

ILEAL MUCOSAL EPITHELIAL CELL PROLIFERATION IN OLD MICE AND IN MICE WITH ALZHEIMER'S DISEASE

PROLIFERACIJA EPITELNIH ČELIJA SLUZOKOŽE ILEUMA KOD STARIH MIŠEVA I KOD MIŠEVA SA ALCHAJMEROVOM BOLEŠĆU

Jovana Dinić¹, Isidora Đorđević¹, David Vuković¹, Nela Puškaš²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju „Prof. dr Aleksandar Đ. Kostić”, Beograd, Srbija

Correspondence: jovana.dinic02@gmail.com

Abstract

Introduction: The epithelial cell layer of the gastrointestinal tract (GIT) undergoes constant renewal initiated by the proliferation of cells in the crypts of Lieberkuhn. Changes in GIT function are often seen in elderly patients and patients with neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease. The proliferation rate of cells in the crypts of the small intestine has been shown to change with aging. Still, there are no studies investigating such changes in patients with Alzheimer's in the available literature. Nuclear protein Ki-67 can be used as a reliable marker for monitoring cells in proliferation.

Aim: This study aimed to analyze the proliferation of epithelial cells in the crypts of the ileum of old mice, and in transgenic 5xFAD mice by monitoring the expression of Ki-67 protein.

Material and methods: Transgenic 5xFAD mice were used as a model of Alzheimer's disease, and non-transgenic mice were used as a control group. The ileum was taken after sacrificing 8- and 36-week-old males. Visualization of Ki-67-positive cells in the crypts was demonstrated immunohistochemically, using antibodies to the Ki-67 protein. Measurements of the crypt's perimeter and Ki-67-positive cells were evaluated on histological images at a total magnification of 400x using Leica Application Suite 4.4.0 software. The obtained values were analyzed using the ANOVA statistical test.

Results: In the group of 8-week-old transgenic mice, a highly statistically significant decrease in the perimeter of longitudinally sectioned Lieberkuhn crypts' was shown, compared to the control group. A highly statistically significant reduction in the number of Ki-67-positive cells per 100 µm of the perimeter length was demonstrated in the group of 36-week-old transgenic mice compared to both the corresponding control group and younger transgenic animals.

Conclusion: The results of this study indicate that the 5xFAD genotype significantly affects the perimeter of longitudinally sectioned Lieberkuhn crypt in younger mice, already at the moment of amyloid plaques accumulation in the subiculum and deep cortical layers, and before the appearance of the first symptoms, while the proliferative capacity of the ileum epithelium has an effect only over a longer period, i.e. in older mice.

Keywords:

Alzheimer's disease,
5xFAD,
old mice,
ileum mucosa,
Ki-67

Sažetak

Uvod: Epitelni sloj ćelija gastrointestinalnog trakta (GIT) podleže stalnom obnavljanju koje je pokrenuto proliferacijom ćelija u bazi Liberkinovih kripti. Promene u funkciji GIT-a često se ispoljavaju kod starijih pacijenata i kod pacijenata sa neurodegenerativnim oboljenjima, poput Alchajmerove bolesti. Pokazano je da sa starenjem dolazi do promena u proliferaciji ćelija u kriptama tankog creva, ali ispitivanja koja se bave ovim promenama kod obolelih od Alchajmera, prema našim saznanjima, nema u dostupnoj literaturi. Kao pouzdan marker za praćenje ćelija u proliferaciji može se koristiti jedarni protein Ki-67.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je analiza proliferacije epitelnih ćelija u kriptama ileuma starih miševa i kod transgenih 5xFAD miševa praćenjem ekspresije Ki-67 proteina.

Materijal i metode: Transgeni 5xFAD miševi korišćeni su kao model Alchajmerove bolesti, a netransgeni miševi kao kontrolna grupa. Ileum je uzet nakon žrtvovanja mužjaka starosti 8 i 36 nedelja. Vizualizacija Ki-67-pozitivnih ćelija u kriptama pokazana je imunohistohemijski, primenom antitela na Ki-67 protein. Merenje obima kripti i Ki-67-pozitivnih ćelija vršeno je na slikama histoloških preparata na ukupnom uveličanju 400x pomoću softvera *Leica Application Suite 4.4.0*. Dobijene vrednosti analizirane su pomoću ANOVA statističkog testa.

Rezultati: Pokazano je visoko statistički značajno smanjenje obima uzdužno presečenih Liberkinovih kripti u grupi transgenih miševa starosti 8 nedelja u odnosu na kontrolnu grupu i visoko statistički značajno smanjenje broja Ki-67-pozitivnih ćelija na 100 µm dužine obima u grupi transgenih miševa starosti 36 nedelja u odnosu na odgovarajuću kontrolu i mlađe transgene životinje.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da 5xFAD genotip značajno utiče na obim uzdužno presečenih Liberkinovih kripti kod mlađih jedinki, tj. već u trenutku započinjanja akumulacije amiloidnih plakova u subikulumu i dubokim kortikalnim slojevima, a pre pojave prvih simptoma, dok na proliferativni kapacitet epitela ileuma ima uticaja u kasnijim fazama života, tj. kod starijih jedinki.

Ključne reči:

Alchajmerova bolest,
5xFAD,
stari miševi,
sluzokoža ileuma,
Ki-67

Uvod

Gastrointestinalni trakt (GIT) je veoma dinamičan organski sistem, što mu omogućava brzu adaptaciju na promene životne sredine i ishrane. Epitelni sloj ćelija sluzokože creva, koji je u direktnom kontaktu sa sadržajem u lumen, kontinuirano podleže obnavljanju. To podrazumeva proliferaciju ćelija u Liberkinovim kriptama, diferencijaciju u nekoliko podtipova ćelija, migraciju do vrha crevnih resica, apoptozu i, konačno, njihovu deskvacijaciju u lumen creva (1). Regulacija ovih procesa neophodna je za održavanje tkivne homeostaze. Pokazano je da je proliferacija matičnih ćelija u Liberkinovim kriptama tankog creva primarni pokretač za migraciju ćelija ka resicama i duž njih (2). Nalaparedi (*Nalapareddy*) i saradnici su pokazali da sa starenjem dolazi do promena u kriptama tankog creva, arhitekturi resica, kao i proliferaciji ćelija u kriptama (3). Morfološke promene sluzokože digestivne cevi se direktno odražavaju i na njene funkcionalne karakteristike.

Osim sa starenjem, promene u funkciji GIT-a često se ispoljavaju i kod pacijenata sa neurodegenerativnim oboljenjima, uključujući i Alchajmerovu bolest (AB), koja predstavlja progresivni neurodegenerativni poremećaj centralnog nervnog sistema, praćen postepenim padom kognitivnih sposobnosti (4). Tokom poslednjih decenija naša saznanja o patogenezi AB znatno su napredovala. Pored toga, pokazana je i veza između demencije i niza poremećaja u GIT-u, poput gastroezofagusne refluksne

bolesti, peptičkog ulkusa, divertikuloze i sindroma iritabilnog creva (5). Ekspresija prekursora amiloida β, karakterističnog za AB dokazana je u enteričkom nervnom sistemu (6) i intestinalnim epitelnim ćelijama (7). Međutim, mehanizmi koji se nalaze u osnovi njihovih odnosa još uvek nisu dovoljno razjašnjeni (8-10). Pored toga, u dostupnoj literaturi nema podataka o istraživanjima proliferacije epitelnih ćelija tankog creva kod obolelih od Alchajmerove bolesti.

Za detekciju ćelija u proliferaciji, inače, može se koristiti protein Ki-67, koji je eksprimiran isključivo u jedrima ćelija u deobi - tj. u G1, S, G2 ili M-fazi ćelijskog ciklusa. Mada je protein Ki-67 dobro okarakterisan na molekularnom nivou i u velikoj meri se koristi kao marker proliferacije, njegova funkcionalna uloga u deobi ćelija i dalje je nejasna (11).

Eticka ograničenja u radu sa humanim materijalom jedan su od glavnih razloga za korišćenje životinja u istraživanjima. Za potrebe proučavanja patogeneze Alchajmerove bolesti razvijen je veliki broj modela transgenih miševa, a jedan od često korišćenih je 5xFAD (engl. *Familiar Alzheimer Disease* - FAD). Ovaj model karakteriše se ubačenom sekvencom genoma sa 5 mutacija u genom miševa, od čega su tri na genima za humani amiloid β prekursori protein (AβPP695): Švedski (K670N, M671L), Florida (I716V) i London (V717I) i dve mutacije na genu za humani presenilin 1 protein (PSEN1): M146L i L286V. Navedene promene u genomu dovode do prekomernog nakupljanja proteina koji vrlo rano formiraju amiloidne

plakove u subikulumu i dubokim kortikalnim slojevima, već u 2. mesecu, dok se prvi simptomi pojavljuju između 4. i 6. meseca života. Upravo iz tog razloga predstavlja vrlo pogodan model za proučavanje patogeneze AB i za druga, prateća istraživanja (12).

Cilj ovog rada bio je analiza proliferacije epitelnih ćelija u Liberkinovim kriptama ileuma miševa kod starijih životinja, kao i transgenih 5xFAD miševa, praćenjem ekspresije Ki-67 proteina.

Materijal i metode

Etička dozvola

Protokol eksperimenta je odobren od strane Etičke komisije za korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Eksperiment je sproveden u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe (13).

Eksperimentalne životinje

Za potrebe istraživanja korišćeni su transgeni 5xFAD miševi (TG) i kontrolni netransgeni miševi (neTG).

Životinje su čuvane u standardnim uslovima, sa ciklusom 12/12 h svetlo/tama i ad libitum pristupom hrani i vodi. Korišćeni su mužjaci starosti 8 i 36 nedelja. Formirane su 4 grupe životinja ($n = 6$ po grupi): netransgeni miševi starosti 8 nedelja - neTG8, netransgeni miševi starosti 36 nedelja - neTG36, transgeni miševi starosti 8 nedelja - TG8 i transgeni miševi starosti 36 nedelja - TG36.

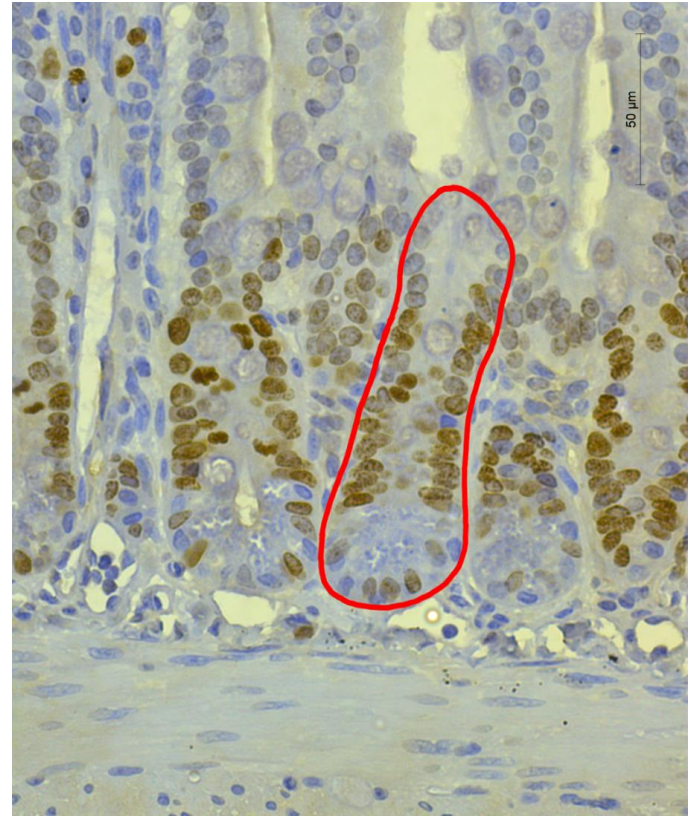
Imunohistohemija

Nakon žrtvovanja životinja ileum je izvađen i ispran fiziološkim rastvorom, kako bi se uklonio zaostali sadržaj. Uzimana su dva isečka iz segmenta između Pajerovih ploča. Uzorci si fiksirani u 10% puferisanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Korišćeni su poprečni preseki proksimalnog i distalnog segmenta ileuma debljine 4 μm .

Posle deparafinizacije i rehidratacije preseka u opadajućim koncentracijama alkohola izvršeno je demaskiranje antigena u citratnom puferu (pH 6,0) u mikrotalasnoj pećnici (20 min na 800 W). Blokada aktivnosti endogene peroksidaze je urađena inkubacijom preseka u 3% rastvoru vodonik-peroksida (H_2O_2) tokom 10 min, a blokada nespecifične imunoreaktivnosti inkubacijom u normalnom kozjem serumu tokom 1 h. Pločice su potom inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi sa zečjim poliklonskim anti-Ki-67 antitelom (1:3500, ab 1558, *Abcam*). Nakon toga, preseci su inkubirani biotiniranim anti-zečjim sekundarnim antitelom tokom 1 h, nakon čega je usledila inkubacija u avidin-biotin kompleksu sa peroksidazom rena, takođe u trajanju od 1 h. Između inkubacija preseci su ispirani u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,36). Za vizualizaciju imunoreaktivnih mesta korišćen je 3,3'-diaminobenzidin (DAB). Preseci su kontrastirani Majerovim hematoksilom, dehidrirani, prosvetljeni u ksilolu i pokriveni odgovarajućim medijumom (DPX).

Semikvantitativna analiza

Preseci su fotografisani uz pomoć *Leica DM4000 B LED* mikroskopa sa digitalnom kamerom *Leica DFC295*, a merenja su vršena pomoću softvera *Leica Application Suite 4.4.0*, na ukupnom uveličanju 400x. Na svakom preseku analizirano je po 10 kripti na jasno vidljivom uzdužnom preseku (**slika 1**). Meren je njihov obim i brojane su Ki-67-pozitivne ćelije duž obima izmerenih kripti.



Slika 1. Ileum netransgenog miša starosti 8 nedelja

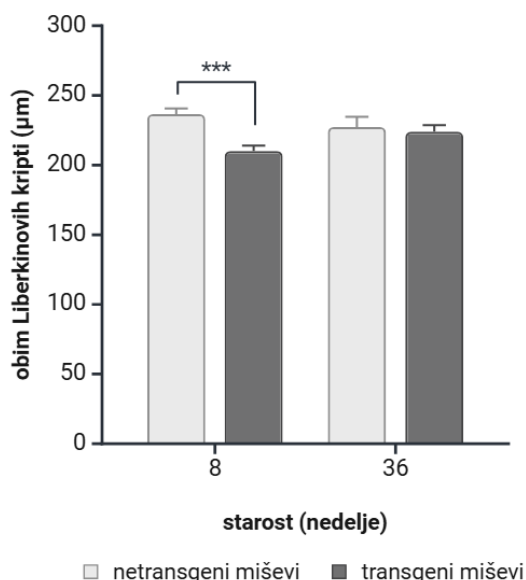
Crvenom bojom obeležen je obim uzdužno presečene Liberkinove kripe. Ukupno uveličanje 400x

Statistička analiza

Normalnost raspodele dobijenih podataka po grupama potvrđena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Korišćen je ANOVA test za ispitivanje međugrupnih razlika, a statistički značajnim razlikama smatrane su vrednosti $p < 0,05$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška. Broj Ki-67-pozitivnih ćelija izražen je na 100 μm dužine obima uzdužno presečene Liberkinove kripe.

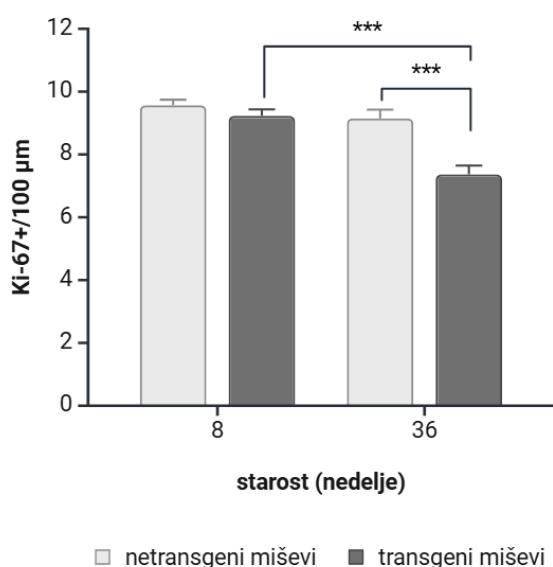
Rezultati

Najveći obim Liberkinovih kripti izmeren je u grupi neTG8 i iznosio je $236,62 \pm 4,02 \mu\text{m}$. U grupi transgenih miševa iste starosti (TG8) izmeren je visoko statistički značajno manji obim ($p < 0,001$) od $210,07 \pm 3,95 \mu\text{m}$. Vrednosti izmerene u grupama neTG36 ($227,32 \pm 7,36 \mu\text{m}$) i TG36 ($223,97 \pm 4,59 \mu\text{m}$) nisu se statistički razlikovale i nisu pokazivale statistički značajne razlike u odnosu na neTG8 i TG8 grupe (**grafikon 1**).



Grafikon 1. Obim uzdužno presečenih Liberkinovih kripti (μm)
Statistička značajnost *** $p < 0,001$

Broj Ki-67-pozitivnih ćelija na 100 μm dužine obima Liberkinovih kripti takođe je bio najveći u grupi neTG8 ($9,57 \pm 0,18$ μm). U grupi TG36 ($7,37 \pm 0,28$ μm) primenjeno je visoko statistički značajno smanjenje ($p < 0,001$) u odnosu na grupe TG8 ($9,23 \pm 0,20$ μm) i neTG36 ($9,15 \pm 0,28$ μm) (**grafikon 2**).



Grafikon 2. Broj Ki-67-pozitivnih ćelija (Ki-67+) na 100 μm obima uzdužno presečenih Liberkinovih kripti
Statistička značajnost *** $p < 0,001$

Diskusija

Rezultati merenja obima uzdužno presečenih Liberkinovih kripti pokazuju da je visoko statistički značajno manji obim kod transgenih 5xFAD miševa starosti 8 nedelja u odnosu na kontrolnu grupu miševa. Nije pokazano statistički značajno smanjenje obima u grupi TG36 u odnosu na odgovarajuću kontrolu, kao ni kod starijih

miševa u odnosu na mlađe. Ovo je delimično u saglasnosti sa studijom Karija (*Karri*) i saradnika (14), koji su pokazali da dolazi do smanjenja dubine kripti u zidu tankog creva transgenih APPSWE miševa sa Alchajmerovom bolešću starosti 12 do 15 nedelja u odnosu na kontrolnu grupu miševa. Prethodno je takođe pokazano da u proksimalnom i distalnom segmentu tankog creva miševa dolazi do povećanja dubine i širine kripti kod starijih miševa soja C57BL/6 (3).

U prethodnom istraživanju (15), na istim životinjama, pokazano je statistički značajno smanjenje dubine kripti u grupi TG8 u odnosu na neTG8, što je u skladu sa dobijenim rezultatima ove studije. S druge strane, u prethodnoj studiji je dobijeno i značajno smanjenje dubine kripti u neTG36 u odnosu na neTG8 (15). Izmereni obimi i u ovoj studiji pokazuju identičan trend promena, ali ne pokazuju statističku značajnost. Ovo se može donekle objasniti različitim morfometrijskim pristupom, merenjem obima uzdužno presečenih Liberkinovih kripti umesto merenja dubine, koji je korišćen zbog drugog analiziranog parametra, broja Ki-67-pozitivnih ćelija na 100 μm dužine obima.

Broj ćelija u proliferaciji na 100 μm dužine obima bio je visoko statistički značajno manji u grupi starijih transgenih miševa u odnosu na odgovarajuću kontrolu, kao i u odnosu na mlađe transgene miševe. Studija Pentimikoa (*Pentinmikko*) i saradnika sugerise da kriptu starijih miševa (24+ meseca vs. mladi starosti 3 - 9 meseci) imaju manji broj matičnih ćelija, kao i izvesne promene u signalnim putevima koje zajedno doprinose smanjenom regenerativnom potencijalu tokom starenja intestinalnog epitela (16). Prethodno je pokazano da dolazi do smanjenja broja ćelija u mitozu u kripti tankog creva (korišćenjem pHH3 antite-la) kod starijih (starosti 18 - 22 meseca) u odnosu na mlađe miševe (starosti 2 - 4 meseca) (3). S obzirom na veću razliku u uzrastu ispitivanih životinja, ovo bi moglo značiti da genotip 5xFAD indukuje promene u Liberkinovim kriptama slične onima koje se dešavaju tokom starenja.

Zaključak

Ova studija pruža morfometrijske podatke o obimu uzdužno presečenih Liberkinovih kripti i broju ćelija u proliferaciji u Liberkinovim kriptama ileuma starih miševa i prve ovakve morfometrijske podatke kod miševa sa Alchajmerovom bolešću. Iako ovo istraživanje nije dovoljno da objasni kompleksne promene u digestivnom traktu kod obolelih od AB, možemo zaključiti da 5xFAD genotip značajno utiče na obim Liberkinovih kripti kod mladih jedinki, tj. već u trenutku akumulacije amiloidnih plakova u subikulumu i dubokim kortikalnim slojevima, a pre pojave prvih simptoma, dok na proliferativni kapacitet epitela ileuma ima uticaja u kasnijim fazama života, tj. kod starijih jedinki.

Zahvalnica

Istraživanje je podržano sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, projekat br. 451-03-66/2024-03/200110.

Literatura

1. Creamer B, Shorter RG, Bamforth J. The turnover and shedding of epithelial cells. Part I. The turnover in the gastro-intestinal tract. *Gut*. 1961; 2(2):110-8.
2. Parker A, Maclaren OJ, Fletcher AG, Muraro D, Kreuzaler PA, Byrne HM, et al. Cell proliferation within small intestinal crypts is the principal driving force for cell migration on villi. *FASEB Journal*. 2017; 31(2):636-49.
3. Nalapareddy K, Nattamai KJ, Kumar RS, Karns R, Wikenheiser-Brokamp KA, Sampson LL, et al. Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells. *Cell Rep*. 2017; 18(11):2608-21.
4. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019; 179(2):312-39.
5. Adewuyi EO, O'Brien EK, Nyholt DR, Porter T, Laws SM. A large-scale genome-wide cross-trait analysis reveals shared genetic architecture between Alzheimer's disease and gastrointestinal tract disorders. *Commun Biol*. 2022; 5(1):691.
6. Semar S, Klotz M, Letiembre M, van Ginneken C, Braun A, Jost V, et al. Changes of the enteric nervous system in amyloid- β protein precursor transgenic mice correlate with disease progression. *J Alzheimers Dis*. 2013; 36(1):7-20.
7. Puig KL, Manocha GD, Combs CK. Amyloid Precursor Protein Mediated Changes in Intestinal Epithelial Phenotype In Vitro. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0119534.
8. Singh A, Dawson TM, Kulkarni S. Neurodegenerative disorders and gut-brain interactions. *J Clin Invest*. 2021; 131(13):e143775.
9. Adewuyi EO, O'Brien EK, Porter T, Laws SM. Relationship of Cognition and Alzheimer's Disease with Gastrointestinal Tract Disorders: A Large-Scale Genetic Overlap and Mendelian Randomisation Analysis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(24):16199.
10. Liu S, Gao J, Zhu M, Liu K, Zhang HL. Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer's Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(12):5026-43.
11. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(3):311-22.
12. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal β -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; 26(40):10129-40.
13. Council of Europe. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Vol. L 276, Official Journal of the European Union. 2010. Cited 2024 Nov 14. p. 33-79. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>
14. Karri S, Acosta-Martinez V, Coimbatore G. Effect of dihydrotestosterone on gastrointestinal tract of male Alzheimer's disease transgenic mice. *Indian J Exp Biol*. 2010; 48(5):453-65.
15. Dinić J, Puškaš N. Promene morfoloških karakteristika ileuma miševa povezane sa starenjem i Alchajmerovom bolešću. 61 kongres studenata biomedicinskih nauka Srbije, Kopaonik, Srbija, 25-29. april 2022. Knjiga sažetaka: p805.
16. Pentimikko N, Iqbal S, Mana M, Andersson S, Cagnetta AB, Suci RM, et al. Notum produced by Paneth cells attenuates regeneration of aged intestinal epithelium. *Nature*. 2019; 571(7765):398-402.