

Оптогенетические методы и технологии в решении прикладных медицинских задач

Сорокина Л.Е.¹, Петренко В.И.¹, Субботкин М.В.¹, Куланова А.А.¹, Кучеренко А.С.¹, Кубышкин А.В.¹, Фомочкина И.И.¹, Номеровская А.Ю.¹, Халилов С.С.²

¹ Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского

Россия, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

² Физико-технический институт, Крымский федеральный университет (КФУ) имени В.И. Вернадского
Россия, Республика Крым, 295007, г. Симферополь, пр. Академика Вернадского, 4/А

РЕЗЮМЕ

Оптогенетика – инновационное и быстро развивающееся научное направление, объединяющее достижения молекулярной биологии и лазерных технологий для решения вопросов мониторинга различных биохимических процессов в клетке и контроля ее активности с помощью света. Данный обзор посвящен вопросам реализации и применения оптогенетического подхода для диагностики и лечения различных социально значимых заболеваний на молекулярно-генетическом уровне. Описаны различные способы доставки и встраивания генетических конструкций, кодирующих трансмембранные белки. Рассматриваются новые оптоволоконные технологии, используемые для исполнения имплантируемых устройств генерации и фиксации сигналов в возбудимых тканях. Приводится анализ современных, наиболее используемых способов регистрации показателей эксперимента, указываются ключевые преимущества и недостатки различных методик.

Ключевые слова: оптогенетика, опсины, ионные каналы, оптоволоконные системы, фотостимуляция, нейроинтерфейс, оптогенетическая терапия.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследования были частично поддержаны Программой развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет В.И. Вернадского» на 2015–2024 г.

Для цитирования: Сорокина Л.Е., Петренко В.И., Субботкин М.В., Куланова А.А., Кучеренко А.С., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Номеровская А.Ю., Халилов С.С. Оптогенетические методы и технологии в решении прикладных медицинских задач. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 195–203. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-195-203>.

Optogenetic methods and technologies in solving applied medical problems

Sorokina L.E.¹, Petrenko V.I.¹, Subbotkin M.V.¹, Kulanova A.A.¹, Kucherenko A.S.¹, Kubyshkin A.V.¹, Fomochkina I.I.¹, Nomerovskaya A.Yu.¹, Halilov S.I.²

¹ V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Medical Academy named after S.I. Georgievsky
5/7, Lenin Av., Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation

✉ Сорокина Лея Евгеньевна, e-mail: leya.sorokina@mail.ru.

² V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Physics and Technology Institute
4, Academician Vernadsky Str., Simferopol, 295007, Republic of Crimea, Russian Federation

ABSTRACT

Optogenetics is an innovative and fast-growing field of science combining the advances in molecular biology and laser technologies to monitor various biochemical processes in the cell and to control its activity using light. Therefore, this review is devoted to the implementation of the optogenetic approach to diagnosis and treatment of various socially sensitive diseases at the molecular and genetic level. Furthermore, the article considers different methods of delivery and incorporation of genetic constructs encoding transmembrane proteins. New fiber optic technologies used to develop implantable devices for generating and recording signals in excitable tissues are described. Besides, the most state-of-the-art and popular registration methods are considered in the review.

Key words: optogenetics, opsins, ion channels, fiber optic systems, photostimulation, neurointerface, optogenetic therapy.

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This work was partially supported by the V.I. Vernadsky Crimean Federal University Development Program for 2015–2024.

For citation: Sorokina L.E., Petrenko V.I., Subbotkin M.V., Kulanova A.A., Kucherenko A.S., Kubyshekin A.V., Fomochkina I.I., Nomerovskaya A.Yu., Halilov S.I. Optogenetic methods and technologies in solving applied medical problems. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (2): 195–203. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-195-203>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на пересечении молекулярной биологии и передовых лазерных технологий стремительно развивается новое междисциплинарное направление – оптогенетика, в рамках которой разрабатывается обширный арсенал для изучения механизмов формирования памяти и поведения, функциональной диагностики и терапии нейродегенеративных, психогенных болезней и других социально значимых заболеваний человека. Центральная роль в решении таких комплексных и сложных задач отводится знаниям о функционировании различных генетических конструкций и внедрению принципиально новых оптических устройств для исследования функционирования электровозбудимых тканей.

Разработанные и внедренные в практику последние достижения оптогенетики основаны на использовании генетически кодируемых светочувствительных ионных каналов, которые в последующем подвергаются воздействию фотостимуляции в различных режимах. В подобных экспериментах особо важно обеспечить наличие качественной оптоволоконной системы, которая позволит провести доставку светового пучка с минимальными потерями и затем эффективно произвести регистрацию внутриклеточных изменений. Подобные системы

сегодня представляют собой уникальную платформу для разработки инновационных нейроинтерфейсов, применяемых в оптогенетике для экспериментов на свободно двигающихся животных.

На современном этапе оптогенетика имеет серьезные преимущества перед традиционными электрофизиологическими методами ввиду избирательности воздействия, точности и возможности как возбуждения, так и угнетения выбранных популяций клеток. Последнее может быть использовано не только в фундаментальной нейробиологии, но и в прикладной медицине. Например, вводя актуаторы в нейроны в очаге эпилептической активности и включив «торможение», можно прервать и (или) предотвратить приступ эпилепсии.

В данном обзоре впервые комплексно освещены вопросы планирования оптогенетического эксперимента с указанием ключевых преимуществ и недостатков различных методик, а также наиболее полно описаны современные достижения оптогенетики в клинической медицине.

ОПТОГЕНЕТИКА: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СТАНОВЛЕНИЯ

В 1971 г. У. Стокениусом и Д. Остерхельтом было установлено, что ионный канал бактериородопсин может быть активирован фотонами. Уже через 8 лет

английский биофизик Фрэнсис Крик высказал идею активации группы клеток с помощью света [1, 2].

В 2005 г. группой ученых Стэнфордского университета под руководством Карла Дайссерота было показано, что контроль активности группы нейронов можно осуществить путем адаптации природного канального родопсина (Channelrhodopsin-2), полученного из зеленых водорослей вида *Chlamydomonas reinhardtii*, используя лентивирусную доставку генов [3]. Эксперимент неоднократно проводился на плодовых мушках и мышках. В результате было достоверно доказано, что после встраивания опсина в плазмалемму клетки и точечного освещения светом синего спектра происходила деполяризация клеточной мембраны.

Последующие исследования показали, что в ответ на облучение светом различных длин волн к регуляции функционирования нейронов способны и другие природные белки, такие как бактериородопсин, галородопсин и каналородопсин. В 2008 г. впервые был выделен каналородопсин VChR1, чувствительный уже к свету желтого спектра [4]. Данное открытие продемонстрировало, что использование различных модификаций канальных родопсинов со смещенными пиками активации в область красного спектра позволяет экспериментатору избирательно стимулировать нейроны двух типов, расположенные в одной области интереса.

С актуализацией исследований в данной области и получением новых знаний нейрофизиологов о молекулярной организации работы мозга стало ясно, что ткани позвоночных животных уже содержат необходимый для реализации метода транс-ретиналь. Поглощая фотон, ретиналь изомеризуется, провоцируя изменение конформации белка, что приводит к изменению проницаемости мембраны для ионов, индуцируя ток одновалентных (H^+ , Na^+ , K^+) и небольшого количества некоторых двухвалентных (Ca^{2+}) катионов, вызывающих деполяризацию мембраны нейрона. Теперь исследователи могут не только избирательно контролировать активность в определенных нейронах, но и прогнозировать физиологические и поведенческие реакции организмов.

В связи с появлением новых методик исследований в мире нейробиологии началось и совершенствование оптоволоконных инструментов, собственно позволяющих осуществлять доставку светового пучка. Так, была успешно осуществлена идея одновременной оптической стимуляции и регистрации электрических импульсов. В настоящее время существует возможность прямого измерения электрической активности в нейронах, ответственных за моторную деятельность, и их одновременного контроля с помощью опсинов.

ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ: ПРИНЦИПЫ ПЛАНИРОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ ДИЗАЙНА ЭКСПЕРИМЕНТА

Дизайн любого оптогенетического исследования включает следующие основные элементы: планирование эксперимента; доставка генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок; доставка светового пучка; регистрация результатов.

Планирование эксперимента

Выполняется постановка цели и задач, уточнение условий проведения эксперимента (имеющееся или доступное оборудование, финансовые ресурсы, кадровый состав), выбор входных и выходных параметров на основе сбора и анализа предварительной информации (определение объекта исследования, способа доставки генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок, режима фотостимуляции), а также составление плана и сроков проведения эксперимента.

Доставка генетической конструкции, кодирующей светочувствительный белок

Широко используемым в настоящее время является метод инъекции аденоассоциированных (AAV) и лентивирусных (LV) векторов, которые позволяют осуществлять точный пространственный контроль над экспрессией опсина. Специфичность метода в основном достигается с помощью промоторов и энхансеров. Только в клетках с соответствующим паттерном экспрессии для конкретного промотора возможна активация процесса синтеза опсина [5]. Использование энхансеров позволяет добиваться строгой специфичности, не перегружая конструкции вектора [6].

Немаловажную роль в эффективности внедрения вирусных частиц играет совокупность белков-рецепторов на поверхности вирусного капсида – серотип, поскольку он определяет, каким образом будет происходить инфицирование клеток-мишеней (например, в области тела нейрона или у его отростков). Уже сейчас экспериментально подтверждено, что серотип AAV 2.1 подходит для заражения клеток головного мозга грызунов, а серотипы 8 и 9 – для инфицирования нейронов в мозге приматов.

Другой стратегией, обеспечивающей наличие специфического гена в эксперименте, является применение трансгенных линий животных, т.е. живых организмов, в геном которых были внесены чужеродные гены. В настоящее время широко используются линии животных Cre/loxP, экспрессирующие cre-рекомбиназу, которая осуществляет «вырезание» окруженного LoxP последовательностями экзона,

благодаря чему создается линия животных, у которых отсутствует определенный интересующий исследователей ген [7].

Для получения трансгенных животных используются вирусные и невирусные технологии. К последним относятся основанные на физическом и химическом воздействии подходы, позволяющие трансфицировать клетки *in vitro* [8]. Один из способов создания таких трансгенных объектов исследования связан с эмбриональными стволовыми клетками. Сначала клонируемая ДНК интегрируется в культуру эмбриональных стволовых клеток, затем отобранные трансгенные эмбриональные стволовые клетки культивируются и используются для получения необходимых линий [9, 10].

Для получения трансгенных мышей также используется метод внутриворотовой электропорации. При этом раствор с ДНК, кодирующей опсин, вводят *in utero* в определенные дни развития эмбриона, а затем его подвергают воздействию высоковольтного электрического разряда короткой продолжительности, что позволяет избирательно воздействовать на конкретные типы клеток и области мозга [11]. Данный метод требует точного знания времени и траектории миграции определенных групп нейронов во время развития. Данная методика позволяет качественно обеспечить таргетную доставку гена в корковые слои II и III, в нейроны стриатума и гиппокампа [12]. В отличие от вирусных методов с помощью электропорации можно внедрить большее количество копий гена и доставлять ДНК любого размера с большими промоторными сегментами для достижения большей клеточной специфичности.

К наиболее известному методу доставки генетической конструкции химическим способом относится липосомальный транспорт: генетический материал помещается в липосому, которая связывается с клеточной мембраной и способствует его внутриклеточному высвобождению. Специфичность данного метода достигается с помощью связывания определенного лиганда с поверхностью липосомы.

Таким образом, в настоящее время имеется большой арсенал методов, обеспечивающих наличие кодирующих опсин генов в экспериментальных моделях. Приоритетными характеристиками приведенных методов являются точность и избирательность действия, относительная доступность и воспроизводимость. Наиболее широко в оптогенетических исследованиях применяются трансгенные животные и вирусные векторы, однако разработка и внедрение новых методов доставки генетических конструкций не менее актуальны, так как они позволяют, во-первых, значительно расширить сферы применения оп-

тогенетики, во-вторых, ускорить процесс внедрения метода в практическое русло, в том числе использовать его для лечения заболеваний человека.

Доставка светового пучка

В целом функции оптоволоконного комплекса доставки светового излучения сводятся к следующему: генерация и управление световым излучением, модификация и фильтрация светового излучения, проведение светового излучения в ткани и клеточные культуры [13]. На современном этапе даже простейшие оптогенетические эксперименты требуют программируемых импульсных генераторов для модуляции светодиодного или лазерного излучения и создания высококачественного управляемого светового импульса. Изучение функций мозга требует нейронных интерфейсов, которые могут записывать и стимулировать мозг с высокой пространственно-временной точностью.

Среди исследователей наиболее востребованной является оптогенетическая методика *in vivo* в лабораторных условиях; для чего в настоящее время используют перманентно имплантируемое оптическое волокно, направляемое через канюлю. Имплантация волокна позволяет преодолеть такие ограничения, как повреждение ткани головного мозга при повторном введении оптоволоконка, потенциальные дефекты волокна внутри имплантата и точность позиционирования канюли внутри головного мозга животного. Одним из преимуществ метода перманентной имплантации оптического волокна в экспериментах *in vivo* является возможность сочетания оптогенетического метода с другими видами исследований. Основные показатели, которые необходимо определить перед началом любого оптогенетического эксперимента: длина волны облучения, интенсивность и режим стимуляции, от которых зависит успешность изучения и управления внутриклеточной активностью.

Регистрация результатов

Для визуализации изменения параметров клеточной активности у свободно двигающихся животных может использоваться большое количество различных биосенсоров, в том числе генетически кодируемых, основанных на эффекте флуоресценции. Эти методы позволяют оценить не только клеточную активность, но и изменение сигнального статуса клетки. Например, широко применяется семейство датчиков ацетилхолина GCh, созданных на основе рецепторов, связанных с G-белком, которые избирательно реагируют на специфический медиатор флуоресценцией, регистрируемой с помощью эпифлуоресцентной, конфокальной и двухфотон-

ной микроскопии [14]. Интерес ученых вызывает возможность манипулирования определенной популяцией нейронов и одновременной регистрации результата, что позволит детальнее изучать связь между активностью и функцией клеток. Новейшей разработкой в этой области стал «минископ», позволяющий визуализировать флуоресценцию и в то же время проводить оптогенетические манипуляции, изменяя активность нейронов [15].

Одним из наиболее распространенных способов оценки электрофизиологических изменений мембранного потенциала возбудимых клеток является «пэтч-кламп» (patch-clamp). С использованием данного метода *in vitro* в комбинации с оптогенетикой становится возможным детальное изучение синаптической активности отдельных нейронов и установление их роли в активирующих и тормозных влияниях на кору мозга. Для оценки неврологического статуса и контроля поведения животного используются поведенческие тесты.

Таким образом, многообразие современных оптогенетических технологий определяет возможность их применения в различных научных направлениях в качестве основного или дополнительного метода. Однако дальнейшая разработка и совершенствование непосредственно оптогенетических технологий продолжают быть актуальными, поскольку развитие биотехнологии, генетики, оптики и биохимии позволит полностью реализовать потенциал данного научного направления. В частности, на каждом этапе оптогенетического исследования можно выделить ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения.

На первом этапе актуальным является совершенствование методов доставки и экспрессии генов, а также прицельное изучение генов, кодирующих светочувствительные белки, что особенно важно в перспективе применения оптогенетики для лечения заболеваний человека. На втором этапе немаловажным является дальнейшее изучение уже известных светочувствительных белков, при этом интерес представляют не только их физико-химические свойства, но также функции в клетках организмов, у которых они были обнаружены, что позволит в дальнейшем рассматривать их уже с позиции фармакологии. Кроме того, определенный интерес представляет возможность модификации светочувствительных белков, благодаря которой будет возможно более тонко регулировать их функции в оптогенетическом эксперименте.

Исследования, затрагивающие третий этап, направлены, во-первых, на изучение модифицированного светового излучения в перспективе разработки новых методов с использованием света различной длины волны, сфокусированного, рассеянного и

многолучевого излучения. Во-вторых, на усовершенствование аппаратного комплекса, что особенно актуально в целях стандартизации метода. Наконец, на четвертом этапе возникает проблема объективной оценки результатов эксперимента, преодоление которой требует комплексного анализа, включающего функциональные тесты, регистрацию с помощью электродов и зондов, а также флуоресцентные биосенсоры. При этом также важна разработка неинвазивных методов регистрации результатов, особенно в интересах медицины.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ: ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД В РЕШЕНИИ БИМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ

Нейрофизиология

Селективно воздействуя на возбудимые ткани, оптогенетика открывает большие возможности, прежде всего для нейрофизиологии, обладая рядом преимуществ по сравнению с другими методами исследования данной фундаментальной области (в частности, по сравнению с классической нейростимуляцией). К достоинствам данного направления относят возможность воздействовать на определенные интересующие типы нейронов и их отдельные внутриклеточные структуры с точным пространственно-временным контролем, что определяет перспективы для расширения современных представлений о функциональном устройстве мозга. Так, например, экспериментально продемонстрирована возможность активации локомоторных движений путем световой стимуляции глутаматергических нейронов спинного мозга трансгенных мышей, что показало ключевую роль данных клеток в процессе передвижения [16].

Оптогенетика также может быть ключом к решению и более сложных, комплексных исследований. Дополнив эксперимент функциональными данными с помощью оптогенетического метода, установлено, что нейроны рострального вентромедиального отдела продолговатого мозга иннервируют функционально неоднородные ткани (миокард, скелетные мышцы). Прежде предполагали, что данный отдел связан с регуляцией исключительно тонуса гладких миоцитов [17].

Кроме того, обсуждается возможность исследования мозжечка с помощью оптогенетического подхода, что является особо актуальным ввиду малоизученности функциональных связей мозжечка с корой больших полушарий и подкорковыми структурами [18].

Неврология

Вышеизложенные достоинства оптогенетики определяют ее широкие возможности не только в области нейрофизиологии, но и таких клинических

дисциплин, как неврология и психиатрия, позволяя рассматривать данный подход в качестве перспективного метода лечения. Одним из направлений оптогенетических исследований является возможность лечения прежде всего нейропатической боли. Точный патогенез данного состояния неизвестен, однако экспериментально установлена возможность воздействия на его периферический и центральный компоненты. В первом случае в качестве терапевтической мишени были рассмотрены ноцицепторы, во втором – желатинозная субстанция [19].

В эксперименте с моделью болезни Альцгеймера удалось установить терапевтическую роль восстановления медленных кортикоталамических осцилляций (0,6 Гц) с помощью оптогенетического повышения активности пирамидальных нейронов. Более того, было установлено патогенное действие медленных кортикоталамических осцилляций с оптогенетически удвоенной частотой (1,2 Гц) на развитие данной патологии, что в целом создает предпосылки для разработки лечебно-профилактической системы на основе достижений оптогенетики [20].

Для лечения болезни Паркинсона с 2010 г. учеными стали предлагаться способы глубокой стимуляции мозга. Методика основывается на стереотаксическом использовании миниатюрных электродов, с помощью которых осуществляют стимуляцию субталамического ядра мозга. Эффективность использования данного варианта терапии намного превышает эффективность медикаментозной терапии.

Функциональный оптогенетический подход также рассматривается в качестве метода реабилитации, в частности после инфаркта мозга. При этом возможно многокомпонентное действие: увеличение нейронной активности в ишемизированных тканях в сочетании с реорганизацией афферентных и эфферентных нейронных цепей [21].

Психиатрия

Перспектива функциональной реорганизации афферентных и эфферентных нейронных цепей и, в особенности, прицельного изучения клеточных и субклеточных взаимодействий в нервной ткани определяет также большой интерес к оптогенетике со стороны психиатров и наркологов.

Предполагается, что путем оптогенетической нормализации биохимических процессов и селективной стимуляции областей мозга, патогенетически связанных с тем или иным заболеванием, станет возможным лечение нарушений, сопровождающихся депрессивным синдромом, тревожностью, зависимостью, а также шизофренией и расстройств аутистического спектра [22, 23]. В частности, в одном

из экспериментов американскими учеными было установлено достоверное снижение депрессивных симптомов у животных после оптогенетической стимуляции дофаминергических нейронов, связанных с прилежащим ядром, ответственным за формирование различных поведенческих реакций [24].

В 2014 г. учеными из университета Буффало удалось контролировать с помощью света аддиктивную зависимость у крыс, приученных к алкоголю. У данной группы животных осуществляли генетическую модификацию систем высвобождения дофамина, после чего с помощью света можно было стимулировать выбранные группы нейронов и достичь продолжительного высвобождения нейромедиатора [25]. Уже в другом эксперименте путем оптогенетической стимуляции орбитофронтальной коры экспериментальных животных было обнаружено угнетение компульсивных симптомов, что создает предпосылки для разработки лечения целого ряда расстройств, связанных с нарушением взаимодействия орбитофронтальной коры и полосатого тела [26].

Офтальмология

Возможность восстановления и регуляции собственных светочувствительных клеток с помощью оптогенетической стимуляции определяет перспективы данного научного направления в области офтальмологии, в том числе для лечения заболеваний сетчатки, что чрезвычайно важно с учетом неутешительных данных Всемирной организации здравоохранения по статистике заболеваемости.

Следует отметить, что оптогенетические исследования, проводимые в области офтальмологии, имеют ряд особенностей в отличие от других медицинских направлений. Прежде всего, предпочтение в работе отдают опсинам с ретиноидным кофактором, что, очевидно, более физиологично, а доставка материала обычно осуществляется с помощью вирусных векторов путем интратретиальной и субретиальной инъекции с использованием аденоассоциированного вируса [27].

К основным проблемам применения оптогенетического метода в данной области относят: возникновение ремоделирования сетчатки с нарушением цитоархитектоники и функциональных взаимоотношений между ее слоями, проблемы с точным определением требуемого места инъекции генетического материала для получения оптимального результата и некоторое несоответствие между физиологическими для человека диапазонами восприятия света и диапазонами света, действующего на опсины [28]. Тем не менее предполагается, что непрерывное совершенствование техники оптогенетического эксперимента позволит преодолеть возникшие трудности. Так, уже

сегодня технологии оптогенетической инженерии позволяют сделать чувствительными к свету недеградировавшие клетки-фоторецепторы, а лежащие глубже ганглионарные клетки, что обеспечивает снижение риск в развитии полной потери зрения у пациентов с дегенеративными заболеваниями сетчатки [29].

Оториноларингология

Широкие возможности открывает оптогенетика и для оториноларингологии. В частности, данный подход может быть использован для восстановления нарушений слуха на уровне рецепторов при воздействии на физиологические механизмы восприятия звука, как показано в экспериментах по оптогенетической стимуляции слухового нерва, в результате которых было зарегистрировано возбуждение соответствующих ядер ствола мозга [30, 31]. Очевидные достоинства отличают оптогенетические конструкции от кохлеарных имплантов, позволяя избирательно действовать на клетки определенной части улитки, что было установлено в лаборатории Массачусетского университета, где удалось добиться частичного восстановления слуха с помощью света низкой интенсивности [32].

Эндокринология

Еще одним вариантом применением оптогенетической стимуляции может стать коррекция основных звеньев патогенеза эндокринных заболеваний, в частности, в перспективе – разработка сахаропонижающей системы. Экспериментально установлена возможность достижения нормогликемии на модели сахарного диабета II типа. В ходе исследования культура клеток, секретирующая глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и щелочную фосфатазу, была трансплантирована мышам линии LepRdb/db интраперитонеально и подкожно. В первом случае световой пучок был подведен с помощью оптоволокну, во втором – трансдермально, при этом в обоих случаях отмечалось достоверное снижение уровня глюкозы крови [33]. Подобная логика эксперимента сохранилась также в исследовании с беспроводным контролем над процессом подачи светового пучка с помощью приложения для смартфона. При этом культура клеток также синтезировала GLP-1 и инсулин, а в качестве источника светового пучка использовался светодиод, подкожно имплантированный с культурой в гидрогелевой капсуле [34].

Кардиология

Исходя из того, что функции сердца неразрывно связаны с электрохимическими процессами, оптогенетика, будучи нацелена на более тонкие и физиологичные механизмы, чем применяемые в настоящее

время медикаментозные и хирургические методы лечения, открывает широкие возможности для восстановления пациентов кардиологического профиля.

Достижения оптогенетики могут быть использованы для получения нового типа кардиостимуляторов, в которых функционирование мышечных клеток-пейсмекеров будет контролироваться светом вместо электрических импульсов. Так, например, в США команда стэнфордских ученых под руководством Оскара Абилеза работает над проектом по разработке нового биологического кардиостимулятора, управляемого светом. Полученные результаты исследований дают основания полагать, что есть надежные способы для восстановления здоровой работы сердечной мышцы с помощью света. Самое главное преимущество оптогенетики в кардиологии – это селективное возбуждение только внутреннего слоя (эндокарда) [35].

Данный способ лечения мерцательной аритмии позволит улучшить состояние пациентов и снизить побочные действия по сравнению с использованием существующих электрических кардиостимуляторов, которые устраняют аритмию, но вызывают сильную боль в связи с возбуждением скелетных мышц [36, 37]. В целом уже сегодня оптогенетический метод готов предложить замену таким устройствам, как кардиостимуляторы и дефибрилляторы, которые позволяют в определенном ритме подводить электрические сигналы, однако использование этих устройств сопряжено с определенными рисками (повреждение сердечной ткани, сбой батареи и др.) [38].

Фармация и фармакология

Не менее актуальным является использование оптогенетики и в области фармацевтических наук. Прежде всего, оптогенетика позволит оптимизировать пайплайн на этапе исследований и разработки препаратов, а именно: поиск новых терапевтических мишеней для лекарственных препаратов путем всестороннего изучения этиопатогенеза заболеваний, оптогенетический скрининг, функциональный оптогенетический анализ и стратификацию пациентов, что является важным шагом в направлении персонализированной медицины [39]. Механизмы действия непосредственно оптогенетического компонента терапии могут быть многообразны: регуляция внутриклеточных сигнальных путей, увеличение проницаемости клеточных мембран, контроль пролиферации и дифференцировки клеток, активация действующих веществ препарата после доставки в клетку и др.

Кроме того, оптогенетика рассматривается в качестве перспективного метода изучения токсичности лекарственных средств на этапе их разработки, что крайне актуально с экономической точки

зрения. Применяемые в настоящее время методы недостаточно эффективны – порядка одной трети лекарственных средств не проходят клинические испытания на II–III фазах [40]. Наконец, оптогенетика может использоваться в качестве высокоспецифичного инструмента для доставки лекарственных средств, позволяя регулировать скорость, ритм и высвобождаемую дозу вещества, а также преодолевать гистогематические барьеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптогенетика – новое перспективное научное направление для решения различных биомедицинских задач. Оптимальный синтез достижений молекулярной биологии и лазерных технологий открывает новые возможности и позволяет решить сложные биомедицинские задачи. Совершенствование и использование данного метода расширяют возможности терапевтического воздействия для широкого спектра заболеваний с минимизацией фармакологического воздействия и максимальной эффективностью и избирательностью действия, что, возможно, в будущем позволит активно использовать данный метод не только в фундаментальной медицине, но и в практическом здравоохранении.

ЛИТЕРАТУРА

- Oesterheld D., Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* 1971; 233 (39): 149–152. DOI: 10.1038/newbio233149a0.
- Crick F.H. Thinking about the brain. *Sci. Am.* 1979; 241 (3): 219–232. DOI: 10.1038/scientificamerican0979-219.
- Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 2005; 8 (9): 1263–1268. DOI: 10.1038/nn1525.
- Zhang F., Prigge M., Beyrière F., Tsunoda S.P., Mattis J., Yizhar O., Hegemann P., Deisseroth K. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat. Neurosci.* 2008; 11 (6): 631–633. DOI: 10.1038/nn.2120.
- Deubner J., Coulon P., Diester I. Optogenetic approaches to study the mammalian brain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019; 57: 157–163. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.04.003.
- Dimidschstein J., Chen Q., Tremblay R. et al. A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 2016; 19 (12): 1743–1749. DOI: 10.1038/nn.4430.
- Fenno L.E., Mattis J., Ramakrishnan C. et al. Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic. *Nat. Methods.* 2014; 11 (7): 763–772. DOI: 10.1038/nmeth.2996.
- Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G. et al. *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron.* 2007; 54 (2): 205–218. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
- Zeng H., Madisen L. Mouse transgenic approaches in optogenetics. *Prog. Brain Res.* 2012; 196: 193–213. DOI: 10.1016/B978-0-444-59426-6.00010-0.
- Park J.E., Silva A.C. Generation of genetically engineered non-human primate models of brain function and neurological disorders. *Am. J. Primatol.* 2019; 81 (2): e22931. DOI: 10.1002/ajp.22931.
- Bitzenhofer S.H., Ahlbeck J., Wolff A. et al. Layer-specific optogenetic activation of pyramidal neurons causes beta-gamma entrainment of neonatal networks. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14563. DOI: 10.1038/ncomms14563.
- Adesnik H., Scanziani M. Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature.* 2010; 464 (7292): 1155–1160. DOI: 10.1038/nature08935.
- Han X., Chow B.Y., Zhou H., Klapeotke N.C., Chuong A., Rajimehr R., Yang A., Baratta M.V., Winkle J., Desimone R., Boyden E.S. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 2011; 5: 18. DOI: 10.3389/fnsys.2011.00018.
- Jing M., Zhang P., Wang G. et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36 (8): 726–737. DOI: 10.1038/nbt.4184.
- Srinivasan S., Hosokawa T., Vergara P. et al. Miniaturized microscope with flexible light source input for neuronal imaging and manipulation in freely behaving animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 517 (3): 520–524. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.07.082.
- Häggglund M., Borgius L., Dougherty K.J., Kiehn O. Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat. Neurosci.* 2010; 13 (2): 246–252. DOI: 10.1038/nn.2482.
- Farmer D.G., Pracejus N., Dempsey B. et al. On the presence and functional significance of sympathetic premotor neurons with collateralized spinal axons in the rat. *J. Physiol.* 2019; 597 (13): 3407–3423. DOI: 10.1113/JP277661.
- Miterko L.N., Baker K.B. et al. Consensus paper: experimental neurostimulation of the cerebellum. *Cerebellum.* 2019; 18 (6): 1064–1097. DOI: 10.1007/s12311-019-01041-5.
- Liu K., Wang L. Optogenetics: Therapeutic spark in neuropathic pain. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* 2019; 19 (4): 321–327. DOI: 10.17305/bjbm.2019.4114.
- Kastanenka K.V., Calvo-Rodriguez M., Hou S.S. et al. Frequency-dependent exacerbation of Alzheimer's disease neuropathophysiology. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 8964. DOI: 10.1038/s41598-019-44964-z.
- 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. DOI: 10.1038/ncomms2376.
- Deisseroth K. Optogenetics and psychiatry: applications, challenges, and opportunities. *Biol. Psychiatry.* 2012; 71 (12): 1030–1032. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.12.021.
- Shirai F., Hayashi-Takagi A. Optogenetics: Applications in psychiatric research. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017; 71 (6): 363–372. DOI: 10.1111/pcn.12516.
- Tye K.M., Mirzabekov J.J., Warden M.R. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depres-

- sion-related behaviour. *Nature*. 2013; 493 (7433): 537–541. DOI: 10.1038/nature11740.
25. Bass C.E., Grinevich V.P., Gioia D. et al. Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration. *Front. Behav. Neurosci.* 2013; 7: 173. DOI: 10.3389/fnbeh.2013.00173.
 26. Burguière E., Monteiro P., Feng G., Graybiel A.M. Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science*. 2013; 340 (6137): 1243–1246. DOI: 10.1126/science.1232380.
 27. Henriksen B.S., Marc R.E., Bernstein P.S. Optogenetics for retinal disorders. *J. Ophthalmic. Vis. Res.* 2014; 9 (3): 374–372. DOI:10.4103/2008-322X.143379.
 28. Berry M.H., Holt A., Salari A. et al. Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. *Nat. Commun.* 2019; 10 (1): 1221. DOI: 10.1038/s41467-019-09124-x.
 29. Ganjawala T.H., Lu Q., Fenner M.D., Abrams G.W., Pan Z.H. Improved CoChR variants restore visual acuity and contrast sensitivity in a mouse model of blindness under ambient light conditions. *Mol. Ther.* 2019; 27 (6): 1195–1205. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.04.002.
 30. Hernandez V.H., Gehrt A., Jing Z. et al. Optogenetic stimulation of the auditory nerve. *J. Vis. Exp.* 2014; (92): e52069/ DOI: 10.3791/52069.
 31. Hernandez V.H., Gehrt A., Reuter K. et al. Optogenetic stimulation of the auditory pathway. *J. Clin. Invest.* 2014; 124 (3): 1114–1129. DOI: 10.1172/JCI169050.
 32. Wrobel C., Dieter A., Huet A. et al. Optogenetic stimulation of cochlear neurons activates the auditory pathway and restores auditory-driven behavior in deaf adult gerbils. *Sci. Transl. Med.* 2018; 10 (449): eaao4496. DOI: 10.1126/scitranslmed.aao0540.
 33. Ye H., Daoud E., Baba M., Peng R.W., Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*. 2011; 332 (6037): 1565–1568. DOI: 10.1126/science.1203535.
 34. Shao J., Xue S., Yu G. et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9 (387): eaal2298. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal2298.
 35. Yu L., Zhou L., Cao G. et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 70 (22): 2778–2790. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.09.1107.
 36. Majumder R., Feola I., Teplenin A.S., de Vries A.A., Panfilov A.V., Pijnappels D.A. Optogenetics enables real-time spatiotemporal control over spiral wave dynamics in an excitable cardiac system. *Elife*. 2018; 7: e41076. DOI: 10.7554/eLife.41076.
 37. Cheng Y., Li H., Lei H. et al. Flexible and precise control of cardiac rhythm with blue light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 514 (3): 759–764. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.035.
 38. Quiñonez Uribe R.A., Luther S., Diaz-Maue L., Richter C. Energy-reduced arrhythmia termination using global photostimulation in optogenetic murine hearts. *Front. Physiol.* 2018; 9: 1651. DOI: 10.3389/fphys.2018.01651.
 38. Zhang H., Cohen A.E. Optogenetic approaches to drug discovery in neuroscience and beyond. *Trends Biotechnol.* 2017; 35 (7): 625–639. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.04.002.
 39. Kielbus M., Czapiński J., Odrzywolski A. et al. Optogenetics in cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2018; 13 (5): 459–472. DOI: 10.1080/17460441.2018.1437138.
 40. Sahel J.-A., Roska B. Gene therapy for blindness. *Ann. Rev. Neurosci.* 2013; 36: 467–488. DOI: 10.1146/annurev-neuro-062012-170304.

Сведения об авторах

Сорокина Лея Евгеньевна, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1862-6816.

Петренко Виталина Игоревна, аспирант, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-9451-1757.

Субботкин Михаил Владимирович, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-0521-0619.

Куланова Алина Алексеевна, студент, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-7553-5382.

Кучеренко Александр Сергеевич, аспирант, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-5861-190X.

Кубышкин Анатолий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1309-4005.

Фомочкина Ирина Ивановна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0003-3065-5748.

Номеровская Александра Юрьевна, ассистент, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинской академии имени С.И. Георгиевского, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-8247-4773.

Халилов Сервер Искандарович, аспирант, кафедра общей физики, Физико-технический институт, КФУ имени В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1682-9441.

(✉) **Сорокина Лея Евгеньевна**, e-mail: leya.sorokina@mail.ru.

Поступила в редакцию 20.07.2019

Подписана в печать 25.12.2019