اوپتوژنتیک: کنترل عملکرد سلول های عصبی به وسیله نور و کاربرد های آن

Optogenetics: Controlling the Function of Neural Cells with Light and its Applications

محمد جواد اسلامی زاده[۱،۲]

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.
۲. آزمایشگاه ثبت داخل سلولی و پچ-کلمپ در بررسی بیماری های تحلیل رونده عصبی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

Mohammad Javad Eslamizade[1,2]

1. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.
2. Laboratory of Intracellular Recording and Patch Clamping in Neurodegenerative Diseases, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

تاریخ دریافت: ۱۵ تیر ۱۳۹۲
تاریخ پذیرش: ۱۰ مرداد ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه تغییر دادن عملکرد سلول های عصبی به وسیله تحریکات الکتریکی و عوامل دارویی در پژوهش های علوم اعصاب به منظور کاوش در چگونگی کارکرد مدارهای عصبی، رفتارهای مربوط به این مدارها و درمان بیماری های عصبی از موضوعات مورد توجه و علاقه پژوهشگران بوده است. قدرت روش های الکتروفیزیولوژی و فارماکولوژی در میزان دقت تحریکات سلول های عصبی از لحاظ زمانی و فضایی متفاوت است و در دو دهه اخیر دانشمندان سعی در بالا بردن هر کدام از این مزیت ها داشته اند. قدرت روش های اوپتوژنتیک در بدست گرفتن هم زمان کنترل زمانی و فضایی در تحریک سلول های عصبی است. در اوپتوژنتیک، پژوهشگر نور را به سلول های مورد نظر که با مولکول های حساس به نور همراه هستند می تاباند و عملکرد سلول های عصبی را تحت کنترل در می آورد. **نتیجه گیری** اخیرا از اوپتوژنتیک برای شناخت چگونگی کارکرد سلول ها، مدارها و سیستم های عصبی استفاده شده است. علاوه بر این، محققین در حال تلاش در جهت شناخت و درمان بیماری های سیستم عصبی با استفاده از اوپتوژنتیک هستند. در این مقاله مروری، به معرفی این روش نوین و کاربردهای درمانی احتمالی آن اشاره خواهد شد.

کلید واژه:
الکتروفیزیولوژی،
اوپتوژنتیک،
اوپسین.

Received: 6 Jul. 2013
Accepted: 1 Aug. 2013

ABSTRACT

Introduction Manipulating the function of neural cells via electrophysiology and pharmacological agents in neuroscience research have long been interesting in unraveling the function of neural circuits, behavior, and attributed disorders. The power of electrophysiology and pharmacologic methods in the manipulation of neural cells varies and therefore researchers have been attempting to enhance their knowledge in this field in recent two decades. Optogenetics has the advantage to take under control both the temporal and spatial resolution in manipulating desired neural cells. In optogenetics, control over the function of neural cells is possible through shining the light onto the cells that bear light sensitive molecules. **Conclusion** Optogenetics come to help the researchers to know how the neural cells, circuits, and systems work and there is an attempt to move toward the treatment of nervous system disorders by this technology. In this article, I reviewed optogenetics and its potential clinical applications.

Key words:
Electrophysiology,
Optogenetics,
Opsins.

• **نویسنده مسئول:**
محمد جواد اسلامی زاده
آدرس الکترونیکی: eslamizademj@gmail.com

Corresponding Author:
Mohammad Javad Eslamizade
E-mail: eslamizademj@gmail.com

مقدمه

بررسی ساختار و از آن جالب تر چگونگی عملکرد سیستم عصبی در تمام رده جانوران از چند قرن پیش تاکنون مورد توجه اهل علم و کاوشگران بوده است. در این راستا از سیستم های عصبی جانوران بسیار گوناگون، از گره های عصبی در بی مهرگانی چون دروسوفیلا ملانوگاستر[۱] (مگس سرکه)، حلزون آپلزیا[۲]، سی-الگانس[۳] گرفته تا سیستم های عصبی بسیار پیچیده در رده های جانوری بالا مانند موش، رت، انواع پریمات ها و حتی انسان استفاده شده است. در این مسیر، هرچه سیستم عصبی را از جانوران رده های پایین به سمت جانوران رده بالاتر کاوش کنیم نظاره گر افزایش تعداد سلول ها و گوناگونی آنها هستیم. از سوی دیگر این گوناگونی در رده های بالاتر باعث بوجود آمدن مدارهای عصبی پیچیده تر در روند تکامل شده است. بدون شک بررسی هر یک از این مدارهای[۴] عصبی که هر کدام مسئول یک و یا چند سری از رفتارها در حیوانات و همچنین در انسان هستند اهمیت کاربردی در شناخت چگونگی کارکرد و به احتمال فراوان نقش در درمان بیماری های مربوط به سیستم عصبی خواهند داشت.

تاکنون برای کاوش در چگونگی کارکرد بخش های گوناگون در سیستم عصبی از روش های متعدد استفاده شده است. روش های الکتروفیزیولوژی مانند ثبت پتانسیل میدانی[۵] از سلول های عصبی که از طریق سیناپس با هم ارتباط دارند و یا ثبت های داخل سلولی[۶] و پچ-کلمپ[۷] از تک سلول ها دارای قدرت بالایی در کنترل دقت زمانی[۸] تحریک الکتریکی و ثبت پاسخ ناشی از آن در حد میلی ثانیه دارند (۱). اگر مقصود در تحریک سلول های ناحیه خاصی از سیستم عصبی بررسی رفتارهای مربوط به آن ناحیه و یا مدار باشد، به ناگزیر، سلول ها و بافت های کنار ناحیه مورد نظر هم تحریک خواهند شد و از این بابت روش های الکتروفیزیولوژی دارای نقطه ضعفی هستند. از طرف دیگر در روش های فارماکولوژی، عوامل دارویی به دلیل داشتن حساسیت و ویژگی[۹] بالا در ایجاد واکنش لیگاند به گیرنده، پژوهشگر قدرت قابل توجهی در کنترل بر تحریک سلول های مورد نظر که از ویژگی های[۱۰] اسیدهای هسته ای پیامبر[۱۱] و پروتئینی منحصر بفرد هستند، خواهد داشت. اما روش های فارماکولوژیک برخلاف الکتروفیزیولوژی از بعد زمانی، دقت محدودتر و ضعیفی دارند.

۱. *Drosophila melanogaster*
۲. Aplysia
۳. *Caenorhabditis-elegans* (C-elegans)
۴. Circuit
۵. Field potential recording
۶. Interacellular receording
۷. Patch-clamp recording
۸. Temporal resolution
۹. Sensitivity and specificity
۱۰. Profile
۱۱. Messenger-Ribonucleic Acid (mRNA)

به عنوان مثال، پژوهشگر می خواهد نقش نورون های بیان کننده گیرنده های دوپامینی را در برانگیختن رفتارهای پاداش و تنبیه در یک رت بررسی کند. تزریق و تاثیر آگونیست و آنتاگونیست های ویژه دوپامینی بر نورون های ذکر شده به مدت چند ثانیه مشخص برای تحریک و مهار هسته تگمنتال شکمی بدون شک با استفاده از روش های یاد شده ممکن نیست.

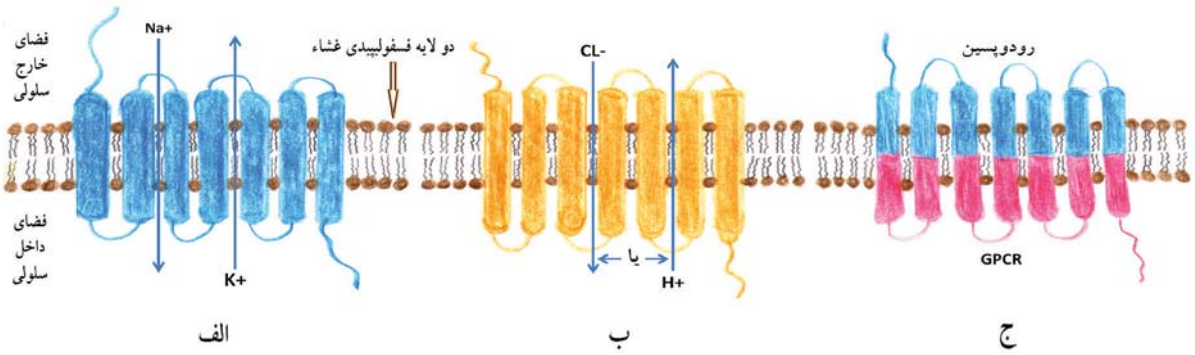
در سال ۲۰۰۵ مقاله ای در مجله Nature Neuroscience به چاپ رسید و روش نوینی را برای اولین بار معرفی کرد (۲). در این مقاله کارل دیسروث[۱۲] و گروه چهار نفره کوچک او با دانش پیشین از کشف رودوپسین ها از جلبک سبز (۳)، رودوپسین-۲ را با لنتی ویروس به نورون های کشت داده شده هیپوکمپ آغشته کردند. پس از هفت روز، با تاباندن نور آبی با پهنای ۴۹۰ تا ۵۱۰ نانومتر به این سلول ها، با استفاده از دستگاه پچ-کلمپ قرض گرفته شده از ریچارد تسین[۱۳] شاهد شلیک پتانسیل های عمل از این سلول ها بودند (۲). کارل نام روش ابدائی خودش را "اوپتوژنتیک[۱۴]" گذاشت. قدرت روش اوپتوژنتیک به داشتن همزمان کنترل زمانی و فضایی[۱۵] به منظور تحریک و یا مهار سلول های مورد نظر در بازه زمانی مورد نظر است.

همانطور که از نام واژه "اوپتوژنتیک" بر می آید این روش از ترکیبی از روش های تاباندن نور "اوپتو-" برای تحریک و یا مهار و دست کاری های ژنی "-ژنتیک" به منظور محدود کردن تاثیر نور بر سلول های مورد نظر است. در قسمت های بعدی مقاله به بررسی جزئیات این روش نوین، شامل مروری بر انواع مولکول های حساس به نور، چگونگی القاء این مولکول ها به سلول های مورد نظر، ابزارها و چگونگی تاباندن نور به سلول ها و نواحی مورد نظر خواهیم پرداخت. در نهایت، هر چند کوتاه بر کاربرد های این روش نوین در درمان احتمالی بیماری های عصبی گذری داریم.

اوپسین ها: ابزاری قدرتمند در اوپتوژنتیک

اوپسین ها[۱۶] مولکول های پروتئینی هستند که پس از ساخته شدن به سمت غشاهای بیولوژیک رفته و در آن قرار می گیرند. ساختار عمومی اوپسین ها همانند گیرنده های هفت بار عبور کننده از عرض غشایی است. توجه به اوپسین ها ابتدا از عملکرد آنها در رفتار تک سلولی ها و جلبک ها شروع شد. این سلول ها در پاسخ به نور شروع به حرکت می کنند (۴). توالی اوپسین ها امروزه مشخص شده و برای کاربرد در اوپتوژنتیک معمولا از اوپسین های تغییر داده شده توسط مهندسی ژنتیک استفاده می شود. به طور کلی، اوپسین ها را بر اساس تغییری که در اختلاف

۱۲. Karl Deisseroth
۱۳. Richard Tsien
۱۴. Optogenetics
۱۵. Spatial
۱۶. Opsins



تصویر ۱. ساختار عمومی سه گروه عمده اوپسین ها. در این سه گروه ساختار اوپسین ها به صورت هفت بار عبور کننده از عرض غشایی است. **الف.** شکل و ساختار عمومی اوپسین های دپولاریزه کننده غشای سلول. با برخورد نور به این اوپسین ها، کانال وسط آنها باز شده و کاتیون ها با انتشار ساده از آنها عبور کرده و غشای سلول دپولاریزه می شود. **ب.** شکل و ساختار عمومی اوپسین های هیپرپولاریزه کننده غشای سلول. این اوپسین ها به دو گروه تقسیم می شوند؛ برخی به صورت کانال بوده، با برخورد نور باز شده و آنیون ها، مانند یون های کلری (Cl^-)، با انتشار ساده به داخل سلول راه می یابند. دوم گروهی هستند که به صورت پمپ عمل کرده و یون های پروتون (H^+) را به خارج از سلول هدایت می کنند. نتیجه عمل هر دو گروه از این اوپسین ها هیپرپلاریزاسیون غشای سلول است. **ج.** شکل و ساختار عمومی اوپسین هایی که پیامرسانی سلولی را دستکاری می کنند. در این گروه از اوپسین ها، ژن رودوپسین به همراه ژن گیرنده متصل شده به جی-پروتئین (GPCR) مورد نظر بیان و کونژوگه می شود. در این روش با برخورد نور به اوپسین، گیرنده فعال شده و پیامرسانی سلولی پایین دست خود را به راه می اندازد.

ولتاژ دو سوی غشا ایجاد می کنند و یا باعث تغییر در پیامرسانی[۱۷] سلولی می شوند، می توان به سه دسته عمده تقسیم بندی کرد (تصویر ۱): اوپسین های دپولاریزه کننده غشای سلولی، اوپسین‌های هیپرپولاریزه کننده غشای سلولی و اوپسین هایی که پیامرسانی سلولی را دستکاری می کنند.

اوپسین های دپولاریزه کننده غشای سلولی

دسته اول اوپسین‌هایی هستند که ساختار یک کانال را دارند و با برخورد نور به آنها باز شده و کاتیون‌ها را به داخل سلول هدایت می‌کنند و با این عمل منجر به دپولاریزه شدن غشای سلول می‌گردند (تصویر ۱: الف). نمونه بارز و پر استفاده‌ترین اوپسین در این گروه، چنلرودوپسین-۲ (ChR2)[۱۸] است که به صورت یک کانال کاتیونی غیراختصاصی عمل می‌کند. این پروتئین به طور طبیعی در جلبک سبزی به نام کلامیدوموناس رئینهاردتی[۱۹] بیان می‌شود (۳). نور آبی با طول موج ۴۸۰ نانومتر کروموفور تمام-ترانس-رتینال[۲۰] را در ساختار این اوپسین به ۱۳-سیس-رتینال[۲۱] تبدیل کرده و باعث باز شدن کانال و هدایت کاتیون‌ها از عرض غشای سلول می‌شود. پس از چند میلی ثانیه، واکنش بیان شده به حالت عکس برگشته و انتشار یون‌ها از عرض غشا متوقف می گردد.

دلایل چندی وجود دارند که باعث شده تا ChR2 به عنوان پر کاربردترین اوپسین برای تحریک و دپولاریزه کردن سلول‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرد. نخست اینکه کینتیک این کانال سریع بوده و در موقع تابیدن و قطع نور به سرعت پاسخ می‌دهد. بنابراین می‌توان حتی با تاباندن نور آبی به مدت چند میلی‌ثانیه، یک پتانسیل عمل[۲۲] ایجاد کرد. دوم اینکه، این کانال در محیط کشت و همچنین در بافت عصبی مهره داران به اندازه کافی رتینال در دسترس دارد تا به طور طبیعی عمل کند. با این وجود، در مدل‌های با بی مهرگان بایستی رتینال و یا همان ویتامین-آ را به سیستم افزود. سوم اینکه، ChR2 را می توان با استفاده از ویروس‌ها و یا به صورت ژنتیکی به سلول‌های مورد نظر وارد کرد و این کار هم از طریق اجزاء تنظیم ژنی بالادست ژن مورد نظر صورت می‌گیرد.

علاوه بر ChR2، اوپسین‌های دیگری هم کشف شده اند که خصوصیات ویژه ای دارند و در اینجا لازم است به برخی از آنها اشاره داشته باشیم. ولوکس چنلرودوپسین-۱ (VChR1)[۲۳] از جلبک سبز چند سلولی به نام ولوکس کارتری[۲۴] جدا شده و علاوه بر جذب نور آبی، می تواند نور با طول موج تا ۵۳۵ نانومتر را هم جذب کند (۵). این ویژگی باعث شده تا بتوان این اوپسین را در عمق بیشتری در بافت مورد نظر با تاباندن نور زرد تحریک کرد. در نتیجه، با استفاده از دو اوپسین توصیف شده می‌توان دو سری سلول با هویت متفاوت را تحریک کرد. اوپسین‌های دیگری با استفاده از دست کاری ژنتیکی ایجاد شده اند که با برخورد نور، فعال شده ولی با قطع شدن آن، غیرفعال شدن اوپسین پس از مدت طولانی، حدود ۳۰ تا ۶۰ ثانیه، اتفاق می افتد. به این اوپسین‌ها، اوپسین‌های با عملکرد پله ای[۲۵] گفته می شود (۶). با استفاده از این اوپسین‌ها می‌توان سلول‌های مورد نظر را به مدت

۱۷. Signal transduction
۱۸. Channelrhodopsin-2
۱۹. *Chlamydomonas reinhardtii*
۲۰. All-*trans*-retinal
۲۱. 13-*cis*-retinal
۲۲. Action potential
۲۳. Volvox channelrhodopsin-1
۲۴. *Volvox carteri*
۲۵. Step-Function-Opsins (SFOs)

طولانی‌تری دپولاریزه کرد در حالیکه از صدمات ناشی از نور ممتد هم جلوگیری می‌شود. اوپسین‌های دیگری هم تولید شده اند که به همین صورت در سرعت فعال و غیرفعال شدن و همچنین در محل قرار گرفتن نهایی اوپسین (جسم سلولی، دندریت و یا پایانه‌های آکسونی) در سلول مورد نظر با هم متفاوت هستند.

اوپسین های هیپرپولاریزه کننده غشای سلولی

دسته دوم، اوپسین هایی هستند که از لحاظ ساختار دو گونه هستند، یک سری همانند کانال و یک سری به صورت پمپ عمل می کنند (تصویر ۱: ب). با برخورد نور به این اوپسین ها، آنیون ها به داخل سلول هدایت شده و باعث هیپرپولاریزاسیون غشای سلول می شوند. نمونه بارز در این گروه، هالورودوپسین[۲۶] است که به طور طبیعی در باکتری به نام هالوباکتریوم ناترونوموناس فارونیس[۲۷] بیان می شود. این اوپسین یک پمپ بوده که با برخورد نور زرد با حداکثر طول موج ۵۷۰ نانومتر به آن، کروموفور تمام-ترانس-رتینال به ۱۳-سیس-رتینال تغییر یافته و با صرف انرژی یون های کلری را به داخل سلول پمپ می کند، در نتیجه سلول های مورد نظر هیپرپولاریزه می شوند (۷). هالورودوپسین های دیگری با استفاده از مهندسی ژنتیک به وجود آمده اند که از لحاظ محل قرارگیری در سلول و میزان هدایت[۲۸] و سرعت جابجایی یون کلر تغییراتی یافته اند (۸).

اوپسین هایی که پیامرسانی سلولی را دستکاری می کنند

علاوه بر تغییراتی که در اختلاف پتانسیل دو سوی غشاء در عملکرد سلول های عصبی دخیل هستند، تغییر در بیان ژن و بیوشیمی سلول ها نیز مهم و در کارکرد سلول شرکت دارند. برای همین اوپسین هایی برای دست کاری در پیامرسانی سلول های عصبی به کار گرفته شده اند (تصویر ۱: ج). این اوپسین ها دسته سوم از اوپسین هایی هستند که به صورت اتصال به گیرنده های متصل شده به جی-پروتئین های در سطح غشای سلول باعث به راه افتادن و یا قطع شدن پیامرسانی سلولی می شوند. برای این منظور اوپسین را به گیرنده متصل به جی-پروتئین مورد نظر کونژوگه کرده و در سلول های مورد نظر بیان می کنند (۱۱-۹). اولین بار از این روش برای کنترل پیامرسانی سلولی با گیرنده های آدرنرژیکی α_{1a} و β_2 استفاده شد (۱۳، ۱۲).

در مجموع اینکه اوپسین ها مولکول های پروتئینی حساس به نور هستند که در چند سال اخیر برای تغییر دادن عملکرد سلول ها مورد استفاده قرار گرفته اند. پژوهشگران به اوپسین های طبیعی که در جلبک ها و دیگر سلول های حساس به نور یافت می شوند بسنده نکرده و در حال تولید مصنوعی و یا حتی تغییر دادن توالی ژنی اوپسین های طبیعی یافت شده هستند تا کینتیک و بیوفیزیک این مولکول ها را مطابق با نیاز پژوهشگر در اشراف بر عملکرد سلول های مورد نظر در بازه زمانی مورد نظر تغییر دهند. در اینجا پرسش دیگر این است که چگونه می توان اوپسین ها را به سلول های مورد توجه پژوهشگر در یک موضع ویژه در بافت عصبی فرستاد و یا القاء کرد. در قسمت بعدی این مقاله، مروری بر این موضوع مهم خواهیم داشت.

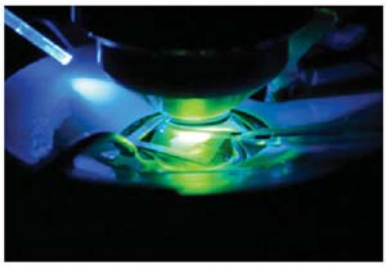
رساندن اوپسین‌ها به سلول‌های عصبی مورد پژوهش در اوپتوژنتیک

معمولترین روش رساندن ژن در اوپتوژنتیک از طریق ویروس‌های غیر قابل تکثیر است. لنتی-ویروس ها[۲۹] و آدنو-اسوسیتد ویروس ها[۳۰] پراستفاده ترین این ویروس ها هستند. در این روش ویروس حاوی توالی اسید نوکلئوتیدی اوپسین و پروموتور و یا قطعه انهانسر[۳۱] ژن مورد نظر است (۱۴). به طور مثال، توالی اسیدهای نوکلئوتیدی ChR2 و پروموتور و یا قطعه انهانسر ژن گیرنده دوپامینی نوع ۱ باعث می شود تا این اوپسین در نورون های حاوی گیرنده دوپامینی نوع ۱ بیان گردد. روش دیگر استفاده از مهندسی ژنتیک و موش ترانسژن در وارد کردن ژن اوپسین به توالی پروموتر ژن مورد نظر در موش است (۱۴).

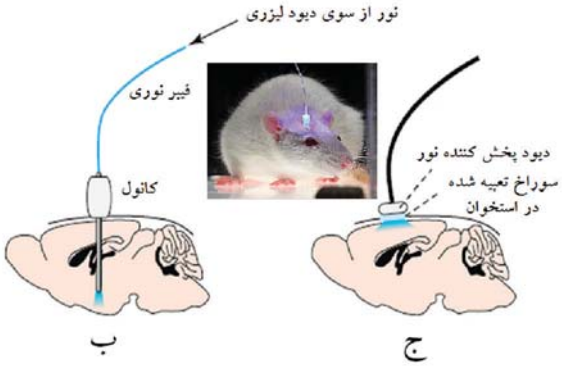
از روش های دیگر می توان استفاده از الکتروپوراسیون در رحم[۳۲] برای وارد کردن اوپسین به سلول های مورد نظر در یک مرحله از رشد جنینی نام برد. نمونه جالب از این مورد را می توان برای وارد کردن اوپسین ChR2 به سلول های ویژه ای از لایه های قشر مغز ذکر کرد (۱۶، ۱۵). روش های آناتومیکی مانند همراه کردن توالی اوپسین به آگلوتینین و یا به قطعه C سم تتانوس برای رساندن آن به نواحی سلولی مورد نظر از طریق جابجایی رو به جلو[۳۳] و یا رو به عقب[۳۴] در مسیر رشته های عصبی نیز از اهمیت قابل توجه و پر قدرتی در هدف قرار دادن سلول های عصبی مورد نظر به حساب می آیند (۸).

قابل توجه اینکه به دلایل گوناگون مانند افزایش قدرت و انتشار اوپسین در سلول های عصبی مورد نظر، می توان از ترکیبی از روش های نام برده استفاده کرد (۱۵). در پروژه هایی که از روش‌های اوپتوژنتیک بهره می برند، اولین قدم پس از وارد ساختن اوپسین به سلول های مورد پژوهش، محقق بایستی از جایگیری درست اوپسین در محل مورد انتظار اطمینان حاصل کند. برای همین استفاده از ایمونوهیستوشیمی[۳۵] و هیبریداسیون در محل[۳۶] از روش‌های پر کاربرد به همراه

۲۶. halorhodopsin
۲۷. Halobacterium *Natronomonas pharaonis*
۲۸. Conductance
۲۹. Lentivirus
۳۰. Adeno-associated virus
۳۱. Enhancer element
۳۲. In utero electroporation
۳۳. Antrograde
۳۴. Retrograde
۳۵. immunohistochemistry
۳۶. In situ hybridization



الف



تصویر ۲. نور پردازی محل و بافت عصبی مورد پژوهش در اوپتوژنتیک. **الف.** برای تابانیدن نور به سلول های محیط کشت و یا برش های بافت عصبی در الکتروفیزیولوژی، نور از لامپ های هالوژن-گزنون، دیود های پخش کننده نور و یا لیزر از طریق مسیر میکروسکوپ به سلول ها تابیده می شود. **ب.** در بررسی های مربوط به نقش سلول های مورد نظر در رفتار حیوان، برای هسته های عمقی مغز معمولا از یک فیبر اوپتیکی که به منبع نوری، دیود لیزر و یا دیود پخش کننده نور، متصل شده استفاده می شود. انتهای فیبر با استفاده از یک کانال تثبیت شده در جمجمه در هسته عمقی قرار می گیرد. **ج.** در صورتی که محل مورد نظر سلول های سطحی در قشر مغز باشد از یک دیود پخش کننده نور که در منفذ ایجاد شده استخوان جمجمه، بالای قشر مغز نصب می شود استفاده می گردد. در وسط تصویر، نمایی از فیبر نوری و کانول به کار رفته در یک رت نشان داده شده است.

اوپتوژنتیک می باشند. تا اینجا از این مقاله مروری بر معرفی روش اوپتوژنتیک، عناصر حساس به نور و چگونگی رساندن آنها به سلول های مورد نظر پرداختیم. در قسمت بعد به روش های مربوط به چگونگی رساندن نور با طول موج لازم به محل و سلول های مورد پژوهش خواهیم پرداخت.

نور پردازی محل و بافت عصبی مورد پژوهش در اوپتوژنتیک

هدف قرار دادن سلول های عصبی مورد نظر در اوپتوژنتیک یک طرف این داستان مهیج است. طرف دیگر این داستان درباره چگونگی تابانیدن نور با ویژگی های لازم برای تحریک اوپسین می باشد. برای تابانیدن نور به سلول های محیط کشت و یا برش‌های بافت عصبی در الکتروفیزیولوژی، نور از لامپ‌های هالوژن-گزنون[۳۷]، دیود های پخش کننده نور[۳۸] و یا لیزر از طریق مسیر میکروسکوپ به سلول ها تابیده می شود (تصویر ۲. الف).

در بررسی های مربوط به نقش سلول های مورد نظر در رفتار حیوان، بر اساس اینکه محل مورد نظر برای نورپردازی در بافت عصبی کجا واقع شده دو روش کلی وجود دارد. برای هسته های عمقی مغز معمولا از یک فیبر اوپتیکی که به منبع نوری، دیود لیزر و یا دیود پخش کننده نور، متصل شده استفاده می شود. انتهای فیبر با استفاده از یک کانال تثبیت شده در جمجمه در هسته عمقی قرار می گیرد (تصویر ۲، ب). نفوذ نور به سلول های مورد نظر و میزان تخریب بافت به دلیل کار گذاشتن کانال از طریق جراحی استریوتاکسی از مباحث مورد اهمیت تکنیکی در رساندن نور در حیوان زنده است. در صورتی که محل مورد نظر سلول های سطحی در قشر مغز باشد از یک دیود پخش کننده نور که در منفذ ایجاد شده استخوان جمجمه، بالای قشر مغز نصب می شود استفاده می گردد (تصویر ۲، ج).

استفاده از اوپتوژنتیک در شناخت و درمان بیماری ها

هرچند تاکنون طراحی های مختلفی در بکارگیری از اوپسین ها انجام شده اند (۱۷)، ولی از همه آنها به اندازه کافی در مطالعات با مدل های حیوانی استفاده نشده است. ساده ترین و پر استفاده ترین شکل استفاده از اوپتوژنتیک، وارد کردن اوپسین مورد نظر به گروهی از نورون ها، تابانیدن نور به آنها و بررسی تاثیر الکتروفیزیولوژی و یا رفتاری ناشی از تحریک و یا مهار این نورون‌ها بر نورون های پایین دست می باشد. در اینجا به ذکر نمونه هایی از این استراتژی می پردازیم.

اولین موارد استفاده از این مدل برای شناسایی عملکرد سیستم عصبی شامل سه مطالعه ای بودند که از لحاظ نوروآناتومی عملکردی و روش بررسی، مورد توجه وسیعی قرار گرفتند. این مطالعات شامل ارتباط سیناپسی پیاز بویایی با قشر پیریفورم (۱۸)، ارتباطات سیناپسی نورون های مختلف قشر مغز (۱۹) و بررسی مدارهای نورونی از یک نیم کره به نیم کره دیگر قشر مغز (۲۰) بودند. پس از این، محققین درصدد استفاده از این روش برای بررسی های فیزیولوژیک و شناخت علل بیماری های روانشناختی[۳۹] و عصبی[۴۰] و همچنین استفاده از آنها در درمان بیماری ها بر آمدند. از مطالعات جالب توجه اخیر در استفاده از این استراتژی در بررسی مکانیسم افسردگی است. تحریک

۳۷. Halogen/Xenon arc lamps
۳۸. Light-emitting diodes
۳۹. Psychiatric
۴۰. Neurologic

مرحله ای هسته تگمنتال شکمی که به هسته آکومبنس می رود، نه مسیر هسته تگمنتال شکمی به قشر پرفرونتال داخلی، باعث علائم افسردگی، و مهار آن باعث افزایش چابکی در موش می شود (۲۱). مطالعه گروه دیگری ولی مشابه با مطالعه پیشین هم نشان دهنده تاثیر مسیر دوپامینرژیک هسته تگمنتال شکمی به هسته آکومبنس در تغییرات خلق و علائم افسردگی است (۲۲). خواب و بیداری ناشی از تحریک اوپتوژنتیک نورون‌های بیان کننده هیپوکرتین[۴۱] در هیپوتالاموس موش (۲۳) و همچنین، تحریک مرحله ای[۴۲] نورون های دوپامینی در هسته تگمنتال شکمی در ایجاد رفتار پاداش در موش شرطی شده (۲۴) از نمونه های دیگر استفاده از اوپتوژنتیک در شناخت عملکرد های فیزیولوژیک مغز است. اخیرا با استفاده از هدف قرار دادن انتخابی نورون های بیان کننده گیرنده های دوپامینی D1 و D2 در هسته استریاتوم نشان داده شد که تحریک نورون‌های بیان کننده D2، مسیر غیرمستقیم هسته‌های قاعده‌ای[۴۳]، علائم شبه پارکینسون ایجاد می‌کند. از طرفی هم نشان داده شد که تحریک نورون های بیان کننده D1، مسیر مستقیم هسته‌های قاعده ای[۴۴]، در یک مدل پارکینسونی، علائم بیماری را به طور کامل کاهش می دهد (۲۵). مطالعه جالب توجه دیگر نشان داد که تحریک سلول های گرانوله در ژیروس دندانه‌ای هیپوکمپ برای ایجاد حافظه ترس در موش لازم و کافی است (۲۶).

از مطالعات عمده دیگر که می توان به آنها برای استفاده های بالینی بالقوه امیدوار بود برگرداندن حساسیت به نور در سلول‌های شبکیه تحلیل رفته[۴۵] (۲۹-۲۷)، برگرداندن ریتم تنفس به موش دچار صدمه به نخاع توسط تابانیدن نور به سلول های حاوی ChR2 در هسته حرکتی فرنیک (۳۰)، شناخت و تنظیم خواب و بیداری (۳۱، ۲۳)، شناخت مکانیسم های نورونی در ایجاد ریتم گاما در قشر مغز و ارتباط آن با بیماری هایی مانند اوتیسم و اسکیزوفرنی (۳۳، ۳۲) را می توان نام برد.

تلاش چشمگیری در استفاده از اوپتوژنتیک در شناخت مکانیسم های عصبی و درمان بیماری صرع وجود دارد. یکی از مطالعات اخیر در این زمینه با استفاده از هالورودوپسین در سلول های هیپوکمپ در کشت اورگانوتیپیک[۴۶] توانست از فعالیت صرعی جلوگیری کند (۳۴). مطالعه ای دیگر در رت هایی که با پیلوکارپین-لیتیوم دچار صرع شده بودند نشان داد که با استفاده از تحریک هالورودوپسین بیان شده در سلول های هیپوکمپی می توان فعالیت صرعی را به شدت کاهش داد (۳۵). علاوه بر مهار سلول های تحریکی، تحریک سلول های گابائرژیک هم می تواند با استفاده از اوپتوژنتیک در درمان صرع مورد استفاده قرار گیرد (۳۶). مطالعه جالب توجه اخیر نشان داد که سلول های تالاموسی پس از سکته در قشر مغز دچار افزایش تحریک پذیری می شوند و با استفاده از یک روش مدار بسته اوپتوژنتیک[۴۷] می توان با مهار کردن فعالیت نورون های تالاموسی، فعالیت تشنجی را کاهش داد (۳۷).

استراتژی جالب توجه دیگر در استفاده از اوپتوژنتیک، هدف قرار دادن پایانه های آکسونی برای بررسی قدرت سیناپس ها در تحریک و یا مهار نورون های پس-سیناپسی است. در مطالعه ای با استفاده از همین استراتژی، مشخص شد که تحریک نورون های لایه پنج قشر حرکتی و یا پایانه های آکسونی این نورون ها که به هسته زیر تالاموسی[۴۸] می روند، مکانیسم احتمالی در تحریک عمقی مغز[۴۹] با فرکانس بالا در درمان اختلالات حرکتی است (۳۸). در مطالعه اخیر دیگری با همین روش پایانه های آکسونی نورون های تالاموسی-قشری و همچنین پایانه های آکسونی قشری-تالاموسی با ChR2 مورد هدف قرار گرفته و به این صورت مدارهای تحریکی و مهاری در این مدار عصبی مورد مطالعه قرار گرفتند (۳۹). برای مطالعه بیشتر درباره اوپتوژنتیک و کاربردهای آن به مقالات مروری (۴۹-۴۰) مراجعه شود.

نتیجه گیری

حدود هفت سال است که از ابداء روش نوین اوپتوژنتیک می‌گذرد. در این مدت نه چندان طولانی پیشرفت شگرفی در رشد و استفاده از این روش وجود داشته و به خوبی توانسته قدرت خود را در پاسخ دادن به سوالات فراوان در حیطه علوم اعصاب نشان دهد. از این روش در جانداران اولیه و غیر پستانداران گرفته تا پستانداران و اخیرا در پریمات ها استفاده شده است (۵۰، ۵۱). این مقاله مروری برای اولین بار به معرفی اوپتوژنتیک به زبان فارسی پرداخته و برای تمرکز در معرفی این موضوع، به یافته های به دست آمده از نورون ها بسنده کرده است. با این حال لازم به ذکر است که اوپتوژنتیک نه تنها در نورون‌ها بلکه در سلول های آستروسیتی، به عنوان جزء مهمی در ساختارهای مدارهای عصبی و سیناپس ها، به عنوان ابزاری در پاسخ دادن به سوالات فراوان کمک کرده است (برای مطالعه درباره استفاده از اوپتوژنتیک در سلول های آستروسیتی رجوع شود به منبع ۵۲). دانشمندان با تمرکز بر دانش بیولوژی سلولی و مولکولی در دستکاری مولکول های حساس به نور سعی دارند تا ابزارهای حساس تر و اختصاصی تر تولید کنند. از طرفی هم شرکت هایی وجود دارند که منابع و وسایل نوری قدرتمند را تولید و مهندسی می کنند. در نتیجه، با ورود این روش نوین به عرصه علم می توان گفت رشته های متعددی بوجود آمده اند تا از اوپتوژنتیک در

۴۱. Hypocretin-expressing neurons
۴۲. Phasic
۴۳. Indirect pathway
۴۴. Direct pathway
۴۵. Degenerated
۴۶. Organotypic culture
۴۷. Closed-loop optogenetic control
۴۸. Subthalamic nucleus
۴۹. Deep brain stimulation

شناخت مکانیسم‌های طبیعی، روند های بیماری زایی و همچنین در درمان بیماری های مربوط به سیستم عصبی استفاده ببرند. بدون شک، چگونگی رساندن اوپسین ها به موضع مورد نظر و نورپردازی به آن در حیوانات بسیار ساده تر از این عمل، در انسان است و استفاده از اوپتوژنتیک در درمان بیماری های عصبی در انسان نیاز به مطالعات و تلاش فراوانی دارد. اخیرا دانشمندان در حال تولید ویروس هایی هستند که با اعمال کنترل بر رشد آنها بتوان از آنها در رساندن مولکول های حساس به نور به مناطق مورد نظر در بافت عصبی انسان استفاده کرد (۵۳). در این مقاله سعی بر آن شد تا با مروری هر چند کوتاه، شناختی از روش اوپتوژنتیک و کاربرد های آن به دانشمندان و پژوهشگران ایرانی ارائه شود.

منابع

1. Scanziani M, Hausser M. Electrophysiology in the age of light. Nature. 2009; 461: 930-9.
2. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci. 2005; 8: 1263-8.
3. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 13940-5.
4. Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 8689-94.
5. Zhang F, Prigge M, Beyrière F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, et al. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carteri. Nat Neurosci. 2008; 11: 631-3.
6. Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches. Nat Neurosci. 2009; 12: 229-34.
7. Bamberg E, Tittor J, Oesterhelt D. Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 639-43.
8. Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, et al. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. Cell. 2010; 141: 154-65.
9. Kramer RH, Fortin DL, Trauner D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. Curr Opin Neurobiol. 2009; 19: 544-52.
10. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3: 639-50.
11. Kim JM, Hwa J, Garriga P, Reeves PJ, RajBhandary UL, Khorana HG. Light-driven activation of beta 2-adrenergic receptor signaling by a chimeric rhodopsin containing the beta 2-adrenergic receptor cytoplasmic loops. Biochemistry. 2005; 44: 2284-92.
12. Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. Nature. 2009; 458: 1025-9.
13. Oh E, Maejima T, Liu C, Deneris E, Herlitze S. Substitution of 5-HT1A receptor signaling by a light activated G protein-coupled receptor. J Biol Chem. 2010; 285: 30825-36.
14. Luo L, Callaway EM, Svoboda k. Genetic dissection of neural circuits. Neuron. 2008; 57: 634-60.
15. Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, et al. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. Nat Protoc. 2010; 5: 439-56.
16. Adesnik H, Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. Nature. 2010; 464: 1155-60.
17. Carter ME, de Lecea L. Optogenetic investigation of neural circuits in vivo. Trends Mol Med. 2011; 17: 197-206.
18. Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, et al. In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. Neuron. 2007; 54: 205-18.
19. Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, et al. High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 8143-8.
20. Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. Nat Neurosci. 2007; 10: 663-8.
21. Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, et al. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. Nature. 2013; 493: 532-6.
22. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behavior. Nature. 2013; 493: 537-41.

23. Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. Nature. 2007; 450: 420-4.

24. Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L, et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. Science. 2009; 324: 1080-4.

25. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. Nature. 2010; 466: 622-6.

26. Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB1, Govindarajan A, Deisseroth K, et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. Nature. 2012; 484: 381-5.

27. Lagali PS, Balya D, Awatramani GB, Münch TA, Kim DS, Busskamp V, et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. Nat Neurosci. 2008; 11: 667-75.

28. Tomita H, Sugano E, Isago H, Hiroi T, Wang Z, Ohta E, et al. Channelrhodopsin-2 gene transduced into retinal ganglion cells restores functional vision in genetically blind rats. Exp Eye Res. 2010; 90: 429-36.

29. Busskamp V, Duebel J, Balya D, Fradot M, Viney TJ, Siegert S, et al. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. Science. 2010; 329: 413-7.

30. Alilain WJ, Li X, Horn KP, Dhingra R, Dick TE, Herlitze S, et al. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury. J Neurosci. 2008; 28: 11862-70.

31. Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. Nat Neurosci. 2010; 13: 1526-33.

32. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature. 2009; 459: 698-702.

33. Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. Nature. 2009; 459: 663-7.

34. Tønnesen J, Sørensen AT, Deisseroth K, Lundberg C, Kokaia M. Optogenetic control of epileptiform activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106: 12162-7.

35. Sukhotinsky I, Chan AM, Ahmed OJ, Rao VR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Optogenetic delay of status epilepticus onset in an in vivo rodent epilepsy model. PLoS One. 2013; 8: e62013.

36. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I. On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. Nat Commun. 2013; 4: 1376.

37. Paz JT, Davidson TJ, Frechette ES, Delord B, Parada I, Peng K, et al. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. Nat Neurosci. 2013; 16: 64-70.

38. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. Science. 2009; 324: 354-9.

39. Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. Neuron. 2010; 65: 230-45.

40. Fiala A, Suska A, Schluter OM. Optogenetic Approaches in Neuroscience. Cur Biol. 2010; 20: R897-903.

41. Tye KM, Deisseroth K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. Nat Rev Neurosci. 2012; 13: 251-66.

42. Kravitz AV, Kreitzer AC. Optogenetic manipulation of neural circuitry in vivo. Curr Opin Neurobiol. 2011; 21: 433-9.

43. Mancuso JJ, Kim J, Lee S, Tsuda S, Chow NBH, Augustine GJ. Optogenetic probing of functional brain circuitry. Exp Physiol. 2010; 96: 26-33.

44. Stamatakis AM, Stuber GD. Optogenetic Strategies to Dissect the Neural Circuits that Underlie Reward and Addiction. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2: a011924.

45. Bernstein JG, Boyden ES. Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. Trends Cogn Sci. 2011; 15: 592-600.

46. Bernstein JG, Garrity PA, Boyden ES. Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits. Cur Opin Neurobiol. 2011; 22: 1-11.

47. Yizhar O, Fenno LE, Davidson TJ, Mogri M, Deisseroth K. Optogenetics in Neural Systems. Neuron. 2011; 71: 9-34.

48. Fenno F, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics. Annu Rev Neurosci. 2011; 34: 389–412.

49. Mei Y, Zhang F. Molecular tools and approaches for optogenetics. Biol Psychiatry. 2012; 71: 1033-8.

50. Han X, Qian X, Bernstein JG, Zhou HH, Franzesi GT, Stern P, et al. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. Neuron. 2009; 62: 191-8.

51. Gerits A, Vanduffel W. Optogenetics in primates: a shining future? Trends Genet. 2013; 29: 403-11.

52. Figueiredo M, Lane S, Tang F, Liu BH, Hewinson J, Marina N, et al. Optogenetic experimentation on astrocytes. Exp Physiol. 2010; 96: 40-50.

53. Hoeben RC, Louz D, Koppers-Lalic D. Biosafety of non-human therapeutic viruses in clinical gene therapy. Curr Gene Ther. 2013; 13: 492-9.