کنترل سیستم عصبی حیوان در حال حرکت با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک

محمد اسماعیل زیبائی[۱]، لیلا درگاهی[۲]، عبدالعزیز رونقی[۲]،فرشاد عابدزاده[۱]، ساره پند آموز[۲]، سعید صالحی[۲]،

عباس حق پرست[۳] و حمید لطیفی[۱]

۱- پژهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی،تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات نوروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده – اپتوژنتیک یک تکنیک جدید برای کنترل نوری سلولها در تحقیقات علوم اعصاب و پزشکی می باشد. در این مقاله به اصول پایه ای تکنیک اپتوژنتیک پرداخته می شود. علاوه بر این به پیشرفتهای بدست آمده در پژوهشکده لیزر و پلاسما دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در زمینه اپتوژنتیک برای کنترل سیستم عصبی حیوان در حال حرکت با استفاده از تحریک اپتوژنتیکی اشاره می شود.

کلید واژه- اپتوژنتیک، علوم اعصاب، اپسین، کانال یونی، فیبرنوری.

Control of neural systems with optogenetics in freely moving animal

Mohammad Ismail Zibaii[1], Leila Dargahi[2], Abdolaziz ronaghi[2], Farshad Abedzadeh[1], Sareh Pandamoz[2],

Saied Salehi[2], Abbas Haghparast[3], Hamid Latifi[1]

1- Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- NeuroBiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract- Optogenetics is an innovative technique for optical control of cells in neuroscience and medical research. In this paper we present the basic concepts are essential for a comprehensive understanding of optogenetics. Further, emphasis is placed on advancement in optogenetics-associated light-based methods in Laser and Plasma Research Institute of Shahid Beheshti University and Shahid Beheshti University of Medical Sciences for spatial control of neural systems in freely moving animals with optogenetics.

Keywords: optogenetics, neuroscience, opsin, ion channel, fiber optic

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

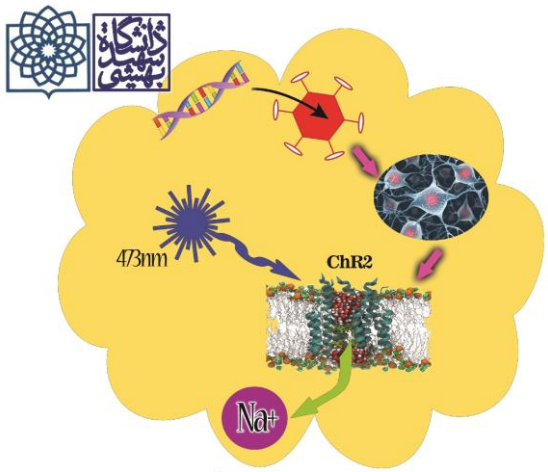
۱- مقدمه

امروزه لیزر به عنوان یکی از ابزارهای جدید در علوم اعصاب با قابلیت کاربرد در سیستم های تصویر برداری عصبی و اپتوژنتیک می باشد. اپتوژنتیک با استفاده از تکنیکهای نوری و دست ورزی های ژنتیکی در سیستم عصبی امکان مطالعه و کنترل عملکرد سلولهای خاص در بافت های زنده عصبی را فراهم می آورد. برای این منظور یکی از ابزارهای تحریک نوری استفاده از فیبرنوری برای انتقال نور لیزر به ناحیه ای از مغز است که کانالهای یونی حساس به نور را بیان می کند [1].

در این مقاله با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک، ماده خاکستری دور قنات مرکزی (PAG) در مغز میانی موش صحرائی تحریک و پاسخ های رفتاری حیوان مورد بررسی قرار می گیرد. PAG از لحاظ آناتومیکی در تقسیم بندی طولی به چهار قسمت دورسومدیال (خلفی-میانی)، دورسولترال (خلفی-جانبی)، لترال (جانبی) و ونترولترال (شکمی-جانبی) تقسیم می گردد. هر کدام از این بخش ها از لحاظ فیزیولوژیکی عملکرد های خاص خود را دارا هستند. قسمت های خلفی تر در رفتارهای حرکتی وابسته به ترس و رفتارهای دفاعی نقش دارند. تحریک این نواحی در جوندگان باعث بروز رفتارهای Freezing و سیخ شدن موها می گردد. اما تحریک نواحی شکمی تر باعث بروز رفتارهای سوماتوموتور مهاری و بی حرکتی حیوان می گردد.

۲- فیزیک تکنیک اپتوژنتیک

در سلولهای عصبی یکسری کانالهای یونی در جسم سلولی وجود دارد که با تنظیم غلظت یونها در داخل و بیرون سلول تولید یک اختلاف پتانسیل یونی می نمایند. تغییرات این اختلاف پتانسیل میتواند بعنوان یک سیگنال عصبی در نظر گرفته شود. برای تغییر در سیگنال عصبی و یا ایجاد یک سیگنال عصبی نیاز است تا غلظت یک و یا چند نوع از یونها از قبیل سدیم، پتاسیم، کلر و غیره تغییر یابد. این امر در علم الکتروفیزیولوژی با اعمال جریان الکتریکی به یک سیستم عصبی و یا محرکهای شیمیایی حاصل می شود. برای این منظور از یکسری الکترودهای رسانا برای تحریک و ثبت سیگنال عصبی استفاده می شود. در هنگام تحریک الکتریکی این الکترود ها قدرت



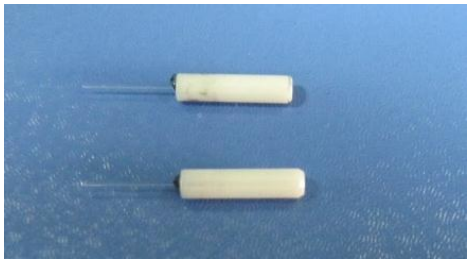
شکل (۱): شماتیک آماده سازی سیستم عصبی در تکنیک اپتوژنتیک

تفکیک پذیری فضایی بالایی ندارند. لذا تحریک نورونی مشخصی امکان پذیر نمی باشد که این منجر به عدم کنترل دقیق سیستم عصبی با استفاده از تحریک الکتریکی می شود. با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک می توان این کنترل و تحریک عصبی را دقیق تر انجام داد. کانال های یونی در سلول های عصبی در حالت طبیعی به نور هیچگونه پاسخی نمی دهند. با استفاده از علم ژنتیک می توان یکسری کانال های یونی پروتئینی حساس به نور را در سیستم عصبی بیان و با استفاده از نور لیزر باز و بسته شدن این کانال ها را کنترل نمود. کانال های یونی پروتئینی حساس به نور اپسین نام دارند که بسته به نوع ممکن است به طول موجهای آبی، زرد و سبز حساس بوده و عبور نوع خاصی از یون ها را کنترل نمایند. بطور مثال پروتئین ChR2 قابلیت کنترل ورود یون سدیم به داخل سلول را دارد و می تواند بعنوان یک کانال تحریکی در سیستم عصبی عمل نماید. پروتئین هالورودپسین ورود یون کلر به داخل سلول را کنترل میکند و می تواند بعنوان یک سیستم مهاری در سیستم عصبی نقش ایفا نماید. تکنیک اپتوژنتیک مورد استفاده در این مطالعه شامل سه مرحله بسته بندی ژن پروتئین حساس به نور در ویروس، تزریق ویروس و تحریک نوری ناحیه مورد نظر با استفاده از ابزارهای اپتیکی می باشد [2-1]. در شکل (۱) شماتیک مراحل تکنیک اپتوژنتیک نشان داده شده است.

۳- روش آماده سازی حیوان برای انجام آزمایشات اپتوژنتیک

با توجه به نوع آزمایشات مورد نظر در مطالعات علوم اعصاب، ناحیه مناسب مغزی انتخاب می شود. استفاده از یک المان بیولوژیکی بنام پروموتور اختصاصی، امکان بیان ژن و پروتئین مورد نظر در ناحیه انتخابی را بصورت اختصاصی فراهم می آورد. ژن اپسینی تحت پروموتور اختصاصی انتخاب شده در داخل ویروس با استفاده از تکنیک های علم ژنتیک بسته بندی شده و سپس ویروس آماده شده در ناحیه مغزی مورد نظر تزریق می شود. برای این منظور طبق استانداردهای کار با حیوانات، حیوان (موش صحرایی نر) بیهوش می شود و در داخل دستگاه استریوتاکسی قرار داده می شود تا پس از جراحی با استفاده از سیستم مختصات و اطلس پاکسینوس ناحیه مورد نظر شناسایی شود. پس از جراحی و سوراخ نمودن جمجمه در حدود ۲-۳ میلیمتر ویروس در عمق مورد نظری که با محاسبه بدست امده است تزریق می شود. پس از پایان یافتن تزریق ناحیه مربوطه با استفاده از تکنیک های جراحی ترمیم و حیوان دوره ریکاوری را طی می نماید. پس از گذشت ۳ الی ۴ هفته ژنهای اپسینی در ناحیه مورد نظر بیان می شوند و کانالهای پروتئینی حساس به نور در ناحیه مورد نظر تولید می شود.

برای تحریک نوری در این آزمایش از کانول فیبرنوری خاصی که طراحی شده است استفاده می شود. این کانول قابلیت کاشت در جمجمه را دارد. در شکل (۲) یک نمونه از کانول ساخته شده نشان داده شده است.



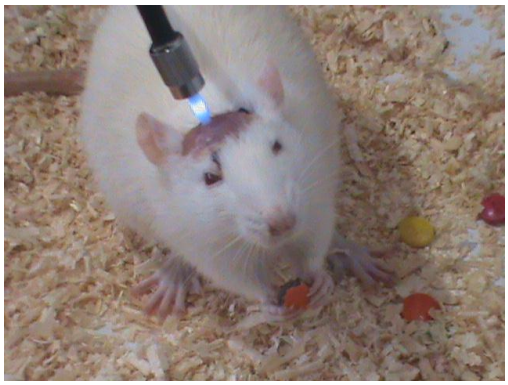
شکل ۲: کانول فیبرنوری ساخت شده با قابلیت کاشت

برای کاشت کانول نیز طبق مرحله قبل حیوان بیهوش در داخل دستگاه استریوتاکسی قرار داده می شود و پس از یافتن ناحیه مورد نظر و برداشتن جمجمه کانول در ناحیه مورد نظر کاشته می شود و با استفاده از سیمان دندانپزشکی بر روی جمجمه محکم می شود. در شکل (۳) یک نمونه از نحوه کاشت کانول در جمجمه برای انجام آزمایشات رفتاری نشان داده شده است.

شکل ۳: کاشت کانول فیبرنوری در ناحیه مورد نظر مغز

۴- نتایج تجربی در آزمایشات اپتوژنتیک برای مطالعات رفتاری

تابش پیوسته نور لیزر بر روی بافت عصبی منجر به ایجاد گرما در بافت و آسیب های جبران ناپذیر در سیستم عصبی می شود[3] . لذا برای تحریک نوری از تابش های پالسی استفاده می شود. همچنین با توجه به سرعت باز و بسته شدن کانال های یونی نیاز است تا زمان تابش دهی با فرکانس، تعداد پالس و طول دوره هر پالس کنترل شود. در شکل (۴) تصویر یک نمونه از حیوان تحت مطالعه رفتاری با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک در آزمایشگاه نشان داده شده است. همانطور که در شکل (۴) مشاهده می شود کانول فیبرنوری بر روی جمجمه کاشته شده است و با استفاده از فیبرنوری و با نور آبی ناحیه نورونی مورد نظر تابشی دهی می شود.



شکل ۵: مطالعه رفتاری موش صحرائی در حال حرکت با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک در آزمایشگاه اپتوژنتیک

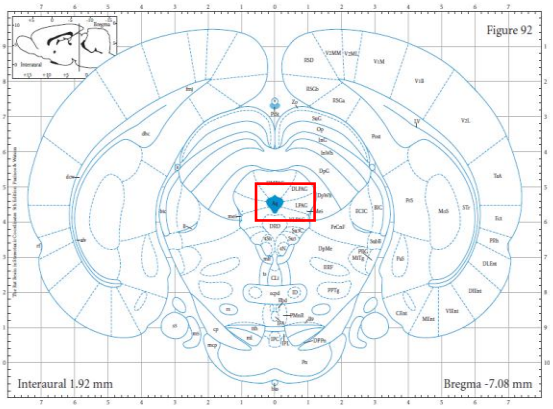
شکل ۶: تابش دهی مغز موش اپتوژنتیکی که منجر به کاهش فعالیت حرکتی حیوان می شود.

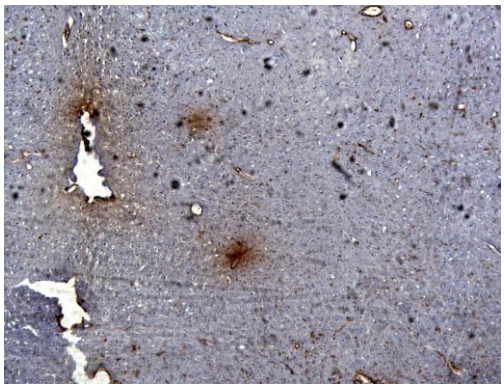
در این آزمایش بدلیل بهینه سازی پاسخ نورونی به نور فرکانس در بازه ۱-۱۰۰ هرتز و بازه تابش دهی میلی ثانیه تا چند ثانیه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بهترین پاسخ رفتاری حیوان در فرکانس ۲۰ و ۵۰ هرتز با تعداد پالس ۱۰۰ تا ۵۰۰ و دوره تکرار ۵ ثانیه مشاهده گردید. رفتارهای مشاهده شده مشابه رفتارهایی بود که قبلا در اثر تحریک الکتریکی نواحی شکمی PAG مشاهده می گردید. یعنی با تحریک نوری این ناحیه حیوان کاهش حرکات سوماتوموتور و بی حرکتی را نشان داد. در شکل (۶) تصویر یک نمونه از پاسخ نشان داده شده است.

برای انجام آزمایشات کنترل از موش فاقد ژن اپسینی استفاده شد که با نور لیزر ناحیه مورد نظر تحریک می شود. نتایج آزمایشات و حرکات رفتاری حیوان نشان داد که تزریق ویروس فاقد ژن اپسینی و تابش نور لیزر به ناحیه مورد نظر با استفاده از کانول کاشته شده در جمجمه هیچگونه تغییری در رفتار ایجاد نمی کند. این امر نشان دهنده آن است که نتایج بدست آمده در حیوان اپتوژنتیکی ناشی از بیان اپسین در مغز است. همچنین حرارت ایجاد شده از تابش نور لیزر هیچگونه تأثیری بر روی عملکرد سیستم عصبی حیوان ندارد.

پس از پایان یافتن آزمایشات رفتاری طبق استاندارد ها و اخلاق کار با حیوانات مغز حیوان از جمجمه خارج می شود و برای آزمایشات کنترل بیان ژن اپسینی بصورت لایه های نازک برش داده می شود و با استفاده از رنگ آمیزی ایمیونوهیستوشیمی و میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می گیرد. در شکل (۷) یک نمونه از برش بافت مغزی پس از رنگ آمیزی با آنتی بادی اختصاصی نشانگر متصل به پروتئین اپسین، در زیر میکروسکوپ نوری نشان داده شده است. نواحی قهوه ای رنگ اطراف قنات مرکزی نشان دهنده بیان شدن ژن اپسین در ناحیه مورد نظر می باشد.





شکل (۷): ناحیه PAG بر روی اطلس پاکسینوس (بالا) و تصویر برش مغزی از ناحیه که بیان ژن انجام شده است.

۵- نتیجه‌گیری

اپتوژنتیک با استفاده از تکنیک اپتیک و ژنتیک امکان مطالعه و کنترل عملکرد سلول های خاص در بافت های زنده را فراهم می آورد. در این مقاله سیستم عصبی حیوان در حال حرکت با استفاده از تکنیک اپتوژنتیک برای کنترل حرکت حیوان مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته است.

مراجع

[1] K. Deisseroth, “Optogenetics”, nature methods., Vol. 8, No. 1, pp. 26-29, 2011.

[2] K. Nikolic, N. Grossman, M. S. Grubb, J. Burrone, “Photocycles of Channelrhodopsin-2”, Photochem. Photobio., 85, pp. 400–411, 2009.

[۳] زهرا نورائی پور ، محمد اسماعیل زیبائی ، حمید لطیفی، " مدل سازی برهم کنش لیزر با بافت مغزی برای تعیین توزیع شدت نور لیزر و افزایش دمای بافت مغزی" ، بیست و یکمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک و هفتمین کنفرانس مهندسی فناوری فوتونیک، دانشگاه شهید بهشتی، ۱۳۹۳