

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

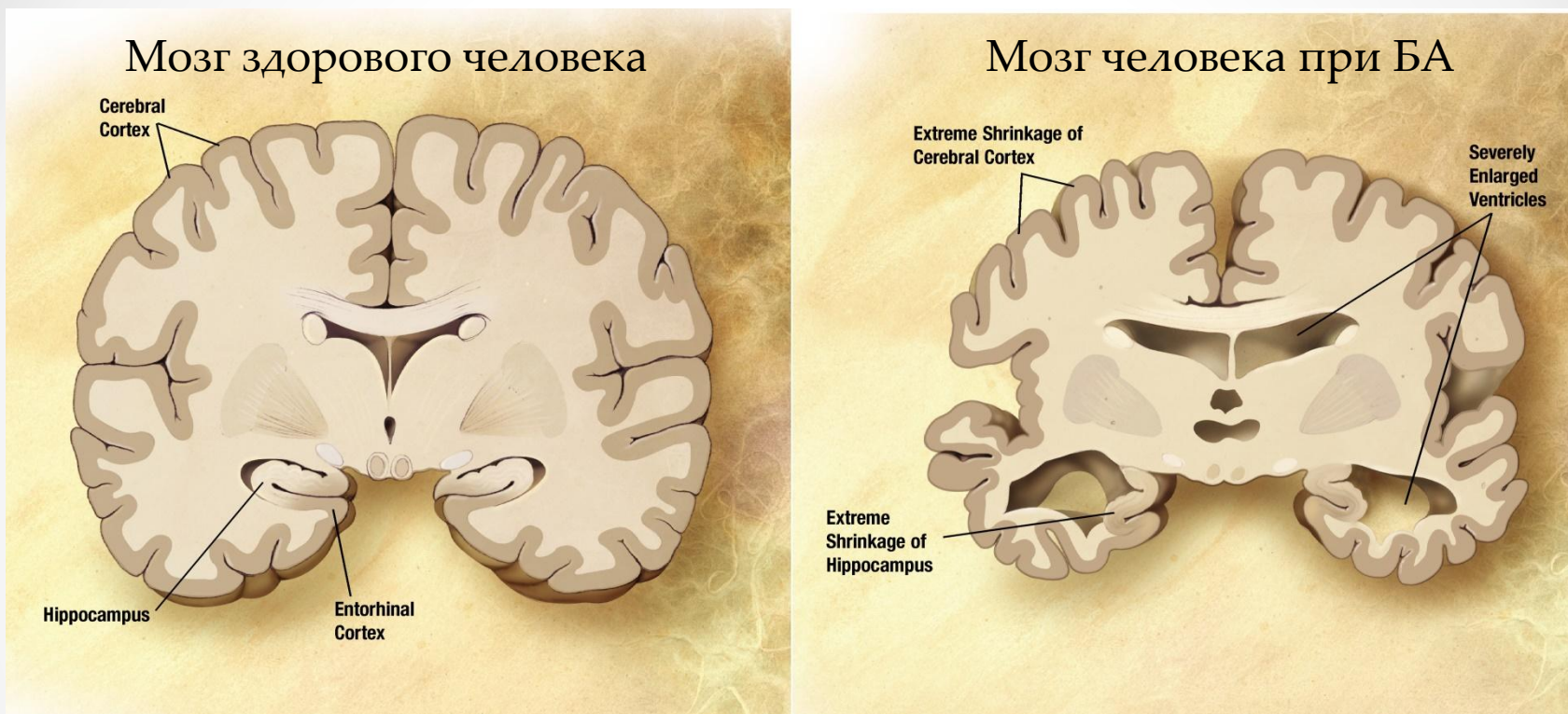
Автор: Алексеева Елена Валерьевна

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

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.

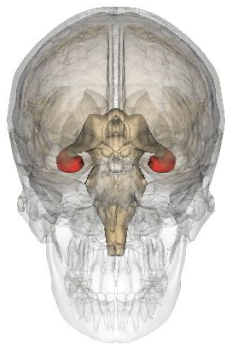
Болезнь Альцгеймера



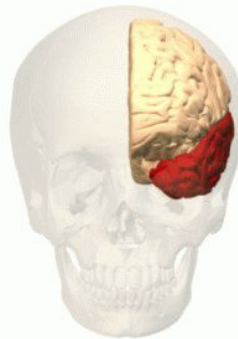
Определение БА по классификации МКБ 10

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.

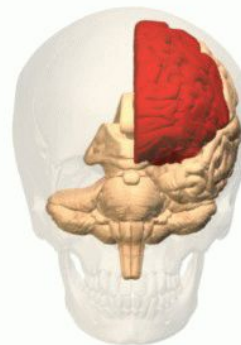
Прогрессирование нейродегенерации при БА



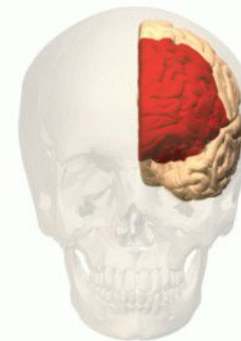
Гиппокамп



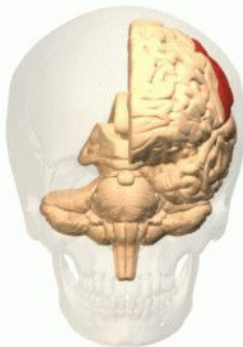
Височные доли



Лобные доли



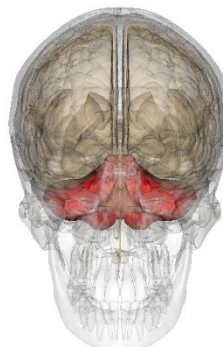
Префронтальная
кора



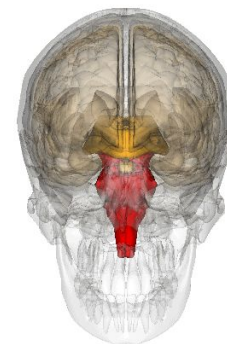
Теменные доли



Затылочные
доли



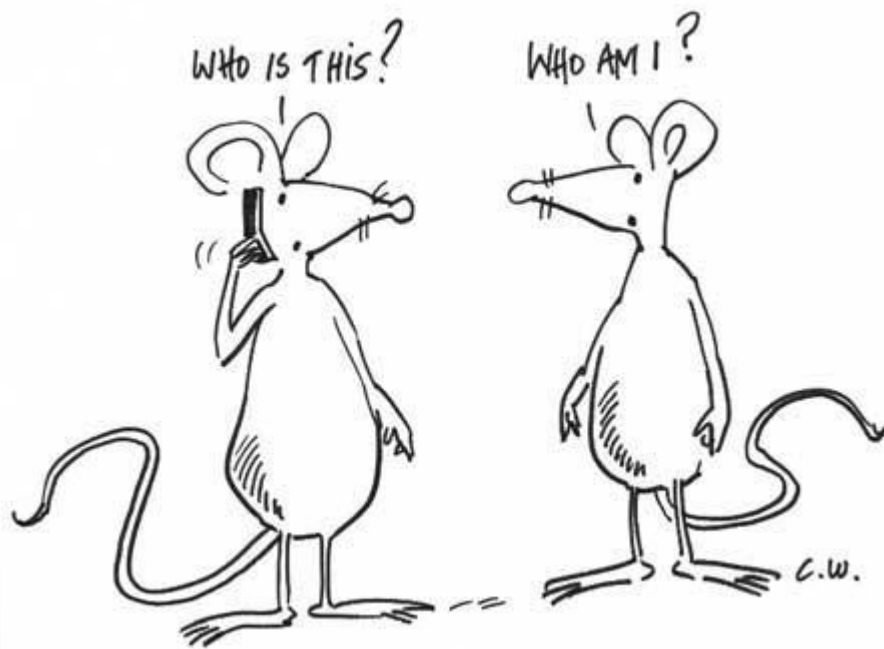
Мозжечок



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, ($A\beta$ 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 $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки мозга или интрагиппокампально на накопление $A\beta$ и показатели нейровоспаления в мозге у мышей линии C57BL/6 методом иммуногистохимии (ИГХ).

Задачи:

- Исследовать влияние введения $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки мозга и гиппокамп на накопление $A\beta$ во фронтальной коре и в СА1, СА3, зубчатой извилине гиппокампа мышей;
- Исследовать влияние интравентрикулярного и интрагиппокампального введения $A\beta_{25-35}$ на активацию микроглии во фронтальной коре и в СА1, СА3, зубчатой извилине гиппокампа мышей.

Материалы и методы

1) «Интактные»;

2) Контроль1 («H2O_LV»)

3) Контроль2 («H2O_Hipp»)

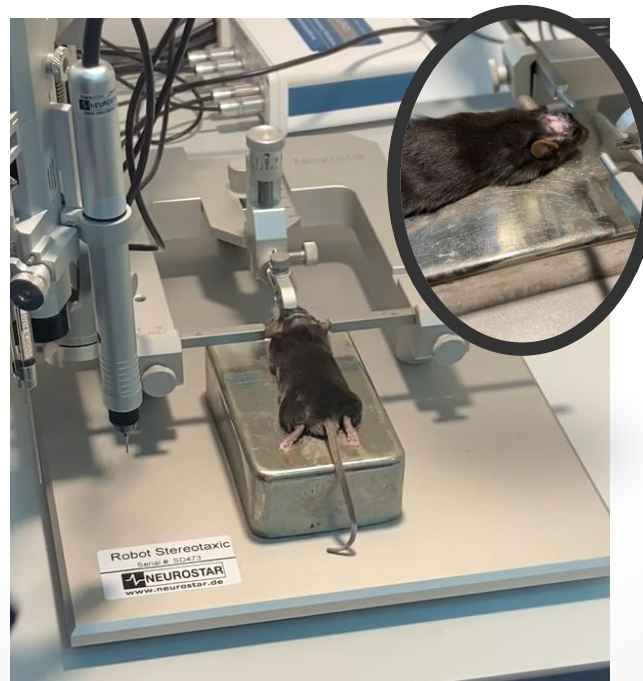
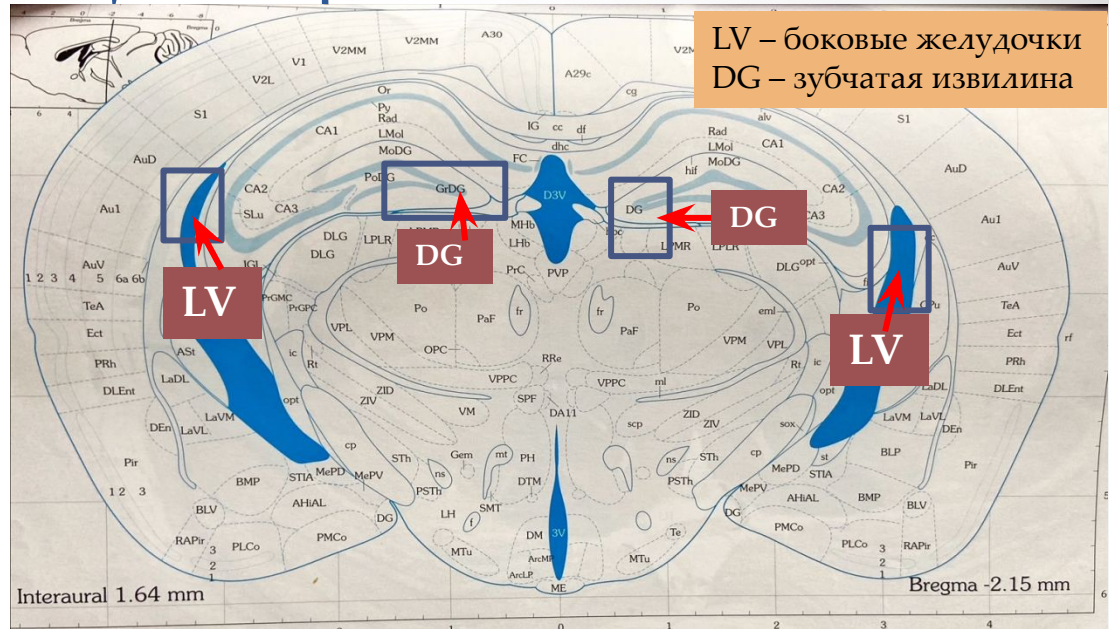
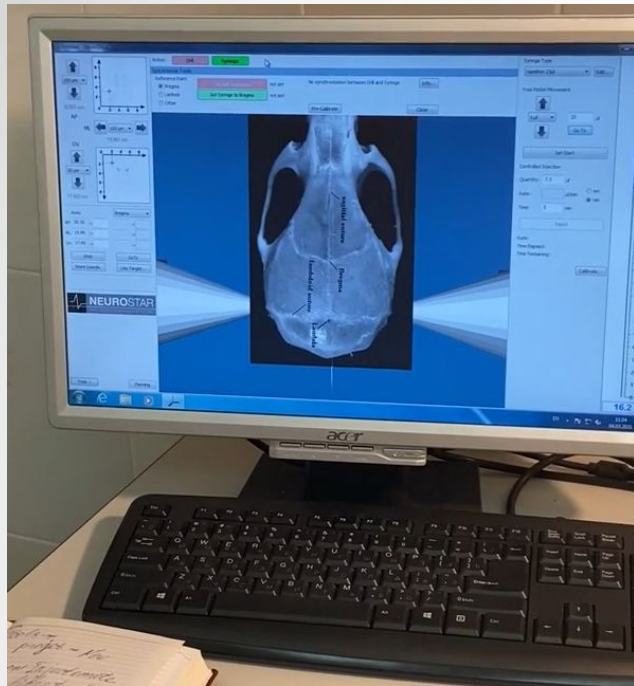
4) «A β 25-35_LV»

5) «A β 25-35_Hipp»



C57BL/6

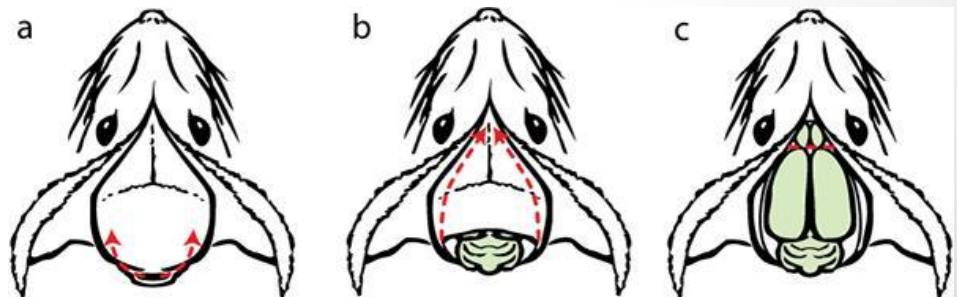
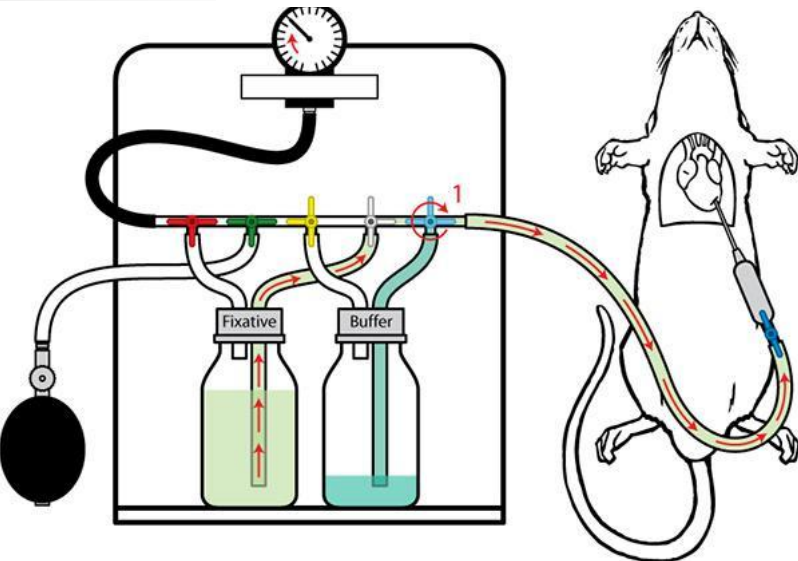
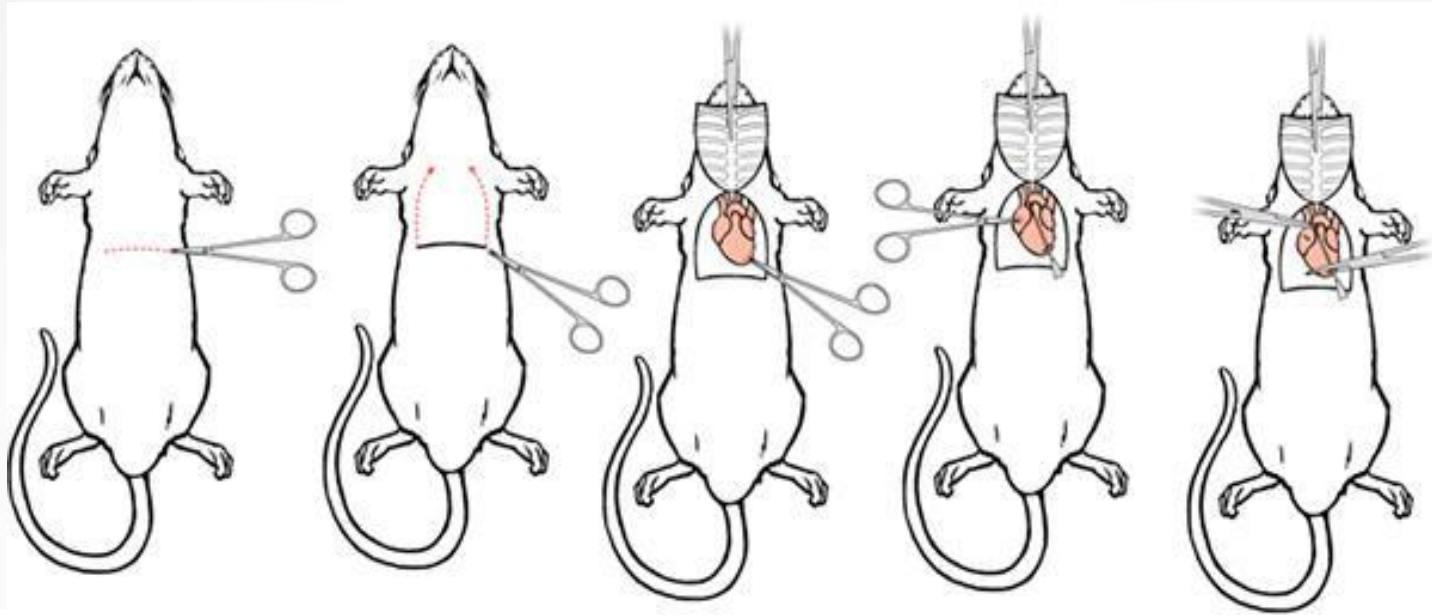
Инъекции A β 25-35



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

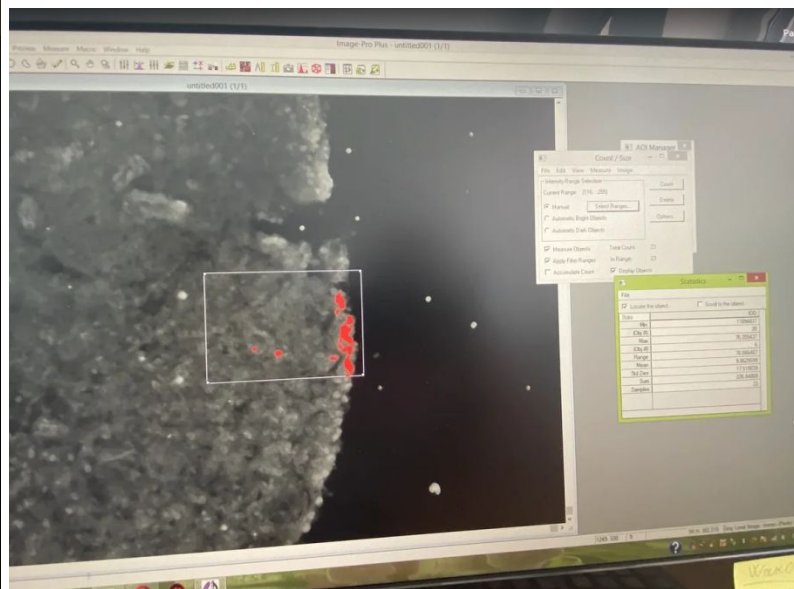
Координаты введения в гиппокамп: AP= -2,06 мм, ML= \pm 1,3 мм, DV= 2 мм

Пробоподготовка



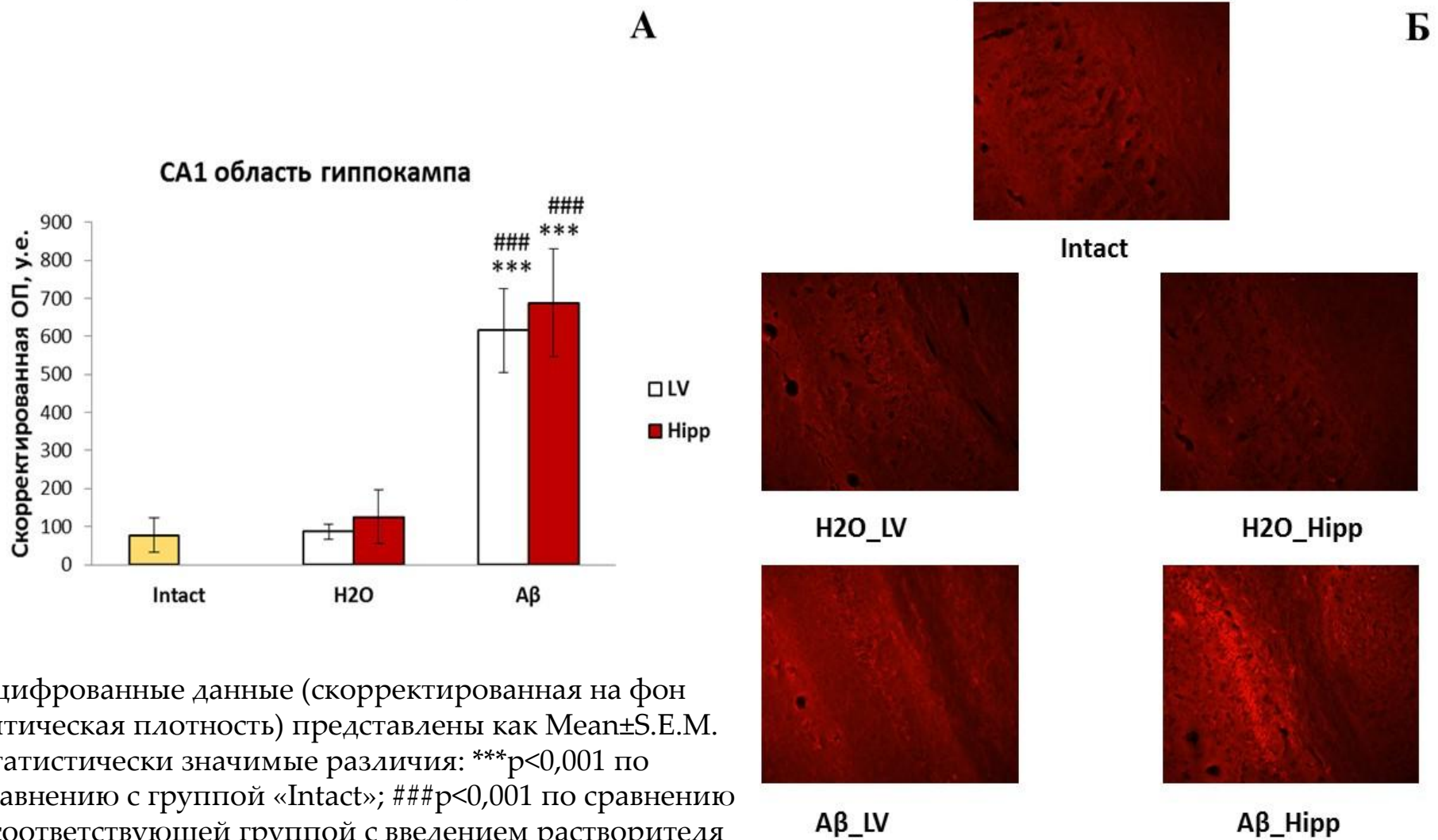
Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents
Gregory J. Gage, Daryl R. Kipke, William Shain, 2012

Иммуногистохимия (ИГХ)



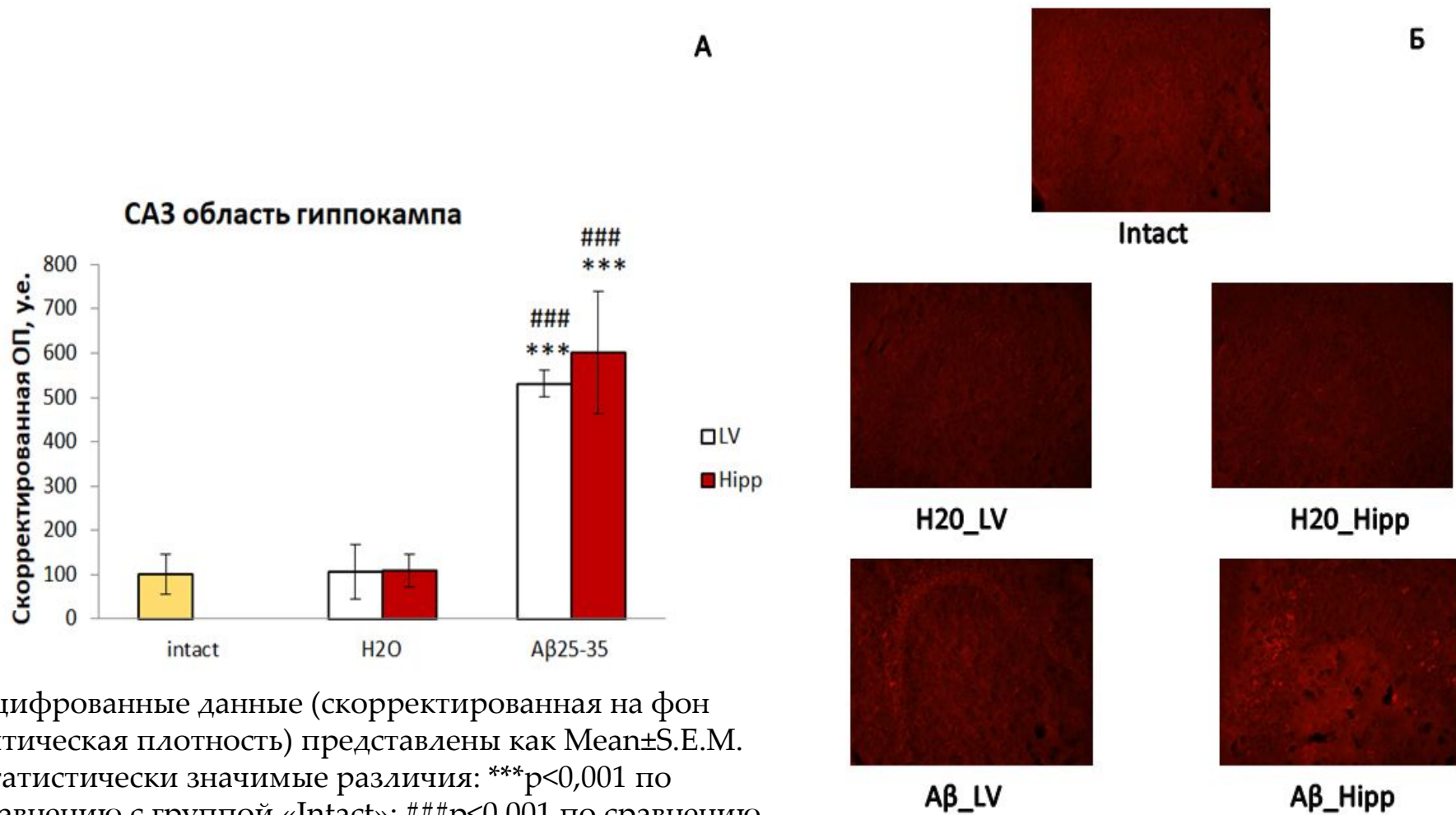
Результаты

Накопление $A\beta$ в CA1 области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)



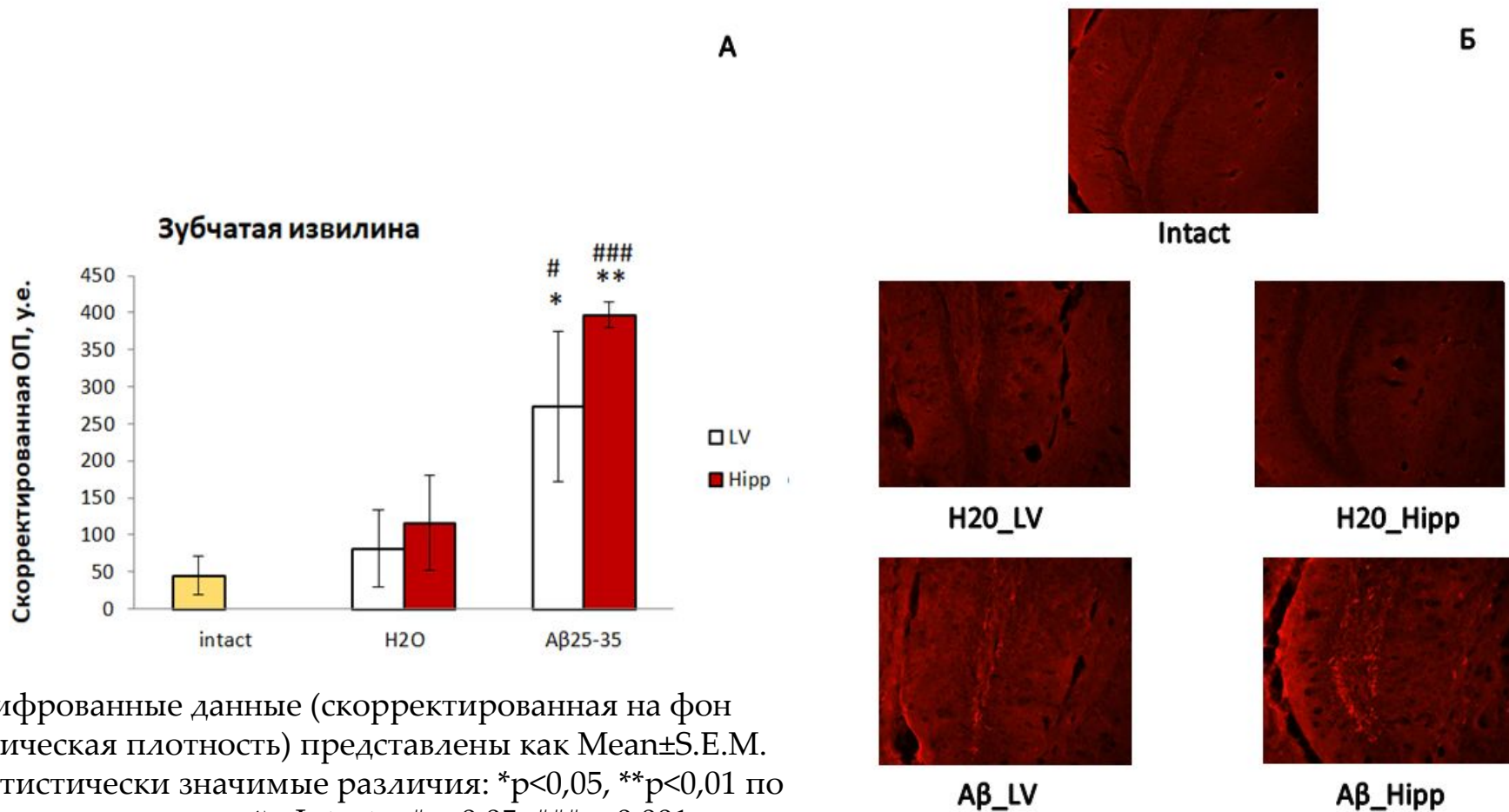
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Intact»; ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Накопление $A\beta$ в CA3 области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампально (Hipp)



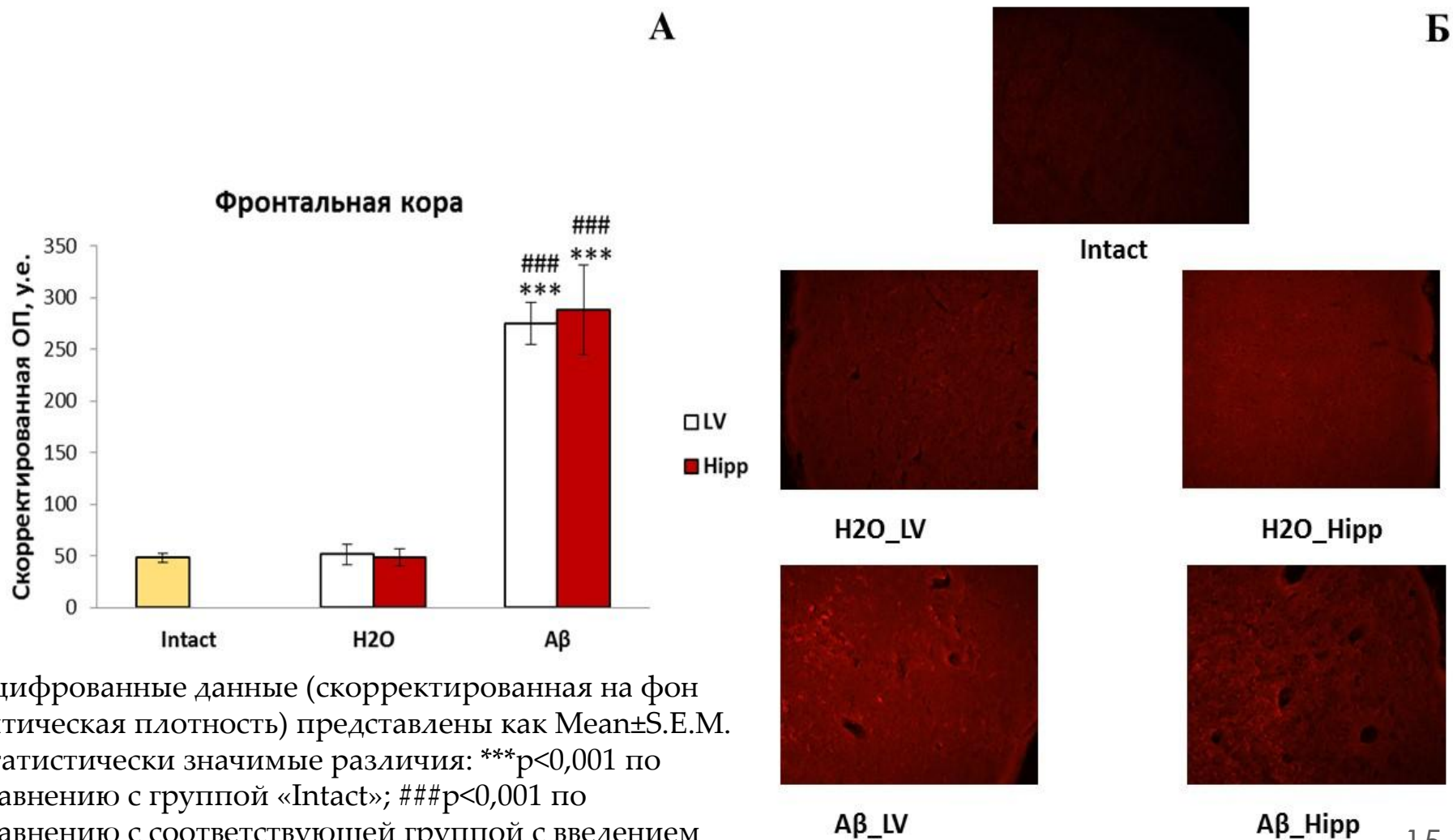
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «Intact»; ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Накопление $A\beta$ в области зубчатой извилины мозга мышей C57BL/6 при введении $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампадно (Hipp)



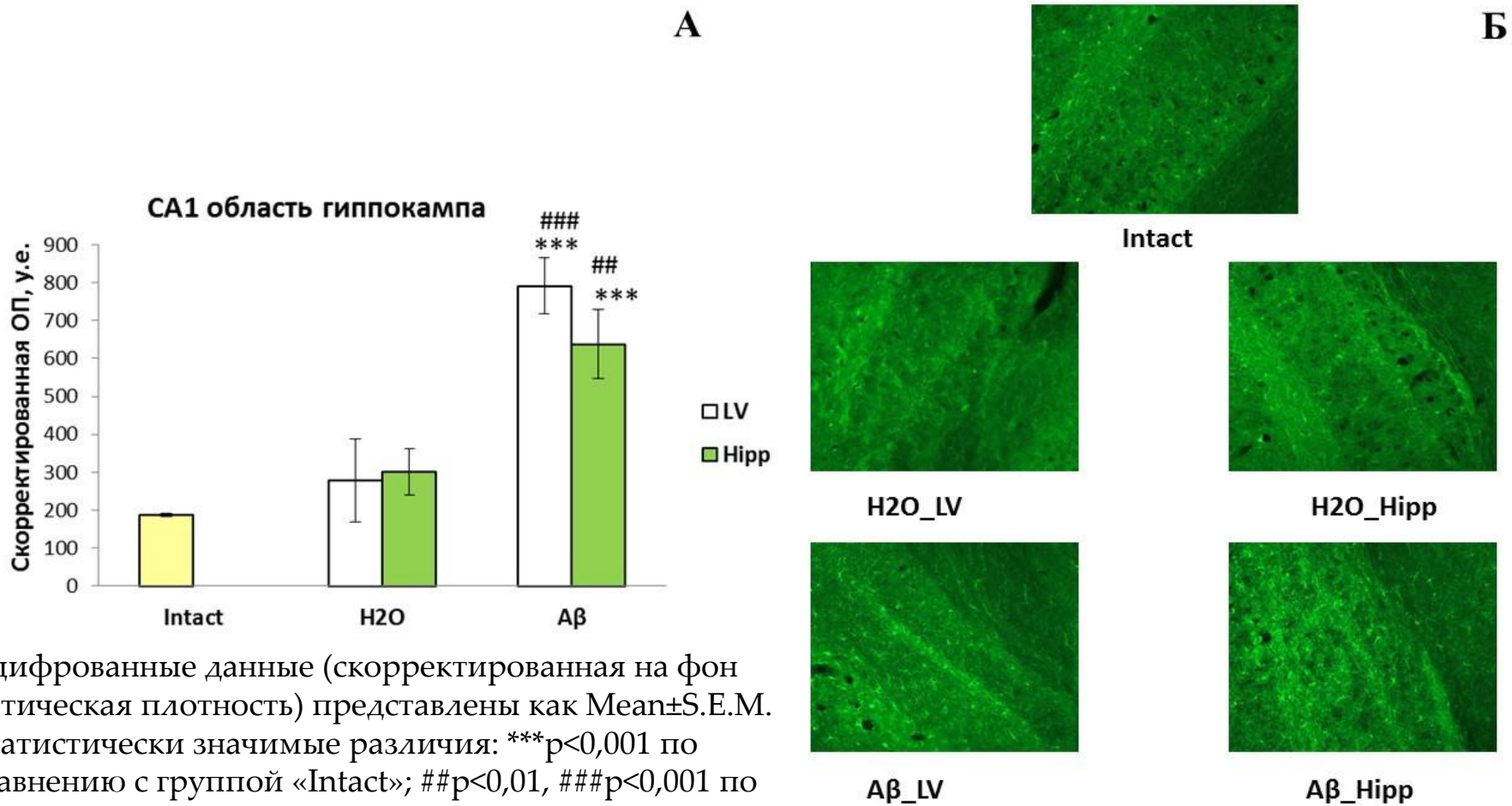
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean±S.E.M. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с группой «Intact»; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Накопление A β во фронтальной коре мозга мышей C57BL/6 при введении A β 25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампадно (Hipp)



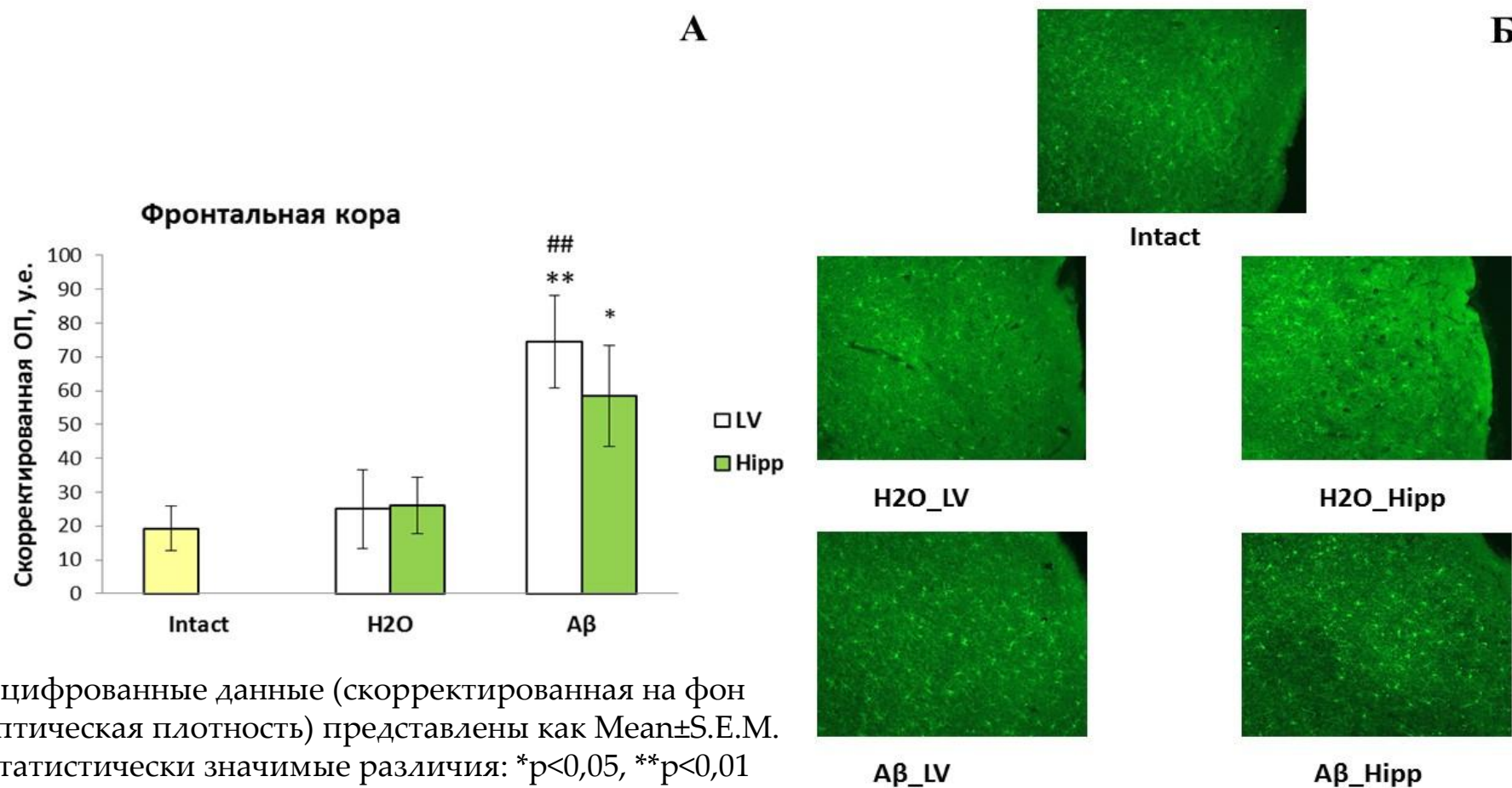
Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean \pm S.E.M. Статистически значимые различия: *** p <0,001 по сравнению с группой «Intact»; ### p <0,001 по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Активация микроглии в CA1 области гиппокампа мозга мышей C57BL/6 при введении $A\beta_{25-35}$ 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»; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с соответствующей группой с введением растворителя (H2O).

Активация микроглии во фронтальной коре мозга мышей C57BL/6 при введении A β 25-35 в боковые желудочки (LV) или интрагиппокампаально (Hipp)



Оцифрованные данные (скорректированная на фон оптическая плотность) представлены как Mean \pm 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 $A\beta$ в гиппокампе и фронтальной коре при билатеральном введении $A\beta_{25-35}$ в боковые желудочки мозга и в гиппокамп в область зубчатой извилины;
- Накопление $A\beta$ во фронтальной коре и гиппокампе сопряжено с активацией микроглии и развитием нейровоспалительной реакции в этих областях мозга;
- Накопление $A\beta$ положительно коррелировало с активацией микроглии в CA1 области гиппокампа ($r_s=0,72$, $p<0,01$) и во фронтальной коре ($r_s=0,8$, $p<0,001$).

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 A β 25-35 в боковые желудочки мозга или интрагиппокампадно, 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 A β 25-35 (анестезирование, фиксация животных с помощью стереотаксиса, инъекции стерильной воды и A β 25-35);
- Перфузия животных (вскрытие 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.aliqs@mail.ru