

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ВАЛИДИЗАЦИЯ С
ПОМОЩЬЮ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТОВ НА ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 «Биология»
Биологического факультета
Грибановой Маргариты Алексеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Е. И. Саранцева

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук

О. В. Семячкина-Глушковская

Введение. Болезнь Альцгеймера (БА) остаётся одной из наиболее распространённых и серьёзных неврологических заболеваний в мире, вызывающее необратимые нарушения в структуре головного мозга. БА характеризуется прогрессирующей утратой когнитивных функций таких как: долгосрочная и краткосрочная память, логическое мышление, ориентация в пространстве. Это приводит к значительному ухудшению качества жизни людей, что подверглись данному заболеванию. С каждым годом она становится более актуальной в связи увеличением средней продолжительности жизни населения.

Одним из ключевых направлений в исследовании БА является моделирование заболевания на лабораторных животных. Это способствует детальному изучению патологических процессов развития БА, а также на основе моделей тестируются новые методы диагностики и лечения.

Для проверки эффективности и достоверности моделей БА необходимо проведение валидации с помощью поведенческих тестов, позволяющих оценить когнитивные функции и поведенческие изменения у животных.

Цель исследования: изучение моделирования болезни Альцгеймера на лабораторных животных и валидизация поведенческих тестов для оценки когнитивных функций и поведенческих изменений у лабораторных животных.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Моделирование болезни Альцгеймера на лабораторных животных с использованием методики введения пептида амилоида- β в гиппокамп здоровым мышам.
2. Проведение валидации поведенческих тестов на модельных животных, страдающих болезнью Альцгеймера.
3. Провести анализ достоверности и репрезентативности индуцированной модели болезни Альцгеймера с помощью инъекции бета-амилоида для изучения патологии болезни Альцгеймера, и определить наиболее точный поведенческий тест.

Основное содержание работы. Данная работа выполнена на базе лаборатории "Умного сна" кафедры физиологии человека и животных медицинского центра Саратовского Государственного Университета имени Н.Г. Чернышевского.

Объекты исследования

Во всех экспериментах использовали мышей-самцов линии C57BL/6 (25–28 г), полученных из Национального лабораторного центра ресурсов животных (Пушино, Москва, Россия), в количестве 10 особей. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, со свободным доступом к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных», Директивой 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях, и рекомендациями Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 742 от 13.11.1984), одобренных Комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (протокол № 7). Мышей содержали при температуре 25 ± 2 °С, влажности 55% и цикле свет-темнота 12:12 ч (свет: 20:00–08:00). Еду и воду давали вволю.

Эксперименты проводились в следующих группах животных:

1. модельная группа с болезнью Альцгеймера
2. контрольная группа

Методы исследования.

Инъекция пептида амилоида- β в гиппокамп здоровым мышам для острого индуцирования когнитивных нарушений, аналогичных болезни Альцгеймера: Мышь взвешивают и анестезируют смесью Золетила 100 (50 мг/кг) и Ксиланита (1 мг/кг). Затем животное фиксируют на стереотаксической установке (51500 Stoelting, США) и наносят Тетрациклин (ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия) на глаза. Волосистой покров на голове от носа до шеи удаляют с помощью машинки для бритья (Braun Series 3310s, Германия) и обрабатывают кожу спиртом.

С помощью прямых рассекающих ножниц (52132-10P Stoelting, США) делают разрез кожи головы, придерживая её микрощипцами (52102-02P Stoelting, США). Затем очищают череп от соединительнотканых оболочек и высушивают его ватными тампонами.

В черепе животного делают краниотомию с помощью бормашины (Foredom, Россия) со сверлом диаметром 1 мм. Удаляют отделившийся участок черепа микрощипцами (52102-02P Stoelting, США) и перевязочными щипцами (52108-83P Stoelting, США), промывают открытую рану физраствором для удаления костной пыли.

Животное закрепляют под объективом мультифотонного микроскопа на тёплой грелке. Рядом с ним с помощью винта устанавливают навигационный держатель стереотаксической установки с присоединённым микроинъектором (Stoelting, США).

В шприц Гамильтон (Диаэм, Россия) набирают 5 мкл амилоида- β (1-42), меченного HiLyte™ Fluor 488 (AnaSpec Inc., Фремонт, Калифорния, США). Шприц помещают в держатель микроинъектора и опускают в головной мозг на заданную глубину по координатам (AP 2,0 мм; ML \pm 1,3 мм; DV 1,9 мм) со скоростью 0,1 мкл/мин.

Конфокальный анализ: Для проведения конфокальной микроскопии отложений β -амилоида в мозге мышей использовали следующий протокол. Мозг был удален и фиксирован в 4% параформальдегиде / PBS в течение двух дней, затем инфильтрирован в 30% сахарозе в течение еще одного дня. Для оценки очагов A β на свободно плавающих срезах тканей использовался стандартный протокол одновременного комбинированного окрашивания (Abcam). Тканевые срезы толщиной 50 мкм были получены на вибротоме (Leica VT 1000S Microsystem) и инкубированы в блокирующем растворе 10% BSA/0.2% Triton X-100/PBS в течение 2 часов при комнатной температуре, затем выдерживали в течение ночи при 4°C с антителами против A β (1:100, Abcam, ab10148, Cambridge, США), а затем еще 2 часа при комнатной температуре. После трехкратного промывания в PBS по 10 минут каждое

срезы инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре с флуоресцентно-мечеными вторичными антителами в растворе (1% BSA/0.2% Triton X-100/PBS, 1:500; Goat A/Rb, Alexa 555-Abcam, UK, ab150078). После трехкратного промывания в PBS по 10 минут срезы помещали под покровные стекла в растворе 50% глицерина/PBS. Конфокальная микроскопия коры головного мозга проводилась с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica SP5 (Leica, Германия)

Поведенческие тесты: Водный лабиринт Морриса — это поведенческий тест, используемый для оценки пространственного обучения и памяти у грызунов. Мышей помещают в большой круглый бассейн, наполненный мутной водой. В бассейне находится платформа, скрытая под поверхностью воды. Мыши должны найти платформу, используя внешние ориентиры. Способность и скорость нахождения платформы после нескольких попыток показывают уровень их пространственной памяти и способности к обучению.

T-образный лабиринт используется для исследования когнитивной гибкости и пространственного обучения у грызунов. Мышь помещают в длинное стартовое рукаво лабиринта, который затем разделяется на два рукава, образуя форму буквы "Т". Одно из рукавов содержит вознаграждение (например, пищу). Мышь должна научиться выбирать правильный рукав, чтобы получить награду. Тест оценивает способность животного запоминать и использовать пространственные ориентиры.

Тест поведенческого отчаяния, или тест принудительного плавания, используется для оценки депрессивного поведения у грызунов. Мышь помещают в цилиндр с водой, из которого она не может выбраться. Поначалу мышь пытается спастись, но со временем прекращает активные попытки плавать и начинает просто плыть на месте. Время, проведенное в неподвижном состоянии, считается показателем степени поведенческого отчаяния.

Тест на распознавание новых объектов оценивает память и способность к обучению у грызунов. Мышь помещают в клетку с двумя идентичными

объектами. Через некоторое время один из объектов заменяется на новый. Способность мыши различать и проводить больше времени около нового объекта указывает на её способность распознавать и запоминать объекты. Этот тест используется для исследования как краткосрочной, так и долговременной памяти.

Результаты: Результаты исследования показали значительное ухудшение когнитивных функций у мышей экспериментальной группы по сравнению с контрольной. В тестах на пространственную память и когнитивную гибкость (водный лабиринт Морриса, Т-образный лабиринт) экспериментальные мыши демонстрировали увеличение времени поиска платформы и ошибки выбора рукава. В тесте поведенческого отчаяния выявлено увеличение времени неподвижности, что свидетельствует о повышенном уровне стресса и депрессивного поведения. В тесте на распознавание новых объектов экспериментальные мыши показали сниженный интерес к новым объектам, указывая на нарушения памяти.

Конфокальная микроскопия выявила значительное увеличение плотности амилоидных отложений в гиппокампе и коре головного мозга у мышей экспериментальной группы. Амилоидные отложения присутствовали как в виде рассеянных бляшек, так и в виде компактных скоплений.

Выводы: 1. Для моделирования БА была выбрана методика инъекции пептида амилоида- β в гиппокамп здоровым мышам для острого вызывания альцгеймероподобных когнитивных расстройств.

Через 7 дней с помощью конфокального анализа данные показали, что в экспериментальной группе наблюдаются скопления патологического белка, что является признаком развития болезни Альцгеймера. У модельных животных наблюдались когнитивные нарушения, снижение памяти и способности к обучению, а также нейропатологические изменения в мозге, включая образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Эти результаты подтверждают, что выбранная методика является эффективной для создания репрезентативной модели БА.

2. Для оценки когнитивных и поведенческих нарушений у модельных животных были проведены следующие поведенческие тесты:

- Водный лабиринт Морриса, предназначенный для оценки пространственной памяти и обучения.
- Тест Т-образный лабиринт для оценки пространственной памяти.
- Тест поведенческое отчаяние, основанный на том, что у животного при вынужденном плавании наблюдается неподвижная поза. В этом тест данная поза оценивается как пассивный стресс.
- Тест на распознавание нового объекта, основанный на естественной склонности грызунов к изучению нового.

Результаты тестов показали, что модельные животные с БА демонстрируют значительные ухудшения в сравнении с контрольной группой. Это подтверждает, что выбранные поведенческие тесты являются валидными инструментами для оценки когнитивных нарушений, связанных с БА.

3. Анализ полученных данных позволил установить, что модель на основе выбранной методики обладает высокой степенью достоверности и репрезентативности. Поведенческие тесты выявили существенные различия между контрольной и экспериментальной группами, что подтверждает надежность измерений. Лабиринт Морриса был признан наиболее точным тестом для оценки когнитивных нарушений, так как он показал наибольшую чувствительность к изменениям в пространственной памяти и обучении.

Выполненная работа продемонстрировала эффективность и целесообразность использования выбранной методики для моделирования БА на лабораторных животных. Проведенная валидизация поведенческих тестов подтвердила их надежность и точность в выявлении когнитивных нарушений. Наиболее информативным тестом оказался лабиринт Морриса, который рекомендован для дальнейших исследований когнитивных аспектов БА.

