

МОДИФИКАЦИЯ НЕЙРОНОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ГРЫЗУНОВ С ПОМОЩЬЮ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ: МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НА ПОВЕДЕНИЕ

Куницына Татьяна Александровна

Для направленного переноса трансгенов используются разнообразные системы вирусных векторов, в том числе и лентивирусные векторы. Целью настоящей работы является охарактеризовать влияние введения в гиппокамп лентивирусных частиц, содержащих кодирующую последовательность EGFP, или их несущего раствора на поведение мышей линии C57BL/6J и их способности к обучению в гиппокамп-зависимых задачах, а также создать трехмерную реконструкцию объема мозга, в которой была проведена лентивирусная трансдукция.

В работе было использовано 30 половозрелых самцов мышей линии C57BL/6J и 6 половозрелых самок крыс Wistar. Мыши были разделены на 3 группы: «p156» (n=10), которым были введены лентивирусные частицы p156; «PBS» (n=10), которым был введен несущий раствор (однократный стерильный фосфатный буфер pH 7,4); «контроль», которым введения веществ проведено не было. Лентивирусные частицы или несущий раствор были введены в ростральную часть гиппокампа. Мышей исследовали в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «открытое поле» (ОП), «ротарод», «Hot Plate» и обучали в задаче условно-рефлекторного замирания (УРЗ) и в пространственной версии водного лабиринта Морриса. После окончания поведенческих тестов проводили интракардиальную перфузию; были изготовлены фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм, одни из которых были покрашены по методу Ниссля для морфологического контроля, другие – на маркер микроглии Iba1. Плотность Iba1+ клеток была оценена в соматосенсорной, первичной моторной и теменной ассоциативной коре, зоне CA1 и зубчатой фасции гиппокампа. Крысам были введены лентивирусные частицы p156 в ростральную часть гиппокампа. Через 2 недели после операции проводили интракардиальную перфузию; изготавливали последовательные фронтальные срезы толщиной 300 мкм, которые оптически просветляли и снимали под конфокальным микроскопом в виде отдельных трехмерных реконструкций. Далее отдельные реконструкции были сшиты с помощью программ Imaris 7.4.4. и AutoAligner (Bitplane).

Было показано, что проведенная стереотаксическая операция по введению лентивирусных частиц p156 или несущего раствора не влияет на исследовательскую активность, локомоцию и болевую чувствительность. Проведенная стереотаксическая операция по введению несущего раствора приводит к снижению тревожности и опосредованно – к повышению двигательной активности. Было показано, что проведенная операция не влияет на способности к обучению в задаче УРЗ и водном лабиринте Морриса. Введение лентивирусных частиц приводит к увеличению воспалительного ответа в области введения, введение несущего раствора к изменениям в воспалительном ответе не приводит.

Использованный способ введения лентивирусных частиц может быть использован для исследования процессов обучения и памяти, но не для исследований, связанных с тонкими изменениями в поведении животных. Отработанный способ реконструкции

области введения лентивирусов является простым при работе со срезами и подходит для общей оценки распространения вирусных частиц вокруг места инъекции, но приводит к сильным искажениям итоговой трехмерной реконструкции и не подходит для последующей количественной оценки, например, для подсчета клеток в объеме.