



Modern Approaches to Preparing Cell Cultures for Scanning Electron Microscopy

A.GAFUROVA¹, Kh.MIRKASIMOVA², S.SULTANOVA³, N.TSIFEROVA⁴,
O.CHARYSHNIKOVA⁵

The Research Institute of Virology of the Republican Specialized Scientific Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitics Diseases
Center of advanced technologies
The Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek

ARTICLE INFO

Article history:

Received October 2024
Received in revised form
15 November 2024
Accepted 25 November 2024
Available online
25 December 2024

Keywords:

scanning electron microscope (SEM),
cell cultivation,
cell technologies,
electron microscopy,
sample preparation,
critical point drying,
SEM images,
cell morphology,
surface analysis,
cell adhesion.

ABSTRACT

The review article examines the methods of using a scanning electron microscope (SEM) for cell analysis in biomedical and biotechnological research. The operating principles of the SEM and its key advantages, including high resolution and significant depth of field, are described. The main focus is on the application of SEM in studying cell morphology, intercellular interactions, and the interaction of cells with various substrates, such as biomaterials and nanomaterials, as well as sample preparation techniques. The presented data highlight the importance of SEM for developing new models of cellular interactions and biomaterials, making this method indispensable in both fundamental and applied science.

2181-1415/© 2024 in Science LLC.

DOI: <https://doi.org/10.47689/2181-1415-vol5-iss12/S-pp361-371>

This is an open access article under the Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ru>)

¹ The Research Institute of Virology of the Republican Specialized Scientific Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitics Diseases. Center of advanced technologies

² The Research Institute of Virology of the Republican Specialized Scientific Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitics Diseases.

³ The Research Institute of Virology of the Republican Specialized Scientific Practical Medical Center of Epidemiology, Microbiology, Infectious and Parasitics Diseases.

⁴ Center of advanced technologies. The Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek

⁵ Center of advanced technologies.

Skanerlash elektron mikroskopiyasi uchun hujayra madaniyatlarini tayyorlashning zamonaviy yondashuvlari

ANNOTATSIYA

Kalit so'zlar:

skanerlash elektron mikroskopi (SEM), hujayralarni o'stirish, hujayra texnologiyalari, elektron mikroskopiya, namuna tayyorlash, kritik nuqtada quritish, SEM tasvirlari, hujayra morfologiyasi, yuza tahlili, hujayralarning yopishishi.

Ushbu sharh maqolasida biotibbiyot va biotexnologik tadqiqotlarda hujayralarni tahlil qilish uchun skanerlovchi elektron mikroskopni (SEM) qo'llash usullari ko'rib chiqiladi. SEMning ishlash tamoyillari va uning asosiy afzalliklari, jumladan yuqori ajrata olish qobiliyati va sezilarli fokus chuqurligi tavsiflangan. Asosiy e'tibor hujayra morfologiyasini, hujayralararo o'zaro ta'sirlarni va hujayralarning turli substratlar, xususan biomateriallar va nanomateriallar bilan o'zaro ta'sirini o'rganishda SEMdan foydalanishga hamda namunalarni tayyorlash jarayoniga qaratilgan. Taqdim etilgan ma'lumotlar SEMning hujayraviy o'zaro ta'sirlar va biomateriallarning yangi modellarini yaratishdagi ahamiyatini ta'kidlaydi, bu esa ushbu usulni fundamental va amaliy fanlarda beqiyos qiladi.

Современные подходы к подготовке клеточных культур для сканирующей электронной микроскопии

АННОТАЦИЯ

Ключевые слова:

сканирующий электронный микроскоп (СЭМ), культивирование клеток, клеточные технологии, электронная микроскопия, пробоподготовка, сушка в критической точке, СЭМ-изображения, клеточная морфология, анализ поверхности, адгезия клеток.

В обзорной статье рассматриваются методы применения сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) для анализа клеток в биомедицинских и биотехнологических исследованиях. Описаны принципы работы СЭМ и его ключевые преимущества, включая высокую разрешающую способность и значительную глубину резкости. Основное внимание уделяется применению СЭМ в изучении морфологии клеток, межклеточных взаимодействий и взаимодействия клеток с различными подложками, такими как biomaterialы и наноматериалы, а также пробоподготовки образцов. Представленные данные подчеркивают значимость СЭМ для создания новых моделей клеточных взаимодействий и biomaterialов, что делает этот метод незаменимым в фундаментальной и прикладной науке.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В современных биомедицинских и биотехнологических исследованиях методы анализа клеточных структур и их взаимодействий играют ключевую роль. Применение сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) предоставляет уникальные возможности для изучения клеточной морфологии, межклеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с biomaterialами на наноуровне. Высокая разрешающая способность и глубина резкости СЭМ позволяют детально визуализировать клетки и их ультраструктуры, что имеет важное значение для фундаментальных исследований и прикладных задач, таких как разработка новых

биоматериалов, оценка клеточных культур и создание тканеинженерных конструкций. Исследования, основанные на применении, СЭМ, способствуют улучшению качества клеточных продуктов, повышению их биосовместимости и изучению механизмов взаимодействия клеток с наноматериалами и биополимерами. Таким образом, актуальность использования СЭМ обусловлена потребностью в точных и объективных методах анализа клеточных культур и систем доставки лекарственных препаратов, что имеет большое значение для развития персонализированной медицины и тканевой инженерии.

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) — это инструмент, использующий направленный пучок электронов для изображения образцов с высокой детализацией. Основное преимущество сканирующего электронного микроскопа заключается в его способности создавать двухмерные изображения и анализировать поверхности образцов с высокой разрешающей способностью. В СЭМ сфокусированный электронный пучок высокоэнергетических электронов сканирует заданную поверхности образца, покрытого проводящим материалами, вызывая эмиссию вторичных электронов, обратно рассеянных электронов и характеристического рентгеновского излучения, которые собираются специальным детектором. Эти сигналы преобразуются в электрические сигналы и отцифровываются компьютером в двухмерное монохромное изображение высокого разрешения, содержащее информацию о морфологии, кристаллографии и других характеристиках образца [12].

СЭМ играет значимую роль в исследованиях, связанных с культивированием клеток, благодаря своей способности предоставлять изображения с высоким разрешением и глубиной резкости. Этот метод позволяет изучать морфологию клеток, включая структуру их мембран, межклеточные контакты и взаимодействие с подложкой или внеклеточным матриксом. СЭМ особенно полезен для оценки качества культивирования, выявления дефектов в клеточных слоях, а также анализа изменений, связанных с воздействием внешних факторов, таких как стресс, лекарственные вещества или изменения в составе питательной среды. Это делает метод незаменимым для создания и оптимизации клеточных моделей, которые используются как в фундаментальной науке, так и в биотехнологических приложениях. Кроме того, СЭМ открывает уникальные возможности для изучения взаимодействия клеток с различными типами подложек, включая традиционные биополимеры, наноматериалы и гибридные покрытия. Это особенно важно для разработки биосовместимых материалов, которые улучшают адгезию, пролиферацию и функциональную активность клеток. Наноматериалы, в частности, предоставляют возможность направленного воздействия на клетки, а СЭМ помогает визуализировать их взаимодействие на субклеточном уровне.

Метод также широко применяется для изучения переноса клетками лекарственных препаратов. СЭМ позволяет визуализировать прикрепление лекарственных частиц к клеточной поверхности, их возможное проникновение внутрь клеток и изменения морфологии, вызванные действием препаратов. Такие исследования являются ключевыми для понимания механизмов доставки лекарств и создания новых терапевтических стратегий, включая системы целевой доставки препаратов.

Сравнение классических методов визуализации с СЭМ

Классическим методом клеточной визуализации в культивирование клеток является светооптическая микроскопия, которая позволяет наблюдать структуры в естественном или окрашенном состоянии с помощью света в видимом спектре. Световая микроскопия широко используется благодаря простоте методики, однако она имеет ограничение по разрешению, что делает ее недостаточной для изучения ультраструктурных деталей клеток. При анализе первичных культур СЭМ оказывается особенно полезным для изучения их адаптации к условиям культивирования. Этот метод позволяет детализировано наблюдать особенности морфологии таких клеток, их адгезию, формирование внеклеточного матрикса и ответ на стимулы.

Таблица 1.

Таблица сравнения различных методов визуализации клеточных культур

Метод	Принцип работы	Применение	Тип образца	Преимущества	Недостатки
СЭМ	Поток электронов создает изображение поверхности, вакуум	Морфология; Анализ поверхности; Взаимодействие с биоматериалом	Фиксирование, обезвоживание	Высокое разрешение; Детализированная поверхность	Подготовка (фиксирование, сушка)
АСМ	Сканирование зондом по поверхности	Наноструктуры; Механические свойства клеток.	Фиксирование/ в естественном виде	Высокая точность поверхности; анализ механических свойств	Маленькая площадь сканирования; Риск повреждения образца
Конфокальная микроскопия	Лазерное сканирование с флуоресцентным и красителями	Визуализация субклеточных структур; Динамика процессов	Фиксирование/ в естественном виде	Визуализация внутренних структур, культуры клеток в живом виде	Ограниченное оптическое разрешение (200нм); окрашивание
Криоэлектронная микроскопия	Замороженные образцы, вакуум	Белковые комплексы; Клеточные органеллы	Замороженные/ тонкие срезы	Высокое разрешение для субклеточных структур; нативное состояние.	Сложная и дорогостоящая подготовка; фиксирование

Сканирующий электронный микроскоп получил наибольшую популярность в 1970-1990 годах, в биологических исследованиях пик пришелся на 2000 года. Со временем технологии продвинулись вперед и метод сканирующего электронного микроскопа был вытеснен, в контексте культуры клеток, более современными методами: атомно-силовой микроскопии (АСМ), конфокальной микроскопии и различными формами криоэлектронной микроскопии. Новые методы стали предпочтительнее благодаря новым подходам и прогрессу технологий, что позволили анализировать клеточные культуры без фиксирования, в их естественной среде. СЭМ анализ приобрёл узкую специализацию, так как его роль в исследовании внутриклеточных структур или динамических процессов в клетках стала ограничена по сравнению с вышеупомянутыми современными методами.

Однако СЭМ обладает рядом преимуществ в сравнение с вышеперечисленными методами визуализации клеточных культур. В отличие от конфокальной микроскопии, которая ограничена оптическим разрешением и требует использования флуоресцентных красителей, СЭМ обеспечивает ультравысокое разрешение и детализированное изображение поверхности клеток без необходимых окрашиваний. Атомно-силовая микроскопия имеет ограниченную площадь сканирования и риск повреждения образца из-за физического контакта зонда с поверхностью. Криоэлектронная микроскопия в сравнение со сканирующей электронной микроскопией имеет более сложную и дорогостоящую пробоподготовку.

Методы пробоподготовки клеточных культур и сэм визуализация

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является мощным инструментом для анализа клеточных структур, однако подготовка образцов для этого типа исследования играет решающую роль в результативности метода и представляет собой сложную задачу. Стандартными этапами пробоподготовки культуры клеток для СЭМ анализа являются фиксация, дегидратация, сушка, прикрепление образцов к столику микроскопа и напыление токопроводящим материалом.

Метод фиксации

Задачей фиксации является сохранность клеточной нативной структуры, ее компонентов и представление подробного микроскопического вида в стабильном состоянии [10]. Фиксация является обязательным фактором подготовки образцов, так как в данном методе требуется, чтобы образцы находились в неподвижном состоянии и могли выдержать условия вакуума в камере микроскопа. Обычно для фиксации используются классические гистологические фиксирующие растворы: глутаровый альдегид, параформальдегид и формалин. Нейтрально-буферный формалин является фиксатором, который стабилизирует ткани путём образования метиленовых мостиков между аминокислотными остатками белков, а также между аминокислотами и нуклеотидами [5],[7],[10]. Формалин не всегда является наиболее оптимальным вариантом фиксации клеточных культур. Выбор фиксатора зависит от цели и изучаемого объекта, внутри- или внеклеточного компонента [10]. Глутаровый альдегид используется в качестве эффективного фиксатора, который образует сшивки между белками через свободные аминогруппы, создавая устойчивую трёхмерную сеть и обеспечивает хорошую сохранность ультраструктур клеток, таких как мембраны и органеллы, является эффективным фиксатором внеклеточного матрикса и межклеточных контактов. Однако его недостатком является риск образования неравномерных сшивок и изменения объёма клеток. Тетраоксид осмия зачастую используется, как постфиксирующий реагент, также играющий важную роль в морфологической визуализации клеток. Данный реагент используется не только для фиксации, но и для улучшения контрастности ультраструктур клеток. Этот фиксатор часто применяется для подготовки образцов для электронно-микроскопических исследований благодаря своей способности проникать в клетки и поддерживать их структуру на уровне нанометров.

Таблица 2.

Методы, применяемые для подготовки клеточных культур для СЭМ визуализации

	Категория	Принцип работы	Источник
<i>Метод фиксации</i>			
<i>Первичный фиксатор</i>			
	Глутаральдегид	Реагент прочно сшивающий белки, сохраняет клеточные ультраструктуры.	[9], [11]
	Параформальдегид	Полимерная форма формальдегида. Реагент, сшивающий белки, стабилизируя клеточные и тканевые структуры.	[4]
	Формалин	Водный раствор формальдегида. Реагент, сшивающий белки, стабилизируя клеточные и тканевые структуры.	[10]
<i>Вторичный фиксатор</i>			
	Тетрооксид осмия OsO ₄	Реагент, сшивающий белки и липиды	[9], [11], [4]
<i>Метод дегидратации</i>			
	Этанол	Последовательная дегидратация с повышением концентрации градиента.	[9], [11]
	Ацетон	Промежуточный дегидратант	[4]
<i>Метод сушки</i>			
	Сушка в критической точке	Заменяет этанол, используемый для дегидратации, инертным газом для сохранения морфологии клеток.	[9], [11]
	Естественная сушка	Сушка образцов на воздухе в биологическом защитном шкафу.	[9]
	Химическая сушка	Заменяет этанол, необходимый для дегидратации, на гексаметилдисилазан.	[9]
<i>Напыление</i>			
	Золото	Образует проводящий слой, увеличивает выход вторичных электронов, улучшает контраст.	[9], [11]
	Платина	Тонкий, однородный проводящий слой, снижает зарядку, улучшает детализацию.	[3],[8]

Метод дегидратации

СЭМ работает в вакууме, что может необратимо изменить структуру образца. Поэтому образцы, помещаемые в СЭМ, должны быть сухими и свободными от органических загрязнений, чтобы избежать вмешательства газовых молекул в вакуумную среду системы [1],[6]. Дегидратация необходима для удаления воды из биологических образцов. Для дегидратации необходимо подвергать образцы возрастающей концентрации этанола, что приводит к поэтапному вытеснению молекул воды, без ущерба для образца [2]. Дегидратация проводится путём последовательного погружения образцов в возрастающие концентрации этанола (от 30% до 100%). На завершающем этапе можно использовать ацетон для дополнительного вытеснения воды. Ацетон обладает высокой летучестью и способствует более эффективному удалению воды, снижая риск деформации образцов.

Метод сушки

Высушивание является неотъемлемой частью пробоподготовки биологического образца. Сушка должна минимизировать артефакты и сохранить структурную целостность образца

Наиболее часто используемым методом высушивания является процесс сушки в критической точке. Сушка в критической точке — это метод подготовки образцов, при котором вода в образце сначала замещается такими веществами, как этанол или ацетон, а затем они заменяются жидким CO_2 . После этого в приборе создаются условия, при которых жидкий CO_2 переводится в сверхкритическое состояние, позволяя удалить его без прохождения через фазу жидкость-газ, что предотвращает деформацию образца [9]. Незначительное изменение параметров присушки, может привести к усадке ткани и разрушению плазматической мембраны, что в свою очередь может привести к артефактам во время анализа. Сушка в критической точке, является эталонным методом для большинства образцов. Однако, даже при незначительных отклонениях от оптимальных условий могут происходить повреждения изображения [2]. Альтернативным вариантом процесса сушки в критической точке является использование гексаметилдисилазана. В процессе химической сушки вода в клетках или тканях заменяется на гексаметилдисилазан, который образует защитную оболочку вокруг клеток, предотвращая их повреждение и деформацию. Гексаметилдисилазан не вызывает усадки ткани, что позволяет сохранить форму клеток, что касается техники проведения химической сушки, следует отметить, что данный метод достаточно прост и не требует использования специализированного оборудования, что делает его доступным для исследовательских лабораторий. Следует отметить, что не смотря на привлекательные преимущества, метод не является универсальным для всех типов образцов из-за их несовместимости с гексаметилдисилазаном, а также ограничениями, связанными с сохранением биологической активности после этапа сушки.

Таким образом, каждый из методов сушки имеет свои преимущества и недостатки, которые определяют его применимость в зависимости от типа исследуемого образца. Сушка в критической точке остается золотым стандартом для большинства образцов, однако для некоторых клеточных структур или тканей

может быть более подходящим использование химической сушки с гексаметилдисилазаном. В некоторых случаях естественная сушка может быть полезна, однако она имеет ограничения, связанные с возможным разрушением клеточных структур. Выбор метода сушки зависит от цели исследования, типа образца и доступного оборудования, и требует тщательной настройки параметров для достижения наилучших результатов.

Метод напыления

Напыление позволяет значительно улучшить качество изображений, получаемых с помощью СЭМ, за счет предотвращения накопления заряда и увеличения контраста. Это особенно важно при анализе изолированных и непроводящих образцов, таких как биологические ткани, полимеры, наноматериалы и другие материалы, которые могут плохо проводить электричество. Напыление также помогает снизить фоновый шум и повысить резкость изображений, что позволяет исследователям более точно изучать морфологию и структуру материалов на нанометровом уровне. Напыление проводящих материалов, таких как золото, платина или палладий, позволяет устранить этот эффект и улучшить качество получаемых данных.

Методы установки подготовленных клеточных образцов на предметный столик микроскопа

Одной из важных задач при работе с СЭМ является прикрепление клеточных культур на предметный столик микроскопа. Предметные столики СЭМ стандартно представляют собой платформы с плоской поверхностью, выполненные из токопроводящих металлов. Их диаметр варьируется от 2 до 10 см, в зависимости от модели микроскопа и специфики исследования.

Установка клеток на такой столик является сложной задачей, для которой нет универсального решения. Разные исследователи используют различные подходы, включая фиксацию клеток на проводящих подложках, использование покровных стекол, нанесение клеточных слоев на металлические диски или использование клеевых материалов, совместимых с СЭМ. Выбор метода подготовки клеток зависит от цели анализа. При изучении клеточной морфологии ключевым является сохранение тонких структур, таких как мембраны и межклеточные контакты, поэтому клетки часто фиксируют на проводящих подложках с минимальным использованием дополнительных материалов. В то же время, при исследовании взаимодействия клеток с подложками или наноматериалами внимание сосредоточено на обеспечении их равномерного распределения и адгезии, что требует более сложных подходов, таких как использование специальных покрытий или функционализированных материалов. При этом ключевым остаётся обеспечение надёжного контакта образца с поверхностью столика для исключения потерь проводимости и минимизации артефактов при анализе.

Нами были рассмотрены методики, описанные в работах исследователей, касающиеся подготовки суспензионных и адгезивных клеточных культур. Суспензионные клеточные культуры представляют собой клетки, которые не прикрепляются к поверхности подложки и находятся во взвешенном состоянии в питательной среде. Адгезивные клеточные культуры, напротив, обладают

способностью самостоятельно прикрепляться к подложке, за счет распластывания и образования монослоя.

Метод подготовки, использованный для анализа выхода вирусных частиц из клеток. Адгезивная линия Веро культивировалась на покровных стеклах в чашках Петри. После фиксирования, дегидратации и сушки, с части образцов была снята плазматическая мембрана при помощи клейкой ленты, для обеспечения доступа к внутренним структурам клетки. Напыление было произведено тонким слоем платины [3].

Метод подготовки, использованный для оценки наноструктур прикреплённых к поверхности клеток. Адгезивная первичная культура мезенхимальных стволовых клеток полученная из жировой фракции и клетки адгезивной культуры остеосаркомы человека, были культивированы на кремниевых пластинах в чашках Петри. После фиксирования, дегидратации, сушки, образцы напыляли тонким слоем золота [9].

Метод подготовки, используемый для визуализации клеточных культур. Адгезивные: клетки рака молочной железы, первичные клетки рака молочной железы, а также первичная культура фибробластов культивировались на 12мм углеродных пленках прикрепленных в 12-луночные планшеты. После фиксации, дегидратации, сушки образцы напыляли тонким слоем золота. Суспензионные: линия эритролейкемии человека K562, линия острого моноцитарного лейкоза человека ThP-1, линия промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, культивировались классически в суспензии в культуральном пластике. Перед фиксацией, клетки осаждались на углеродной липкой пленке. Дальнейшая подготовка соответствовала методу адгезивных культур [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного анализа литературы были рассмотрены современные методики применения СЭМ в биомедицинских и биотехнологических исследованиях. Особое внимание уделено подготовке образцов, поскольку от правильности этого этапа зависит качество получаемых изображений и достоверность интерпретации данных. Рассмотрены три основных фиксатора: формалин, глутаральдегид и тетраоксид осмия. Формалин, является водным раствором формальдегида, который широко используется для фиксации биологических тканей. Он образует метиленовые мостики между аминоклассами белков, стабилизируя их структуру. Однако формалин может вызывать определенную степень усадки тканей и не обеспечивает достаточной фиксации липидных компонентов. Глутаральдегид, более мощный фиксатор, способный образовывать прочные ковалентные связи с белками. Он обеспечивает лучшую сохранность ультраструктуры клеток и тканей, что особенно важно для СЭМ-исследований. Тем не менее, глутаральдегид также неэффективен в фиксации липидов. Тетраоксид осмия, используется в качестве дополнительного фиксатора, особенно для стабилизации липидных компонентов мембран. Он взаимодействует с ненасыщенными связями липидов, повышая электронную плотность и контрастность мембранных структур при СЭМ-анализе. После фиксации образцы подвергаются дегидратации для удаления воды, что предотвращает артефакты при последующей сушке и напылении. Основными используемыми реагентами являются этанол и ацетон. Этанол, постепенное повышение концентрации этанола позволяет мягко удалить воду из образца, минимизируя риск структурных

изменений. Однако остаточные количества этанола могут вызывать артефакты при сушке. Ацетон, обладает высокой проникающей способностью и эффективно удаляет воду. Тем не менее, быстрая дегидратация с использованием ацетона может привести к усадке и деформации образца, особенно при работе с деликатными тканями. Три основных метода сушки были оценены с точки зрения их влияния на морфологию образцов. Сушка в критической точке, предотвращает капиллярные силы, способные деформировать структуру образца, обеспечивая сохранение его морфологии. Этот метод считается "золотым стандартом" для подготовки биологических образцов к СЭМ. Естественная сушка, простой и доступный метод, однако испарение воды может вызвать значительную усадку и деформацию образца, что ограничивает его применение для высокоточных исследований. Сушка с использованием гексаметилдисилазана, представляет собой альтернативу сушке в критической точке. Гексаметилдисилазан замещает воду в образце, испаряясь без значительных капиллярных эффектов, что позволяет сохранить структуру образца с минимальными искажениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сканирующая электронная микроскопия является незаменимым инструментом в биомедицинских и биотехнологических исследованиях, позволяя детально изучать морфологию клеток и их взаимодействия с различными материалами. Успех СЭМ-анализа во многом зависит от правильной подготовки образцов. Выбор оптимальных методов фиксации, дегидратации и сушки, а также надежное прикрепление клеток к подложкам, обеспечивают получение высококачественных изображений и достоверных данных. Понимание и применение этих методик способствует развитию новых моделей клеточных взаимодействий и созданию биоматериалов с заданными свойствами, что имеет ключевое значение для прогресса в фундаментальной и прикладной науке.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ:

1. Ali R, El-Boubbou K, Boudjelal M. An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*. 2021 Sep 20;8:101521. doi: 10.1016/j.mex.2021.101521. PMID: 34754792; PMCID: PMC8564727.
2. Bhattacharya, R., Saha, S., Kostina, O., Muravnik, L., & Mitra, A. (2020). Replacing critical point drying with a low-cost chemical drying provides comparable surface image quality of glandular trichomes from leaves of *Millingtonia hortensis* L. f. in scanning electron micrograph. *Applied microscopy*, 50(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s42649-020-00035-6>
3. Caldas LA, Carneiro FA, Augusto I, Corrêa IA, da Costa LJ, Miranda K, Tanuri A, de Souza W. SARS-CoV-2 egress from Vero cells: a morphological approach. *Histochem Cell Biol*. 2024 Jan;161(1):59-67. doi: 10.1007/s00418-023-02239-9. Epub 2023 Sep 22. PMID: 37736815.
4. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning electron microscopy. *Curr Protoc Microbiol*. 2012 May;Chapter 2:Unit 2B.2.. doi: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25. PMID: 22549162; PMCID: PMC3352184.
5. Helander KG (1994) Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*, 69:177–179.

6. A.M. Kashi, K. Tahermanesh, S. Chaichian, M.T. Joghataei, How to Prepare Biological Samples and Live, 3 (2014) 63–80.
7. Kashi, A.M., Tahemanesh, K., Chaichian, S., Joghataei, M.T., Moradi, F., Tavangar, S.M., Najafabadi, A.S., Lotfibakhshaiesh, N., Beyranvand, S.P., Anvari-Yazdi, A.F., & Abed, S.M. (2014). How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Medical Journal* 63–80.
8. Leong AS, Gilham PN (1989) The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology*, 21:266–268.
9. Malá Z, Vojta M, Loskot J, Sleha R, Ježek B, Zelenka J. Analysis of SARS-CoV-2 interactions with the Vero cell lines by scanning electron microscopy. *J Biol Phys*. 2023 Sep;49(3):383-392. doi: 10.1007/s10867-023-09638-y. Epub 2023 Jun 30. PMID: 37389665; PMCID: PMC10397163.
10. Minuti AE, Labusca L, Herea DD, Stoian G, Chiriac H, Lupu N. A Simple Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopic Imaging Allows Quick Screening of Nanomaterials Adhering to Cell Surface. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 27;24(1):430. doi: 10.3390/ijms24010430. PMID: 36613905; PMCID: PMC9820490.
11. Paavilainen L, Edvinsson Å, Asplund A, et al. The Impact of Tissue Fixatives on Morphology and Antibody-based Protein Profiling in Tissues and Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2010;58(3):237-246. doi:10.1369/jhc.2009.954321
12. Shao M, Jiang L, Cong W, Ouyang F. Analysis of Vero cell growth behavior on microcarrier by means of environmental scanning electron microscopy. *Sci China C Life Sci*. 2002 Apr;45(2):149-58. doi: 10.1360/02yc9017. PMID: 18763074.
13. Zhao, J., Yu, X., Shentu, X. et al. The application and development of electron microscopy for three-dimensional reconstruction in life science: a review. *Cell Tissue Res* 396, 1–18 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00441-024-03878-7>