

## **Методика підготовки кісткової тканини для растрової скануючої електронної мікроскопії.**

Забір матеріала здійснюється безпосередньо після декапітації тварини. Розмір зразка може бути підібраний індивідуально в залежності від поставлених завдань – від кількох мм до розміру всієї кістки щура.

Після забору матеріалу проводимо фіксацію зразка протягом доби в 3,125% глутарового альдегіду, виготовленому на буфері Соренсона. Фіксацію необхідно проводити при температурі 4<sup>0</sup>С. Через добу поміщаємо зразок в 1% розчин осмію для постфіксації. Даний етап не є обов'язковим в даній методиці але забезпечує кращу візуалізацію деталей при отриманні зображення в електронному мікроскопі. Після постфіксації проводиться дегідратація зразка в спиртах зростаючої концентрації (60-70-80-90-100%) по 15 хв. у кожному, дегідратацію у 100% спирті проводимо двічі. Звертаємо вашу увагу, що виготовлення 100% етанолу необхідно проводити безпосередньо перед початком експерименту чи використовувати свіжевідчинену ампулу спирту. Після дегідратації зразок поміщується в суміш епоксидних смол. За відсутністю спеціальних смол для електронної мікроскопії (епон-аралдит та ін) можна використовувати звичайну технічну епоксидну смолу. Після полімерізації смоли (режим полімерізації залежить від марку смол) необхідно підготувати поверхню кістки для аналізу. В даному випадку можна використовувати дві методики:

1. Для отримання зображення поверхні з наступним її мікроаналізом проводимо полірування поверхні зразка (Рис. 1). Необхідно отримати ідеальну рівну поверхню для більш точного аналізу.

2. Для отримання зображення структури балочок та пошуку клітин кісткової тканини можна провести скол на попередньо замороженому препараті (для цього використовується рідкий азот). Розколювання препаратів можна проводити звичайним скальпелем шляхом прикладення сили, перпендикулярної до досліджуваної поверхні.

Після отримання поверхні з необхідними властивостями проводимо напильнення зразка в стандартній вакуумній установці типу ВУП-5 (в якості напулювача може виступати вуглець, срібло, золото чи платина). Останнім етапом є власне

візуалізація поверхні на растровому електронному мікроскопі та зондовий мікроаналіз поверхні (за необхідності).

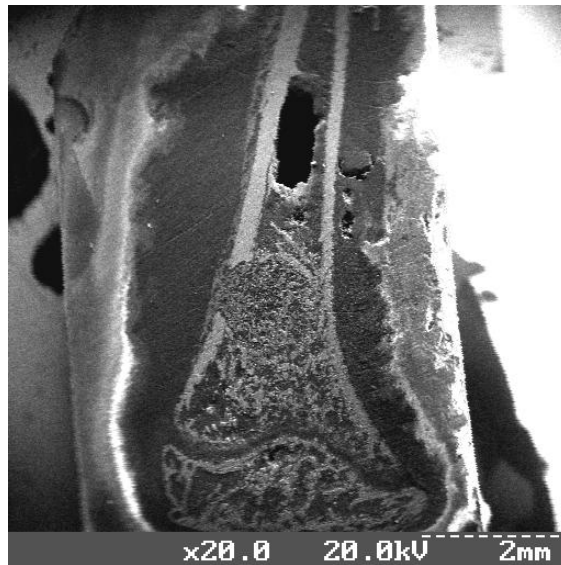


Рис. 1. Растрова електронна мікроскопія поверхні травмованої кістки отримана пришліфуванні поверхні зразка.

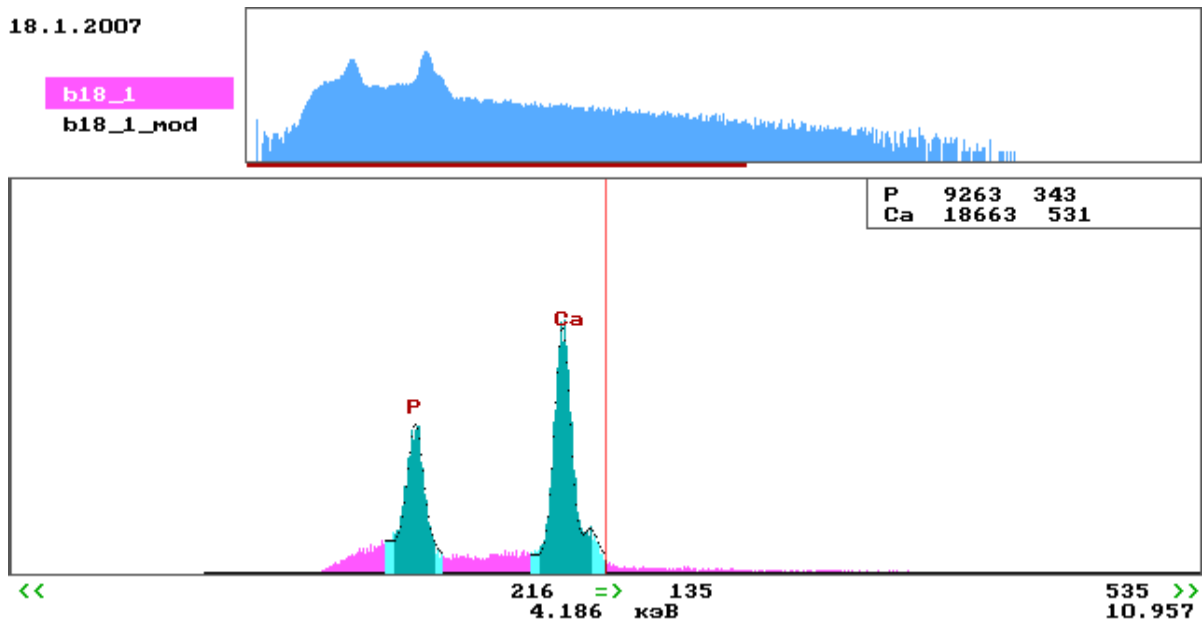


Рис. 3. Спектр з поверхні травмованої кістки – аналіз вмісту кальцію та фосфору на поверхні дефекту.

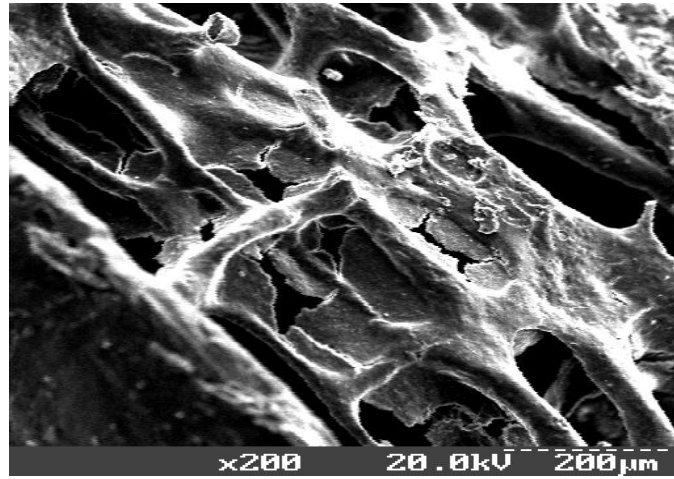


Рис. 2. Поверхня регенерату великогомілкової кістки щура – формування новоутворених кісткових балочок.