

## Сканирующая электронная микроскопия легких крыс при блеомициновом фиброзе

С.В. Буравков<sup>1,2</sup>, С.А. Гаврилова<sup>1</sup>, Е.В. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

**Резюме. Введение.** Легочный фиброз – одно из тяжелых заболеваний легких, имеющее высокий риск смертности и функциональных нарушений. Блеомициновая модель легочного фиброза грызунов является одной из наиболее распространенных и часто используемых. Комплексные методики исследования депарафинированных тканей позволяют получить ценную информацию о морфологических, микроструктурных и химических изменениях в тканях без проведения отдельных исследований, на уже существующем материале. Целью данного исследования было выявление методом сканирующей электронной микроскопии характерных морфологических изменений в депарафинированных образцах легких на модели легочного фиброза, вызванного интратрахеальным введением блеомицина крысам. **Материалы и методы.** В работе моделировали развитие фиброза легких на крысах-самцах Вистар массой 200–250 граммов путем интратрахеального введения блеомицина. Спустя 28 дней легкие перфузировали 4% раствором нейтрального забуференного формалина через полую вену до остановки сердца, образцы дофиксировали 10% забуференным формалином в течение 36 часов, проводили через спирты и заливали в парафин. Для проведения сканирующей электронной микроскопии толстые, 250 мкм, срезы депарафинировали в ксилоле и спирте, насыщали гексаметилдисилазаном и высушивали на воздухе. После напыления золотом образцы просматривали и фотографировали на настольном электронном микроскопе JSM-7000.

**Результаты.** При помощи световой микроскопии признаки фиброза были обнаружены во всех исследованных препаратах легких крыс из экспериментальной группы. При этом выявлена очаговость развития фиброза и выделены три типа структурных изменений: 1) незначительные отличия от показателей в контрольной группе, 2) признаки воспаления с начальными явлениями образования коллагена, 3) области с полностью завершенным фиброзом.

**Заключение.** Применение сканирующей электронной микроскопии толстых срезов значительно расширяет возможности исследования легких при таких патологиях как фиброз, позволяя исследовать ультраструктуру поверхности с высоким разрешением, а также идентифицировать различные включения, вызывающие патологические изменения, обнаруживаемые с помощью метода рентгеновского микроанализа. Такой подход позволяет просто, быстро и недорого подготавливать образцы для сканирующей электронной микроскопии из архивных парафиновых блоков и дает более детальную структурную информацию о развитии фиброза легких.

**Ключевые слова:** сканирующая электронная микроскопия, блеомициновый фиброз, легкие крыс

**Для корреспонденции:** Сергей Валентинович Буравков. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

**Для цитирования:** Буравков С.В., Гаврилова С.А., Иванов Е.В. Сканирующая электронная микроскопия легких крыс при блеомициновом фиброзе. Клин. эксп. морфология. 2024;13(4):58–66. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.4.58-66.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (№ 76-23/110-03-124012400366-3).

Статья поступила 24.05.2024. Получена после рецензирования 14.06.2024. Принята в печать 24.06.2024.

## Scanning electron microscopy of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

S.V. Buravkov<sup>1,2</sup>, S.A. Gavrilova<sup>1</sup>, E.V. Ivanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

**Abstract. Introduction.** Pulmonary fibrosis is a serious lung disease with high risks of mortality and functional impairments. The model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rodents is one of the most common

and frequently used models. Complex methods for analyzing dewaxed tissues enable us to obtain valuable information about morphological, microstructural, and chemical changes in tissues using the existing material, i.e., without conducting separate studies. The purpose of this paper was to identify characteristic morphological changes in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, the medication being administered intratracheally, using scanning electron microscopy (SEM) in deparaffinized lung samples.

**Materials and methods.** The experiment included male Wistar rats weighing 200–250 g, in which pulmonary fibrosis was modeled by intratracheal administration of bleomycin. After 28 days, the lungs were fixed with perfusion of a 4% solution of neutral buffered formalin through the vena cava until cardiac arrest. The samples were further fixed with 10% buffered formalin for 36 hours, plunged into alcohols, and embedded in paraffin. For SEM, thick 250- $\mu$ m sections were deparaffinized in xylene and alcohol, saturated with hexamethyldisilazane, and air-dried. After gold sputtering, the samples were viewed and photographed under a JCM-7000 benchtop electron microscope.

**Results.** Light microscopy revealed signs of fibrosis in the lungs of all experimental rats. The fibrosis was local. We distinguished three types of structural changes: 1) slight structural differences from the control animals, 2) inflammation with initial signs of collagen formation, and 3) areas with complete fibrosis.

**Conclusion.** The use of SEM in analyzing thick sections significantly expands the possibilities of studying the lungs in such pathologies as fibrosis and allows one to examine high-resolution surface ultrastructures and identify various inclusions that cause pathological changes seen with X-ray microanalysis. This approach is simple, fast, and low-cost to prepare samples for SEM using existing paraffin blocks and provides more detailed structural information about the development of pulmonary fibrosis.

**Keywords:** scanning electron microscopy, bleomycin fibrosis, rat lungs

**Corresponding author:** Sergey V. Buravkov. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru

**For citation:** Buravkov S.V., Gavrilova S.A., Ivanov E.V. Scanning electron microscopy of rat lungs with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(4):58–66 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.58-66.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Lomonosov Moscow State University (No. 76-23/110-03-124012400366-3).

**Received** 24.05.2024. **Received in revised form** 14.06.2024. **Accepted** 24.06.2024.

## Введение

Фиброзирование является основным механизмом развития интерстициальных заболеваний легких, представляющих собой высокие риски смертности и функциональных нарушений. Первичный (идиопатический) легочный фиброз – относительно редкое, но крайне тяжелое заболевание, трудно поддающееся лечению [1, 2]. В последние годы существенно выросла встречаемость вторичного легочного фиброза, который может развиваться в исходе пневмонии, вызванной SARS-CoV2, и сопровождается значительным снижением респираторных функций [3]. Существующие антифибротические препараты ограничены в своих возможностях, а для разработки новых требуется более глубокое понимание механизмов повреждения и фиброирования легких. За последние десятилетия многими исследовательскими учреждениями проведены сотни научных работ, посвященных легочному фиброзу, в которых накоплены архивные гистологические материалы. Комплексные методики исследования депарфинированных тканей позволяют получить ценную информацию о морфологических, микроструктурных и химических изменениях в тканях без проведения отдельных исследований, на уже существующем материале.

Блеомициновая модель легочного фиброза грызунов является одной из наиболее часто используемых

и описанных в литературе. Она характеризуется относительно быстрым образованием фиброзной ткани, сохраняющейся в течение нескольких месяцев на фоне относительно низкой летальности и значимого снижения функции легких [4–6]. Блеомициновая модель выполняется в разных модификациях, с разными путями введения и дозами блеомицина. Поскольку путь введения и значительной степени влияет на повреждающий механизм и область воздействия, важно иметь четкие представления о механизмах повреждения и репарации для каждого из вариантов. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) депарфинированных тканей – удобный и информативный метод исследования, который пока не в должной степени освещен в научной литературе. Для последующего применения метода к архивным материалам требуются исследования, выполненные на контролируемых сериях экспериментов.

Цель исследования – выявить характерные морфологические изменения в модели легочного фиброза, вызванного интратрахеальным введением блеомицина крысам, методом СЭМ в депарфинированных образцах легких.

## Материалы и методы

При проведении исследований мы руководствовались положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспери-

ментов или в иных научных целях, а также правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено на заседании биоэтического комитета факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 2 от 09.02.2023).

Самцы крыс Вистар массой 200–250 граммов были получены из питомника конвенционального содержания в Институте медико-биологических проблем РАН. Всего в исследование после периода акклиматизации 2 недели ввели 30 животных (десять – группа контроля, 20 – экспериментальная группа, в которой моделировали легочный фиброз). В течение всего времени крыс содержали в конвенциональном виварии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при 12-часовом цикле освещения со свободным доступом к воде и стандартному комбикорму по три особи в клетке.

При моделировании фиброза блеомицин (Nippon Kaуaku, Япония), разведенный в стерильном физиологическом растворе, вводили интратрахеально крысам, анестезированным изофлураном в дозе 7,5 мг/кг. Методику моделирования фиброза и дозу препарата выбирали согласно данным литературы [6, 7]. За крысами наблюдали в течение 28 дней, после чего при глубокой анестезии вскрывали грудную клетку, сердце и легкие перфузировали 4% раствором нейтрального забуференного формалина через полую вену до остановки сердца. Легкие извлекали из грудной клетки и заполняли таким же раствором формалина для направления альвеол. Диафрагмальную долю правого легкого иссекали в области видимой патологии, выделяли срез толщиной не более 4 мм, который затем фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 36 часов. Далее образцы легкого отмывали проточной водой, обезвоживали в изопропиловых спиртах восходящей концентрации, минеральном масле и парафине, после чего заливали в парафиновые блоки.

В исследовании применяли методы корреляционной микроскопии для сравнения результатов, полученных при помощи световой микроскопии, с данными СЭМ. Для проведения СЭМ использовали блоки, залитые в парафин, с которых после получения срезов для световой микроскопии и их окрашивания гематоксилином и эозином и по методу Массона получали толстые срезы, 250 микрон. После этого их депарафинировали в ксилоле в течение суток при постоянном щадящем помешивании на шейкере (Shaker S-3, Латвия) при 50 об./мин, проводили через 100° спирт (30 минут) и гексаметилдисилазан (30 минут). Гексаметилдисилазан дает возможность обойтись без сушки при критической точке и высушивать образцы на воздухе без нарушения тонких структур поверхности [8]. Высушенные на воздухе образцы монтировали на столиках для микроскопа с использованием углеродного двустороннего скотча и напыляли золотом.

Анализ и фотографирование проводили на настольном сканирующем электронном микроскопе, оснащенном рентгеновским микроанализатором JSM-7000 (JEOL, Япония). Цифровые фотографии сохраняли в формате TIFF с разрешением 1.3 МП.

## Результаты

По результатам световой микроскопии признаки фиброза были обнаружены в 100% исследованных препаратов легких крыс из экспериментальной группы.

Корреляционная микроскопия очень удобна для сравнения результатов световой и электронной микроскопии. На рисунке 1 А представлен срез, окрашенный гематоксилином и эозином, а на рисунке 1 В – ультраструктура поверхности последующего толстого среза, подготовленного для проведения сканирующей микроскопии. Следует отметить, что при депарафинировании и монтаже срезов на столике для проведения СЭМ стоит обращать внимание на сторону, которая будет обращена наружу, иначе нарушится соответствие световой и электронной картины.

Более детальные изображения различных участков легких, полученные с помощью СЭМ у животных контрольной группы, приведены на рисунке 2. Поверхность серозной оболочки висцеральной плеврой представлена плоским однослойным эпителием из мезотелиальных клеток полигональной формы со множеством микроворсинок, образующих межклеточные соединения (рис. 2 А, В).

На рисунках 2 С и D показана ультраструктура поверхности бронха у животных контрольной группы при разном увеличении. Отчетливо видны складчатость и клеточная структура поверхности, клетки которой покрыты многочисленными микроворсинками. Наличие эритроцитов на поверхности свидетельствует об операционном заборе материала и не является артефактом.

Ультраструктура альвеолярной поверхности легких крыс контрольной группы представлена на рисунках 2 Е и F. При малом увеличении (рис. 1 В) альвеолярная часть легких напоминает пчелиные соты, каждая альвеола выстлана уплощенными клетками альвеолярного эпителия, основную часть которых занимают альвеолоциты 1-го типа, на их долю приходится 90–95% всей поверхности альвеолы. Эти клетки активно участвуют в газообмене и тесно контактируют с легочными кровеносными капиллярами. Альвеолоциты 2-го типа (рис. 2 F) имеют округлую или овальную форму и обладают многочисленными короткими микроворсинками на апикальной поверхности.

Исследование структуры поверхности с помощью СЭМ легких крыс с блеомицининдуцированным фиброзом при малом увеличении отчетливо выявило места пораженных областей. Следует сказать, что поражение легких носило гнездовый характер. В местах, где фиброзный процесс не начался, ультраструктура альвеол (рис. 3 А, В), а также эпителий висцеральной

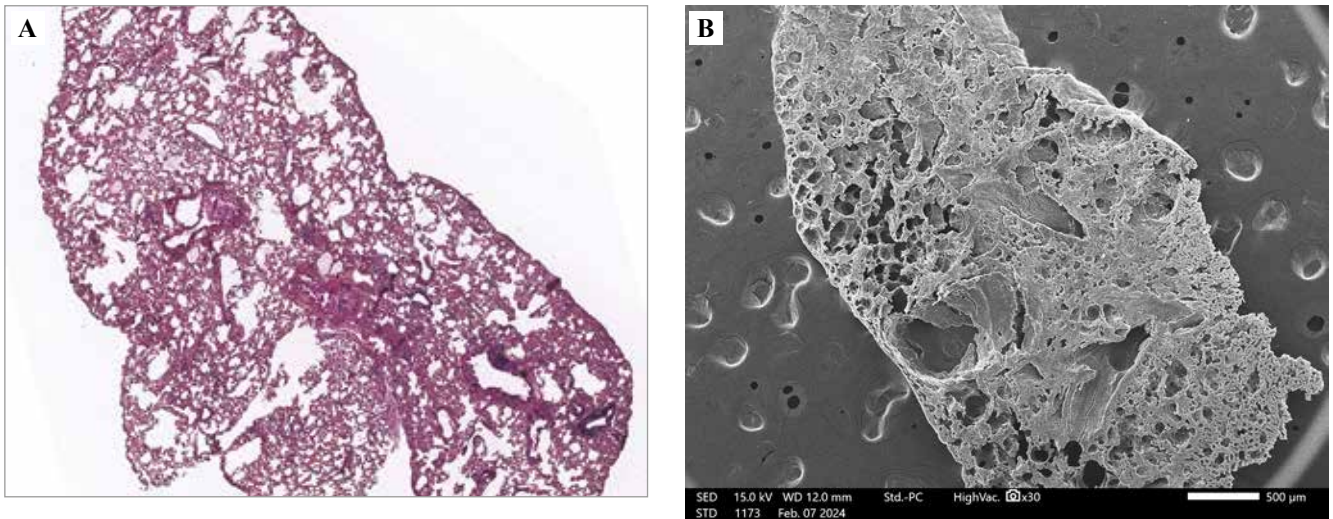


Рис. 1. Малое увеличение срезов легких крыс в контрольной группе животных.

А – 5 мкм срез, окрашенный гематоксилином и эозином. В – 250 мкм срез, подготовленный для проведения СЭМ. Масштабный отрезок соответствует 500 мкм

Fig. 1. Low magnifications of lung sections of rats in the control group of animals.

А – 5-µm section stained with H&E. В – 250-µm section prepared for SEM. The scale bar is 500 µm

плевры (рис. 3 С, D) не отличались от таковых у контрольных животных. Вместе с тем встречались места с резко выраженной воспалительной реакцией с лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 4 А, В) с появлением тонких отдельных волокон коллагена (до 0,1 мкм), еще не сплетающихся в пучки. В областях с полностью завершившимся фиброзом практически отсутствовала клеточная структура, а все пространство было занято волокнами коллагена. Размер волокон, расположенных отдельно, составлял порядка 0,1 мкм, они часто располагались хаотично, однако, сливаясь в жгуты, могли достигать 5 мкм, заполняя все пространство в ткани. В значительной степени поиск локализации мест исследования под электронным сканирующим микроскопом облегчался наличием параллельных гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином и трихромом по Массону.

### Обсуждение

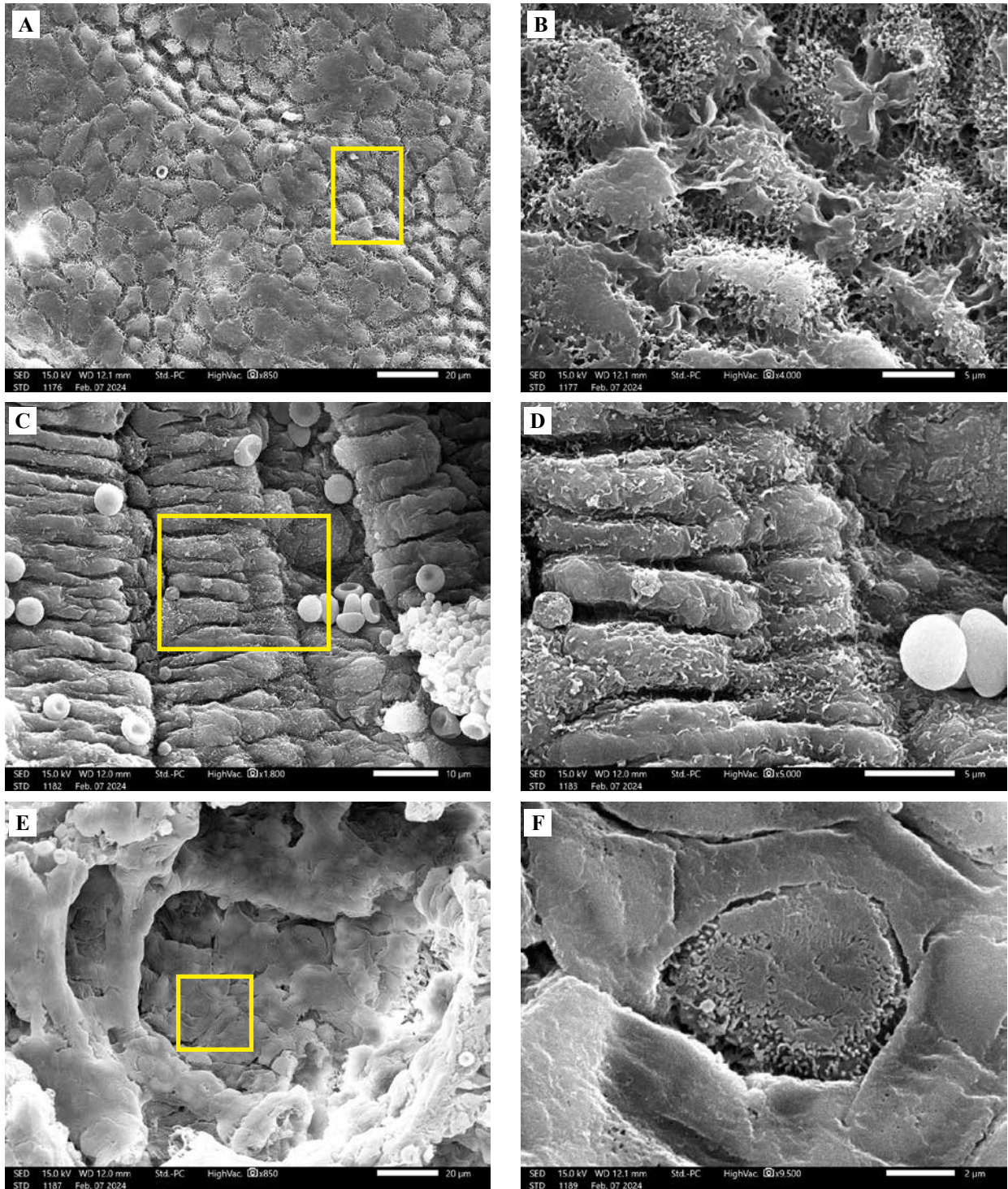
В исследовании использовался метод корреляционной микроскопии, когда параллельно анализировали срезы 5 мкм в световом микроскопе, окрашенные гематоксилином и эозином или по Массону, а в сканирующем электронном микроскопе – толстые, 250 мкм, срезы после их депарафинирования. Это дает возможность легко идентифицировать как место, так и соответствующие структуры. Очень часто в работах можно встретить корреляционные исследования в конфокальном или флуоресцентном микроскопе с последующей сканирующей электронной микроскопией для получения более детальной морфологической информации о структуре [9]. В случае наличия каких-либо включений, имеющих место при различных профессиональных заболеваниях легких, таких как силикозы, асбестозы

и т.д., они легко могут быть идентифицированы, и их химический состав определен с помощью рентгеновского микроанализа [10, 11].

Исследования легких методом сканирующей электронной микроскопии проводились в Институте морфологии человека еще в 1987 году Л.К. Романовой [12]. Однако тогда не осуществлялось корреляционное исследование со световой микроскопией, а изучались объемные образцы легочной ткани, подготовленные специально для СЭМ.

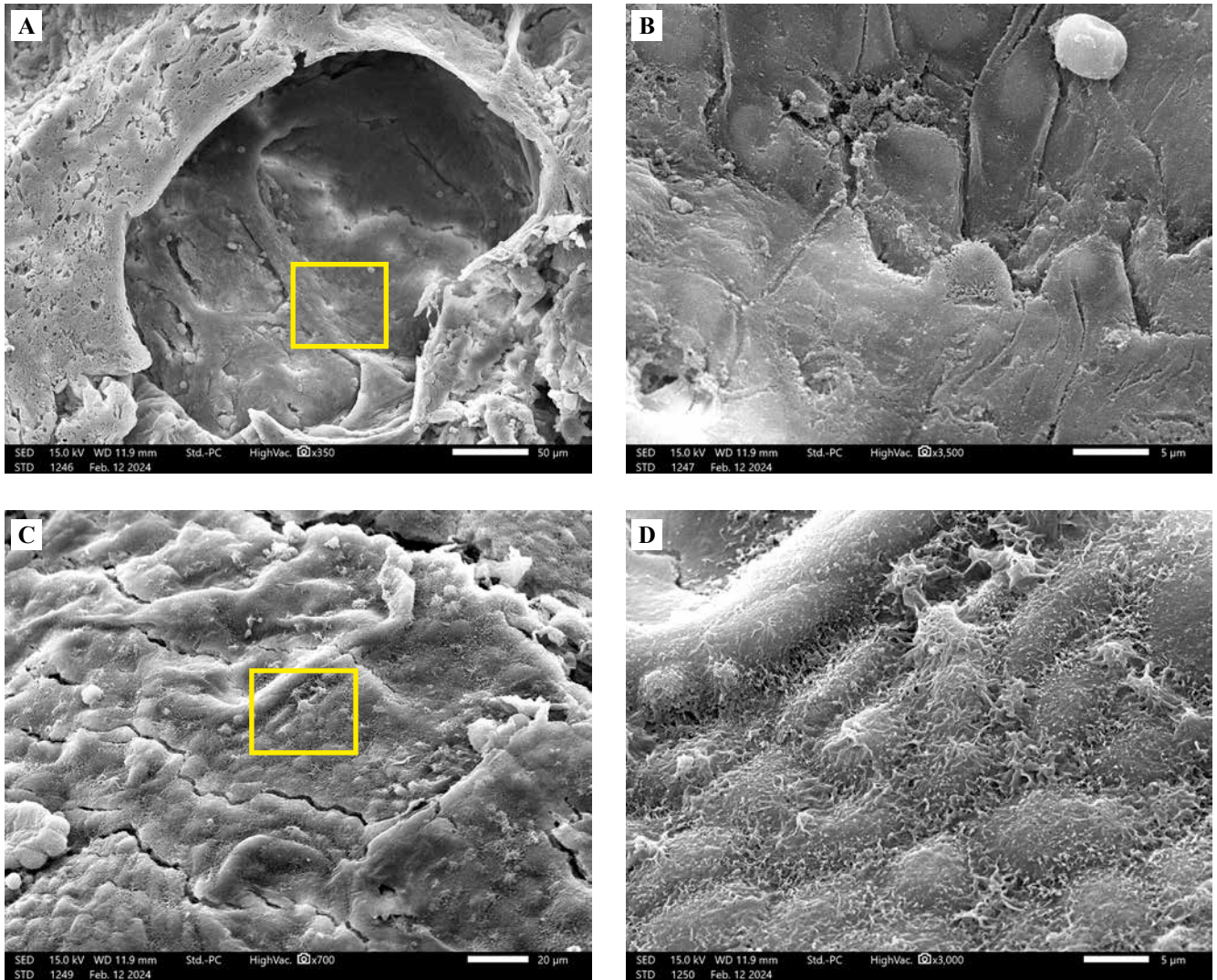
В своей работе мы показали, что архивный материал, залитый в парафин, возможно использовать для исследований не только в световом, но и в сканирующем электронном микроскопе, что дает возможность более детально увидеть ультраструктуру клеточной поверхности без каких-либо значительных дополнительных затрат.

В наших исследованиях не отмечены изменения мезотелиальных клеток висцеральной плевры при развитии фиброзного процесса при использованной нами модели легочного фиброза. Считается, что основной функцией мезотелиальных клеток является секреция серозной жидкости, а также синтез и транспорт веществ из серозной жидкости в лимфатическое русло. Мезотелиальные клетки висцеральной плевры (МКВП) метаболически активны, поддерживают динамическое состояние гомеостаза в плевральном пространстве. В ответ на повреждение они реагируют пролиферацией и хемотаксисом, покрывая участки оголенного внеклеточного матрикса. Этот ответ опосредуется аутокринной сигнализацией, обусловленной выработкой хемокинов. Юкстакринные и паракринные связи между клетками обеспечивают быструю реакцию во время воспаления [13]. МКВП являются фагоцитар-



**Рис. 2.** Сканирующая электронная микроскопия ультраструктуры поверхности легких крыс контрольной группы.  
 А – легкое в области висцеральной плеуры. Масштабный отрезок 20 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Видны многочисленные микроворсинки и множественные межклеточные контакты. Масштабный отрезок 5 мкм.  
 С – ткань легкого в области бронхов. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм.  
 E – ультраструктура поверхности альвеолы. Масштабный отрезок 20 мкм. F – тот же участок при большем увеличении. В центре отчетливо виден альвеолоцит 2-го типа. Масштабный отрезок 2 мкм

**Fig. 2.** SEM of the ultrastructure of the lung surface in the control group of animals.  
 A – lung in the area of visceral pleura. The scale bar is 20 µm. B – an enlarged view of the area marked with a square in A. Numerous microvilli and multiple intercellular contacts are visible. The scale bar is 5 µm. C – lung tissue in the area of bronchi. The scale bar is 20 µm. D – an enlarged section of bronchi, marked with a square in C. The scale bar is 5 µm. E – ultrastructure of the alveolar surface. The scale bar is 20 µm. F – enlarged area marked with a square in E. Type 2 alveolar cells are clearly visible in the center. The scale bar is 2 µm



**Рис. 3.** Сканирующая электронная микроскопия ультраструктуры поверхности легких крыс с блеомициновым фиброзом. А – ткань легкого в области альвеол. Масштабный отрезок 50 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм. С – легкое в области висцеральной плевры. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм

**Fig. 3.** SEM of the ultrastructure of the lung surface with bleomycin-induced fibrosis. A – lung tissue in the area of alveoli. The scale bar is 50 µm. B – enlarged section of alveoli marked with a square in A. The scale bar is 5 µm. C – lung in the area of the visceral pleura. The scale bar is 20 µm. D – enlarged section of the ultrastructure of the pleural surface marked with a square in C. The scale bar is 5 µm

ными и продуцируют несколько цитокинов и молекул адгезии [14]. Мезотелиальные клетки имеют микроворсинки и множество межклеточных контактов. Размер и форма, а также количество микроворсинок и органелл в МКВП могут отражать ее функциональность. В МКВП экспрессируются белки плотных соединений, которые, как известно, определяют парацеллюлярную проницаемость [15].

Развитие фиброза носило гнездовый характер, вследствие чего изменения альвеол трудно было оценить. В тех местах, где процесс не начался, ультраструктура поверхности альвеолоцитов как 1-го, так и 2-го порядка выглядела неизменной и не отличалась от контрольных образцов. Альвеолоциты 2-го порядка –

это активно секретирующие клетки, формирующие легочный сурфактант. Очень часто поверхность альвеолоцитов покрыта сурфактантом, представляющим собой поверхностно активную жидкую среду. Функция сурфактанта – снижение поверхностного натяжения пленки тканевой жидкости, покрывающей альвеолярный эпителий, что препятствует слипанию стенки при дыхании. Кроме того, легочный сурфактант осуществляет бактерицидную и иммуномодулирующую функции, стимулирует активность альвеолярных макрофагов.

Предложенный нами метод корреляционного анализа можно использовать при исследовании других легочных патологий. В последнее время значительный

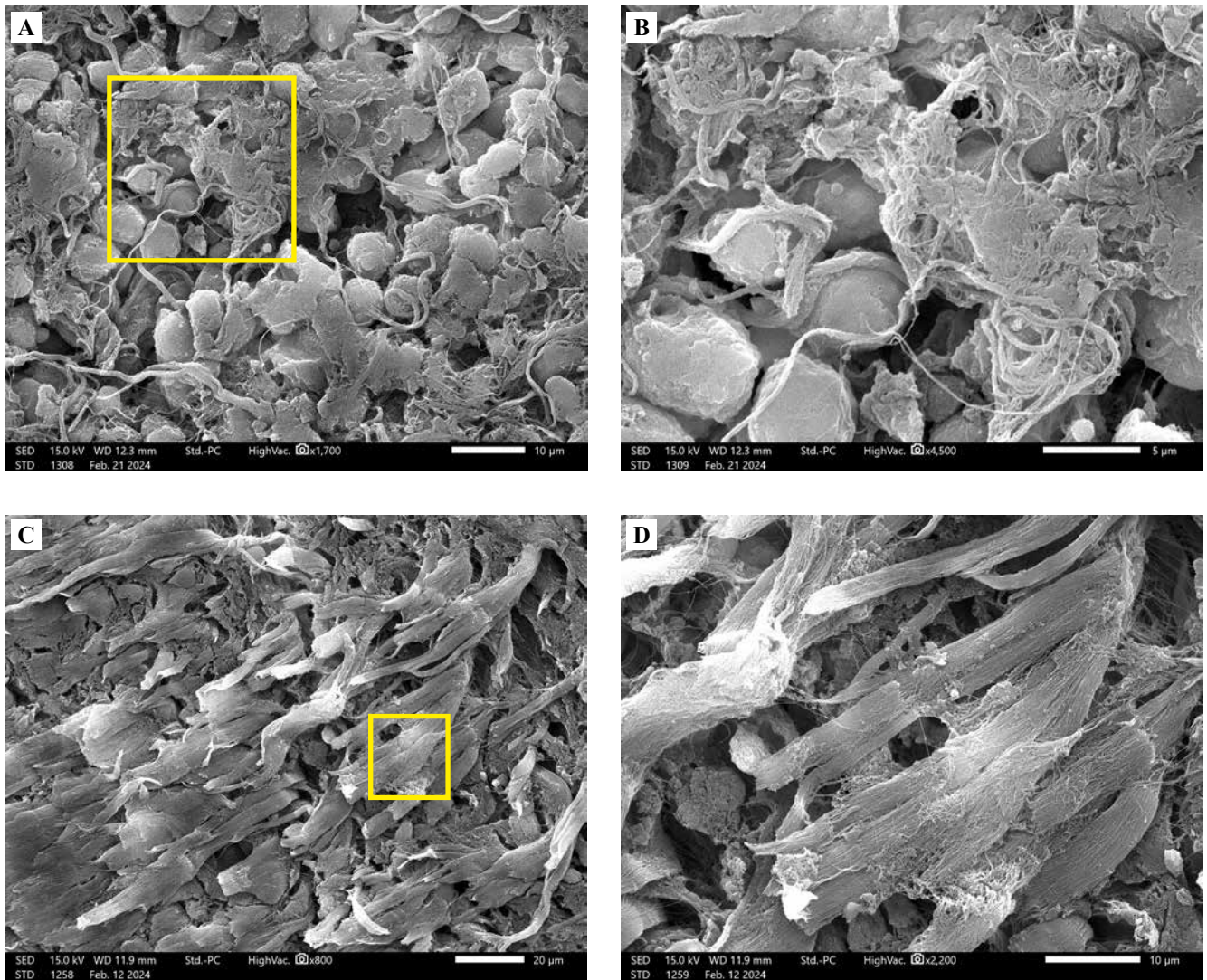


Рис. 4. Очаг воспалительной реакции в легких крыс с блеомициновым фиброзом и завершившимся фиброзом.

А – множественные лимфоциты и коллагеновые пучки. Масштабный отрезок 10 мкм. В – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 5 мкм. С – участок завершившегося фиброза, отмечаются множественные пучки коллагеновых волокон. Масштабный отрезок 20 мкм. D – тот же участок при большем увеличении. Масштабный отрезок 2 мкм

Fig. 4. The focus of the inflammatory reaction in the lungs of rats with bleomycin-induced fibrosis and complete fibrosis.

A – multiple lymphocytes and collagen bundles. The scale bar is 10 μm. B – enlarged area of inflammation marked with a square in A. The scale bar is 5 μm. C – area of complete fibrosis, multiple bundles of collagen fibers. The scale bar is 20 μm. D – enlarged area marked with a square in C. The scale bar is 2 μm

интерес возник при исследовании методом СЭМ легких пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Так, в работе T. Congiu et al. [16] были обнаружены значительные изменения в ультраструктуре легких, вызванные сужением дыхательных путей. Альвеолярные полости были заполнены фибриллярными структурами, похожими на фибрин. Внутри альвеол часто присутствовали эритроциты, окруженные ретикулярной фибриновой сетью, что указывает на геморрагический альвеолит. Альвеолярные изменения тесно коррелировали с изменениями сосудов, в которых отмечались повреждение эндотелия и тромбоз. Фибриновые микротромбы многократно обнаруживались в ка-

пиллярах межальвеолярной перегородки. Кроме того, нередко выявлялась пролиферация капилляров в альвеолярных перегородках, указывающая на неоангиогенез [17].

### Закключение

Применение сканирующей электронной микроскопии существенно расширяет возможности исследования легких при различных патологиях, включая фиброз. Для анализа могут использоваться парафиновые блоки, в том числе архивные, с которых режут толстые, 250-микронные, срезы и депарафинируют их. Параллельные срезы, получаемые для световой

микроскопии, значительно облегчают идентификацию ультраструктур на сканирующей электронной микроскопии. Помимо получения высокого разрешения ультраструктур поверхности становится возможной химическая идентификация различных включений, вызывающих патологические изменения, с помощью метода рентгеновского микроанализа.

Такой подход является простым, быстрым и недорогим способом подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии из архивных парафиновых блоков. Он дает более детальную структурную информацию о развитии фиброза легких.

#### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

Сбор и обработка материала – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

Написание текста – С.В. Буравков, Е.В. Иванов.

Редактирование – С.В. Буравков, С.А. Гаврилова, Е.В. Иванов.

#### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

Collected the data and performed the analysis – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

Wrote the paper – S.V. Buravkov, E.V. Ivanov.

Edited the manuscript – S.V. Buravkov, S.A. Gavrilova, E.V. Ivanov.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

#### Литература/References

1. Wu W, Qiu L, Wu J, Liu X, Zhang G. Efficacy and safety of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2021;11(12):e050004. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-050004.
2. Finnerty JP, Ponnuswamy A, Dutta P, Abdelaziz A, Kamil H. Efficacy of antifibrotic drugs, nintedanib and pirfenidone, in treatment of progressive pulmonary fibrosis in both idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and non-IPF: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2021;21(1):411. DOI: 10.1186/s12890-021-01783-1.
3. Tanni SE, Fabro AT, de Albuquerque A, Ferreira EVM, Verastro CGY, Sawamura MVY et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med*. 2021;15(6):791–803. DOI: 10.1080/17476348.2021.1916472.
4. Kolb P, Upagupta C, Vierhout M, Ayaub E, Bellaye PS, Gaudie J et al. The importance of interventional timing in the bleomycin model of pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2020;55(6):1901105. DOI: 10.1183/13993003.01105-2019.
5. Li S, Shi J, Tang H. Animal models of drug-induced pulmonary fibrosis: an overview of molecular mechanisms and characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 2022;38(5):699–723. DOI: 10.1007/s10565-021-09676-z.
6. Danaei N, Kokhdan EP, Sadeghi H, Sadeghi H, Hassanzadeh S, Rostamzadeh D et al. *Stachys pilifera* Benth. Ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through the antioxidant pathways. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:6208102. DOI: 10.1155/2022/6208102.
7. Ren YX, Zhou R, Tang W, Wang WH, Li YC, Yang YF et al. (5R)-5-Hydroxytryptolide (LLDT-8) protects against bleomycin-induced lung fibrosis in mice 1. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(4):518–25. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00524.x.
8. Buravkov SV, Chernikov VP, Buravkova LB. Simple method of specimen preparation for scanning electron microscopy. *Bull Exp Biol Med*. 2011;151(3):378–82. DOI: 10.1007/s10517-011-1335-7.
9. Casares-Arias J, Alonso MA, San Paulo Á, González MU. Correlative confocal and scanning electron microscopy of cultured cells without using dedicated equipment. *STAR Protoc*. 2021;2(3):100727. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100727.
10. Monsó E, Tura JM, Pujadas J, Morell F, Ruiz J, Morera J. Lung dust content in idiopathic pulmonary fibrosis: a study with scanning electron microscopy and energy dispersive x ray analysis. *Br J Ind Med*. 1991;48(5):327–31. DOI: 10.1136/oem.48.5.327.
11. Grosso F, Croce A, Trincheri NF, Mariani N, Libener R, Degiovanni D et al. Asbestos fibres detected by scanning electron microscopy in the gallbladder of patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *J Microsc*. 2017;266(1):48–54. DOI: 10.1111/jmi.12517.
12. Романова Л.К. Органы дыхания. В кн.: О.В. Волкова, В.А. Шахламов, А.А. Миронов (ред.). Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. Москва: Медицина, 1987. С. 288–333.
13. Романова Л.К. Respiratory system. In: OV Volkova, VA Shakh-lamov, AA Mironov (eds.). Atlas of scanning electron microscopy of cells, tissues, and organs. Moscow: Meditsina, 1987. P. 288–333 (In Russ.).
14. Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration*. 2008;75(2):121–33. DOI: 10.1159/000113629.
15. Jonjić N, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P et al. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med*. 1992;176(4):1165–74. DOI: 10.1084/jem.176.4.1165.
16. Markov AG, Amasheh S. Tight junction physiology of pleural mesothelium. *Front Physiol*. 2014;5:221. DOI: 10.3389/fphys.2014.00221.
17. Congiu T, Demontis R, Cau F, Piras M, Fanni D, Gerosa C et al. Scanning electron microscopy of lung disease due to COVID-19 – a case report and a review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(24):7997–8003. DOI: 10.26355/eurrev\_202112\_27650.
18. Kwon KY, Park KK, Chang ES. Scanning electron microscopic study of capillary change in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Korean Med Sci*. 1991;6(3):234–45. DOI: 10.3346/jkms.1991.6.3.234.



**Информация об авторах**

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Светлана Анатольевна Гаврилова – доктор биологических наук, доцент кафедры физиологии и патологии, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Евгений Викторович Иванов – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Author information**

Sergey V. Buravkov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Leading Researcher, Laboratory of Muscle Activity Physiology, Institute of Biomedical Problems.  
<https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

Svetlana A. Gavrilova – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Physiology and Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.  
<https://orcid.org/0000-0002-8776-6062>

Evgenii V. Ivanov – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Cell Structures Image Analysis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.  
<https://orcid.org/0000-0002-3382-4458>