

## ОЦЕНКА ОКРАШИВАНИЯ ТКАНИ МОЗГА ЭКСТРАКТОМ ЧАЯ УЛУН С ОСОБЫМ ВНИМАНИЕМ К ГЛАДКОМУ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОМУ РЕТИКУЛУМУ

© 2022 г. Е.А. Шишкова\*, И.В. Краев\*\*, В.В. Рогачевский\*.\*

\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

\*\*Faculty of Health and Social Care, the Open University, Walton Hall, Milton Keynes, UK, MK7 6AA

#E-mail: cckpem.icb.ras@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2022 г.

После доработки 08.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Электронная микроскопия остается золотым стандартом в исследованиях нервной системы, поскольку позволяет получать изображения ультраструктуры нервной ткани с адекватным пространственным разрешением. Несмотря на высокое разрешение электронно-микроскопических изображений, их корректная интерпретация возможна только при наличии достаточного контраста элементарных мембран, компонентов цитоплазмы и цитоскелета, которого достигают с использованием опасных реагентов и тяжелых металлов. Ранее для замены токсичного и радиоактивного ацетата диоксида урана был предложен раствор сухого экстракта чая улун, но окрашивание с ним давало более слабый контраст внутриклеточных органелл. Известно, что в зависимости от природы образца и условий эксперимента различные ткани обладают разной способностью связывать краситель. В данной работе с помощью просвечивающей электронной микроскопии мы впервые оценили красящие свойства экстракта чая улун на ткани мозга новорожденной и взрослой крысы. Мы обнаружили, что приготовленный насыщенный водный экстракт чая улун не уступает стандартным красителям и имеет ряд преимуществ. Показано, что его использование позволяет в незрелом мозге выявлять тончайшие детали гладкого эндоплазматического ретикулама нейронов, а в сочетании с осмированием с феррицианидом калия и какодilatным буфером обеспечивает лучшую визуализацию цитоскелета нейронов и гладкого ретикулама терминальных ламелл астроцитов. Окрашивание насыщенным водным экстрактом чая улун после общепринятого протокола химической фиксации хорошо подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных, в том числе для пакетного контрастирования большого числа препаратов.

*Ключевые слова:* сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, экстракт чая улун, контраст мембран; эндоплазматический ретикулум; гиппокамп.

DOI: 10.31857/S000630292205009X, EDN: JILFBC

Современный уровень исследований центральной нервной системы методами электронной микроскопии включает 3D-реконструкции больших объемов ткани мозга на основе автоматической сегментации стека изображений серийных ультратонких срезов на отдельные клеточные компартменты при помощи машинного обучения. В таких исследованиях коннектомики по-

средством сканирующей электронной микроскопии (SEM) основное внимание уделяют анализу общей структуры отростков нейронов: дендритов, дендритных шипиков и аксональных пресинаптических бутонов, что требует высокого контраста их плазматических мембран.

Для усиления контраста мембран в ходе подготовки ткани для электронной микроскопии фиксацию ткани альдегидами проводят в присутствии специальных добавок, таких как ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ . После первичной фиксации ткань дополнительно фиксируют восстановленным ферроцианидом тетраоксидом осмия (rO), или повторно в  $\text{OsO}_4$  (rOO или двойное осмиро-

*Сокращения:* SEM – сканирующая электронная микроскопия, ОТО – осмий–тиокарбогидразид–осмий, PSD – постсинаптическое уплотнение, ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия, УАс – уранилацетат, ОТЕ – экстракт чая улун (oolong tea extract), гЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум, UL – краситель на основе солей лантаноидов (UranylLess).

вание), или в вариантах фиксаторов/красителей, содержащих чрезвычайно токсичный тиокарбондигидрид (гОТО), или другими контрастерами. В качестве последнего этапа кусочки ткани часто насыщают различными солями тяжелых металлов (см., например, работы [1–5]).

Такие препараты в целом имеют достаточный контраст мембран для последующего анализа методами SEM, такими как сканирование поверхности блока ткани, последовательно срезаемого алмазным ножом (SBF-SEM) или ионным пучком (FIB-SEM), или сканирование ультратонких срезов (ATUM- или Multi-SEM). Но эти методы имеют несколько присущих им недостатков, ограничивающих комплексный анализ ультраструктуры клетки. Известно, что наличие постсинаптического уплотнения (PSD) и/или пресинаптических везикул наряду с синаптической щелью является критерием идентификации ассиметричных и симметричных синапсов [6, 7], а площадь активной зоны или мембраны, занятой PSD, является важным маркером уровня активности синапса. Поэтому высокий контраст этих структур играет важную роль в анализе центральной нервной системы методами электронной микроскопии. В то же время, в отличие от стандартных протоколов подготовки ткани для просвечивающей электронной микроскопии (TEM), гОТО-препараты имеют значительно меньший контраст PSD и плазматических мембран синаптической щели [8]. Более того, на некоторых препаратах, подготовленных для SBF-SEM с применением гОТО-протокола, PSD вообще невозможно идентифицировать (см., например, работу [9]). Еще одним недостатком ОТО-метода является очень низкий контраст других внутриклеточных структур, таких как рибосомы, ядерный хроматин, тонкие филаменты, в некоторой степени снижены контраст микротрубочек и электронная плотность митохондриального матрикса (см. иллюстрации в работе [8] и рис. 5 в работе [10]).

С учетом этих недостатков некоторым исследователям при подготовке образцов для SEM пришлось вернуться к методу двойного контрастирования срезов уранилацетатом (UAc) и солями свинца (см., например, работу [10]). Так, срезы ткани, подготовленной по протоколу с двойным осмированием, последовательно контрастированные уранилацетатом и свинцом (рис. 5 в работе [5], рис. 5 в работе [10]) или только свинцом (рис. 5 в работе [5]), на SEM-изображениях имели достаточный контраст PSD, синаптической щели и некоторых других внутриклеточных структур. Кроме этого, классический протокол подготовки для TEM, за которым следовало

двойное контрастирование, облегчал подготовку препаратов для SEM [10].

Почти все компоненты для подготовки биологических образцов для электронной микроскопии, применяемые для усиления контраста, являются опасными, и чем меньше они будут использоваться, тем лучше. Поэтому если контрастирование свинцом является, по-видимому, незаменимым для визуализации тонких деталей не только в TEM, но и в SEM, то токсичный и радиоактивный UAc можно легко заменить на альтернативные менее опасные реагенты.

Более десяти лет назад в качестве заменителя UAc для контрастирования ультратонких срезов соединительной ткани легких и гепатоцитов был предложен забуференный фосфатами экстракт чая улун (OTE-stain) [11, 12]. Позднее OTE-контрастирование было протестировано на простейших [13], бактериальных клетках [14] и на периферическом миелинизированном нервном волокне [15]. Авторы отмечали, что, несмотря на меньший общий контраст образцов, окрашенных с OTE, некоторые тонкие детали выявлялись лучше [13]. В то время как стандартное двойное контрастирование (UAc и цитрат свинца) давало более четкие очертания шероховатого эндоплазматического ретикулума и митохондрий, после окраски с OTE слабоконтрастные цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (гЭР) проявляли лучшую сохранность и были менее фрагментированы [12].

С одной стороны, гЭР возбудимых клеток представляет собой сложно разветвленную сеть цистерн и играет ключевую роль в динамике ионов кальция во время сокращения мышц и в вызванной или гомеостатической синаптической пластичности центральной нервной системы. Поэтому организацию гЭР кардиомиоцитов и нейронов экстенсивно исследовали с помощью FIB-SEM или SBF-SEM на основе ручной 3D-реконструкции в больших объемах клеточных компартментов, хотя и с относительно низким оптическим разрешением (15 нм/пиксель) [16] или с вышеупомянутыми ограничениями контрастирования SEM-препаратов [17]. В этом отношении анализ гЭР можно было бы облегчить его автоматизированной 3D-реконструкцией на TEM-изображениях более высокого разрешения, но этому может препятствовать слабый контраст гЭР на TEM-препаратах. С другой стороны, наряду с ограниченным числом публикаций по красящим свойствам OTE также известно, что в зависимости от природы образца и других экспериментальных условий, биологические ткани и их внутриклеточные структуры различаются по своей способности связывать краситель. Поэтому выбор адекватной техники контрастирования явля-

ется ключевым моментом как для комплексной интерпретации ультраструктуры, так и для получения корректной эталонной модели для обучения нейронной сети.

В попытке оценить красящие свойства ОТЕ по сравнению с такими широко используемыми контрастерами для ТЕМ, как UAc и UranylLess, мы обнаружили, что ультратонкие срезы, окрашенные экстрактом чая улун, полученным из заваренного чая (рОТЕ), имеют такой же контраст плазматических мембран, как и окрашенные уранилацетатом. рОТЕ также имеет ряд преимуществ в контрастировании гЭР и других внутриклеточных структур нейронов и глиальных клеток, по крайней мере в ювенильном мозге, и хорошо подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Мозг раннего постнатального периода.** Гиппокамп криоанестезированных новорожденных крыс Wistar выделяли между первыми и вторыми сутками постнатального развития, разрезали лезвием перпендикулярно длинной оси на кусочки менее 1 мм в капле фиксатора и погружали в тот же фиксатор, содержащий 3% параформальдегида и 2.5% глутарового альдегида в 0.1 М какодилатном буфере, на 1 ч при комнатной температуре, а затем на ночь при 4°C. На следующий день образцы были дважды отмыты в том же буфере и для четкости экспериментальных данных разделены на две группы. Одну группу образцов постфиксировали в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub> в 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.01% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (группа Os). Другую группу постфиксировали в 1%-м растворе восстановленного OsO<sub>4</sub> добавлением 1.5%-го феррицианида калия (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (непосредственно перед использованием) в тот же буфер, содержащий бихромат калия (группа rOs). Осмирование обеих групп образцов проводили в течение ночи при 4°C, отмывали дважды деионизированной водой (milliQ, каждая смена по 10 мин), обезвоживали в серии возрастающих концентраций этанола и затем в 100%-м ацетоне, далее заливали в смесь смол EMBed812 (на ночь в смесь EMBed812 с 100%-м ацетоном в объемном отношении 1 : 1 и затем в чистую смолу), которую полимеризовали 48 ч при 60°C. Отвержденные блоки были заточены специально приготовленными стеклянными ножами [18] для получения пирамидок в СА3-области гиппокампа (содержащей большое число конусов роста мшистых волокон). С каждой пирамидки на ультратоме Leica EM UC6 с помощью алмазного ножа были получены срезы номинальной толщиной 60 нм, которые монтировали на медные бленды (сеточки с

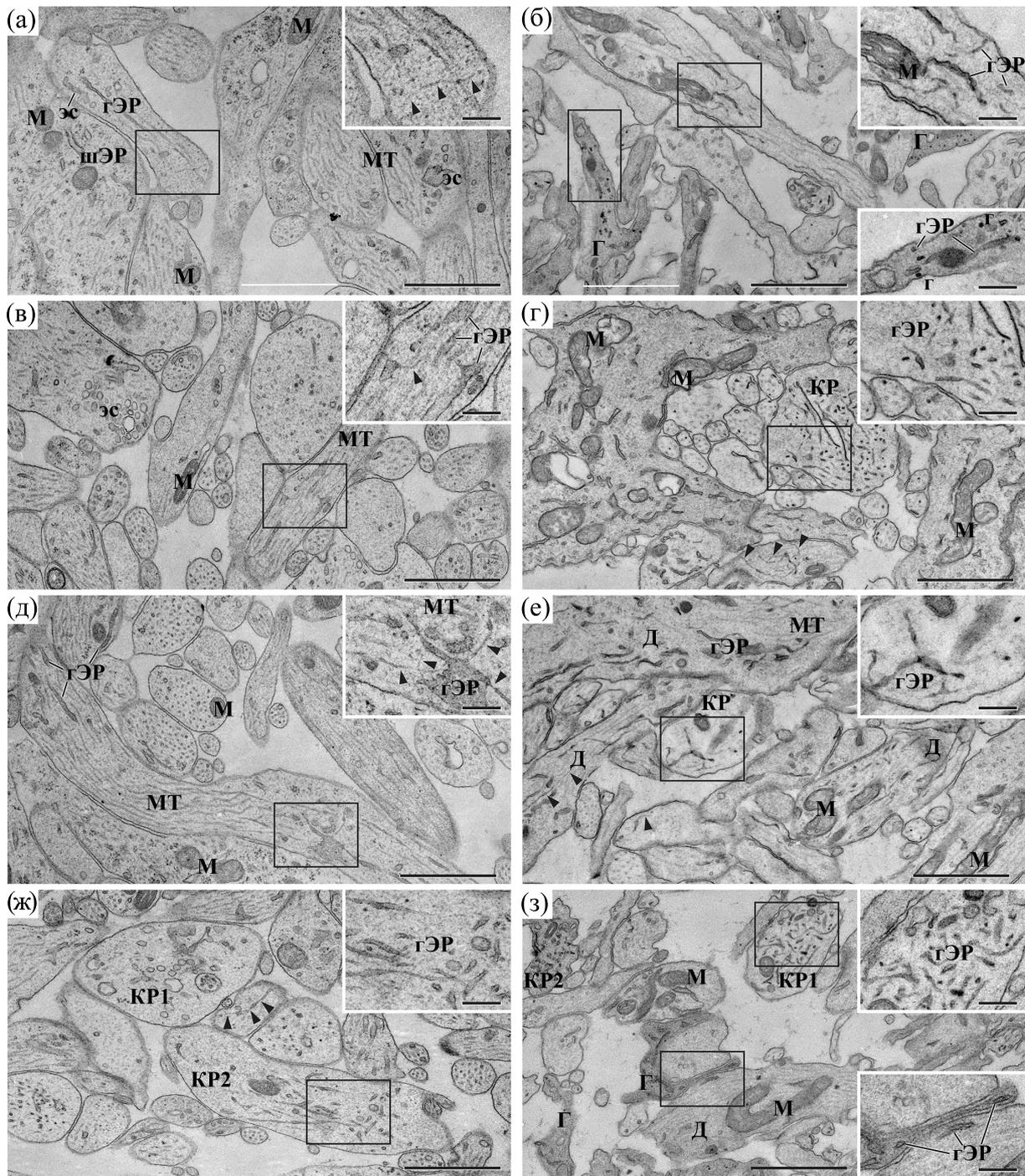
одним слотом), покрытые пленкой-подложкой из пиолоформа, укрепленной аморфным углеродом.

**Получение экстракта чая улун.** Ввиду отсутствия местных поставщиков ОТЕ и в отличие от предыдущих публикаций, описывающих использование ОТЕ вместо UAc, мы использовали водный экстракт, полученный из свежеприготовленного молочного чая улун (рОТЕ), доступного в любом магазине. В данной работе мы использовали чай, приобретенный 10 лет назад (Ahmad Tea Ltd., дата упаковки 01.2011). Для получения рОТЕ 5 г сухих листьев чая в 50 мл деионизированной воды (milliQ) в стеклянном флаконе нагревали в микроволновой печи до начала кипения, флакон оборачивали алюминиевой фольгой и оставляли настаиваться минимум 40 мин. Полученный раствор вместе с листьями можно хранить плотно закрытым и завернутым в фольгу при комнатной температуре в течение нескольких недель и использовать по необходимости. Для удаления крупных частиц непосредственно перед использованием экстракт центрифугировали и пропускали через шприцевой фильтр с порами диаметром 0.2 мкм. Сухой вес фильтрованного рОТЕ составлял около 2.8% и не менялся со временем хранения раствора.

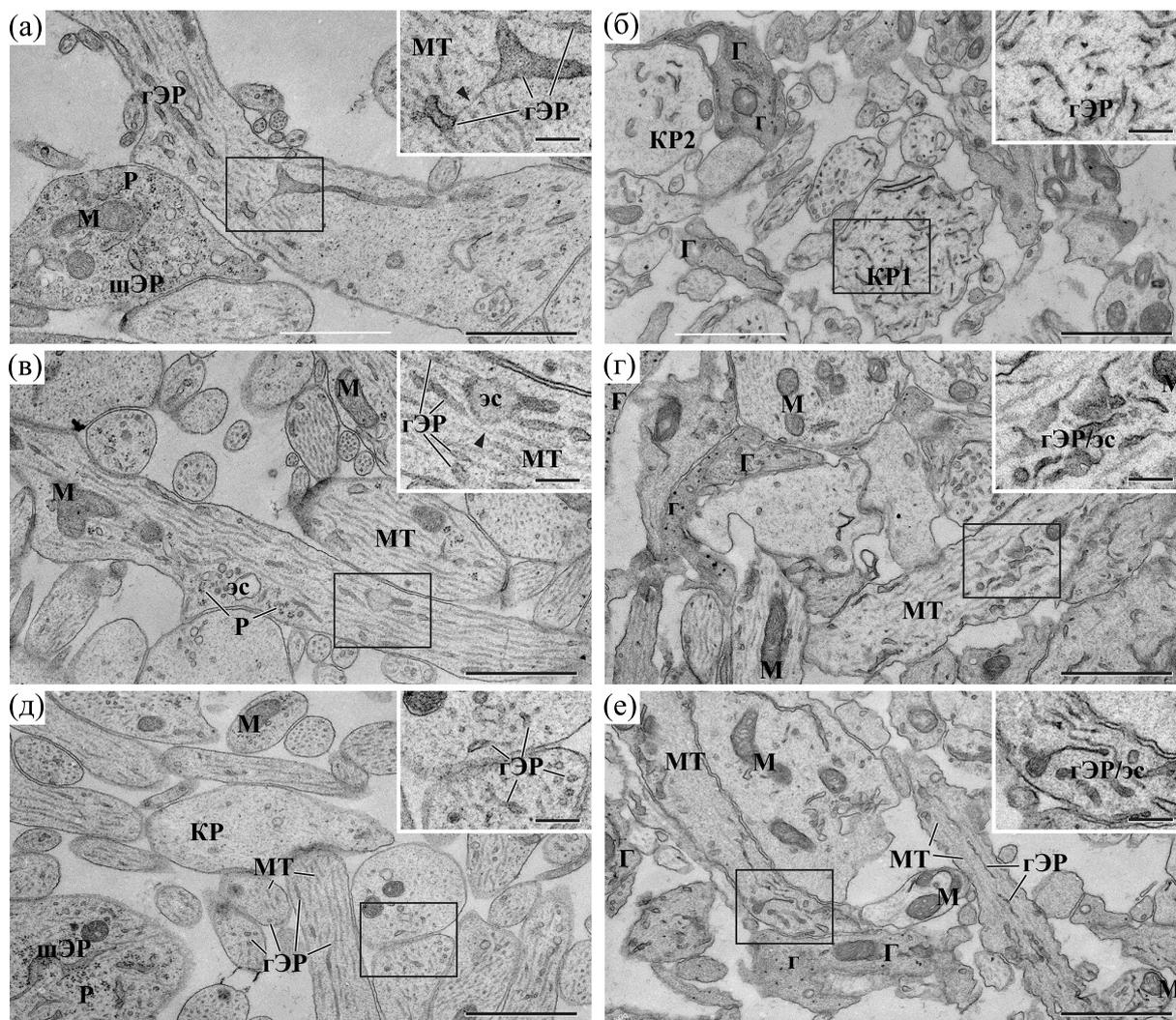
**Процедуры окрашивания.** Все сеточки со срезами ювенильной ткани мозга были разделены попарно (Os и rOs) на несколько групп и окрашены на каплях при комнатной температуре следующими реагентами:

- Группа 1 (рис. 1а,б) – насыщенным раствором UAc в течение 10 мин.
- Группа 2 (рис. 1в,г) – насыщенным раствором UAc в течение 30 мин.
- Группа 3 (рис. 1д,е) – красителем UranylLess в течение 1 мин.
- Группа 4 (рис. 1ж,з) – старым рОТЕ (хранился около двух месяцев при комнатной температуре) в течение 40 мин.
- Группа 5 (рис. 2а,б) – свежим рОТЕ в течение 40 мин.
- Группа 6 (рис. 2в,г) – свежим рОТЕ, разведенным 1:1 по объему 0.2 М какодилатным буфером (рН 7.6) в течение 40 мин.
- Группа 7 (рис. 2д,е) – свежим рОТЕ, разведенным 1:1 по объему 0.2 М фосфатным буфером (рН 7.3–7.4) в течение 40 мин.

Затем все сеточки последовательно отмывали по 1 мин на каждой из трех капель деионизированной воды и дополнительно контрастировали модифицированным красителем Сато, содержащим три соли свинца [19], разведенным дважды с H<sub>2</sub>O (рН воды был доведен до рН красителя Са-



**Рис. 1.** Ультраструктура нейроплазмы области СА3 гиппокампа новорожденной крысы после окраски УАс, лантаноидами и старым рОТЕ. Изображения в левой колонке получены с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в  $\text{OsO}_4$ ; изображения в правой колонке – с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в  $\text{OsO}_4$ , восстановленном феррицианидом калия. (а) и (б) – Срезы обработаны насыщенным раствором УАс в течение 10 мин; (в) и (г) – срезы обработаны насыщенным раствором УАс в течение 30 мин; (д) и (е) – срезы окрашены  $\text{UganuLess}$  в течение 1 мин; (ж) и (з) – срезы окрашены старым рОТЕ в течение 40 мин. Все срезы дополнительно контрастированы тремя солями свинца по Сато (см. описание в основном тексте). Сокращения: гЭР – трубочки и расширенные цистерны гладкого ЭР, шЭР – цистерны шероховатого ЭР, эс – эндосомальные компартменты ретикулума, М – митохондрии, МТ – микротрубочки, г – гликогеновые гранулы, Г – глиальные клетки, КР – конусы роста, Д – дендриты. Головками стрелок на основных панелях и врезках отмечены тончайшие цистерны гладкого ЭР. Шкала для всех панелей 1 мкм, для врезок – 200 нм.



**Рис. 2.** Ультраструктура нейропиля СА3-области гиппокампа новорожденной крысы после окраски свежеприготовленным рОТЕ. Изображения в левой колонке получены с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в  $\text{OsO}_4$ ; изображения в правой колонке – с образцов, фиксированных альдегидами и постфиксированных в  $\text{OsO}_4$ , восстановленном феррицианидом калия. (а) и (б) – срезы окрашены незабуференным рОТЕ в течение 40 мин; (в) и (г) – срезы окрашены рОТЕ с какодильным буфером в течение 40 мин; (д) и (е) – срезы окрашены рОТЕ с фосфатным буфером в течение 40 мин. Все срезы дополнительно контрастированы тремя солями свинца по Сато. (см. описание в основном тексте). Сокращение: Р – свободные рибосомы и полисомы. Остальные сокращения те же, что и на рис. 1. Головками стрелок отмечены тончайшие цистерны гладкого ЭР. Шкала для всех панелей 1 мкм; для врезок – 200 нм.

то). Каждую сеточку отмывали 0.02 М раствором NaOH и дважды деионизированной водой в течение 1 мин.

**Мозг взрослого животного.** Крысу Wistar (возраст 7 месяцев, масса 310 г) анестезировали внутривенным введением пентобарбитала натрия (200 мг/кг веса). Фиксацию мозга крысы проводили путем транскардиальной перфузии сначала изотоническим солевым раствором (0.9% NaCl), содержащим гепарин (60 ед./мл), а затем 0.1 М фосфатно-солевым буфером (pH 7.4), содержащим 2% параформальдегида и 2% глутаро-

вого альдегида. Мозг был помещен в этот же фиксатор на ночь. Коронарные срезы дорзального гиппокампа толщиной 50 мкм получали на вибраторе VT1000S (Leica, Германия) и далее обрабатывали как было описано ранее [20, 21]. Срезы были постфиксированы в 1%-м растворе  $\text{OsO}_4$  в течение одного-полутора часов при комнатной температуре, обезвожены в серии спиртов с возрастающей концентрацией, затем в 100%-м ацетоне и выдержаны в смеси ацетон:смола (Agar100/Araldite CY212) в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее для заключения в

смолю в расплавленном состоянии (flat-embedding) срезы помещали в смолу между сжатыми листами акларовой пленки и полимеризовали при 60°C в течение 48 ч. В области среднего молекулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа была заточена пирамидка, с которой были получены и собраны, как описано выше, ультратонкие срезы номинальной толщиной ~70–80 нм. Срезы сначала выдерживали на каплях свежеприготовленного рОТЕ в течение 40 мин при комнатной температуре, трижды отмывали на каплях деионизированной воды и затем контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу в течение 10 мин.

**Получение изображений.** Микрофотографии срезов всех образцов ювенильной ткани и калибровочной реплики (дифракционной решетки с шагом 463 нм) получали с использованием фотопленки на электронном микроскопе JEM-1200EX (JEOL, Япония) при увеличении 12000× с одинаковыми настройками колонны микроскопа: ускоряющее напряжение – 80 кВ, размер пятна – 3, диафрагма объективной линзы – 20 мкм, плотность потока электронов – 44–47 пА/см<sup>2</sup>. Негативы оцифровывали с разрешением 2400 dpi с помощью сканера Epson Perfection V700 в HDR-режиме, а небольшие различия в общей плотности отсканированных пленок были нормализованы путем получения одинаковой оптической плотности заливочной среды (внеклеточного пространства) с помощью уровней серых тонов в программе Photoshop. Изображения срезов мозга взрослого животного были получены на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) с помощью камеры АМТ XR60 (АМТ Imaging, США) при увеличении 6000× (ускоряющее напряжение – 80 кВ, размер пятна – 2, диафрагма объективной линзы – 40 мкм, плотность потока электронов – 35 пА/см<sup>2</sup>) в режиме захвата монтажа из взаимоперекрывающихся кадров. Кадры объединяли в бесшовные изображения с помощью эластичных трансформаций плагином TrakEM2 в программе ImageJ [22]. За исключением исходных настроек АМТ XR60, ни яркость, ни контраст финального изображения не меняли. Отдельные изменения контраста исходных изображений отмечены ниже по тексту.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки способности рОТЕ окрашивать ткань мозга в качестве кандидата на роль идеальной модели мы выбрали мозг крысы на втором дне постнатального развития по следующим причинам. Во-первых, данный период развития характеризуется массивным ростом и ветвлением нейритов, а также формированием межклеточных контактов и, следовательно, требует повы-

шенного синтеза мембран, необходимых для роста конусов роста [23, 24]. Во-вторых, известно, что эмбриональная или незрелая ткань окрашивается менее интенсивно и имеет меньший контраст из-за большого содержания воды [25]. Таким образом, было предположено, что если окрашивание с рОТЕ покажет усиление контраста на незрелой ткани, то такой же эффект должен проявиться и на зрелой ткани.

**Окрашивание ткани незрелого мозга.** Стандартные красители. Все изображения на рис. 1 и 2 иллюстрируют структуру *Str. lucidum* или *radiatum* развивающегося нейропиля поля СА3 гиппокампа. Нейропил сформирован массой растущих нейритов и их конусов роста, большинство из которых еще невозможно идентифицировать как аксоны или дендриты, за исключением больших профилей проксимальных дендритов пирамидных нейронов. В качестве стандарта электронной плотности и контраста мы взяли изображения после двойного контрастирования с насыщенным водным раствором UAc (в течение 10 или 30 мин, рис. 1а и 1в соответственно), за которым следовало контрастирование модифицированным красителем Сато [19] (в течение 1 мин) с обычно используемой нами двукратно сниженной концентрацией трех солей свинца.

Профили нейритов на рис. 1в, некоторые из которых заполнены пучками микротрубочек, четко очерчены плазматическими мембранами. Среди слабоконтрастных микротрубочек можно наблюдать чуть более темные цистерны гЭР, от расширенных участков которых отходят тонкие следы не совсем различных анастомозирующих веточек, направленных поперек оси нейрита (головки стрелок и указатели на врезках на рис. 1а,в). Четко различимы и некоторые другие внутриклеточные органеллы, такие как митохондрии с плотным матриксом, эндосомальные компартменты, кластеры свободных рибосом и шероховатый ретикулум.

Поскольку осмий, восстановленный с ферроили феррицианидом, широко и регулярно используют в ультраструктурных исследованиях для усиления контраста мембран [26, 27], мы опробовали все используемые варианты контрастирования (левые колонки на рис. 1 и 2) на тех же образцах мозга, но осмированных с феррицианидом калия (правые колонки на рис. 1 и 2). Ювенильная ткань, фиксированная гОs, обладала несколькими отличительными особенностями. Некоторые из них, такие как значительно усиленный контраст элементарных мембран и гранул гликогена, были описаны давно, но другие также заслуживают внимания. Плазматические мембраны и тонкие цистерны гЭР в таких образцах имеют неравномерные волнистые очертания по типу ряби

на поверхности воды. Поскольку оба протокола фиксации идентичны за исключением добавленного феррицианида калия, то причиной такого волнообразного искривления мембран может являться только постфиксация ткани восстановленным  $\text{OsO}_4$ . И если во взрослом мозге этот недостаток на плазматических мембранах менее выражен за счет плотной упаковки нейрональных отростков в нейропиле (см., например, работы [28–30]), то большие межклеточные пространства в незрелом мозге этому способствуют. Свободное расположение тонких цистерн гЭР в нейроплазме также способствует их волнообразной форме после обработки с гОс. Нативную форму тонких цистерн гЭР можно было бы сохранить или отказавшись от использования гОс (левые колонки на рис. 1 и 2) или, по-видимому, только с использованием криофиксации ткани (как, например, в работе [31]). Как было ранее отмечено в работе [26], клетки, фиксированные с гОс, проявляли более слабое прокрашивание нуклеопротеинов и слабо различимые рибосомы, но последующее контрастирование с UAc позволяло их выявлять. Отчасти в противоположность этим наблюдениям, после применения протоколов контрастирования, использованных в данной работе, электронная плотность рибосом повышалась, но не в достаточной степени.

*Красители на основе лантаноидов.* Недавно в качестве замены UAc были предложены некоторые лантаноиды, такие как Sm, Gd, Nd, Yb [32–36], полиоксометаллаты [37] или гафний [38], а также ставший уже популярным *UranylLess* (UL), содержащий соли La, Dy, Gd [39]. Поэтому для определения красящих свойств рОТЕ UL также был взят в качестве второго стандарта электронной плотности и контраста. В то время как общая электронная плотность сечений нейритов и конусов роста, окрашенных с помощью UL (рис. 1д,е), занимает промежуточное положение между таковой на срезах, контрастированных с UAc в течение 10 и 30 мин, некоторые детали гЭР выявлялись лучше. Лучшее выявление деталей по сравнению с UAc может быть связано со сравнительно меньшей молекулярной массой солей лантаноидов и, как следствие, с увеличением плотности промежуточных тонов. Это свойство UL позволяет наблюдать, как тонкие трубочки гЭР отходят в разных направлениях от уплощенной цистерны гладкого ретикула в нейрите (рис. 1д, врезка), или лежат параллельно микротрубочкам в дендритах, или произвольно расположены в конусах роста (рис. 1е).

Все соли выше упомянутых лантаноидов обладают хотя и несколько отличающейся, но достаточной способностью усиливать контраст. Однако будучи достаточно хорошо растворимыми со-

лями, обладающими высокой проникающей способностью в ткани и высокой химической активностью, все они также содержат атомы тяжелых металлов и, следовательно, могут оказывать негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека. А поскольку они являются редкоземельными металлами (следовательно, не самыми дешевыми), то вряд ли будут удобны для пакетного контрастирования большого числа сеточек или «конвейерного» контрастирования лент со срезами (grid-tape) (см., например, работу [5]).

*Контрастирование с рОТЕ.* Полифенолы, например дубильную кислоту, благодаря ее красящим свойствам уже давно стали использовать в электронно-микроскопических исследованиях в качестве промежуточного агента до и после осмия для усиления контраста мембран (см., например, работы [40, 41]). С тех пор как авторы работы [11] предположили, что ОТЕ с более низкой молекулярной массой танинов чая улун предпочтительнее дубильной кислоты, использование рОТЕ стало частью нашей повседневной практики, однако мы готовим рОТЕ заново перед каждым контрастированием срезов. На рис. 1ж,з представлена ткань, окрашенная водным экстрактом чая, хранившегося около двух месяцев при комнатной температуре. Можно видеть, что длительно хранимый рОТЕ обеспечивает хорошее качество окраски всех клеточных структур, включая внешние и внутренние мембраны, микротрубочки и промежуточные филаменты, митохондрии, нуклеопротеины и рибосомы, не уступая результату контрастирования с UAc или UL (рис. 1а–е). Кроме того, стоит обратить внимание на другую, не отмеченную ранее особенность ювенильной ткани мозга, фиксированной с гОс: глиальные клетки имеют более плотно окрашенную цитоплазму, что позволяет в незрелой ткани отличать их профили от профилей нейронов. Цитоплазма некоторых глиальных клеток и конусов роста, наряду с гранулами гликогена, окрашивается даже более интенсивно с рОТЕ (рис. 1з), чем с UAc (рис. 1б). Также интересно отметить наличие цистерн гЭР в тонких терминальных глиальных отростках, тогда как традиционно считается, что терминальные отростки астроцитов не имеют таких органелл [42–44]. Характерна ли для рОТЕ способность контрастировать цистерны гЭР в терминальных отростках астроцитов или наличие таких цистерн является чертой незрелого мозга — вопрос для дальнейших исследований.

Авторы работы [11] указывали на необходимость использования забуференного фосфатами ОТЕ для лучшего качества окраски. Для сравнения красящих свойств рОТЕ с результатами вышеупомянутых публикаций, полученных с ис-

пользованием коммерчески доступного порошка ОТЕ, мы протестировали красящие свойства свежеприготовленного чая как с буферами, так и без них. Как показано на рис. 2а, окраска свежеприготовленным рОТЕ обеспечивает хорошее окрашивание рибосом, микротрубочек, проявляет резко очерченные контуры плазматических мембран, митохондриальных внешней и внутренней мембран, а также хороший общий вид гЭР с гладкими мембранами и гомогенно зернистым содержимым цистерн (рис. 2а, врезка). Как можно видеть на врезке, окрашивание с рОТЕ позволяет четко идентифицировать даже самые тонкие цистерны гЭР с наименьшими их диаметрами вплоть до считанных нанометров.

На рис. 2в представлена ткань, окрашенная забуференным какодилатом рОТЕ. В то время как общая электронная плотность не сильно отличается от незабуференного рОТЕ (рис. 2а), изображение выглядит более четким благодаря чуть более светлому цитозолю, что способствует более легкой идентификации внутриклеточных структур. Ткань, окрашенная рОТЕ с фосфатным буфером (рис. 2д; рН 7.3–7.4 согласно работе [11]), имеет в целом чуть меньшую электронную плотность и в общем сравнима с тканью, окрашенной с UL или длительно хранившимся рОТЕ.

Авторами работы [12] после окрашивания гепатоцитов с ОТЕ была показана лучшая визуализация альфа-частиц (розеток) гликогена по сравнению с окрашиванием UAc. Но в отличие от гепатоцитов, такой эффект мы не наблюдали на незрелой ткани мозга. Однозначная идентификация гликогеновых гранул и глиальных клеток благодаря их более темной цитоплазме была возможна только при комбинации фиксации ткани с гOs и последующей окраски срезов безотносительно природы контрастирующих растворов (UAc, UL, рОТЕ и/ или модифицированного свинцового красителя Сато).

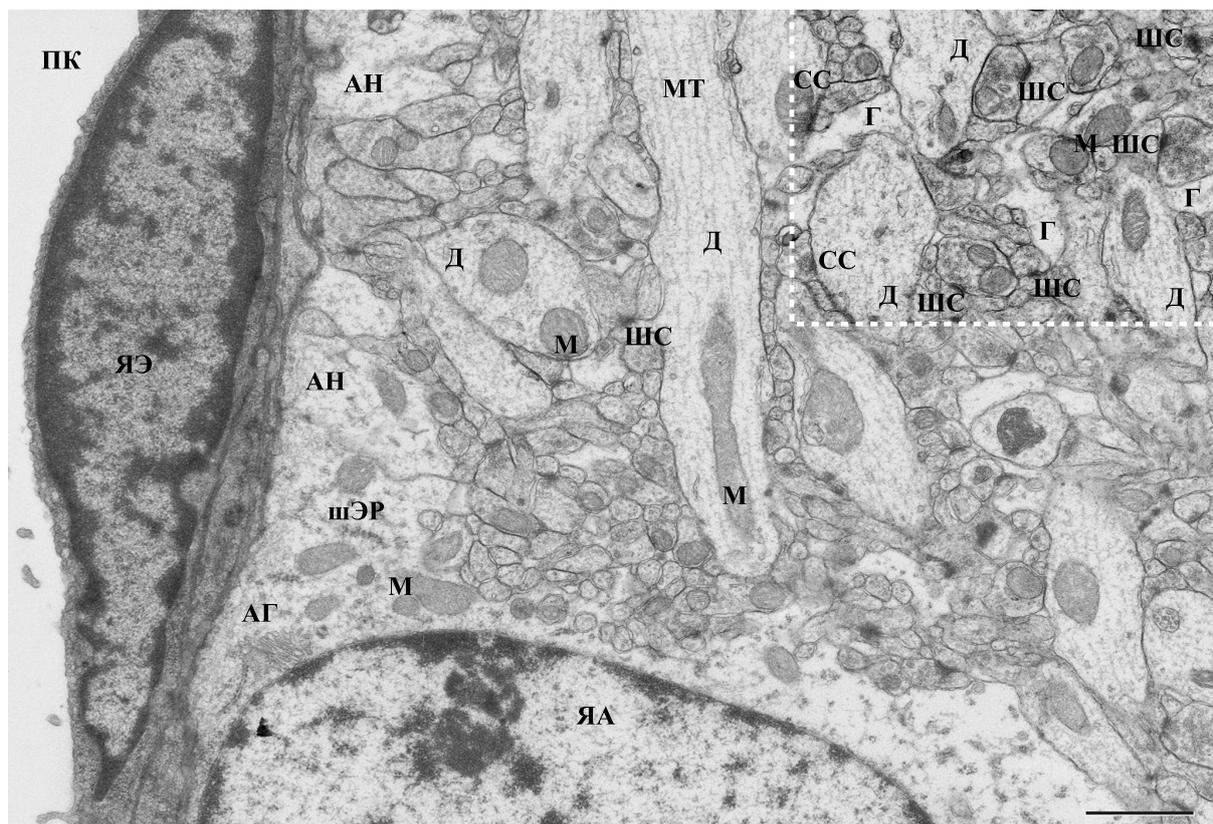
Однако фиксация с гOs имеет другое серьезное ограничение, как впрочем и ТО- и ОТО-подобные протоколы постфиксации: микротрубочки становятся практически не различимы на фоне цитозоля (см. правую колонку на рис. 1 и рис. 2б,е). В этом отношении использование рОТЕ, забуференного какодилатом с рН 7.6 (в отличие от фосфатного буфера), имеет очевидные преимущества для идентификации микротрубочек и обеспечивает в общем лучшую ультраструктурную целостность ткани, которая была фиксирована с гOs (рис. 2г).

Согласно опыту других исследователей и нашему собственному известно, что фиксация тканей млекопитающих в растворах, забуференных какодилатом (в отличие от фосфатного буфера),

обеспечивает лучшее качество изображения. Однако, поскольку мы не проверяли красящие свойства рОТЕ при разных рН, мы не можем с уверенностью утверждать, что высокое качество изображений обеспечено использованием именно какодилатного буфера, а не рН свежеприготовленного экстракта чая. Поэтому было бы неправильно исключать влияние рН. Тем не менее, в более ранних работах Симионеску [45], используя галлоилглюкозу *en bloc* в качестве усилителя контраста, также наблюдали наилучшие результаты при использовании мышьяк-содержащих буферов.

**Окрашивание экстрактом чая ткани зрелого мозга.** Для более широкой оценки красящих свойств рОТЕ мы анализировали ткань мозга взрослого животного. На рис. 3 представлен срез среднего молекулярного слоя зубчатой фасции, которая была фиксирована альдегидами и осмирована невосстановленным OsO<sub>4</sub>. Ультратонкие срезы были окрашены незабуференным водным рОТЕ, а затем цитратом свинца по Рейнольдсу. Несмотря на хорошо прокрашенные нуклеопротеины и постсинаптические уплотнения дендритных шипиков, можно заметить, что зрелая ткань имеет более низкую общую электронную плотность нейропила по сравнению с профилями нейритов незрелой ткани.

Такому эффекту могло бы быть несколько причин. Во-первых, существуют некоторые отличия в протоколах подготовки тканей: для ткани взрослого животного использовали фиксатор на фосфатном буфере и смолу Agar100 в качестве заливочной среды. Во-вторых, возможно, что у зрелой и незрелой тканей способность связывать рОТЕ отличается. Мы также не можем исключить то, что комбинация окраски с рОТЕ с последующим контрастированием цитратом свинца по Рейнольдсу неэффективна для усиления контраста мембран, в отличие от последующего контрастирования тремя солями свинца по Сато. Действительно, по сравнению с окраской UAc авторы работы [14] обнаружили лишь умеренное усиление контраста на криофиксированных образцах, залитых в смолу Спура, которые затем были окрашены с ОТЕ на фосфатном буфере и контрастированы цитратом свинца по Рейнольдсу. Также Феллнер с соавторами [46] показали явно меньший контраст образцов, залитых в смолу Agar100, окрашенных с ОТЕ и контрастированных цитратом свинца по Рейнольдсу. Несмотря на то что некоторые из этих причин достойны более глубокого рассмотрения, изображение ткани мозга зрелого животного, представленного на рис. 3, имеет хорошее качество, которое является достаточным для рутинного подсчета синапсов и/или для полуавтоматической 3D реконструкции.



**Рис. 3.** Ультраструктура зубчатой фасции гиппокампа взрослой крысы. Срез зубчатой фасции окрашен свежеприготовленным незабуференным рОТЕ в течение 40 мин и постконтрастирован цитратом свинца. Контраст выделенной области в верхнем правом углу увеличен для лучшего проявления постсинаптических уплотнений. Сокращения: ПК – просвет капилляра; ЯЭ – ядро эндотелиальной клетки; ЯА – ядро астроцита; АГ – аппарат Гольджи; АН – астроцитарная ножка; ШС – шипиковые синапсы; СС – стволовые синапсы. Остальные сокращения те же, что и на рис. 1. Шкала 1 мкм.

**Предполагаемые механизмы взаимодействия рОТЕ с тканью.** Уже давно было показано, что остаток галловой кислоты в молекуле низкомолекулярной галлоилглюкозы является эффективным усилителем окраски [47]. При том, что относительное содержание галловой кислоты постепенно повышается со временем хранения чая [48], для окраски ультратонких срезов мы использовали чай, собранный 10 лет назад. Поэтому можно предположить, что наблюдаемое нами усиление контраста происходит за счет увеличения в чае содержания галловой кислоты. Однако авторы работы [45] отмечали, что обработка срезов галлоилглюкозой без предварительной пропитки галлоилглюкозой всего образца до заключения в смолу не обеспечивала хорошего контраста, а обработка галлоилглюкозой как самой ткани, так и полученных с нее срезов, не увеличивала контраст по сравнению с обработкой лишь только самой ткани. Но с другой стороны, кроме галловой кислоты рОТЕ содержит значительное количество других низкомолекулярных фенолсодержа-

щих предшественников танинов, таких как катехины, кофеин и т.д. Некоторые из них, как и галлоилглюкоза, также содержат остаток галловой кислоты, а общая масса катехинов в сухих листьях улуна составляет около 8% [49]. В данной работе мы не пропитывали всю ткань экстрактом чая. Тем не менее, в отличие от обработки срезов галлоилглюкозой, окрашивание срезов с рОТЕ обеспечивает хороший контраст. Учитывая, что некоторые полифенолы или катехины связываются с их белковыми мишенями в мембране с образованием устойчивых к растворению детергентами агрегатов (см., например, работы [50–52]), нельзя исключить того, что широкий спектр органических и неорганических веществ, составляющих рОТЕ [53], может вносить вклад в усиление контраста ткани, в которой каждое вещество находит свою нишу для связывания. Несмотря на то что точная природа взаимодействия рОТЕ с тканью остается неизвестной, он обеспечивает отличное качество изображений, безопасен в использова-

нии/утилизации и обладает некоторыми другими преимуществами.

**Иные преимущества окраски с использованием рОТЕ.** В отличие от УАс, в результате окраски срезов с рОТЕ в темноте и при свете мы не обнаружили каких-либо различий в качестве контрастирования, как это было замечено ранее [13]. В данной работе для окраски срезов мы использовали центрифугированный и фильтрованный экстракт, приготовленный из листьев чая. Дополнительным преимуществом использования рОТЕ является отсутствие загрязнений, которых обычно трудно избежать при окрашивании с УАс. В то же время, некоторые авторы отмечали более частое загрязнение срезов с ОТЕ, чем с УАс (см., например, работу [46]). Однако, как можно видеть на рис. 1–3, во внеклеточном пространстве или просвете капилляра отсутствуют какие-либо крупные или мелкие, сходные с молотым перцем, загрязнения. Также и в других родственных публикациях не было информации о большем загрязнении после окраски коммерчески доступным ОТЕ. Следовательно, загрязнения, упомянутые в вышеуказанном исследовании, вероятнее всего могут быть следствием неаккуратного обращения с сеточками в процессе монтирования и контрастирования срезов, или пропуска стадии их промывки после контрастирования, которую рекомендуют некоторые поставщики ОТЕ (напр., Science Services GmbH, Германия). Кроме того, коммерчески доступный порошок ОТЕ в отличие от заваренного чая может содержать менее растворимые компоненты, которые могут являться источником нежелательной контаминации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное в нашем исследовании усиление контраста с помощью рОТЕ ясно показывает, что полученный из заваренного листового чая улун насыщенный водный экстракт в комбинации с какодилатным буфером и/или с повышенным рН вполне применим в качестве заменителя уранилацетата в исследованиях центральной нервной системы. Окрашивание с рОТЕ даже имеет некоторые преимущества перед окрашиванием с УАс. рОТЕ нетоксичен и нерадиоактивен, он лучше выявляет тончайшие детали гладкого эндоплазматического ретикулума и вполне подходит для рутинных исследований мозга взрослых животных. С учетом низкой стоимости чая улун по сравнению со стоимостью большинства реактивов для электронной микроскопии, таких как уранилацетат, UranylLess и др., использование экстракта чая в качестве первичного агента в контрастировании ультратонких срезов позволяет

использовать его для пакетной обработки большого числа препаратов.

Другое преимущество использования улун может состоять в том, что после трудоемкого приготовления и монтирования ультратонких срезов есть благоприятная возможность выпить чашку-другую ароматного чая, отделив несколько капель для ультратонких срезов. К тому времени, когда чаепитие подойдет к концу, срезы будут уже окрашены и готовы к последующей обработке солями свинца. Таким образом, использование экстракта чая улун позволяет сочетать исследование с пользой для здоровья.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность В.Г. Цыгановой (ИТЭБ РАН) за помощь в выделении гиппокампа новорожденных животных.

Исследование было проведено на базе сектора электронной микроскопии Центра коллективного пользования ПНЦБИ РАН (<https://www.pbcras.ru/services/tskp/>; <http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>), Пушкино, Россия, а также на базе лаборатории Электронной микроскопии Открытого Университета, Милтон-Кинс, Великобритания.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ПНЦБИ РАН (№ АААА-А20-120101390069-4) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90068).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с: положениями Совета по исследованиям в области защиты животных и этики Открытого университета и Министерства внутренних дел Великобритании (PPL 80/2612); Европейским руководством по содержанию и использованию лабораторных животных 1986 г. в соответствии с Этическими принципами Директивы Совета ЕС (86/609/ЕЕС); протоколом Комитета по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ РАН, Протокол № 13/2019 от 12.03.2019).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. J. Deerinck, E. A. Bushong, V. Lev-Ram, et al., *Microscopy and Microanalysis*, **16**, 1138 (2010).
2. J. C. Tapia, N. Kasthuri, K. J. Hayworth, et al., *Nature Protocols*, **7**, 193 (2012).
3. S. Mikula and W. Denk, *Nature Methods*, **12**, 541 (2015).
4. Y. Hua, P. Laserstein, and M. Helmstaedter, *Nature Communications*, **6**, 7923 (2015).
5. Y. Kubota, J. Sohn, S. Hatada, et al., *Nature Commun.*, **9**, 437 (2018).
6. M. Colonnier, *Brain Res.*, **9**, 268 (1968).
7. E. G. Gray, *J. Anatomy*, **93**, 420 (1959).
8. A. M. Seligman, H. L. Wasserkrug, and J. S. Hanker, *J. Cell Biol.*, **30**, 424 (1966).
9. L. de Vivo, M. Bellesi, W. Marshall, et al., *Science*, **355**, 507 (2017).
10. E. Kim, J. Lee, S. Noh, et al., *Appl. Microsc.*, **50**, 14 (2020).
11. S. Sato, Y. Sasaki, A. Adachi, et al., *Med. Electron Microsc.*, **36**, 179 (2003).
12. S. Sato, A. Adachi, Y. Sasaki, and M. Ghazizadeh, *J. Microsc.*, **229**, 17 (2008).
13. A. A. Miller and A. V. Simakova, *Cell Tissue Biol.*, **4**, 109 (2010).
14. K. Yamaguchi, K.-I. Suzuki, and K. Tanaka, *J. Electron Microsc.*, **59**, 113 (2010).
15. X. He and B. I. N. Liu, *J. Microsc.*, **267**, 27 (2017).
16. C. Pinali, H. Bennett, J. B. Davenport, et al., *Circ. Res.*, **113**, 1219 (2013).
17. Y. Wu, C. Whiteus, C. S. Xu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E4859 (2017).
18. V. V. Rogachevskii, *Cell Tissue Biol.*, **7**, 487 (2013).
19. T. Hanaichi, T. Sato, T. Iwamoto, et al., *J. Electron Microsc.*, **35**, 304 (1986).
20. V. I. Popov, H. A. Davies, V. V. Rogachevsky, et al., *Neuroscience*, **128**, 251 (2004).
21. M. G. Stewart, H. A. Davies, C. Sandi, et al., *Neuroscience*, **131**, 43 (2005).
22. A. Cardona, S. Saalfeld, J. Schindelin, et al., *PLoS One*, **7**, e38011 (2012).
23. E. Kawana, C. Sandri, and K. Akert, *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **115**, 284 (1971).
24. M. Z. Chauhan, J. Arcuri, K. K. Park, et al., *iScience*, **23**, 100836 (2020).
25. M. A. Hayat, *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications* (Cambridge University Press, 2000).
26. M. J. Karnovsky, In *Abstr. Book of the 11<sup>th</sup> Annual Meet. of the American Society for Cell Biology*, Abstracts 284, 146 (1971).
27. L. A. Langford and R. E. Coggeshall, *Anatom. Record*, **197**, 297 (1980).
28. J. Spacek and K. M. Harris, *J. Neurosci.*, **17**, 190 (1997).
29. J. R. Cooney, J. L. Hurlburt, D. K. Selig, et al., *J. Neurosci.*, **22**, 2215 (2002).
30. T. Cui-Wang, C. Hanus, T. Cui, et al., *Cell*, **148**, 309 (2012).
31. N. Jiménez, K. Vocking, E. G. van Donselaar, et al., *J. Struct. Biol.*, **166**, 103 (2009).
32. M. Nakakoshi, H. Nishioka, and E. Katayama, *J. Electron Microsc.*, **60**, 401 (2011).
33. N. Hosogi, H. Nishioka, and M. Nakakoshi, *Microscopy*, **64**, 429 (2015).
34. K. Inoue, Y. Muranaka, P. Park, and H. Yasuda, In *Proc. Eur. Microsc. Congr.* (2016), 461.
35. J. Kuipers and B. N. G. Giepmans, *Histochem. Cell Biol.*, **153**, 271 (2020).
36. A. L. Pinto, R. K. Rai, A. Shoemark, et al., *Diagnostics*, **11**, 1063 (2021).
37. A. Moscardini, S. Di Pietro, G. Signore, et al., *Sci. Reports*, **10**, 11540 (2020).
38. K.-I. Ikeda, K. Inoue, S. Kanematsu, et al., *Microscopy Research and Technique*, **74**, 825 (2011).
39. N. Benmeradi, B. Payre, and S. L. Goodman, *Microscopy and Microanalysis*, **21**, 721 (2015).
40. K. Asami, *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95**, 38 (1986).
41. R. C. Wagner, *J. Ultrastruct. Res.*, **57**, 132 (1976).
42. B. Fernandez, I. Suarez, and G. Gonzalez, *Anat. Anz.* **156**, 31 (1984).
43. A. Reichenbach, A. Derouiche, and F. Kirchhoff, *Brain Res. Rev.*, **63**, 11 (2010).
44. B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, *Nature Neurosci.*, **18**, 942 (2015).
45. N. Simionescu and M. Simionescu, *J. Cell Biol.*, **70**, 608 (1976a).
46. N. Fellner, M. Brandstetter, K. Trimmel, and G. Resch, *reSolution*, **1**, 8 (2012).
47. N. Simionescu and M. Simionescu, *J. Cell Biol.*, **70**, 622 (1976b).
48. M. M.-C. Wang, Y. Yeh, Y.-E. Shih, and J. T.-C. Tzen, *J. Food Drug Analysis*, **26**, 609 (2018).
49. M. G. Sajilata, P. R. Bajaj, and R. S. Singhal, *Comprehensive Rev. Food Science Food Safety*, **7**, 229 (2008).
50. M. Nakayama, K. Shimatani, T. Ozawa, et al., *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **79**, 845 (2015).
51. M. P. Borisova, A. A. Kataev, and V. S. Sivozhelezov, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, **1861**, 1103 (2019).
52. K. M. Pomier, R. Ahmed, and G. Melacini, *Molecules*, **25** (2020).
53. C. Cabrera, R. Giménez, and M. C. López, *J. Agricult. Food Chem.*, **51**, 4427 (2003).

## Evaluation of Oolong Tea Extract Staining of Brain Tissue with Special Reference to Smooth Endoplasmic Reticulum

E.A. Shishkova\*, I.V. Kraev\*\*, and V.V. Rogachevsky\*

\**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\**Faculty of Health and Social Care, the Open University, Walton Hall, Milton Keynes, UK, MK7 6AA*

Electron microscopy remains the gold standard for studying the nervous system, as it allows adequate spatial resolution imaging of the finer structures of nervous tissues. Despite the high resolution, correct interpretation of electron microscopy images is only possible with the sufficient contrast of unit membranes, cytosolic components and cytoskeleton, which is achieved using hazardous reagents and heavy metals. Earlier, solution of dry oolong tea extract was introduced as a replacement for toxic and radioactive uranyl acetate. However staining with oolong extract showed less contrast of intracellular organelles. It is known that depending on the specimen nature and experimental conditions, different tissues have unequal ability to capture the stain. Here, oolong tea extract staining of early postnatal and adult rat brain tissue was used for the first time to evaluate with transmission electron microscopy. We found that oolong extract obtained from freshly prepared tea is equal with conventional stains in section staining and has several advantages. We showed that its use on the immature brain allows to reveal the finest details of the smooth endoplasmic reticulum of neurons. Also, in combination with osmication with potassium ferricyanide and cacodylate buffer, it provides better visualization of the neuronal cytoskeleton and the smooth cisternae in the terminal astrocytic lamellae. A conventional chemical fixation protocol followed by staining with a saturated oolong tea water extract is also well suited for routine studies of the brain of adult animals, as well as for multiple grids batch staining.

*Keywords: scanning electron microscopy; transmission electron microscopy; oolong tea extract; membrane contrast; endoplasmic reticulum; hippocampus*