

Raport științific și tehnic - **Clusterina, un nou agent terapeutic util în clearance-ul amiloidului vascular (PN-III-P4-ID-PCE2020-1622)**- Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș

Rezumat

Boala Alzheimer este cea mai frecventă formă de demență legată de vârsta și reprezintă o problemă majoră de sănătate la populația în creștere a persoanelor vârstnice în țările dezvoltate.

Elementul cheie al acestei boli este depunerea de amiloid β la nivelul pereților vaselor cerebrale ca o angiopatie amiloidă cerebrală, în principal la nivelul arteriolele corticale și arterelor leptomeningiene.

Studiile clinice și experimentele au demonstrat faptul că clearance-ul deficitar al amiloidului β de la nivel cerebral este un element esențial în patogeneza bolii Alzheimer și a complicațiilor acesteia după imunizarea împotriva amiloidului β .

În particular, eșecul clearance-ului de amiloid β din spațiile extracelulare de la nivel cerebral prin căile de drenaj periarterial intramural este un factor cheie patogen în dezvoltarea angiopatiei amilode.

Clusterina – Apolipoproteina J este o glicoproteină heterodimerică legată de o disulfură. Studiile de asociere de la nivelul genomului în boala Alzheimer sporadică, în care amiloidul β se acumulează atât în plăcile corticale, cât și în angiopatia amiloidă cerebrală au evidențiat importanța variațiilor genetice comune în gena care codifică Clusterina.

Studii experimentale sugerează faptul că această apolipoproteină – Clusterina joacă un rol important în clearance-ul amiloidului β 42 prin intermediul proteinelor lipoproteice 2 de densitate mică. Clusterina pare a fi sechestrată cu speciile de amiloid β în angiopatia amiloidă cerebrală, precum și în anomaliile substanței albe în arteriopatia cerebrală autozomal dominantă cu infarcte subcortice și leucoencefalopatie.

Obiectiv general

Demonstrarea următoarei ipoteze: Apolipoproteina J – Clusterina este molecula cheie care îmbunătățește drenajul periarterial intramural al amiloidului β în Boala Alzheimer, astfel încât ar exista posibilitatea stopării progresiei bolii Alzheimer.

Obiective specifice/sub-obiective

1. Stabilirea cadrului de implementare al proiectului
2. Selectarea eșantionului de subiecți pentru experiment
3. Efectuarea injectărilor intrahipocampale de Clusterina la șoarecii transgenici cu ajutorul aparatului stereotaxic

Activitățile specifice implementării fiecărui obiectiv

1. **Stabilirea cadrului de implementare al proiectului** s-a realizat în pachetul de lucru: *Analiza oportunității cercetării* cu următoarele activități:

- 1.1. Analiza stadiului actual al cunoașterii în domeniul bolii Alzheimer și interacțiunile Clusterinei la nivel celular

Rezultat: 1 review al literaturii de specialitate

- 1.2. Cercetare privind metodologia de selecție a procedurilor adecvate

Rezultat: 1 studiu de sinteză

- 1.3. Redactare de protocoale de lucru pentru studiul experimental

Rezultat: 1 ghid de bune practici

2. **Selectarea eșantionului de subiecți pentru experiment** s-a realizat în pachetul de lucru: *Activități de colectare a subiecților experimentali*:

- 2.1. Colectare și îmbătrânirea subiecților experimentali

Rezultat: șoareci transgenici cu vârste de 6 luni, respectiv 12 luni

3. **Efectuarea injectărilor intrahipocampale de Clusterina la șoarecii transgenici** se va realiza în pachetul de lucru: *Abordarea cercetării propriu-zise* cu următoarele activități:

- 3.1. Familiarizarea utilizării aparatului stereotaxic de injectare prin citirea manualului de folosire al acestuia

Rezultat: dobândirea cunoștințelor de utilizare a aparatului stereotaxic.

- 3.2. Tratarea șoarecilor transgenici tineri (vârsta 6 luni) cu Clusterina

Rezultat: șoareci tineri tratați cu Clusterină.

- 3.3. Analizarea patologiei șoarecilor transgenici tineri (luna 4-7)

Rezultat: Examinarea lamelor ce conțin secțiuni histologice prin hipocampusul șoarecilor tineri patologici cu depuneri de β amyloid la nivelul vaselor cerebrale și cuantificarea modificărilor.

3.4. Tratarea șoarecilor transgenici bătrâni (vârsta 12 luni) cu Clusterina (luna 8-12)

Rezultat: șoareci bătrâni tratați cu Clusterină.

3.5. Analizarea patologiei șoarecilor transgenici în vârstă (vârsta 12 luni) (luna 0-6)

Rezultat: Examinarea lamelor ce conțin secțiuni histologice prin hipocampusul șoarecilor bătrâni patologici cu depuneri de amyloid β la nivelul vaselor cerebrale și cuantificarea modificărilor.

Studii initiale pentru perfectionarea injectiilor intra-hippocampus in soareci

I. Aparatul stereotaxic - folosit pentru injectarea șoarecilor - tehnică

Această tehnică permite injectarea unor cantități mici de trăsore în parenchimul creierului de șoarece la un control și fiziologic rata relevantă (0,5 μ L/2,5 min). În studiile initiale executate pentru a perfecționa tehnica de injectare, s-au folosit n=20 șoareci adulți, C57Bl6 în vârstă de 6 luni, injectați cu Evans Blue. După injectare, vârful capilar a fost lăsat *in situ* timp de 2 minute pentru a permite difuzia în bolus. Încă 5 min au fost lăsați șoarecii pentru drenaj perivascular înainte de terminarea experimentului. Toate procedurile au fost efectuate folosind un microscop de disecție și detaliile experimentale pe care le-am definitivat pentru experimentele cu clusterina sunt:

1. Se poziționează șoarecele anesteziat pe un tampon încălzit pe cadrul stereotaxic folosind piesa bucală și barele pentru urechi. Capul trebuie să fie în siguranță și nu se mișcă atunci când se aplică presiune pe scalp.
2. Se acoperă sonda rectală cu vaselină și se introduce în șoarece. Se reglează temperatura la 37°C.
3. Se aplică Lacrilube pe ochii șoarecelui.
4. Se practică o incizie pe linia mediană a scalpului pentru a expune craniu.
5. Se curăță suprafața craniului folosind PBS și vată. Se usucă la aer cu Dust Off.
6. Se încarcă frontal pipeta microcapilară cu trăsor folosind un 1 mL Seringă Termo atașată la pipetă prin tuburi înguste. Se atașează pe cadrul stereotaxic folosind injecția suport pentru pipetă (seringa Hamilton).

7. Se utilizează comenzile stereotaxice XYZ pentru a manevra pipeta.
microcapilară astfel încât vârful să fie situat peste Bregma (punctul unde suturile sagitale și coronale se intersectează)
8. Se ajustează XY astfel încât vârful pipetei să fie poziționat la hipocamp (ML = -1,5 mm, AP = -2,0 mm).
9. Se marchează partea superioară a craniului sub vârful pipetei cu un marker fin.
10. Se reglează axa Z pentru a ridica vârful departe de craniu.
11. Se folosește un burghiu fin la viteză medie spre mare pentru a pătrunde ușor în craniu care este marcat anterior de marker. Se oprește când dura mater devine vizibilă.
12. Se curăță zona de operație folosind PBS, pH 7,2 și tampon de bumbac.
13. Se reglează ușor axa Z pentru a coborî vârful pipetei până când acesta atinge dura și apoi coboară în hipocamp (DV = 1,7 mm).
14. Se apasă încet pistonul seringii pentru a injecta 0,5 μ L de trasor timp de 2,5 min.
15. Se lasă vârful pipetei în situ timp de 2 minute pentru a preveni refluxul și apoi se îndepărtează încet din creier folosind stereotaxicul axei Z Control.
16. După încă 3 minute se injectează pentobarbitona intraperitoneal (200 mg/kg), folosind o seringă de 1 ml și o seringă de 26 G Ac de $\frac{1}{2}$ " $\times$ 0,45 $\times$ 13 mm.
17. Se așteaptă 1 minut și apoi se transferă șoarecele pe covorașul de perfuzie. Se pregătește șoarecele pentru perfuzie și se începe procedura de spălare.

II. Microtomul

Microtomul este un aparat ce permite secționarea țesuturilor incluse în blocurile de parafină în secțiuni foarte fine (4-10 microni). Secțiunile sunt ulterior colorate și analizate cu ajutorul unui microscop. În cadrul proiectului specificat mai sus fiind necesară obținerea unor secțiuni histologice din blocurile de parafină din zone de interes cu coordonate foarte precise, secțiuni de aceeași grosime, reproductibile pe mai multe cazuri, s-au făcut toate demersurile pentru achiziționarea unui microtom automat.

Experimentele initiale de studiu histologic, imunohistochimic și de imunofluorescență:

Studiul histologic este absolut necesar pentru a aprecia dacă injectarea a fost efectuată în aria de interes. Evans Blue este un marker util, ce poate fi identificat atât pe secțiunile macroscopice, cât și pe cele microscopice. *Obiectivul principal a fost de a determina dacă tehnica de injectare cu markerul Evans Blue la nivelul șoarecilor simpli este pusă la punct și markerul se găsește în zonele de interes de la nivelul hipocampusului.* După atingerea acestui obiectiv se va injecta Clusterină șoarecilor transgenici de diferite vârste. Între timp se încearcă punerea la punct a tehnicii de imunohistochimie (IHC) și de imunofluorescență (IF) pentru identificarea structurilor vasculare și cuantificarea leziunilor de la nivelul lor pe secțiunile de creier obținute de la șoareci.

Studiul histologic, IHC și de IF s-a realizat folosind infrastructura de cercetare din cadrul Laboratorului de Microscopie din Centrul de Cercetare Avansată Medico-Farmaceutică (CCAMF), precum și infrastructura existentă în cadrul Laboratorului de Imunohistochimie și Biologie Moleculară, Disciplina de Histologie din cadrul UMFST GE Palade Târgu Mureș, astfel:

1. Evaluarea morfologică a cazurilor (Disciplina de Histologie): microscop de laborator pentru cercetare, cu modul de observare simultană pentru trei persoane, sistem digital de achiziție și prelucrare a imaginilor cu cameră foto digitală (Olympus BX46) <https://erris.gov.ro/Laboratory-of-Immunohistoche-1>.
2. Efectuarea reacțiilor imunohistochimice (CCAMF): aparat automat de imunohistochimie (Bond-MAX Fully Automated Immunostainer – Leica Biosystems), precum și toată aparatura necesară pentru efectuarea colorației standard și a colorației speciale <http://erris.gov.ro/CCAMF>.
3. Interpretarea lamelor de IF se va realiza la CCAMF cu ajutorul microscopelor de imunofluorescență și a microscopului confocal (Confocal microscope Leica TCS SP8) <http://erris.gov.ro/CCAMF>

Pentru a putea utiliza în mod corespunzător aparatura pusă la dispoziție de CCAMF, în special aparatul automat de imunohistochimie, am urmat un curs de instruire, în care ni s-au explicat modul de funcționare, protocoalele specifice ce pot fi adaptate fiecărui anticorp în parte și mi s-au detaliat toate consumabilele și reactivii necesari unei funcționări corespunzătoare.

Momentan s-au achiziționat consumabilele și reactivii necesari punerii la punct și derulării reacțiilor IHC și de IF. Toate consumabilele și reactivii sunt compatibili cu aparatura pusă la dispoziție de CCAMF:

nr. crt.	CATEGORIE ACHIZIȚIE
	Consumabile de laborator
1	Parafină (granule) – punct de topire peste 57 grade
2	Lame pentru coloratii standard
3	Lame silanizate ptr. IHC
4	Lamele 24x50mm
5	Casete de rutină
6	Mediu de montare cu DAPI pentru IF
7	Sistem de acoperire care permite transferul reactivului pe lamă (Bond Universal Covertiles)
8	Containere goale pentru reactivi cu volum de 7mm (Bond Open Containers)
9	Kit format din etichete și cartuș suficient pentru imprimarea acestora (Bond Slide Labels and Printer Ribbon)
10	Mediu de montare, CV Mount
11	Lame de microtom, profil îngust (Low-profile disposable blades)
	REACTIVI
1	15% goat serum (Sigma, 9023)
2	Anticorp anti-SMA
3	Anticorpi secundari pentru IF (conjugated secondary antibody goat antirabbit AlexaFluor 633)
4	Sudan Black
5	Evans Blue
6	Kit de imunodectie cu polimer de înaltă sensibilitate și specificitate (Bond Polymer Refine Detection)
7	Soluție prediluată pentru îndepărtarea parafinei de pe secțiunile fixate în formol (Bond Dewax Solution)
8	Soluție spălare tampon, concentrată 10x (Bond Wash Solution 10X Concentrate)
9	Soluție prediluată pentru demascare antigenică a secțiunilor incluse în parafină, pH acid (Bond Epitope Retrieval 1-1L)
10	Soluție prediluată pentru demascare antigenică a secțiunilor incluse în parafină, pH basic (Bond Epitope Retrieval 2-1L)
11	Kit pentru pretratare enzimatică în vederea demascării antigenice (Bond Enzyme Pretreatment Kit)
12	Sistem de curățare a sondei de aspirare a echipamentului (Bond Aspirating Probe Cleaning Kit)
13	Anti-Collagen IV antibody

În vederea punerii la punct a tehnicilor de IHC și de IF s-au realizat protocoale specifice, ce urmează a fi adaptate și optimizate pentru probele de creier obținute de la șoareci.

- Fiecare protocol de IHC și de IF, presupune un țesut cerebral corespunzător fixat, soluția fixatoare fiind soluția de paraformaldehidă 4% în 0.01 M PBS, cu un pH de 7,2.
- Secțiunile din creier pentru toți șoarecii incluși în studiu se vor face în zona de interes din hipocamp și se includ în parafină, conform unui protocol prestabilit.
- Din fiecare bloc de parafină se va face o secțiune, ce se va colora cu o colorație standard (Hematoxină Eozină - HE).
- Celelalte secțiuni din blocurile de parafină se vor pune pe lame silanizate, reacțiile IHC și de IF realizându-se în aceeași etapă pentru toate cazurile, pentru a asigura reproductibilitatea rezultatelor obținute.
- Toate reacțiile IHC și de IF se vor face automat utilizând aparatul automat de imunohistochimie de la CCAMF (Bond-MAX Fully Automated Immunostainer – Leica Biosystems), conform cunoștințelor obținute în urma programului de instruire.

Rezumatul etapei

În acesta etapă a studiului am dobândit cunoștințele necesare bunei funcționări ale acestui proiect cu participare internațională și cu tehnici specializate. Avem achiziționate echipamentele, consumabilele și reactivii necesare desfășurării părții practice a proiectului de cercetare. S-au practicat injectări pe șoareci simpli pentru a ne putea perfecționa tehnica de injectare, folosind tracer Evans Blue. Practicăm aceste exerciții pentru prevenirea injectării greșite la șoarecii transgenici, la nivel de hipocamp, șoareci care ne vor fi donați de către Mayo Clinic. Clusterina a fost sintetizată sub îndrumarea directorului de proiect împreună cu Prof Mark Wilson, University of Wollongong, a fost trimisă și a ajuns în siguranță la UMF Târgu Mureș. Șoarecii transgenici de clusterina sunt pregătiți pentru transport de la Mayo Clinic la Târgu Mureș. Prezentăm și discutăm background-ul proiectului în cadrul zilelor UMFST Târgu Mureș 6-10 Dec 2021.

Prof. dr. Roxana Carare

