



УДК 616-076.4:616-097

# РАЗРАБОТКА МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНО-КОНТРАСТИРУЮЩЕГО ИММУНООКРАШИВАНИЯ ДЛЯ 3D-ВИЗУАЛИЗАЦИИ АСТРОЦИТАРНОЙ УЛЬТРАМОРФОЛОГИИ

© 2024 г. К. Е. Мочалов\*, О. И. Сутягина\*, \*\*, А. В. Алтунина\*, \*\*\*, Д. О. Соловьева\*,  
А. Е. Ефимов\*\*\*\*, В. А. Жучков\*, С. П. Чумаков\*, В. А. Олейников\*, \*\*\*\*\*, #

\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

\*\*\* ФГ АОУ ВО “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский  
университет)”,

Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

\*\*\*\* ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных  
органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России,

Россия, 123182 Москва, ул. Щукинская, 1

\*\*\*\*\* Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ (Московский инженерно-физический  
институт),

Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 12.11.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

Изменение астроцитарной ультраморфологии может лежать в основе развития нейродегенеративных процессов на их ранних стадиях. Однако механизмы ее изменения до настоящего времени изучены мало, поскольку размеры периферических астроцитарных отростков, формирующих основу астроцитарного синаптического покрытия, лежат за пределами разрешающей способности большинства методов оптической микроскопии (ОМ). В свою очередь, недостатком перспективных для таких исследований методов электронной (ЭМ) и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) является отсутствие возможности определения целевого участка исследования за счет одновременного использования флуоресцентной микроскопии иммуноокрашенных клеток и возможности полноценного 3D-анализа образцов. В данной работе рассмотрена концепция решения вышеуказанной проблемы за счет применения инструментального подхода, объединяющего в рамках единого аппаратного комплекса методы СЗМ и ОМ совместно с ультрамикротомией в качестве метода восстановления 3D-структуры образца. Для реализации предлагаемой комбинированной методики (оптико-зондовой нанотомографии) в данной статье представлена разработка первой стадии создания специализированных флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител. Такой тип метки обеспечит как иммуноокрашивание “зоны интереса” для восстановления 3D астроцитарной ультраморфологии, так и контрастирование астроцитов методом СЗМ.

*Ключевые слова:* астроцитарная ультраморфология, нейродегенеративные процессы, сканирующая зондовая микроскопия, оптическая микроспектроскопия, однодоменные антитела (наноантитела), флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, оптико-зондовая нанотомография

**DOI:** 10.31857/S0132342324050027, **EDN:** LSDJAJ

Сокращения: ОМ – оптическая микроскопия; ЭМ – электронная микроскопия; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; ОЗНТ – оптико-зондовая нанотомография; SVR – отношение площади поверхности к объему (surface-to-volume ratio); УМТ – ультрамикротомия; НТ – наноантитела; НК – нанокристаллы.

# Автор для связи: (тел.: +7 (910) 409-84-55; эл. почта: voleinik@mail.ru).

## ВВЕДЕНИЕ

Приоритетное направление современной нейробиологии – изучение клеточных механизмов нейродегенеративных процессов и, в частности, поиск способов выявления и предотвращения нейродегенерации на ранних стадиях развития заболеваний. При этом считается, что важную роль в нейродегенеративных процессах играет глия [1, 2], и развитие патологий мозга при старении и нейродегенеративных заболеваниях (эпилепсии, болезни Альцгеймера) начинается с изменений в астроцитах [3–5]. Известно, что астронейрональные взаимодействия лежат в основе работы головного мозга [1, 6, 7], и в норме астроциты обеспечивают нейропротекцию и метаболическую поддержку нейронов, регулируют активность нейронов и локальный кровоток [8], участвуют в регуляции синаптической передачи [1, 7, 9] и механизмах синаптической пластичности. Нарушение астронейрональных взаимодействий сопровождается снижением когнитивных функций, потерей памяти, психическими расстройствами [1]. В свою очередь, астроциты потенциально могут быть использованы в качестве мишеней для терапии, предотвращающей негативные изменения до начала развития необратимых нейродегенеративных процессов.

В соответствии с моделью трехчастного синапса в организацию синаптических связей между нейронами вовлекаются отростки астроцитарных клеток [6, 10]. Терминальные отростки астроцитов преимущественно располагаются в непосредственной близости от постсинаптического отдела, охватывая по периметру синаптическую щель [11]. Астроциты эффективно модулируют синаптическую передачу, контролируя ионный гомеостаз. В частности, тонкие астроцитарные отростки несут на мембране многочисленные транспортеры глутамата (GLT-1 и GLAST/GLT-1) [12], осуществляют удаление из синаптической щели глутамата и снабжение нейрональных терминалей глутамином [2, 9, 13–15]. Участие астроцитов в регуляторных процессах включает изменение их ультраморфологии. Астроцитарные отростки динамически реагируют на изменения в окружающей среде и за счет актинового цитоскелета способны к быстрой пространственной реорганизации [16], в частности терминальные отростки могут вытягиваться при высокой синаптической активности, обуславливая

повышение эффективности захвата глутамата. Возможны и еще более тонкие ультраструктурные изменения – перемещение транспортеров GLT-1 по мембране отростка в сторону большей концентрации глутамата [17, 18].

Изменение астроцитарной ультраморфологии может лежать в основе развития нейродегенеративных процессов на их ранних стадиях. Так, на примере гиппокампа продемонстрирована связь снижения синаптической пластичности при старении с дистрофией астроцитов, в том числе с истощением фракции мелких астроцитарных отростков. Продемонстрированное ранее снижение эффективности захвата глутамата астроцитами при болезни Альцгеймера [4, 5] также с большой долей вероятности может быть обусловлено тонкими изменениями в компартменте терминальных астроцитарных отростков, в частности ингибированием экспрессии GLT-1 вблизи депозитов  $\beta$ -амилоида.

Таким образом, для понимания регуляторных и дисфункциональных астронейрональных процессов огромное значение имеет изучение клеточных и молекулярных механизмов изменений в терминальных отростках астроцитов на ультраструктурном уровне на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний. Однако эти механизмы до настоящего времени недостаточно хорошо изучены, что во многом связано с тем, что размеры периферических астроцитарных отростков, формирующих основу астроцитарного синаптического покрытия (стандартная толщина  $\sim 100$  нм) [16, 19], лежат за пределами разрешающей способности большинства методов оптической микроскопии. В частности, они не могут быть визуализированы с помощью широко распространенной конфокальной или двухфотонной микроскопии. Ультраструктура клеточных компонентов с разрешением от десятков до единиц нанометров может быть исследована методами микроскопии высокого разрешения (электронная (ЭМ) и сканирующая зондовая (СЗМ) микроскопия), однако у этих методик есть существенный недостаток – отсутствие возможности определения целевого участка исследования за счет одновременного использования флуоресцентной микроскопии иммуноокрашенных клеток и возможности полноценного 3D-анализа образцов. Необходимость точного выбора участка

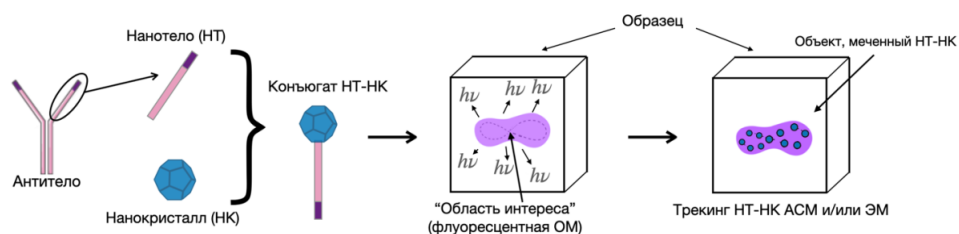
“зоны интереса” с использованием иммунного окрашивания очевидна, поскольку это в значительной степени оптимизирует экспериментальную процедуру как с точки зрения значительного сокращения времени измерений, так и существенного повышения их информативности. При этом информация о 3D-структуре периферических астроцитарных отростков не менее важна. Так, одним из ключевых параметров, определяющих физиологические свойства астроцитарных отростков (например, интенсивность обменных процессов и характер ионной динамики), является показатель отношения площади поверхности структуры к ее объему (surface-to-volume ratio, SVR) [19], который невозможно определить без 3D ультраструктурной реконструкции. Для решения указанной проблемы с успехом могут быть использованы современные методы корреляционной микроскопии [20–22], объединяющие в рамках единого аппаратного комплекса методы микроскопии высокого разрешения (ЭМ и СЗМ), оптическую микроскопию (ОМ) и методики восстановления 3D-структуры, такие как, например, ультрамикротомия (УМТ).

Однако использование данных методик для исследования астроцитарной ультраморфологии требует соответствующей адаптации методик иммунофлуоресцентного мечения астроцитов с целью как минимизации общего размера меток, так и их комбинированного использования для флуоресцентного окрашивания в режимах ОМ и контрастирования в режимах ЭМ и СЗМ. В данной работе мы предлагаем методику иммунофлуоресцентного мечения астроцитов с использованием однодоменных антител (наноантител), конъюгированных со стандартным флуоресцентным красителем, с целью использования для комбинированного исследования ультраморфологии методами элек-

тронной, оптической, сканирующей зондовой микроскопии и оптико-зондовой нанотомографии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Концепция использования конъюгатов наноантител и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов для визуализации астроцитарных структур методом оптико-зондовой нанотомографии (ОЗНТ).** ОЗНТ предлагается в качестве коррелятивной методики, позволяющей в ходе одной экспериментальной процедуры получать данные о расположении “зоны интереса” методом широкопольной флуоресцентной ОМ и объемную ультраструктуру астроцитов методом СЗМ, комбинированным с УМТ. Данная методика основана на проведении последовательных УМТ-срезов заключенного в эпоксидные смолы образца и одновременном получении совмещенных данных ОМ/СЗМ от каждого среза. Далее последовательность данных 2D-ОМ/СЗМ соответствующими программными средствами восстанавливается в массив 3D-ОМ/СЗМ. Данный подход обеспечивает полноценное решение ранее указанной задачи восстановления 3D астроцитарной ультраморфологии в иммуноокрашенной “зоне интереса”. Важно отметить, что использование в качестве меток флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов дает дополнительную возможность контрастирования астроцитарных сетей на фоне остального объема образца. В действительности особенностью СЗМ является то, что данный метод “видит” все содержимое образца, а не то, что помечено специальными контрастирующими агентами, как это происходит в случае ЭМ. Предлагаемая концепция визуализации объемной ультраструктуры астроцитов отображена на рис. 1 и заключается в следующем:



**Рис. 1.** Концепция использования флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов наноантител (НТ) и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (НК) для визуализации объемной ультраструктуры астроцитов методом ОЗНТ.

- проводится иммуномечение соответствующих участков астроцитарных сетей с использованием конъюгатов антител к определенному белку, содержащемуся в астроцитах, и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов;
- исследуемые образцы фиксируются и иммобилизуются в эпоксидных смолах;
- в определяемых с помощью флуоресцентной ОМ по излучению нанокристаллов “зонах интереса” проводится восстановление данных 3D-СЗМ;
- с использованием высокого контраста нанокристаллов в режиме СЗМ проводится восстановление непосредственной ультраструктуры астроцитов в “зоне интереса”.

Важно отметить, что использование антител для иммунофлуоресцентного мечения – это общепринятый подход. Однако большинство доступных в настоящее время коммерческих антител, предназначенных для иммуноцитохимического окрашивания, представляют собой крупные молекулы иммуноглобулинов. Кроме того, значительная часть доступных коммерческих антител предназначена для метода непрямого иммуноцитохимического окрашивания, когда с белком интереса связываются первичные антитела, не несущие на себе флуоресцентной метки, после чего с первичными антителами связываются вторичные антитела, несущие флуорофор; на одно первичное антитело прикрепляется, как правило, несколько вторичных. Таким образом очевидно, что в целом размеры таких меток чрезвычайно большие для ультраструктурных исследований, поэтому в данном подходе предпочтительным видится использование так называемых однодоменных антител (наноантител) – антител, представляющих собой мономерный антигенсвязывающий переменный домен, например, V<sub>HH</sub>-E9 верблюжьих антител [23, 24]. За счет своего небольшого размера наноантитела глубже проникают в объемные образцы, чем обычные антитела [24], что должно способствовать более глубокому окрашиванию 400-мкм блока, предназначенного для дальнейшего изготовления срезов вибротома, что дает преимущество при нацеливании на менее доступные эпитопы, а также способствует более мягкому окрашиванию, сохраняющему ультраструктуру [25, 26]. Кроме того, локализация одиночной молекулы с помощью методов ЭМ и СЗМ требует специфической доставки меток в

непосредственной близости от целевого белка. Вследствие большого размера иммуноглобулинов их применение для визуализации может привести к получению ошибочного результата при используемой разрешающей способности, что происходит из-за существенного расстояния между меткой и белком-мишенью. Однако предлагаемые конъюгаты наноантител обеспечат минимальную ошибку благодаря их небольшому размеру [24]. Кроме того, на данный момент в мире существуют наработки, связанные с получением высокоориентированных конъюгатов наноантител с флуоресцентными полупроводниковыми нанокристаллами [27], что дает основания считать дальнейшую разработку указанного выше подхода весьма перспективной. Однако сама по себе методика иммуноокрашивания наноантителами астроцитов до настоящего времени не разработана. На решение этой задачи и была направлена данная работа.

**Разработка методики иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей.** Как было показано выше, астроцитарная морфология на ультраструктурном уровне может быстро изменяться при перемене условий [16], таким образом, для получения объективной ультраморфологической картины в течение всей пробоподготовки вплоть до момента фиксации необходимо поддерживать состояние среды, максимально приближенное к нативному. Это требование и было положено в основу модификации протокола иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей.

На первом этапе при подготовке срезов гиппокампа материал в течение всего процесса резки находился в растворе, соответствующем по составу спинномозговой жидкости, а также в течение всего процесса нарезки производили карбогенизацию раствора. Поскольку при нарезке клеточные структуры подвергаются стрессу, перед фиксацией срезы инкубировали в растворе, аналогичном используемому при резке, но характеризующемся повышенным содержанием глюкозы, способствующей восстановлению ткани после стресса.

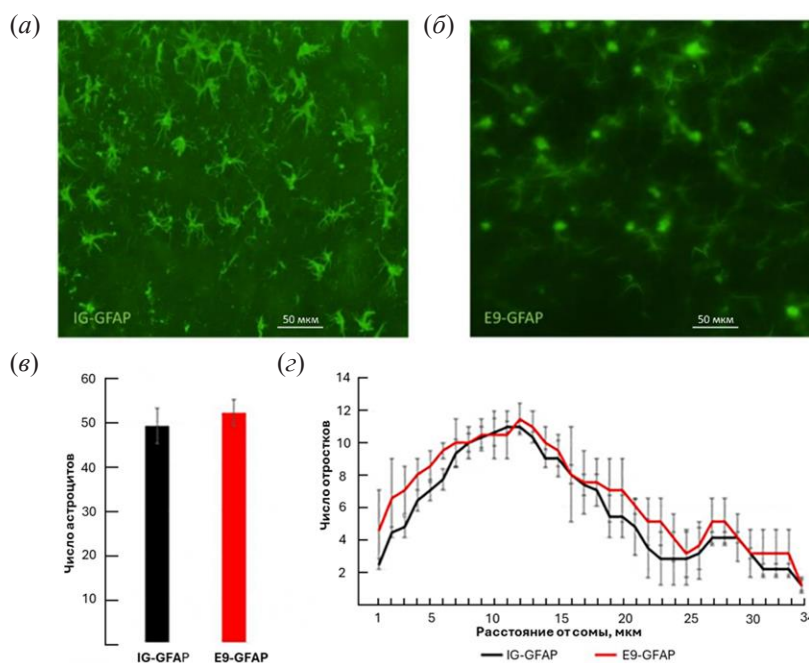
Для иммуноцитохимического окрашивания в данной работе использовали специфичные к GFAP коммерческие кроличьи поликлональные антитела (ab7260; Abcam, США) и наноантитела

VНН-Е9, специфичные к GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAМ, специально произведенные на базе ИБХ РАН.

**Эффективность иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами наноантител и флуоресцентных красителей методом флуоресцентной микроскопии.** Флуоресцентные изображения срезов мозговой ткани, окрашенных конъюгатами коммерческих антител и наноантителами, приведены на рис. 2а и 2б соответственно). Оба способа окрашивания продемонстрировали тканевую архитектуру гиппокампа и морфологию астроцитарных клеток, соответствующие нормальным. Анализ полученных изображений с использованием программного обеспечения Fiji (Fiji/ImageJ2 – общедоступное программное обеспечение для обработки и анализа изображений, www.fiji.sc) показал, что плотность выявляемых при иммуноокрашивании астроцитов в зоне *stratum radiatum* составляет  $49 \pm 4$  и  $52 \pm 3$  на  $250\,000\ \mu\text{m}^2$  при использовании коммерческих антител и наноантител соответственно (рис. 2в). Сравнение выявляемой при различных окрашиваниях морфологии астроцитов посредством анализа Шолля (определение числа астроцитарных отростков, детектируемых по мере удаления

от астроцитарной сомы) показало совпадение в пределах статистической ошибки Шолль-профилей, полученных с изображений с разным окрашиванием (рис. 2г). Таким образом, можно сделать вывод о равной на макроуровне эффективности иммуноокрашивания, достигаемого при помощи коммерческих антител-иммуноглобулинов и наноантител.

Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанной методики пробоподготовки в целом и иммуноокрашивания с использованием изготовленных наноантител VНН-Е9 в частности, что открывает перспективы разработки аналогичной методики, но уже с использованием флуоресцентно-контрастирующих агентов на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов. Нанокристаллы типа “ядро/оболочка” (например, CdSe/ZnS) обладают узким симметричным пиком флуоресценции (в отличие от органических красителей), высокой яркостью флуоресценции и уникально высокой фотостабильностью [28]. Кроме того, их высокая твердость и непрозрачность для электронных пучков делает их крайне привлекательными для использования в качестве контрастирующих агентов для СЗМ и ЭМ.



**Рис. 2.** Визуализация астроцитов гиппокампа мыши C57Bl6 (зона *stratum radiatum*). (а) – Иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител IgG-GFAP; (б) – иммуноцитохимическое окрашивание с использованием наноантител E9-GFAP; (в) – плотность астроцитов в зоне *stratum radiatum* (число астроцитов на  $250\,000\ \mu\text{m}^2$ ) при окрашивании IgG-GFAP и E9-GFAP; (г) – профиль 2D-анализа Шолля (количество пересечений астроцитарных отростков с концентрическими сферами с центром в середине клеточной сомы) одиночных астроцитов при окрашивании IgG-GFAP и E9-GFAP.

Важно отметить, что создание методики иммуноокрашивания/контрастирования с использованием конъюгатов изготовленных нанокристаллов – важная задача работ по внедрению методики ОЗНТ в область исследования 3D астроцитарной ультраморфологии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Животные.** В работе использовали трех самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 6 месяцев весом  $29 \pm 0.5$  г, предоставленных НПП “Питомник лабораторных животных” ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Для получения биоматериала мышей умерщвляли путем декапитации, предварительно проводили анестезию изофлураном (1-хлор-2,2,2-трифторэтилдиформетилловый эфир), выполняли декапитацию, извлекали гиппокампы, который впоследствии закрепляли в специальном агаровом блоке для соблюдения необходимой ориентации, позволяющей минимально повредить функциональные связи и максимально сохранить структуру клеток.

**Изготовление срезов гиппокампа.** После извлечения гиппокампы переносили в раствор, соответствующий по составу спинномозговой жидкости, содержащий (в mM) 92 *N*-метил-D-глюкамина (NMDG), 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 NaHCO<sub>3</sub>, 20 NEPEP, 25 глюкозы, 2 тиомочевины, 5 Na-аскорбата, 3 Na-пирувата, 0.5 CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O и 10 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. Срезы толщиной 350 мкм изготавливали с помощью вибрационного микротомы (Microm HM650 V; Thermo Fisher Scientific, США). Для восстановления ионного равновесия срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе, содержащем (в mM) 127 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> и 25 D-глюкозы. Все растворы имели осмолярность  $295 \pm 5$  мОсм, pH 7.4 и были насыщены карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>).

**Иммуноцитохимическое окрашивание.** Общая методика окрашивания при применении коммерческих или нанокристаллов VNH-E9 состоит из следующих этапов. Для проведения иммуноцитохимического окрашивания срезы гиппокампа фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 60 мин при 37°C, затем дважды промывали фосфатным буферным раствором (PBS, pH 7.4). Фиксированные срезы инкубировали в блок-растворе (PBS с 0.3%

Triton-X100, 0.1% Tween 20 и 5%-ным раствором BSA) при комнатной температуре в течение 90 мин для пермеабиллизации. После пермеабиллизации срезы инкубировали в растворе первичных антител в PBS с 0.01% Tween 20 в течение 60 ч при 25°C, трижды промывали PBS (3 смены по 10 мин) и в случае коммерческих первичных антител инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при 25°C в темноте.

Для окрашивания использовали нанокристалл VNH-E9 (специфичные к глиальному фибриллярному кислому белку GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAM, произведенные на базе ИБХ РАН) или первичные кроличьи моноклональные антитела против глиального фибриллярного кислого белка GFAP (ABIN-3043832) + вторичные антимышиные поликлональные антитела Alexa Fluor® 594 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (кат. № AB\_2338871; Jackson ImmunoResearch, США).

Нанокристаллы VNH-E9, специфичные к GFAP, конъюгированные с флуорофором малеинид-FAM, произведены на базе ИБХ РАН. Для этого нуклеотидная последовательность, кодирующая нанокристалл VNH-E9 к GFAP с добавленной на 3'-конце последовательностью, кодирующей 6 гистидинов и цистеин, была синтезирована (ДНК-синтез, Россия) и клонирована в экспрессионную плазмиду pET22 по сайтам рестрикции XbaI и BamHI. Для получения штамма-продуцента pET22-VNH-E9 были трансформированы клетки *Escherichia coli* штамма Rosetta-gami (DE3) (Novagen, США). Нарработку белка проводили при помощи автоиндукции в питательной среде LB без NaCl с добавлением 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% глицерина, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы. Нанокристаллы очищали из осветленных клеточных лизатов при помощи металл-хелатной хроматографии на колонках HisTrap FF (Cytiva, США) с последующей гель-фильтрацией на колонке 16/60 HiPrep Sephacryl S200 HR (Cytiva, США). Для флуоресцентного мечения нанокристаллы использовали малеимид-FAM (Lumiprobe, Россия). К раствору VNH-E9 (1 мг/мл) в PBS добавляли 10 mM раствор флуоресцентной метки в DMSO в 20-кратном молярном избытке и оставляли в атмосфере аргона при 3°C на 18 ч. Для удаления непрореагировавшего красителя образец очищали на колонке PD-10 (Cytiva, США).

Наноантитела VNH-E9 непосредственно конъюгированы с флуорофором, коммерческие антитела ab7260 (Abcam, США) предназначены для непрямого иммуноцитохимического окрашивания, в качестве вторичных антител использовали коммерческие ослиные антикроличьи поликлональные антитела Alexa Fluor® 488 (AB\_2313584; Jackson ImmunoResearch, США). Оптимальное разведение наноантител VNH-E9 (1 : 100) было определено на серии образцов посредством титрования, для коммерческих антител использовали разведение, рекомендуемое для иммуноцитохимического исследования в описании продукта.

Для визуализации использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия), объективы PlanApo 20× и 40×, цифровую камеру AxioCamHR.

**2D-Анализ Шолля.** Анализ морфологии астроцитов, визуализированных при различных способах окрашивания, осуществляли посредством теста Шолля с использованием программного обеспечения FiJi (Fiji/ImageJ2, [www.fiji.sc](http://www.fiji.sc)) [29–31]. Тест предполагает построение концентрических окружностей с увеличивающимся радиусом (5–50 мкм с шагом 1 мкм) из центра сомы астроцита с регистрацией числа пересечения окружностей каждого радиуса с астроцитарными отростками для каждой клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие комбинированных методик, объединяющих в себе методы высокоразрешающей микроскопии типа ЭМ и СЗМ, оптической микроспектроскопии и методик восстановления 3D-ультраструктуры образца необходимо для изучения клеточных и молекулярных механизмов изменений в терминальных отростках астроцитов на ультраструктурном уровне на ранних стадиях развития нейродегенеративных заболеваний. Такого рода исследования требуются для понимания регуляторных и дисфункциональных астроцитарных процессов, лежащих в основе развития нейродегенеративных заболеваний.

В качестве перспективной методики такого рода в данной работе предложена концепция применения методики ОЗНТ, позволяющей в ходе одной экспериментальной процедуры получать данные о расположении “зоны интереса” методом широкопольной флуоресцентной ОМ и объемную ультраструктуру астроцитов методом

СЗМ, комбинированным с УМТ. Данная методика основана на проведении последовательных УМТ-срезов заключенного в эпоксидные смолы образца и одновременном получении совмещенных данных ОМ/СЗМ от каждого среза. Далее последовательность данных 2D-ОМ/СЗМ соответствующими программными средствами восстанавливается в массив 3D-ОМ/СЗМ. Данный подход обеспечивает полноценное решение ранее указанной задачи – восстановление 3D астроцитарной ультраморфологии в иммуноокрашенной “зоне интереса”.

Один из необходимых шагов по внедрению методики ОЗНТ в область исследования 3D астроцитарной ультраморфологии – создание специализированных флуоресцентно-контрастирующих меток на основе конъюгатов флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител. Главное достоинство таких систем – узкий симметричный пик, высокая яркость и фотостабильность флуоресценции полупроводниковых нанокристаллов, что важно для иммуноокрашивания “зоны интереса”, а также их высокая твердость и непрозрачность для электронных пучков, что делает их крайне привлекательными для использования в качестве контрастирующих агентов как для СЗМ, так и для ЭМ.

Предлагаемая концепция визуализации объемной ультраструктуры астроцитов заключается в следующем:

- проводится иммуномечение соответствующих участков астроцитарных сетей с использованием конъюгатов антител к определенному белку, содержащемуся в астроцитах, и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов;
- исследуемые образцы фиксируются и иммобилизуются в эпоксидных смолах;
- в определяемых с помощью флуоресцентной ОМ по излучению нанокристаллов “зонах интереса” проводится восстановление данных 3D-СЗМ;
- с использованием высокого контраста нанокристаллов в режиме СЗМ проводится восстановление непосредственной ультраструктуры астроцитов в “зоне интереса”.

Важно отметить, что для создания подобных меток необходимо использование конъюгатов нанокристаллов и наноантител (однодоменных антител), которые за счет своего небольшого

размера значительно глубже проникают в объемные образцы, чем обычные антитела, что должно способствовать более глубокому и мягкому, сохраняющему ультраструктуру, окрашиванию образца.

В рамках данного исследования была разработана предварительная методика иммуноокрашивания астроцитов конъюгатами верблюжьих наноантител VNH-E9, специфичных к глиальному фибриллярному кислом белку GFAP, и красителя малеимид-FAM. Полученные результаты демонстрируют эффективность разработанной методики пробоподготовки в целом и иммуноокрашивания с использованием изготовленных VNH-E9 наноантител в частности, что открывает перспективы разработки аналогичной методики, но уже с использованием флуоресцентно-контрастирующих агентов на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов.

Полученные в работе результаты станут первым шагом в разработке методики адресного мечения астроцитов универсальными флуоресцентно-контрастирующими метками на основе конъюгатов наноантител и флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов для анализа их наноструктуры при помощи коррелятивной технологии оптико-зондовой нанотомографии (ОЗНТ) с использованием уникальной научной установки (<http://skp-gf.ru/usu/486825/>), объединяющей в себе возможности 3D-СЗМ и ОМ [32–34].

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00168 (<https://rscf.ru/project/22-14-00168/>).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры проводили в соответствии с этическими регламентами Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Исследования одобрены институтской комиссией по содержанию и использованию лабораторных животных (протокол № 337/2021).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Verkhatsky A., Rodriguez J.J., Parpura V.* // *Cell Tissue Res.* 2014. V. 2. P. 493–503. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1814-z>
2. *Verkhatsky A., Zorec R., Rodriguez J.J., Parpura V.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2016. V. 26. P. 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.011>
3. *Popov A., Brazhe A., Denisov P., Sutyagina O., Li L., Lazareva N., Verkhatsky A., Semyanov A.* // *Aging Cell.* 2021. V. 20. P. e13334. <https://doi.org/10.1111/acel.13334>
4. *Kelly P., Hudry E., Hou S.S., Bacskai B.J.* // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. P. 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.0021>
5. *Hefendehl J.K., LeDue J., Ko R.W., Mahler J., Murphy T.H., MacVicar B.A.* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13441. <https://doi.org/10.1038/ncomms13441>
6. *Allen N.J., Barres B.A.* // *Nature.* 2009. V. 7230. P. 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
7. *Verkhatsky A., Nedergaard M.* // *Physiol. Rev.* 2018. V. 1. P. 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
8. *Takano T., Tian G.-F., Peng W., Lou N., Libionka W., Han X., Nedergaard M.* // *Nat. Neurosci.* 2006. V. 9. P. 260–267. <https://doi.org/10.1038/nn1623>
9. *Garwood C.J., Ratcliffe L.E., Simpson J.E., Heath P.R., Ince P.G., Wharton S.B.* // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2017. V. 4. P. 281–298. <https://doi.org/10.1111/nan.12338>
10. *Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G.* // *Trends. Neurosci.* 1999. V. 5. P. 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)
11. *Papouin T., Dunphy J., Tolman M., Foley J.C., Haydon P.G.* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* V. 1715. P. 20160154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154>
12. *Rimmele T.S., Rosenberg P.A.* // *Neurochem. Int.* 2016. V. 98. P. 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.010>
13. *Verkhatsky A., Zorec R., Rodriguez J.J., Parpura V.* // *Opera Med. Physiol.* 2016. V. 1. P. 13–22.
14. *Dossi E., Vasile F., Rouach N.* // *Brain Res. Bull.* 2018. V. 136. P. 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
15. *Heller J.P., Rusakov D.A.* // *Glia.* 2015. V. 63. P. 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/glia.22821>
16. *Hennebelle M., Champeil-Potokar G., Lavialle M., Vancassel S., Denis I.* // *Nutr. Rev.* 2014. V. 72. P. 99–112. <https://doi.org/10.1111/nure.12088>



17. *Perez-Alvarez A., Navarrete M., Covelo A., Martin E.D., Araque A.* // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 12738–12744.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2401-14.2014>
18. *Murphy-Royal C., Dupuis J.P., Varela J.A., Panatier A., Pinson B., Baufreton J., Groc L., Oliet S.H.* // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 2. P. 219–226.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3901>
19. *Patrushev I., Gavrilov N., Turlapov V., Semyanov A.* // *Cell Calcium.* 2013. V. 54. P. 343–349.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.08.003>
20. *Caplan J., Niethammer M., Taylor R.M., Czymmek K.J.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011. V. 21. P. 686–693.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.010>
21. *Spiegelhalter C., Tosch V., Hentsch D., Koch M., Kessler P., Schwab Y., Laporte J.* // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e9014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009014>
22. *Miranda A., Gómez-Varela A.I., Stylianou A., Hirvonen L.M., Sánchez H., De Beule P.A.A.* // *Nanoscale.* 2021. V. 13. P. 2082–2099.  
<https://doi.org/10.1039/d0nr07203f>
23. *Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyltermans S., Cardoso M.C., Leonhardt H.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 887–889.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth953>
24. *Perruchini C., Pecorari F., Bourgeois J.P., Duyckaerts C., Rougeon F., Lafaye P.* // *Acta Neuropathol.* 2009. V. 118. P. 685–695.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-009-0572-6>
25. *Muyltermans S.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 775–797.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
26. *Fang T., Lu X., Berger D., Gmeiner C., Cho J., Schalek R., Ploegh H., Lichtman J.* // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. P. 1029–1032.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0177-x>
27. *Wu M., Petryayeva E., Medintz I.L., Algar W.R.* // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1199. P. 215–239.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1280-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1280-3_17)
28. *Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I.* // *Lab. Inves.* 2002. V. 82. P. 1259–1261.  
<https://doi.org/10.1097/01.lab.0000027837.13582.e8>
29. *Milosovic N.T., Ristanovic D.* // *J. Theor. Biol.* 2007. V. 245. P. 130–140.
30. *Wu C.C., Reilly J.F., Young W.G., Morrison J.H., Bloom F.E.* // *Cereb. Cortex.* 2004. V. 14. P. 543–554.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhh016>
31. *Ferreira T.A., Blackman A.V., Oyrer J., Jayabal S., Chung A.J., Watt A.J., Sjöström P.J., van Meyel D.J.* // *Nat. Methods.* 2004. V. 11. P. 982–984.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3125>
32. *Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Mezin A.V., Molinari M., Nabiev I., Mochalov K.E.* // *Rev. Sci. Instrum.* 2017. V. 88. P. 023701.  
<https://doi.org/10.1063/1.4975202>
33. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov F.E.* // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
34. *Efimov A.E., Bobrovsky A.Y., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Nabiev I.R., Mochalov K.E.* // *Tech. Phys. Lett.* 2016. V. 42. P. 171–174.  
<https://doi.org/10.1134/S1063785016020231>

# Development of a Fluorescence Contrasting Immunostaining Technique for Visualizing 3D Astrocytic Ultramorphology

**K. E. Mochalov\***, **O. I. Sutyagina\***, **\*\***, **A. V. Altunina\***, **\*\*\***, **D. O. Solovieva\***,  
**A. E. Efimov\*\*\*\***, **V. A. Zhuchkov\***, **S. P. Chumakov\***, and **V. A. Oleinikov\***, **\*\*\*\*\***, **#**

*# Phone: +7 (910) 409-84-55; e-mail: voleinik@mail.ru*

*\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

*\*\* Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*\*\*\* Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia*

*\*\*\*\* Laboratory of Bionanotechnology, V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs  
ul. Shchukinskaya 1, Moscow, 123182 Russia*

*\*\*\*\*\* National Research Nuclear University “MEPhI” (Moscow Engineering Physics Institute)  
Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia*

Changes in astrocytic ultramorphology may underlie the development of neurodegenerative processes in their early stages. However, the mechanisms of its change are still poorly understood, since the size of the peripheral astrocytic processes forming the basis of the astrocytic synaptic coating are beyond the resolution of most optical microscopy (OM) methods. In turn, the disadvantage of promising methods of electron and scanning probe microscopy (EM and SPM) for such studies is the inability to determine the target area of the study due to the simultaneous use of fluorescence microscopy of immunocolored cells and the possibility of full-fledged 3D analysis of samples. In this paper, we consider the concept of solving the above problem by using an instrumental approach that combines the methods of SPM and OM together with ultramicrotomy as a method of restoring the 3D structure of the sample within a single hardware complex. To implement the proposed combined technique (optical-probe nanotomography, OPNT), the first stage of creating specialized fluorescent-contrasting labels based on conjugates of fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies has been developed in this work. This type of label will provide both immuno-staining of the “area of interest” for the restoration of 3D astrocytic ultramorphology, and contrast of astrocytes by the SPM method.

*Keywords: astrocytic ultramorphology, neurodegenerative processes, scanning probe microscopy, optical microspectroscopy, single-domain antibodies (nanoantibodies), fluorescent semiconductor nanocrystals, optical probe nanotomography*