

مدل سازی پاسخ نوروں هیپوکمپ دارای پروتئین های چانلرودوپسین حساس به نور با تابش نور لیزر در آزمایشات اپتوژنتیک

زهرا نورائی پور^۲، محمد اسماعیل زبائی^۱، حمید لطیفی^{۱،۲}

۱ پژوهشکده لیزر و پلاسما دانشگاه شهید بهشتی، اوین-بلوار دانشجو، تهران

۲ گروه فیزیک، دانشگاه بهشتی، تهران

چکیده- یکی از موثرترین روش های موجود در بررسی عملکرد سیستم عصبی اپتوژنتیک نام دارد. استفاده از مدل های محاسباتی نقش بسیار مهمی را در پیشبرد این تکنولوژی ایفا مینماید. در این مقاله با استفاده از مدل هاجکین و هاگسلی و مدل چرخه فوتون، یک نوروں هر می ۱۹ قسمتی واقع در ناحیه هیپوکمپ که دارای کانال های پروتئینی حساس به نور بر روی جسم سلولی است، شبیه سازی شده است. با تابش نور لیزر پالسی و پیوسته به نوروں، مشاهده شد که تابش پیوسته قادر به کنترل فرکانس اسپایک های عصبی نیست. در تابش با نور پیوسته اسپایک هایی با فرکانس ثابت به وجود می آیند. اما در تابش نور لیزر پالسی، قادر به ایجاد اسپایک های پیچیده تری خواهیم بود به گونه ای که با تابش هر پالس یک پتانسیل فعالیت به وجود می آید. نتایج نشان دادند که در پالس های کوتاه تر و با شدت بیشتر باشد، اسپایک های منظم تر و کنترل شده تری به وجود می آیند.

کلید واژه- اپتوژنتیک - اسپایک - پتانسیل فعالیت - مدل چرخه فوتون - مدل هاجکین و هاگسلی - نوروں هیپوکمپ.

Modeling of ChR2 expressing -Hippocampal Pyramidal Neuron response to light irradiance in Optogenetics experiments

Z.Noraepor², M.I.Zibaii^{1,*}, H.Latifi^{1,2}

1 Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran

2 Department of Physics, Shahid Beheshti University, Tehran

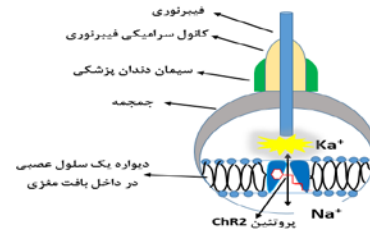
*Corresponding author

Abstract- One of the most effective methods in studying the function of nervous system is Optogenetics. Using computational models, play a crucial role in advancing this technology. In this study, we simulate a ChR2-expressing pyramidal neuron in hippocampal area with a 19-compartment by the Hodgkin-Huxley model and ChR2 photocycle model. We found that continuous laser light into neurons, fails to control neural spikes. In fact in constant illumination, the ChR2-neuron system can reach a spiking condition with stable spiking frequency. Therefore, in this protocol we cannot control the frequency of spikes. At pulsing the light, a complex spike patterning can be attained so that, one pulse of light could induce one action potential. Results indicated that short and strong illuminations might establish better spikes .

Keywords: Optogenetics - action potential – spike - photocycle model - Hodgkin-Huxley model - hippocampal pyramidal neuron

۱- مقدمه

در الکتروفیزیولوژی برای بررسی و مطالعه عملکرد سیستم مغز از روش‌هایی از قبیل تحریک الکتریکی، مغناطیسی و دارویی استفاده می‌شود. روش تحریک الکتریکی دارای دقت فضایی کمی در تحریک نورونی می‌باشد. در حال حاضر تکنیک اپتوژنتیک، با بیان پروتئین‌های غشایی حساس به نور با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در سلول‌های تخصص یافته و تحریک نوری با استفاده از فیبرنوری، یکی از ابزارهای جدید در علوم اعصاب به شمار می‌آید. [۱]. در شکل (۱) تحریک نوری نورون دارای یک مولکول چانلرودوپسین (ChR2) که فعال کننده کانال یونی سدیم بر روی غشا می‌باشد، نشان داده شده است.



شکل ۱: تحریک نوری نورون دارای مولکول چانلرودوپسین

در این تکنیک استفاده از مدل‌های محاسباتی، نقش بسیار مهمی را در شناسایی بهترین مکانیزم تحریک نوری سلول‌های عصبی مانند بهینه نمودن توان نوری رسیده به نورون‌های دارای ChR2، ایفا می‌کند. در این مقاله با استفاده از مدل هاجکین و هاکسلی و مدل چرخه‌ی فوتونی یک نورون هرمی دارای ۱۹ قسمت بر اساس مدل (traub 1991)، واقع در ناحیه‌ی هیپوکمپ که دارای کانال‌های پروتئینی حساس به نور بر روی جسم سلولی است، شبیه‌سازی شده‌است. در مدل چرخه‌ی فوتونی که اولین بار توسط هگمن معرفی شد، فرآیند القای رسانندگی در ChR2 توسط نور با چهار حالت نشان داده می‌شود. ChR2 در زمان اولیه در حالت بسته c_1 قرار دارد. با تابش نور به حالت باز o_1 می‌رود. با ادامه تابش موکول یا دوباره به c_1 و یا به حالت باز دیگر o_2 گذار می‌کند و پس از آن به حالت بسته c_2 و یا o_1 می‌رود. سپس مولکول از c_2 به حالت اولیه c_1 و یا با جذب فوتون به o_2 بازمی‌گردد. در مدل هاجکین و هاکسلی که چگونگی تولید پتانسیل فعالیت را توضیح می‌دهد، غشا و اجزای آن مانند یک مدار الکتریکی در نظر گرفته می‌شوند. لایه لیپیدی غشا به صورت یک خازن و کانال‌های یونی به

صورت مقاوت الکتریکی با رسانندگی g نمایش داده می‌شوند. [۳].

۲- شبیه‌سازی نورون هیپوکمپ دارای

پروتئین چانلرودوپسین

به منظور بررسی رفتار نورون هیپوکمپ تحت تابش نور لیزر پالسی و پیوسته، نورون هیپوکمپ مطابق شکل (۲) متشکل از ۱۹ قسمت، ۸ دندریت پایه‌ای و ۱۰ دندریت راسی و یک جسم سلولی در نظر گرفته شده است.



شکل ۲: نورون هرمی هیپوکمپ دارای ۱۹ قسمت

بر روی هر قسمت از نورون ۸ نوع کانال یونی، شامل ۴ نوع کانال پتاسیمی، ۱ نوع کانال سدیمی، ۱ نوع کانال کلسیمی، ۱ کانال نشستی و مولکول ChR2 در نظر گرفته شده است. ظرفیت غشای سلول $c_m = 1 \mu F/cm^2$ و رسانندگی بین هریک از اجزای نورون برابر است با $\gamma_k = 0.001 \mu S/\mu m^2$. بنابر قانون کیرشهف و مدل مداری هاجکین و هاکسلی تغییرات پتانسیل برای هر قسمت از نورون طبق معادله‌ی دیفرانسیل (۱) بیان می‌شود. I_{ionic} جریان یونی عبوری از غشا و v_k به ترتیب پتانسیل قسمت k ام نورون، پتانسیل بازگشتی سدیم، کلسیم و پتاسیم و g_{Na} ، g_{Ca} ، g_K و g_{ChR2} رسانندگی کانال‌ها سدیم، کلسیم و پتاسیم را نشان می‌دهند [۲-۳]:

$$\frac{dv}{dt} = -I_{ionic, k} + \gamma_{k-1, k} (v_{k-1} - v_k) + \gamma_{k+1, k} (v_{k+1} - v_k) - I_{chr2} \quad (1)$$

$$I_{ionic, k} = g_{Na} m_k^2 h_k (v_k - v_{Na}) + g_{Ca} s_k^2 r_k (v_k - v_{Ca}) + g_K - D r n_k (v_k - v_K) + g_K - AHP q_k (v_k - v_K) + \quad (2)$$

$$g_K - C \min(1, \frac{x_k}{250}) (v_k - v_K) +$$

$$g_K - A a k b k (v_k - v_K)$$

احتمال باز و بسته بودن هر یک از کانال‌های یونی توسط پارامترهای b, a, q, k, r, s, h, m و توسط معادله‌ی دیفرانسیل مرتبه‌ی اول (۳) بیان می‌شود. مقادیر مربوط به پارامترهای $\alpha_k(v_k)$ و $\beta_k(v_k)$ و مقدار ثابت ϕ_k با توجه

طول موج ۴۷۰ nm، طول پالس ۱۰۰ ms و چگالی کانال‌های ChR2 برابر با ۱۰۰ ChR2/μm را نشان می‌دهد و در شکل ج-۳ و د ۳ شدت تابش برابر با ۰/۱ mw/mm² و ۱ و چگالی کانال‌ها برابر با ۳۰۰ ChR2/μm² در نظر گرفته شده است. در تابش ثابت نورون دارای اسپایک‌هایی با فرکانس تقریباً ثابت خواهد بود. فرکانس این اسپایک‌ها با افزایش شدت، افزایش می‌یابند. پاسخ نورون به افزایش شدت به دو صورت است. در مورد اول، (شکل ۳-الف و ۳-ب) زمانی که جریان عبوری از کانال‌های ChR2 کم باشد، پاسخ نورون توسط سنتیک کانال‌های ChR2 محدود می‌شود. در این حالت با افزایش شدت، فرکانس اسپایک‌ها افزایش می‌یابد. و در مورد دوم (نمودار ۳-ج و ۳-د) زمانی که جریان عبوری از کانال‌های ChR2 زیاد باشد (حدود ۲/۵ nA) پاسخ‌ها توسط دینامیک نورون کنترل می‌شوند. با افزایش تعداد مولکول‌ها دامنه‌ی اسپایک‌ها کاهش می‌یابد. اندازه‌ی جریان الکتریکی عبوری از کانال ChR2 توسط رسانندگی کانال، چگالی ChR2 ها بر روی غشا و سطحی از غشا که مورد تابش قرار گرفته است، مشخص می‌شود. فرآیند ظاهر شدن یک پتانسیل فعالیت را می‌توان اینگونه توضیح داد که با تابش نور، مولکول‌های ChR2 برانگیخته می‌شوند در نتیجه کاتیون‌ها به درون غشاء نفوذ می‌نمایند. افزایش در پتانسیل غشاء موجب، فعال شدن کانال‌های سدیمی می‌شود. با ورود یون‌های سدیم به درون غشاء، یک پتانسیل فعالیت شکل می‌گیرد. افزایش بیشتر ولتاژ غشاء باعث به جود آمدن یک فید بک منفی در نورون می‌شود که از ورود کاتیون‌ها به درون غشاء جلوگیری می‌نماید. در نتیجه جریان کاهش می‌یابد. زمانی که پتانسیل غشاء به بالاتر از صفر میلی ولت افزایش یابد جهت جریان در کانال‌های ChR2 بر عکس می‌شود. در پیک پتانسیل کانال‌های پتاسیمی و کانال‌های کلسیمی که توسط کانال‌های پتاسیمی فعال می‌شوند، باعث کاهش پتانسیل غشاء می‌شوند. در این حالت کانال ChR2 با کانال‌های دیگر جهت کاهش پتانسیل فعالیت همکاری می‌کنند. پس از خاموش شدن نور، جریان هایپلارایزکننده‌ای در نورون وجود دارد که باعث افزایش زمان بازبایی برای رسیدن به پتانسیل استراحت و خاموش شدن نورون می‌شود. شکل (۴) پاسخ نورون‌های هیپوکمپ را به پالس‌های نوری به ترتیب ۱۰۰ و ۵۰- و ۲۵-، با تعداد ۴ پالس و شدت ۱۰ mw/mm² و چگالی

به مرجع [2] انتخاب شده‌اند. x_k غلظت درون سلولی در قسمت k ام برحسب فرمول (۴) تغییر می‌نماید [۲]:

$$\frac{d\eta_k}{dt} = \alpha_k (v_k)(1 - \eta_k) - \beta_k (v_k)\eta_k \quad (۳)$$

$$\frac{dx_k}{dt} = -\phi_k I_{ca,k} - \beta_x x_k \quad \beta_x = 0.0075 \quad (۴)$$

جریان یونی عبوری از کانال‌های ChR2 به صورت مقابل تعریف می‌شود:

$$I_{chr2} = A g_{xR} f(v)\psi(\phi, t) \quad (۵)$$

A مساحت سلول و برابر با $1150 \mu\text{m}^2$ و g_{xR} ماکزیم رسانندگی کانال در واحد سطح را نشان می‌دهد و در برگیرنده‌ی اثر چگالی پروتئین‌ها و ماکزیم رسانندگی یک کانال است. $\psi(\phi, t)$ و $f(v)$ توابع به هنجار شده‌ای هستند که وابستگی کانال ChR2 را به شار نور، ϕ و پتانسیل نشان می‌دهند. تابع $f(v)$ به صورت مقابل است.

$$f(v) = \frac{v}{v_1} \left(1 - e^{-\frac{v}{v_0}}\right) \quad (۶)$$

v_0 و v_1 به ترتیب برابر با ۴۰ و ۱۵ mV هستند. $\psi(\phi, t)$ را می‌توان با استفاده از مدل چرخه‌ی فوتونی ۴ حالتی و بر اساس آهنگ گذار بین حالت‌های مختلف، $s_1=c_1, s_2=o_1, s_3=o_2, s_4=c_2$ مدل‌سازی نمود. تعداد کانال‌ها در حالت s_i بنابر معادله‌ی دیفرانسیل (۷) تغییر می‌نماید. r_{ij} گذار از حالت i به j و r_{ji} گذار از حالت j به i می‌باشد که طبق مرجع [4] انتخاب شده‌اند.

$$\frac{ds_i}{dt} = \sum_1^4 r_{ji} s_j - \sum_1^4 r_{ij} s_i \quad (۷)$$

در نتیجه تابع $\psi(\phi, t)$ طبق فرمول (۸) توصیف می‌شود. γ_i توصیف کننده‌ی رسانندگی کانال در حالت s_i نسبت به رسانندگی کانال با ماکزیم رسانندگی است [۶].

$$\psi(\phi, t) = \sum \gamma_i s_i \quad (۸)$$

۳- نتایج مدل سازی

در این مقاله تمام معادلات دیفرانسیل توسط روش رنگ‌کوئی مرتبه ۴ حل شده‌اند. شکل الف-۳ و ب-۳ پاسخ نورون هیپوکمپ به تابش ثابت 10 mw/mm^2 و ۴۰

نتایج نشان می دهند که تابش های کوتاه و با شدت بیشتر اسپایک های بهتری به عبارتی دیگر در هر پالس یک اسپایک را ایجاد می نمایند پالس های طولانی تر باعث ظاهر شدن بیشتر از یک اسپایک می شوند. پالس های کوتاه از به وجود آمدن اسپایک دوم جلوگیری می نمایند. به وجود آمدن اسپایک های اضافه تر در هر پالس نوری زمان بازیابی سیستم را کاهش می دهد که باعث به تاخیر افتادن اسپایک های دیگر می شود. هنگامی که اولین پالس تابیده می شود پاسخ کانال های ChR2 به نور به دلیل اینکه در حالت پایه خود قرار دارند و غشا دارای بیشترین اختلاف پتانسیل می باشد، ماکزیمم است.

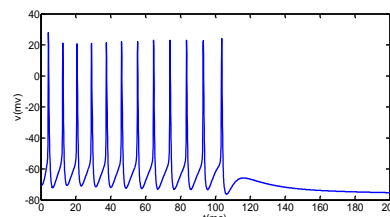
۴- نتیجه گیری

با تابش نور لیزر پالسی و پیوسته به نورون، مشاهده شد که تابش پیوسته قادر به کنترل اسپایک های عصبی نیست. در تابش با نور پیوسته اسپایک هایی با فرکانس ثابت به وجود می آید. بنابراین در این الگوی تابشی نمی توان شرایط کنترل شده ای را بر روی فرکانس اسپایک ها به وجود آورد. اما در تابش نور لیزر پالسی، این امکان به وجود می آید که با کنترل طول پالس و تعداد پالس ها و شدت، شرایط کنترل شده ای را بر روی اسپایک ها به وجود آورد. بدین معنی که با کنترل و تخمین مناسب چگالی ژن های بیان شده بر روی سطح غشای نورون به منظور کنترل مقدار ماکزیمم جریان و کوتاه نمودن طول پالس و افزایش شدت نور می توان به اسپایک هایی با فرکانس کنترل شده دست یافت.

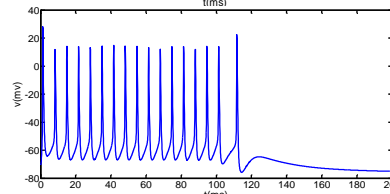
مراجع

- [1] K. Deisseroth, "Optogenetics", Nature methods, 2011, 8(1): pp. 26-29.
- [2] Traub, Roger D., et al. "A model of a CA3 hippocampal pyramidal neuron incorporating voltage-clamp data on intrinsic conductances." *Journal of Neurophysiology* 66.2 (1991): 635-650.
- [3] N. Grossman, K. Nikolic, C. Toumazou, Fellow, IEEE, P. Degenaar, "Modeling study of the light stimulation of a neuron cell with channelrhodopsin-2 mutants", IEEE. Biomed. Eng, 2011, 58(6): pp. 1742-1751.
- [4] R. A. Stefanescu, R. G. Shivakeshavan, P. P. Khargonekar, S. S. Talathi, "Computational modeling of channelrhodopsin-2 photocurrent characteristics in relation to neural signaling", *Bull. Math. Biol.*, 2013, 75(11): pp. 2208-2240.
- [5] P. Hegemann, S. Ehlenbeck, D. Gradmann, "Multiple photocycles of channelrhodopsin", *Biophys. J.*, 2005, 89(6): pp. 3911-3918.
- [6] K. Nikolic, N. Grossman, M. S. Grubb, J. Burrone, C. Toumazou, P. Degenaar", Photocycles of Channelrhodopsin-2", *J. Photochem. Photobiol.*, 2009, 85(1): pp. 400-411.

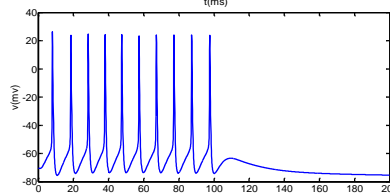
کانال های ChR2 برابر با $100 \text{ ChR2}/\mu\text{m}^2$ را نشان می دهد.



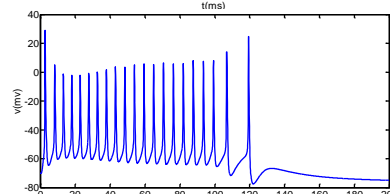
الف



ب

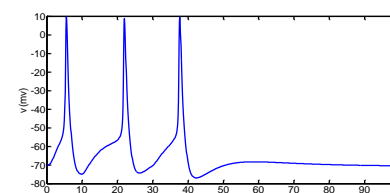


ج

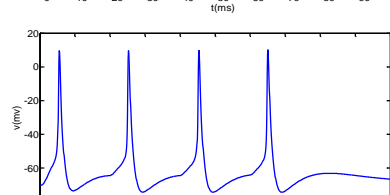


د

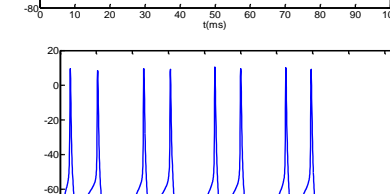
شکل ۳: پاسخ نورون دارای مولکول های ChR2 به پالس نوری ms 100 . شدت های (الف) 1 mw/mm^2 (ب) 40 mw/mm^2 (ج) 100 mw/mm^2 (د) 1 mw/mm^2



الف



ب



ج

شکل ۴: پاسخ نورون دارای مولکول های ChR2 به پالس نوری با شدت 10 mw/mm^2 و فرکانس های (الف) 100 Hz (ب) 50 Hz (ج) 25 Hz