Иммуногистохимическая верификация нейродегенеративных изменений у мышей в двух моделях болезни Альцгеймера: при введении фрагментов пептида амилоида-β в боковые желудочки головного мозга и в гиппокамп

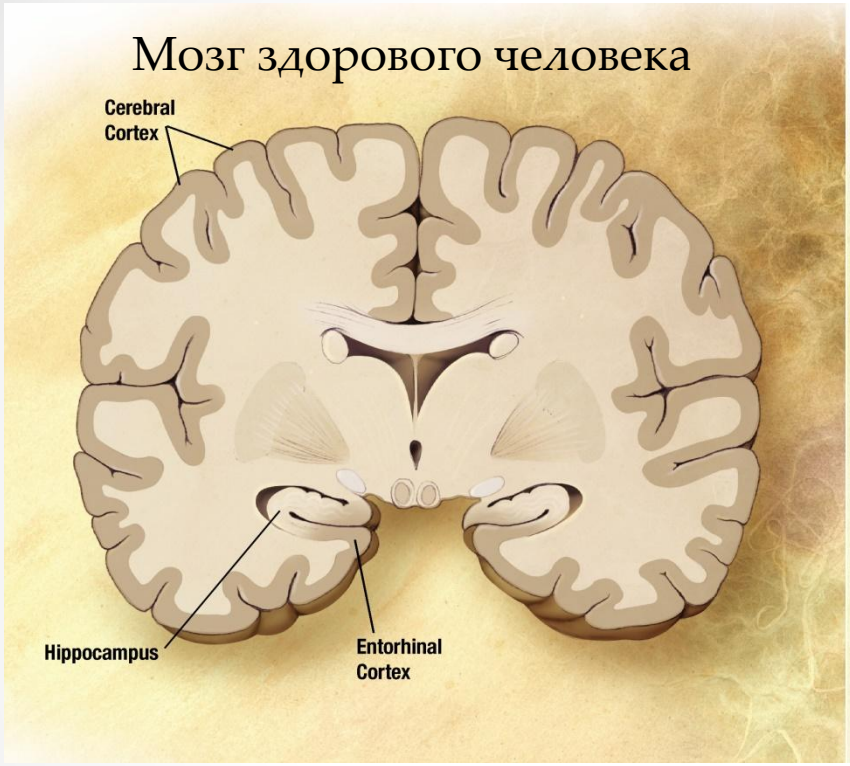
Автор: Алексеева Елена Валерьевна
Научный руководитель: д. б. н. Амстиславская Тамара Геннадьевна
лаборатория экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов НИИНМ

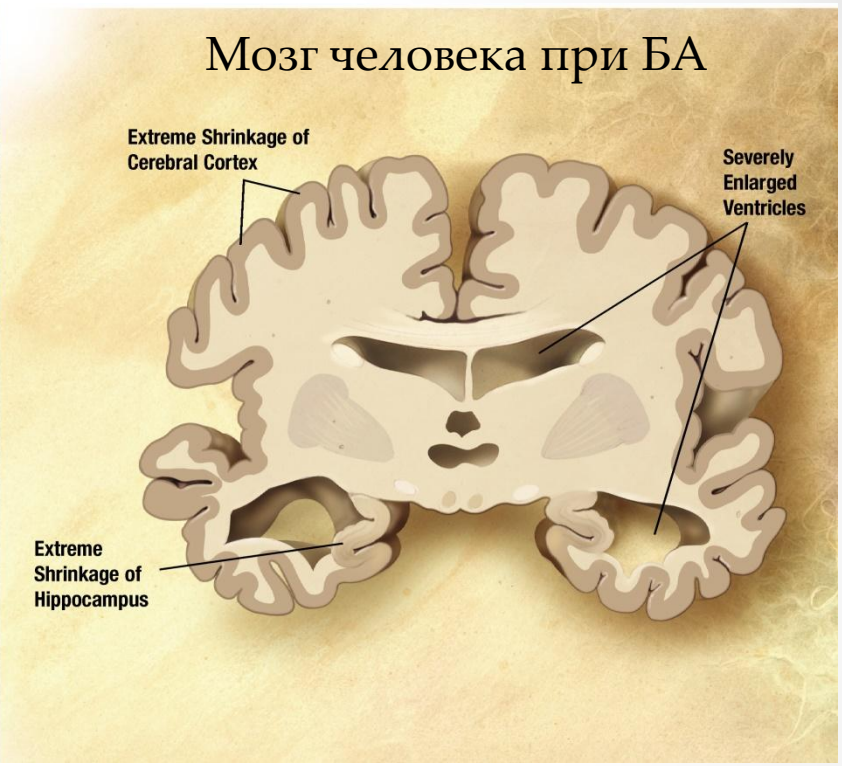
Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины

План презентации

- Этиология и патогенез болезни Альцгеймера 3-6 с.
- Цели и задачи 7 с.
- Материалы и методы 8-11 с.
- Результаты и обсуждение 12-17 с.
- Выводы 18 с.

Болезнь Альцгеймера

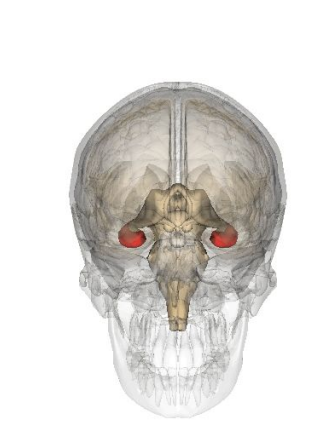




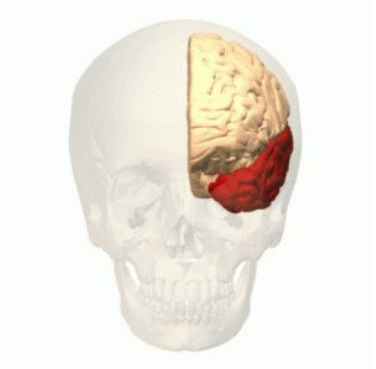
<u>Определение БА по классификации МКБ 10</u>

Болезнь Альцгеймера (G30.+-) - это первичная дегенеративная болезнь головного мозга неизвестной этиологии с характерными нейропатологическими и нейрохимическими проявлениями. Болезнь обычно начинается незаметно и медленно, но неуклонно прогрессирует в течение нескольких лет.

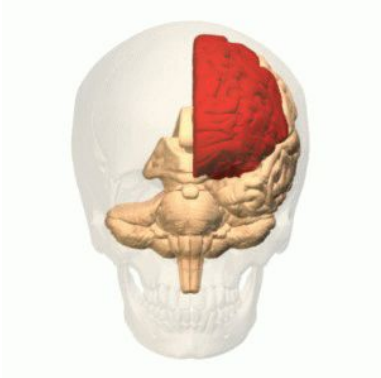
Прогрессирование нейродегенерации при БА



Гиппокамп

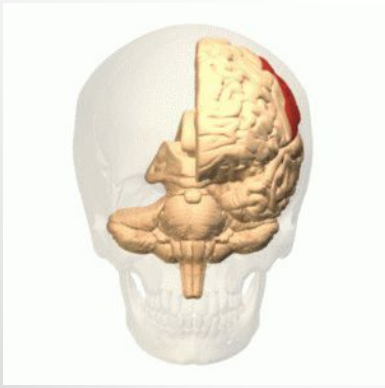


Височные доли



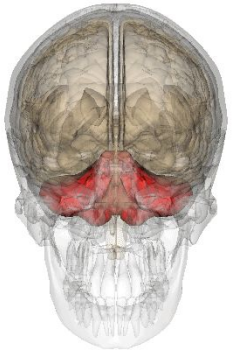
Лобные доли

Префронтальная кора

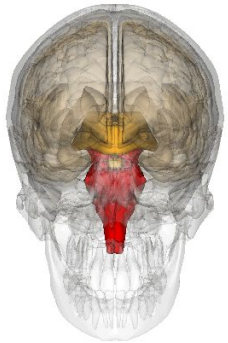


Теменные доли

Затылочные доли



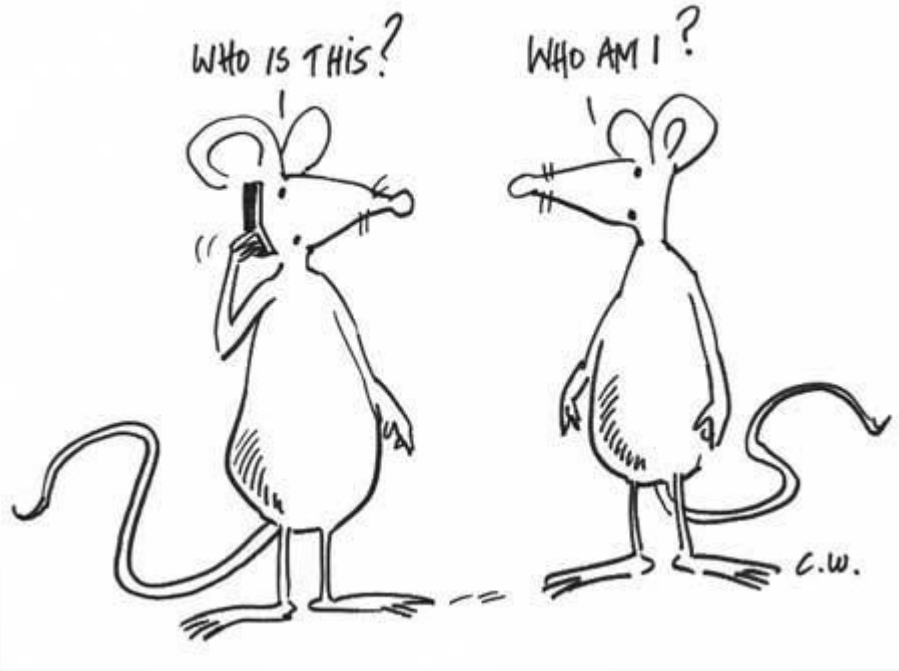
Мозжечок



Ствол головного мозга

Основные гипотезы возникновения БА

- Холинергическая
- Тау-гипотеза
- **Амилоидная**



Модели Болезни Альцгеймера

Генетические

Создание организмов с гиперэкспрессией генов APP, PS или тау-мутациями

Введение токсических веществ, (Aβ и/или тау-белка) в желудочки мозга, либо в гиппокамп

Alicia M. Hall and Erik D. Roberson, 2011
«Mouse Models of Alzheimer's Disease»

Фармакологические

Цель:

- Провести сравнительное исследование двух способов введения Aβ25-35 в боковые желудочки мозга или интрагиппокампально на накопление Aβ и показатели нейровоспаления в мозге у мышей линии C57BL/6 методом иммуногистохимии (ИГХ).

Задачи:

- Исследовать влияние введения Aβ25-35 в боковые желудочки мозга и гиппокамп на накопление Aβ во фронтальной коре и в CA1, CA3, зубчатой извилине гиппокампа мышей;

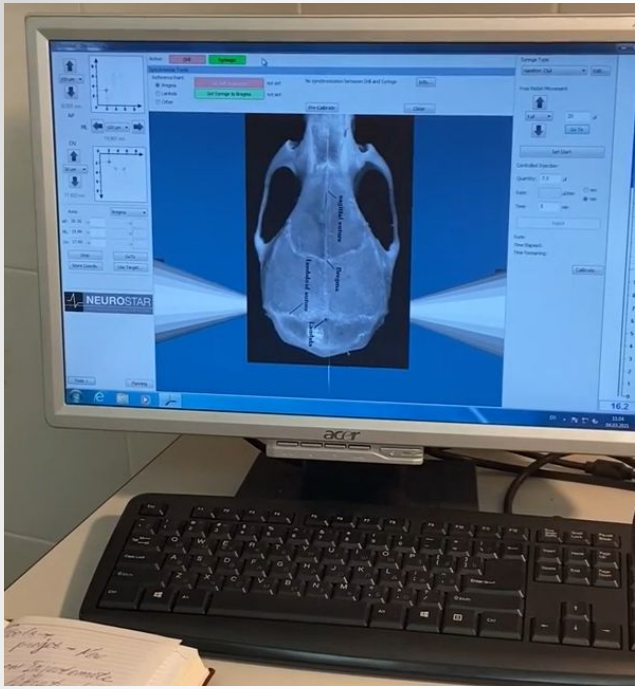
- Исследовать влияние интравентрикулярного и интрагиппокампального введения Aβ25-35 на активацию микроглии во фронтальной коре и в CA1, CA3, зубчатой извилине гиппокампа мышей.

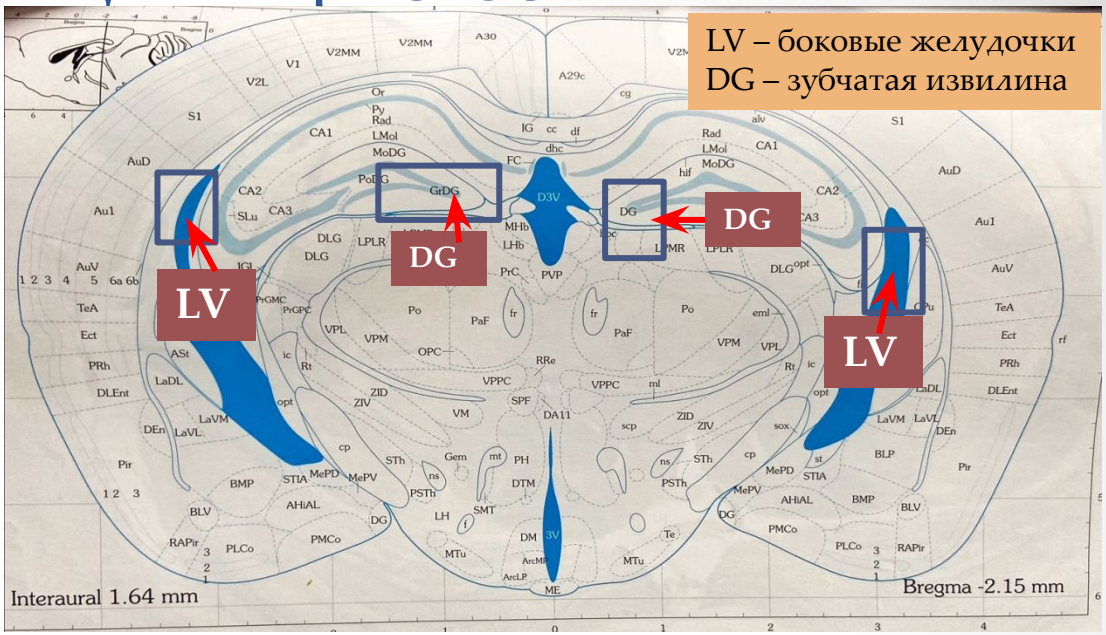
Материалы и методы

1) «Интактные»;
2) Контроль1 («H2O_LV»)
3) Контроль2 («H2O_Hipp»)
4) «Aβ25-35_LV»
5) «Aβ25-35_Hipp»

C57BL/6

Инъекции Aβ25-35

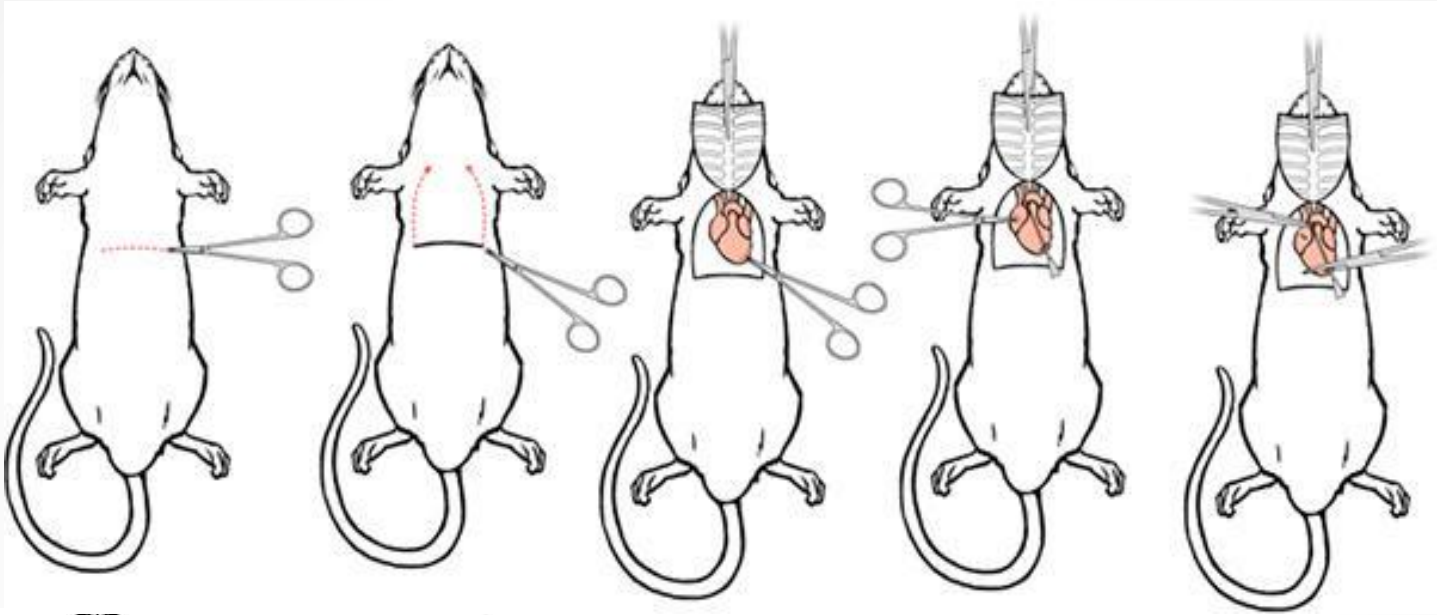


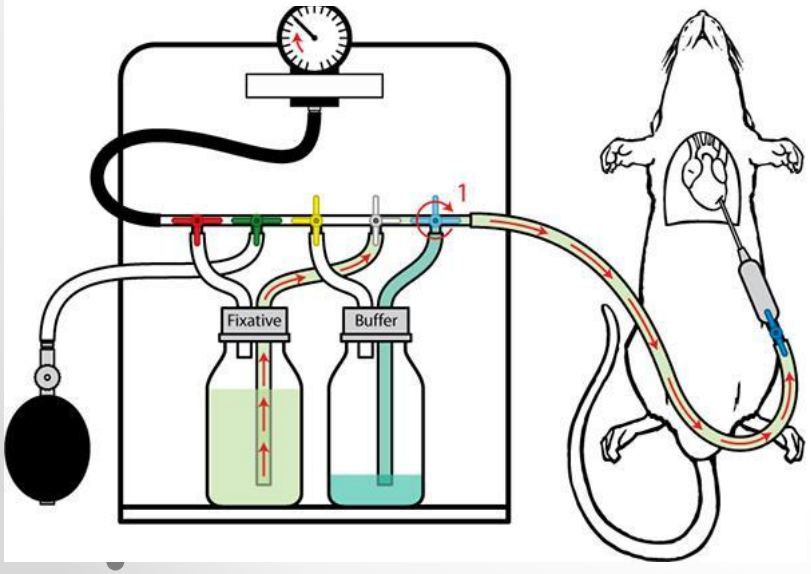


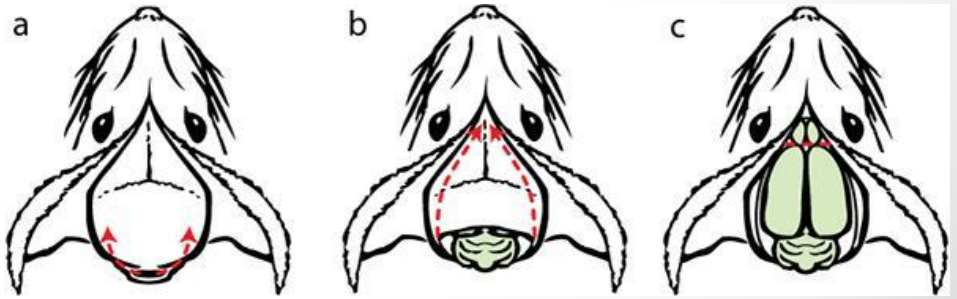
Координаты введения в желудочек: AP= -0,46 мм, ML= ±0,9 мм, DV= 2,5 мм.

Координаты введения в гиппокамп: AP= -2,06 мм, ML= ±1,3 мм, DV= 2 мм

Пробоподготовка

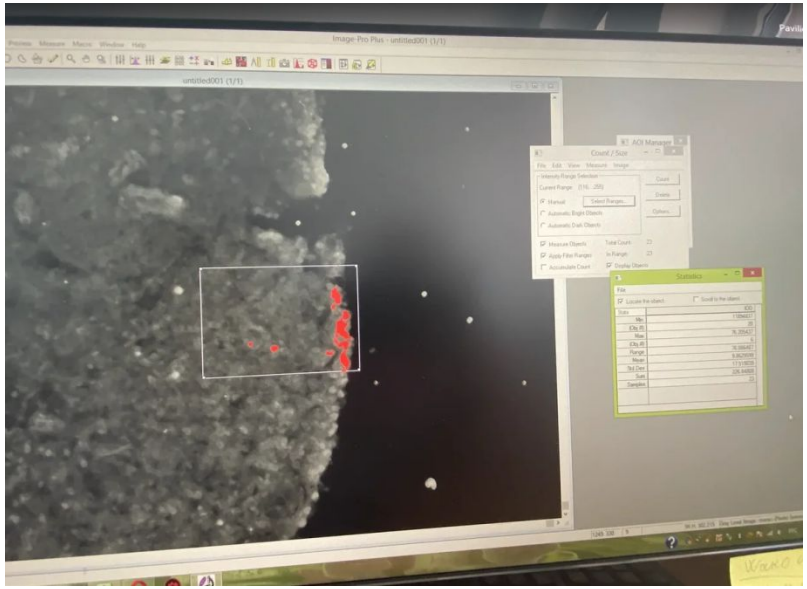






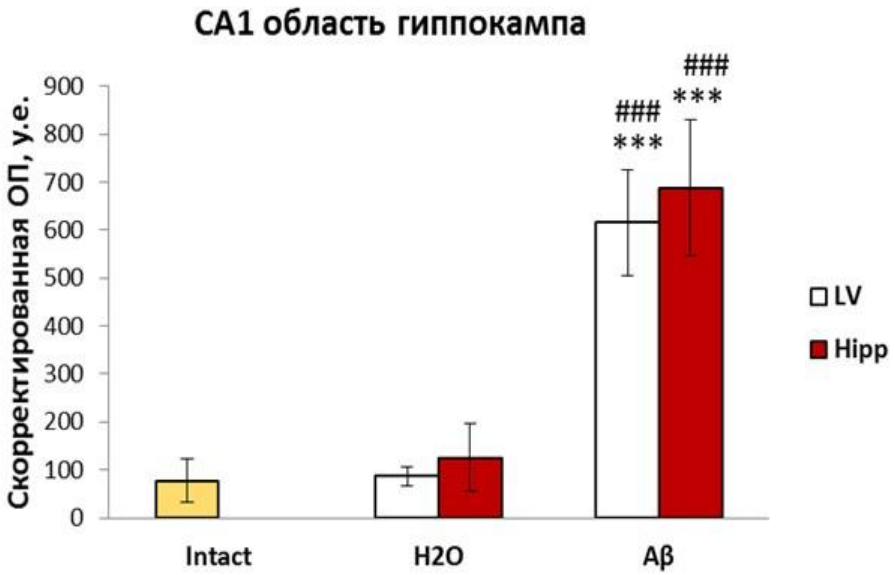
Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents
Gregory J. Gage, Daryl R. Kipke, William Shain, 2012

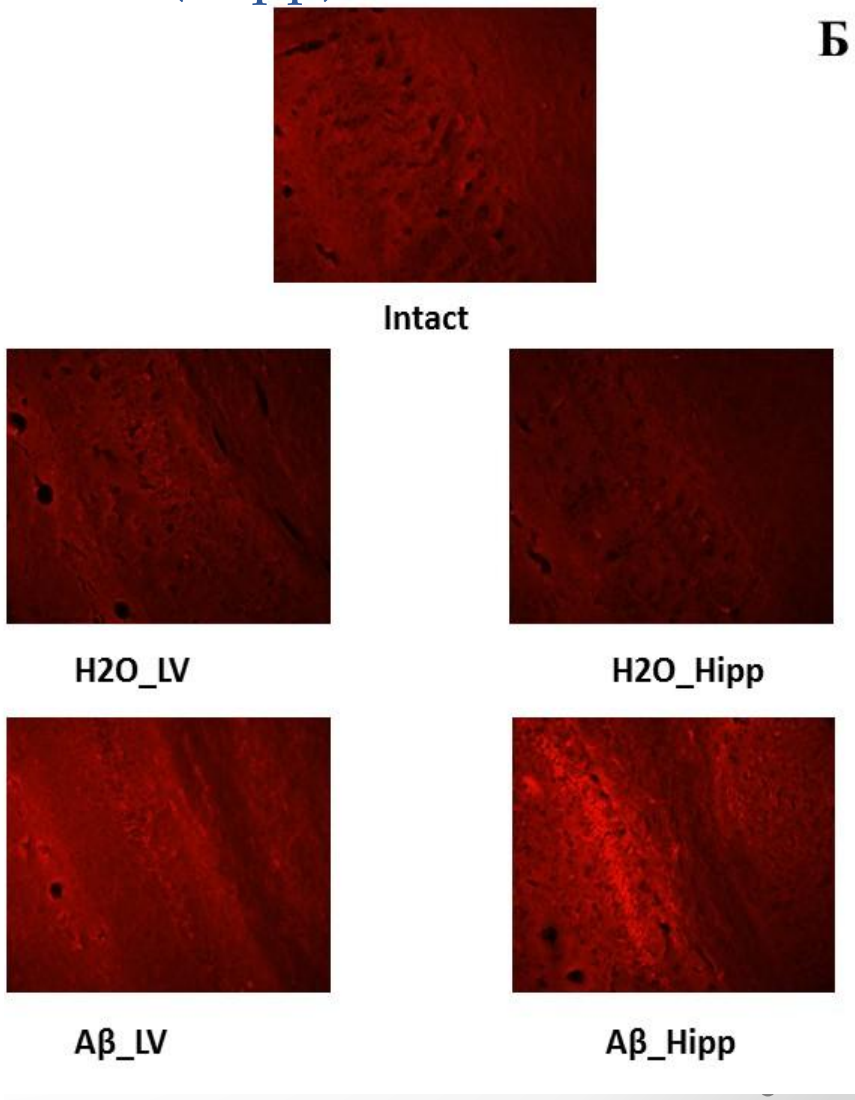
Иммуногистохимия (ИГХ)



Результаты

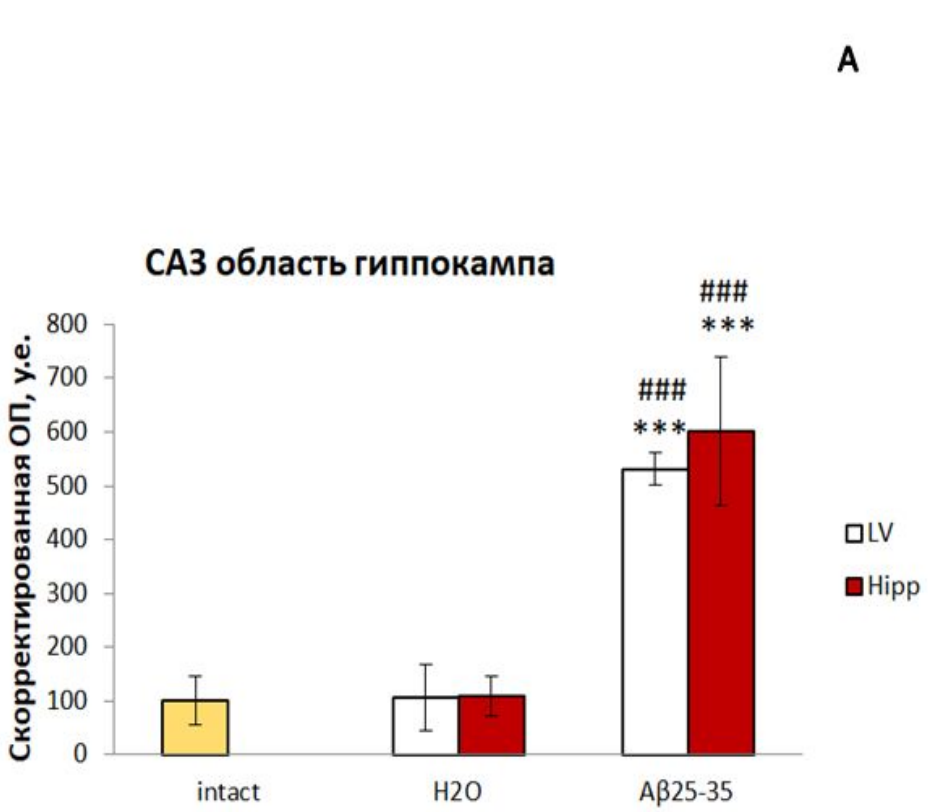
Накопление Aβ в ***CA1*** области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)

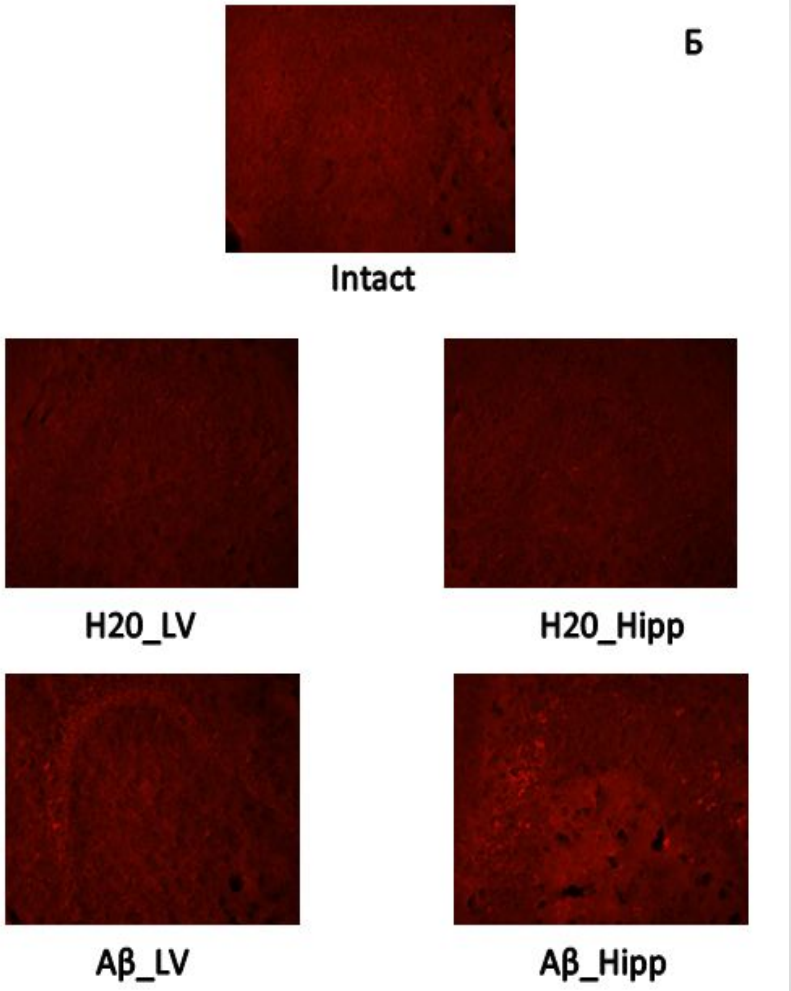




Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: ***p<0,001 по сравнению с группой «Intact»; ###p<0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

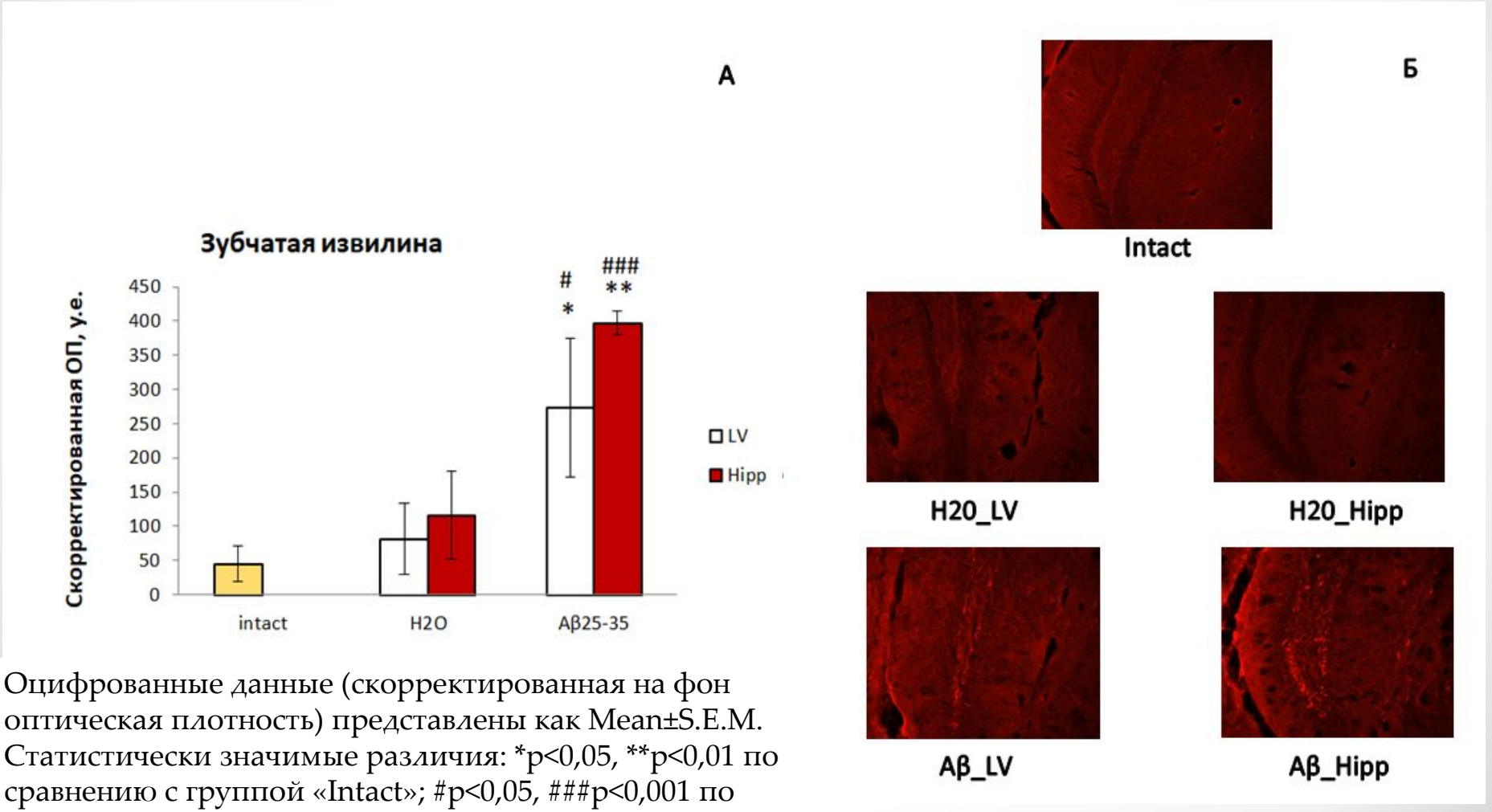
Накопление Aβ в *CA3* области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)





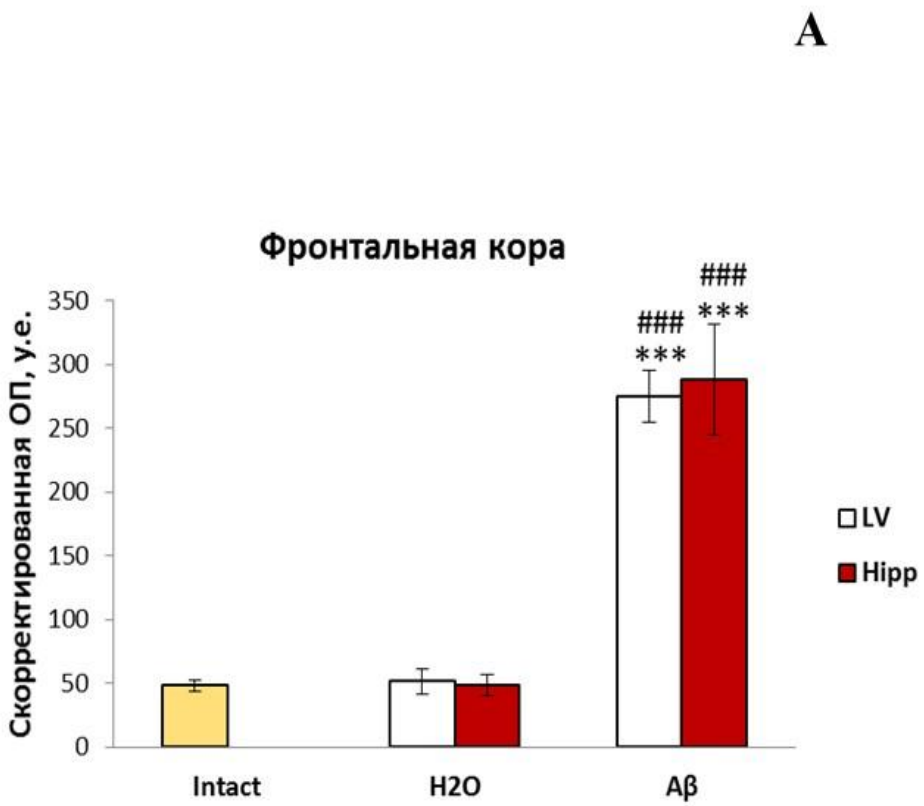
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: ***p<0,001 по сравнению с группой «Intact»; ###p<0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

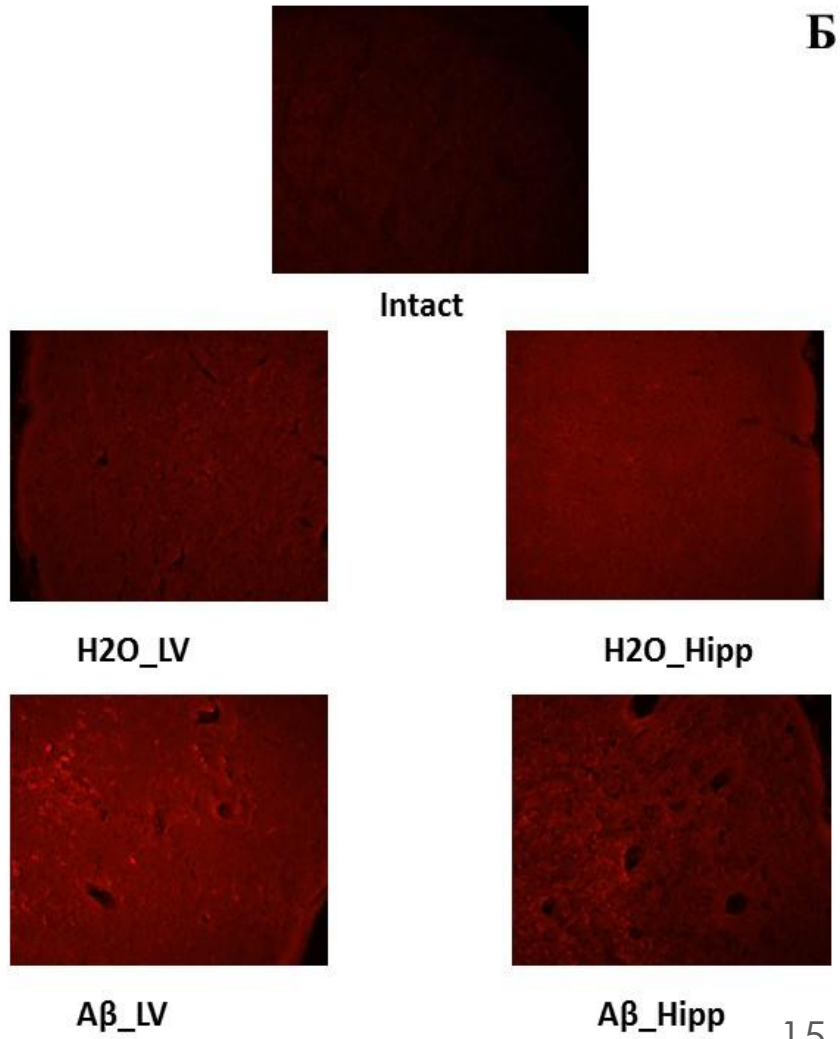
Накопление Aβ в области ***зубчатой извилины*** мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)



Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с группой «Intact»; #p<0,05, ###p<0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

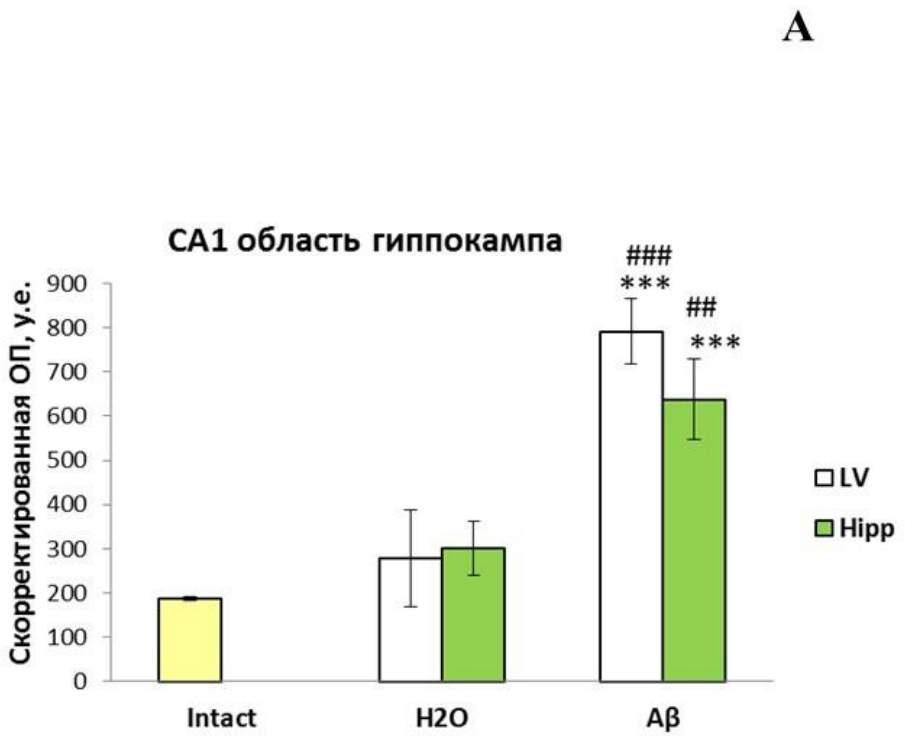
Накопление Aβ во ***фронтальной коре*** мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)





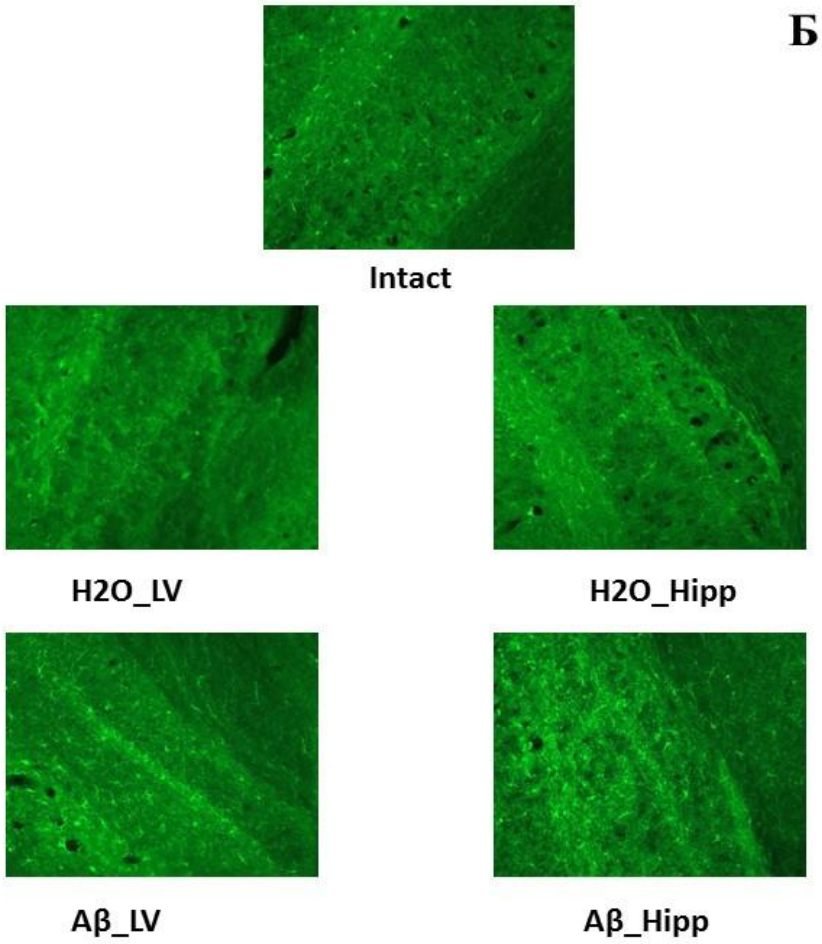
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: ***p<0,001 по сравнению с группой «Intact»; ###p<0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Активация микроглии в *CA1* области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)



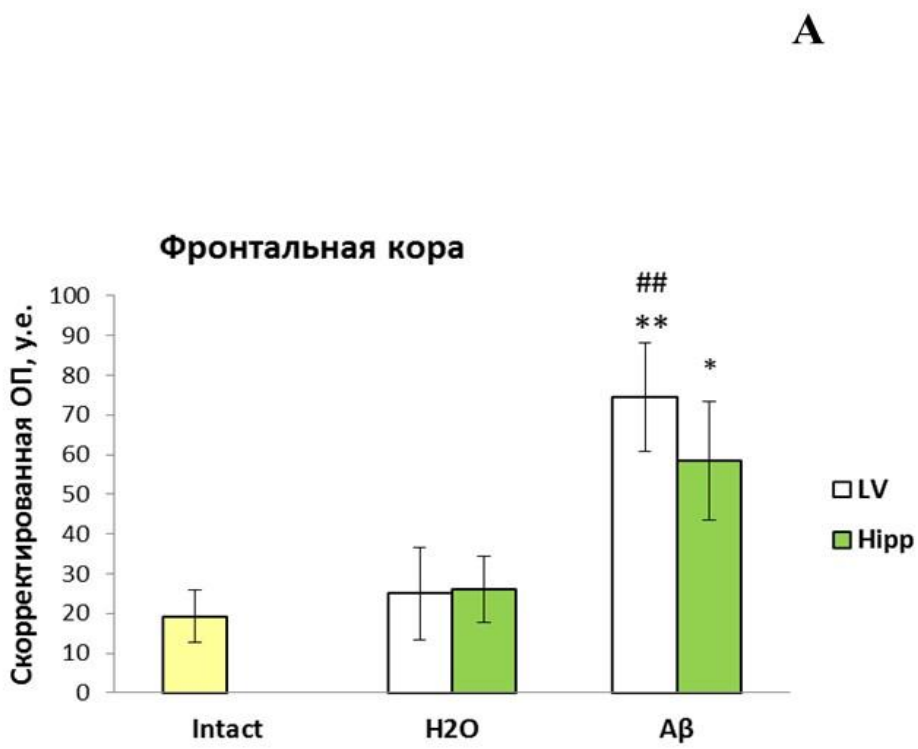
А

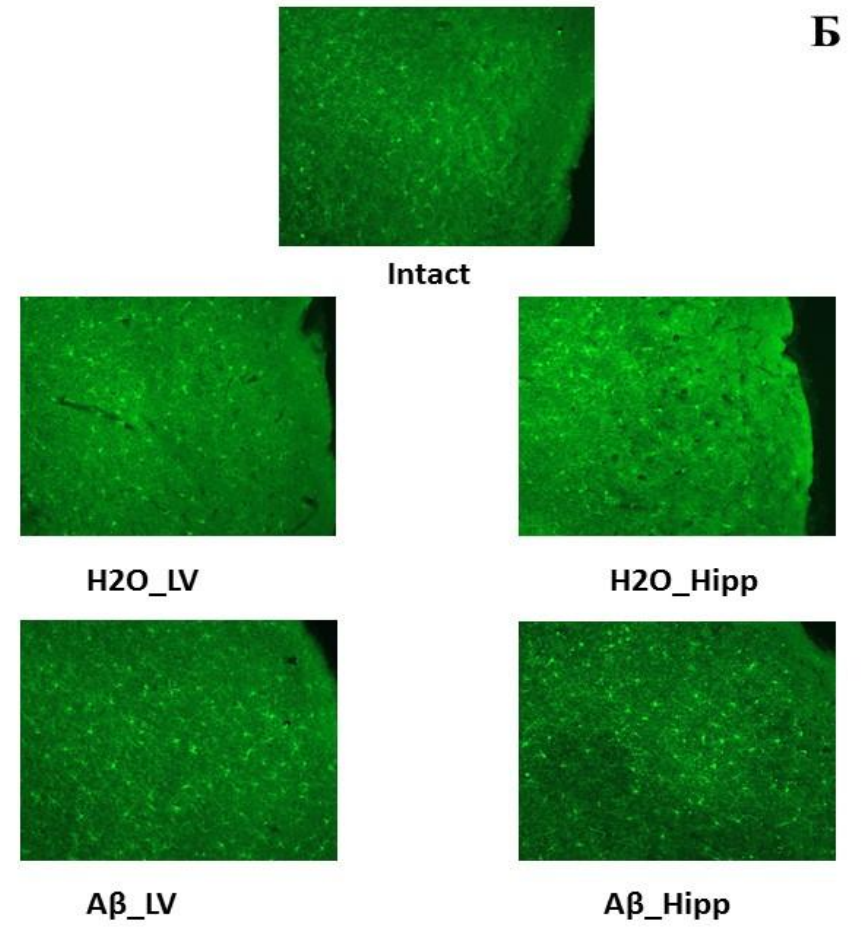
Б



Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: ***p<0,001 по сравнению с группой «Intact»; ##p<0,01, ###p<0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Активация микроглии во ***фронтальной коре*** мозга мышей C57BL/6 при введении Aβ25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)





Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: *p<0,05, **p<0,01 по сравнению с группой «Intact»; ##p<0,01 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Выводы

- У мышей линии C57BL/6 выявлено сходное накопление Aβ в гиппокампе и фронтальной коре при билатеральном введении Aβ25-35 в боковые желудочки мозга и в гиппокамп в область зубчатой извилины;

- Накопление Aβ во фронтальной коре и гиппокампе сопряжено с активацией микроглии и развитием нейровоспалительной реакции в этих областях мозга;

- Накопление Aβ положительно коррелировало с активацией микроглии в CA1 области гиппокампа ($rs=0,72$, $p<0,01$) и во фронтальной коре ($rs=0,8$, $p<0,001$).

Личное участие

Выполненное исследование – это часть общей работы, в которой сравнивали поведение, морфологию и экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию синтеза и распада амилоида в мозге мышей с альцгеймероподобной патологией, обусловленной центральным введением Aβ25-35 в боковые желудочки мозга или интрагиппокампально, а также в которой исследовали терапевтическое действие активаторов аутофагии рапамицина и трегалозы на анимальной модели болезни Альцгеймера.

Мною было принято непосредственное участие в следующих этапах работы:

- Проведение инъекций Aβ25-35 (анестезирование, фиксация животных с помощью стереотаксиса, инъекции стерильной воды и Aβ25-35);
- Перфузия животных (вскрывание грудной полости, фиксация мозга, транскардиальной перфузией по протоколу Gage et al. 2012);
- Забор биообразцов (декапитация и извлечение мозга, постфиксация в 4% р-ре параформальдегида в течение 12 часов при 4 при 4°C; инкубация в 30% сахарозе в течение 4 недель при 4°C, фиксация в среде для криотомии, замораживание в морозильной камере при –76°C);
- ИГХ (использование непрямого иммуногистохимического метода: маркировка антигена первичными и вторичными антителами);
- Микроскопирование, микрофотографирование и оцифровка данных в программе Image Pro Plus.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

E-mail: lena.aliks@mail.ru