

УДК 620.187.3, 576.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ДЕТАЛЕЙ СИСТЕМ ОТРОСТКОВ АСТРОЦИТОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОРРЕЛЯТИВНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ И ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. О. И. Агапова¹, А. Е. Ефимов¹, Е. А. Образцова^{2,3}, К. Е. Мочалов², Д. О. Соловьева², В. А. Олейников^{2,4}, И. И. Агапов^{1,*}, академик РАН С. В. Готье^{1,5}

Поступило 29.11.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принято к публикации 28.12.2023 г.

Наноразмерные морфологические особенности разветвленных отростков глиальных клеток могут иметь определяющее значение для нейрон-астроцитарных взаимодействий в норме и в патологии. В работе представлены результаты корреляционного анализа изображений тонких отростков астроцитов в нервной ткани головного мозга мыши, полученных методами сканирующей зондовой микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии с высоким пространственным разрешением. Образцы были приготовлены и визуализированы с помощью уникальной аппаратной комбинации методов ультрамикротомии и сканирующей зондовой микроскопии. Было показано, что на изображениях идентифицируются детали астроцитов толщиной порядка десятков нанометров, что может быть использовано в дальнейшем для восстановления трехмерной структуры астроцитарных отростков за счет интеграции серий последовательных изображений сверхтонких срезов нервной ткани.

Ключевые слова: сканирующая зондовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, астроциты, нервная ткань, ультрамикротомия.

DOI: 10.31857/S2686738924020146, **EDN:** WEXZZQ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

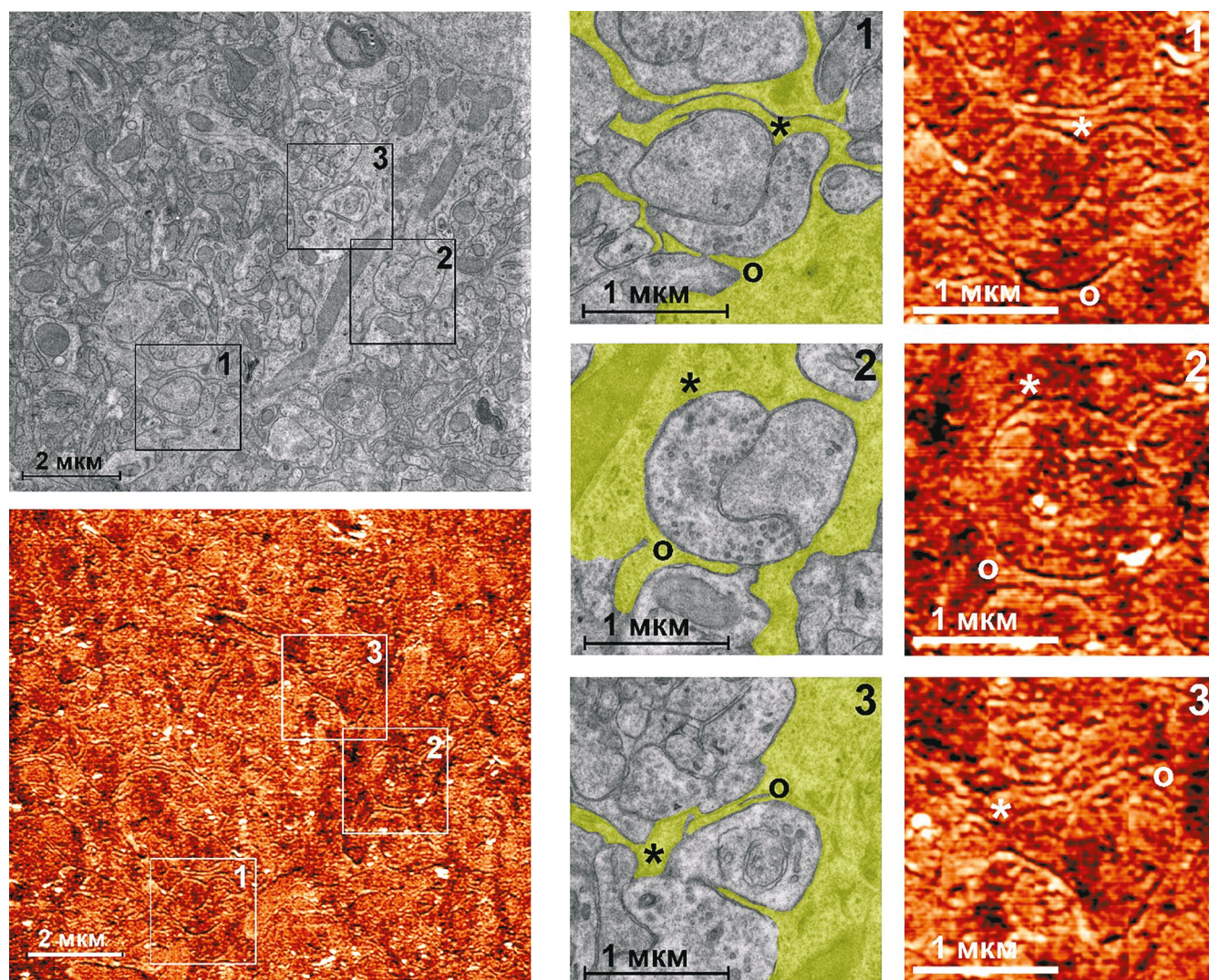
³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия.

⁵Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

*E-mail: igor.agapov@gmail.com

Астроциты являются важнейшими компонентами нейронных цепей, наиболее распространенными глиальными клетками в центральной нервной системе и участвуют в синаптических, контурных и поведенческих функциях. Хорошо развитые протоплазматические астроциты содержат многочисленные отростки, имеющие сложную разветвленную форму. При нормальных физиологических процессах, таких как развитие и старение мозга, а также при патологических процессах, например эпилепсии, болезни Альцгеймера, наблюдаются значительные изменения в нейрон-астроцитарных взаимодействиях. В частности, данные изменения регулируются отростками астроцитов. Обнаружение и изучение патологий этих микроструктур стало возможно только благодаря инновационным подходам в микроскопии. Однако клеточные и молекулярные механизмы изменений в астроцитарных отростках малоизучены. Критически важным для понимания и дальнейшего исследования этих структур является возможность разрешить ультратонкие детали самих астроцитов и областей их контактов с другими структурами [1]. Мелкие астроцитарные отростки имеют наноразмеры, что



Комплементарные ПЭМ- и СЗМ-изображений участков астроцитов. Обзорные изображения (слева) и увеличенные участки (справа). На увеличенных изображениях тонкие отростки астроцитов на ПЭМ-изображениях отмечены цветом, символами указаны комплементарные области.

исключает использование световой микроскопии без дополнительного маркирования ткани флуоресцентными метками и обуславливает необходимость использования методов микроскопии высокого разрешения [2]. Современные подходы позволяют сочетать различные методы визуализации и манипулирования тканями для получения трехмерной картины таких сложных структур, как астроциты [3–5]. Однако данные различных взаимодополняющих методов получения изображений с большим пространственным разрешением требуют разработки не только процедур накопления данных, но и методик идентификации элементов на изображениях, алгоритмов восстановления трехмерных структур.

В данной работе мы представляем результаты проведения сравнительного анализа коррелятивных измерений систем отростков астроцитов

методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) с использованием ультрамикротомии (УМТ). В предыдущих работах нами была разработана уникальная научная установка (<http://skr-rf.ru/usu/486825/>), объединяющая в себе техники СЗМ и УМТ [6–8]. Эта разработка позволяет многократно производить сверхтонкие (до 20 нм) срезы с поверхности образца с последующим получением СЗМ-изображений, восстанавливая таким образом морфологию образца. Данная методика получила название "сканирующая зондовая нанотомография" (СЗНТ) и может быть использована для восстановления трехмерной ультраструктуры биологических объектов за счет интегрирования СЗМ-изображений поверхности образца после последовательных сверхтонких срезов. Данный метод представляется перспективным для исследования

тонкой структуры астроцитов, тем более что получение СЗМ-изображений может быть дополнено измерениями пространственного распределения флуоресцентно-меченых объектов и спектральной информации методом конфокальной микроспектроскопии на тех же участках [7]. Для корректной интерпретации изображений, полученных с помощью СЗМ, и однозначного определения элементов астроцитов в случае исследования тканей мозга требовалось проведение предварительных корреляционных измерений с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Для измерений использована ткань мозга “гено-типически здоровых” мышей линии 5xFAD. Ткань мозга мышей была фиксирована путем транскардиальной перфузии растворами альдегидов, извлечена и дополнительно фиксирована 1%-ным раствором тетраоксида осмия. Затем — обезвожена и заключена в акрилатную среду.

При помощи ультрамикротом, входящего в состав установки СЗНТ с алмазным ножом Diatome Ultra AFM 35 (Diatome AG, Швейцария), были получены сверхтонкие срезы образцов тканей толщиной 70 нм. Применяемые алмазные ножи позволяют получить не только малую толщину среза, но и достаточно гладкую поверхность, что критически важно для проведения измерений методом СЗМ.

Несколько последних срезов были перенесены на стандартные медные бленды для электронной микроскопии с покрытием из формвара. После чего образцы были контрастированы с использованием насыщенных водных растворов уранилацетата и цитрата свинца согласно [9].

ПЭМ-изображения срезов нервной ткани были получены в режиме СПЭМ (сканирующей электронной микроскопии в просвечивающем режиме) с использованием микроскопа Zeiss Merlin (Zeiss, Германия). Для получения достаточного контраста изображений были использованы ускоряющие напряжения 20–24 кВ, ток зонда 150–180 пА. Такие параметры измерений позволили получать изображения как в просвечивающем режиме, так и в режиме обратно отраженных электронов.

Поверхность блока залитого образца нервной ткани непосредственно после выполнения срезов была проанализирована при помощи СЗМ, входящего в состав установки СЗНТ. Для ориентации на поверхности образца были использованы обзорные изображения с малым увеличением, на которых можно было найти реперные особенности, например крупные образования характерной формы. Такие реперные особенности были использованы для согласования масштаба и угла поворота изображений СЗМ и СПЭМ.

Поскольку при использовании СЗМ разрешение изображений ограничено количеством точек, в которых проводятся измерения, для выделения тонких астроцитарных структур были получены СЗМ-изображения меньшего размера с существенно более высоким латеральным разрешением. На рисунке приведены комплементарные ПЭМ- и СЗМ-изображения участков астроцитов. На ПЭМ-изображениях желтыми контурами отмечены участки, которые мы идентифицируем как астроциты. Соответствующие структуры на СЗМ-изображениях отмечены стрелками. Видно, что применение электронной микроскопии позволяет получить изображения более высокого качества. Однако СЗМ-изображения имеют достаточную детализацию для определения характерных деталей нервной ткани. Анализ приведенных данных позволяет заключить, что наиболее уверенно на СЗМ-изображениях можно регистрировать тонкие отростки астроцитов (веточки, листочки) толщиной 50–100 нм в окрестностях синапсов и щелевых контактов, которые выглядят как окружающие их удлинённые двух- или трехслойные структуры. Изучение подобных астроцитарно-нейронных взаимодействий является важной задачей, поскольку подвергается изменениям при ряде патологий. Приведенные изображения были получены для выполненного сверхтонкого среза при помощи ПЭМ и поверхности блока после среза при помощи СЗМ. Однако, несмотря на максимально приближенные к комплементарности объекты, коррелятивная морфология наблюдаемых структур не полностью совпадает, что говорит о том, что морфология астроцитарных участков может заметно изменяться на масштабе нескольких толщин среза, которая составляет всего несколько десятков нанометров.

Таким образом, на основании коррелятивных измерений методами СЗМ и ПЭМ в работе показано, что сканирующая зондовая микроскопия может применяться для эффективной визуализации тканей головного мозга и исследования особенностей строения астроцитов с пространственным разрешением на нанометровом уровне. При этом методически можно рекомендовать выполнение измерений с разрешением не более 2 нм/рх. При анализе изображений в первую очередь необходимо регистрировать удлинённые двух- или трехслойные структуры толщиной от 50 до 100 нм, располагающиеся вокруг синапсных структур размерами около 1 мкм. Данные удлинённые структуры с высокой вероятностью являются тонкими астроцитарными отростками, которые можно сегментировать для последующей трехмерной реконструкции. Использование СЗНТ для последовательного удаления тонких слоев с поверхности блока и получения СЗМ-изображений тканей головного мозга даст

возможность восстановить трехмерную картину распределений астроцитарных участков.

При этом важно отметить, что использование СЗМ для анализа поверхности блоков не требует контрастирования с применением соединений тяжелых металлов. Это может играть важную роль для минимизации нарушений клеточных структур, вызываемых фиксацией и контрастированием. Кроме того, соединения тяжелых металлов, используемые для контрастирования в электронной микроскопии, в большинстве случаев значительно снижают эффективность использования флуоресцентных маркеров. Таким образом, использование СЗНТ как метода исследований трехмерной ультраструктуры нервной ткани также расширяет возможности применения и коррелятивных методик флуоресцентной микроскопии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Сутягину О. И. за помощь в подготовке биологических образцов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00168) в части получения образцов и выполнения ПЭМ-исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней, а также в соответствии с Директивой 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований и с этическими регламентами ИБХ РАН по содержанию и использованию животных, учитывающими этические и юридические нормы Rus-LASA и международные GLP-стандарты. Настоящее исследование

одобрено комиссией ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных, протокол № 337/2021 от 15.11.2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zuo Y.-X., Jiang R. T., Zhou B. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2019. V. 25. P. 661–807.
2. Kiyoshi C.M., Aten S., Arzola E.P., et al. Ultrastructural view of astrocyte-astrocyte and astrocytesynapse contacts within the hippocampus // *bioRxiv*. 2020.
3. Morita M. Modern Microscopic Approaches to Astrocytes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 5883.
4. Curry N., Ghézali G., Kaminski Schierle G.S., et al. Correlative STED and Atomic Force Microscopy on Live Astrocytes Reveals Plasticity of Cytoskeletal Structure and Membrane Physical Properties during Polarized Migration // *Front. Cell. Neurosci.* 2017. V. 11. P. 104.
5. Kikuchi T., Gonzalez-Soriano J., Kastanauskaitė A., et al. Volume Electron Microscopy Study of the Relationship Between Synapses and Astrocytes in the Developing Rat Somatosensory Cortex // *Cerebral Cortex*. 2020. V. 30. P. 3800–3819.
6. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., et al. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography // *Review of Scientific Instruments*. 2017. V. 88. P. 023701.
7. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Сафонова Л.А. и др. Сканирующая оптическое-зондовая нанотомография для исследования структуры биоматериалов и клеток // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 500. № 1. С. 483–487.
8. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., et al. An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography // *Ultramicroscopy*. 2017. V. 182. P. 118–123.
9. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов; отв. ред. Н.Н. Никольский. – СПб.: Наука, 1994.
10. Hanaichi T., Sato T., Iwamoto T., et al. A Stable Lead by Modification of Sato's Method // *Journal of Electron Microscopy*. 1986. V. 35. P. 304–306.

IDENTIFICATION OF ULTRASTRUCTURAL DETAILS OF THE ASTROCYTE PROCESS SYSTEM IN NEURAL TISSUE OF THE BRAIN USING CORRELATIVE SCANNING PROBE AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

**O. I. Agapova^a, A. E. Efimov^a, E. A. Obraztsova^{b,c}, K. E. Mochalov^b, D. O. Solovyeva^b,
V. A. Oleinikov^{b,d}, I. I. Agapov^{a,*}, Academician of the RAS S. V. Gautier^{a,e}**

^a*Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

^b*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^c*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation*

^d*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation*

^e*Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

^{*}*E-mail: igor.agapov@gmail.com*

Nanoscale morphological features of branched processes of glial cells may be of decisive importance for neuron-astrocytic interactions in health and disease. The paper presents the results of a correlation analysis of images of thin processes of astrocytes in the nervous tissue of the mouse brain, obtained by scanning probe microscopy and transmission electron microscopy with high spatial resolution. Samples were prepared and imaged using a unique hardware combination of ultramicrotomy and scanning probe microscopy. It was shown that the images identified details of astrocytes with a thickness of the order of tens of nanometers, which can be used in the future to reconstruct the three-dimensional structure of astrocytic processes by integrating a series of sequential images of ultrathin sections of nervous tissue.

Keywords: scanning probe microscopy, transmission electron microscopy, astrocytes, neural tissue, ultramicrotomy.