

6. Griego E, Galván E.J. Biophysical and synaptic properties of regular spiking interneurons in hippocampal area CA3 of aged rats. *Neurobiology of Aging*. 2021 Dec 30;112:27–38.
7. George Paxinos, Charles Watson *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th Edition - November 2, 2006

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ВЫРАЖЕННОСТИ СКОПЛЕНИЙ АМИЛОИДА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ APPSWE/PS1dE9/BLG

Солин А.В., Морозов В.Н., Морозова Е.Н., Радченко А.И.
*Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия*

Аннотация. В настоящее время поиск средств терапии заболеваний нервной системы приводящие к развитию деменции является актуальной проблемой. Одной из основных причин развития таких состояний является накопление в мозге амилоидного белка β (A β). Для поиска средств лечения нейропатий, связанных с накоплением в тканях A β , необходим удобный, хорошо воспроизводимый метод подсчета характеристик сформированных агрегатов амилоида. Показано, что окрашенные Конго красным препараты мозга трансгенных мышей APP^{swE}/PS1^{dE9}/Blg, сканированные микроскопом в режиме флюоресценции TRITC обеспечивают качественную визуализацию (высокой яркости) скоплений амилоида на фоне темных структур головного мозга мыши. Полное сканирование среза обеспечивает точность последующего анализа. Дальнейшая обработка полученных изображений при помощи открытого программного обеспечения QuPath с целью автоматического выделения и подсчета количества, площади и координат расположения скоплений амилоида позволяют с высокой степенью воспроизводимости и скоростью обрабатывать срезы целого мозга мыши. Сравнительный анализ результатов подсчета с использованием данной методики и ручного подсчета не выявил достоверных различий. Таким образом, предложенная методика позволяет не только определять наличие амилоида в головном мозге, но и анализировать его распределение, площадь, объем. Данные исследования позволят продвигнуться в понимании причин развития и лечения заболеваний, связанных с накоплением A β в мозге.

Ключевые слова: амилоид, нейропатии, флюоресцентная микроскопия, анализ изображений

A METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE SEVERITY OF AMYLOID ACCUMULATIONS IN THE BRAIN OF APPSWE/PS1dE9/BLG TRANSGENIC MICE

Solin A. V., Morozov V.N., Morozova E.N., Radchenko A.I.
Belgorod National Research University, Belgorod, Russia

Abstract. Currently, the search for treatments for diseases of the nervous system leading to the development of dementia is an urgent problem. One of the main causes of the development of such conditions is the accumulation of amyloid protein β (A β) in the brain. To search for treatments for neuropathies, associated with the accumulation of A β in tissues, a convenient, well-reproducible method for calculating the characteristics of the formed amyloid aggregates is needed. It is shown that Congo red-stained brain preparations of transgenic APP^{swE}/PS1^{dE9}/Blg mice scanned with a microscope in the TRITC fluorescence mode provide high-quality visualization (high brightness) of amyloid clusters against the background of dark structures of the mouse brain. Full scanning of the slice ensures the accuracy of subsequent analysis. Further processing of the obtained images using the open-source QuPath software for the purpose of automatic selection and counting of the number, area and coordinates of the location of amyloid clusters allows for high-reproducibility and high-speed processing of whole mouse brain slices. A comparative analysis of the counting results using this technique and manual counting did not reveal significant differences. Thus, the proposed method allows not only to determine the presence of amyloid in brain, but also to analyze its distribution, area, and volume. These studies will allow us to advance in understanding the causes of etiology and treatment of diseases associated with the accumulation of A β in the brain.

Keywords: amyloid, neuropathies, fluorescence microscopy, image analysis

Введение. Известно, что накопление в ткани мозга амилоидного белка β (A β) приводит к его повреждению. Такое повреждение приводит к стойкому снижению когнитивных функций [8]. В настоящее время рассматриваются различные гипотезы накопления амилоидных белков в структурах мозга, связанные как с их гиперпродукцией, так и с их транспортом [1]. В связи с этим целью работы являлась разработка легко воспроизводимой методики выявления и анализа скоплений амилоида, обладающая высокой повторяемостью. Это позволило бы продвинуться в понимании как патогенеза, так и разработки стратегий лечения больных с такими нарушениями.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на мышах сублинии APP^{swe}/PS1^{dE9}/B1g в условиях стандартного пищевого рациона и свободным доступом к пище и воде на базе SPF вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета с соблюдением 12-часового дневного и ночного интервалов при температурном режиме от +22 до +24°C, относительной влажности в системе содержания от 50 до 65%.

После выведения животных из эксперимента передозировкой наркоза в возрасте 5,5 и 10 месяцев головной мозг был извлечен и фиксирован в растворе Карнуа (этиловый спирт 96%, хлороформ, ледяная уксусная кислота в пропорциях 6:3:1). В последующем, по стандартной методике изготавливались гистологические срезы толщиной 7-8 мкм, которые окрашивались Конго красным [2]. Микроскопия препаратов осуществлялась на микроскопе Nikon Eclipse Ti, оснащенным моторизованным столиком. Панорамная съемка в режиме флюоресценции TRITC среза мозга мыши производилась с объективом 10x в приложении NIS Elements AR версия 4.6 со сшивкой кадров в единое изображение, перекрытием 10% и автоматической постобработкой. Полученные изображения загружались в приложение QuPath (версия 0.5.1) [6], в котором проводилась детекция и анализ скоплений A β . Детекция объектов осуществлялась по порогу уровня яркости точки свечения амилоида относительно базовой яркости точки интактной ткани мозга. После автоматического выделения объектов проводился контроль с целью исключения некорректного выделения. С целью подтверждения повторяемости полученных результатов подсчеты также проводились вручную двумя независимыми исследователями.

Результаты и их обсуждение. В работе подтверждается, что использование трансгенных мышей сублинии APP^{swe}/PS1^{dE9}/B1g приводит к появлению выраженных скоплений амилоида в головном мозге [4].

Использование Конго красного в качестве красителя амилоида в настоящее время является общепринятым [3]. Автоматизированный подсчет при анализе полученных при исследованиях изображений осуществляется несколькими классическими методами, позволяющими с высокой повторяемостью дифференцировать объекты [5, 7]. Внешний вид приложения с идентифицированными скоплениями представлен на рис 1.

В работе установлено, что использование порога при детекции скопления A β в приложении QuPath достоверно не отличается от ручного подсчета, выполненного независимыми исследователями. Однако, использование данной методики позволяет не только выделять скопления амилоида, но и картировать их, предоставляя возможность для дальнейшего анализа их распределения.

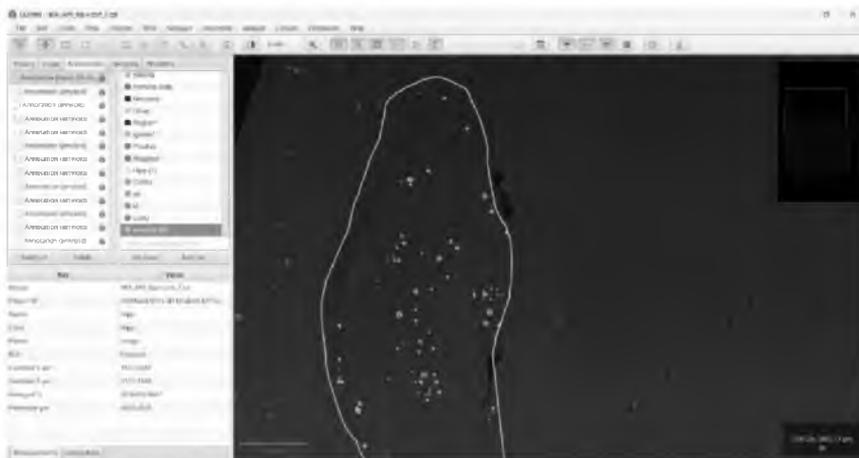


Рис. 1. Внешний вид приложения QuPath, в котором проведена детекция скопления амилоида гиппокампа мыши сублинии APP^{swE}/PS1dE9/Btg.

Заключение. Полученные данные позволяют рекомендовать данную методику для выявления, подсчета, анализа скопления амилоида β в тканях мозга, являющегося одним из ведущих факторов в развитии нейродегенерации.

Список источников

1. Амилоидная гипотеза болезни Альцгеймера: прошлое и настоящее, надежды и разочарования / И. В. Литвиненко, А. Ю. Емелин, В. Ю. Лобзин [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2019. – Т. 11, № 3. – С. 4-10. – DOI 10.14412/2074-2711-2019-3-4-10.
2. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – Санкт-Петербург : СпецЛит, 2010. – 95 с. – ISBN 978-5-299-00438-0.
3. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. / Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N. [et al.] // Amyloid, 2016. – No 23(4). – P. 209–213. – DOI 10.1080/13506129.2016.1257986.
4. APP^{swE}/PS1dE9/Btg Transgenic Mouse Line for Modeling Cerebral Amyloid Angiopathy Associated with Alzheimer's Disease / E. A. Lysikova, E. V. Kuzubova, A. I. Radchenko [et al.] // Molecular Biology. – 2023. – Vol. 57, No 1. – P. 74-82. – DOI 10.1134/s0026893323010077.
5. Methods For Nuclei Detection, Segmentation, and Classification in Digital Histopathology: A Review – Current Status and Future Potential / H. Irshad, A. Veillard, L. Roux [et al.] // IEEE Reviews in Biomedical Engineering. – 2014. – Vol. 7. – P. 97–114. – DOI: 10.1109/RBME.2013.2295804.
6. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, B. Loughrey, J.A. Fernandez [et al.] // Science Reports. – 2017. – No 1 (7). – P. 16878. – DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5.
7. Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis / S. Chen, Z. Mingzhu, W. Guang [et al.] // Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2012. – 101536. – DOI: 10.1155/2012/101536.
8. The amyloid-oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. / E.N. Cline, M.A. Bicca, K.L. Viola [et al.] // J Alzheimers Dis. – 2018. – Vol. 64(s1). – S567-S610.