

In vivo két-foton pásztázó mikroszkópiás mérések altatott és éber egér és patkány idegrendszerében

A projekt nem szakmai jellegű összefoglalója:

Az idegrendszer működésének és annak patológiás elváltozásainak megértéséhez nélkülözhetetlen az idegsejtek és azok hálózatának vizsgálata kísérletes állatokban. A jelen kérelem tárgya egy olyan kísérletes állatokon végzett kísérletsorozat melyben a pályázó a legmodernebb in vivo és in vitro képalkotási, élettani, molekuláris és anatómiai módszerek kombinálásával vizsgálja a központi idegrendszert felépítő idegsejteket és azok szinaptikus hálózatának működését "viselkedő" állatokban. A kísérleteink fő célja, hogy a központi idegrendszer egy bizonyos területének (pl. hippocampusz) működése alatt fellépő idegsejt aktivitást optikai módszerrel nyomon kövessük, majd az agyterületből készített túlélő agyszeleten in vitro élettani és anatómiai módszerekkel jellemezzük a különböző viselkedés alatt nyomon követett idegsejteket. Röviden: az állatnak megtanítjuk, hogy egy bizonyos környezetben (vitruális valóság) jutalmat kap, míg más környezetben nem. A hippocampusz felelős a térbeli tájékozódásért és a különböző környezetben más és más hippocampális idegsejt csoportok aktiválódnak (azaz más és más idegsejtcsoport kódolja a különböző környezeteket). Arra vagyunk kíváncsiak, hogy a különböző környezetet kódoló idegsejtcsoportok más és más belső tulajdonsággal rendelkeznek-e és más módon vannak-e szinaptikusan összekapcsolva. Ezen kérdés megválaszolása csak úgy lehetséges, hogy először az idegsejtek aktivitását viselkedő állatokban regisztráljuk, majd a hasonló működést mutató sejtek tulajdonságait és kapcsolataik erősségét in vitro élettani módszerekkel vizsgáljuk.

A kísérletekhez műtétekre van szükségünk.

Minden invazív beavatkozást altatott állaton végzünk (isofluran és/vagy ketamin használatával). A maximális fájdalom csillapítás érdekében további helyi érzéstelenítést alkalmazunk lidocainnal/ropivacainnal. Az altatás teljes ideje alatt az állatokat egy melegítő párna segítségével folyamatosan melegítjük, hogy megvédjük őket a kihűléstől, a kornea kiszáradását szemkrém használatával küszöböljük ki. Az állat műtete során törekszünk a fertőzések csökkentésére, ezért a beavatkozást steril eszközökkel végezzük.

1. A sejt-aktivitást jelző fehérjéket ki kell fejeztetnünk meghatározott idegsejtekben; ehhez a megfelelő DNS-t be kell juttatnunk a neuronokba. Ezt kétféle módszerrel tesszük:

i) a DNS-t az ún. "in utero elektroporáció" technikával még az állatok születése előtt (14-17 napos embrionális kor) visszük be az idegsejtekbe: a vemhes nőtényt mélyen elaltatva, a hasfalat megnyitva a méhfalon keresztül az embriók agykamrájába injektáljuk a DNS-t egy üvegkapilláris segítségével. A méh és a hasüreg kiszáradását folyamatos testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal való nedvesítéssel előzzük meg. Az injektálás után elektroporátor segítségével feszültségpulsusokkal juttatjuk be a DNS-t a sejtekbe. A műtét hosszát 30 percben maximalizáljuk az anya és az embriók túlélésének érdekében, és minden esetben posztoperatív fájdalomcsillapítást alkalmazunk.

Az in utero elektroporációs technika előnyei:

- az agykéreg egy adott rétegében elhelyezkedő sejtek szelektíven jelölhetők (főként kortikális L2/3 és L5 piramisisejtek, hippocampális piramisisejtek);
- a kívánt gén kifejeződésének erőssége a bevitt DNS mennyiségével jól szabályozható;
- kialakítható ritka (kevés sejt), de erős jelölés, mely az „imaging” kísérletekhez elengedhetetlen;
- az embrionális korban történő jelölés lehetővé teszi fiatal állatok vizsgálatát is.

- ii) A DNS-t hordozó vírus vektort injektálunk felnőtt állatok agyába, ahol a vírus az idegsejtekbe jutva kifejezti az általunk választott DNS-t. A műtét során az állat elaltatását követően a koponyacsonton át egy 1,5 mm nagyságú lyukat fúrunk a primer szomatoszenzoros vagy látókéreg felett egy fogorvosi fúró segítségével. A vírust tartalmazó oldatot nanoliter 2010 pumpával és egy injektáló pipetta segítségével juttatjuk az agyba. Az injektálás időtartama általában 15-20 perc, ezután az állat fejbőrét összevarrva, majd lidokainnal/ropivacainnal bekenve zárjuk a sebet. A vírus által bejuttatott transzgen kifejeződési ideje 1-2 hét, amíg az állatok folyamatos ellenőrzés mellett gyógyulnak.

A vírus-közvetített géntranszfer előnyei:

- bármely agyterületen bármilyen idegsejtet lehet sejtet fertőzni vele, ám nehéz ritka jelölést létrehozni (Cre-rekombináz függő rendszerrel megoldható)
- felnőtt állatok vizsgálatára alkalmas

2. Az optikai vizsgálatokhoz a két-foton mikroszkóp számára fel kell tárnunk a vizsgálandó agyterületet. Ehhez az állat altatását követően a koponyacsont egy kis részének eltávolítása után, a hippokampusz fölé egy erre a célra speciálisan kialakított 1,5 mm hosszúságú és 3 mm szélességű hengert rögzítünk fogorvosi cementtel a kifűrt kraniatómiába. Vérzés esetén koagulátort, illetve vérzéscsillapító szivacsot használunk. Ezután eltávolítjuk a hippokampusz feletti kérgi agyterületet. Az állatok a műtét után láthatólag a megszokott módon viselkednek, nem éreznek fájdalmat.
3. Az állat fejét egy a koponyához rögzített külső lemez segítségével pozícionáljuk a mikroszkópos vizsgálathoz, miközben a test szabadon mozoghat. A fej-befogó lemez rögzítése szintén fogorvosi cementtel történik. A vizsgálatok során az állat számítógéppel generált vizuális (környezeti) „feladatokat” kap, és a „jó” válaszait jutalom-falatokkal, jutalom-itallal díjazzuk. A tanulási folyamat alatt optikai és elektrofiziológiai mérésekkel elemezzük a folyamatban részt vevő idegi hálózatok működését.

A kísérletekhez szükséges állatigényünk évente:

100 db egér és 25 db Wistar patkány a vírus-közvetített géntranszferhez, és 28 db vemhes nőstény egér (körülbelül 168 embrió) és 12 db vemhes nőstény patkány (körülbelül 72 embrió) évente.

Reméljük, hogy eredményeink nem csak alapvető neurobiológiai kérdéseket fognak megválaszolni, hanem alapjául szolgálnak az idegrendszert érintő betegségek alatt bekövetkezett változások megértéséhez.