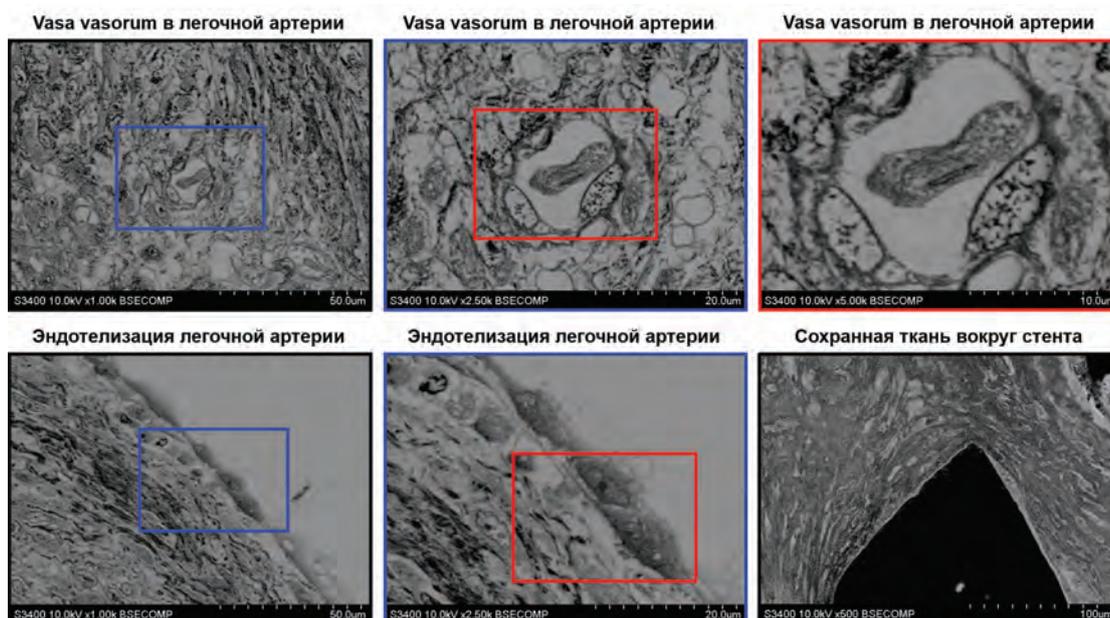
ную смолу по описываемой методике позволило успешно визуализировать vasa vasorum, которые представляли собой сформированный эндотелиальными клетками сосуд округлой формы с выраженным просветом, хотя их строение у детей несколько отличается от такового у взрослых (рисунок 5). Кроме того, отчетливо наблюдался сохранный эндотелий легочной артерии (рисунок 5). Как и в случае с массивными кальцификатами атеросклеротической бляшки, ткани вокруг цельнометаллических стоек стента также были сохранены и представляли собой соединительнотканную капсулу (рисунок 5).

Рисунок 5.

Визуализация сосудистой ткани вокруг стента (оценка неоваскуляризации, эндотелизации и ее целостности)

Figure 5.

Visualisation of the vascular tissue around the stent: assessment of neovascularisation, endothelialisation, and tissue integrity



Важно отметить, что, как и при стандартной гистологической резке, при которой вид располагаемых на стекле срезов зависит от особенностей их распределения внутри ткани, вид получаемой по описываемой методике ткани существенно зависит от глубины шлифовки. В то же время это в принципе дает возможность маневра при постепенном шлифовании образца, в то время как при серийной резке (микротомном аналоге постепенного шлифования, заключающемся в равномерном распределении срезов по всей толщине блока по стеклу) материал теряется необратимо и гистологическое решение нужно принимать мгновенно.

Заключение

Разработанный оригинальный метод «полного гистологического цикла» (обработка ткани – окрашивание – визуализация) позволяет

получать достаточно качественные изображения нормальных (на примере брюшной аорты крысы) или патологически измененных тканей (на примере атеросклеротической бляшки). Практическим применением его в лабораторной практике может быть анализ эндотелизации (либо целостности эндотелия), неоваскуляризации или формирования новой отвечающей за иммунный ответ ткани; кроме того, данный метод в принципе позволяет проводить общий гистологический анализ тканей, содержащих цельнометаллический имплантат или массивный эктопический кальцификат, без их извлечения и повреждения ткани.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаменталь-

ной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «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».

Funding

This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research

Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2015-0011 "Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors".

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Литература / References:

1. Timmermans FJ, Otto C. Contributed review: Review of integrated correlative light and electron microscopy. *Rev Sci Instrum.* 2015; 86 (1): 011501. doi: 10.1063/1.4905434.
2. Combs CA, Shroff H. Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. *Curr Protoc Neurosci.* 2017; 79: 2.1.1-2.1.25. doi: 10.1002/cpns.29.
3. Ryan J, Gerhold AR, Boudreau V, Smith L, Maddox PS. Introduction to Modern Methods in Light Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2017; 1563: 1-15. doi: 10.1007/978-1-4939-6810-7_1.
4. Mukhamadiyarov RA, Sevostyanova VV, Shishkova DK, Nokhrin AV, Sidorova OD, Kutikhin AG. 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.
5. 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. Russian (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. Т. 6. № 1. С. 122-130). doi: 10.17802/2306-1278-2017-1-122-130.
6. 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. Russian (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. Т. 6. № 3. С. 131-142). doi: 10.17802/2306-1278-2017-6-3-131-142.
7. Pereira T, Betriu A, Alves R. Non-invasive imaging techniques and assessment of carotid vasa vasorum neovascularization: Promises and pitfalls. *Trends Cardiovasc Med.* 2019; 29 (2): 71-80. doi: 10.1016/j.tcm.2018.06.007.
8. Shishkova D.K., Velikanova E.A., Krivkina E.O., Mironov A.V., Kudryavtseva Yu.A., Kutikhin A.G. Toxicity of calcium phosphate bions for aortic adventitia in rats. *Atherosclerosis and Dyslipidemias.* 2018; 3 (32): 37-43. Russian (Шишкова Д.К., Великанова Е.А., Кривкина Е.О., Миронов А.В., Кудрявцева Ю.А., Кутихин А.Г. Токсическое действие кальций-фосфатных бионов на адвентицию брюшной аорты крыс // Атеросклероз и дислипидемии. 2018. № 3 (32). С. 37-43).
9. Sander B, Golas MM. Visualization of bionanostructures using transmission electron microscopical techniques. *Microsc Res Tech.* 2011; 74 (7): 642-663. doi: 10.1002/jemt.20963.
10. Jensen E. Technical review: colocalization of antibodies using confocal microscopy. *Anat Rec (Hoboken).* 2014; 297 (2): 183-187. doi: 10.1002/ar.22835.
11. Galis ZS, Lessner SM. Will the real plaque vasculature please stand up? Why we need to distinguish the vasa plaquorum from the vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med.* 2009; 19 (3): 87-94. doi: 10.1016/j.tcm.2009.06.001.
12. Akhavanpoor M, Wangler S, Gleissner CA, Korosoglou G, Katus HA, Erbel C. Adventitial inflammation and its interaction with intimal atherosclerotic lesions. *Front Physiol.* 2014; 5: 296. doi: 10.3389/fphys.2014.00296.
13. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol.* 2017; 174 (20): 3496-3513. doi: 10.1111/bph.13705.
14. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
15. Nokhrin A.V., Tarasov R.S., Mukhamadiyarov R.A., Barbarash L.S. Staged approach: stenting of right ventricular outflow tract followed by tetralogy of Fallot definitive repair in low birthweight children - immediate and long-term results. *Pediatric Cardiovascular Diseases.* 2017; 14 (2): 90-100. Russian (Нохрин А.В., Тарасов Р.С., Мухамадияров Р.А., Барбараш Л.С. Этапный подход: стентирование выводного отдела правого желудочка с последующей радикальной коррекцией тетрады Фалло у маловесных детей - непосредственные и отдаленные результаты // Детские болезни сердца и сосудов. 2017. Т. 14. № 2. С. 90-100). doi: 10.24022/1810-0686-2017-14-2-90-100.

Сведения об авторах

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: разработка и оптимизация протокола оригинальной методики, микроскопический анализ, написание статьи.
ORCID: 0000-0002-5558-3229

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: микроскопический анализ, написание статьи.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич,
650002, г. Кемерово, б-р Сосновый, д. 6
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

Для цитирования:

Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Исследование нормальной и патологической микроскопической анатомии кровеносных сосудов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах // Фундаментальная и клиническая медицина. 2019. Т. 4, № 1. С. 6-14. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14>

Статья поступила: 26.01.2019г.

Принята в печать: 28.02.2019г.

Authors

Dr. Rinat A. Mukhamadiyarov, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation
Contribution: conceived and designed the original technique; performed the microscopy analysis; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0002-5558-3229

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation
Contribution: performed the microscopy analysis; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Corresponding author:

Dr. Anton G. Kutikhin,
6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002,
Russian Federation
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

For citation:

Rinat A. Mukhamadiyarov, Anton G. Kutikhin. Histology and histopathology of blood vessels: backscattered scanning electron microscopy approach. Fundamental and Clinical Medicine. 2019; 4 (1): 6-14. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-1-6-14>