

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
ПУПОВИННОЙ КРОВИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
ФАКТОР РОСТА НЕРВОВ, ДЛЯ КОРРЕКЦИИ
ПАТОЛОГИИ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

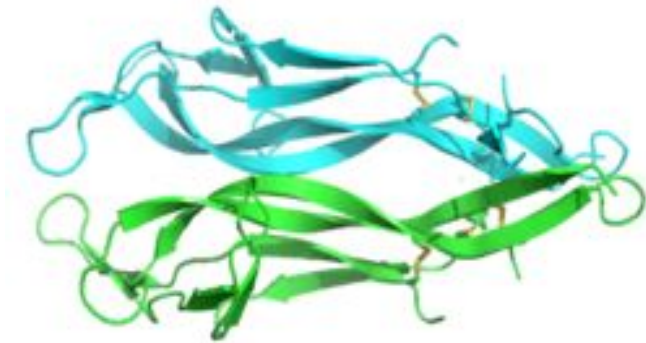


Тихонова Анастасия Евгеньевна
Научный руководитель: Мухамедьяров Марат
Александрович, доц. кафедры нормальной
физиологии КГМУ

Казань 2017

Введение

Болезнь Альцгеймера – прогрессирующее неизлечимое нейродегенеративное заболевание, главным проявлением которого является деменция. Перспективным направлением в разработке методов лечения болезни являются *генно-клеточные технологии*.



Одним из наиболее перспективных подходов к лечению болезни Альцгеймера является применение моноклеарных клеток пуповинной крови, экспрессирующих различные нейротрофические факторы.

Фактор роста нервов (NGF) — белок семейства нейротрофинов, поддерживающий жизнеспособность нейронов и стимулирующий их развитие и активность.

Цели и задачи

Целью данной работы явилась *оценка терапевтического потенциала МКПК, трансдуцированных аденовирусами, экспрессирующими фактор роста нервов (NGF) на модели болезни Альцгеймера (APP/PS1 трансгенные мыши (Alz)).*

В связи с целью были поставлены следующие **задачи:**

1. *Трансплантировать МКПК человека, экспрессирующие NGF мышам с болезнью Альцгеймера.*
2. *Изучить иммуногистохимическим методом влияние NGF-экспрессирующих МКПК на характер и интенсивность экспрессии нестина и даблкортина в гиппокампе трансгенных мышей на сроках 7 суток, 48 суток и 3 месяца.*
3. *Оценить выживаемость трансплантируемых клеток и их способность к хоумингу и экспрессии в ткани мозга терапевтического гена.*

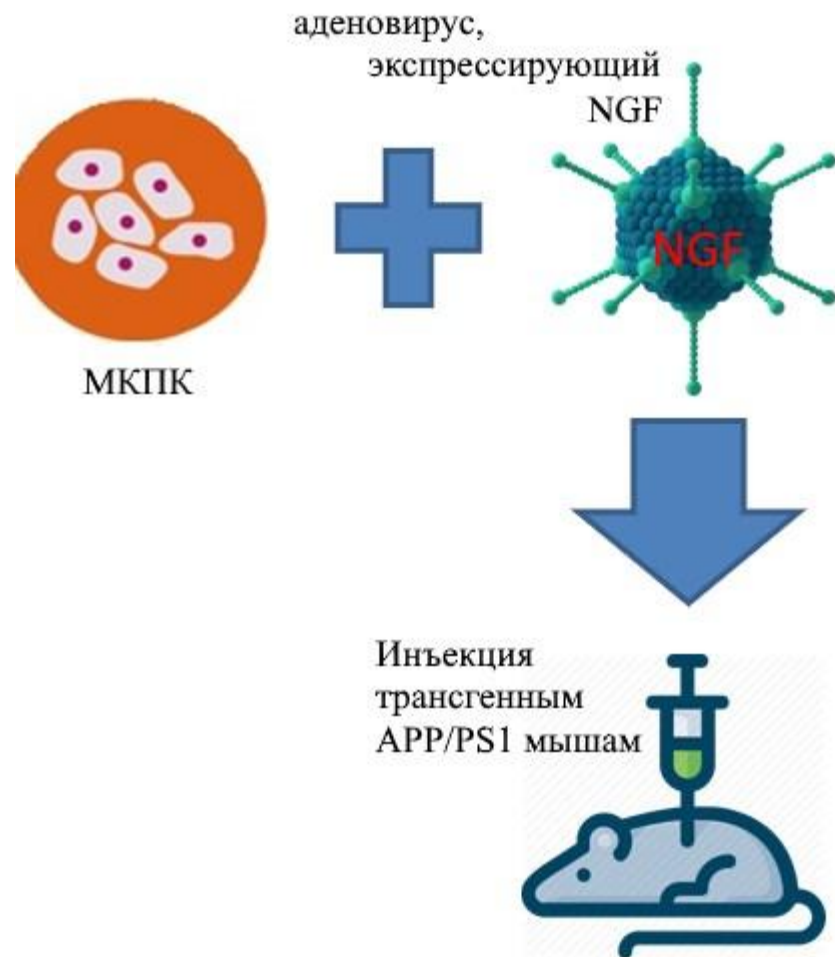
Модель эксперимента

В исследовании были использованы трансгенные мыши генотипа APP/PS1, экспрессирующие химерный человеческий/мышиный белок предшественник бета-амилоида и мутантный человеческий пресенелин-1. Обе мутации связаны с развитием ранних форм болезни Альцгеймера и вызывают отложения бета-амилоидного пептида в головном мозге мышей, а также связаны с нарушениями пространственной памяти.

Было сформировано 4 экспериментальных группы:

- 1) **WT** (дикий тип, контроль)
- 2) **Alz-EGFP** (трансгенные мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих репортерный белок EGFP)
- 3) **Alz-NGF** (трансгенные мыши после трансплантации МКПК, экспрессирующих NGF)
- 4) **Alz** (трансгенные мыши, контроль).

Инъекция МКПК осуществлялась ретроорбитально. Забор материала (головной мозг) у мышей осуществлялся на 7-е и 48-е сутки после трансплантации.



Методика иммуногистохимического окрашивания:

День 1

- 1) Промывка в PBST (4 раза по 5 мин)
- 2) Инкубация в PBST-DS
- 3) Инкубация в первичных антителах

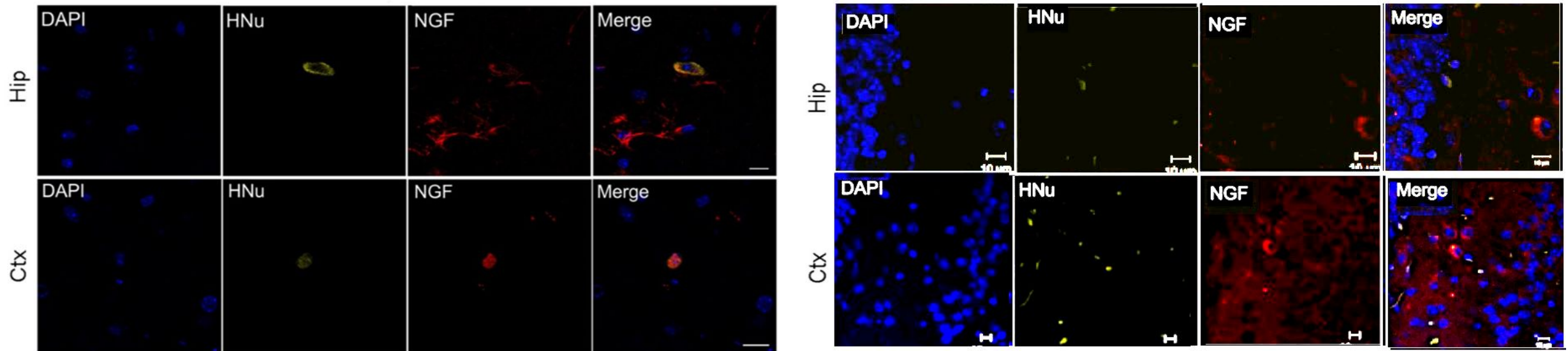
День 2

- 1) Промывка в PBS (4 раза по 5 мин)
- 2) Инкубация во вторичных антителах
- 3) Промывка в PBS (4 раза по 5 мин)
- 4) Инкубация в DAPI
- 5) Промывка в PBS (4 раза по 5 мин)
- 6) Заключение под покровное стекло

Использованные первичные антитела:

- 1) *Исследование хоуминга клеток в головном мозге:* антитела к человеческому антигену (Hnu) и белку фактора роста нервов (NGF)
- 2) *Исследование нейрогенеза после трансплантации клеток:* первичные антитела к нестину и даблкортину

Хоуминг NGF-позитивных клеток в коре и гиппокампе головного мозга



Визуализация трансплантированных клеток в мозге трансгенных мышей APP/PS1. Окрашивание срезов коры (ctx) и гиппокампа (hipp) трансгенных мышей APP/PS1 после трансплантации NGF-экспрессирующих МКПК (группа Alz-NGF) с антителами к HNu (желтый) и NGF (красный) на сроке 7 суток (слева) и 48 суток (справа). Ядра окрашиваются DAPI (синим). Шкала представляет значение 10 мкм.

Оценка нейрогенеза

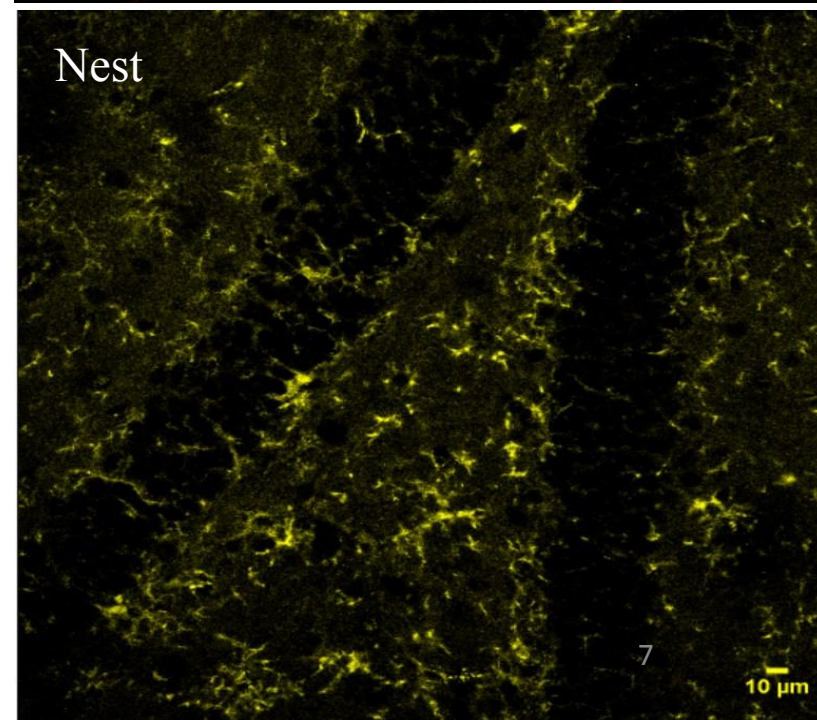
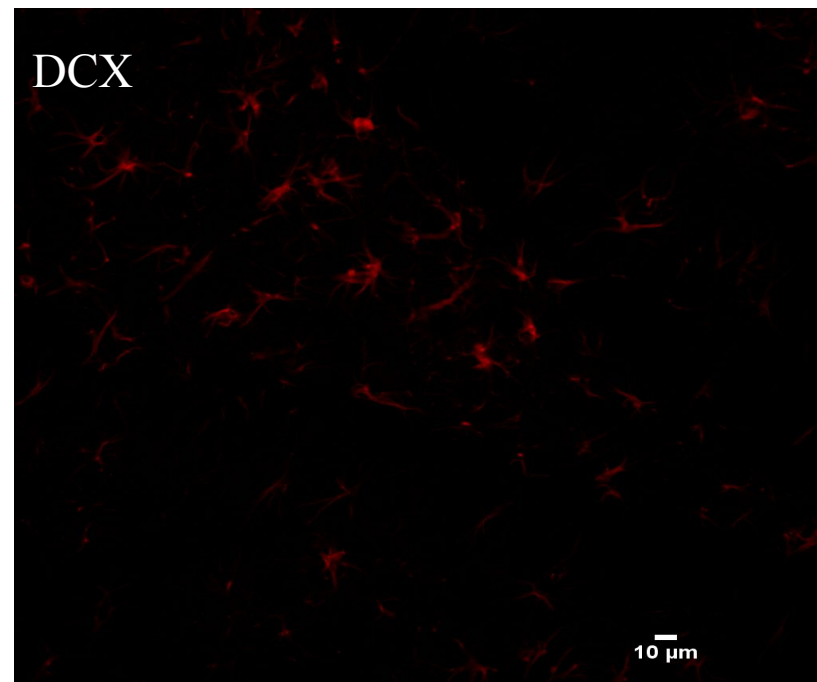
Для оценки процессов нейрогенеза исследовали характер и интенсивность экспрессии маркеров нейрональных стволовых и прогениторных клеток (нестин, даблкортин) в гиппокампе.

Нестин - белок промежуточных филаментов, маркер прогениторных клеток, находящихся на стадии пролиферации.

Даблкортин (DCX) – ассоциированный с микротрубочками белок, экспрессирующийся в мигрирующих и дифференцирующихся нейронах

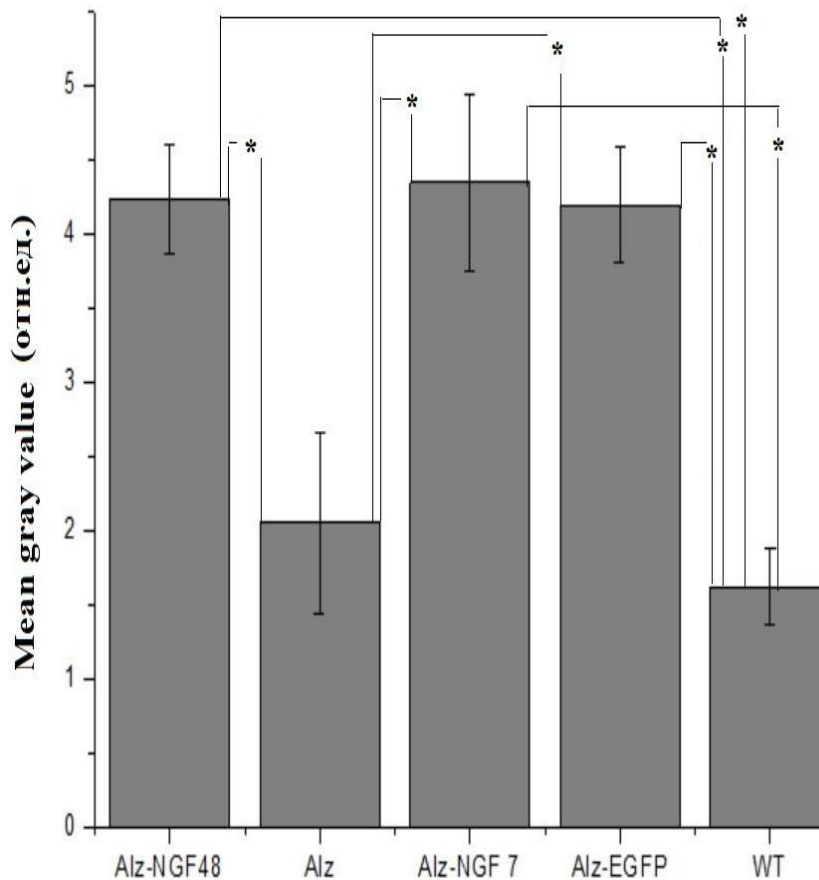
Измерения производились в программе ImageJ. Интенсивность свечения вторичных антител оценивалась через показатель *mean gray value* - сумма серых значений всех пикселей в выделенном сегменте, деленная на количество пикселей.

Иммуноэкспрессия даблкортина (красный цвет) и нестина (желтый цвет), зубчатая извилина Alz-NGF мыши. Срок трансплантации клеток – 7 суток.

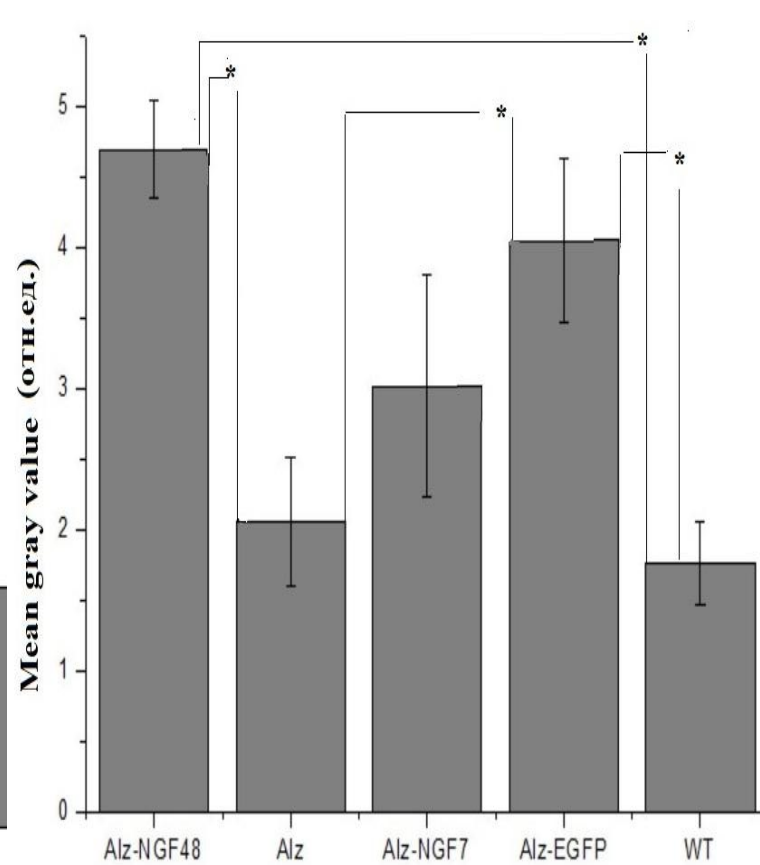


Экспрессия даблкортина в гиппокампе после трансплантации МКПК, экспрессирующих NGF

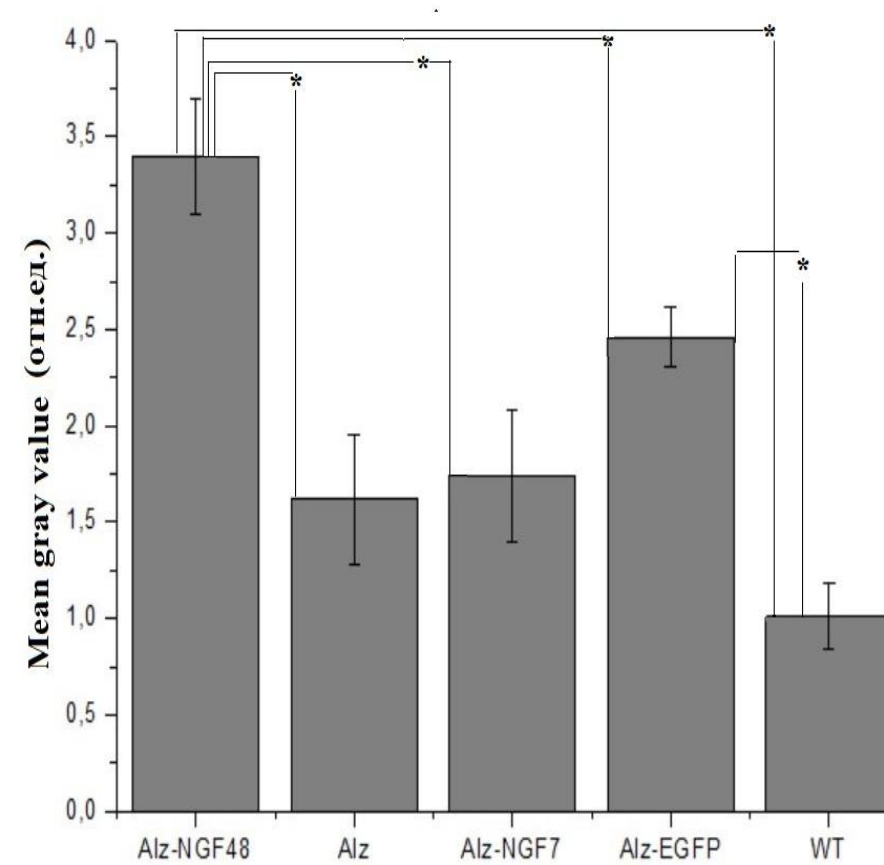
Зубчатая извилина



Зона СА1

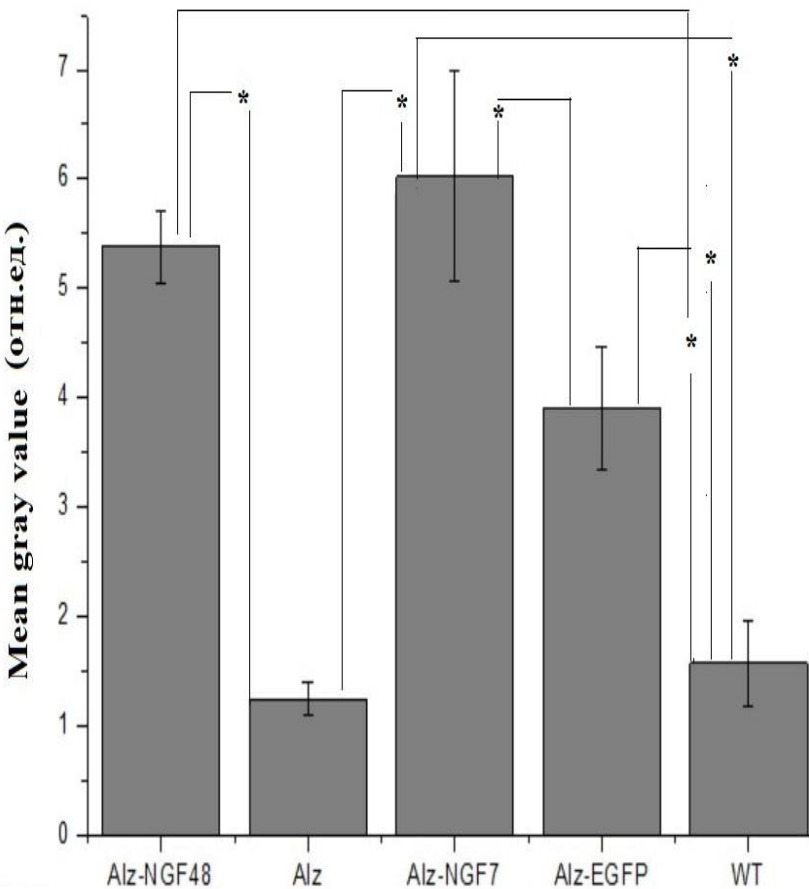


Зона СА3

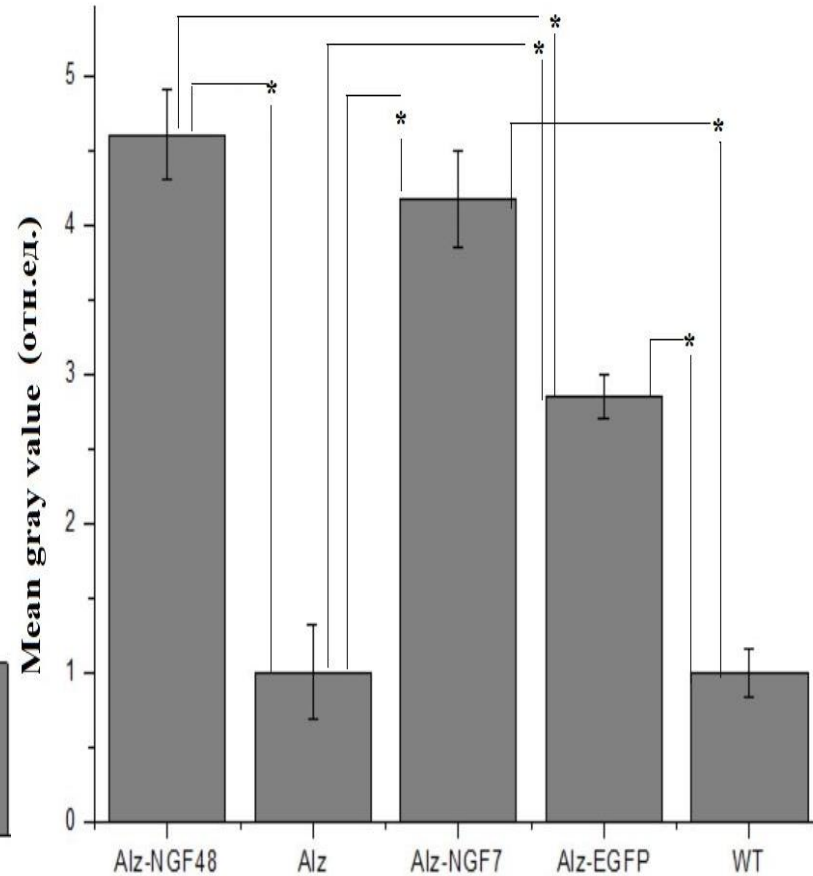


Экспрессия нестина в гиппокампе после трансплантации МКПК, экспрессирующих NGF

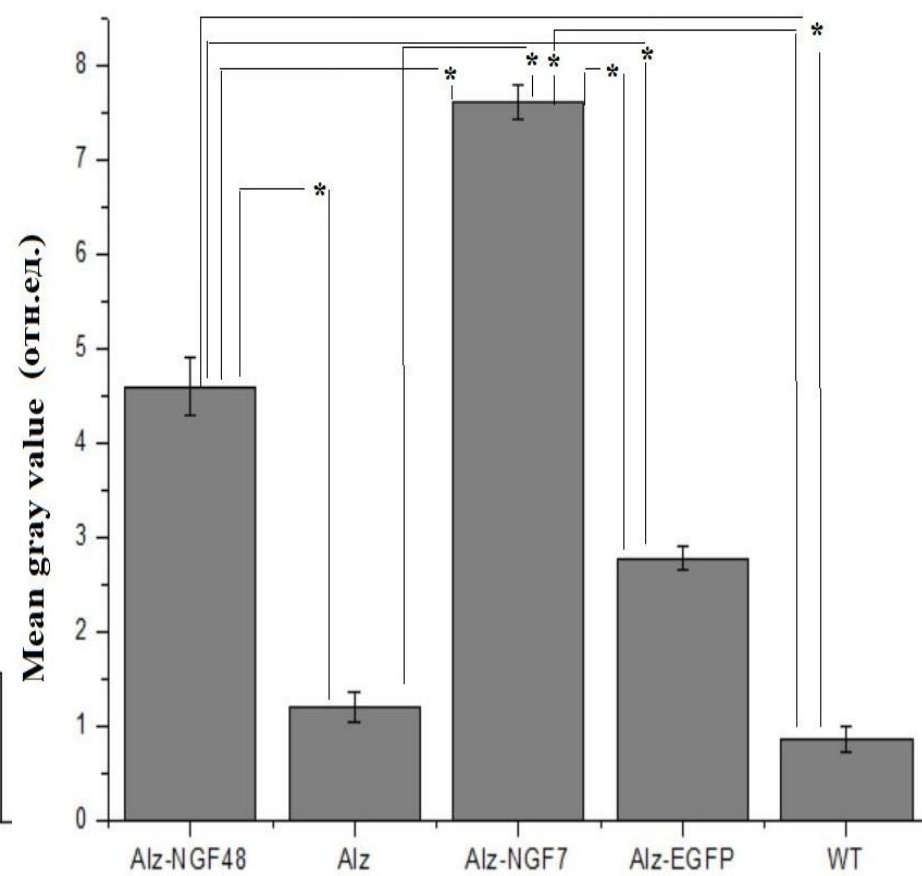
Зубчатая извилина



Зона СА1



Зона СА3



Выводы

В ходе исследования были показаны:

1. Успешная *трансплантация* предложенного вектора и способность генно-клеточной конструкции к длительной экспрессии рекомбинантного белка NGF.
2. Способность NGF-экспрессирующих МКПК к *миграции и хоумингу* в коре и гиппокампе головного мозга.
3. *Высокий уровень экспрессии* маркеров нейрональной пролиферации *нестина и даблкортина*, превышающий в группах Alz-NGF на сроках трансплантации 7 и 48 суток показатели экспрессии данных маркеров у групп Alz и WT.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях по разработке способов лечения болезни Альцгеймера.

Благодарности

Выражается благодарность за помощь в подготовке и выполнении работы:

- Кафедре физиологии человека и животных КФУ
- OpenLab «Генные и клеточные технологии» КФУ
- Междисциплинарному центру «Аналитическая микроскопия» КФУ
- Кафедре нормальной физиологии КГМУ

**Спасибо за
внимание!**

