

Применение лазеров в медицине



Профессор Власова О.Л.
Кафедра медицинской физики

Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций
Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра
Великого

Лазерная диагностика

- Задача диагностики – достоверное извлечение информации о состоянии организма и патологических изменений в нём.
- Поэтому – любое воздействие извне с одной стороны **нежелательно**, с другой стороны **без воздействия нет отклика**.
- Все-таки при диагностике **низкоинтенсивные воздействия**, не вызывающие необратимых изменений в организме, **применяются значительно шире**, чем высокоинтенсивные, после которых биологическая ткань либо перестает существовать вообще как организованная структура, либо погибает.
- Высокоинтенсивное излучение применяется, когда необходимо исследовать **продукты разрушения биотканей**.
- В основном, информацию получают, используя эффекты **светорассеяния или флуоресценции**.

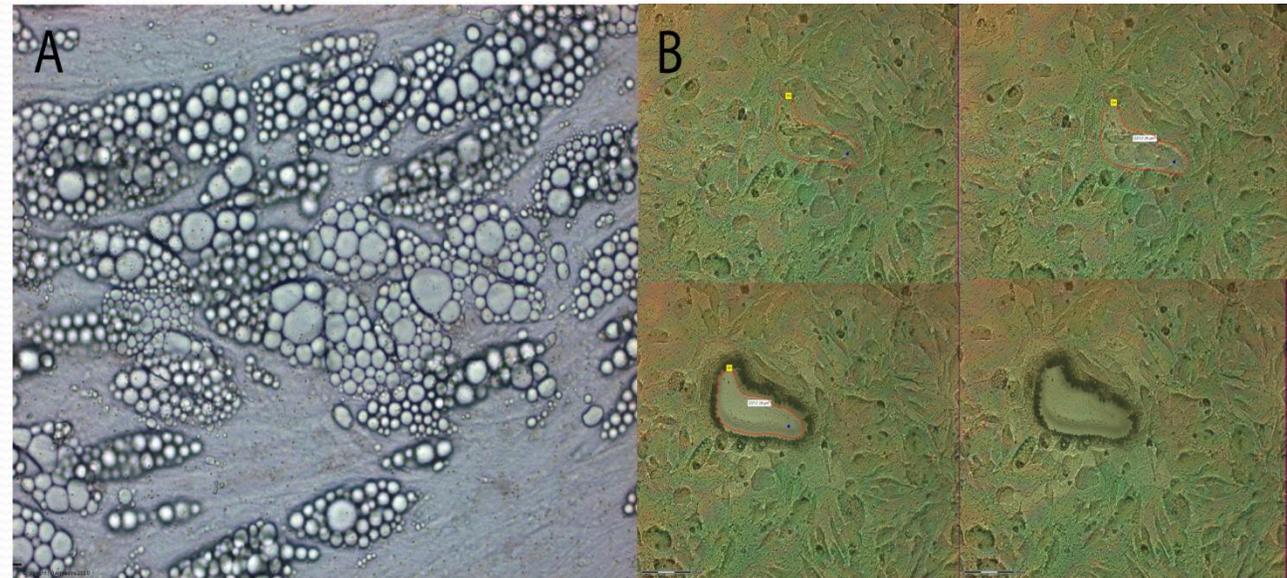
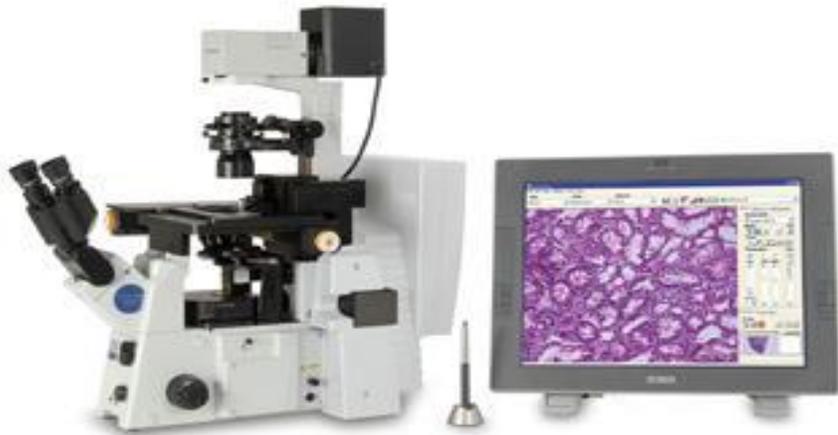
Принципы лазерной диагностики

- Методы лазерной диагностики можно разделить на:
- Микродиагностические (на уровне атомов и молекул) – линейная и нелинейная лазерная спектроскопия
- Макродиагностические (на уровне клеток и органелл, органов) – упругое и квазиупругое рассеяние, эффект Доплера, флуоресценция, интерферометрия и голография.
- Примеры микродиагностики, в основном, связаны с использованием лазеров для пробоподготовки.
- **Резонансная фотоионизация** молекул с помощью лазера с традиционной масс-спектрометрией позволяет, например, определить концентрацию триптофана в воде на уровне 10^{-14} г. ЛАММА -метод (лазерная микроаналитическая масс-спектрометрия)– отбор пробы путем её **испарения с помощью лазера** с поверхности биообъекта и дальнейшего масс-спектрометрического анализа пара.
- **Неразрушающая микродиагностика** , например: лазерная микрофлуориметрия отдельных клеток или органелл

- **Лазерная захватывающая микродиссекция (ЛМЗ) как пример разрушающего действия лазера в диагностике** — метод изоляции отдельных клеток с необходимыми характеристиками из биологических образцов ткани, позволяющий избежать возможных повреждений или изменений клетки либо минимизировать их.
- ЛМЗ позволяет избежать повреждений морфологии клетки и её химического состава, что делает этот метод оптимальным при изучении ДНК, РНК, белкового состава клетки. Среди возможных образцов — мазки крови, цитологические препараты, культуры клеток, и даже замороженные и парафинированные образцы.
- Прозрачная плёнка накладывается на образец, затем нужные клетки идентифицируются под микроскопом. Под воздействием лазерного луча **ИК диапазона** клетки слипаются с плёнкой и вместе с ней вынимаются из образца для дальнейшего исследования.

- В коммерческих системах для лазерной микродиссекции используются, как правило, следующие лазеры: азотный лазер (337 нм), а также твердотельные лазеры с умножением частоты на кристаллах Nd:YAG (355 нм). Лазерные линии выбраны таким образом, что они попадают в зону А (320- 400 нм) ультрафиолетовой области, где поглощение ультрафиолетового излучения молекулами ДНК, РНК и белков, а следовательно, и их повреждение **минимально**. Это обеспечивает лучшую сохранность материала для молекулярно-генетического и биохимического анализа.
- С помощью лазерной микродиссекции, например, отделяют опухолевую ткань от нормальной или же вырезают различные компоненты опухолей из биопсийного материала.

Использование лазерного луча, сфокусированного объективом микроскопа, в качестве «режущего» инструмента позволяет выделять объекты интереса микроскопических размеров с высокой точностью.



А - жировая ткань; В - Этапы выделения адипоцитов методом лазерной микродиссекции.

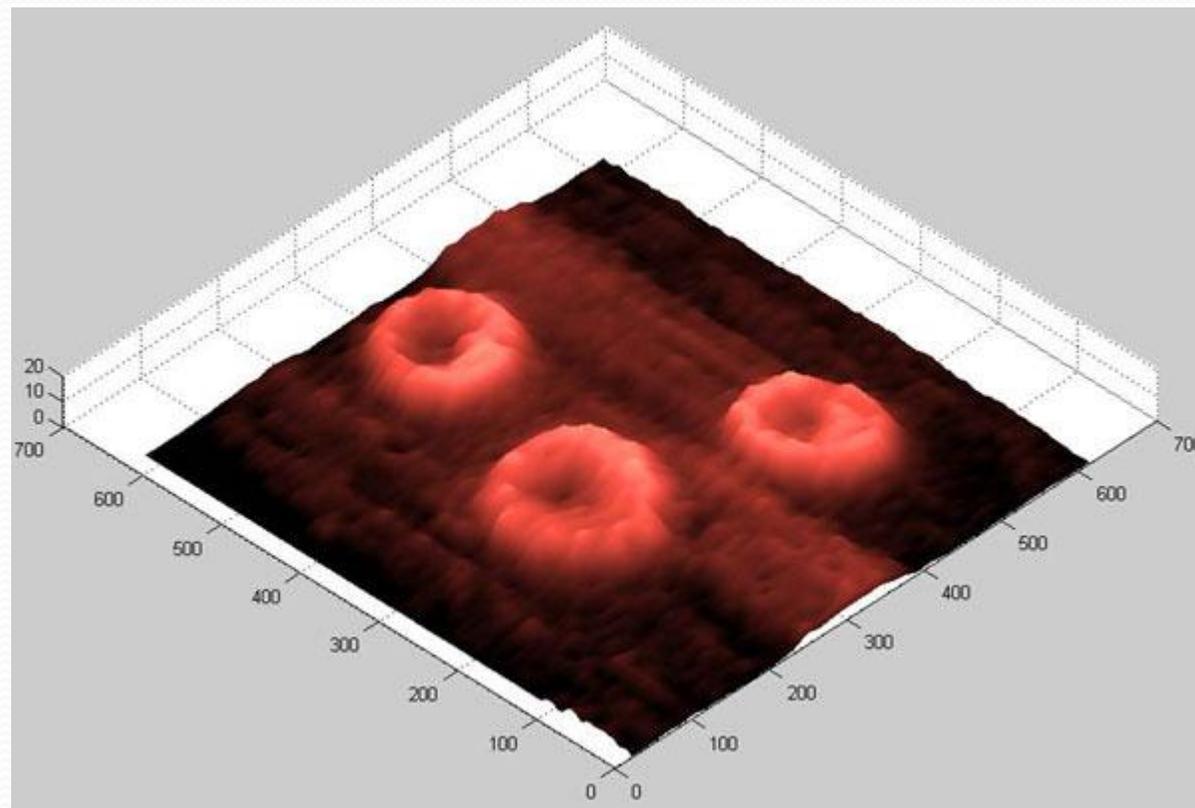
Лазерная макродиагностика

- В основе – использование высокой монохроматичности и когерентности лазерного излучения, которая позволяет измерять положение, скорость, форму компонентов и самих биообъектов. В основном, используются эффекты светорассеяния (нефелометры, проточные цитометры) и флуоресценции (микроскопия и др.).
- Примеры использования эффекта **светорассеяния**:
- 1. **Лазерный индикатор иммунологических реакций.** Основан на измерении интегральной интенсивности рассеянного света в суспензиях отдельно антигена (I_1), антител (I_2) и в их смеси (I_3). Реакция произошла, если $K=10 (I_1+I_2)I_3$ лежит в интервале 0-8.
- 2. Упругое рассеяние лазерного излучения – метод измерения деформируемости эритроцитов (**экмацитометрия**). Лазерный луч пропускают через суспензию эритроцитов, помещенных между вращающимися прозрачными цилиндрами и наблюдают дифракционную картину, вид которой зависит от формы эритроцитов (недеформированные – концентрические окружности, деформированные – эллипсы).
- 3. **Лазерная пролетная цитометрия.**

Голография и интерферометрия

- Голографические методы позволяют получать трехмерные изображения биообъекта, контуры объекта могут быть картированы, а их деформации проанализированы в реальном масштабе времени.
- Такие новые возможности могут оказать влияние на развитие многих разделов медицины: ортопедию,
- радиологию, офтальмологию и др.

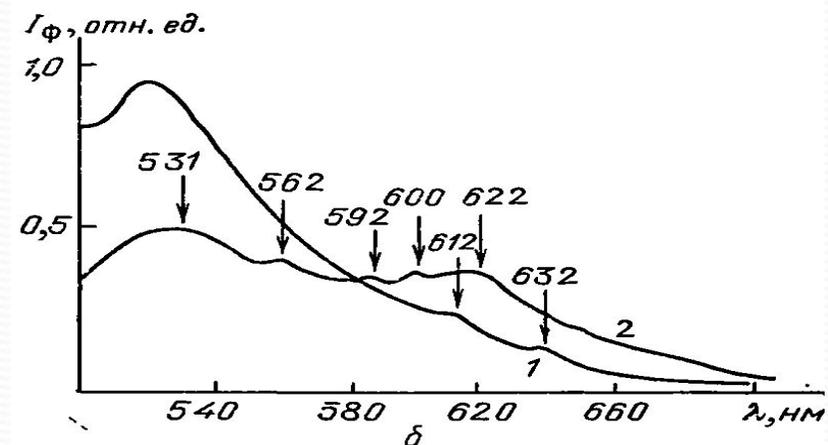
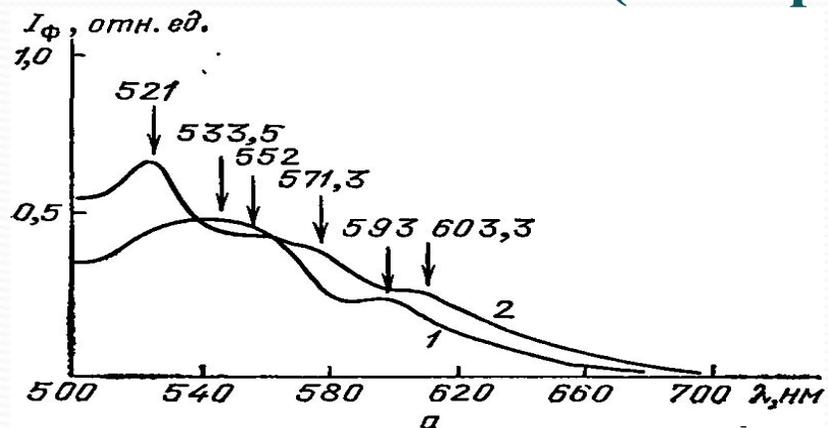
Большие возможности имеет классическая интерферометрия при использовании лазерных источников, например, при Создании ретинометров – устройств для определения ретинальной остроты зрения, спекл-интерферометров – устройств для определения структуры и шероховатости некоторых биотканей.



Флуориметрия

- Лазер как источник излучения (возбуждающего флуоресценцию) очень часто используется в ходе флуоресцентного анализа, например:
- 1. При анализе **собственной флуоресценции** живых тканей с помощью спектрометров.
- 2. При флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных красителей (**конфокальный микроскоп**).
- 3. При флуоресцентной диагностике опухолевых тканей с использованием **фотосенсибилизатора**.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ (спектры собственной флуоресценции)



Спектры флуоресценции от почки (а) и предстательной железы (б) крысы: 1 — здоровый орган, 2 — опухолевый

Применение лазерных флуоресцентных спектрометров с высокой спектральной плотностью мощности возбуждения позволило повысить скорость и качества получения спектров собственной флуоресценции и поднять общий уровень исследований в этом направлении. Отличия спектров объясняются либо изменениями среды, окружающей флуорофоры, либо производством новых флуорофоров, индуцированным биохимическими изменениями в клетках или в окружающей их среде.

Лазерная диагностика в офтальмологии

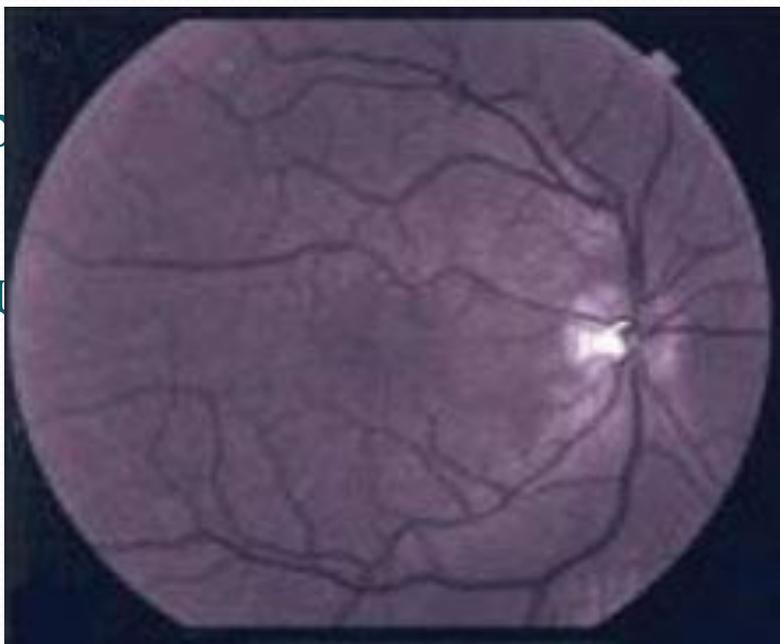
Ангиография.

Исследование сосудистой системы и гемодинамики глазного дна является одним из важнейших средств ранней диагностики тяжелых патологических изменений органа зрения и, в конечном счете, профилактики преждевременной слепоты.

Наибольшее распространение для исследования гемодинамики в настоящее время получили флюоресцентная ангиография и ангиоскопия глазного дна. Эти методы обладают большой информационной емкостью. Флюоресцентная ангиография с фоторегистрацией позволяет зафиксировать результаты исследования.

Флуоресцентная ангиография

- Флуоресцентная ангиография (ФАГ) – метод исследования сосудов сетчатки, заключающийся во внутривенном введении красителя – флуоресцеина и наблюдении за его прохождением по сосудам глазного дна. При освещении голубым светом с длиной волны около 490 нм молекулы флуоресцеина активируются и начинают излучать световые волны иного спектра (около 530 нм) желто-зеленого цвета.



изобр

сосуд

фиксирует
дна на различных этапах
оресцеина по

Лазерная диагностика

В диагностике лазерное излучение может использоваться как вне организма (*ex vivo*), так и для прямого анализа органов и тканей пациента (*in vivo*). Приведем некоторые примеры применения лазеров в диагностике.

Применение *ex vivo*. Через тонкий кварцевый капилляр прокачивается специально обработанная кровь (см. рисунок). Излучение лазера направляется на прозрачный капилляр и вызывает флюоресценцию клеток крови. Флюоресцентное свечение улавливается чувствительными датчиками. Это свечение специфично для каждого типа клеток крови, проходящих поодиночке в области лазерной засветки. Поэтому имеется возможность подсчитать их количество в заданном объеме крови, а также получать с высокой точностью количественные показатели по каждому типу клеток. Этот принцип использован в приборе, который называется *гемоцитометр*. Производительность этого прибора в сотни раз превышает производительность анализа крови лаборантом традиционным способом. И точность, и объективность результатов также существенно выше.

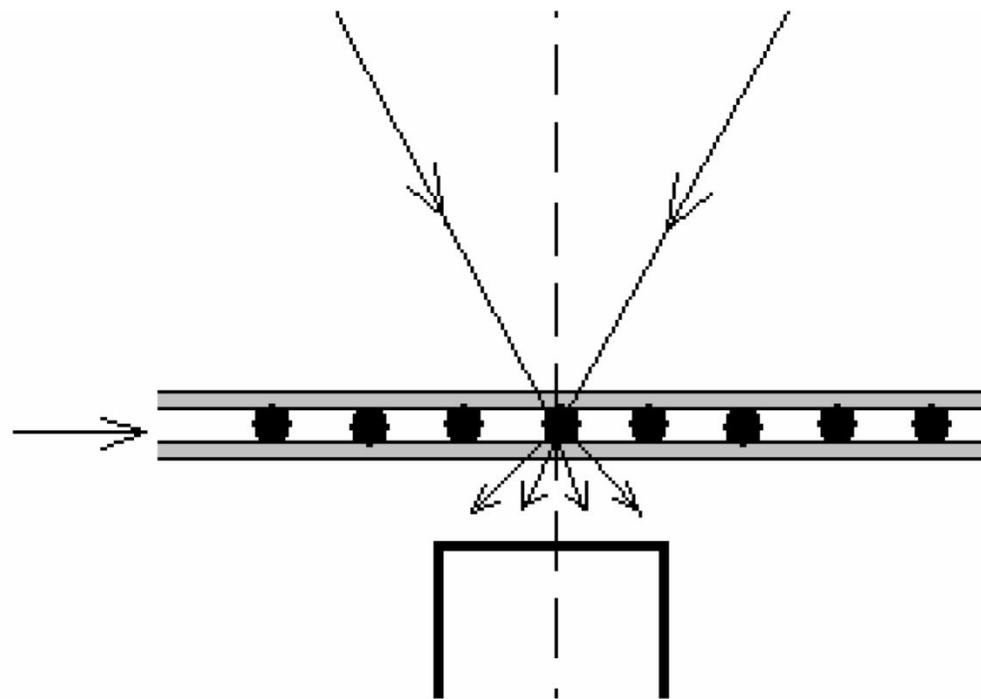
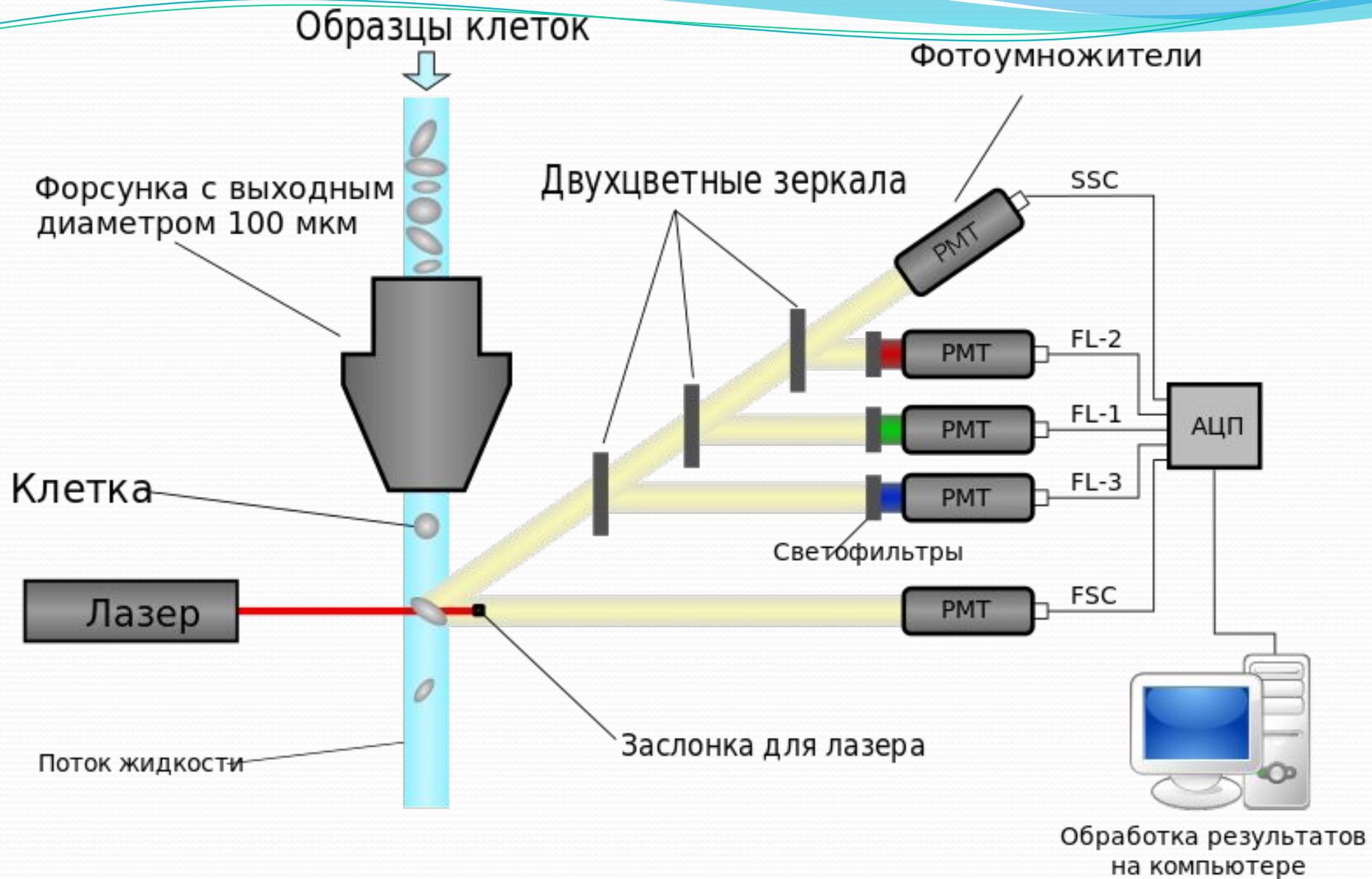


Рисунок . Применение лазерного излучения для диагностики крови.

Еще более совершенным диагностическим лазерным анализатором является *проточный флуориметр*, в котором клетки перед прогоном через капилляр окрашиваются специальными красителями, так что появляется возможность не только исследовать отдельные типы, но и разновидности типов клеток крови. При этом возможен анализ не только клеток крови, но и любых других клеточных элементов, выделенных из любых тканей организма для диагностики.



Принцип получения информации

Клеточная суспензия, предварительно меченная флуоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет **гидродинамического фокусирования в струе**. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют:

- **рассеяние света под малыми углами** (от 1° до 10°) (данная характеристика используется для определения **размеров клеток**).
- **рассеяние света под углом 90°** (позволяет судить о **соотношении ядро/цитоплазма**, а также о неоднородности и гранулярности клеток).
- **интенсивность флуоресценции** по нескольким каналам - позволяет определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.

● **Преимущества**

- короткое время анализа (сек) за счет высокой скорости
- анализ большого количества клеток (до 10^8 клеток)
- детектирование субпопуляций клеток
- измерение параметров редко встречающихся клеток
- объективное измерение интенсивности флуоресценции

- **Лазерная пролётная цитометрия с многопараметрическим подходом, основанным на светорассеянии (например, He-Ne лазер 633 нм) , иногда в сочетании с микрофлуориметрией (например, используется аргоновый - 488 нм или He-Cd лазер -441 нм).**
- При таком подходе одновременно измеряется ряд сигналов от отдельной клетки, например, рассеяние вперёд и под углом 90 градусов (ортогональное рассеяние).
- Такой подход позволяет довольно эффективно **дифференцировать клетки крови по их морфологии.**

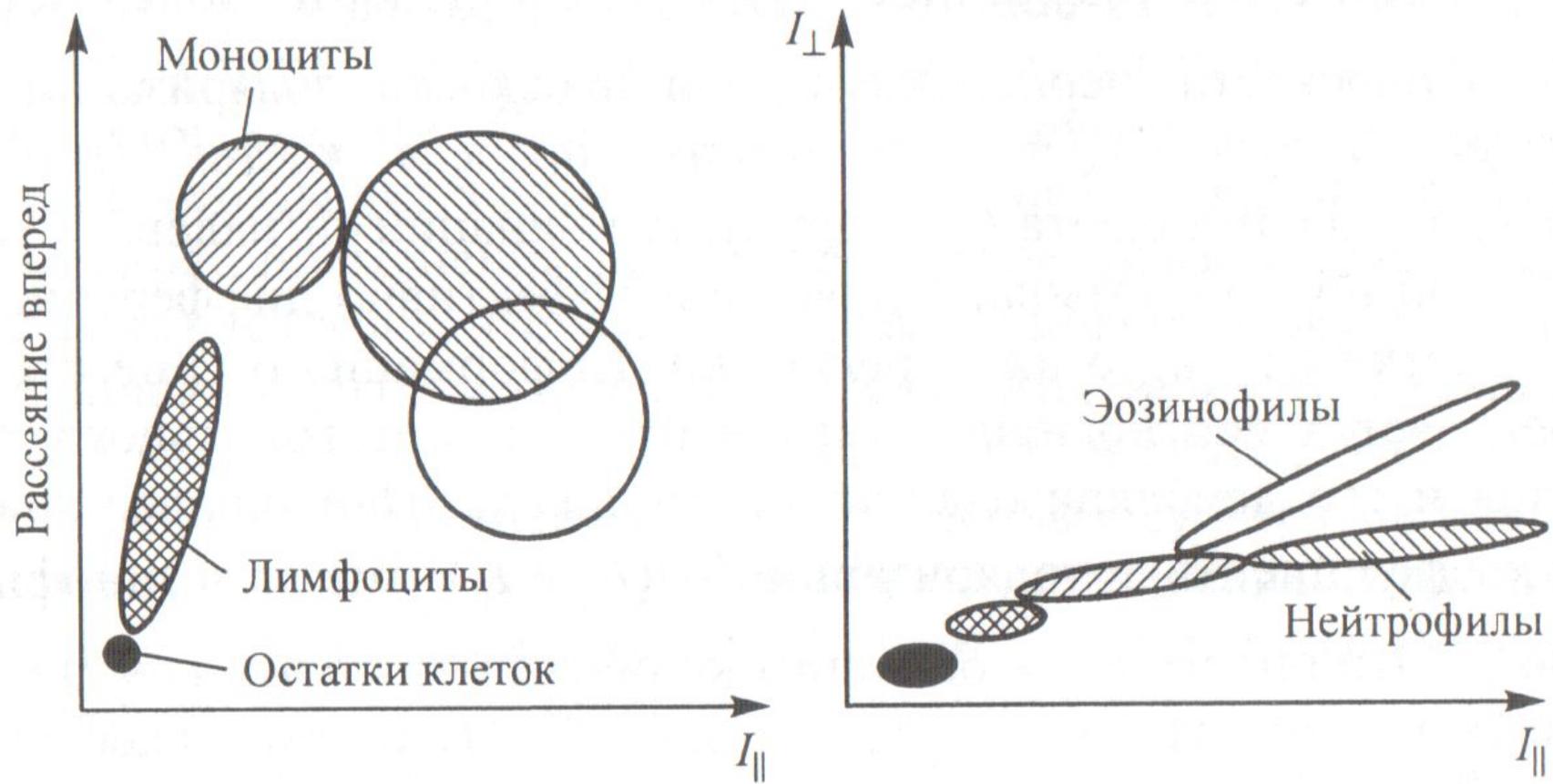
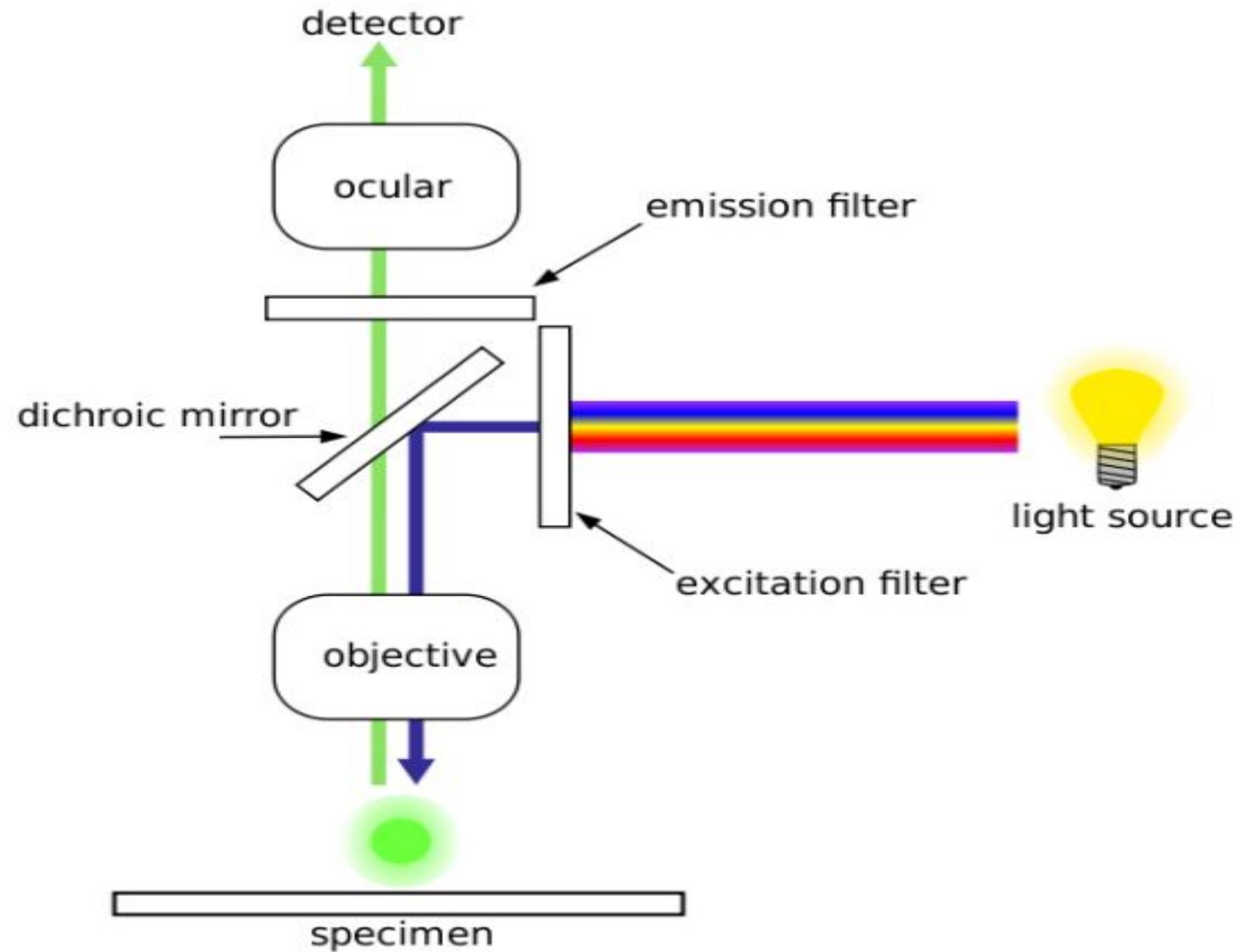


Рис. 4.1. Двухпараметрические карты интенсивности рассеяния белых клеток крови

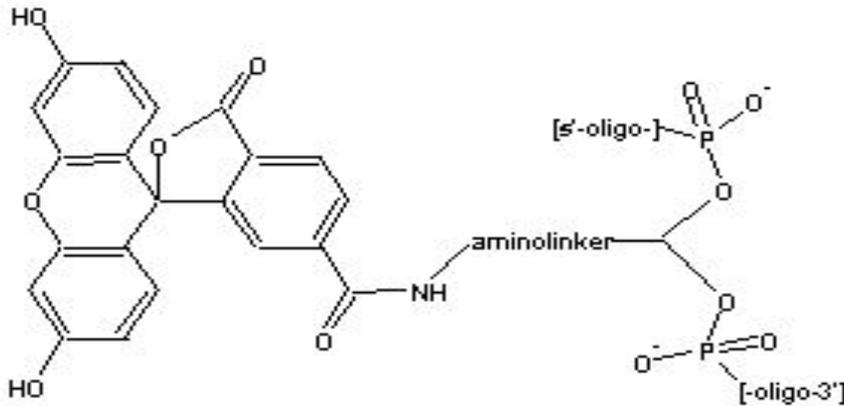
Принципиальная схема флуоресцентного микроскопа.



Виды флуоресцентных красителей.

Флуоресцеины.

Карбоксифлуоресцеин (FAM)



MW:	376.3
Поглощение: $1_{\text{макс.}}$	492 нм
Флуоресценция: $1_{\text{макс.}}$	520 нм
Молярный коэффициент поглощения при $1_{\text{макс.}}$	83,000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Квантовый выход	~ 0.8

Работают при pH = 7

Области применения:

Производные флуоресцеина являются наиболее распространенными флуоресцентными метками, вводимыми в олигонуклеотиды.

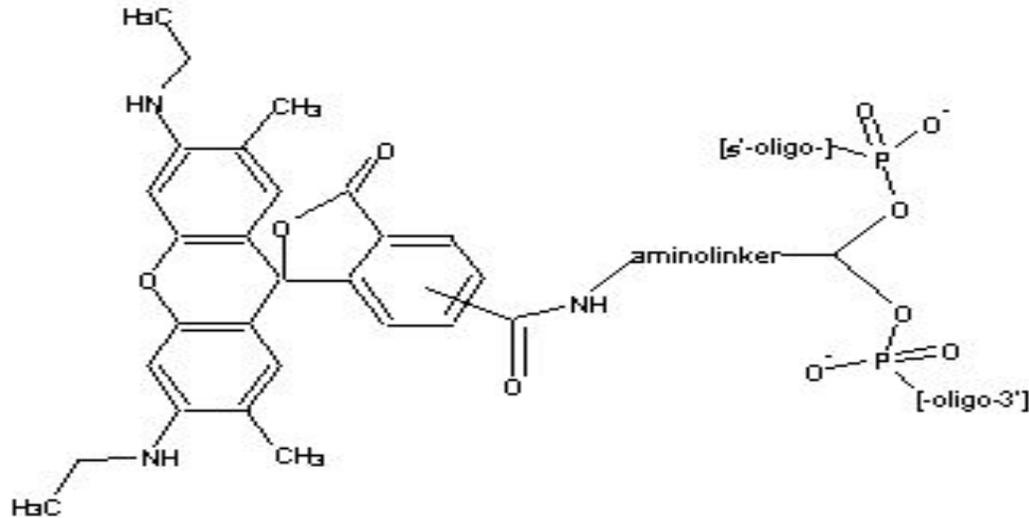
Максимум возбуждения для производных флуоресцеина находится в диапазоне спектральных линий аргонового (488 нм) и Nd:YAG (477 нм) лазеров, что делает этот краситель незаменимым в таких областях, как:

1. ДНК анализ с лазер-индуцируемой флуоресцентной детекцией;
2. микроскопия с конфокальным лазерным сканированием;
3. проточная цитофлуориметрия.

Виды флуоресцентных красителей.

Родамины.

6-Карбоксиродамин (R6G)



MW:	457.52
Поглощение: $\lambda_{\text{макс.}}$	524 нм
Флуоресценция: $\lambda_{\text{макс.}}$	557 нм
Молярный коэффициент поглощения при $\lambda_{\text{макс.}}$	108,000 M ⁻¹ *см ⁻¹
Квантовый выход	~ 0.75

Области применения:

Красители родаминового ряда снискали широкое применение в качестве олигонуклеотидных меток. В отличие от производных флуоресцеинов, их спектральные характеристики не меняются в диапазоне pH от 4 до 10. Карбоксиродамины используются в различных молекулярно-биологических приложениях, таких как:

- 1.автоматическое секвенирование ДНК;
- 2.количественная ПЦР в реальном времени;
- 3.флуоресцентная in situ гибридизация;
- 4.детекция на ДНК-чипах.

Виды флуоресцентных красителей.

Родамины.

Карбокси-X-родамин (ROX)

MW:	534.68
Поглощение: $1_{\text{макс.}}$	580 нм
Флуоресценция: $1_{\text{макс.}}$	605 нм
Молярный коэффициент поглощения при $1_{\text{макс.}}$	82,000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
Квантовый выход	~ 0.8

Тетраметилкарбоксиродамин (TAMRA)

MW:	431
Поглощение: $1_{\text{макс.}}$	546 нм
Флуоресценция: $1_{\text{макс.}}$	576 нм
Молярный коэффициент поглощения при $1_{\text{макс.}}$	95,000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
Квантовый выход	~ 0.7

TAMRA используется прежде всего в качестве акцептора флуоресценции в зондах, применяемых для проведения количественного ПЦР в реальном времени.

6-Карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин (6-JOE)

MW:	390.26
Поглощение: $1_{\text{макс.}}$	520 нм
Флуоресценция: $1_{\text{макс.}}$	548 нм
Молярный коэффициент поглощения при $1_{\text{макс.}}$	75,000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
Квантовый выход	~ 0.75

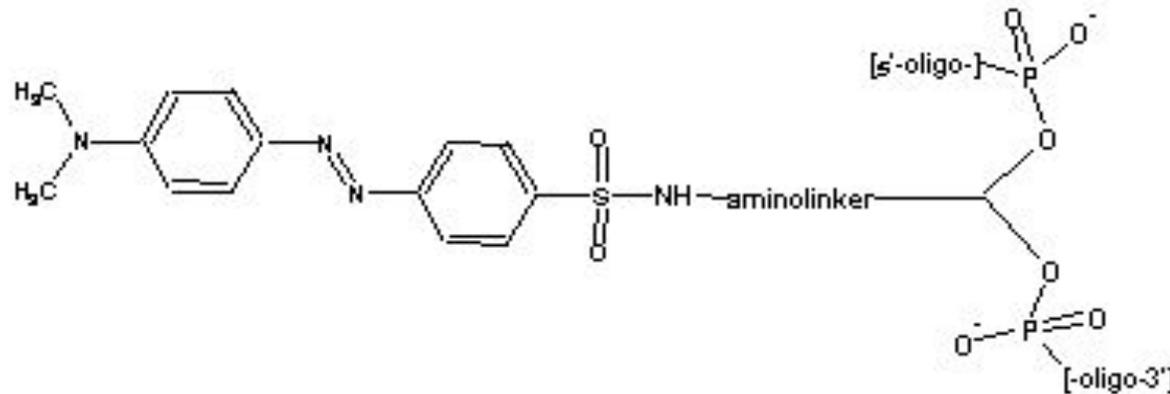
традиционно используется при автоматическом секвенировании ДНК. Промежуточный по сравнению с другими красителями спектр поглощения/флуоресценции 6JOE, высокий квантовый выход и низкая чувствительность к изменению pH (pKa ~4.3) в диапазоне близком к физиологическому, позволяют использовать этот краситель для целого ряда молекулярно-биологических приложений.

Виды флуоресцентных красителей.

Гасители флуоресценции.

Эти вещества имеют спектр поглощения близкий к спектру флуорофора и в случае когда молекулы тушителя и флуорофора находятся в непосредственной близости друг к другу, тушитель "перехватывает" излучение и эффективность флуоресценции сильно падает.

Dabsyl

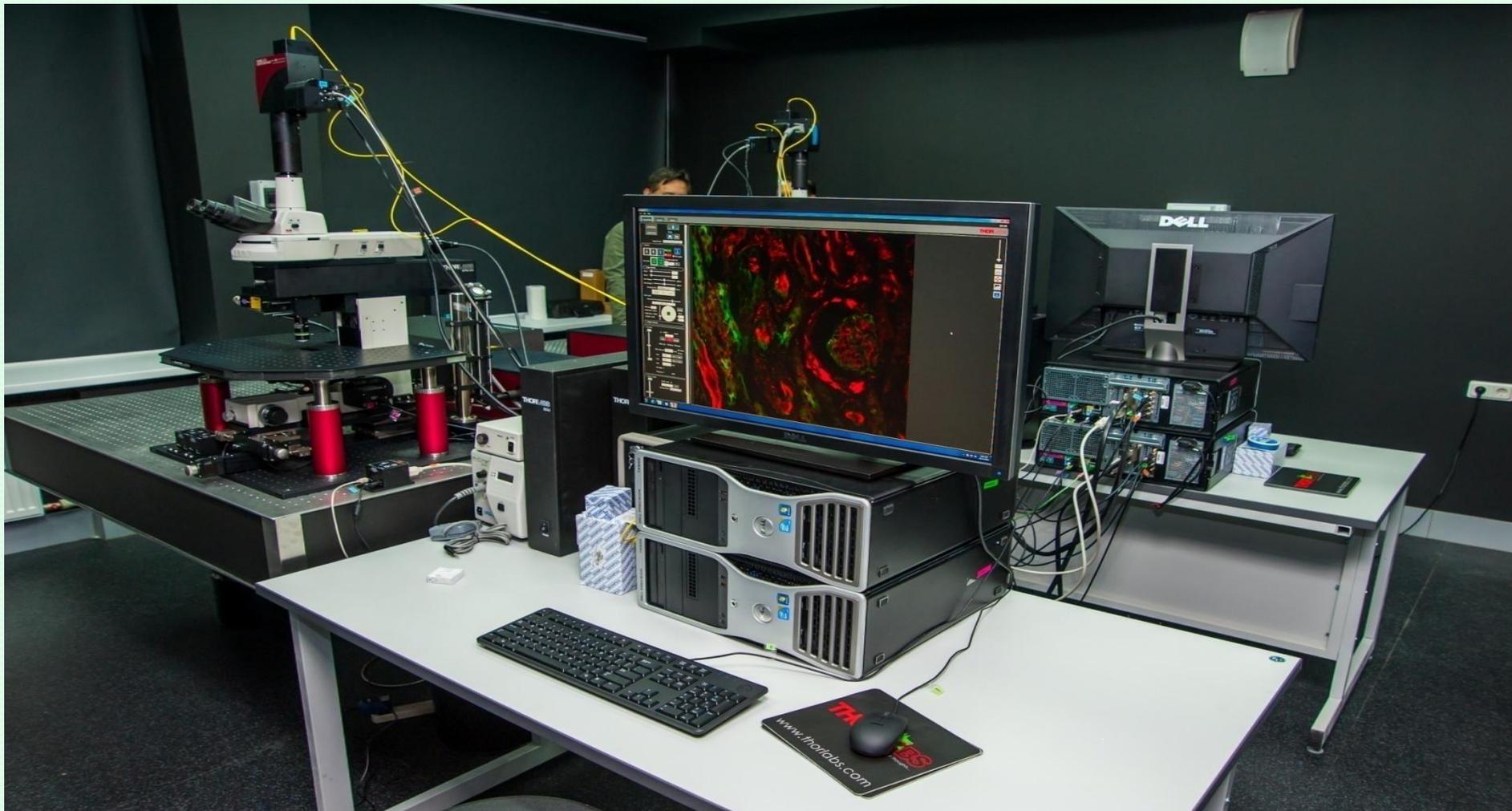


MW:	420.53
Поглощение: $\lambda_{\text{макс.}}$	453 нм
Флуоресценция:	нет
Молярный коэффициент поглощения при $\lambda_{\text{макс.}}$	32,000 M ⁻¹ *см ⁻¹
Квантовый выход	нет

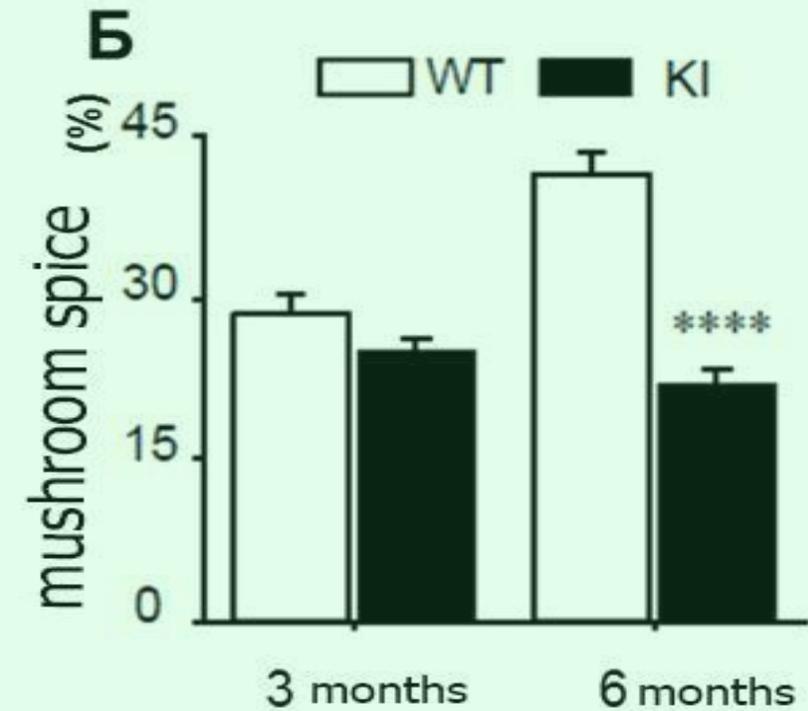
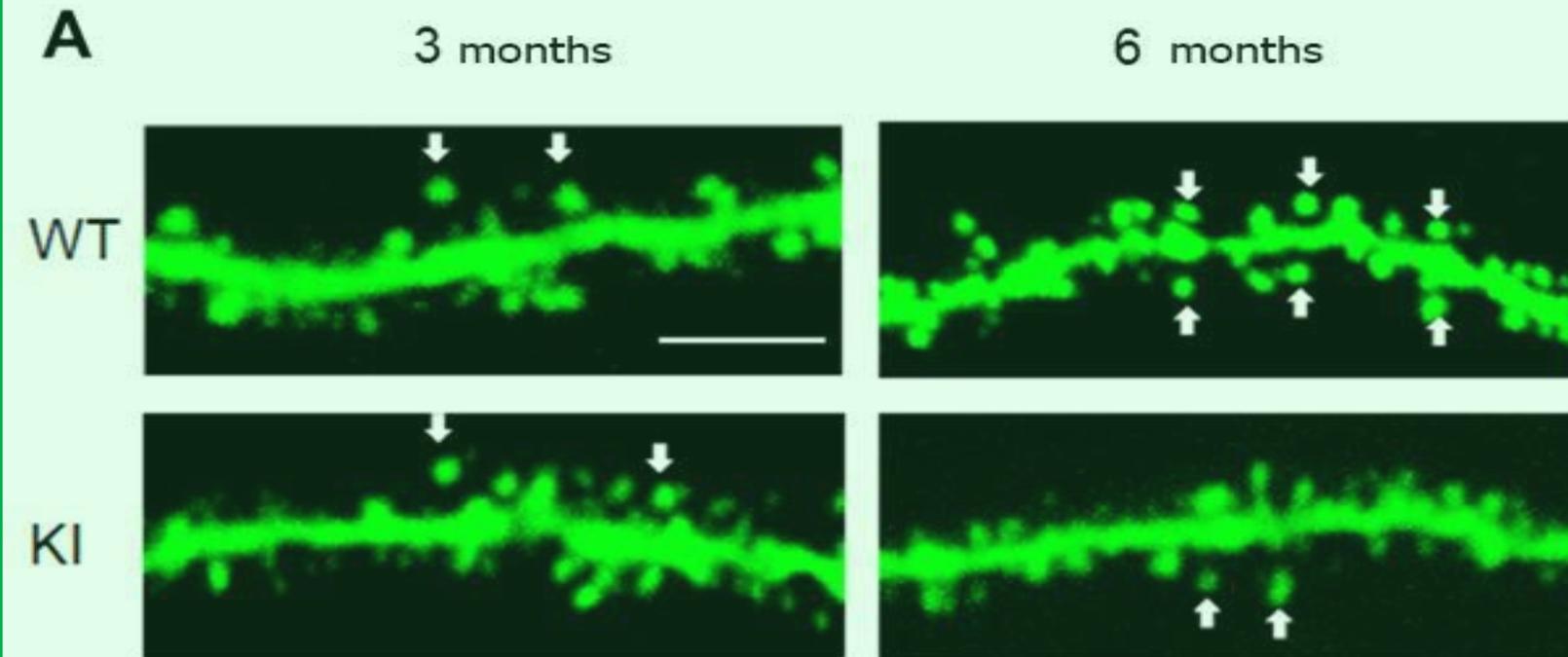
Области применения:

Dabsyl используется как гаситель (quencher) флуоресценции флуорофоров с λ_{em} от 450 до 550 нм. При λ_{em} флуорофора > 550 нм эффективность гашения снижается. Чаще всего Dabsyl вводится в состав олигонуклеотидных зондов, используемых для проведения количественной ПЦР в реальном времени.

Конфокальный микроскоп

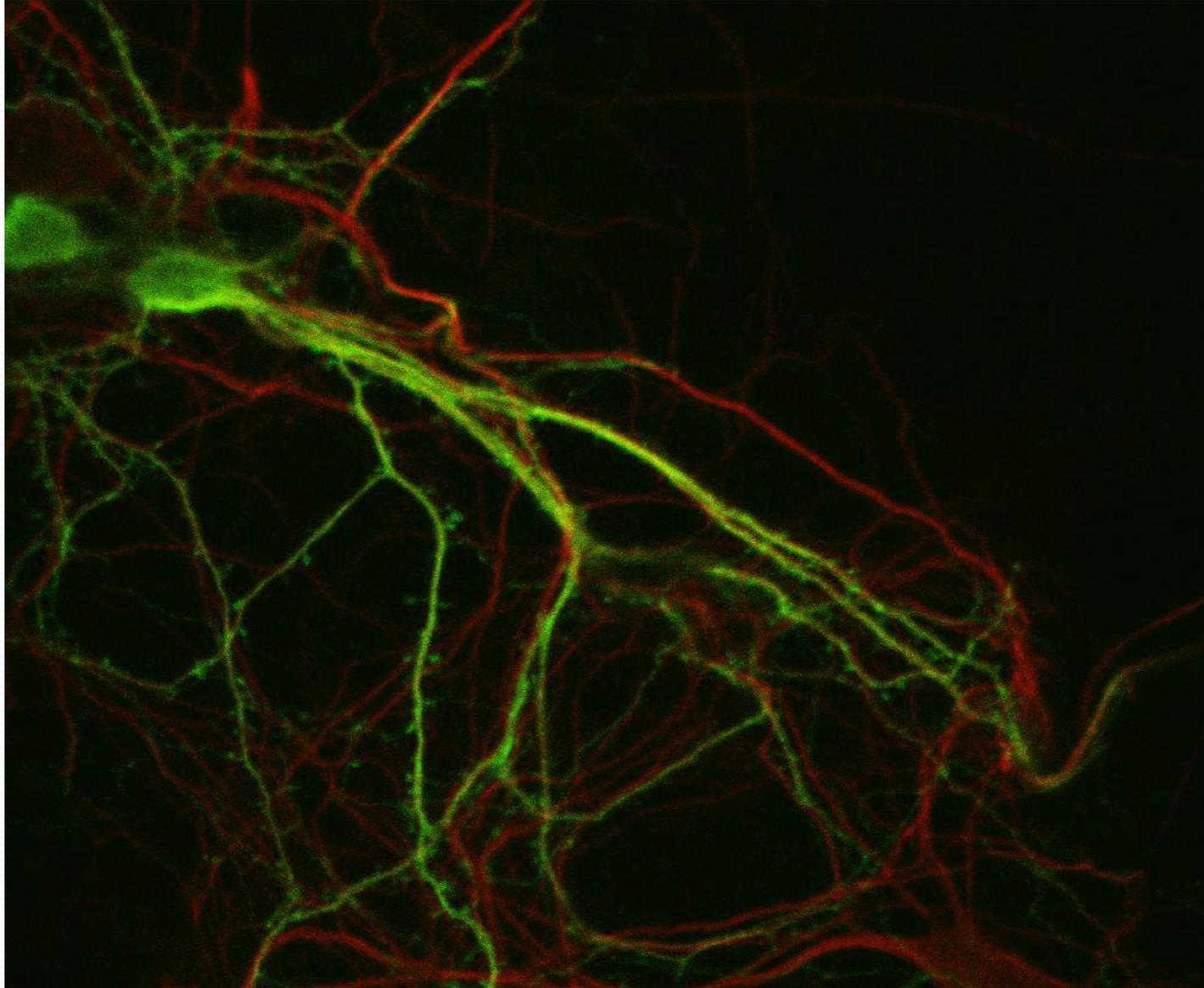


Mushroom spines are eliminated in 6 month's mice

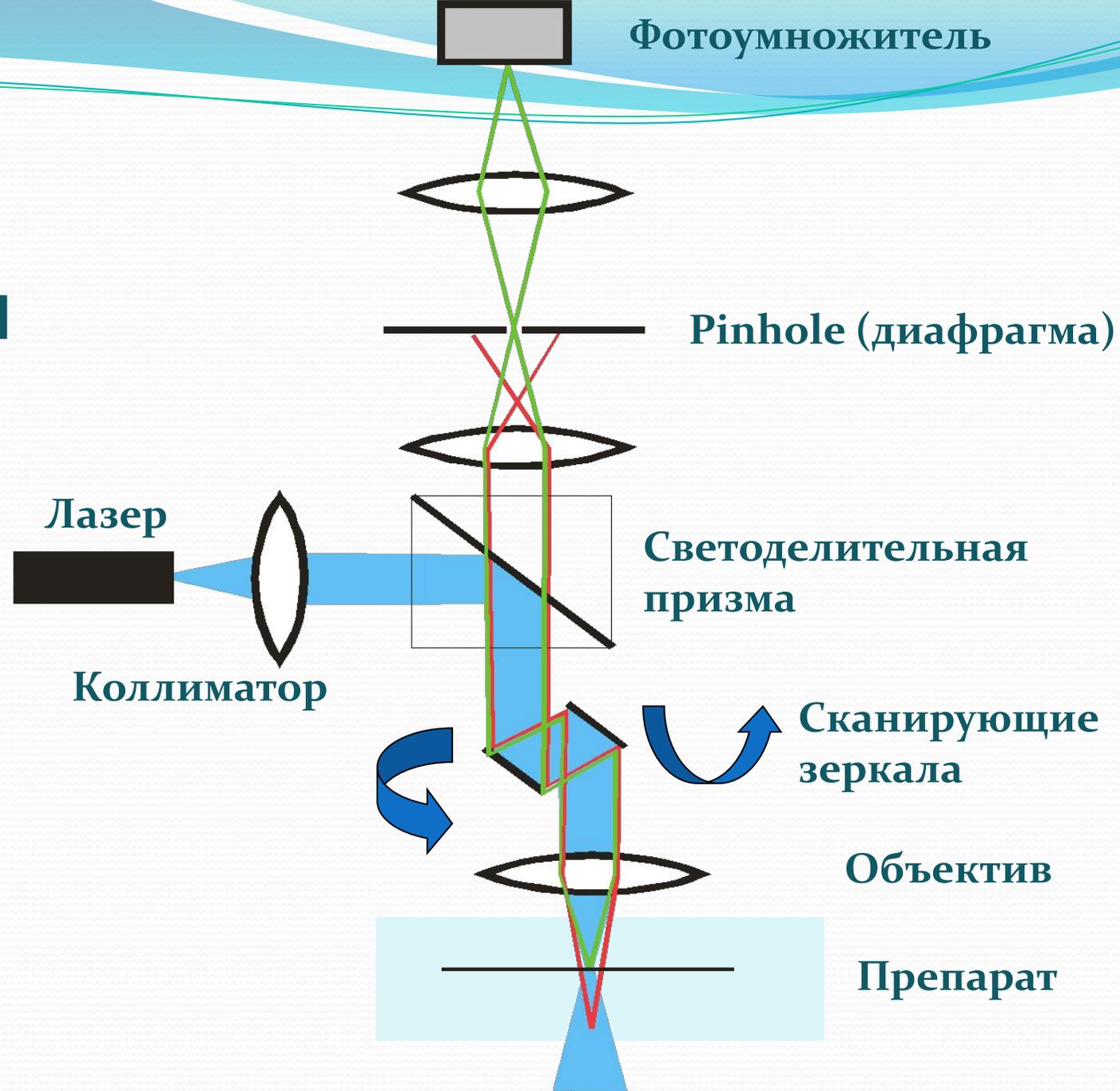


Brain slices (300 μ m), hippocampal neurons CA1. Lucifer Yellow staining

DARPP-32, MAP2 100x to visualize co-localization of cortex cells and MSNs

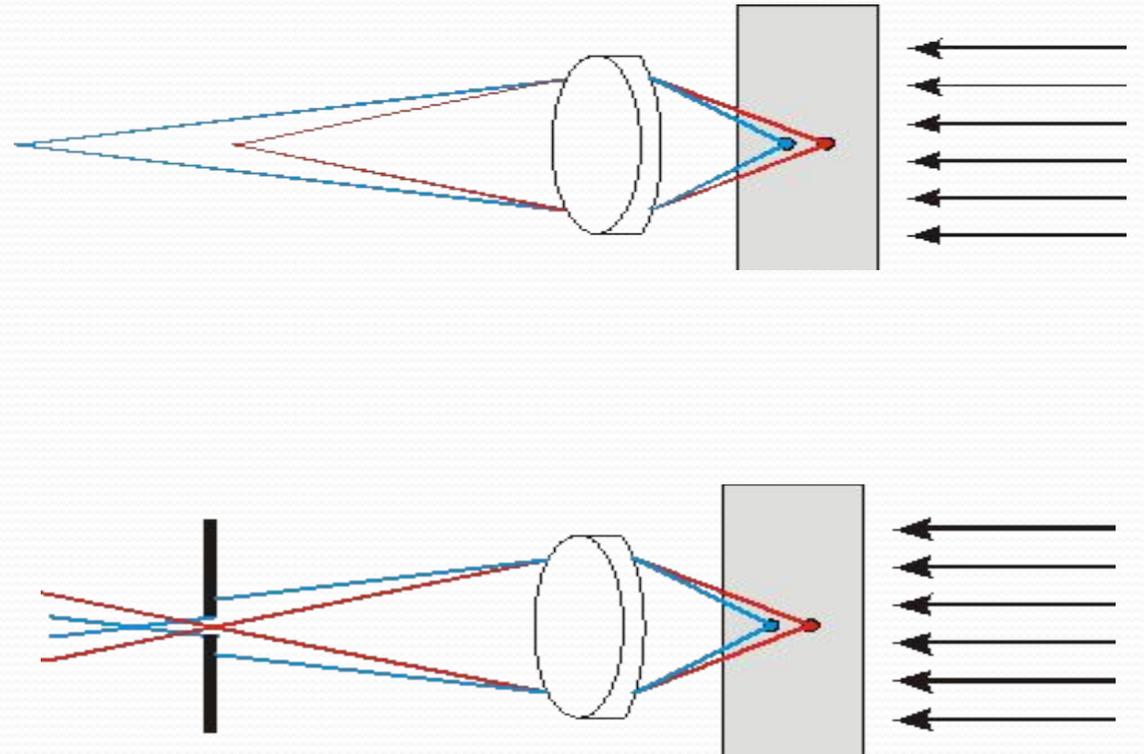


Принцип конфокальности

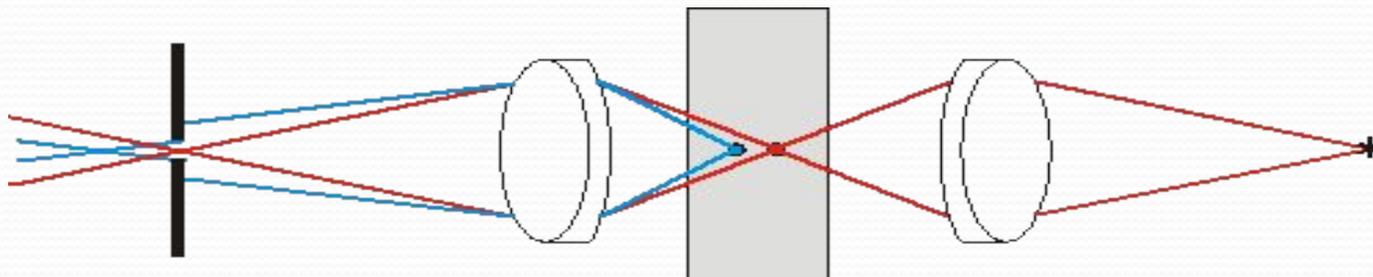


Что значит «конфокальный»?

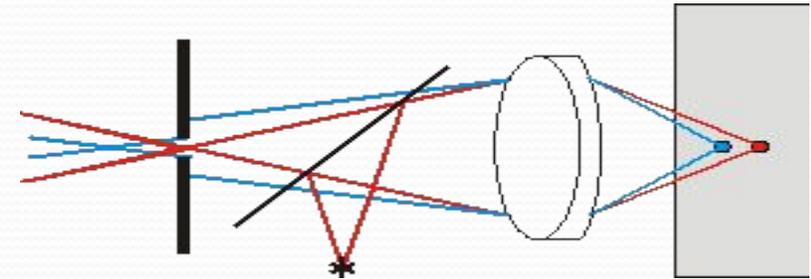
Конфокальный микроскоп отличается от "классического" оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования (движения образца или перестройки оптической системы). Для того, чтобы регистрировать свет только от одной точки после объективной линзы располагается диафрагма малого размера таким образом, что свет, испускаемый анализируемой точкой (красные лучи на **рис.**), проходит через диафрагму и будет зарегистрирован, а свет от остальных точек (например, синие лучи на **рис.**) в основном задерживается диафрагмой.



Вторая особенность состоит в том, что осветитель создает не равномерную освещенность поля зрения, а фокусирует свет в анализируемую точку. Это может достигаться расположением второй фокусирующей системы за образцом, но при этом требуется, чтобы образец был прозрачным. Кроме того, объективные линзы обычно сравнительно дорогие, поэтому использование второй фокусирующей системы для подсветки мало предпочтительно.



Альтернативой является использование светоделительной пластинки. Схема со светоделительной пластинкой упрощает конструкцию микроскопа за счет двойного использования объектива (для подсветки и сбора отраженного сигнала).

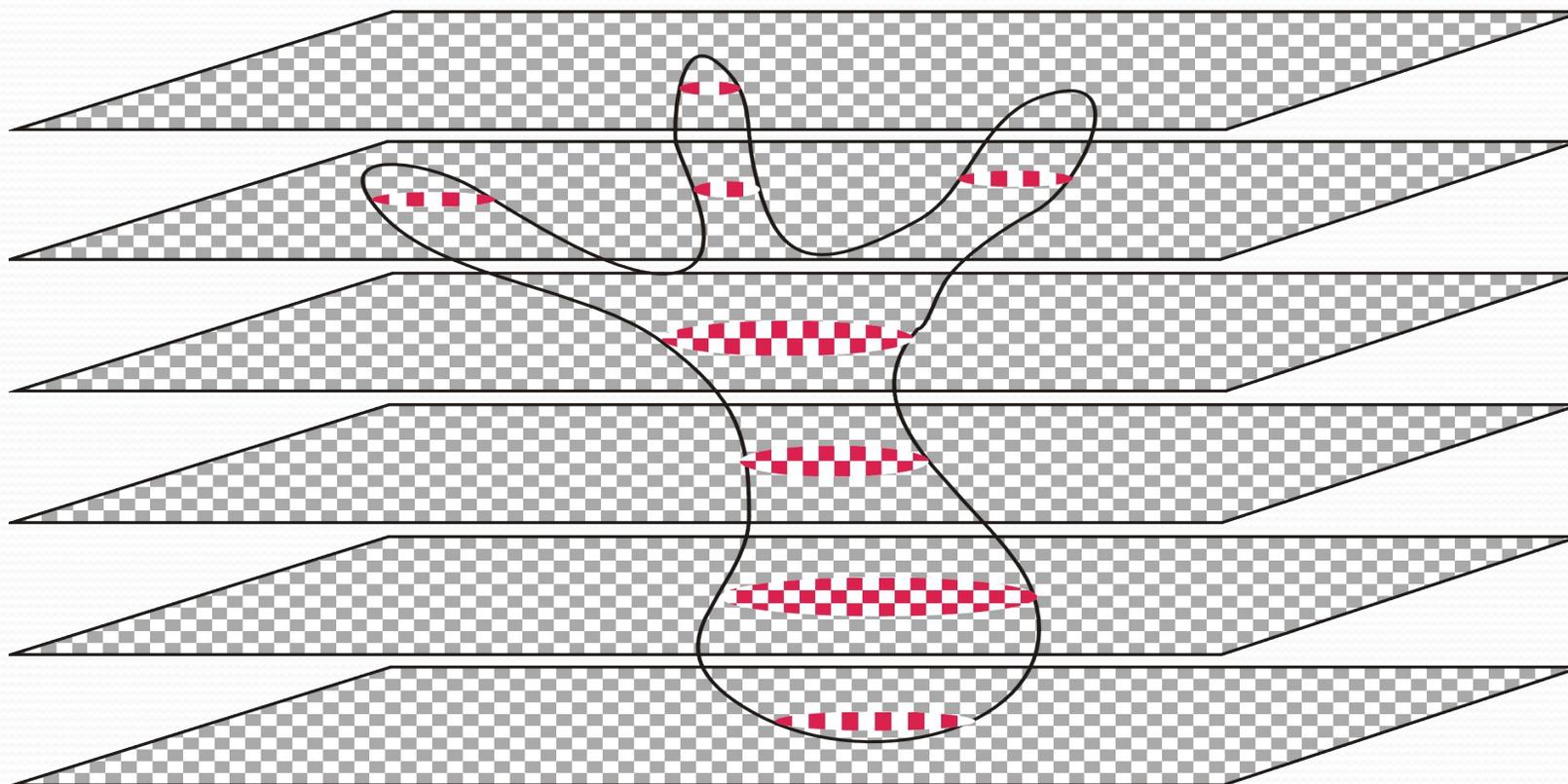


Конфокальная микроскопия обеспечивает увеличение контраста изображения за счет применения подсветки сфокусированной объективной линзой в область анализа и размещения диафрагмы в плоскости наблюдения перед фотодетектором. Такое увеличение контрастности приводит к возможности разрешения объектов, имеющих разницу в интенсивности до 200:1.

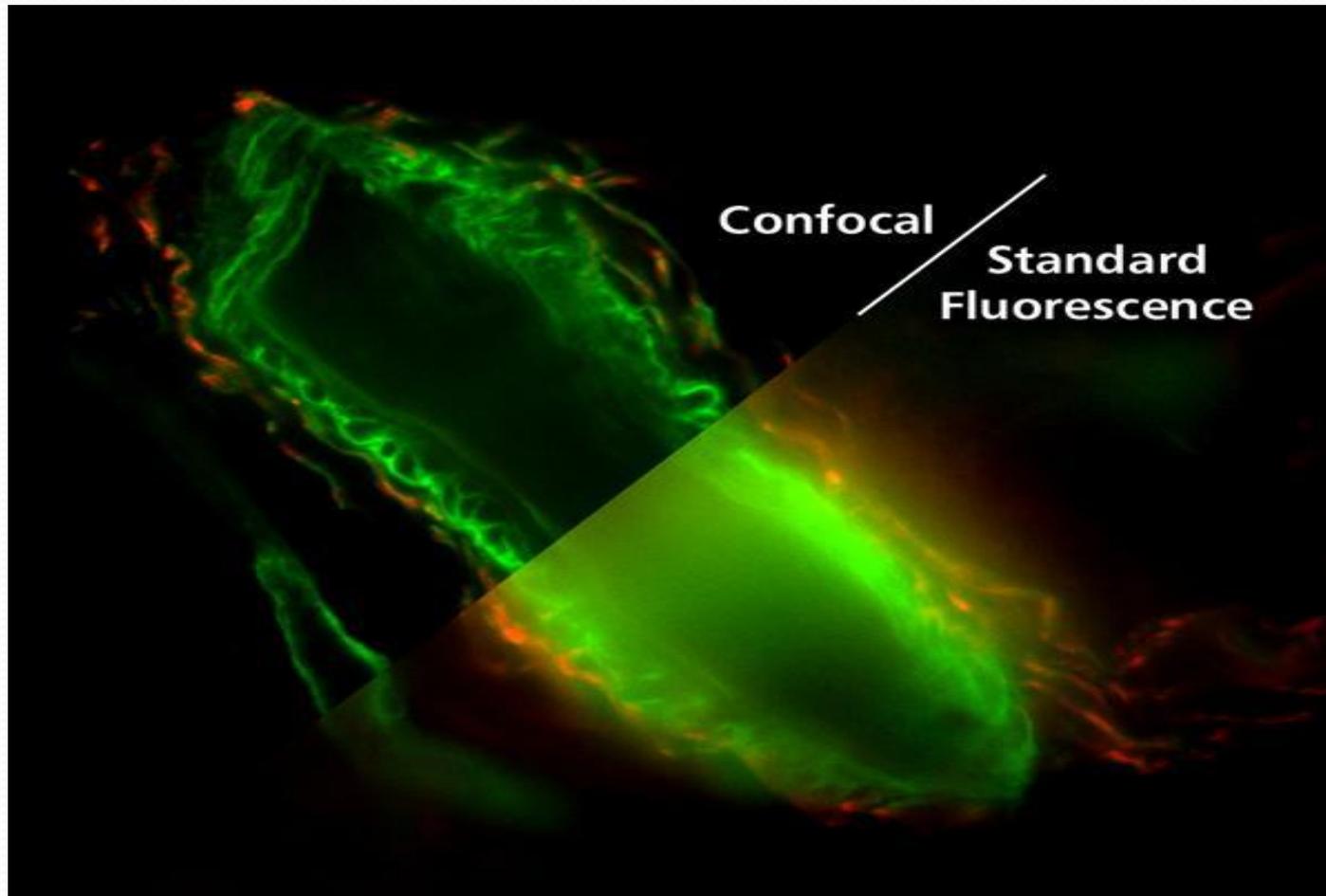
В конфокальной микроскопии несколько улучшается разрешение в плоскости объекта (в 1.5 раза) и достигается высокое разрешение вдоль оптической оси.

Платой за полученные улучшения является необходимость применения схем сканирования, либо путем перемещения образца, либо путем перестройки оптической системы. Применение сканирования позволяет увеличить поле зрения по сравнению с обычными оптическими микроскопами.

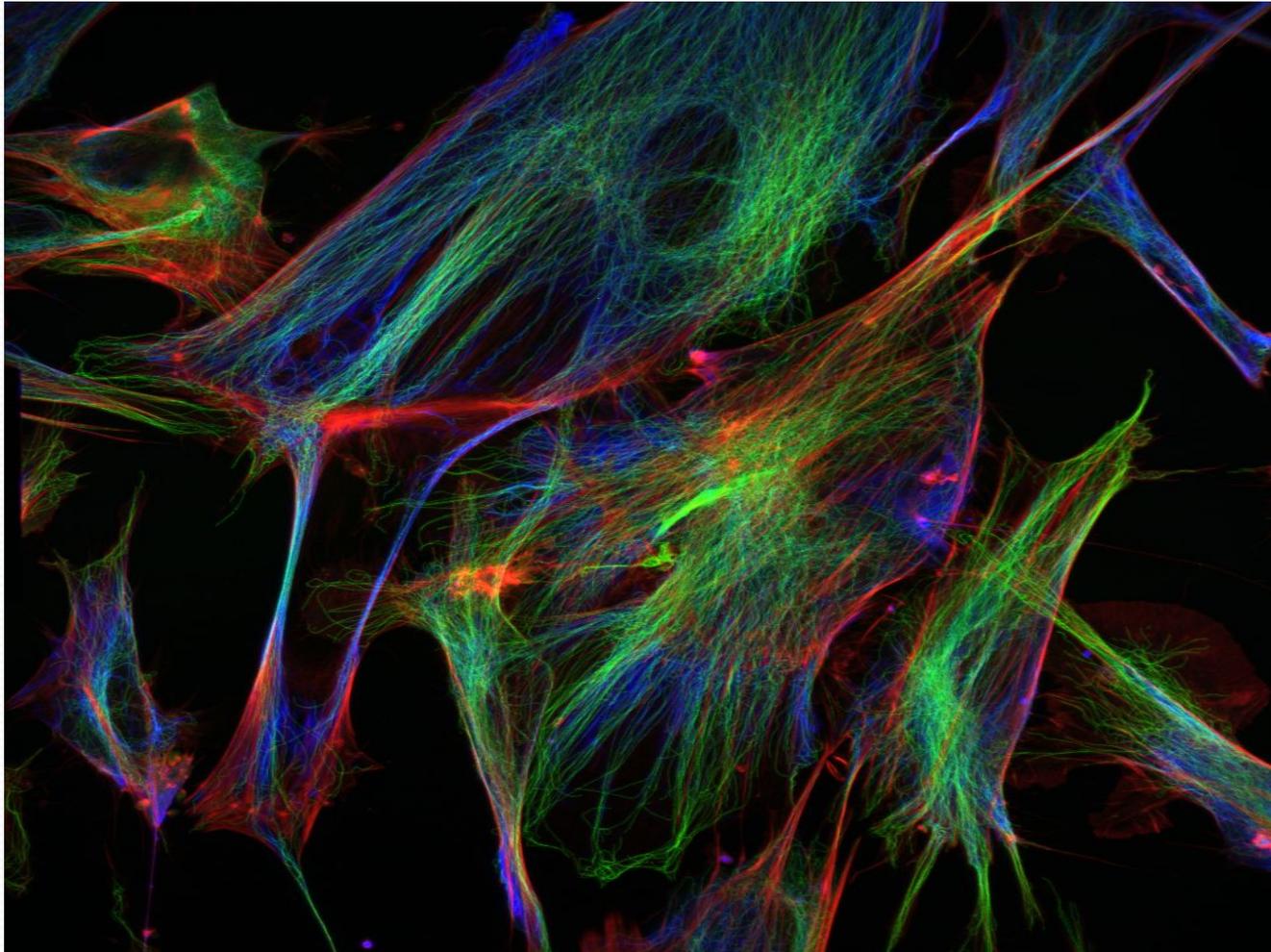
Сканирование проходит слоями



Таким образом получили две большие разницы



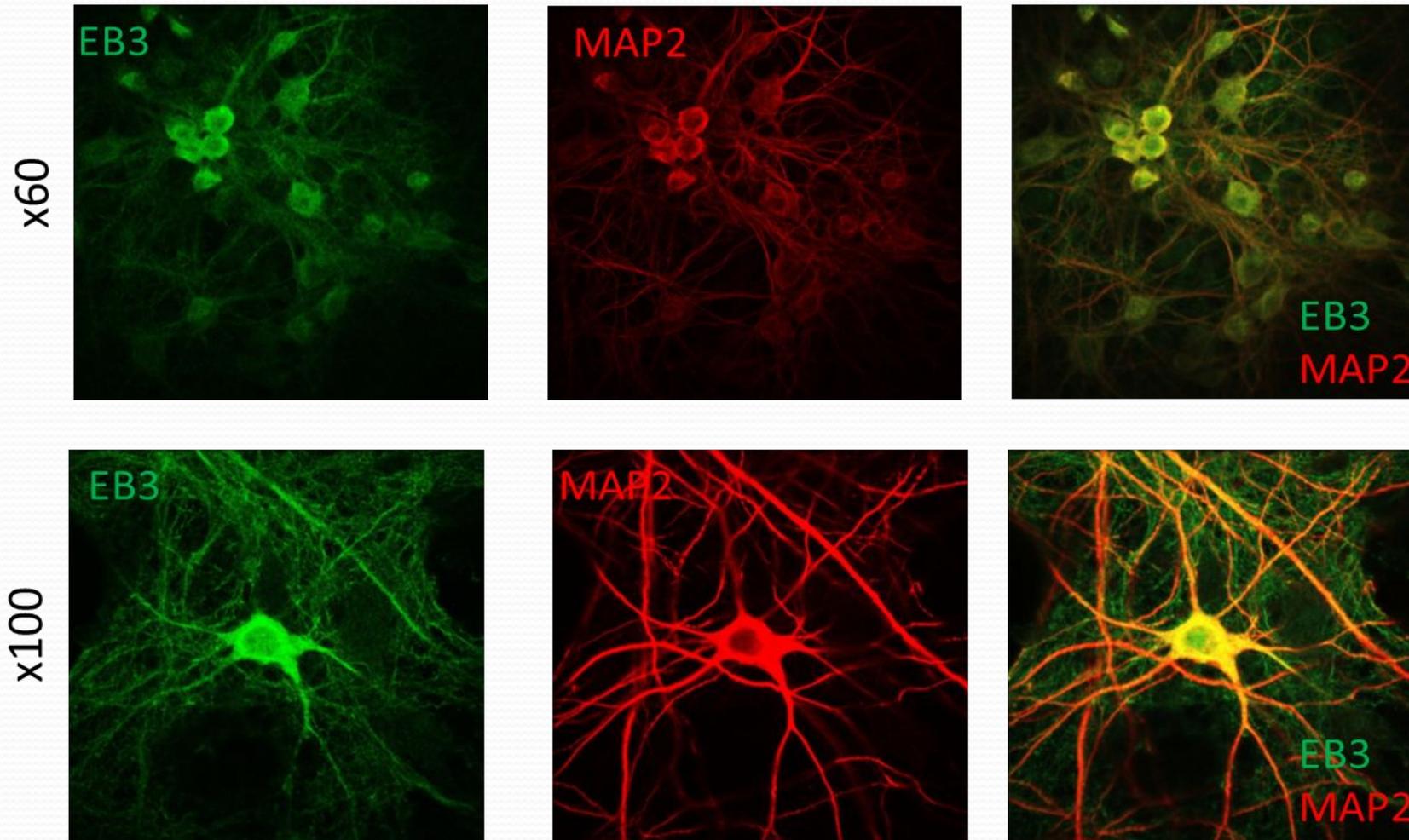
Изображения высокого качества



Фибробласты мышцы, тройное окрашивание

Белок цитоскелета	Возбуждение	Эмиссия
Microtubuli	492	494-556
F-Actin	560	566-632
Vimentin	646	659-800

Wild type mouse hippo culture 16 DIV was stained with anti-EB3 (green) and anti-MAP2 (red) antibodies, confocal microscopy, x60, x100



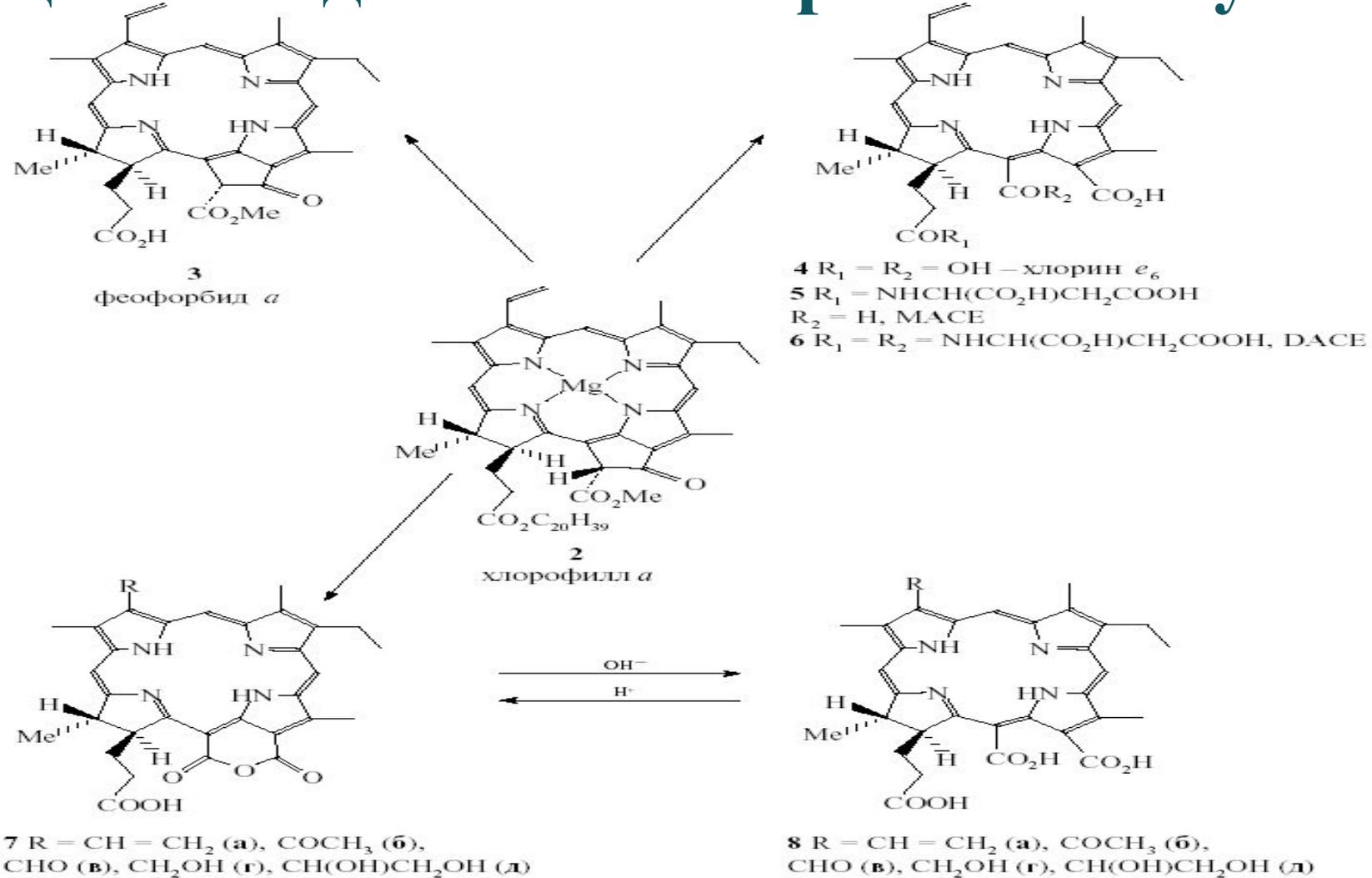
Диагностика in vivo – новая и перспективная область лазерной медицины. Ее практическая реализация еще только начинается, и большинство исследований находятся в стадии экспериментальной разработки и испытаний. Рассмотрим некоторые примеры диагностики in vivo.

1. Луч CdNe лазера (УФ, $\lambda = 327$ нм) пропускается через кварцевый световод по сосудистому катетеру и нацеливается на исследуемую ткань, например, сердечной мышцы. Флюоресцентное свечение ткани, происходящее в результате воздействия лазерного излучения, улавливается через тот же световод. По интенсивности флюоресцентного свечения можно судить о концентрации в ткани различных компонентов, определяющих ее жизнедеятельность.

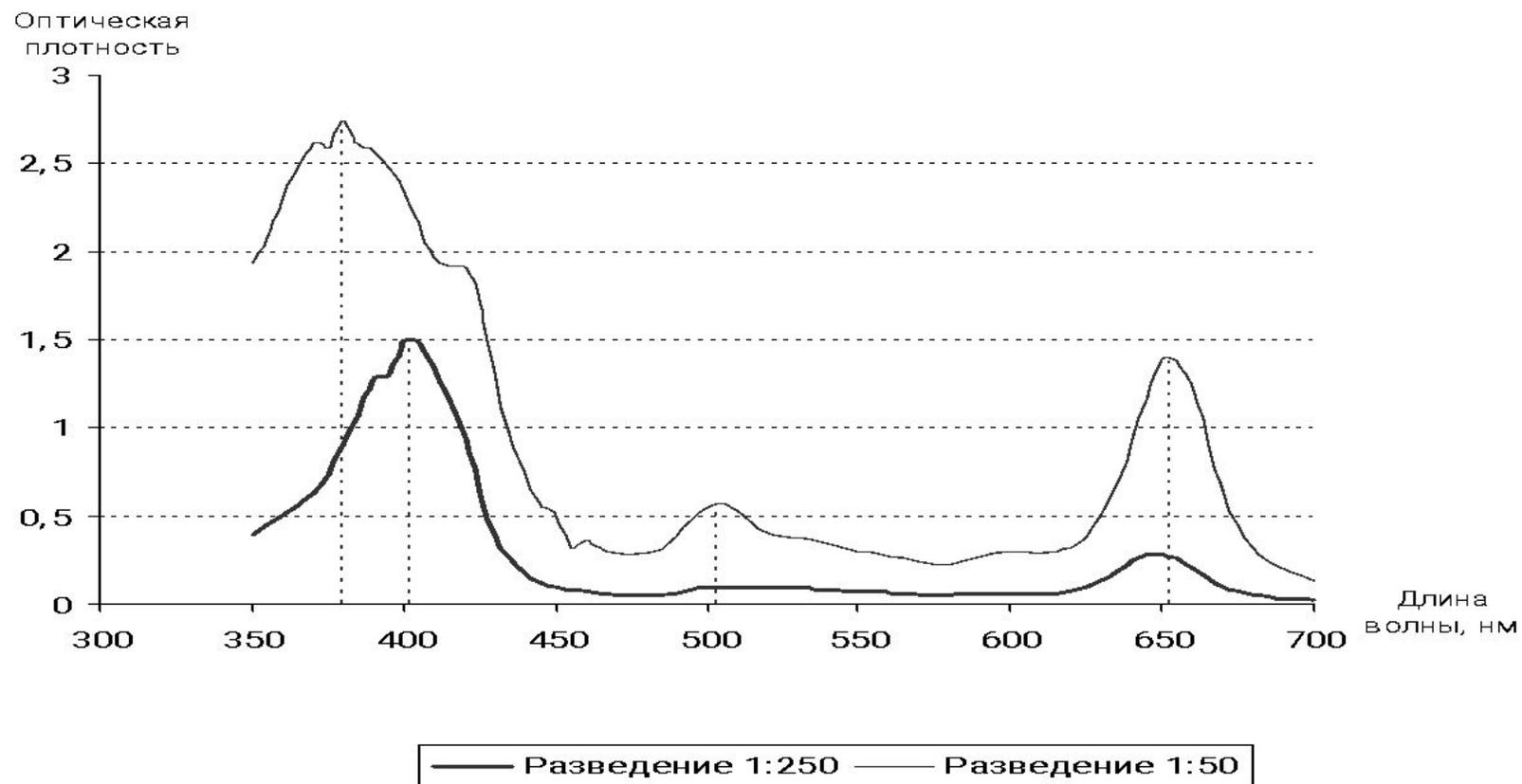
2. Луч эксимерного ХеС1 лазера, $\lambda=308$ нм используется для удаления атеросклеротических бляшек в кровеносных сосудах. Диагностика заключается в том, что одновременно с обработкой производится анализ флюоресцентного излучения от бляшки, разрушающейся под действием излучения. Такой анализ позволяет выявить наличие отложений кальция, магния, а также липидов. Это дает возможность контролировать ход операции и судить об эффективности удаления этих компонентов из пораженного сосуда.

3. Лазерная диагностика может использоваться в других областях, в частности, в стоматологии для дифференциации кариогенного дентина зуба от нормального, лазерной диагностике глазного дна (исследование сосудистой системы), флюоресцентной ангиографии, голографической диагностике.

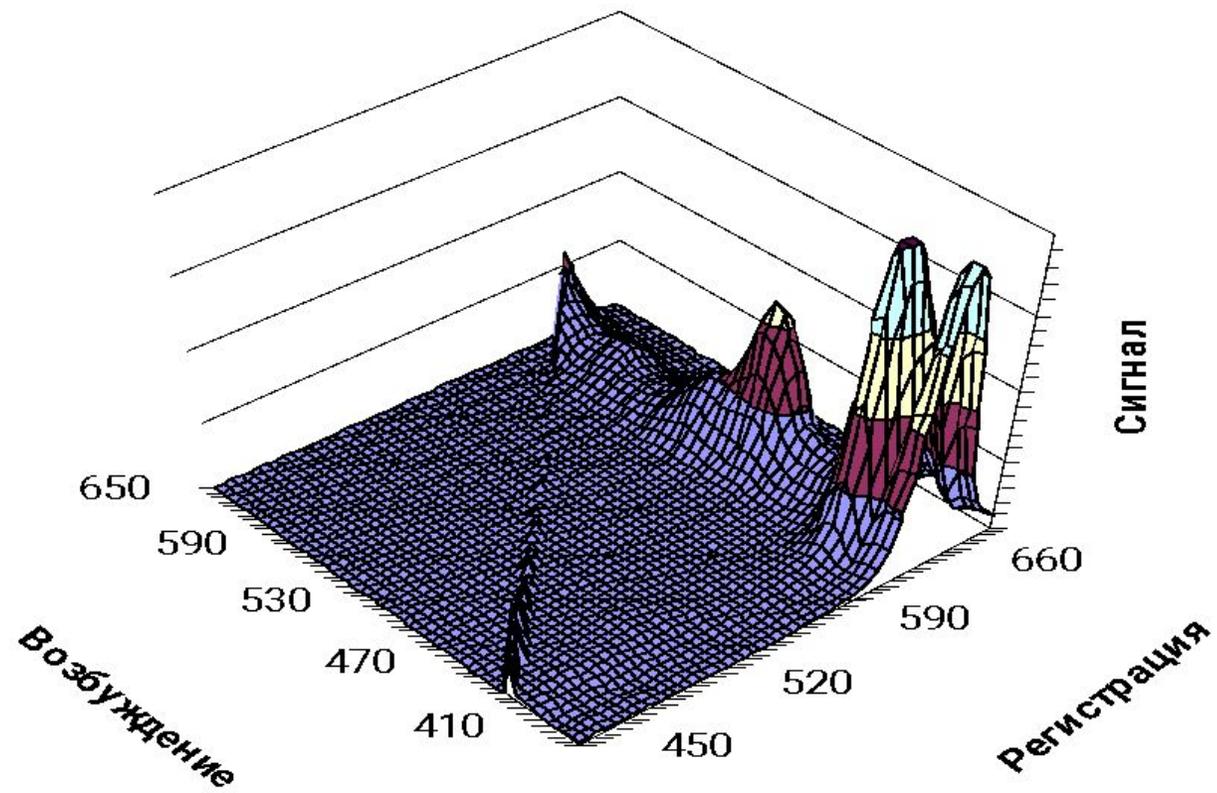
Флуоресцентная диагностика раковых опухолей



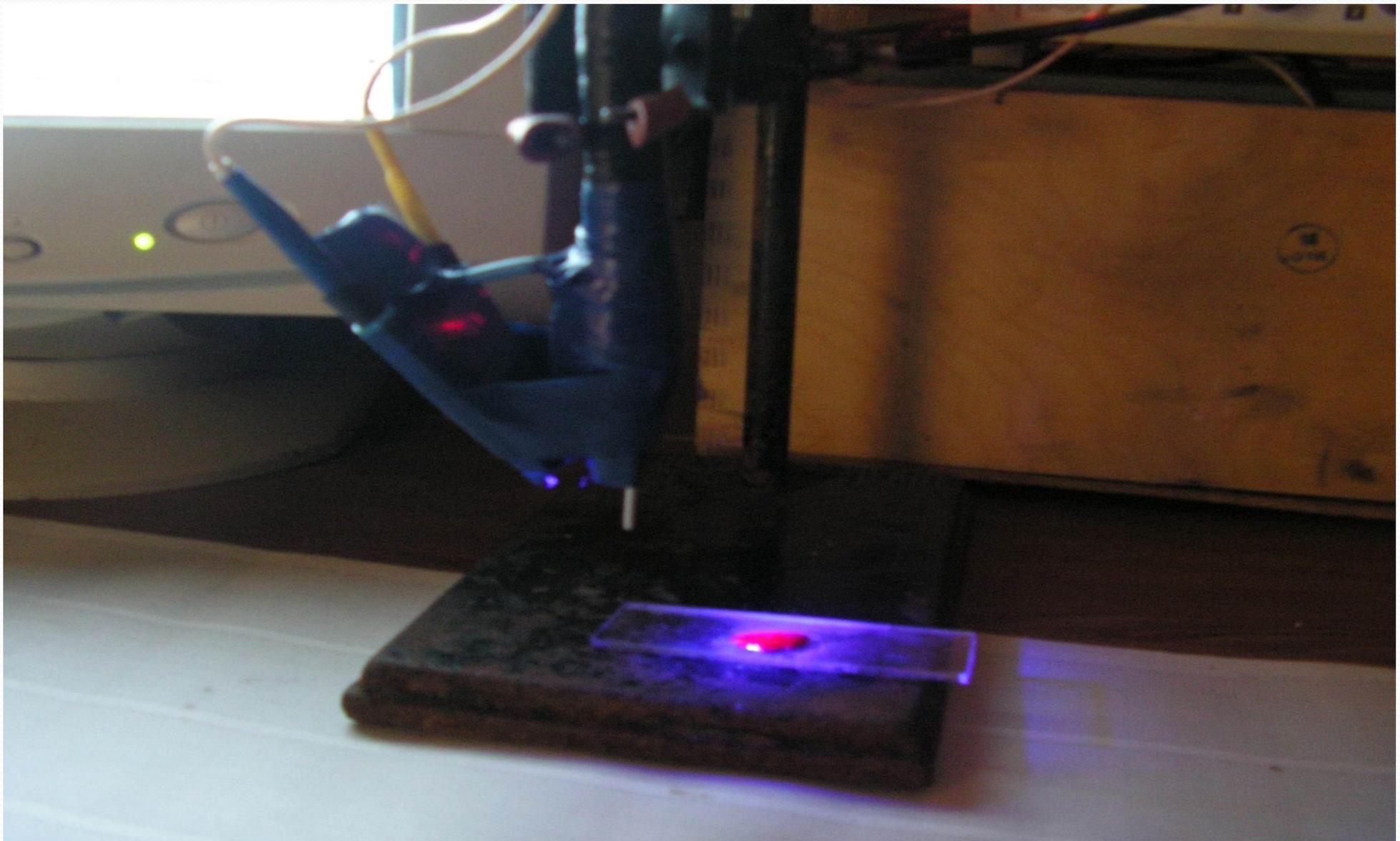
Сенсибилизаторы второго поколения на основе хлорофилла *a*



Спектры поглощения исходного препарата «Радахлорин», разбавленного физиологическим раствором до концентрации 0,0014% и 0,007%



Двумерный спектр люминесценции препарата
«Радахлорин» с концентрацией 0,0014%



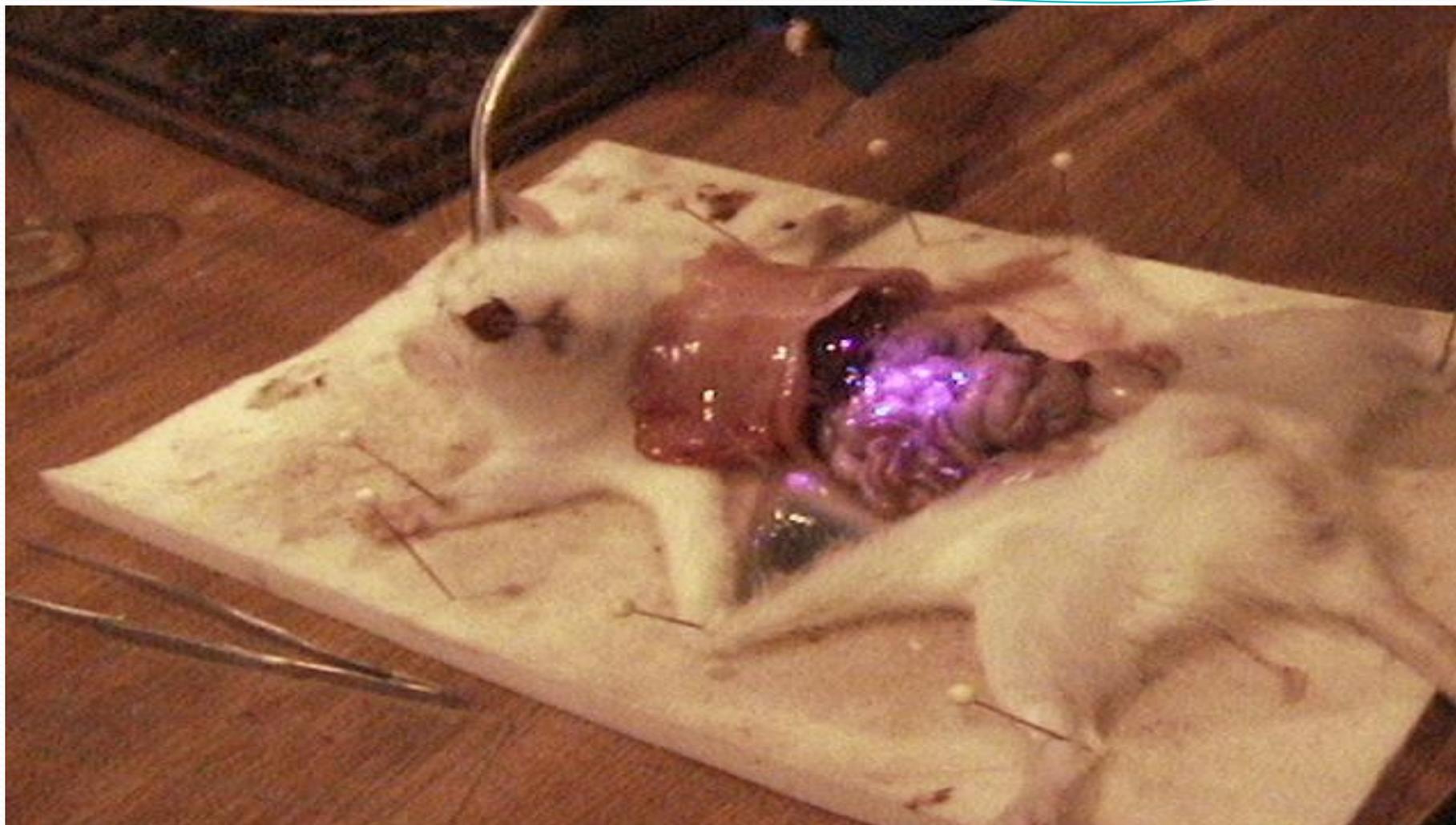
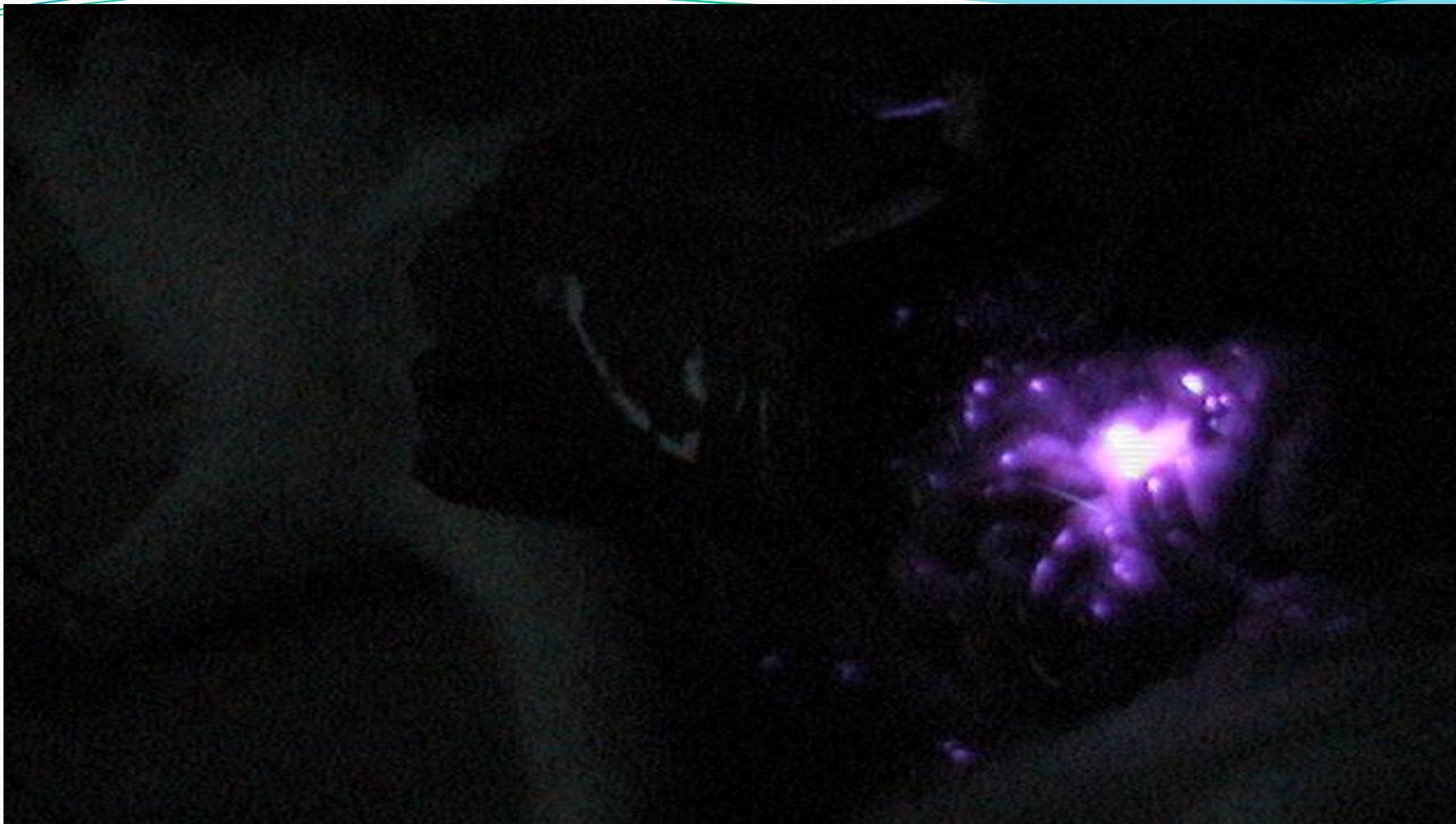


Рис.5 Наглядное представление о проведении сеанса



Сеанс проведения люминесцентного анализа (в темноте).

Оптическая когерентная томография(ОКТ)-

- 1)это метод медицинского имиджинга, позволяющий получать изображения приповерхностных тканей организма человека *in vivo* с высоким пространственным разрешением
- 2)это метод получения и обработки оптического сигнала для получения трехмерных изображений внутренней структуры образца за счет рассеяния света в объеме материала.

Биологические ткани являются прекрасным объектом для оптической томографии в диапазоне длин волн так называемого терапевтического окна прозрачности (0,75—1,3 мкм), где они сильно рассеивают и относительно слабо поглощают излучение.

При этом удастся получать изображения живых тканей на глубину 1,5—2 мм.

Разрешающая способность ОКТ сравнима с нижней границей размеров клеточных элементов тканей

После создания в начале 90х фемтосекундных лазеров появляются методы с разрешением порядка размеров отдельных клеток.

Что изучает ОКТ?

- кожа
- слизистые оболочки
- шейки матки
- пищевода
- мочевого пузыря
- желудка
- тонкого и толстого кишечника

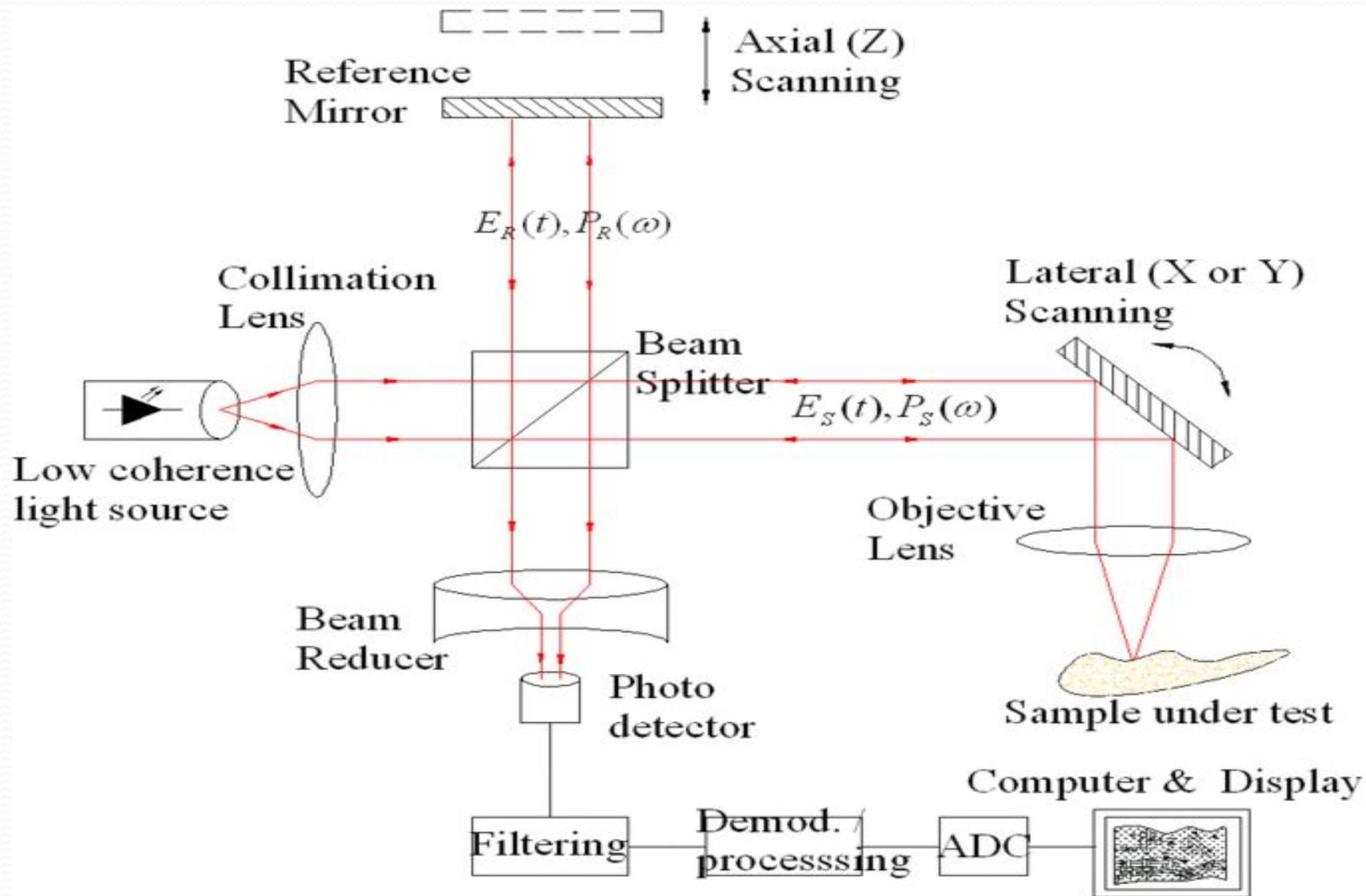
Все эти ткани имеют общие признаки гистологического строения:

- поверхностный плоский, переходный или цилиндрический эпителий,
- базальную мембрану,
- подлежащую соединительную ткань.
- Физический принцип действия ОКТ аналогичен ультразвуковому исследованию с той лишь разницей, что в ОКТ для зондирования биоткани **используется оптическое излучение ближнего инфракрасного диапазона (~1 мкм)**, а не акустические волны. Поэтому терминологически данный метод следует отнести не к томографии, а к эхозондированию, так как при построении ОКТ-изображения не решается томографическая обратная задача.

Основными преимуществами ОКТ являются:

- изображение в реальном времени
- почти микроскопическое разрешение
- мгновенная, направленная визуализация
- не требует подготовки образца или объекта
- нет ионизирующего излучения

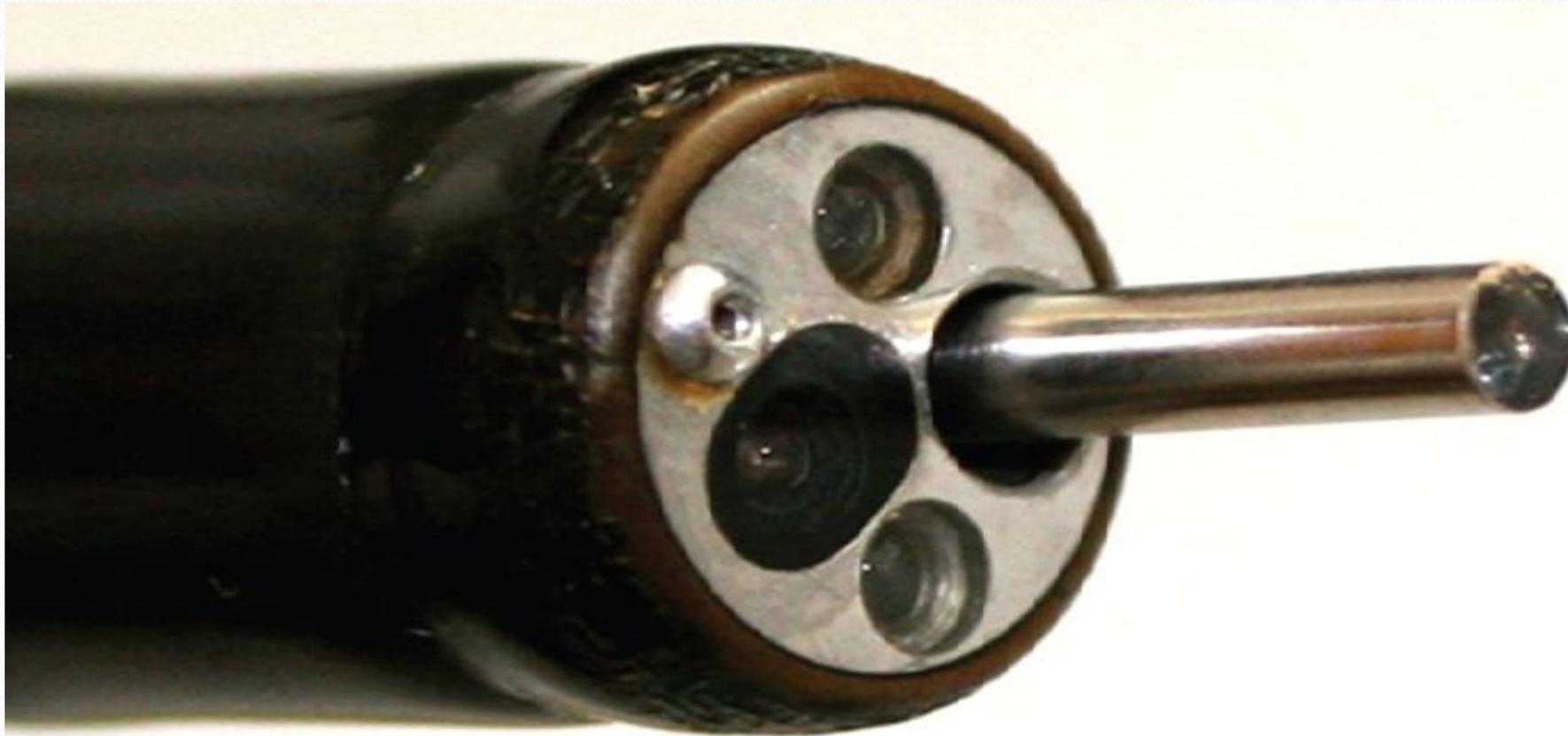
Физический принцип



Использование метода ОКТ в видеоэндоскопии.



Эндоскопический торцевой ОКТ-микрзонд в биопсийном канале фиброгастроскопа.

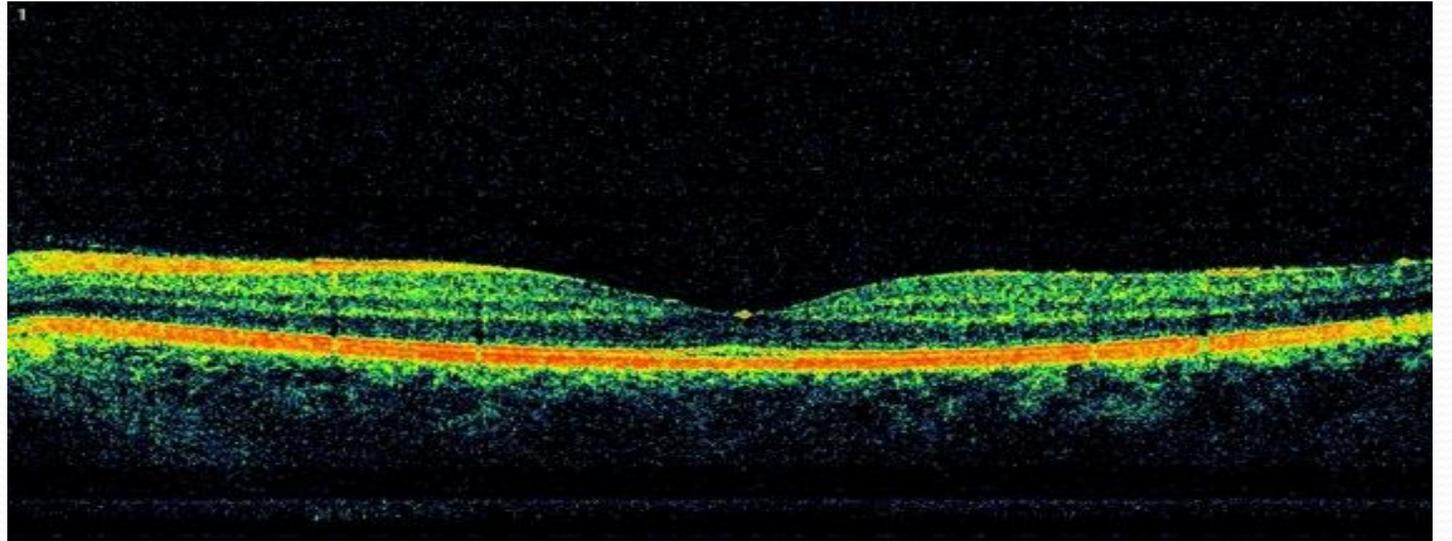


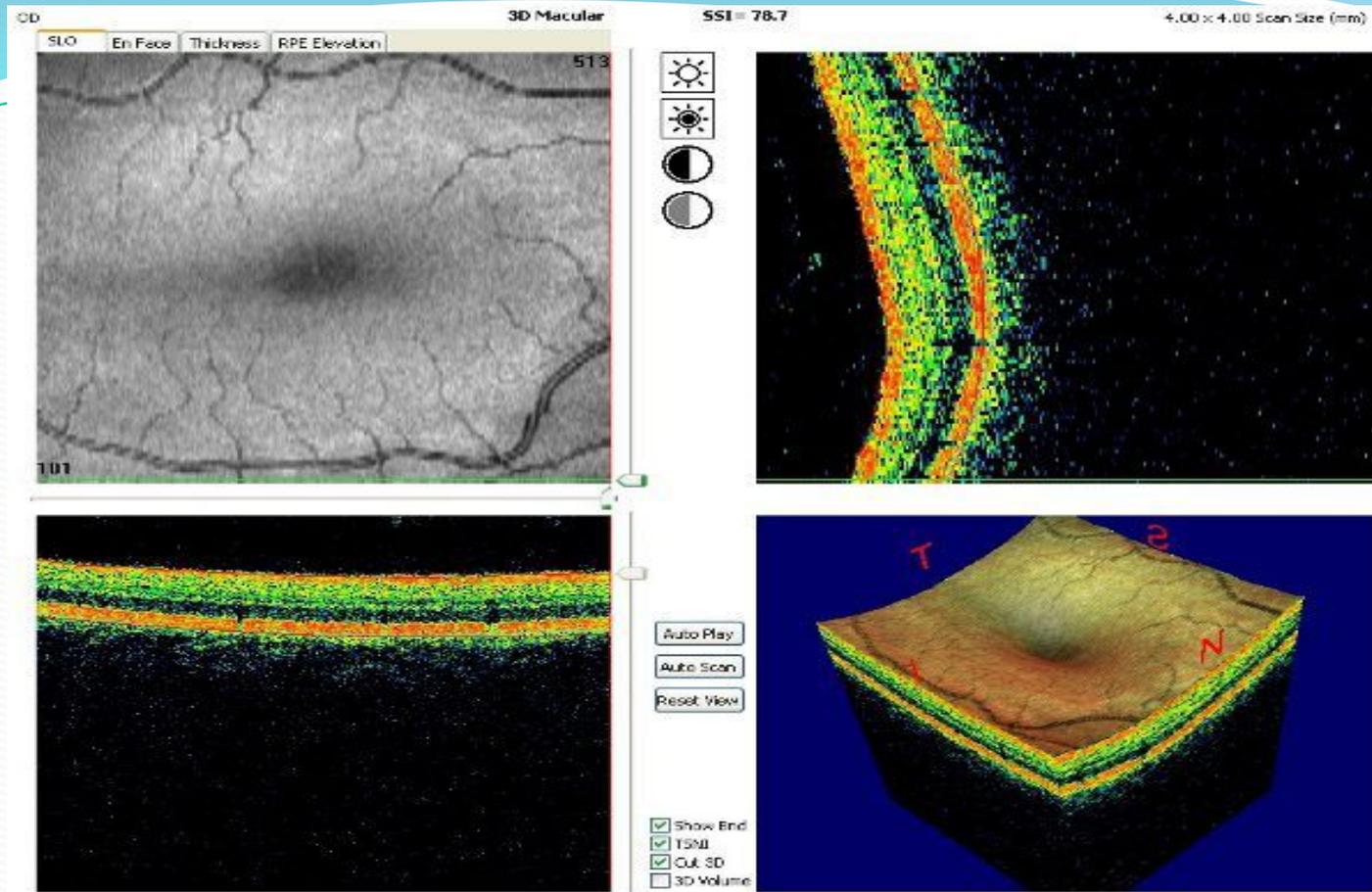
Показания к применению ОКТ

- детекция патологических изменений, включая раннее обнаружение неоплазии
- оптимизация прицельной биопсии;
- дифференциальная диагностика сходных по внешним проявлениям заболеваний различной природы;
- уточнение локализации и распространенности патологических изменений, включая интраоперационное планирование в реальном времени и контроль органосохраняющих и реконструктивных операций;
- оценка динамики патологических изменений, включая контроль проводимого лечения на всех этапах.

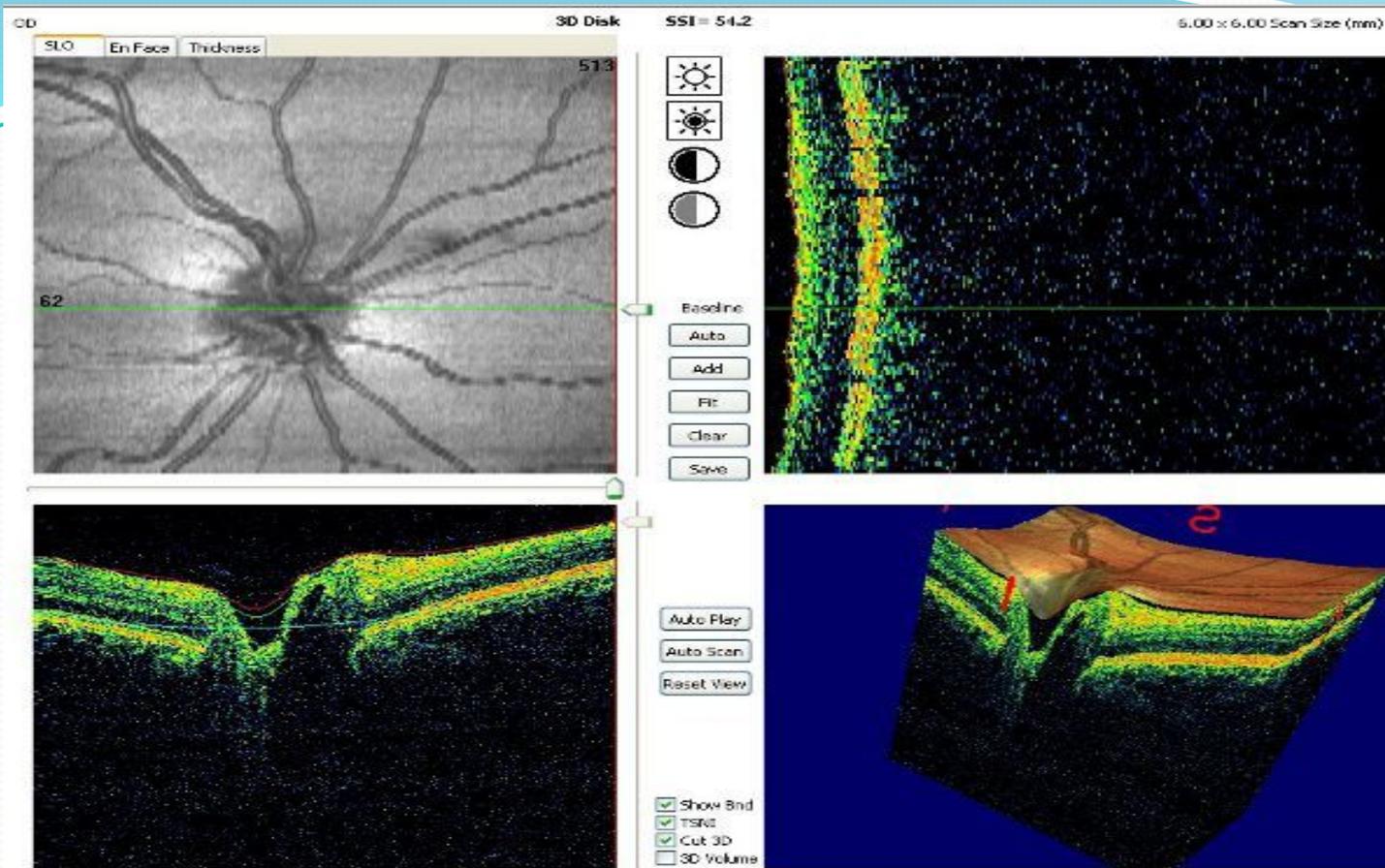
Офтальмология

Скан макулярной области сетчатки в норме. Прибор представляет черно-белое изображение прозрачной сетчатки. Для удобства восприятия изображение приведено в псевдоцветной шкале, где структуры с большей оптической плотностью окрашены в красный цвет. Скан получен с помощью оптического когерентного томографа RTVue-100 фирмы Optovue (США).



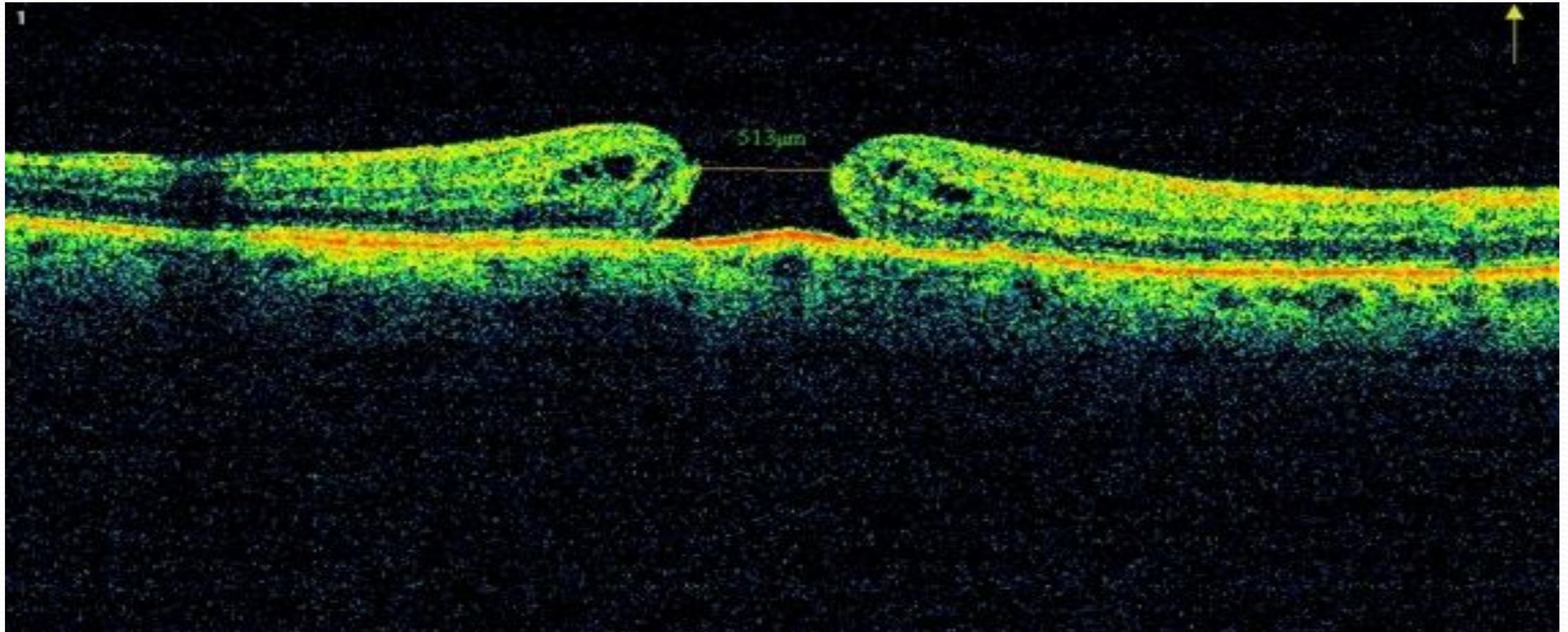


Трехмерная реконструкция макулярной области сетчатки глаза того же пациента (3 x 3 мм), полученная в результате обработки более тысячи единичных линейных сканов.

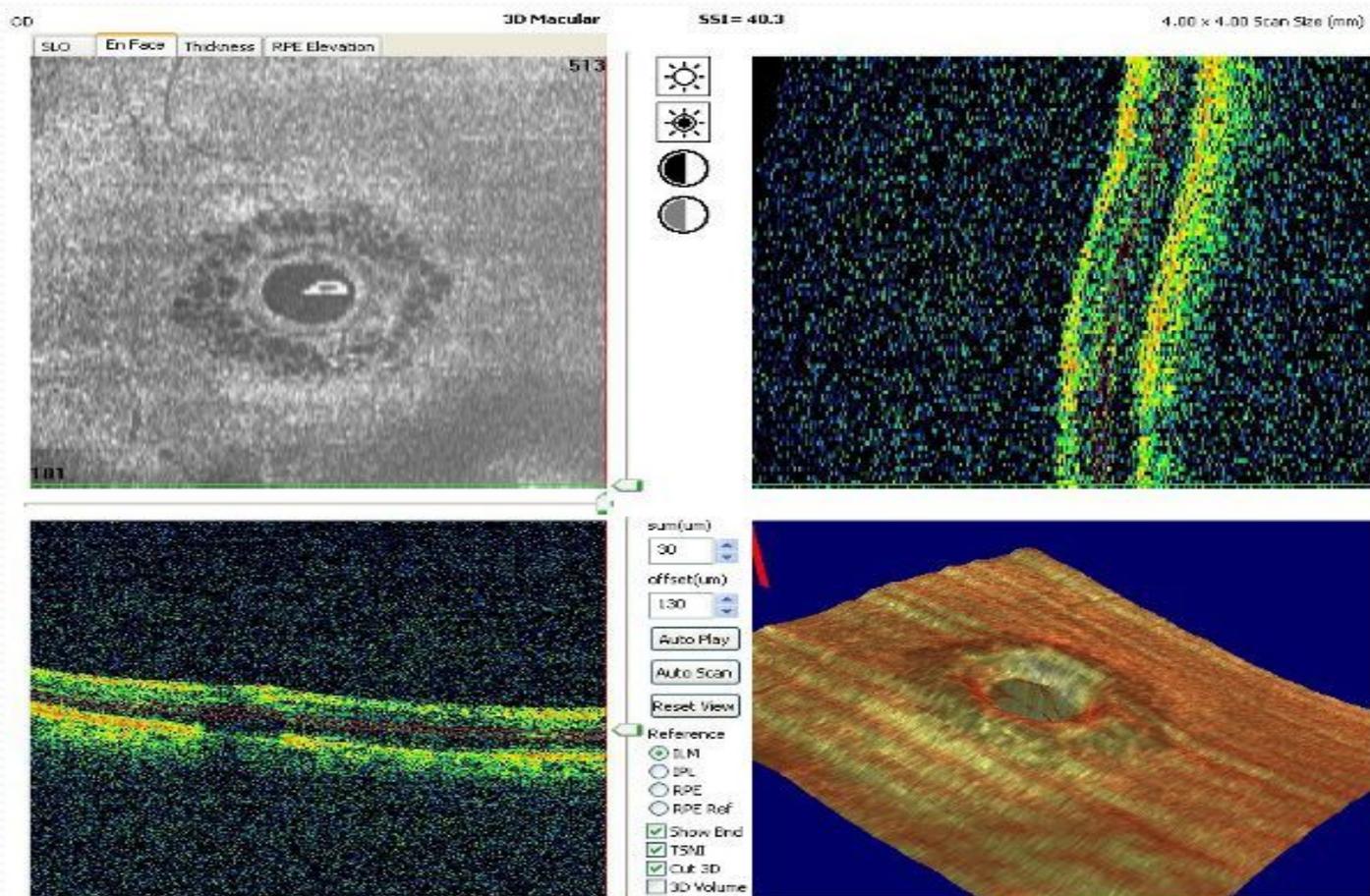


Трёхмерная реконструкция области диска зрительного нерва (оптический срез проходит через зрительный нерв).

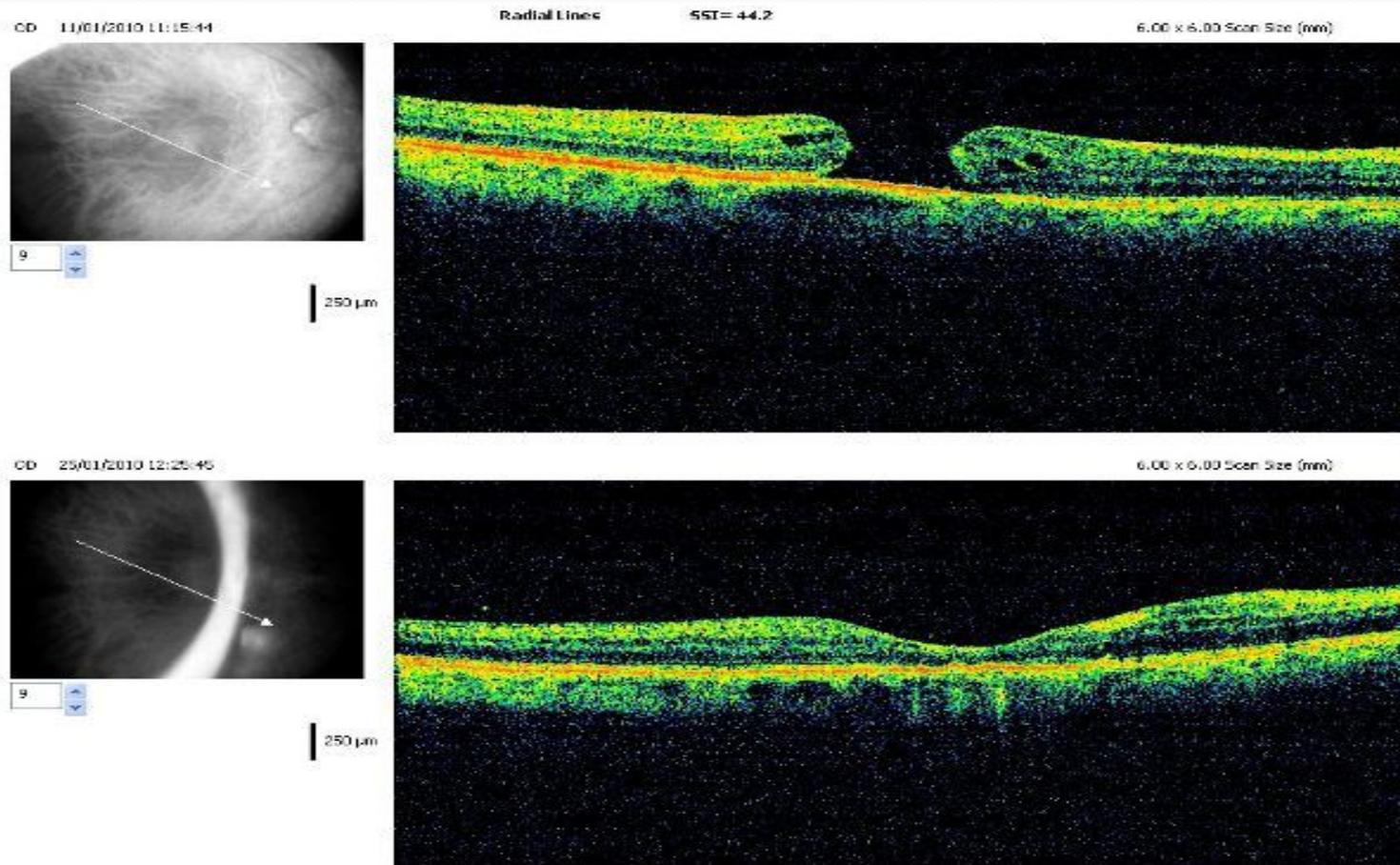
Сквозное сенильное (возрастное) макулярное отверстие. Диаметр отверстия у вершины 513 мкм.



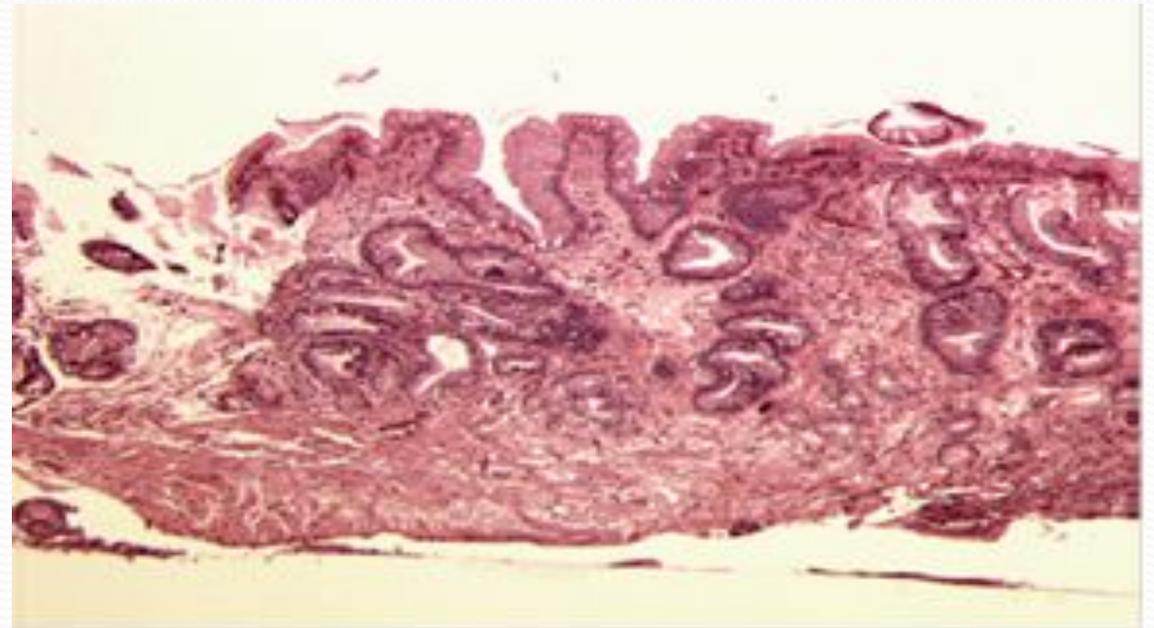
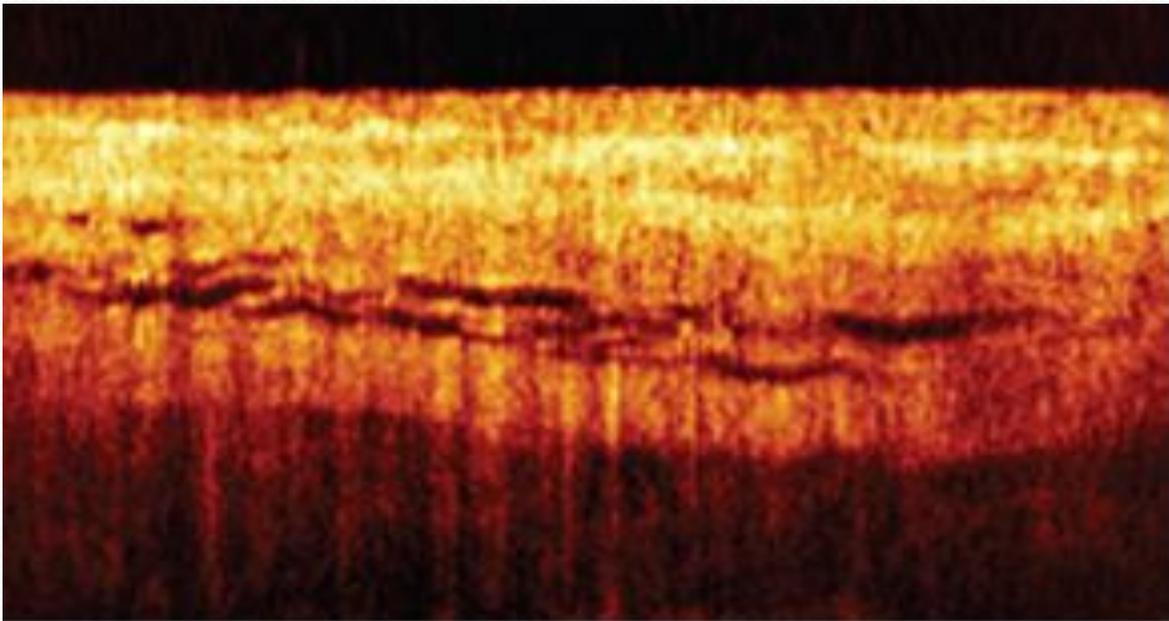
Трёхмерная реконструкция макулярной области сетчатки того же пациента. Хорошо визуализируются изменения в слоях сетчатки вокруг отверстия.



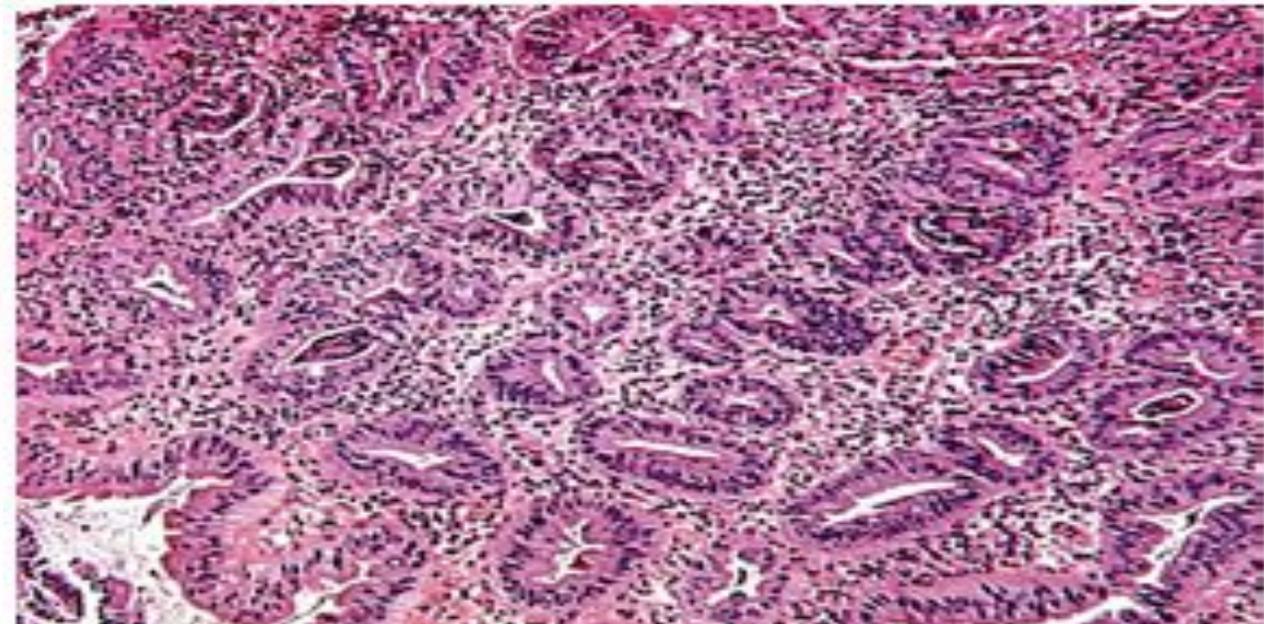
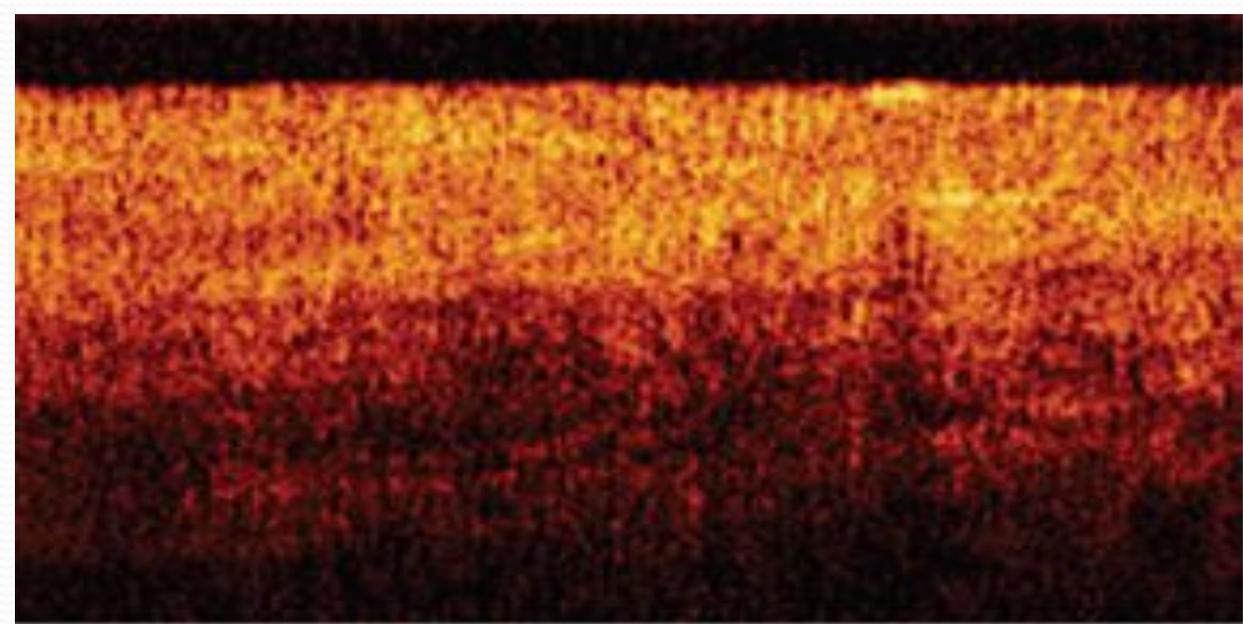
ОКТ того же пациента до и после хирургического лечения (витрэктомия).
Отверстие закрылось. Анатомия макулярной области восстановлена. Отек и
изменения вокруг отверстия претерпели обратное развитие.



Пищевод : доброкачественное ОКТ-изображение и соответствующий гистологический препарат



Высокая степень дисплазии метапластического эпителия —
ОКТ-изображение и соответствующий гистологический
препарат



Оптогенетика

Метод, объединяющий в себе оптику и генетику

Позволяет детектировать приобретение или потерю функций специфических клеток, живых тканей.

Позволяет оптически контролировать определенный тип нейронов, которые могут экспрессировать под специфическим промотором ионные каналы (рецепторы), активируемые светом.

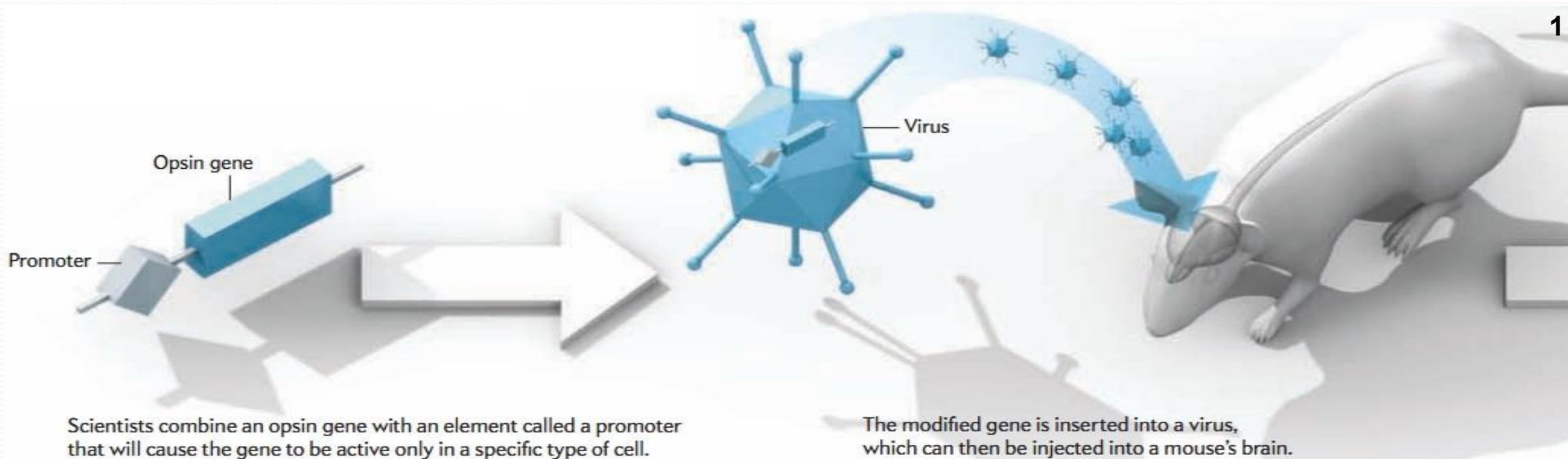
Быстрое возбуждение: Channelrhodopsin2

Быстрое ингибирование: Halorhodopsin

Бистабильные модуляции: step opsins

Контроль внутриклеточного сигналинга: OptoXRs

Шаг 1: Вставить гены опсинов в желаемые клетки



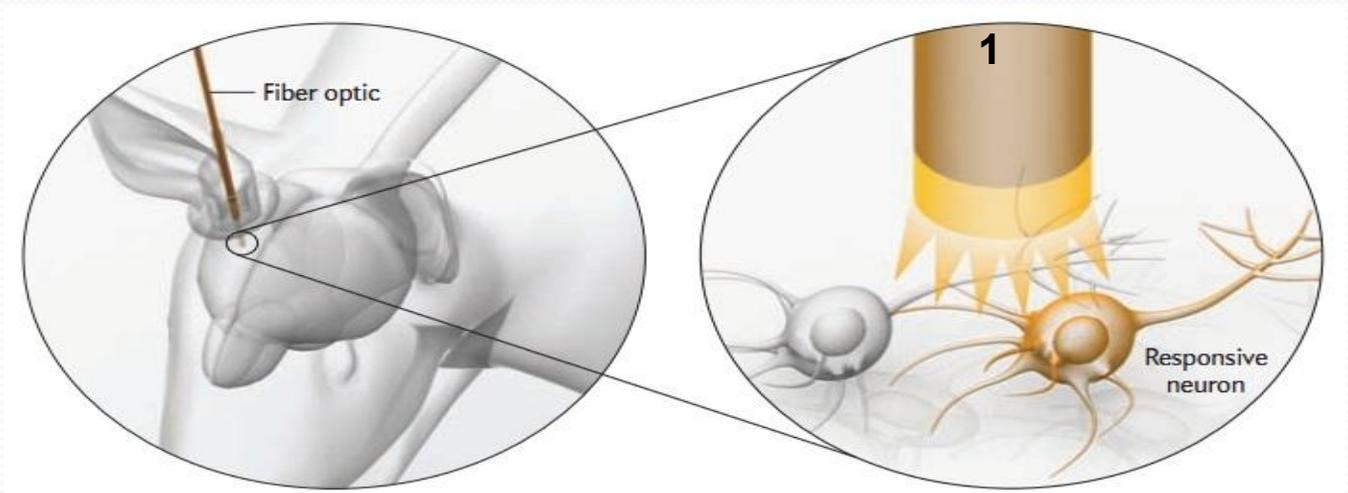
Ген опсина комбинируется с промотором, которые приводит к активации гена только в клетке специфического типа

Модифицированный ген вставляется в вирус, который может быть введен в мозг мыши

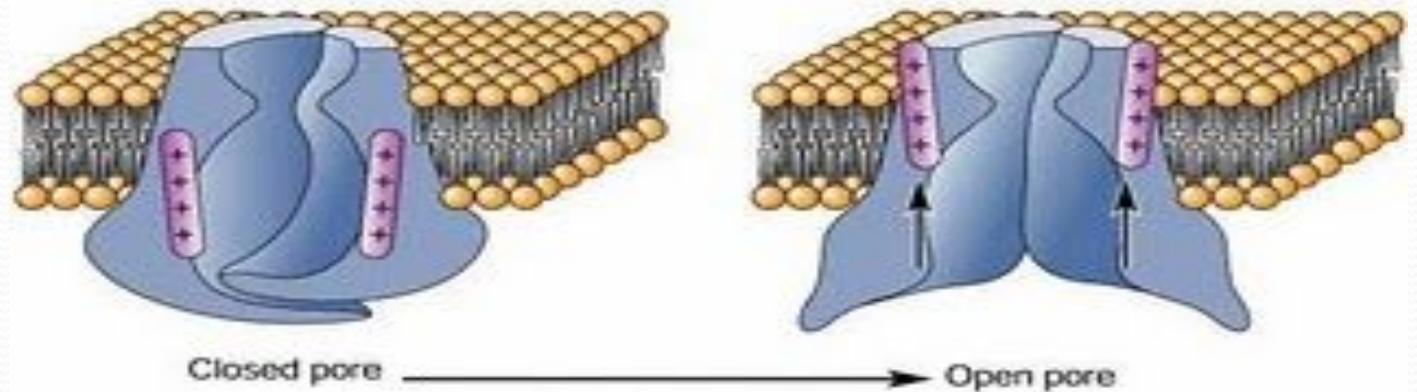
Шаг 2:

Активация белков-опсинов с помощью света

- Свет различной длины волны поглощается хромофором в составе белка опсина



- Воздействие света приводит к изменению конформации белка



Преимущества

Направленный контроль активности одного типа клеток при неизменном состоянии других (генетически ориентированные на специфические группы нейронов)

Селективная активация нейрональных путей (в отличие от электрической стимуляции, которая активирует многие нейронные пути)

Быстрое временное разрешение: миллисекундная точность сравнима с известной динамикой нейронных событий, таких как потенциалы действия синаптических токов

Можно работать в интактных системах, включая свободно движущихся животных

Быстрое возбуждение: Каналородопсин

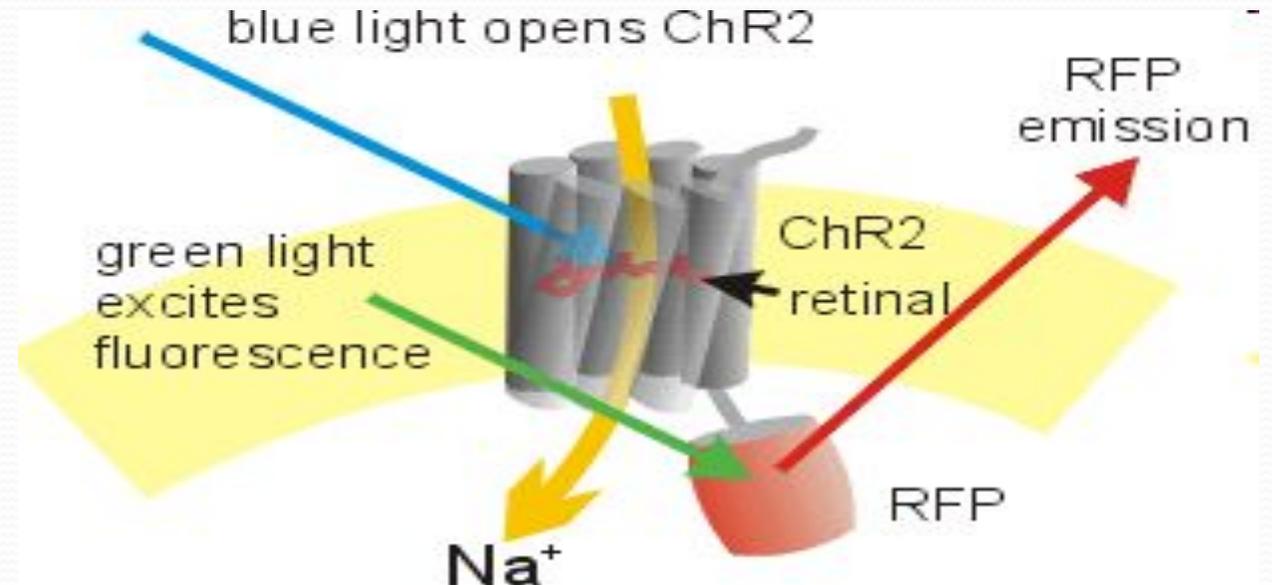
Channelrhodopsin2

Свет-активируемый ионный канал изолированный из зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

Неспецифический катионный канал, проводящий ионы H^+ , Na^+ , K^+ , и Ca^{2+}

Синий свет открывает ChR2 (поглощает при 480 nm)

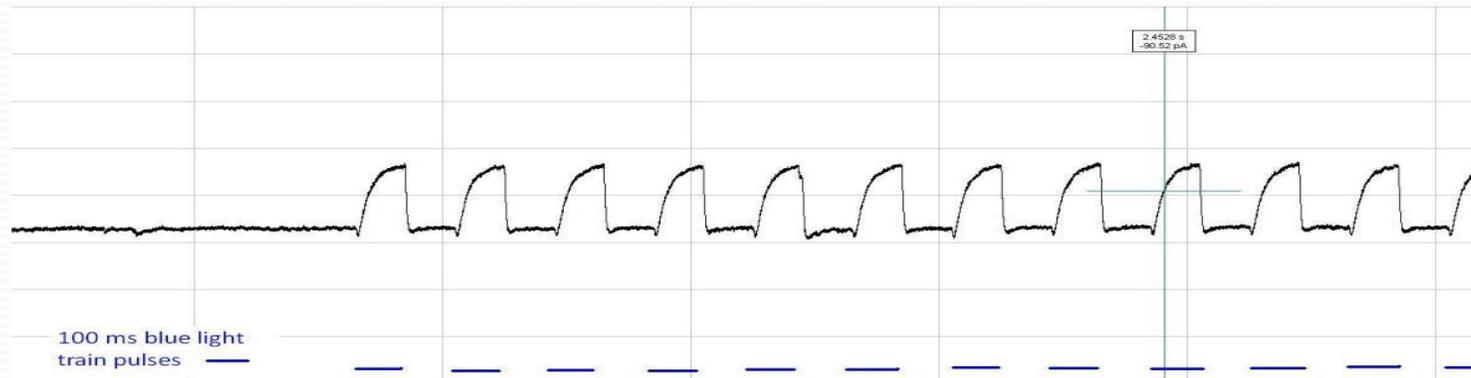
Деполяризует нейроны



Халородопсин (Halorhodopsin)

- Халородопсин (Halorhodopsin) использует оранжевый свет для перемещения хлорид- ионов в клетку, преодолевая мембранный потенциал
- Желтый свет открывает проводимость хлорид- ионов в гиперполяризованную клетку
- Халородопсин может быть использован один для нейронов в покое или в сочетании с Channelrhodopsin2 для активации, молчания или десинхронизации нервной ткани

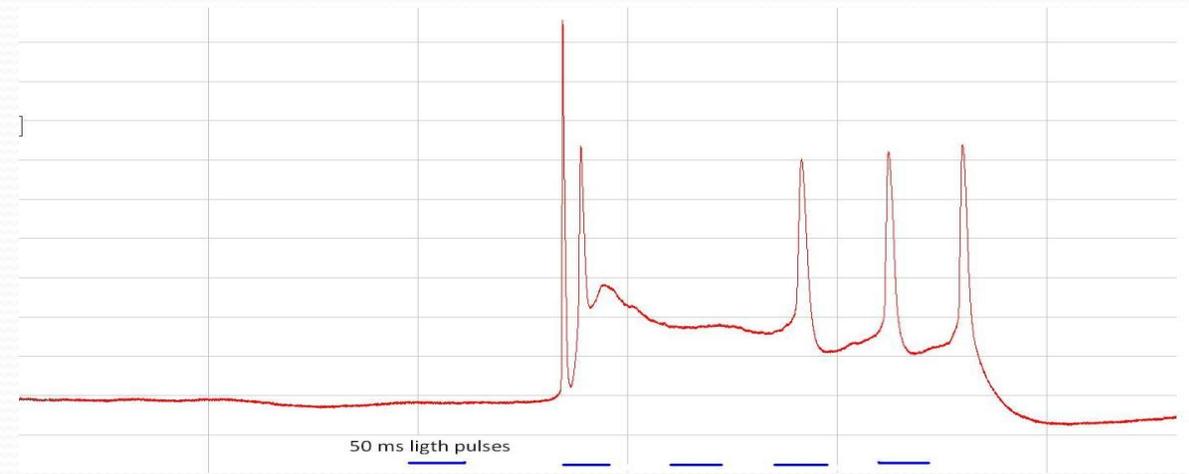
Активация кортикальных нейронов, экспрессирующих ChR2 (Channelrhodopsin2) синим светом



1
Деполаризация клетки

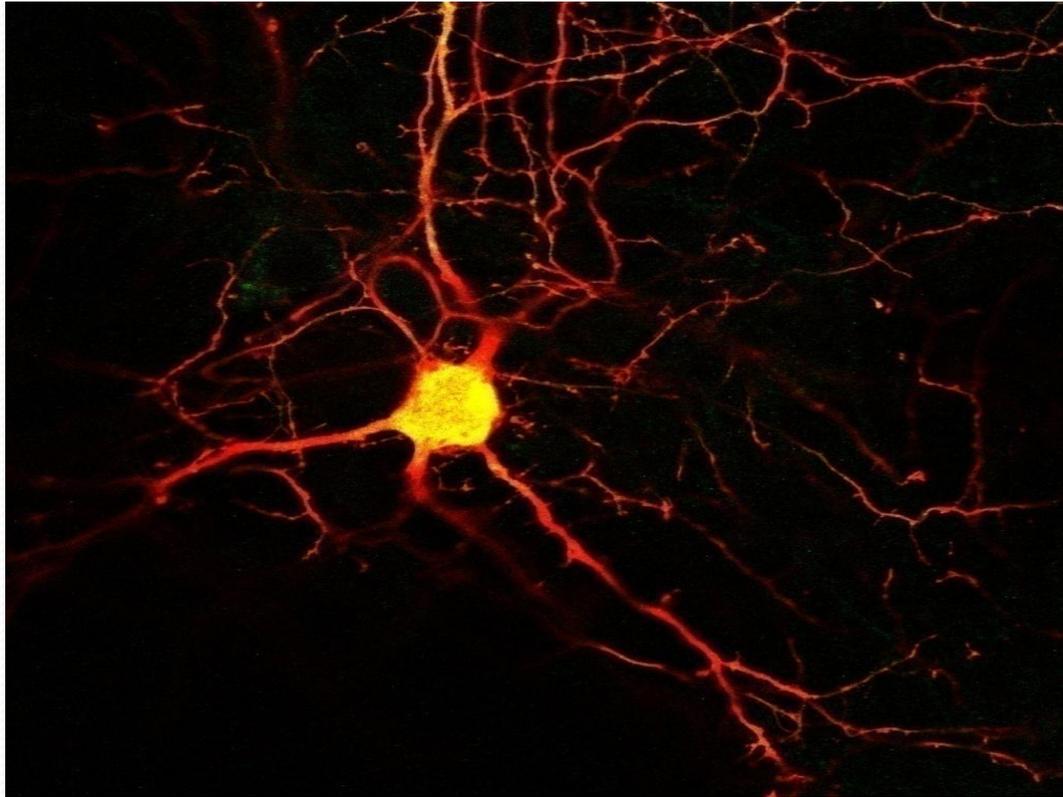


Импульсная активация потенциалов действия

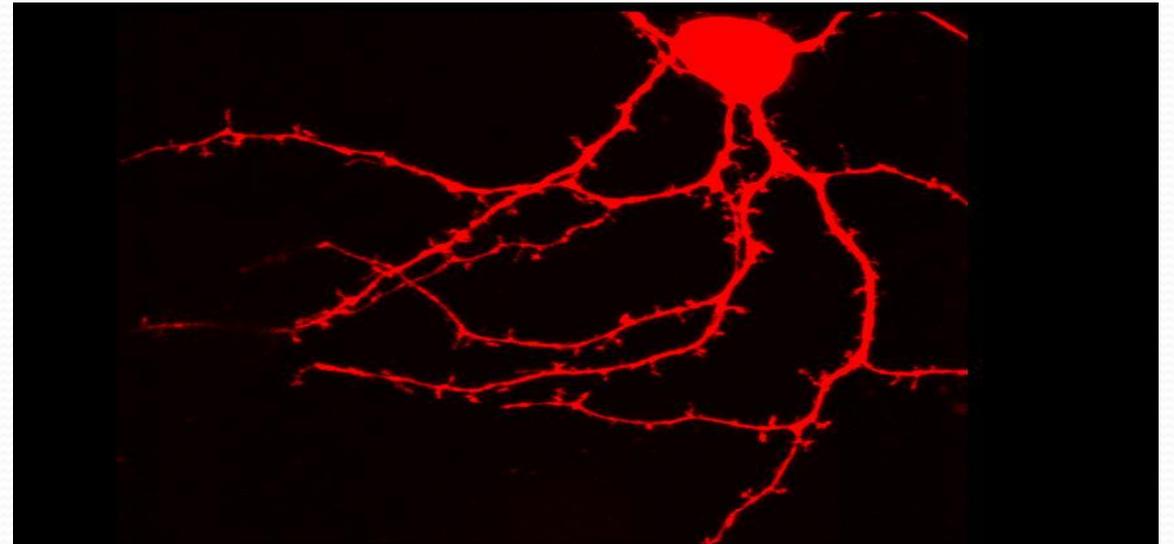


Тоническая световая активация

Нейроны коры и стриатума (средние шипиковые нейроны- MSN) в смешанной культуре.

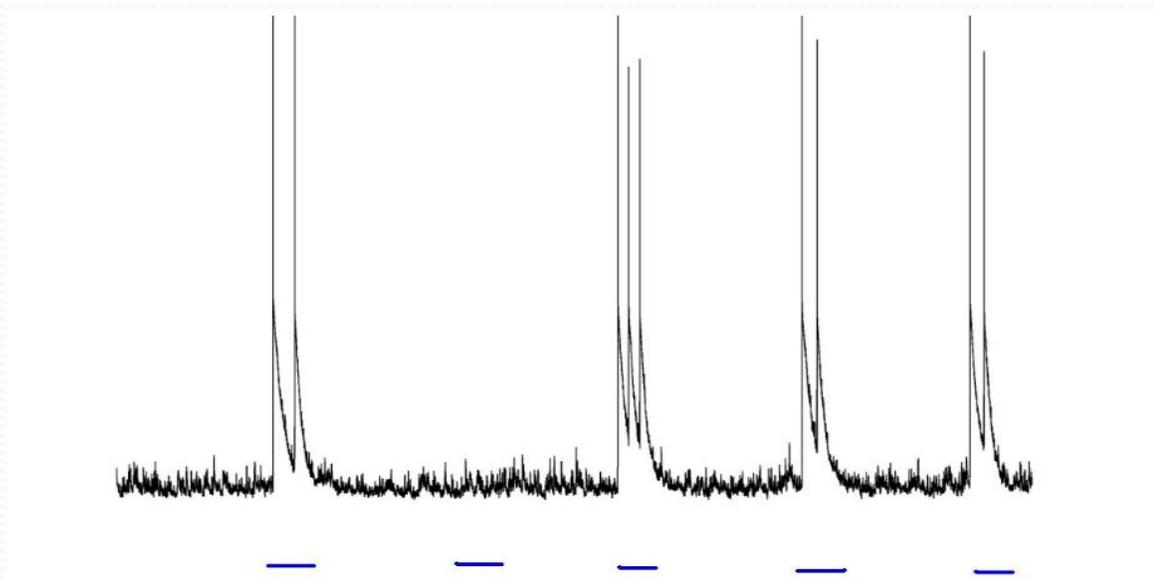


Cortical – lenti-GFP and Tomato

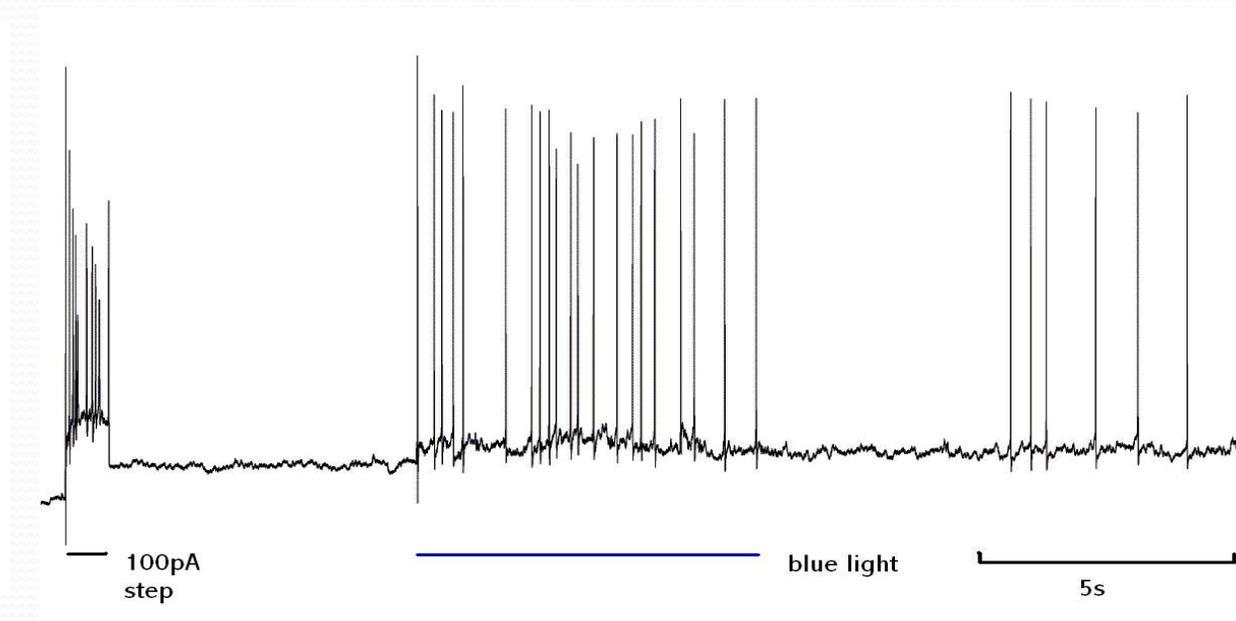


MSN - Tomato

Контроль активности нейронов коры и стриатума в смешанной культуре синим светом. Только нейроны кортекса экспрессируют ChR2

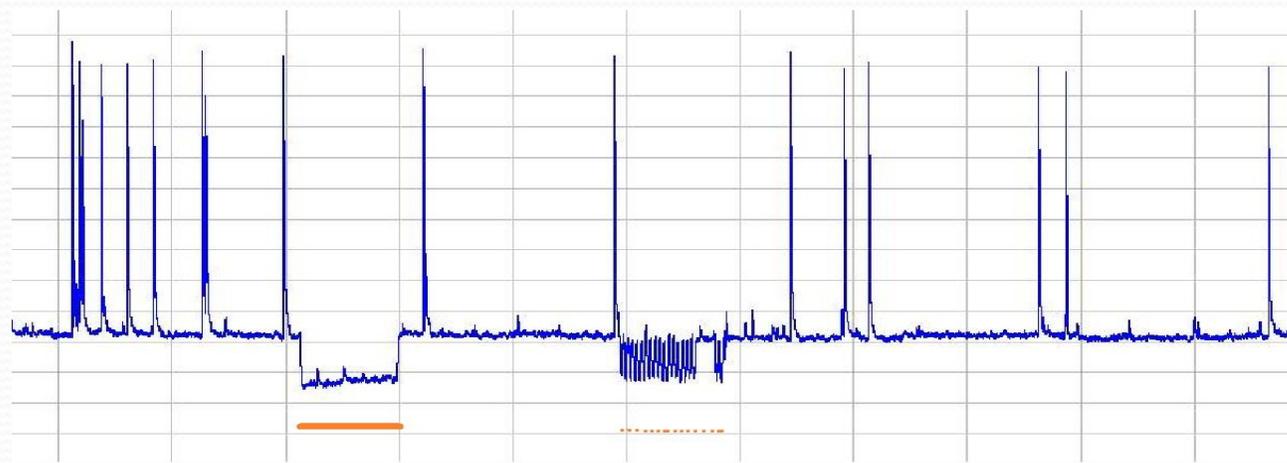


Cortical

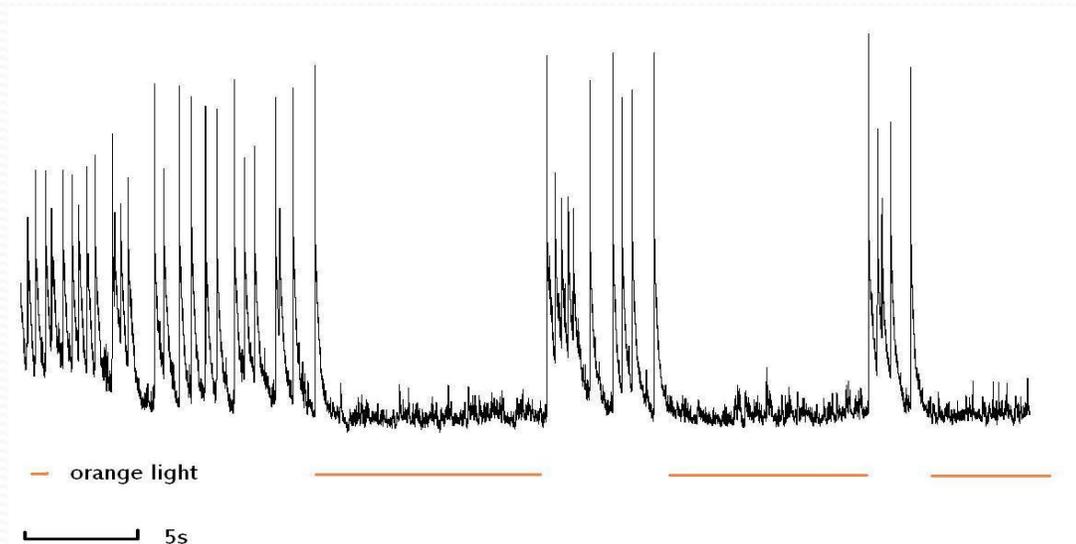


MSN

Контроль активности нейронов коры и стриатума в смешанной культуре
оранжевым светом. Только нейроны кортекса экспрессируют
Halorhodopsin

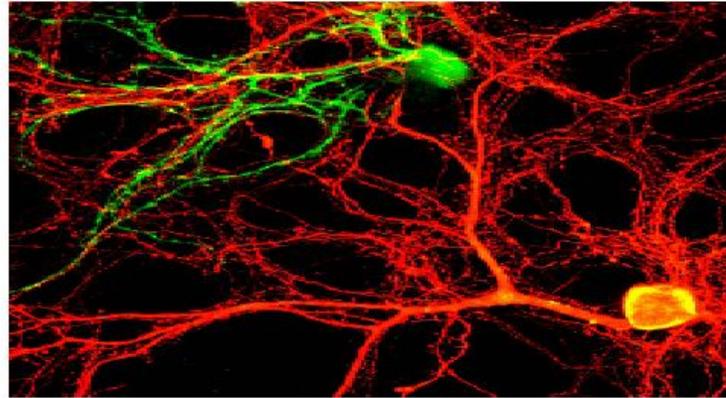


Cortical



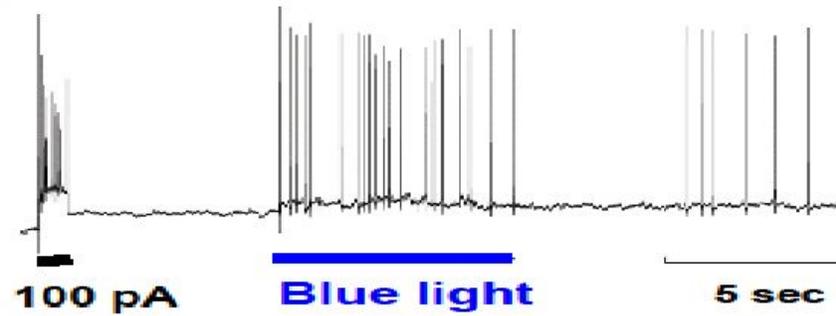
MSN

A



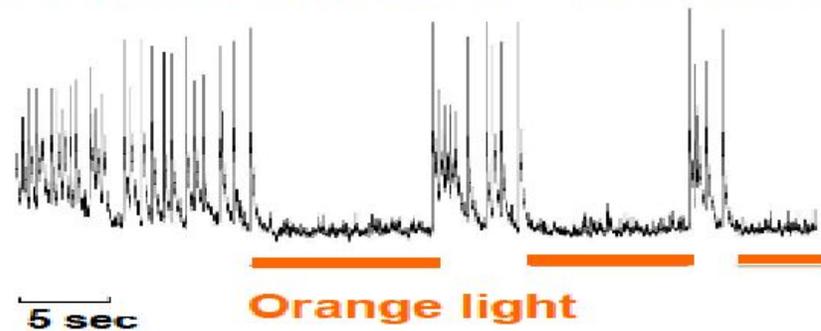
B

Ctx ChR2 activation – MSN readout

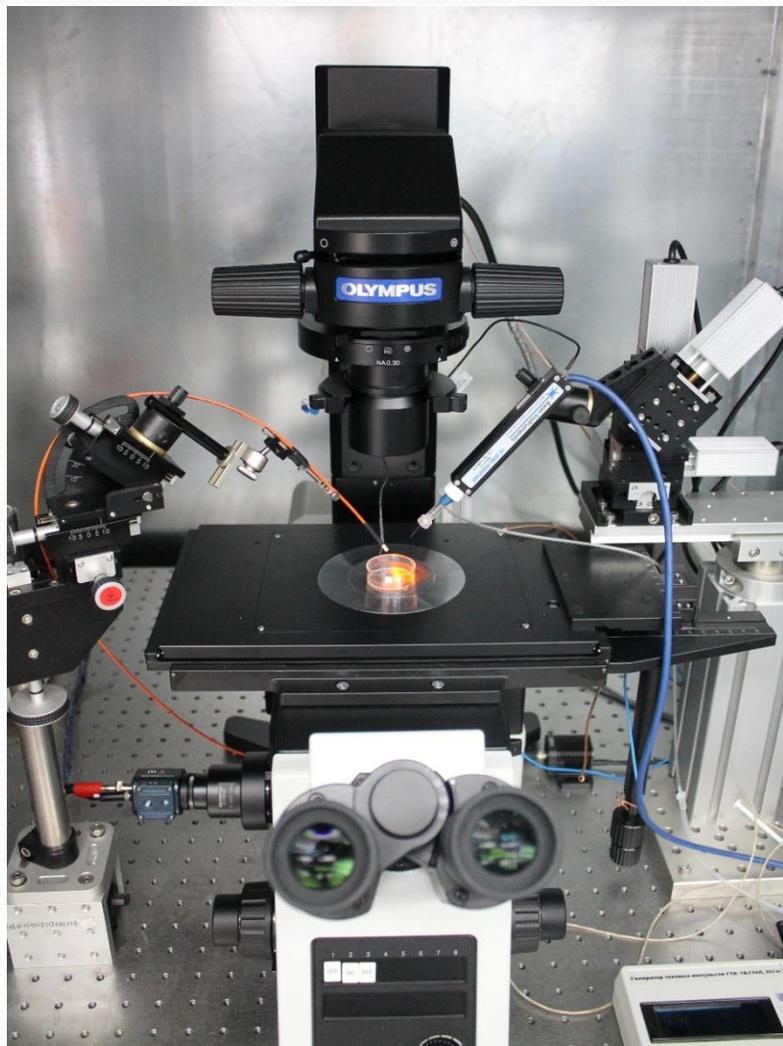


C

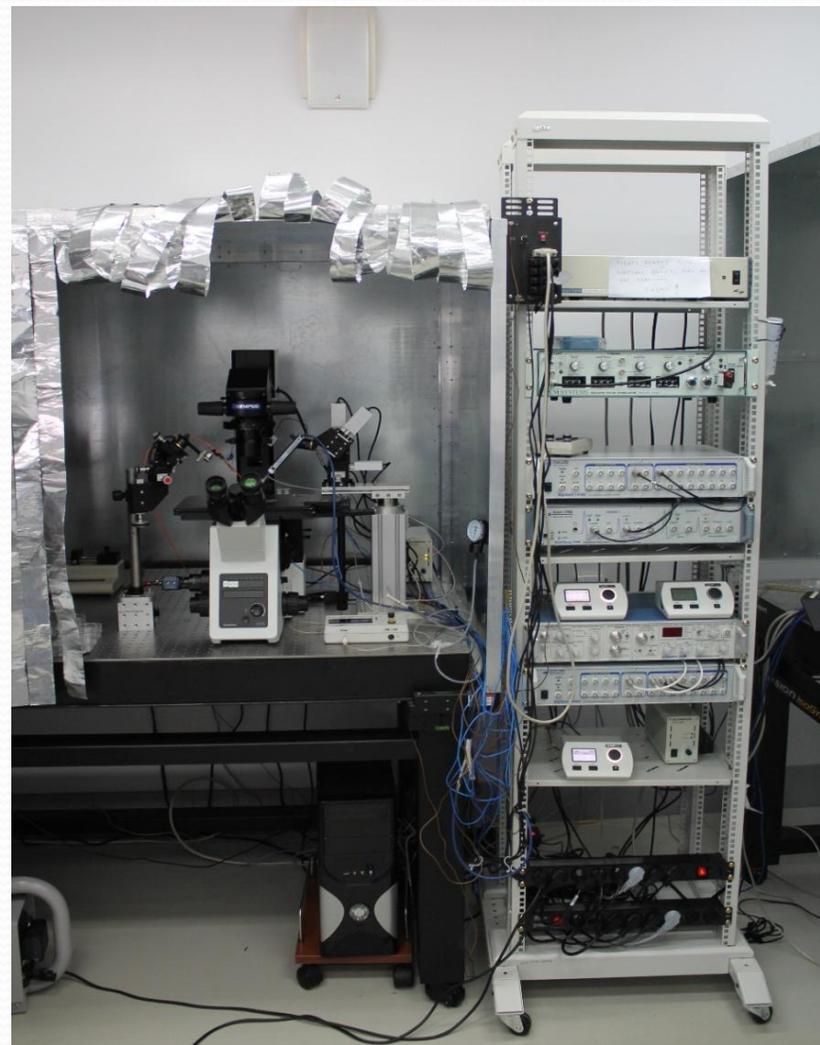
Ctx NpHR inhibition – MSN readout



Исследовательские возможности ЛМН

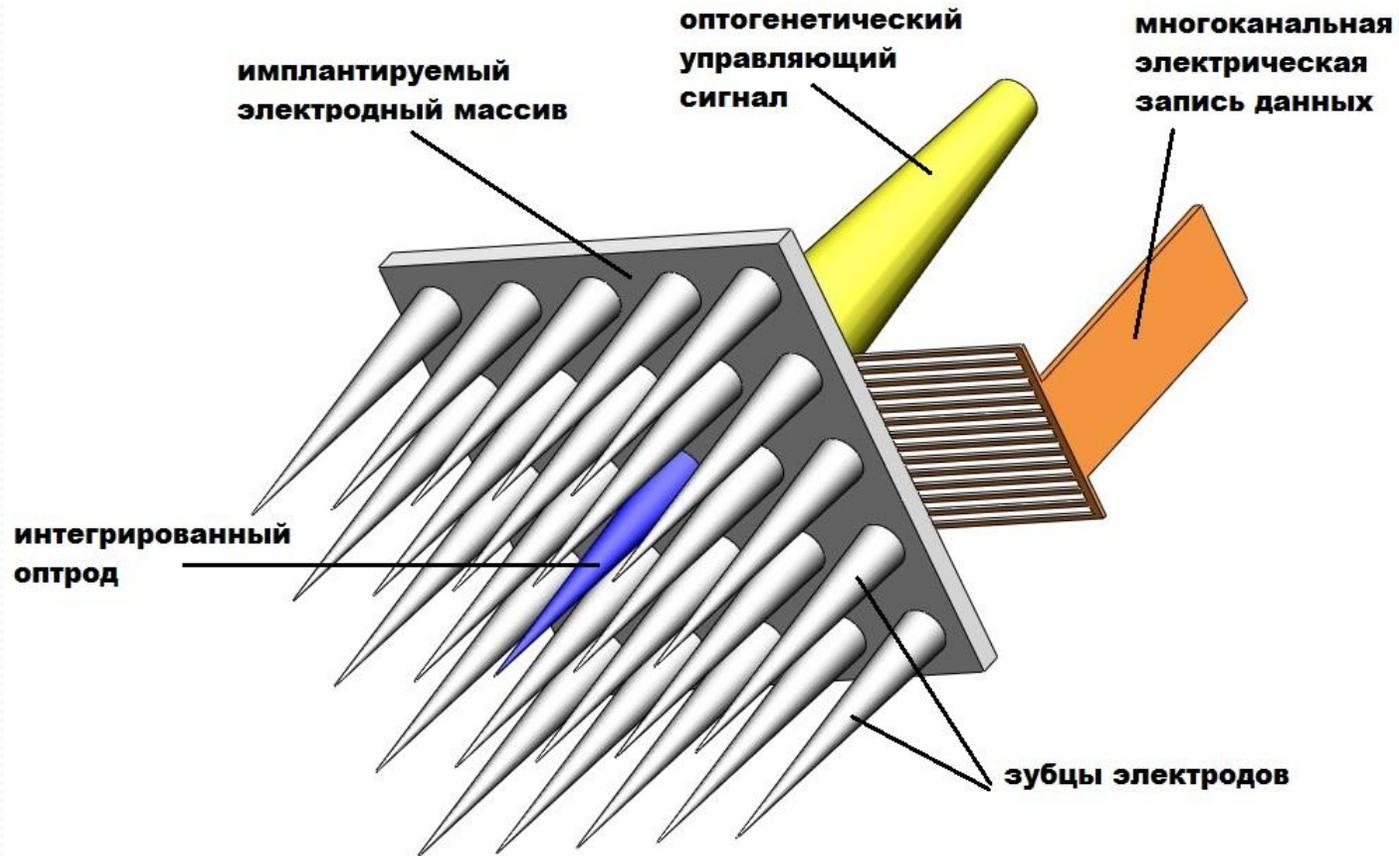


Испытательная установка (на клеточных культурах нейронов)



Общий вид экспериментального комплекса

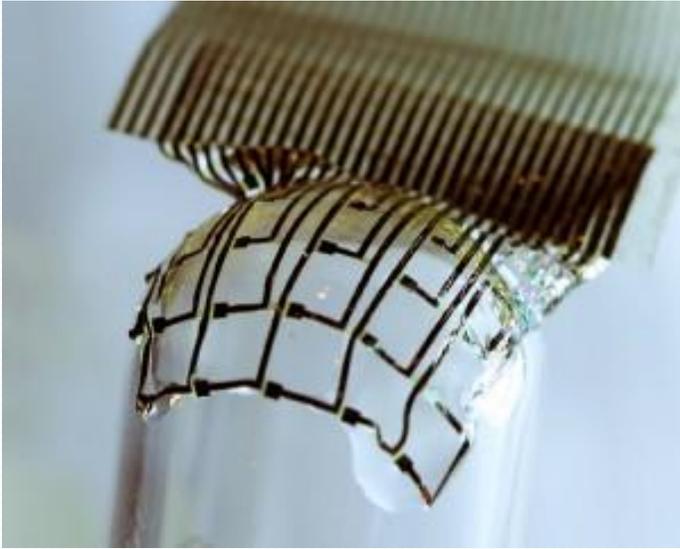
Будущее оптогенетики



Данная разработка позволит увеличить точность позиционирования биоэлектрического датчика и качество съема и обработки экспериментальных данных за счет сопряжения группы оптико-электродных устройств в единую тест-систему.

Комбинированный оптико-электродный массив (узел тест-системы)

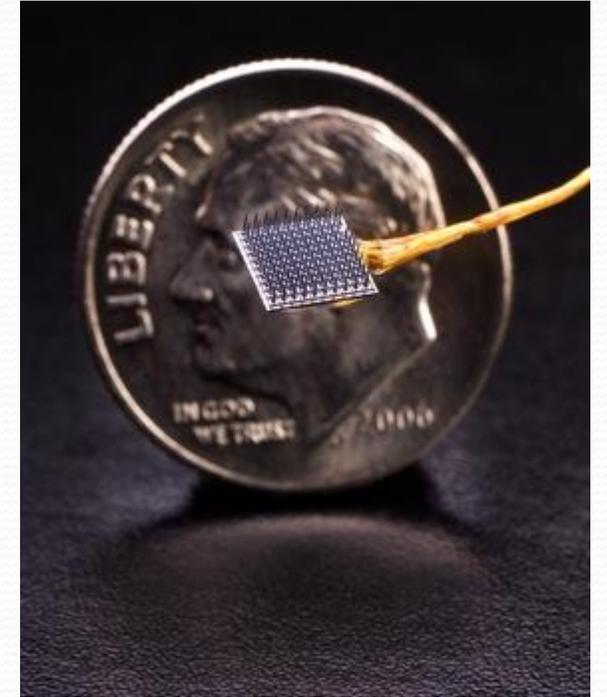
Разработки в мире



1.



2.



3.

1. Гибкий массив электродов, моделируемый по форме экспериментального образца (Columbia University, USA)
2. Электродный массив с световодом оптогенетической активации импульса возбуждения (University of Utah, USA)
3. Нейро-мышечный имплантат стимуляции тканей головного мозга (США)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

