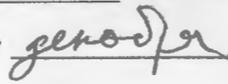


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации

Инв. №

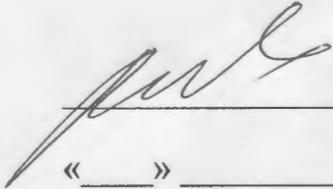
УТВЕРЖДАЮ
Директор ИФАВ РАН,
член корреспондент РАН,
 С.О.Бачурин
« 21 »  2015 г.



«МЕТОДИКА СТЕРЕОСКОПИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ НА ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ
ДЛЯ АДРЕСНОГО ВВЕДЕНИЯ В ЗАДАННЫЕ АНАТОМИЧЕСКИЕ ОБЛАСТИ МОЗГА
НЕЙРОТОКСИНОВ И ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ (В ТОМ ЧИСЛЕ
ЛЕНТИВИРУСНЫХ И АДЕНОВИРУСНЫХ) С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ»

СТП-14.621.21.0008.13-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

 С.Г. Ключков
« » 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

Оглавление

1. Наименование методики измерений 3
2. Назначение методики измерений и область применения 3

3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений.....	4
5. Требования к показателям точности измерений.....	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики	4
7.1. Реактивы.....	4
7.2. Материалы	4
7.3. Оборудование	4
8. Операции, связанные с выполнением данной методики	5
8.1 Анестезия и фиксация животного	5
8.1 Кранеотомия	6
8.1 Введение генноинженерных конструкций	7
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
11. Требования к квалификации операторов.....	8
9. Обработка и оформление результатов измерений.....	Ошибка! Закладка не определена.

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.13-2015 устанавливает методику «Методика стереоскопических операций на головном мозге мышей для адресного введения в заданные анатомические области мозга нейротоксинов и генноинженерных конструкций (в том числе лентивирусных и аденовирусных) с целью получения экспериментальных моделей нейродегенеративных заболеваний

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуры, выполнение которых необходимо адресного введения в заданные анатомические области мозга нейротоксинов и генноинженерных конструкций. Основными областями применения данной методики являются биологические и медицинские науки (создание экспериментальных моделей нейродегенеративных заболеваний)

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений

Не устанавливаются.

6. Условия измерений

Не устанавливаются.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам при выполнении данной методики.

7.1. Реактивы

- 1 кетамин, ксиларин (Sigma Aldrich, Германия)
2. Очищенный гAAV или лентивирус
3. Этанол, 70%

7.2. Материалы

1. Капилляры из боросиликатного стекла (IPC, США)
2. Шприцы 1, 5 and 20 мл (BD, США)
- 3 Иглы 23 G и 27 G (BD, США)
- 4 Хирургическая нить (Ethicon, США)

7.3. Оборудование

1. Бинокляр (Leica Microsystems, Швейцария)
2. Хирургические инструменты (Dimeda, Германия)
- 3.Стереотаксический аппарат для мелких животных (David Kopf Instruments, США)
4. Ручной бур (Osada, США)

8. Операции, связанные с выполнением данной методики

Стереотаксическая доставка генов с помощью рекомбинантных вирусов в мозг грызунов – универсальный метод, применяемый практически во всех областях нейробиологии. Изменение нормальных функций *in vivo*–инфицированных нейронов происходит только в результате произведенных генетических манипуляций, что является преимуществом данного подхода перед работой с культурами клеток. Также данная методика характеризуется относительной простотой в исполнении и небольшим промежутком времени между этапами планирования эксперимента и получением экспериментальных данных. Привнесенные изменения затрагивают лишь небольшую популяцию нейронов, что делает возможным использование этой методики для изучения функций генов, нарушение которых обычно приводит к летальному исходу или активации мощных компенсаторных механизмов. К недостаткам данного метода можно отнести ограниченную способность к воздействию в обширных областях головного мозга на определенный тип клеток. Кроме того, эта методика не вполне совместима с поведенческим тестированием.

8.1 Анестезия и фиксация животного

Время выполнения операции 10 мин

Провести глубокую анестезию путем введения смеси кетамина и ксиларина в дозе 80-100 мг кетамина и 10 мг ксиларина на килограмм массы тела внутривенно. Выбрить шерсть на голове животного, и протереть кожу 70% этиловым спиртом. Для того, чтобы разместить животное в стереоскопическом аппарате, необходимо зафиксировать одно ушное крепление, аккуратно разместить голову животного так, чтобы ушной зажим вошел в ушной канал, затем медленно разместить второй ушной зажим и зафиксировать его в том же положении (Рис 1а). Маленьким пинцетом отвести нижнюю челюсть вниз (Рис 1б), затем медленно вводить резцовый адаптер в

рот животного до тех пор, пока резцы не поместятся в разьеме адаптера, затем аккуратно потянуть адаптер назад и зафиксировать его положение (Рис 1с). Далее под небольшим давлением разместить носовой зажим. Для предотвращения проблем с дыханием маленьким пинцетом вытащить язык животного наружу.

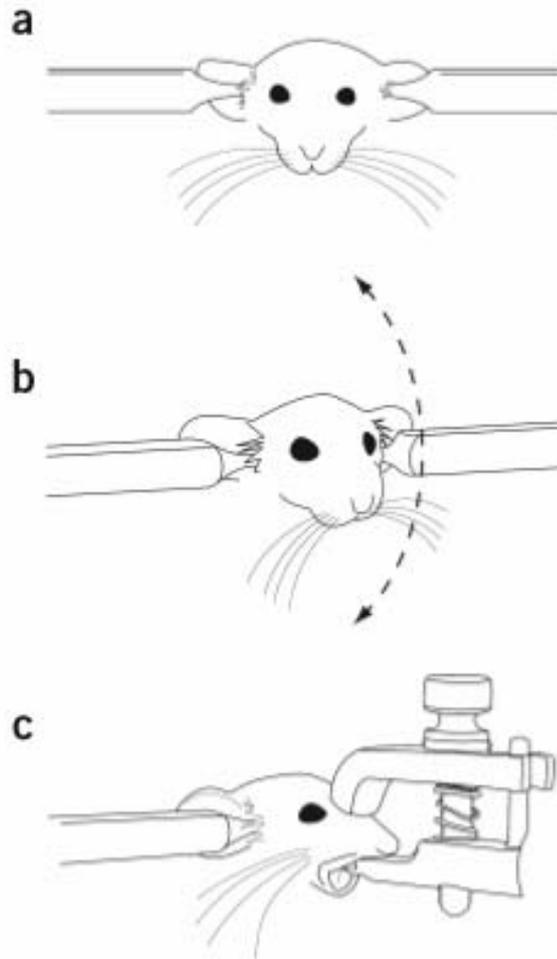


Рисунок 1. Правильное расположение и фиксация головы животного

8.1 Кранеотомия

Время выполнения операции 15 мин

При помощи бинокля визуально определить положение верхушки черепа животного. Сделать срединный надрез при помощи хирургических ножниц. Развести при помощи маленьких зажимов зафиксировать края хирургической раны. Аккуратно очистить зоны bregma и lambda при помощи маленького костяного скобеля. Выровнять голову животного путем измерения

Z координат bregma и lambda, отрегулировать положение головы так, чтобы они оказались равными. Тогда голова животного примет горизонтальное положение в каудально-ростральном направлении. Определить X и Y координаты bregma и вычислить координаты зоны укола на основании стереотаксического атласа. Используя ручной бур, истончить костяную поверхность над местом укола. Когда кость станет очень тонкой, взять иглу (27 G) и аккуратно перфорировать контур области краниотомии, затем при помощи иглы 'flip up' проколоть истонченную кость и удалить ее микропинцетом.

8.1 Введение генноинженерных конструкций

Время выполнения операции 15 мин

Закрепить микрокапилляр для инъекций в держателе. Набрать 4- μ л каплю раствора, содержащего вирус. Поднести кончик микрокапилляра к bregma и вычислить X, Y и Z координаты, которые будут использованы для введения.

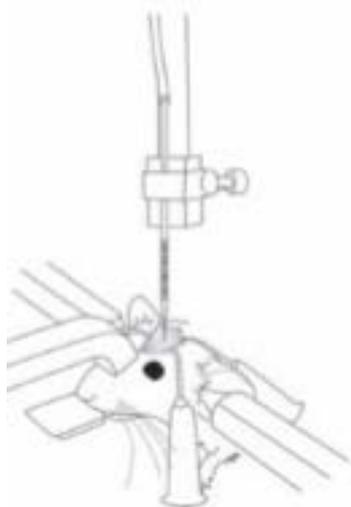


Рисунок 2. Схема проведения стереоскопического укола

Предать микрокапилляру правильную ориентацию к X и Y положению и опустить его таким образом, чтобы его конец оказался над открытой твердой мозговой оболочкой. Надрезать конец микрокапилляра, предав ему

заостренную форму. Надрезать иглой 27-G твердую оболочку и вести носик микропипетки, опуская его до тех пор, пока по оси Z не будут достигнуты координаты требуемой зоны (Рис 2). Присоединив 20 мл шприц, и, наблюдая в бинокляр, плавно ввести раствор. Визуально контролировать скорость и объем инъекции, основываясь на движении столба относительно калибровочных отметок. Через 2-3 мин. после введения медленно извлечь микрокапилляр так, чтобы раствор с вирусом не попал на поверхность. Если границы области краниотомии больше, чем 1мм × 1мм, нанести на поврежденный участок костяной воск.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки