

INCREASED ASTROCYTE REPRESENTATION IN THE HIPPOCAMPUS
OF 5XFAD MICEPOVEĆANJE ZASTUPLJENOSTI ASTROCITA U HIPOKAMPUSU
5XFAD MIŠEVAVioleta Jovanović¹, Jelica Despotović¹, Mario Balo¹, Ivan Zaletel^{1,2}, Sanja Despotović^{1,2}, Nela Puškaš^{1,2}¹Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija²Institut za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić", Beograd, Srbija

Correspondence: violeta13ema@gmail.com

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder, characterized by the formation of amyloid plaques and the neurofibrillary tangles in the brain of an ill person, leading to neuronal damage and loss. Activation of astrocytes and astrogliosis occurs along with this process. Due to ethical limitations in working with human tissue, numerous transgenic animal models have been developed to study the pathogenesis of these processes. Early A β deposition is observed in the cortex and the hippocampus.

Aim: This study aimed to determine the difference in the presence of GFAP positive cells in the hippocampus between transgenic 5xFAD mice aged 36 weeks and their corresponding controls.

Material and Methods: The 5xFAD mice model of Alzheimer's disease was used, characterized by early formation of amyloid plaques but without the presence of neurofibrillar tangles. Transgenic and control animals were sacrificed at 36 weeks of age. The visualization of GFAP-positive cells in the hippocampus of their brains was done by using immunohistochemistry and antibody for glial fibrillary acidic protein – GFAP, the major marker of astrocytes. Quantification of immuno-reactivity was done by using the Icy software system.

Results: There was a statistically significant difference in the expression of GFAP in the dentate gyrus and the granular zone of the hippocampus between the transgenic and control group at 36 weeks of age, while the significant change in the CA1-3 regions was not observed between investigated groups.

Conclusion: Obtained results confirm the involvement of astrogliosis in the pathophysiology of Alzheimer's disease and indicate an earlier occurrence of astrogliosis in the dentate gyrus and granular zone, in relation to other regions of the hippocampus, in the 36-week-old 5xFAD mice.

Keywords:Alzheimer's disease,
5xFAD,
hippocampus,
astrocytes,
GFAP

Sažetak

Uvod: Alchajmerova bolest je najčešće neurodegenerativno oboljenje, koje se karakteriše formiranjem amiloidnih plakova i neurofibrilarne klubadi u mozgu obolelih osoba, što dovodi do oštećenja i gubitka neurona. Uporedo sa ovim procesom dolazi do aktivacije astrocita i astroglioze. Zbog etičkih ograničenja u radu sa humanim tkivom, za proučavanje patogeneze navedenih procesa razvijeni su brojni transgeni animalni modeli. Strukture koje najranije bivaju zahvaćene promenama jesu korteks i hipokampus.

Cilj: Cilj rada je bio utvrditi da li postoji razlika u zastupljenosti astrocita u hipokampusu između transgenih 5xFAD miševa starosti 36 nedelja i odgovarajućih kontrolnih jedinki.

Materijali i metode: Za potrebe istraživanja korišćen je 5xFAD model Alchajmerove bolesti, koji se karakteriše ranim formiranjem amiloidnih plakova, ali bez formiranja neurofibrilarne klubadi. Transgena i kontrolna grupa životinja žrtvovane su u 36. nedelji, a vizualizacija astrocita u tkivu hipokampusa urađena je imunohistohemijskom metodom pomoću antitela na glijalni kiseli fibrilarni protein (GFAP). Kvantifikacija zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija rađena je korišćenjem *Icy* softvera.

Rezultati: Pokazana je statistički značajna razlika u prisustvu GFAP pozitivnih ćelija u dentatnom girusu i granularnoj zoni hipokampusa između transgene i kontrolne grupe životinja, dok u CA1-3 regionima nije zapažena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa.

Zaključak: Dobijeni rezultati jasno ukazuju na postojanje astroglioze, kao bitnog mehanizma u patogenezi Alchajmerove bolesti, kod 5xFAD miševa u 36. nedelji, ali i na raniju pojavu astroglioze u dentatnom girusu i granularnoj zoni u odnosu na ostale regione hipokampusa.

Ključne reči:

Alchajmerova bolest,
5xFAD,
hipokampus,
astrociti,
GFAP

Uvod

Alchajmerova bolest je vodeći neurodegenerativni poremećaj, progresivnog toka, koji se karakteriše prekomernim stvaranjem proteina amiloida beta (A β) i hiperfosforilisanih tau proteina, kao i oštećenjem i gubitkom neurona. Ekstracelularnim nagomilavanjem A β i agregacijom i hiperfosforilacijom tau proteina nastaju amiloidni (senilni) plakovi i taloži se neurofibrilarna klubad, čime se otvara mogućnost za posledični gubitak funkcije nervnih sinapsi i neurodegeneraciju (1). Gubitak neurona uzrokovao A β i tau patogeneza dovodi se u neraskidivu vezu sa kliničkim manifestacijama Alchajmerove bolesti, koje ukazuju na kognitivne poremećaje u centralnom nervnom sistemu (2). Struktura koja je prevashodno odgovorna za održavanje kognitivnih procesa u nervnom sistemu, posebno za očuvanje memorijskog sistema je hipokampus (3). Najveće izmene u strukturi mozga osoba obolelih od Alchajmerove bolesti zapažene su u medijalnom temporalnom režnju velikog mozga sa inicijalnim promenama u hipokampusu (4, 5).

Iz etičkih razloga nije moguće izvršiti biopsiju humanog mozga, tako da su za potrebe istraživanja patogeneze i potencijalne terapije ove bolesti razvijeni brojni animalni modeli. Jedan od najčešće korišćenih životinjskih modela u tu svrhu je transgena životinja - 5xFAD miš, koju karakteriše rano formiranje amiloidnih plakova, ali bez prisustva neurofibrilarne klubadi. Formiranje amiloidnih plakova u ovom modelu zapaženo je već u 8. nedelji života u subikulumu i petom sloju korteksa velikog mozga, dok je u hipokampusu vidljivo u 24. nedelji. Uporedo sa akumulacijom A β plakova u 8. nedelji počinje i astroglioza (6).

Astrociti su glija ćelije zvezdastog oblika, koje imaju važne uloge u održavanju funkcije centralnog nervnog sistema. Glavna uloga astrocita ogleda se u uticaju na sinaptičku transmisiju i informacione procese u neuronskim krugovima, kao i u izgradnji krvno-moždane barijere, obezbeđivanju nutrijenata nervnom tkivu i dr (7). Istraživanja su pokazala važnu funkciju astrocita u kognitivnim procesima, kao i u patogenezi neurodegenerativnih poremećaja sa razvojem demencije, poput Alchajmerove bolesti (8, 9). Dosadašnja saznanja ukazuju na dvostruku ulogu astrocita, koja je povezana sa amiloidnim plakovima. S jedne strane, reaktivni astrociti oslobađaju medijatore inflamacije i indukuju oksidativni stres, čime nastaje i deponuje se beta amiloid, formirajući plakove (10). S druge strane, astrocitna disfunkcija dovodi do gubitka mogućnosti odstranjivanja amiloida (11). Promene u broju i zastupljenosti astrocita kao odgovor na proizvodnju amiloida mogu se analizirati na osnovu ekspresije glavnog markera astrocita – glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) (12).

Uzevši u obzir sve navedeno, osnovni cilj rada bio je utvrditi da li postoji razlika u zastupljenosti astrocita, tj. GFAP pozitivnih ćelija u hipokampusu između 5xFAD miševa obolelih od Alchajmerove bolesti, starosti 36 nedelja i odgovarajućih kontrolnih netransgenih miševa.

Materijali i metode

Eksperimentalne životinje

U ovom istraživanju korišćeni su 5xFAD transgeni miševi (TG) koji predstavljaju transgeni model AB. U

pitanju su životinje sa ubačenom sekvencom genoma sa 5 mutacija, od toga tri mutacije na genima za humani amiloid- β prekursori protein (A β PP695): Švedski (K670N, M671L), Florida (I716V) i London (V717I) i dve mutacije na genu za humani presenilin 1 protein (PSEN1): M146L i L286V, koje dovode do prekomernog nakupljanja navedenih proteina koji formiraju amiloidne plakove. Životinje su čuvane u standardnim uslovima, sa *ad libitum* pristupom hrani i vodi. U istraživanje su bile uključene dve grupe životinja starosti 36 nedelja, šest 5xFAD mužjaka i šest mužjaka odgovarajućeg kontrolnog soja (engl. *wild-type*, WT).

Imunohistohemija

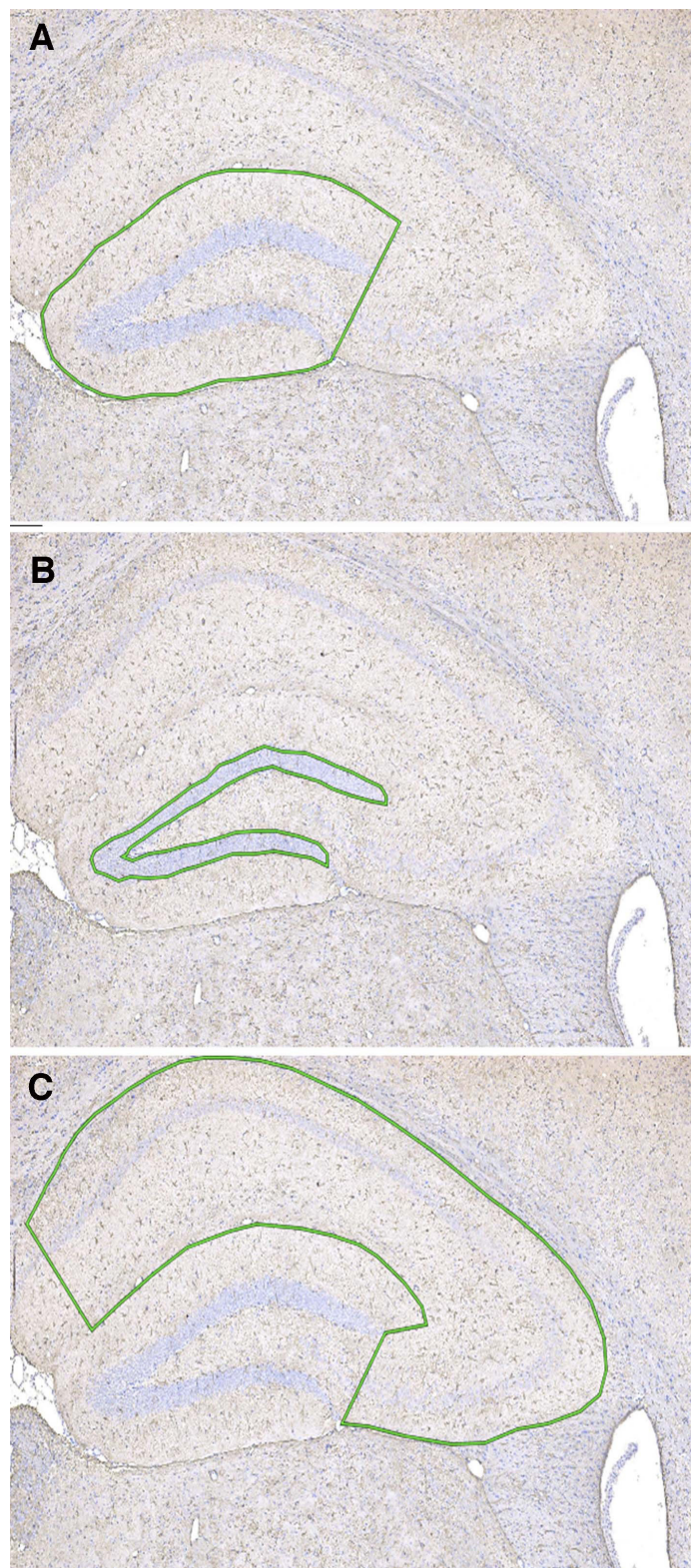
Mozgovi miševa su nakon žrtvovanja fiksirani u 4% pufersanom rastvoru paraformaldehida, standardno procesuirani i ukalupljeni u parafin. Nakon sečenja, koronalni preseki mozga, u nivou dorzalnog hipokampusa, debljine 5 μ m, deparafinirani su i rehidrirani, a demaskiranje antigena je izvršeno kuvanjem u citratnom puferu (pH = 6,0) u mikrotalasnoj peći (21 minut, 800 W). Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3% rastvorom vodonik-peroksida (3% H₂O₂). Preseci su potom inkubirani tokom 1h u normalnom kozjem serumu, a preko noći u zečjem poliklonskom anti-GFAP antitelu (1:500, Dako) na sobnoj temperaturi. Isečci su potom inkubirani 1h u biotiniziranom anti-zečjem sekundarnom antitelu, a zatim i u ABC kompleksu. Vizualizacija imunoreaktivnih mesta urađena je korišćenjem 3,3'-diaminobenzidin-hromogena (DAB). Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilinom, dehidrirani, prosvetljeni u ksilolu i pokriveni odgovarajućim medijumom (DPX) i pokrovnim staklima. Fotografisanje obojenih preseka hipokampusa urađeno je na Leica DM4000 B LED mikroskopu sa digitalnom kamerom Leica DFC295 pomoću *Leica Application Suite* (LAS, 4.4.0) softverskog sistema, uz korišćenje opcije *multistep*, na uveličanju 200x, kako bi bio obuhvaćen ceo hipokampus.

Kvantifikacija imunoreaktivnih ćelija

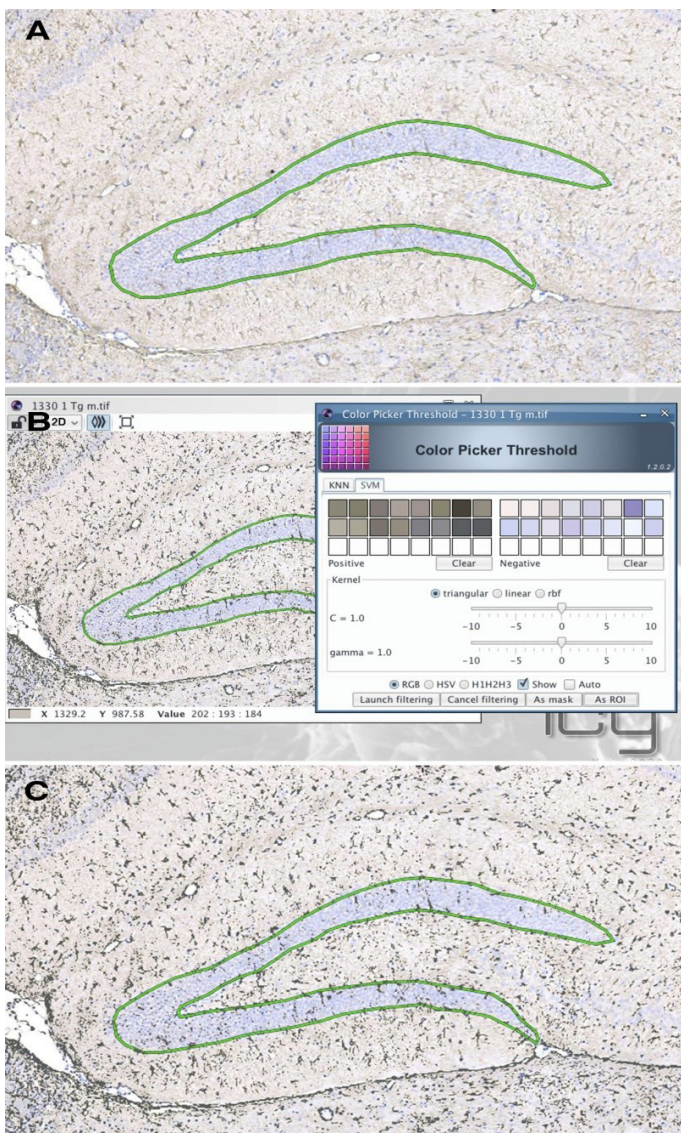
Zastupljenost GFAP pozitivnih ćelija na svakom preseku hipokampusa određivana je korišćenjem *Color Picker Threshold Plugin*-a u sklopu *Icy* softvera u 3 regiona: celom dentatnom girusu, granularnom sloju dentatnog girusa i u CA1-3 regionima hipokampusa (**slika 1**).

U *Color Picker Threshold Plugin*-u označene su: „pozitivne“ boje, tj. nekoliko nijansi braon boje (reprezentuju GFAP pozitivne ćelije bojene DAB-om), i „negativne“ boje, tj. plava, bela i svetlo braon (predstavljaju nukleuse kontrastirane hematoksilinom, obezbojeno tkivo i svetlo nespecifično obojenu pozadinu) (**slika 2**).

Na osnovu pravilnog odabira „pozitivnih“ i „negativnih“ boja program meri površinu prekrivenu „pozitivnim“ bojama, koja u ovom slučaju predstavlja površinu pokrivenu GFAP pozitivnim ćelijama. Zastupljenost GFAP pozitivnih ćelija izražena je relativnim odnosom između površine koju zauzimaju GFAP pozitivne ćelije i površine celih regiona od interesa (dentatnog girusa, granularnog sloja dentatnog girusa i CA1-3 regiona hipokampusa).



Slika 1. Koronalni presek hipokampusa miša starosti 36 nedelja. Slike redom prikazuju ispitivane regione hipokampusa: dentatni girus (A), granularnu zonu (B) i CA1-3 regione (C). Ukupno uveličanje 200x.

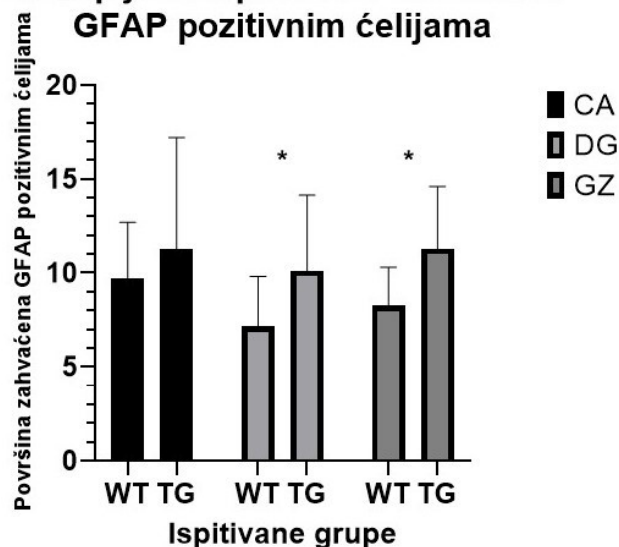


Slika 2. Koraci u obradi slike za potrebe kvantitativne analize ekspresije GFAP-a. Selektovana granularna zona dentatnog girusa pre (A) i nakon (C) obeležavanja GFAP pozitivnih ćelija izdvajanjem „pozitivnih” i „negativnih” boja. Deo granularnog sloja dentatnog girusa u hipokampusu sa GFAP ćelijama prepoznatih pomoću *Color Picker Threshold Plugin-a* (B).

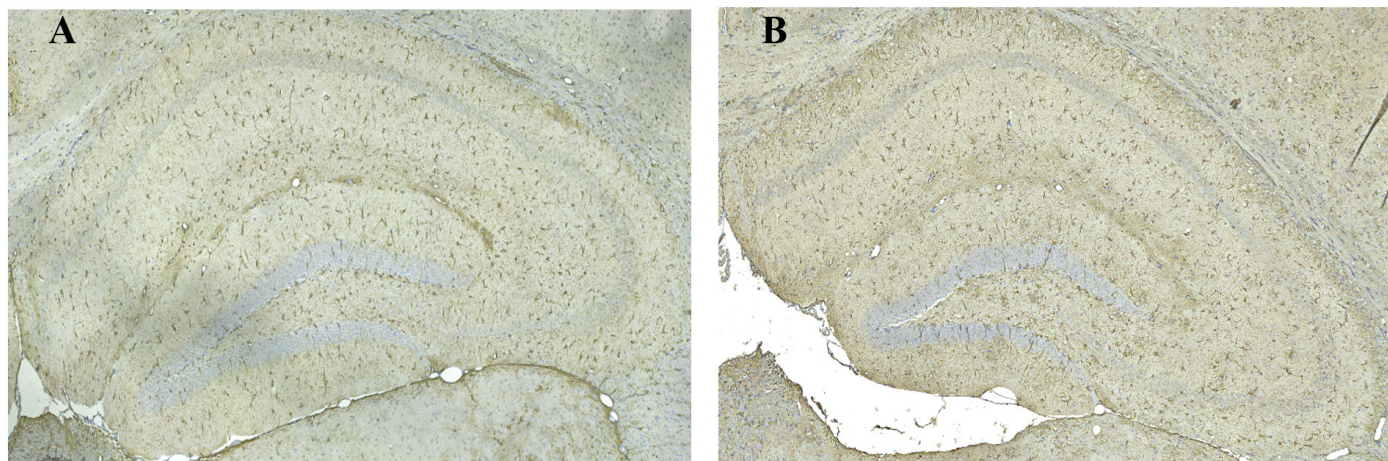
Rezultati

Poređenjem dobijenih vrednosti površine koju pokrivaju astrociti, tj. GFAP pozitivne ćelije u hipokampusu 5xFAD miševa starosti 36 nedelja i kontrolnih životinja pokazano je da postoji statistički značajno povećanje zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija (%) u transgennoj grupi u odnosu na WT grupu u predelu dentatnog girusa hipokampusu ($t = 2,127, p < 0,05$) i granularnog sloja hipokampusu ($t = 2,510, p < 0,05$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija kod transgene u odnosu na WT grupu u predelu CA1-3 regiona hipokampusu ($p = 0,468$) (**grafikon 1, slika 3**).

Zastupljenost površine zahvaćene GFAP pozitivnim ćelijama



Grafikon 1. Zastupljenost (izražena u procentima ili relativna zastupljenost) površine zahvaćene GFAP pozitivnim ćelijama u različitim regionima hipokampusu. Statistički značajna razlika zabeležena je između transgene i kontrolne grupe miševa u granularnoj zoni i dentatnom girusu hipokampusu (* označava $p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao medijana i standardna devijacija. Skraćenice: CA - CA1-3 regioni hipokampusu; DG - dentatni girus; GZ - granularna zona dentatnog girusa; TG - transgena životinja; WT - *wild-type*, kontrolne životinje.



Slika 3. Reprezentativne slike ekspresije GFAP u hipokampusu kontrolne (A) i transgene (B) životinje. Uveličanje x200.

Diskusija

Dobijeni rezultati pokazuju povećano prisustvo GFAP pozitivnih ćelija u dentatnom girusu i granularnoj zoni hipokampusa, dok u CA1-3 regionima nije primećena značajna promena u zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija između dve testirane uzrasne grupe. Ovi rezultati ukazuju na raniji razvoj glioze upravo u dentatnom girusu i granularnoj zoni hipokampusa.

U dostupnoj literaturi nema podataka o zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija kod transgenih 5xFAD miševa starosti 36 nedelja, niti odnosa zastupljenosti astrocita između TG i WT životinja. Žirar (*Giarard*) i saradnici su, međutim, na ovom eksperimentalnom modelu ustanovili progresivni porast broja reaktivnih astrocita obeleženih GFAP-om kod miševa starosti 24 nedelje u odnosu na one starosti 16 ($p < 0,01$) ili 8 nedelja ($p < 0,05$) kako u dentatnom girusu, tako i u CA1 i CA3 regionima hipokampusa (13). Ovi rezultati, tj. opisani trend promena poklapaju se sa našim rezultatima u dentatnom girusu i granularnoj zoni dentatnog girusa, međutim, rezultati u CA1-3 ne prate navedeni trend. Razlika u nalazima se može objasniti različitim metodološkim pristupom i različitim osetljivošću primenjenih metoda analize zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija. Prethodne studije na drugim transgenim modelima životinja obolelih od Alchajmerove bolesti takođe su pokazale astrogliozu u tkivu mozga. Značajnu razliku u ekspresiji GFAP-a našli su Olsena i saradnici kod 16 meseci starih APPArcSwe miševa u odnosu na odgovarajuće WT grupe ($p < 0,001$), kao i kod 12 meseci starih APPArcSwe miševa u odnosu na odgovarajuće WT grupe ($p < 0,01$) (12). Formiranje amiloidnih plakova, kao i astrogljoza koja dokazano prati tu pojavu u APPArcSwe transgenom mišu započinje u periodu od 5. do 6. meseca i dešava se u hipokampusu, ali i u moždanom korteksu i talamusu (14). Iako se ovde ispitivani model životinje razlikuje od onog koji je bio uključen u naše istraživanje, značajan je podatak da postoji identičan trend razvoja astrogljoze u hipokampusu transgenih miševa ovih uzrasnih grupa. Pored formiranja plakova i propadanja neurona, astrogljoza se može povezati i sa smanjenim obimom adultne neurogeneze u dentatnom girusu. Istraživanja novijeg datuma pokazuju da se pad u ekspresiji markera neurogeneze u dentatnom girusu može detektovati kod 5xFAD mužjaka već u 8. nedelji starosti (15).

Poznato je da gliozna doprinosi napredovanju Alchajmerove bolesti (8,9). Hong i saradnici su uz pomoć kvantitativne proteomske analize, rađene u hipokampusu transgenih 5xFAD miševa starosti 4 meseca i u odgovarajućoj kontrolnoj grupi pokazali porast proteina koji se eksprimiraju u glija ćelijama i učestvuju u patogenezi Alchajmerove bolesti (16). Iako se amiloidni plakovi ne otkrivaju lako u hipokampusu miševa ovog uzrasta, među ostalim proteinima nađena je i povećana ekspresija GFAP-a, što sugerise da gliozna može delimično i da prethodi formiranju plaka.

Zaključak

Bazirano na prethodnim studijama, kao i na rezultatima našeg istraživanja, možemo zaključiti da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti GFAP pozitivnih ćelija između transgene i kontrolne grupe miševa korišćenih u studijama o Alchajmerovoj bolesti. Dobijeni rezultati svedoče o povećanom prisustvu GFAP pozitivnih ćelija u dentatnom girusu i granularnoj zoni hipokampusa transgenih 5xFAD miševa, starosti 36 nedelja. Uzimajući u obzir sve navedeno, ovom studijom je dodatno potvrđeno da je astrocitni odgovor na formiranje amiloidnih plakova u mozgu, koji je prikazan kroz povećanu ekspresiju glavnog astrocitnog markera – GFAP-a, jako bitan u patogenezi Alchajmerove bolesti, ali i da navedeni metodološki pristup ukazuje na veću osetljivost dentatnog girusa u odnosu na preostale regione hipokampusa kod 5xFAD miševa.

Literatura

1. Forny-Germano L, Lyra e Silva NM, Batista AF, Brito-Moreira J, Gralle M, Boehnke SE et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates. *J Neurosci.* 2014;34(41):13629-43.
2. Zhiyou C, Cheng-Qun W, Zhou L. Astrocyte and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 2017;267:2068-74.
3. Voss JL, Bridge DJ, Cohen NJ, Walker JA. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn Sci.* 2017;21:577-88.
4. Schott JM, Fox NC, Frost C, Scahill RI, Janssen JC, Chan D et al. Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2003;87:181-8.
5. Moodley KK, Chan D. The hippocampus in neurodegenerative disease. *Front Neurol Neurosci.* 2014;44:95-108.
6. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;34(41):10129-40.
7. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
8. Jo WK, Law AC, Chung SK. Neglected co-star in the dementia drama: the putative roles of astrocytes in the pathogenesis of major neurodegenerative disorders. *Mol Psychiatry.* 2014;19(2):159-67.
9. Mancardi GL, Liwniez BH, Mandybur TI. Fibrous astrocytes in Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer's type. *Acta Neuropathol.* 1983;61(1):76-80.
10. Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankovsky JL, Zheng H. Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse models of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2016;34(41):577-89.
11. Liu RX, Huang C, Bennett DA, Li H, Wang R. The characteristics of astrocyte on A clearance altered in Alzheimer's disease were reversed by an anti-inflammatory agent (+)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeate. *Am J Transl Res.* 2016;8(10):4082-94.
12. Olsen M, Aguilar X, Sehlin D, Fang XT, Antoni G, Erlandsson A et al. Astroglial Responses to Amyloid-Beta Progression in a Mouse Model of Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(4):605-14.
13. Giarard SD, Jackuet M, Baranger K, Migliorati M, Escoffier G, Bernard A et al. Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5xFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus.* 2014;24:762-72.

14. Lord A, Kalimo H, Eckman C, Zhang XQ, Lannfelt L, Nilsson LN. The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal Abeta aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2006;27(1):67-77.
15. Zaletel I, Schwirtlich M, Perović M, Jovanović M, Stevanović M, Kanazir S et al. Early Impairments of Hippocampal Neurogenesis in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease Are Associated with Altered Expression of SOXB Transcription Factors. *J Alzheimers Dis*. 2018;65(3):963-76.
16. Hong I, Kang T, Yoo Y, Park R, Lee J, Lee S et al. Quantitative Proteomic Analysis of the Hippocampus in the 5xFAD Mouse Model at Early Stages of Alzheimer's Disease Pathology. *J Alzheimers Dis*. 2014;36(2):321-34.