

Оптогенетика

Нов метод за контролиране на мозъчни функции

Боряна Пирьова

Оптогенетиката представлява нов метод за контролиране функцията на нервните клетки. Методът съчетава генно-инженерни технологии със светлинна стимулация. Наименованието „опто“ произхожда от гръцката дума за зрение – функцията на очите, които чрез попадналата в тях светлина възприемат предметите от околния свят.

В перспектива това е метод, който ще позволи да се развият технологии за живяване в мозъка на безвредни устройства при свободно движещи се животни с цел да се изучават и контролират функциите на мозъка. Засега е постигнато чрез насочено светлинно стимулиране към определени клетки да се повлияе тяхното състояние, както и да се предизвикат промени в някои поведенчески прояви. Желаното въздействие може да се осъществява в границите на милисекунди.

Още преди 40 години в микроорганизми са намерени белтъчни молекули, които под действие на светлина могат да регулират електролитни потоци и с това да променят електричните заряди на клетъчните

„Преди да можем да дадем отговор, ние се нуждаем от силата да задаваме нови въпроси – тази сила се крие в новите технологии.“

Карл Попър

мембрани. Нормално по вътрешната страна на клетъчните мембрани се намират отрицателно заредени йони, а по външната ѝ страна – йони с положителни заряди. За клетките на

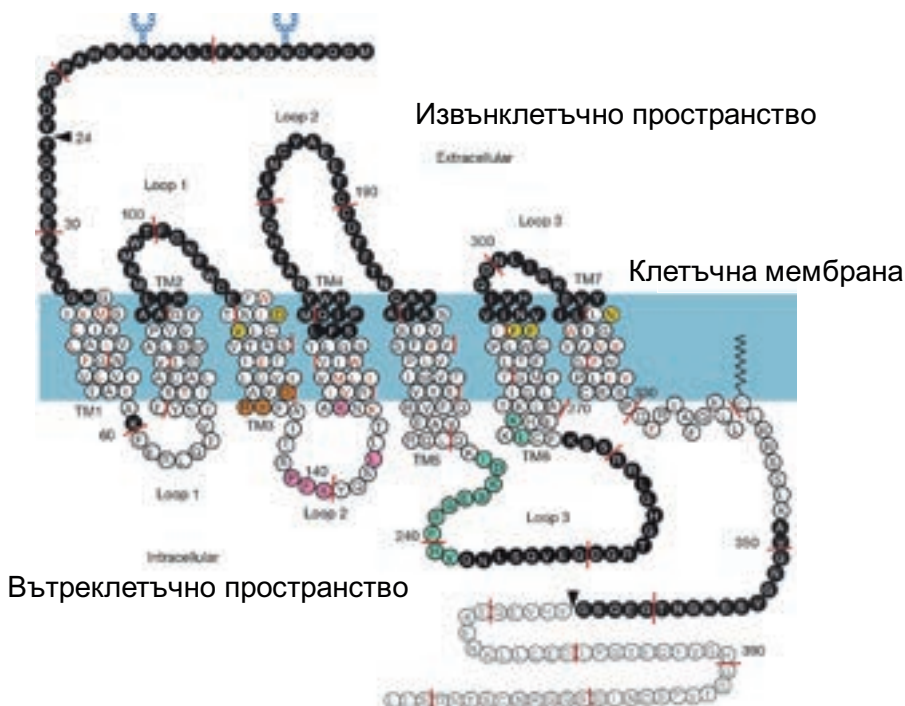
нервната система, наречени неврони, при състояние на покой това е нормалната поляризация на клетъчната им мембрана. Когато невронът е стимулиран по някакъв начин, тази поляризация се променя, като вътрешната повърхност се зарежда отрицателно, а външната – положително. Процесът носи наименованието деполяризация и е израз на настъпило възбуждане. Предизвиква се от гразнители, които променят проникваемостта на клетъчната мембрана и преразпределението на йоните. Обратното състояние на неврона – задържане, се съпътства от процес на хиперполяризация. При това състояние външната повърхност на клетъчната мембрана се зарежда с повече положителни йони, а вътрешната – с повече отрицателни.

В основата на метода оптогенетика са белтъчни молекули от групата на опсините. Опсини е общо название на рецепторни белтъци, възградени в клетъчните мембрани

и свързани със светочувствителна „химична“ молекула. Опсините са възникнали далече в еволюцията, още в едноклетъчните организми, заедно с чувствителността към светлината. В еволюционен план това е далече преди истинското зрение, за което трябва и мозък. Те са стотици видове, различаващи се, както всички белтъци, по последователността на аминокиселините, които ги изграждат, т.е. полипептидната им структура. Освен това пептидите им вериги имат различно нагъване в пространството, което създава допълнително структурно разнообразие. Разбира се, тази различна структура води и до различна функция. Опсините се подразделят на групи, според чувствителността си към дадена дължина на вълната (λ), както и по клетъчните структури, в които са вградени: напр. родопсин – вграден в пръч-

ковидните клетки за нощното зрение, или такъв, вграден в конусовидните клетки за цветното зрение, или меланоопсин – свързан с генонощния ритъм.

Общото за белтъците от групата на опсините е, че те имат роля на йонни помпи. Те се активират чрез светлини фотони, което предизвиква движение на йони. Както беше описано по-горе, движението на йони през клетъчната мембрана предизвиква възбуждане или задържане. В този смисъл опсините могат да се охарактеризират като забележителни молекулни „машини“, които променят функционалното състояние на отделни клетки. Наличието на тези чувствителни към светлина молекули, наречени най-общо опсини, е установено първоначално във водорасли и бактерии, които се нуждаят от светлина за своето развитие.



*Структурна схема на белтък от групата на опсините. Синята лента е клетъчната мембрана. През нея преминават нагънати множество части от белтъчната молекула. Нейни части се намират както в извънклетъчното, така и във вътреклетъчното пространство. Показаният на фигурата родопсин се намира във фоторецептор в плодова мушица (*Drosophila*). Стимулацията му с насочена светлина е използвана за промяна в поведението на плодовата мушица – приближаване към източника на светлината*

В едноклетъчни организми те представляват своеобразни фоторецептори, които контролират придвижването им към светлина – явление, наречено фототаксис. Когато чрез генно-молекулни техники опсини се вградят в клетки на други организми, те дават възможност да се регулират възбудимост, вътреклетъчна активност на обмяна на веществата, калциев поток и др. Това е новата технология, наречена оптогенетика.

Кратката хронология за развитието на оптогенетиката е следната:

1971 г. Описан е един от видовете опсини – бактериородопсин, като компонент на клетъчна мембрана, който се активира от светлина и променя трансмембранный йонен поток.

1972 и 2002 г. Описани са други два опсини – халородопсин и каналородопсин.

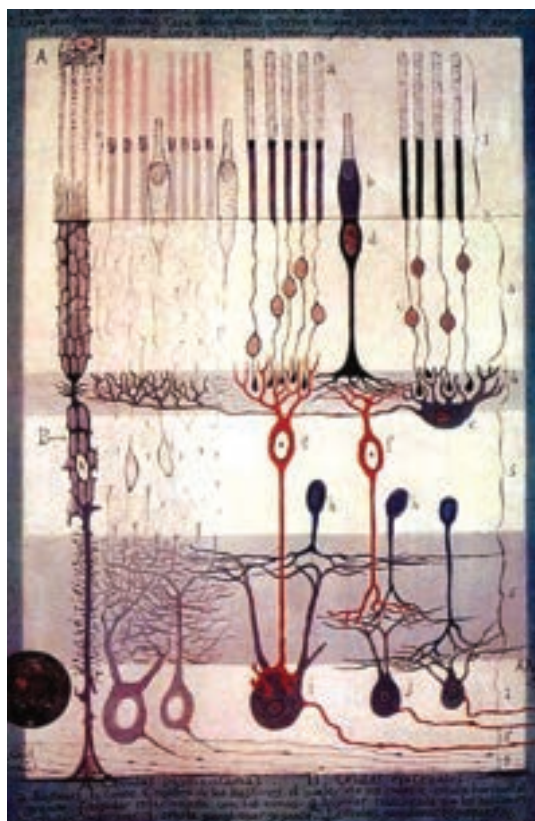
2005 г. За първи път е пренесен опсин от микробна клетка върху неврон. В резултат на това става възможно да се контролира основна функция на неврона – възникване на възбуждане.

2007 г. Създаден е фиброоптичен интерфейс, който представлява тънък кабел, фиксиран към черепа на опитно животно, по който може да се предава светлинно гразнене. Това устройство позволява да се въздейства върху мозъка на опитното животно, плъх, при негово свободно движение.

2010 г. Започва широко приложение на геномни стратегии, насочени към научни изследвания в областта на невронауките. Търси се приложение с клинично значение – въздействия върху клетки от скелетни мускули, миокард и неврони в опитни животни, създадени като модели на различни болести, между които Паркинсонова болест, страхова невроза, депресия, кокаинова зависимост и др. През 2010 г. оптогенетиката е посочена като Метод на годината в областта на интердисциплинарните постижения. В съответния специализиран брой на списание *Nature* оптогенетиката е наречена „Научният пробив на десетиле-

тието“, а през 2009 г. списание *Science* посвещава един цял брой на проблема и чрез множество публикации утвърждава оптогенетиката като научен метод. Корицата на списанието е с илюстрация на метода.

Родопсинът е зрителен пигмент от фоторецепторните клетки на ретината на окото, които трансформират светлинното гразнене в нервни импулси. Под влияние на светлината във фоторецепторите настъпват фотохимични реакции, които дават началото на нервните импулси, достигащи до зрителните центрове в мозъка. Тези нервни импулси носят в себе си информация за възприетия образ. Фоторецепторните клетки са два вида. Поради характерната им форма те носят наименования пръчици и колбички. Изображени-

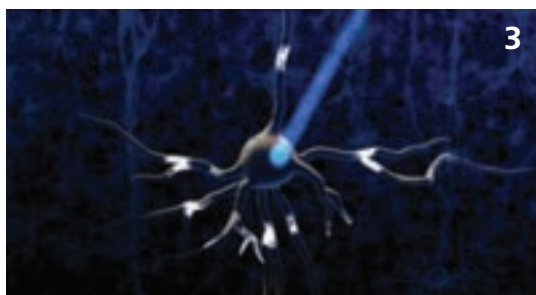
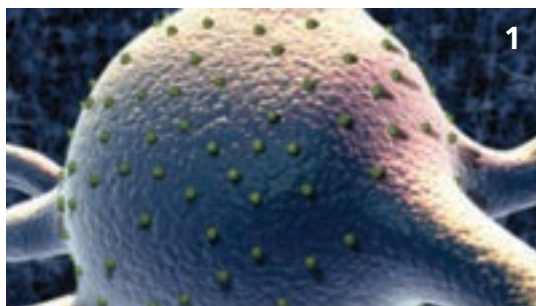


Структура на ретината като невронна мрежа. Зрителните рецептори са пръчици и колбички. Забележителна рисунка на Сантяго Рамон-и-Кахал, 1900 г.

ето е направено от именития испански хистолог Сантяго Рамон-и-Кахал (Ramon y Cajal) през миналия век (1900 г.), но този образ напълно отговаря на познатата ни понастоящем структура на ретината от електронни микрографии. С пръчиците се възприемат черно-белите изображения, без за това да е необходимо силно осветяване. Колбичките осъществяват цветното зрение при ярка осветеност. В човешката ретина има 3 милиона колбички и 100 милиона пръчици. Фоторецепторите пръчици притежават изключително висока чувствителност. В тях възбуждане може да настъпи под въздействие на възможното най-малко количество светлина, един фотон. В пръчиците се съдържат белтъчни молекули, които поглъщат светлина и с това създават възбуждане. Една такава молекула е фоторецепторният белтък родопсин.

Накратко, същността на оптогенетиката е със светлинен лъч да се достигне до неврон, в който чрез генно инженерство на повърхността му са въградени молекули от групата на опсините. При светлинна стимулация с определена дължина на вълната се отварят йонни канали, през които йонният поток предизвиква възбуждане, т.е. активация на неврона. При светлинна стимулация с друга дължина на вълната се отварят други йонни канали, от което следва хиперполяризация на мембраната и съответно процес на задържане. Съвременните методи на молекулярната биология позволяват чрез инжектиране на вирус, който съдържа ДНК-части, които кодират синтез на опсини, да се създадат опитни животни, в които да са налице желаните структурни промени. По този начин в бързо размножаващи се мишки се създават различни видове линии, при които опсини са въградени в мембраните на определени неврони. Тази генно-инженерна техника например предвижда каналородопсинът да се въгради в неврон от клетъчна култура, като се въведе съответният ген за молекулата на каналородопсина (ChR2). Това ста-

ва посредством доброкачествен вирус, наречен вектор. Допълнително се осигурява молекулите на каналородопсина да се въграждат само върху избрани неврони, например такива, в които медиатор е глутамат. С това се постига точност в локализацията и специфичност на въздействието.

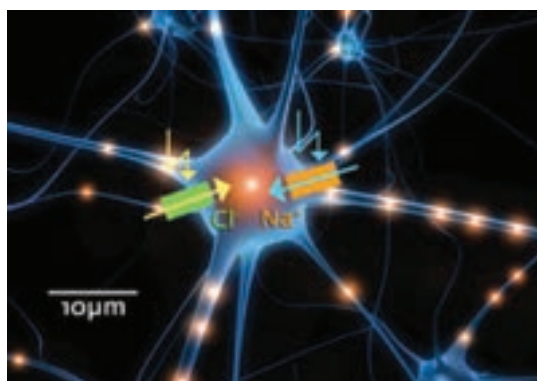


1. Сканираща микрография на неврон, на чиято повърхност чрез генно инженерство е предизвикана поява на молекули родопсин, които са йонни канали, регулирани от светлина

2. Молекулите родопсин са показани при голямо увеличение

3. Светлинен лъч достига до неврона, в който на повърхността са молекулите родопсин. Отварят се йонни канали, през които йонният поток предизвиква възбуждане, т.е. активация на неврона. Показани са потенциалите на действие като израз на възбуждането

Още през 1979 г. Нобеловият лауреат Франсис Крук (Francis Crick) изказва становището, че най-голямото предизвикателство пред невронауките е да се постигне контрол върху дейността на отделни мозъчни клетки. Всякакви електроди са твърде груби за такова въздействие, защото едновременно стимулират клетъчни групи от различен тип. С новата технология, наречена оптогенетика, се постига такова въздействие върху отделна клетка.

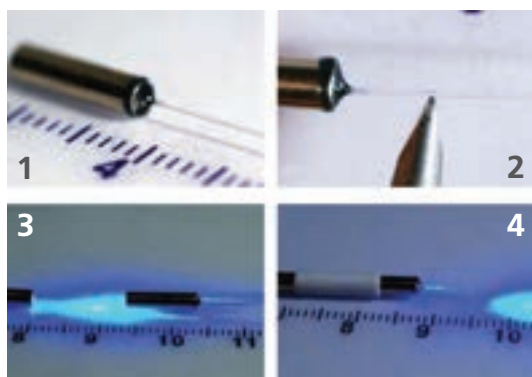


Схематично представяне на въздействието на насочена светлина към белтъчни молекули, йонни канали, включени в клетъчната мембрана, които поотделно могат да бъдат активирани. Един вид от тези молекули, наречени каналородопсин, са чувствителни към синя светлина и отварят йонни канали за Na^+ , от което следва деполяризация на клетъчната мембрана и процес на възбуждане, т.е. клетката се „включва“. Другият вид молекули, наречени халородопсин, отварят Cl^- -каналите, при което клетъчната мембрана се хиперполяризира и в клетката настъпва задържане – т.е. тя се „изключва“. На фигурата е показана и метричната скала, на която реално отговаря схематично показаният неврон

Тези оптогенетични подходи понастоящем се използват от множество изследователи в областта на невронауките из цял свят. Опсините са били използвани за проучване поведението на различни ниши организми като един кръгъл червей, паразит *Caenorhabditis elegans*, плодовата мушица *Drosophila*, която е класическият обект за генетични изследвания, рибата

Zebrafish и др. Установено е, че ларви на *Zebrafish* отговарят на светлинно гразене посредством фотопигмент в клетки, разположени във вътрешността на мозъка – в хипоталамуса и други структури. Тези опсин-съдържащи фоторецептори повлияват поведението, като при стимулация с оптогенетичен метод усилват плуването им към по-добре осветена област.

След пренасяне на опсиновите молекули в мембраните на мозъчни клетки по-ната-



Фиброоптични нишки, които със стереотаксична техника се вживяват в определени мозъчни структури (1 и 2). Те се свързват с лазерен източник на светлина (3 и 4)

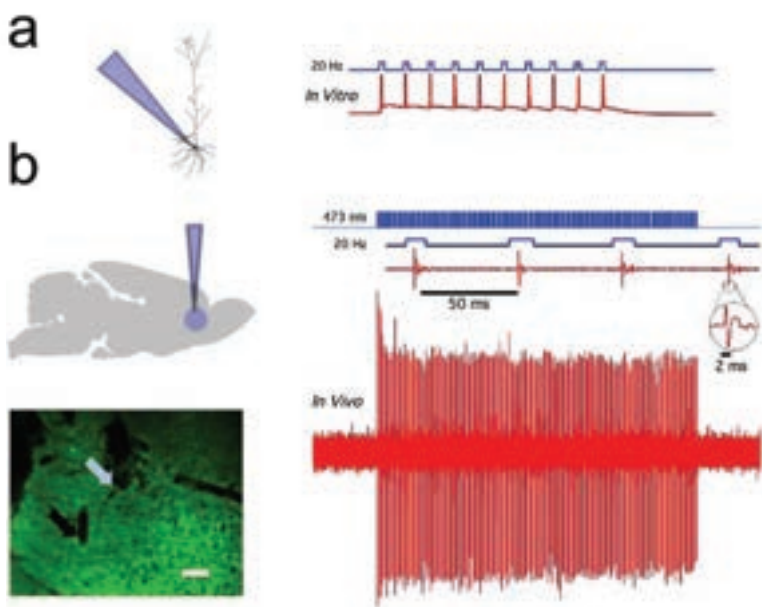
тък проблемът навлиза в сферата на технологичната реализация. Как светлинен лъч ще бъде фокусиран и насочен към такива клетки или определени структури в цялостния организъм. Светлинно въздействие вече е било широко използвано върху клетъчни култури при условия *in vitro*, където светлинните източници са ксенонни лампи, лазерни устройства, светлинни диоди и др. При цялостен организъм това светлинно въздействие се осъществява чрез вживяване в мозъчните структури на оптични фибри. За целта се използва стереотаксична техника. Главата на опитно животно под наркоза се фиксира в апарат, с който става насочване на вживяваните елементи (електроди, или канюли) към точно определени структури. За целта се използват специално разработени атла-

си за точната локализация на мозъчните структури – означават се координатите на корови полета, подкорови ядра, свързващи невронни пътища и др. Вживените елементи се фиксират към черепа, след което опитните животни имат свободно движение в клетките си.

Традиционният метод за изследване функцията на нервните клетки е те да бъдат стимулирани с електрически импулси или от тях да се отвеждат биоелектрични потенциали. Ефективността на тези методи е ограничена от техните пространствени и времеви параметри. Развиващата се съвременна технология, в която се използва светлочувствителността на белтъчни молекули, позволява контролирано да се включва или изключва активността на отделни неврони или групи от неврони. Това дава надежда на пациентите, страдащи от зрителни смущения, невродегенеративни заболявания, епилепсия или Паркинсонова болест, за намиране начини за лечение. Главна заслуга за тези разкрития имат сътрудници от Макс Планк института по биофизика във Франкфурт.

Общо за усилията на научната общност да се придвижи напред в познанията си не трябва да се забравя, че никога не може да се предвиди от началото на дълъг път, къде и кога той ще ни доведе до някакво ново постижение. Това в пълна сила важи за новите технологии и тяхното приложение.

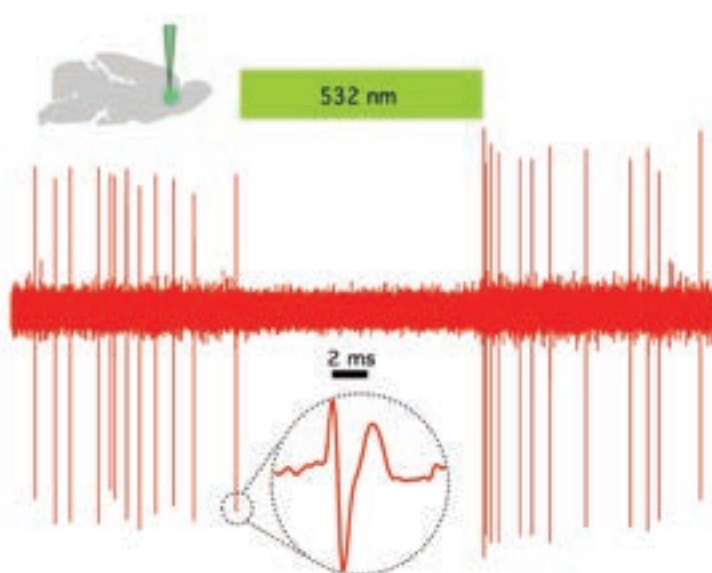
В международен план се обсъжда възможността да се финансират рискови проекти, защото обикновено тези, които кандидатстват с проекти, предпочитат сигурни неща. На годишната среща на обществата по невронауки (Society for Neuroscience annual meeting) през 2011 г. с 30 000 участници дори възниква предложението за кратко време да се обединят усилията на хиляди изследователи от много страни с идеята човечеството да се спаси от някои болести като болестта на Алцхаймер. В този смисъл някои практикуващи психиатри смятат, че въдъхваваща роля във фундаменталните и инженерните науки следва да има клиниката, т.е. новите технологии за регулация на мозъчните процеси да създават нови хоризонти за лечение.



Регистрация на ефект от светлинна стимулация

a) В препарат от челната област на мозъка (in vitro) с вградени молекули каналородопсин при светлинна стимулация се отвеждат и се регистрират електрични потенциали

b) Стимулация със синя светлина (473 nm). Чрез вживени електроди от цялостно животно (in vivo) се отвеждат електрични потенциали. Върху мозъчния срез стрелката показва мястото на вживената оптична фибра в мозък на мишка. Вдясно при различна скорост на регистрацията е показана биоелектричната активност при стимулация с честота 20 Hz



Регистрация на ефект от светлинна стимулация. Анесетизирана генно модифицирана мишка се стимулира с лазерен лъч. С този метод, отново на цялостно животно, е проведен експеримент, при който светлинната стимулация в продължение на 10 секунди със зелена светлина с определена дължина на вълната (532 nm) в област, регулираща движение в клетката, предизвиква прекратяване на двигателната активност. След края на стимулацията движенията се възобновяват. Съответно се променя и регистрираната в това време електроенцефалографска (ЕЕГ) активност

Основното приложение на оптогенетиката засега е чрез светлинно активиране на йонни канали или ензими да се промени биелектричната активност на нервни клетки. Пример за това е стимулиране на клетки в челната мозъчна област на мишки.

Сложността на структурата на мозъка е ненадмината. Поради това и новите технологии за изучаване на мозъка са несравнимо по-трудни от редица други технологии. Мозъкът е изграден от билиони неврони, взаимно свързани с връзки, по които протичат милисекундни електрични сигнали и се отделят огромен брой химични посредници. В тази сложност на структурата остава неясно как активността в специфични мозъчни клетки се превръща в мисли, чувства, памет и всякакви други психични преживявания. Още по-малко ясно има как в мозъка се създават психиатричните разстройства като депресия или шизофрения.

През 2009 г. изследователи от Департамента по когнитивна наука и изучаване на мозъка в Масачузетския технологичен институт (Robert Desimon и съпр.) за първи път публикуват данни за използването на оптогенетичния метод с въградени молекули каналородопсин при маймуни. Те успяват

да покажат ефективно въздействие върху неврони, без да се предизвиква невронно увреждане или имунна реакция от страна на нервната тъкан. В университета в Женева Кристиан Лушер (Christian Lüscher) и неговите сътрудници през 2011 г. регистрират у опитни животни усилено генериране на електрична активност при приемане на кокаин в мозъчна структура, свързана с удоволствени изживявания (ядро от базалните ганглии, наречено nucleus Accumbens). При съответно светлинно въздействие на клетъчно ниво в тези структури те успяват да преобърнат реакцията от прилагане на дрогата. В следващ етап от изследванията си те постигат чрез оптогенетика прекратяване на поведението на търсене на дрогата при опитни животни, плъхове, при които е създадена наркоманна зависимост.

В заключение новата технология, наречена оптогенетика, дава възможност от разстояние да се контролира активност на неврони, да се регулира генна активност и безжично да се правят мозъчни вживявания (поставяне на импланти). Дава възможност да се изучава мозъчната локализация на процеси, свързани с поведението, и даже то да се насочва в нови посоки. ■

ДОБИВАНЕ НА ЗЛАТО БЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ЦИАНИДИ

Открай време златото е играло привилеги-
рована роля в живота на човека. Той винаги е
търсел нови пътища за добиването му и се е
старал да подобри съществуващите методи
за неговото получаване. В природата златото
се среща най-вече като самороден метал, но
също и в някои руди. От рудите и от пясъците
на наносните находища благородният метал се
извлича по няколко начина. Различни са същест-
вуващите промишлени методи за добиване на
злато. И досега се използват флотационното
обогащаване, амалгамирането и цианирането.
Особено широко се прилага тъкмо методът на
цианирането, при който златото се разтваря в
разтвори на алкални цианиди, най-често натриев
цианид, в присъствието на кислород. При това
то се превръща в комплексно съединение, от
което пък се извлича в хода на няколко следващи
химични процеса.

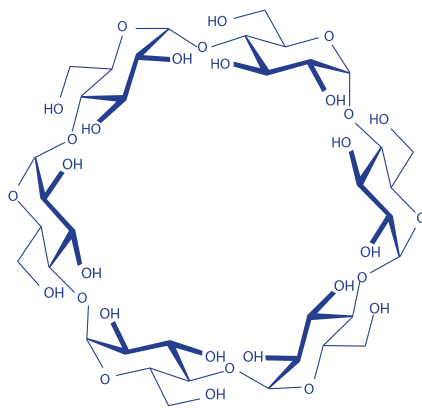
Очевидно технологията, при която се използ-
ват цианиди, крие сериозни рискове. От една
страна, алкалните цианиди са твърде токсични
соли и работата с тях застрашава здравето
и живота на заетите в производството ра-
ботници. Това налага вземането на системни
предпазни мерки. От друга страна, отпадните
води при технологичния процес замърсяват
околната среда с цианиди и други цианови съ-
единения, което също налага въвеждането на
предпазни мерки.

Рисквете, присъщи за използването понаст-
оящем технологии за добиване на злато, при
които се използват токсичните цианиди, биха
могли да се преодолеят, ако те бъдат заменени
с комплексообразовател, който да е значително
по-малко опасен както за здравето на човека,
така и за екологичното състояние на близката
до технологичните съоръжения околна среда.
Сполучливо решение на такава задача намират
изследователи от Северозападния университет
в Ивънстоун, Съединени щати (Northwestern
University of Evanston), които публикуват ре-
зультатите от своя труд в авторитетното

научно списание Nature Communications в майския
брой на 2013 г.

Ръководителят на американския научен ко-
лектив, д-р Фрейзър Стогарт (Fraser Stoddart)
подчертава, че е необходимо да бъдат създадени
нови, безопасни методи за извличане на злато.
Химичното съединение, което според учените
може успешно да замени цианидите в досегаш-
ната технология, е възлехидрат, алфа-цикло-
декстрин. Алфа-циклодекстринът се получава
от полизахарид, какъвто е нишестето. Веще-
ството, както доказват американските химици,
има свойството избирателно да свързва златни
йони, които се съдържат в разтвор, дори когато
в него се съдържат и различни други вещества.
При взаимодействието на златните йони с
алфа-циклодекстрина се получава комплексно
съединение, от което впоследствие може да се
изолира метално (елементно) злато. От еколо-
гична и токсикологична гледна точка разработ-
ката на Фрейзър Стогарт и сътрудници също
постига поставената цел – нито използваният
алфа-циклодекстрин, нито комплексът му със
златото са токсични.

По scinexx.de



Молекулата на алфа-циклодекстрина, който образува
избирателно комплекси със златото, представлява
голям пръстен, изграден от шест глюкозни остатъка