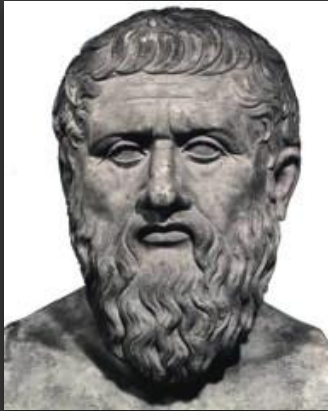


Лекция 2

Вопросы ЛЕКЦИИ:

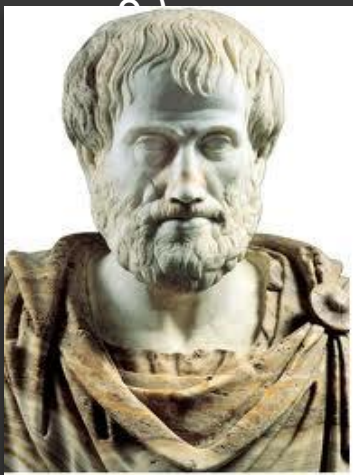
- Краткий экскурс в историю изучения ВНД;
- Основные методы исследования ВНД.

История изучения высшей нервной деятельности до 201г до н.э.



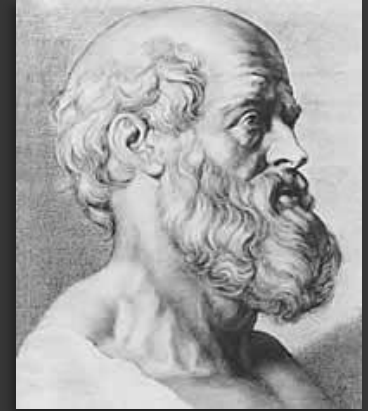
ПЛАТОН

(427 - 347 до н.э.)



АРИСТОТЕЛЬ

(384 - 322 до н.э.)



ГИППОКРАТ

(460—377 гг. до н.э.)

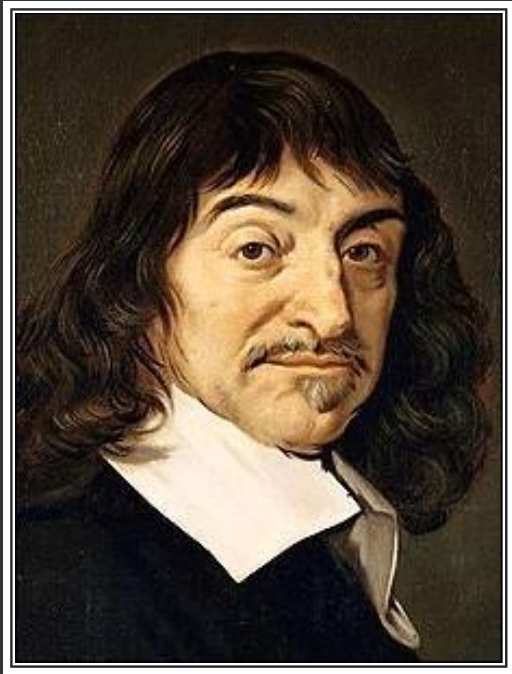


ГАЛЕН

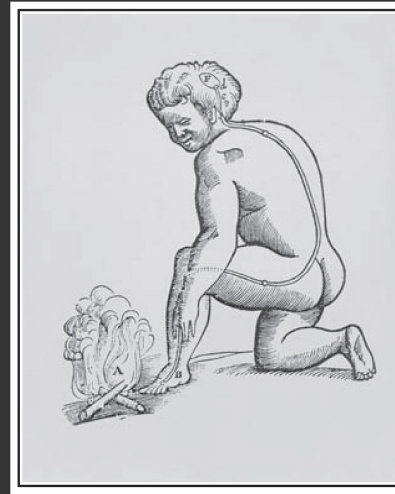
(129— 201 н.э.)

История изучения ВНД от Рене Декарта до начала XIX в.

ДЕКАРТ, Рене (1596 - 1650), французский философ и естествоиспытатель

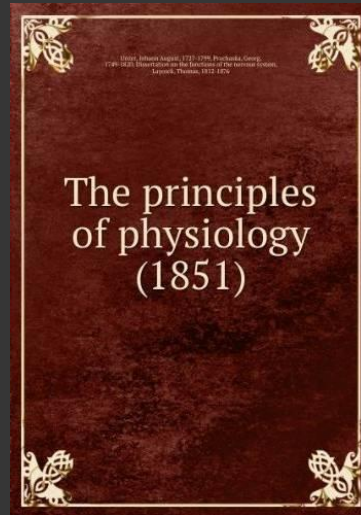


- разделение тела и души;
- поддерживал понятие «высшего разума»;
- сознание – в эпифизе;
- **описал прототип понятия рефлекторной дуги** в виде «нервных нитей» от органов чувств к мышцам;

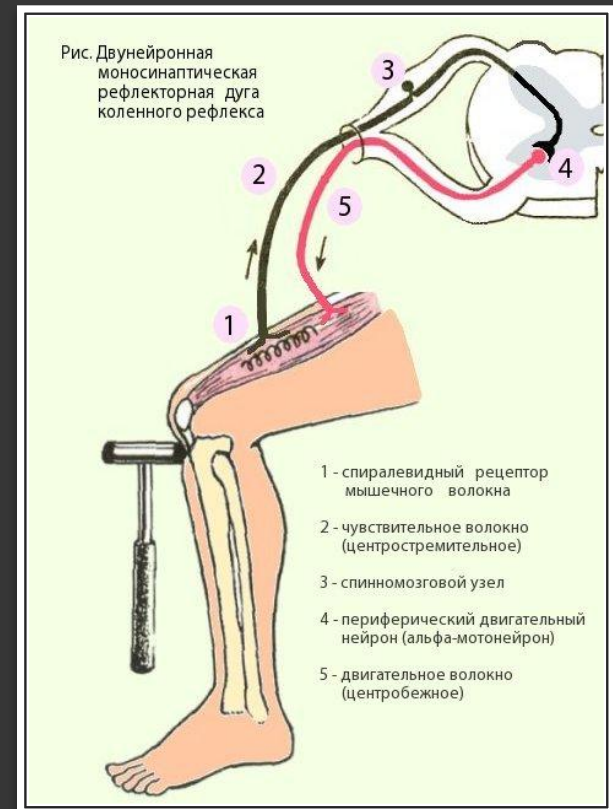


концепция рефлекса по
Декарту

Йиржи ПРОХАЗКА (Georg Prochaska) (1749—1820), чешский анатом, физиолог и врач



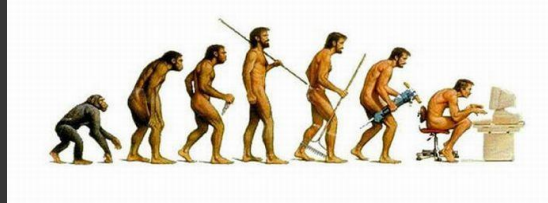
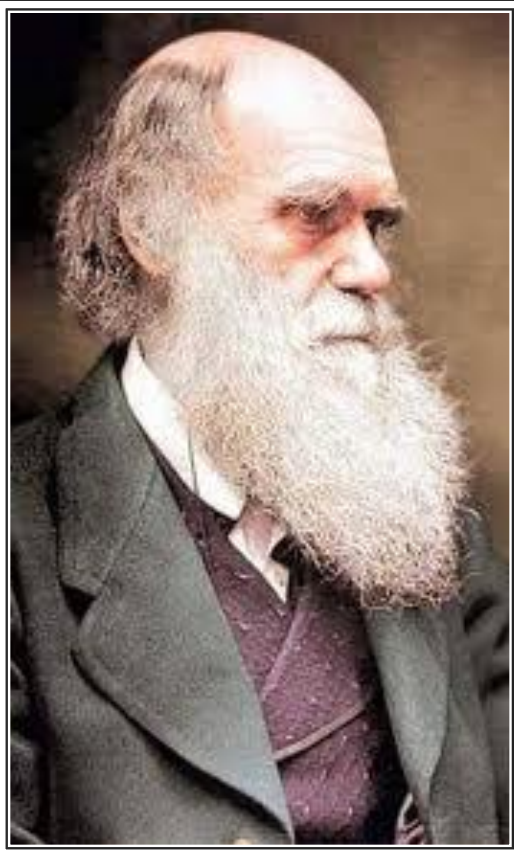
- **Ввел понятие и термин рефлекс (1800 г.)** для всей нервной системы, а не только её низших отделов;
- Утверждал избирательность реакции на внешние воздействия в зависимости от потребности.



(от лат. «рефлекс» — отраженный)
1800 г.

Начало XIX века – становление психологии и теория эволюции

ДАРВИН Чарльз (1809 - 1882),
английский
естествоиспытатель



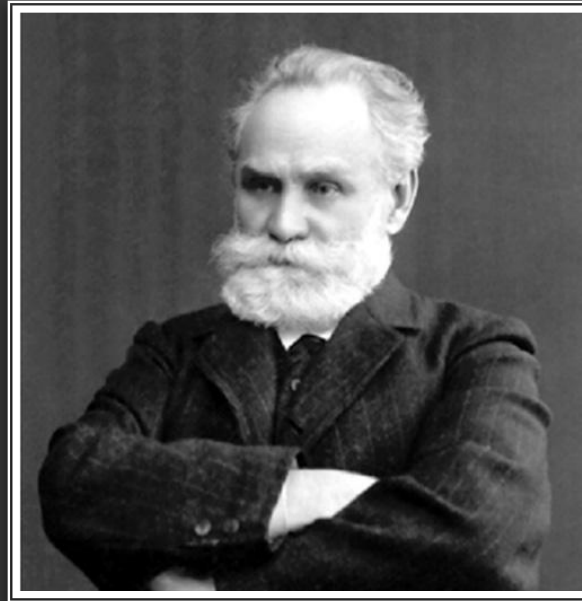
- Теория естественного отбора;
- Соединение мозга и разума;
- Признание общности человека и животных;
- Сравнительное изучение их поведения;
- Начало развития:
 - физиологии человека и животных;
 - микробиологии;
 - генетики.

**Создание научных
предпосылок
для сравнительного
изучения
животных и человека**

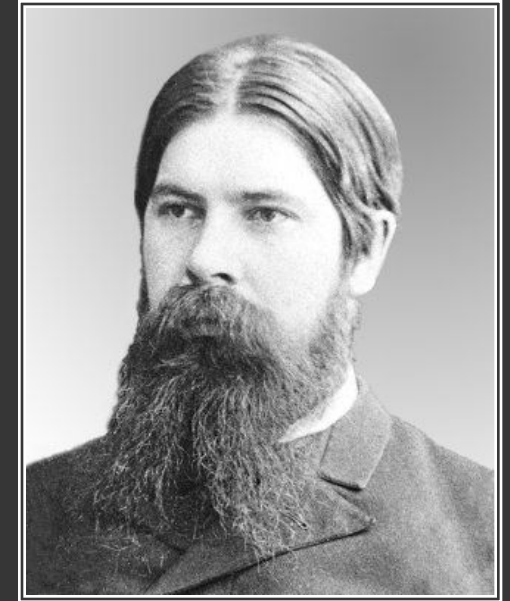
РУССКАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ШКОЛА ВНД



Иван Михайлович
СЕЧЕНОВ
(1829-1905)



Иван Петрович
ПАВЛОВ (1849-1936)



Владимир
Михайлович
БЕХТЕРЕВ (1857-1927)

РУССКАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ШКОЛА ВНД



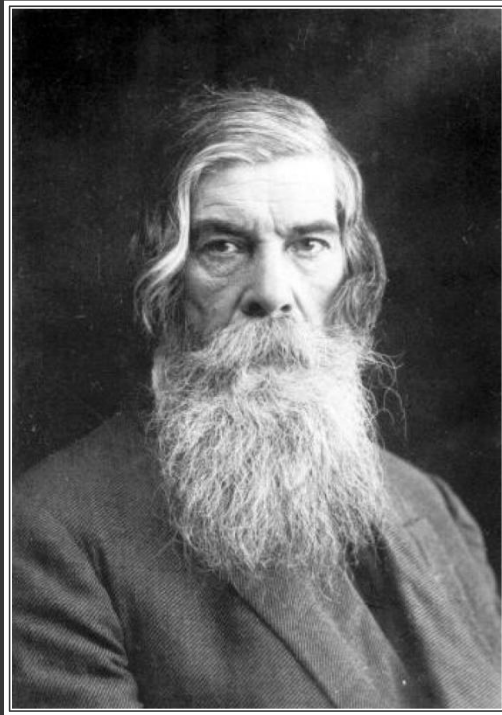
Иван Михайлович
СЕЧЕНОВ

В 1863 г. опубликовал работу «Рефлексы головного мозга», в которой впервые обосновал рефлекторную природу психической деятельности; обосновал анатомический и молекулярный принципы изучения физиологии.



*«..ни один русский учёный не имел такого широкого и благотворного влияния на русскую науку и развитие научного духа в нашем обществе...»
(К. А. Тимирязев)*

РУССКАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ШКОЛА ВНД

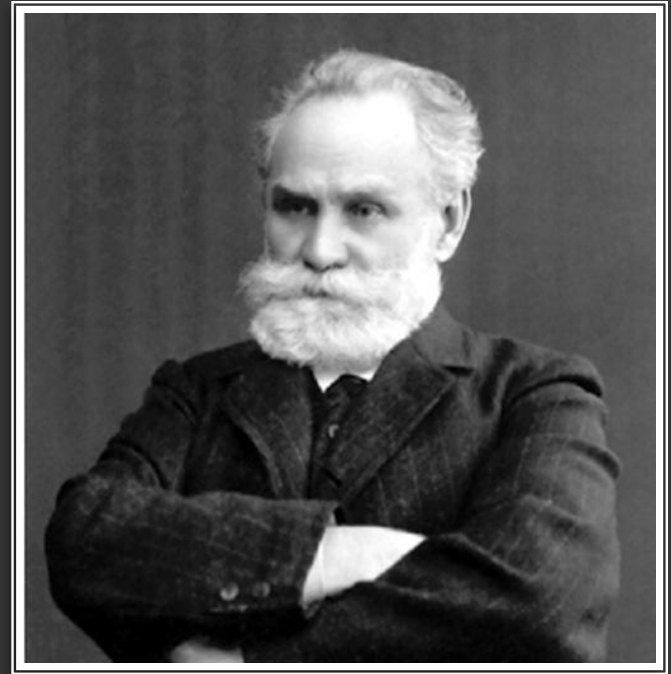


Владимир
Михайлович
БЕХТЕРЕВ (1857-1927)

- Основы учения о функциях мозга (7 томов);
- Основы психологии (3 тома);
- Рефлексология;
- Основатель Института психиатрии;
- Сочетательные рефлексy.

РУССКАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ШКОЛА ВНД

- Ввел понятие условного рефлекса;
- Разработал методы исследования психических процессов;
- Лауреат Нобелевской Премии за физиологию пищеварения;
- Предложил понятие второй сигнальной системы.



Иван Петрович
ПАВЛОВ
(1849-1936)

Музей-квартира И.П. Павлова на Васильевском о-ве, г. Санкт-Петербург



Кабине



Памятник

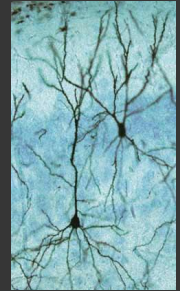
Музей И.П. Павлова, Институт физиологии, Колтуши



«Памятник молочнице, снабжавшей И.П. Павлова и его собак»

В результате работ **русских исследователей** И.М. Сеченова, И.П. Павлова, В.М. Бехтерева, Л.А.Орбели, П.К.Анохина и других физиологическая природа психических явлений была принята научным большинством.

Работы по исследованию мозга,
поддержанные Нобелевским комитетом:



1906 г. Нервная система образована отдельными клетками (С. Рамон-и-Кахаль; Гольджи);

1932 г. Синапсы – контакты нейронов (Ч.С. Шеррингтон);

1936 г. Механизм химической передачи нервного импульса (Г. Дейл, О. Леви);

1963 г. Открытие ионных каналов (Д. Эклс, А. Ходжкин, Э.Ф. Хаксли);

1970 г. Биосинтез медиаторов в нейроне (Д. Аксельрод, Б. Кац, У. Ойлер).

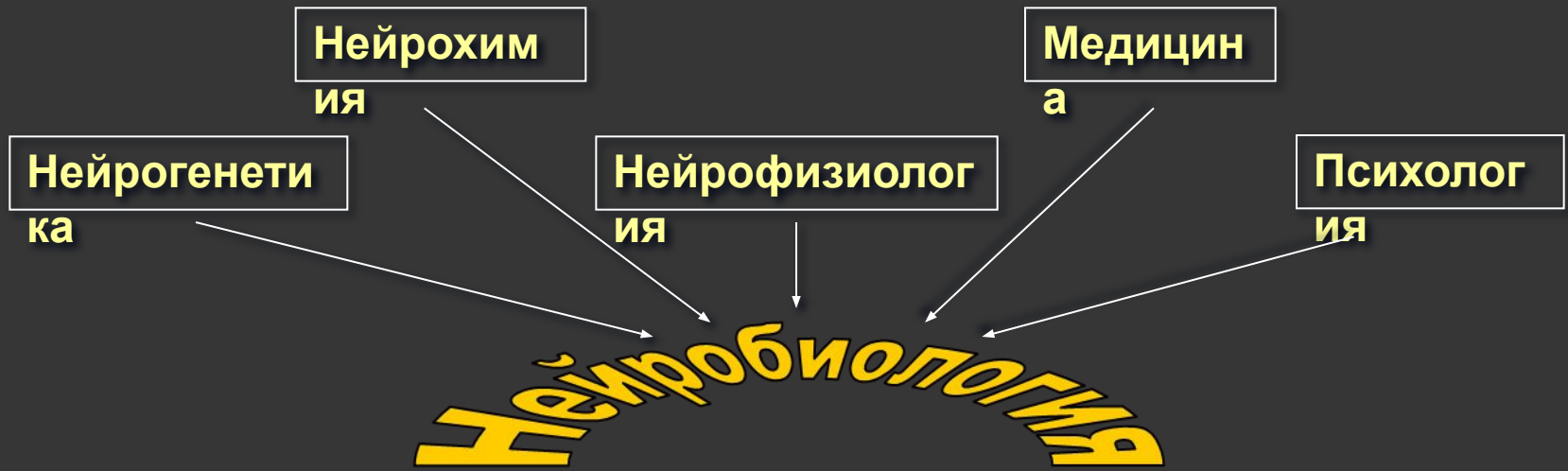


2000 г. Механизмы сигнальной трансдукции в ЦНС (Э. Кендел, А. Карлссон, П. Грингард)



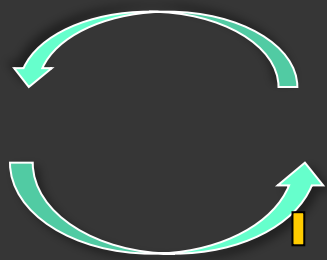
2012 г. Исследование рецепторов, сопряженных с G-белками (Р. Лефковиц, Б. Кобилка...

2014 г. Нейроны «ориентации» в коре мозга (супруги Мозеры и Дж.ОКиф)



Высшая нервная
деятельность

Поведение



Neuroscience

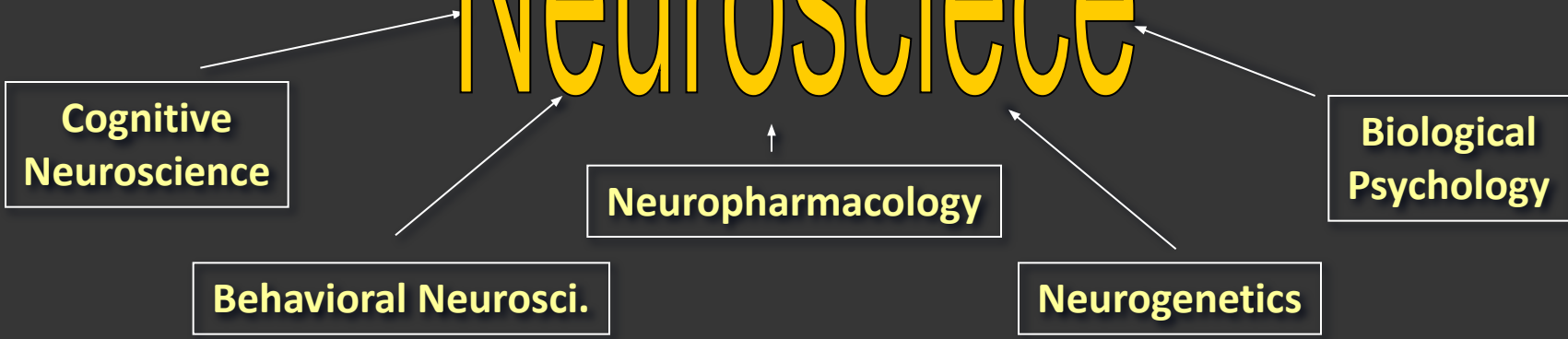
Cognitive
Neuroscience

Neuropharmacology

Biological
Psychology

Behavioral Neurosci.

Neurogenetics



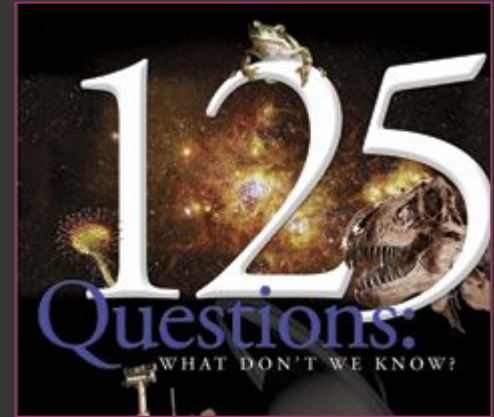
INTRODUCTION

What Don't We Know?

Special Section

At *Science*, we tend to get excited about new discoveries that lift the veil a little on how things work, from cells to the universe. That puts our focus firmly on what has been added to our stock of knowledge. For this anniversary issue, we decided to shift our frame of reference, to look instead at what we *don't* know: the scientific puzzles that are driving basic scientific research.

We began by asking *Science's* Senior Editorial Board, our Board of Reviewing Editors, and our own



1. What is the Universe Made of?
2. What is the Biological Basis of Consciousness?



«...И есть все основания думать, что в 21-ом веке, в науке 21-го века, наука о мозге и разуме будет занимать такое же место, как в 20-ом веке занимала наука о генах и наследственности...».
К. В. Анохин

“В XXI веке перед учеными стоит, возможно, самая сложная задача за всю историю существования науки: понять мозг. Наш век уже окрестили веком наук о мозге и сознании по аналогии с тем, как прошлый век называли веком генетики. Задача невероятно сложная хотя бы потому, что обычно инструмент, с помощью которого проводят исследования, сложнее объекта исследования. Сейчас же с помощью разума мы пытаемся понять сам разум. Удастся ли?”

..Мозг, породивший естествознание, сам становится объектом естествознания..

И.П. Павлов

Древняя
я



400
0

Декарт

1600

Наше
время

2000

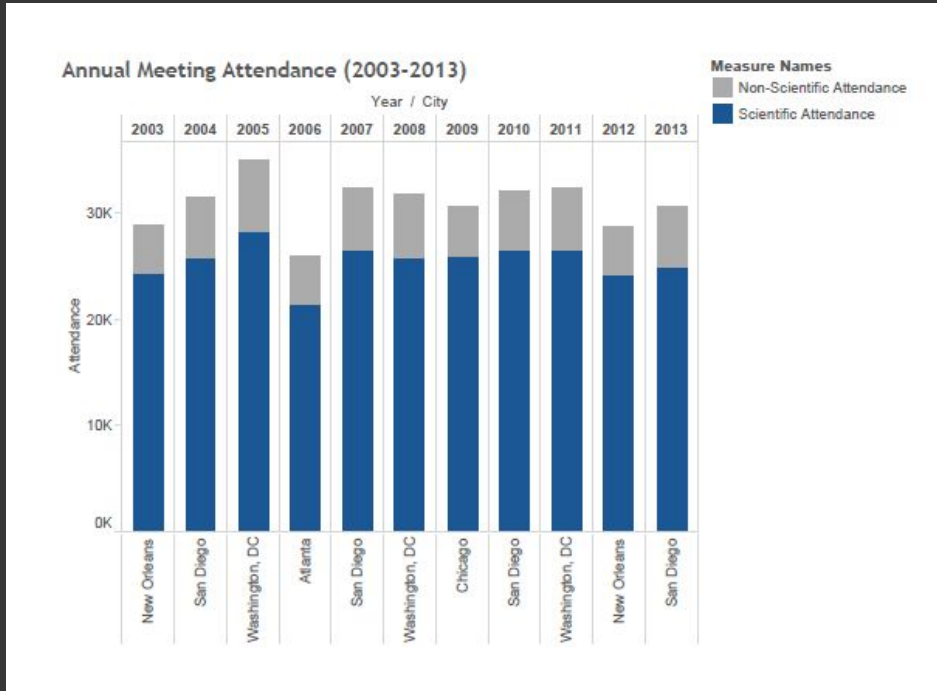


Численность мирового Общества Нейронаук (Society for Neuroscience)



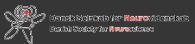


November 11-15, Washington, DC



Forum of Neuroscience
July 2-6, 2016 | Copenhagen, Denmark

Organized by the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)
Hosted by the Danish Society for Neuroscience



11th FENS
Forum of Neuroscience
7-11 July 2018 | Berlin, Germany

Organized by the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)
Hosted by the German Neuroscience Society



Home of the
FENS Forum of Neuroscience

20th
anniversary



..Мозг, породивший естествознание, сам становится объектом естествознания..

И.П. Павлов

Необходимость исследования мозга :

1. Мозг - наиболее сложно устроенный орган на Земле;
2. Формирование мозгом поведения и сознания остается нерешенным вопросом мировой науки;
3. Прогрессивный рост расстройств, обусловленных патологическими процессами мозга:

THE TOLL OF SELECTED BRAIN AND NERVOUS SYSTEM DISORDERS*

<u>Condition</u>	<u>Total Cases</u>	<u>Costs Per Year</u>
Hearing Loss	28 million	\$ 56 billion
All Depressive Disorders	20.5 million	44 billion
Alzheimer's Disease	4.5 million	100 billion
Huntington's Disease	30,000	2 billion
Stroke	4.7 million	51 billion
Schizophrenia	2 million	32.5 billion
Parkinson's Disease	1 million	5.6 billion
Traumatic Head Injury	5 million	56.3 billion
Multiple Sclerosis	2.5 million	9.5 billion
Spinal Cord Injury	250,000	10 billion

* Estimates provided by the National Institutes of Health and voluntary organizations.

Патологии мозга:

Нейродегенеративные заболевания — группа медленно прогрессирующих заболеваний нервной системы, связанных с гибелью нервных клеток, внешне выражающиеся в виде деменции и расстройства двигательных функций (болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона — наиболее известные представители данной группы).

Психические расстройства, связанные с нарушениями в сфере чувств, мышления, поведения. К этой группе относятся депрессия, анорексия, булимия, нарушения сна, алкогольные и наркотические зависимости, шизофрения.

Заболевания, связанные с сосудистой системой — инсульты и т.п.

Все перечисленные заболевания возникают по разным причинам, но на уровне нейронов их проявление всегда одно: нарушается передача нервных импульсов. В зависимости от причины таких нарушений требуется и разное лечение. Но проблема в том, что мы до сих пор не знаем причин этих заболеваний.

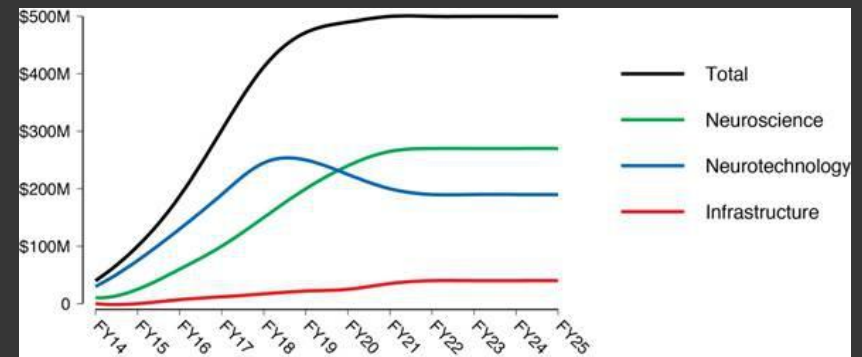
Объем финансирования научных исследований в Европе

Рамочная программа	Период, гг.	Общий объем финансирования, млрд евро
FP1	1984-1987	3,8
FP2	1987-1991	5,4
FP3	1990-1994	6,6
FP4	1994-1998	13,2
FP5	1998-2002	15,0
FP6	2002-2006	17,9
FP7	2007-2013	50,5
FP8, Horizon 2020	2014-2020	80

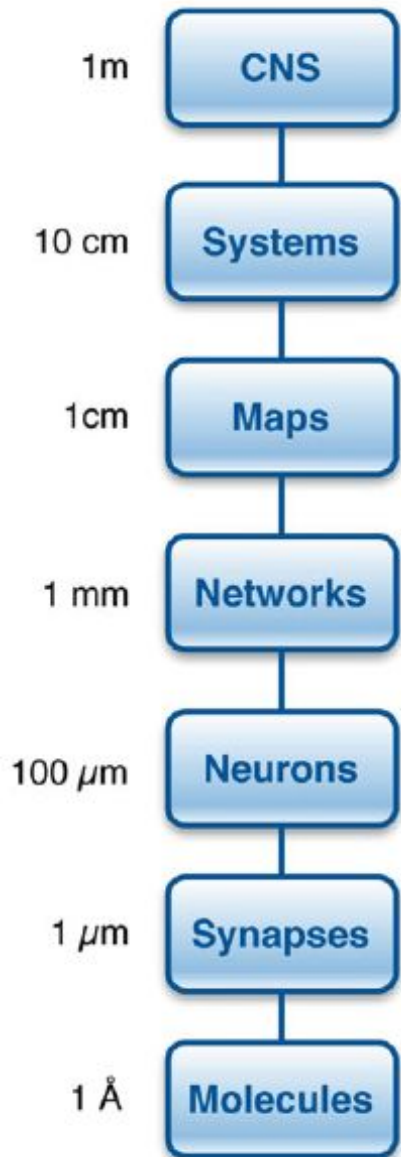
На исследования мозга до 10 % от этих сумм

Самые финансируемые программы:

- Blue Brain
- The Human Brain Project, HBP
- B.R.A.I.N. („Brain Research Through Advancing Innovative Neurotechnologies”)
- Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies



Уровни исследования:

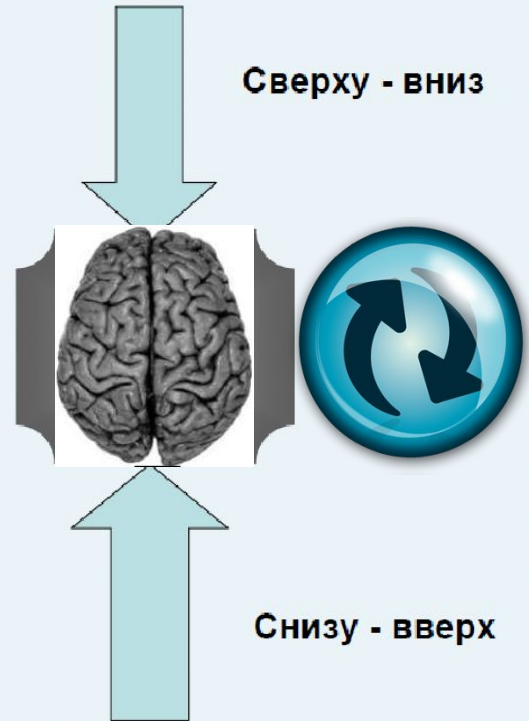


«Наука движется толчками в зависимости от успехов, делаемых методикой» (И.П. Павлов)

Уровни изучения мозга

- Социальные взаимодействия
- Системный уровень (высшие нервные функции)
- Взаимодействие между структурами мозга
- Функциональная организация локальных нейронных и глиальных сетей
- Процессы на клеточном уровне и передача сигнала от клетки к клетке
- Молекулярные механизмы

Методические подходы



Основные методы и подходы:

Неинвазивные методы исследования мозга:

- *Электроэнцефалография - ЭЭГ*
- *Магнитоэнцефалография -МЭГ*
- *Компьютерная томография – КТ, МСКТ*
- *Позитронно-эмиссионная томография – ПЭТ*
- *Магнитно-резонансная томография – МРТ, фМРТ*
- *Глубокая стимуляция мозга, DBS*
- *Магнитная стимуляция мозга*

Электро-физиологические методы исследования мозга in vitro.

Молекулярно-биохимические методы исследования мозга:

- *Экспрессия генов и белков*
- *Уровень медиаторов*
- *Плотность рецепторов*
- *Генетические модификации экспрессии генов (нокаут, нокдаун, гиперэкспрессия)*
- *CRISPR-Cas9 технологии (изменение экспрессии, уровня метилирования)*

Новейшие методические подходы для исследования мозга:

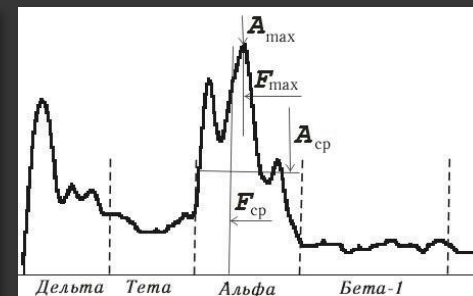
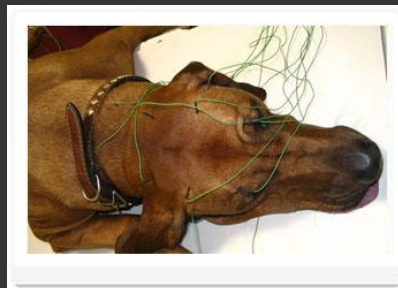
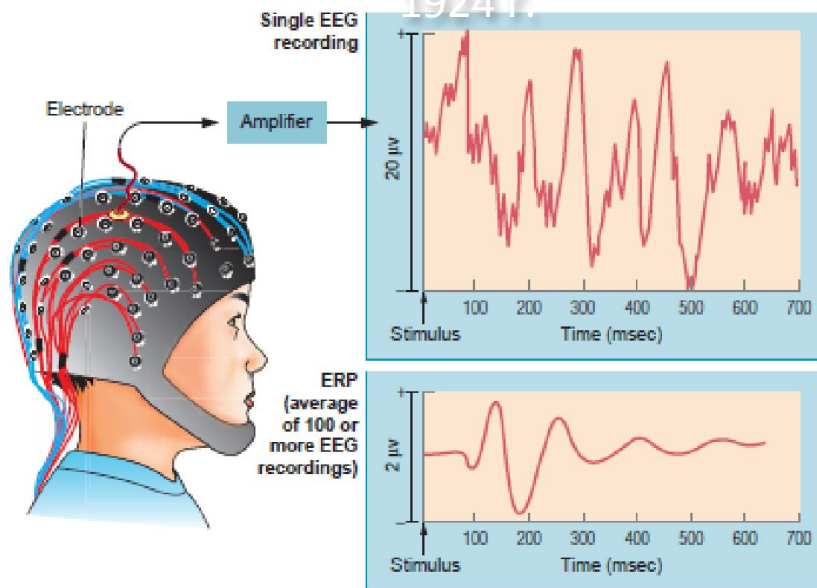
- *Оптогенетика*
- *Хемогенетика*
- *CLARITY*
- *.....*

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЗГА

Электрэнцефалография неинвазивные (ЭЭГ)

На животных - с 1913 г., на человеке – с

1924 г.



РИТМЫ:

α, альфа (8-13

Гц),

β, бета (13-30 Гц),

δ, дельта (1-4

Гц),

θ, тета (4-7 Гц),

γ, гамма (≤ 40 Гц).

γ

Монопольный и бипольный
подход;

Наложение электродов по схеме

Анализ: корреляты разного
состояния;

метод вызванных

Может делаться:

электромиограммой и
электроокулографией

α – закрытие глаз;

β – активное бодрствование; быстрый сон;

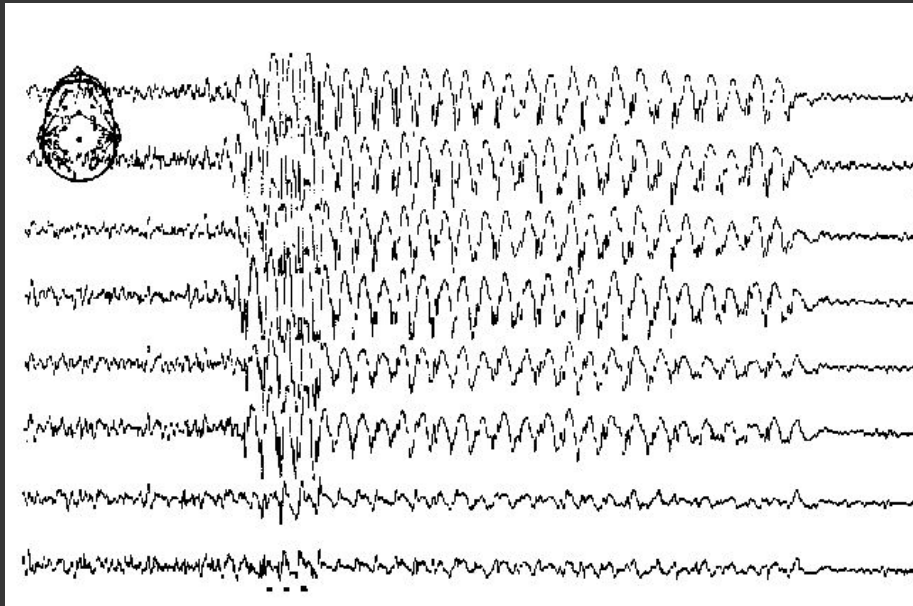
δ – глубокий сон; кома; умствен.

переутомление;

θ – обучение;

γ – максимальное внимание.

ЭЭГ: эпилептическая активность



Вызванные потенциалы и IQ

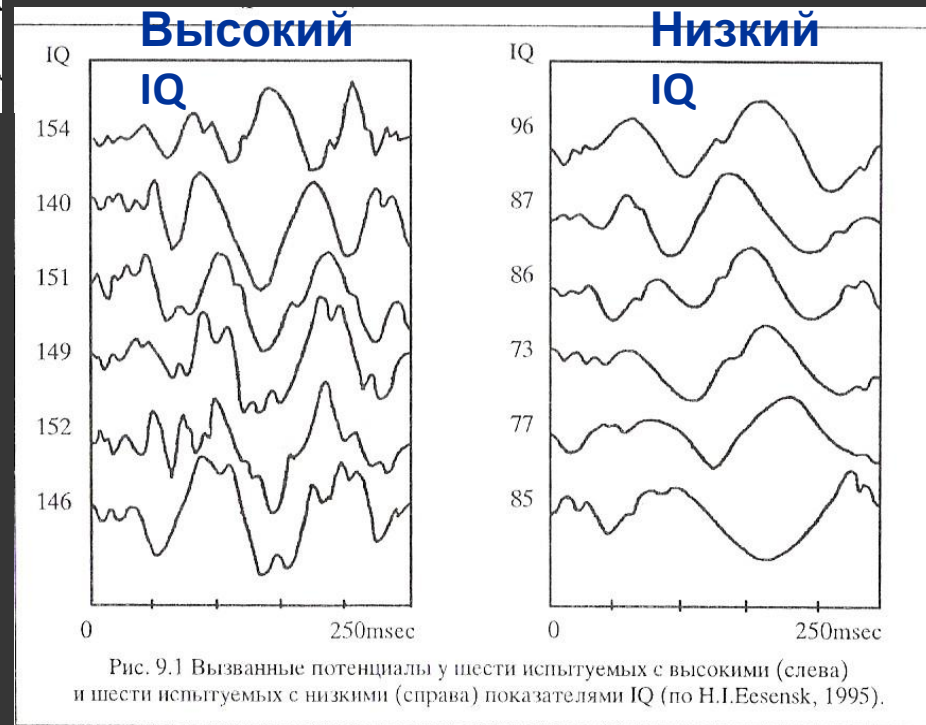
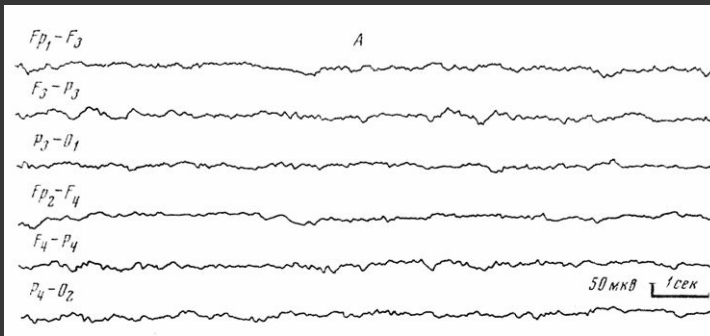


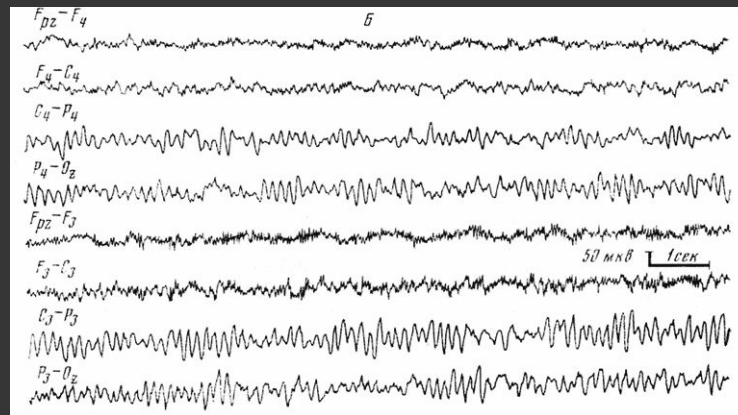
Рис. 9.1 Вызванные потенциалы у шести испытуемых с высокими (слева) и шести испытуемых с низкими (справа) показателями IQ (по Н.И.Есенск, 1995).

6 дней

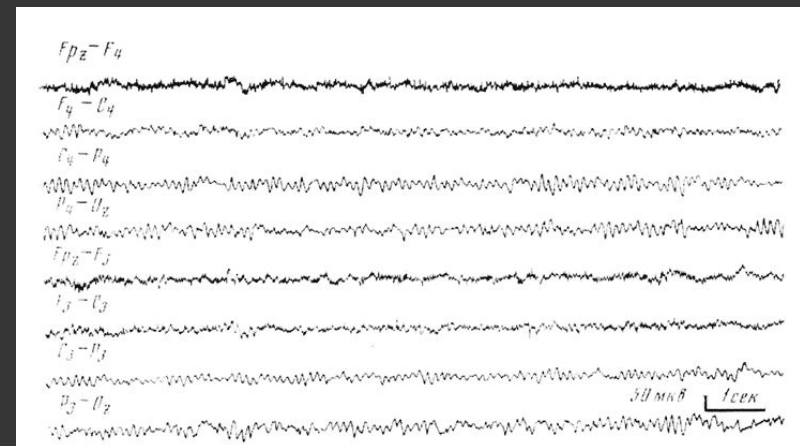


ЭЭГ в онтогенезе человека

3 года

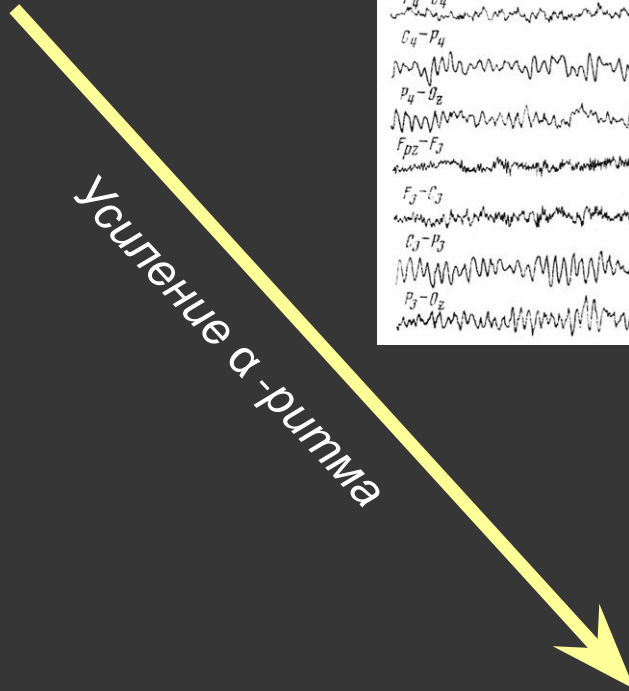


12 лет



δ и θ

Усиление α -ритма



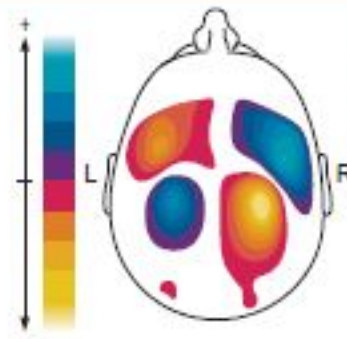
Магнитоэнцефалография (МЭГ) – регистрация магнитного поля, обусловленного биоэлектрической активностью мозга

Используется – с 1968

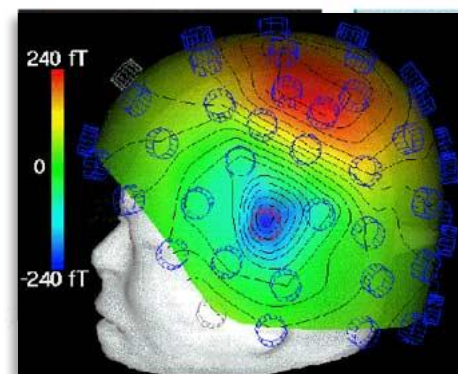
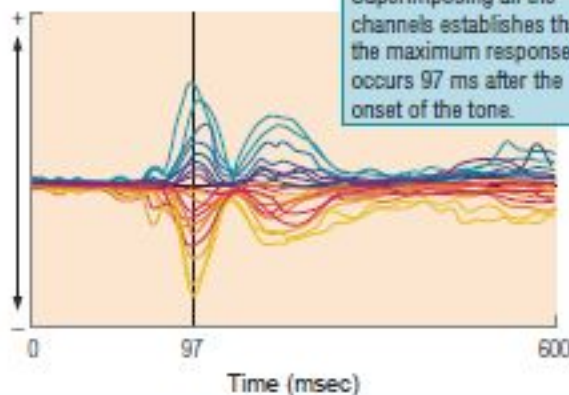
Г.



Changes in magnetic fields, recorded by 143 SQUIDS in the array (seen from the top of the head).

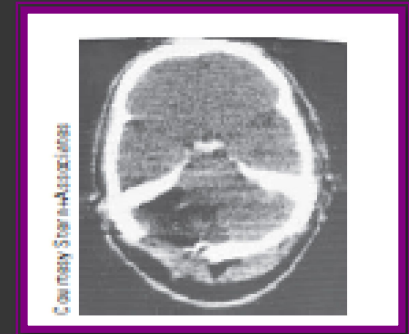
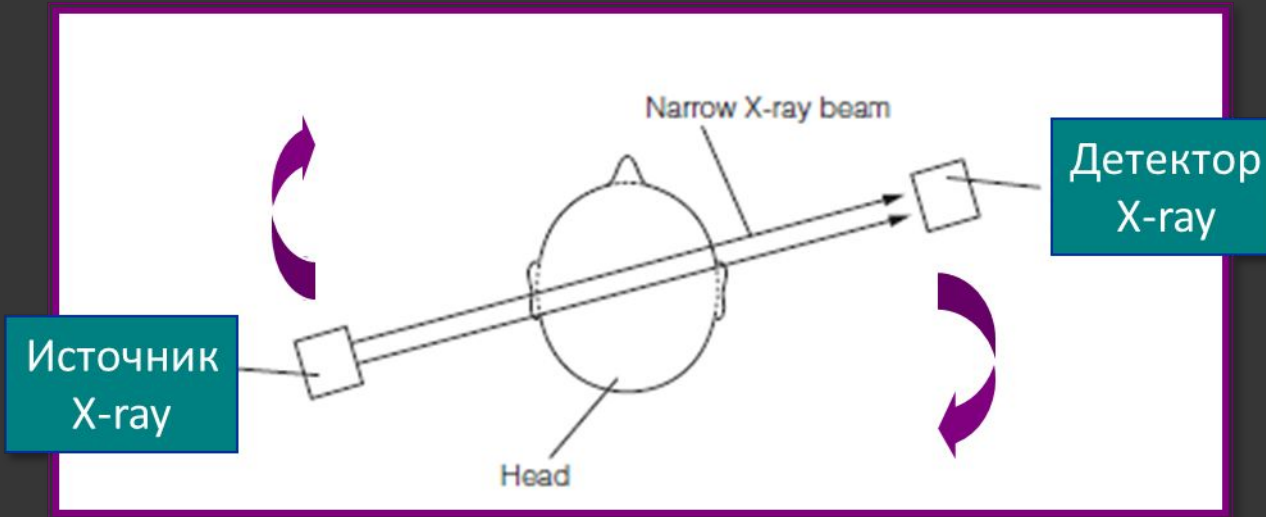


The results are mapped back onto a diagram of a head. Weaker responses indicate activity at greater depths in the brain.



МЭГ чувствительнее ЭЭГ, но значительно дороже, используется в диагностике патологий мозга, по разрешению сопоставима с внутримозговыми электродами

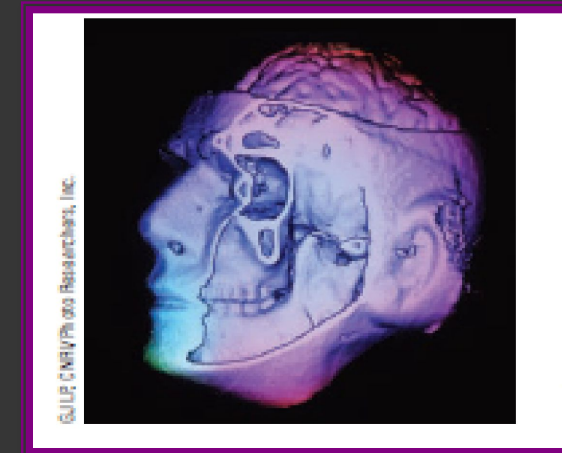
СКАНИРОВАНИЕ 1. Компьютерная томография (КТ) МОЗГА



Первые изображения
КТ

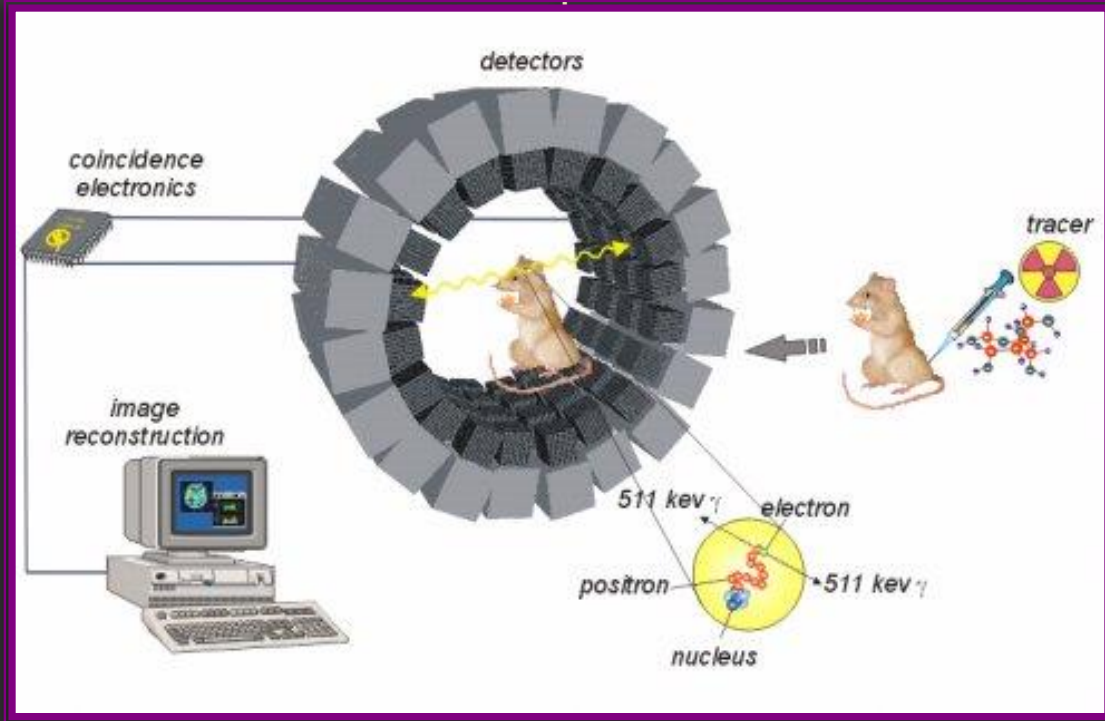
- Используется с 1972 г. (Нобелевская премия 1979 г.)
- Основной принцип – рентгеновское излучение;
- Дает точную морфологическую картину;
- Не определяет активность мозга.

Мультиспиральная компьютерная томография — МСКТ
(до 160 срезов за оборот сканера)



3D изображения
КТ
сегодня

2. Сканирование Позитронно-эмиссионная томография МОЗГА (ПЭТ)



омография



«Albira»
Bruker, США

Радиофармпрепараты:

углерод C11 ($T_{1/2} = 20.4$ мин)

азот N13 ($T_{1/2} = 9.96$ мин)

кислород O15 ($T_{1/2} = 2.03$ мин)

фтор-F18 ($T_{1/2} = 109,8$ мин.)

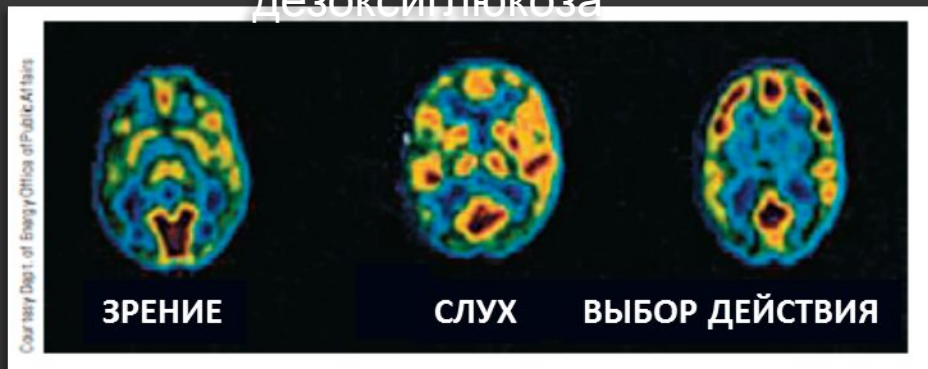
F18 -

дезоксиглюкоза

Принцип: регистрация квантов света;
Уступает КТ по описанию структуры;
Определяет функциональную активность.

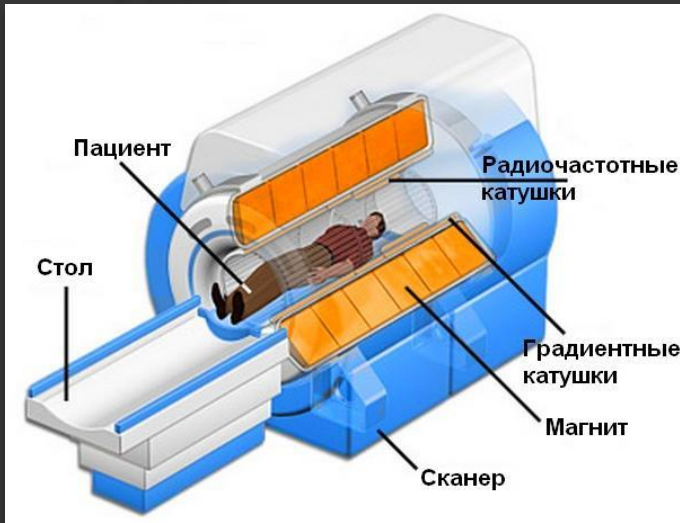
Область применения:

неврология, кардиология, онкология



ПЭТ-КТ позитронно-эмиссионная томография высвечивает области с повышенным обменом веществ, а КТ определяет их точное позиционирование

СКАНИРОВАНИЕ 3. Магнитно-резонансная томография (МРТ) = ЯМР МОЗА



Впервые предложен в 1973 г.,
Нобелевская премия 2003 г. (П. Ротербур, П.
Мэнсфилд)

Максимально информативный, безопасный,
неинвазивный, высокочувствительный
метод современной диагностики;

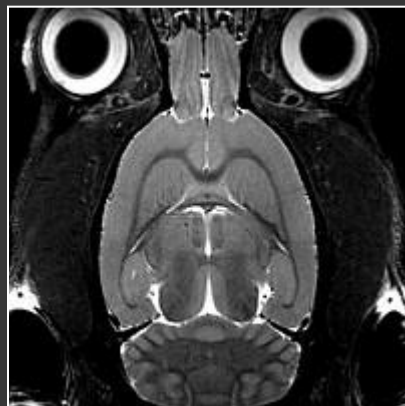
Не требует введения дополнительных веществ,
основан на природных свойствах ядер;

В равной степени подходит для твердых и
мягких тканей;

Есть возможность усиления сигнала;
МР-диффузия, МР-ангиография, МР-
спектроскопия



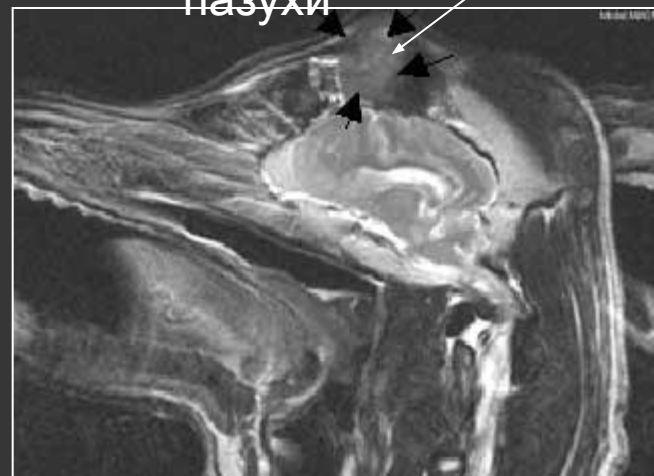
МРТ на ЖИВОТНЫХ



МР-снимок мозга
крысы



Опухоль лобной
пазухи



МР-снимок мозга
собаки

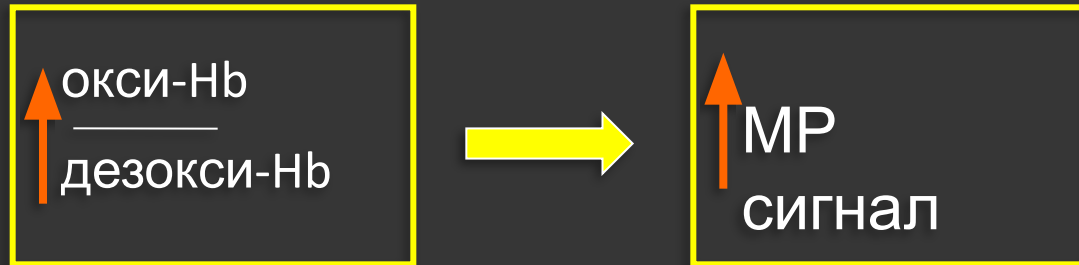
BioSpec 117/16 USR, Bruker, США
11,7 Тесла ИЦиГ СОРАН
(магнитное поле земли 5×10^{-5} Тл)



СКАНИРОВАНИЕ

МОЗГА

4. Функциональная МРТ (fMRI), BOLD (blood oxygen level detection)

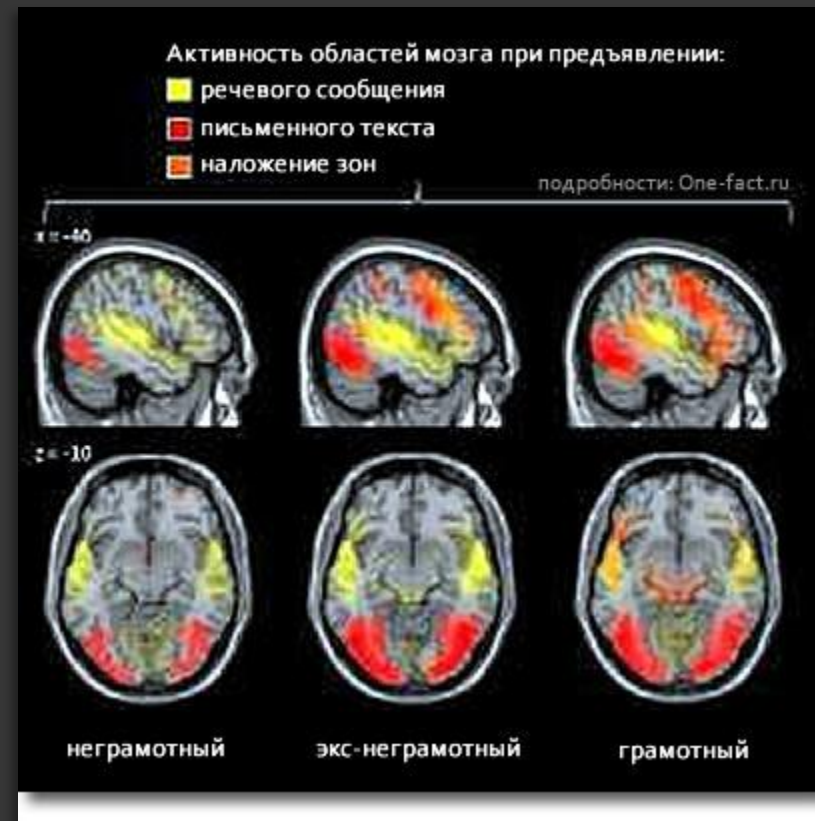


Все преимущества МРТ +

- Возможность оценки функциональной активности мозга;
- Принцип метода – оценка интенсивности кровотока в областях нейрональной активации;
- Единица измерения - воксель (3D пиксель).

5. ТЕРМОЭНЦЕФАЛОСКОПИЯ

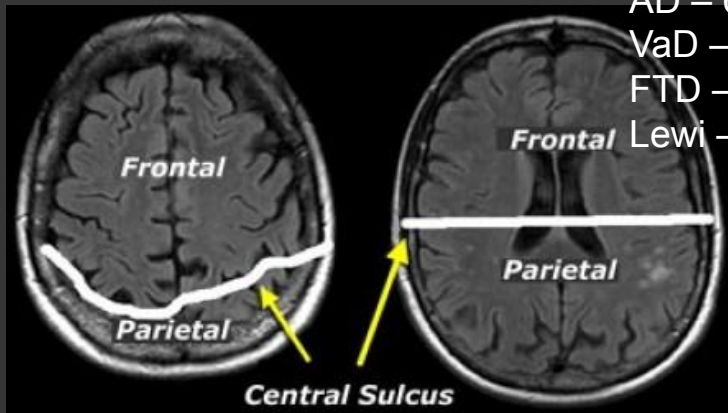
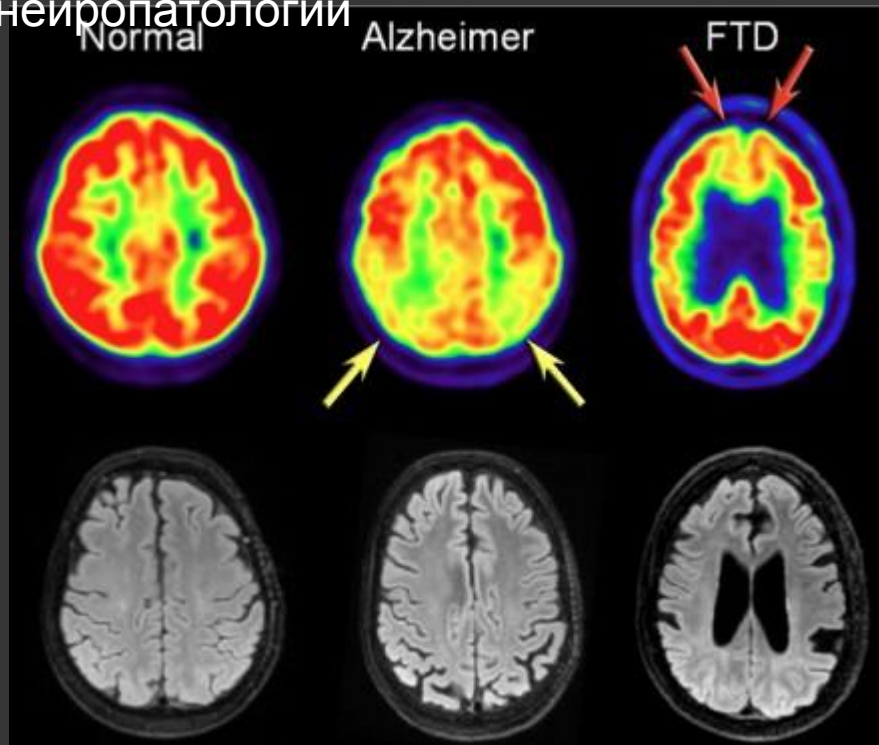
измерение локального метаболизма и кровотока по теплопродукции по фиксации инфракрасных лучей в диапазоне 3-5 и 8- 14 мкм с помощью тепловизора; разработан Шевелевым И.А. (1989 г.) в Институте ВНД (Москва).



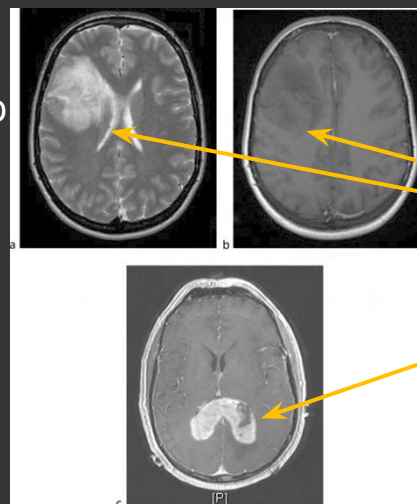
MR findings in Dementia

	AD	VaD	FTLD	Lewi*
Hippocampal atrophy	+++	++	++	-
Temporal atrophy	++	+	+++	-
Frontal atrophy	-	+	+++	-
Parietal atrophy	++	+	-	-
Lacunae	-	+++	-	-
WML's	-	+++	-	-
Strategic infarcts	-	+++	-	-

ПЭТ - гипометаболизм при нейропатологии



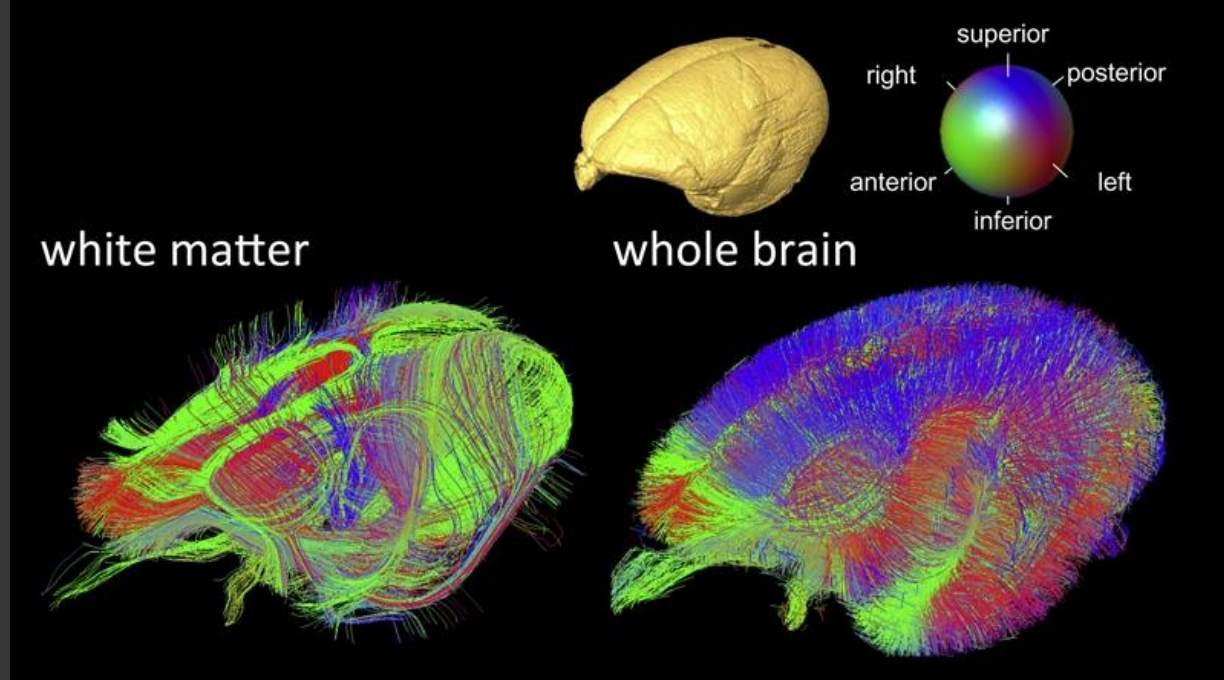
AD – болезнь Альцгеймера ;
 VaD – подкорковая деменция;
 FTD – лобно-височная дистрофия
 Lewi – болезнь Леви



МРТ
 ГЛИОМЫ

6. Метод диффузионной тензорной магнитно-резонансной томографии с трактографией основан на измерении величины и направления диффузии молекул воды в веществе мозга. Движение молекул воды вдоль волокон белого вещества происходит гораздо активнее, чем в перпендикулярных направлениях.

Метод позволяет оценить степень поражения мозга, создание 3D реконструкции волокон белого вещества, а также обнаружить и оценить повреждение нервных связей, установить корреляцию между поражением нейронных связей и неврологическим дефицитом в соответствующей системе.

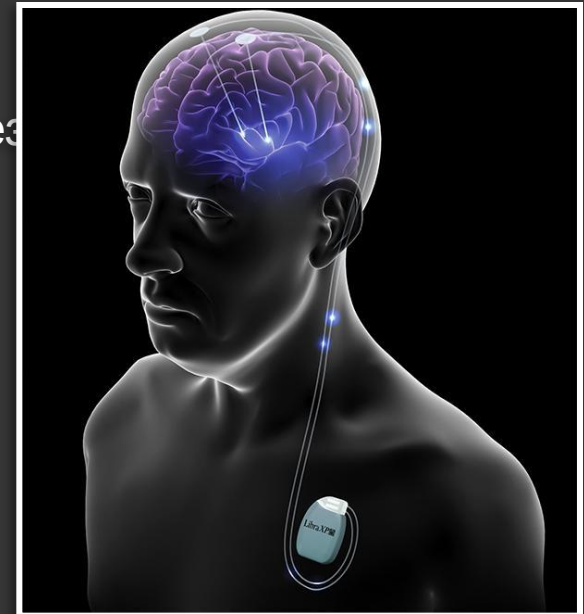


Волокнистая структура белой материи и областей целого мозга мартышки была реконструирована в виртуальном пространстве с использованием данных, полученных с использованием метода DTI-MRI с трактографией.

Глубокая стимуляция мозга

(Deep Brain Stimulation, DBS):

- стимуляция электротоком различных зон мозга через имплантированные электроды;
- электроды соединены с управляющим блоком;
- показан терапевтический эффект при Паркинсонизме, треморе, дистонии, болезни Альцгеймера, нарушении памяти;
- название – ошибочно, т.к. активность мозга не активируется, а подавляется в результате гиперполяризации.
- эффект обратим (слепая хирургия).

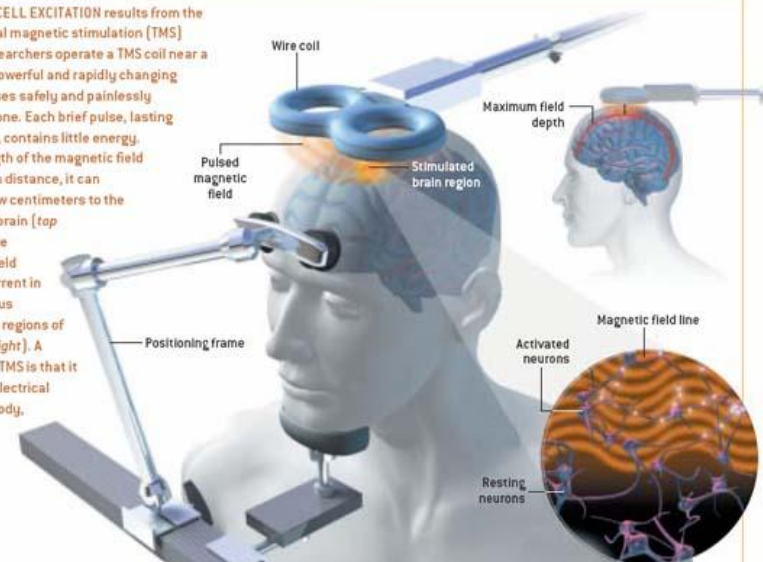


Внутриголовная магнитная стимуляция:

- воздействие электромагнитным полем в течении миллисекунд;
- возбуждение на глубину 2-3 см;
- используется с 1985г.;
- показана положительная динамика при терапии депрессии;
- не требует подключения к току.

TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION

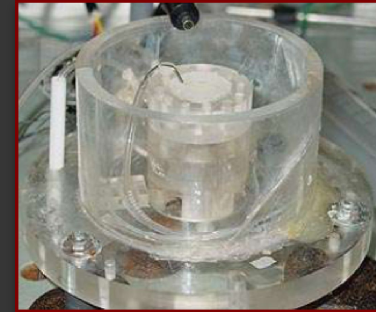
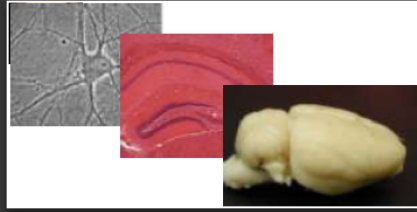
LOCALIZED BRAIN-CELL EXCITATION results from the use of a transcranial magnetic stimulation (TMS) machine. When researchers operate a TMS coil near a subject's scalp, a powerful and rapidly changing magnetic field passes safely and painlessly through skin and bone. Each brief pulse, lasting only microseconds, contains little energy. Because the strength of the magnetic field falls off rapidly with distance, it can penetrate only a few centimeters to the outer cortex of the brain (top right). On arrival, the precisely located field induces electric current in nearby neurons, thus activating targeted regions of the brain (bottom right). A principle benefit of TMS is that it requires no direct electrical connection to the body, as is required for electroconvulsive therapy.



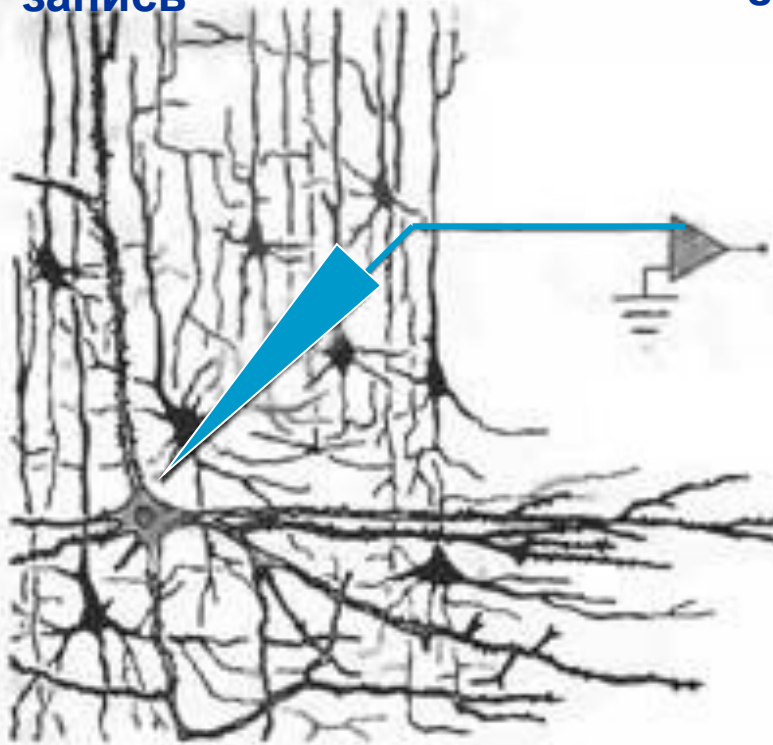
Клеточная электрофизиология

in vivo,

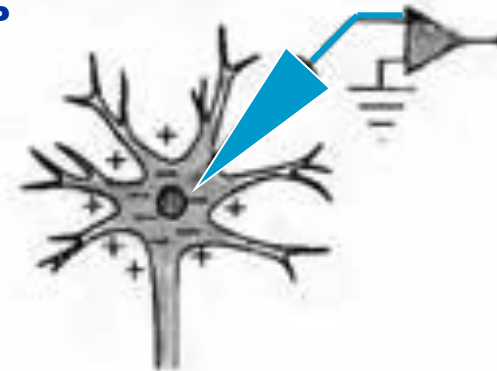
на культуре клеток,
срезах мозга



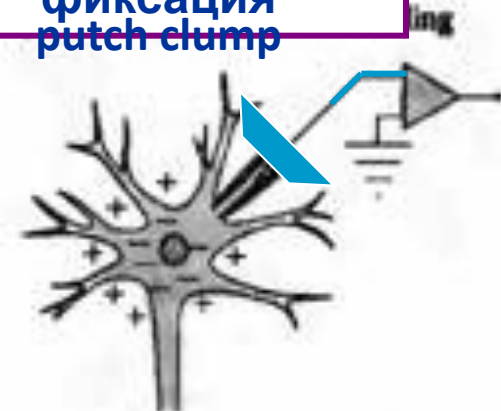
**Экстраклеточная
запись**



**Внутриклеточная
запись**



**Локальная
фиксация
patch clamp**



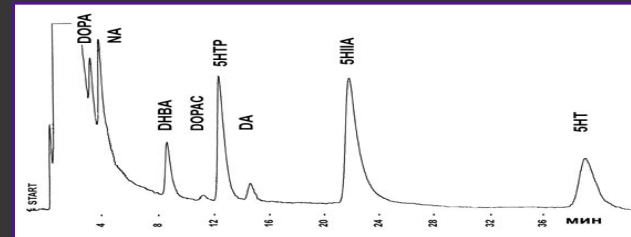
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЗГА

Методы ^{in vitro} биохимического анализа:

- ✓ нейрохимия (in vitro – HPLC; in vivo – микродиализ);
- ✓ активность ферментов синтеза и деградации медиаторов;
- ✓ плотность рецепторов (binding).



Один из наиболее распространенных и современных жидкостных хроматографов фирмы Shimadzu



Пример хроматограммы образца мозга

Методы морфологического и структурного анализа

- ✓ световая
- ✓ конфокальная
- ✓ электронная

микроскопия.



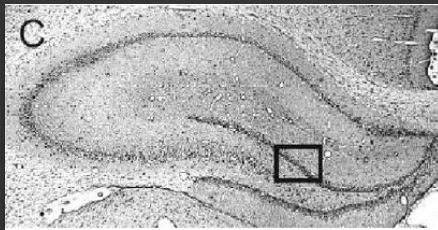
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЗГА

in vitro

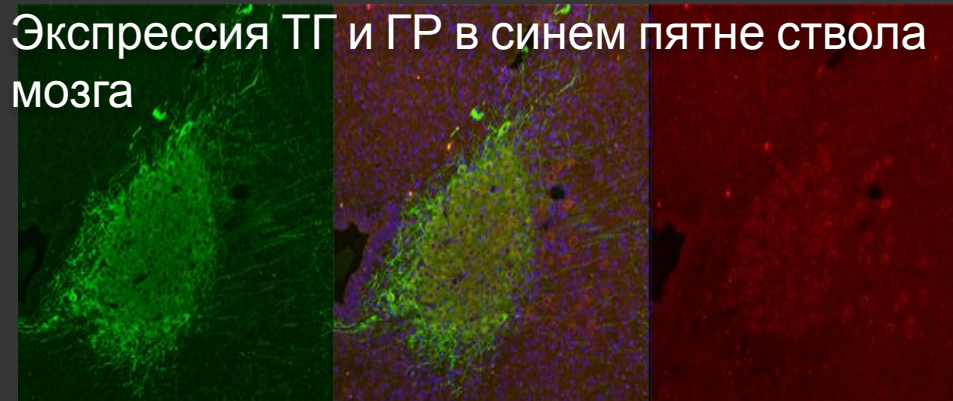
Методы молекулярно-биологические:

- ✓ экспрессия генов:
 - гибридизация *in situ*;
 - ПЦР в реальном времени

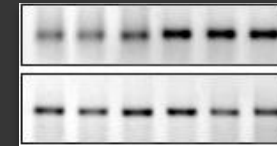
- ✓ экспрессия белков:
 - иммуногистохимия;
 - вестерн-блоттинг.



Экспрессия ТГ и ГР в синем пятне ствола мозга



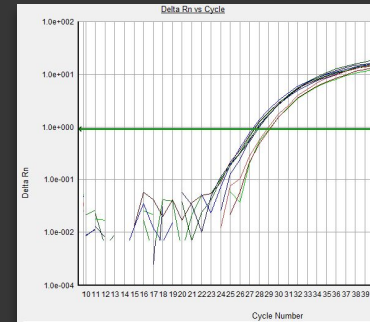
Semi-quantitative RT-PCR



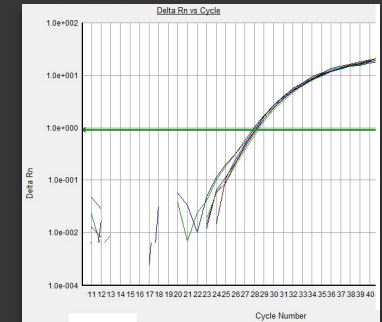
Gene X

beta-actin

Real-time RT-PCR



Gene X

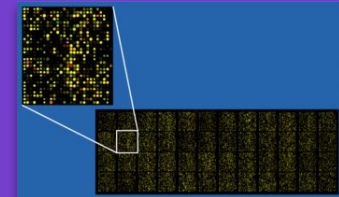


beta-actin

Одновременный анализ

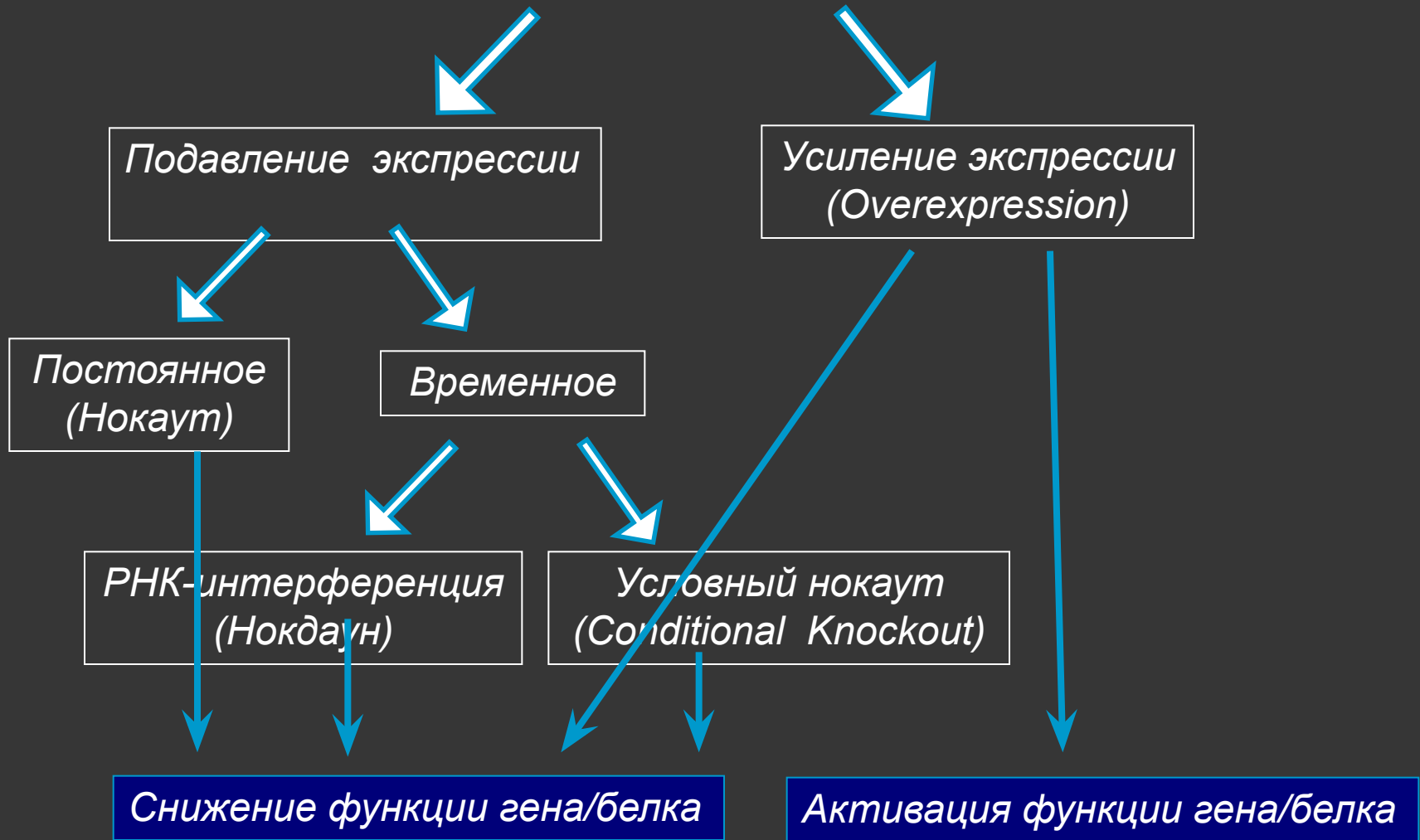
множества генов:

1. Микрочипы

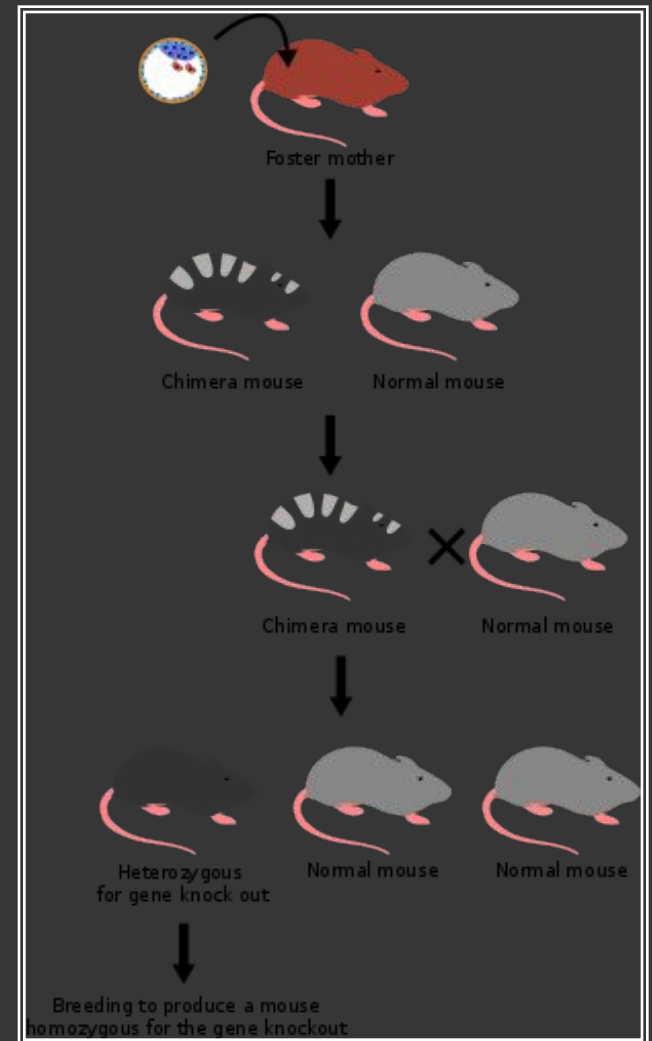
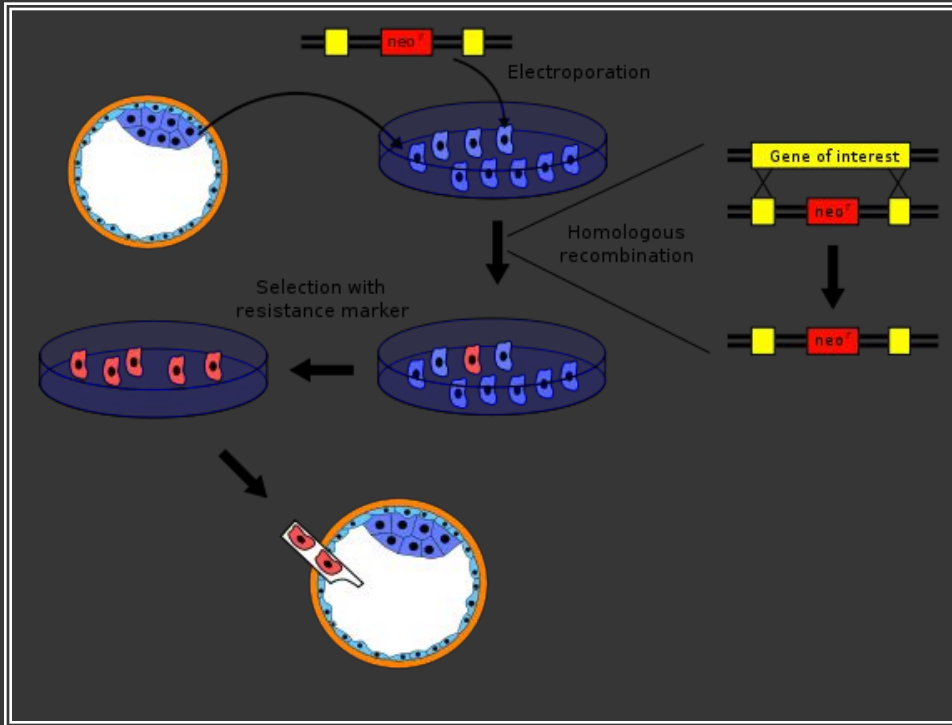


2. RNA-sequencing (Illumina, Solid)
(NGS – Next Generation Sequencing)

Модификации экспрессии генов

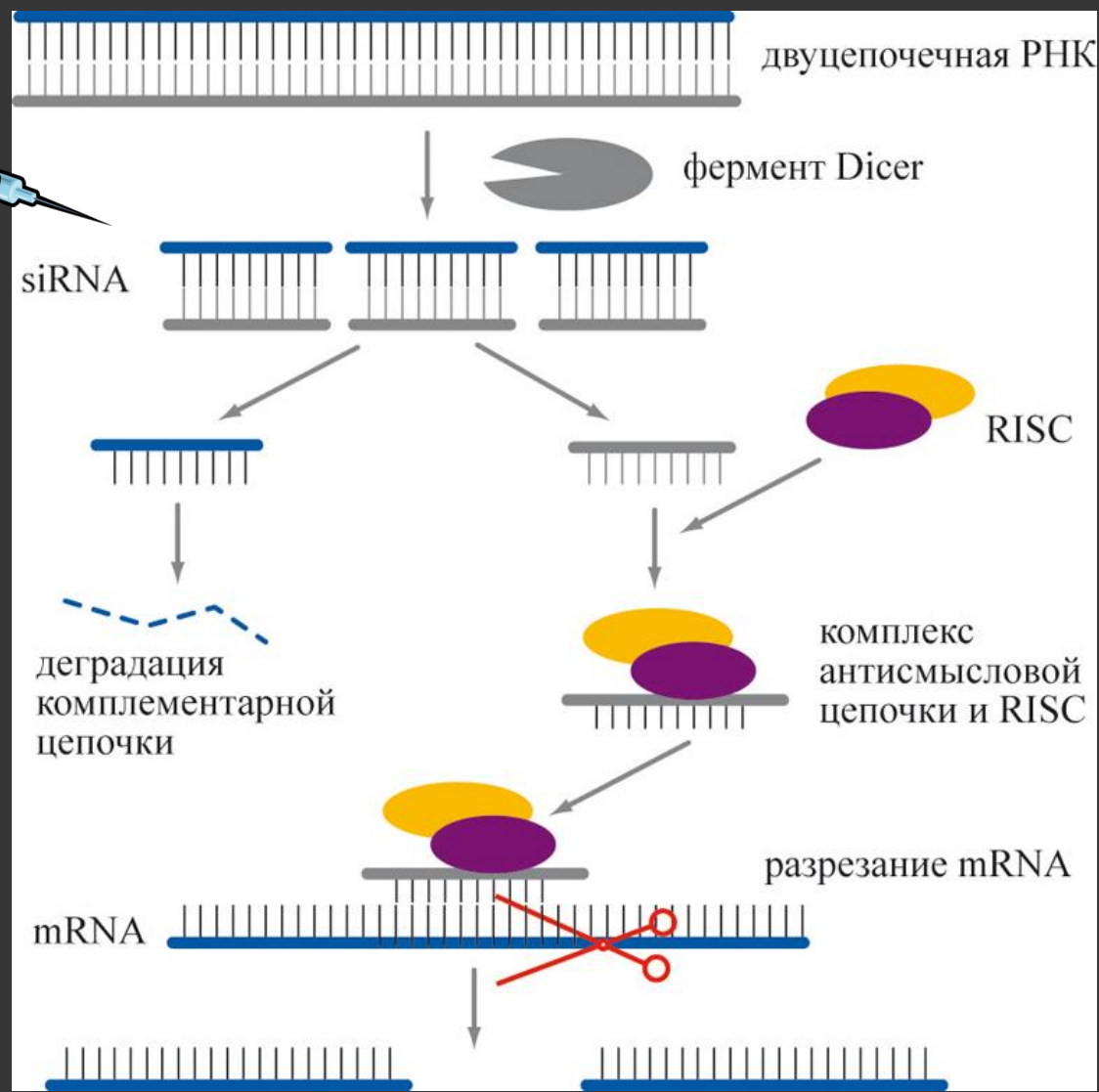


СОЗДАНИЕ НОКАУТА



Механизм РНК-интерференции

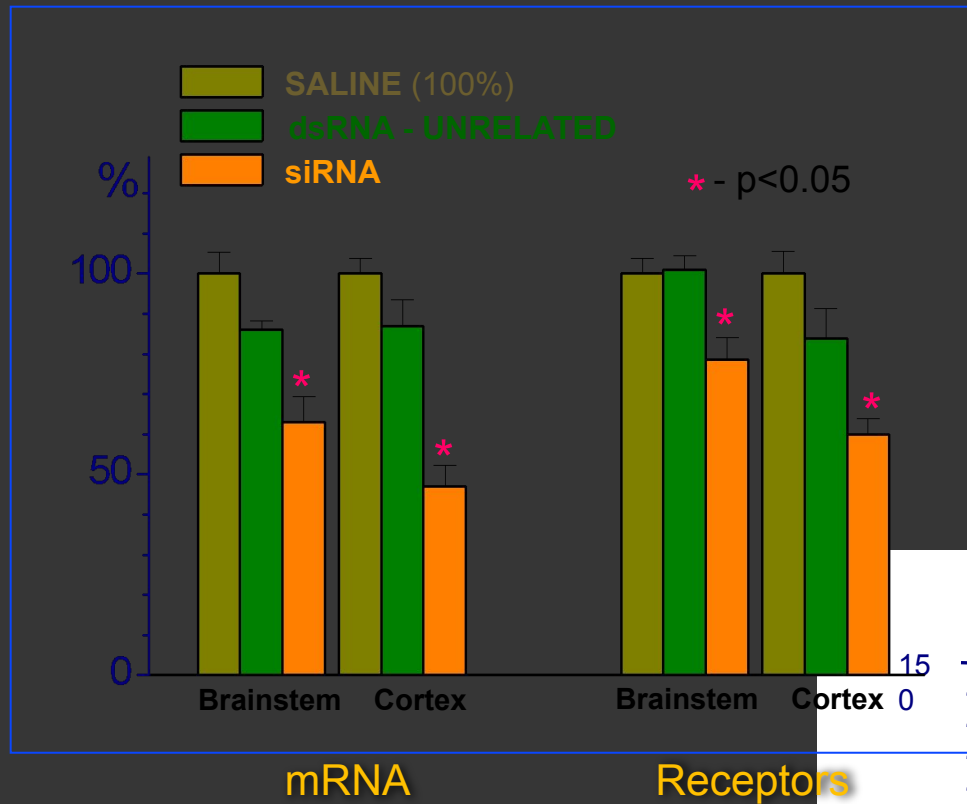
(Нобелевская премия 2006
К. Файер, Е. Мелло)



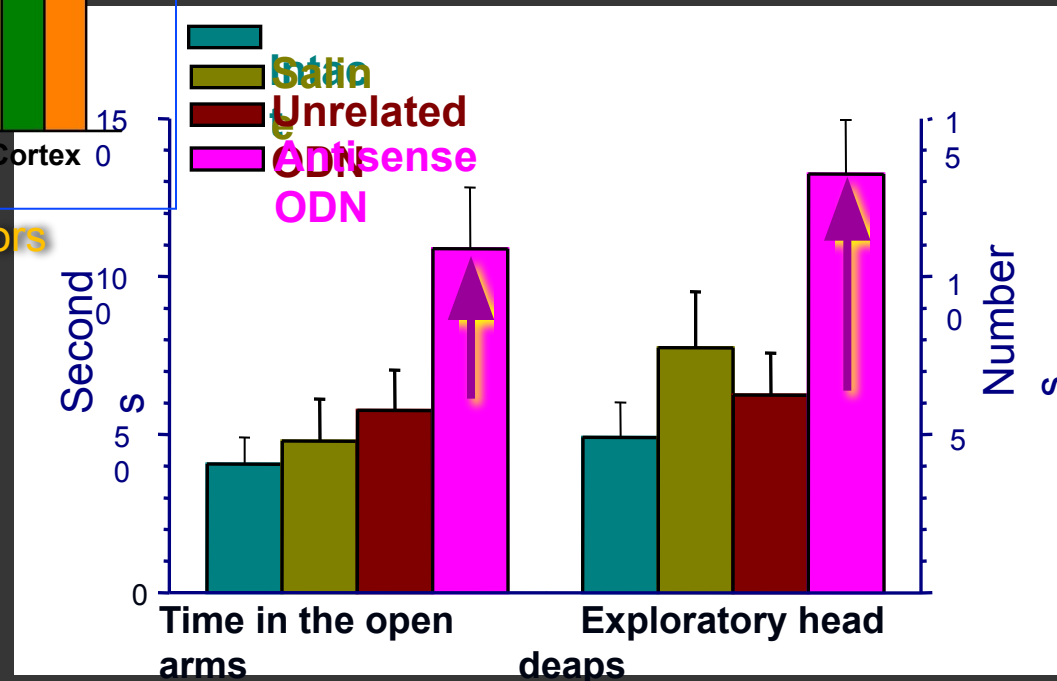
*RNA-Induced
Silencing Complex*

Блокировка транскрипции и => трансляции

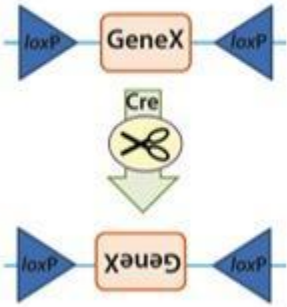
Inhibition of $\alpha 2A$ -ARs expression by RNA interference *in vivo* in the brain of 5-day old rats



Behavior of adult male rats in elevated plus-maze after knock-down of brain $\alpha 2A$ -ARs during neonatal life



Inversion



Deletion

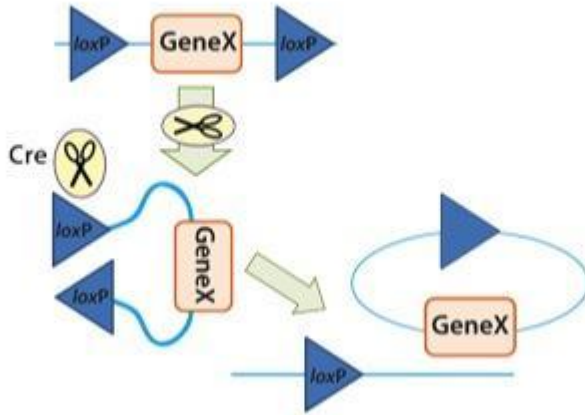
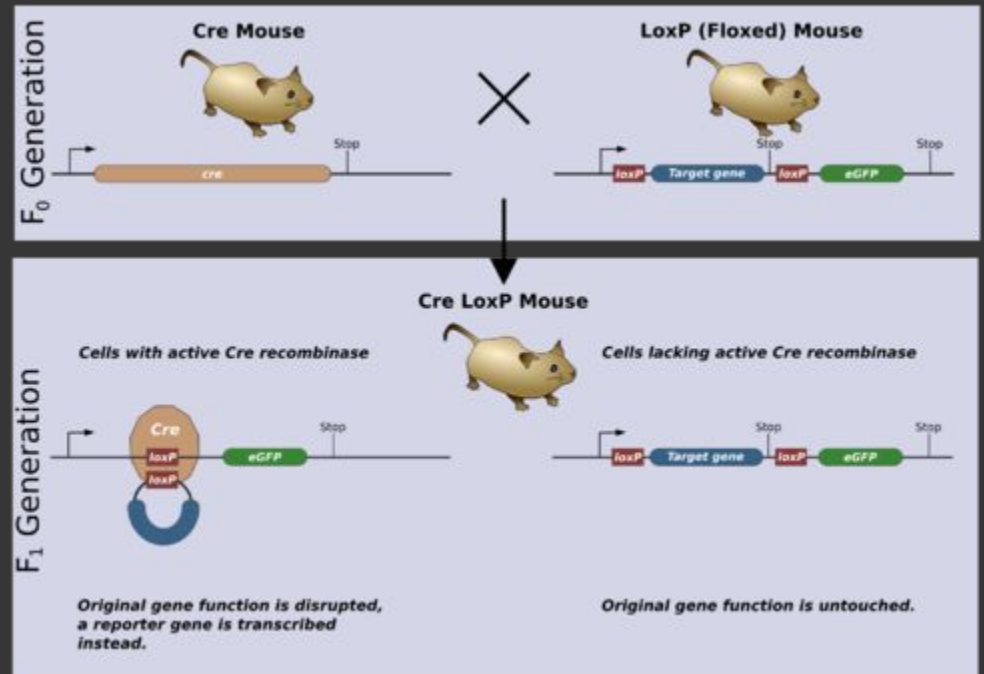


Image by Larissa Haliw

CRE-LoxP system

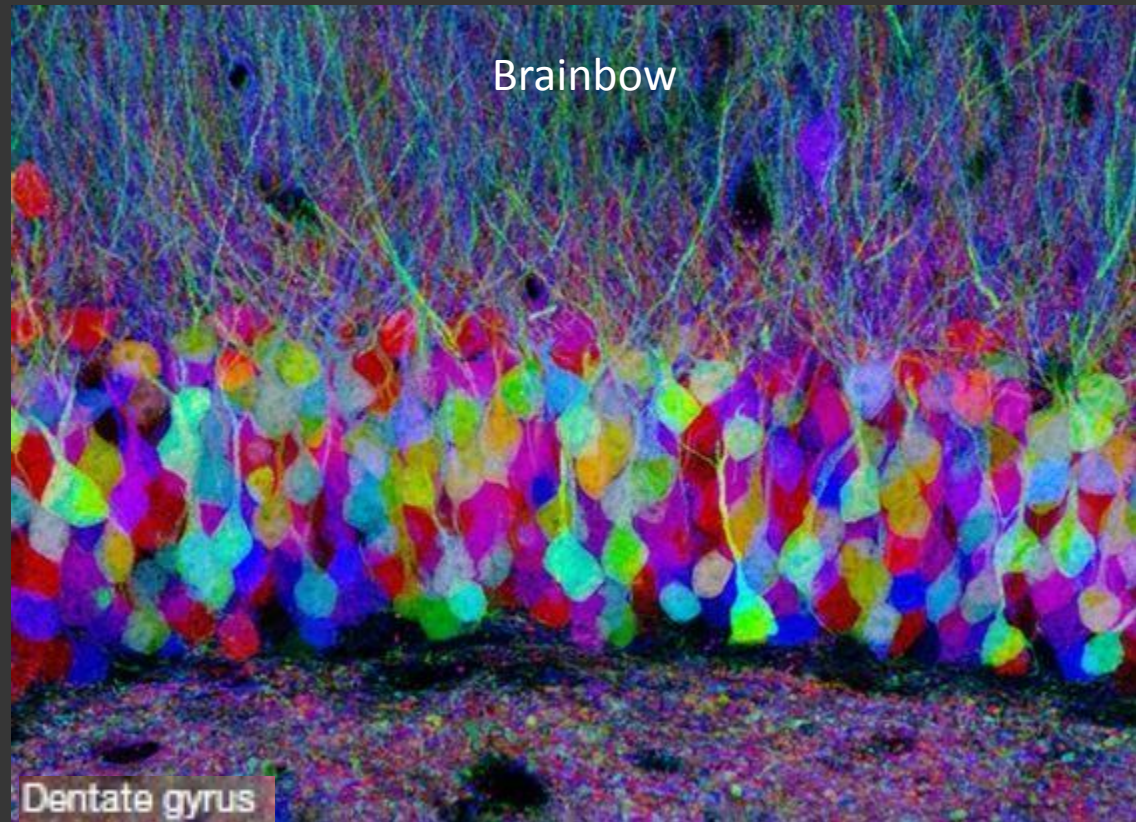


Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system

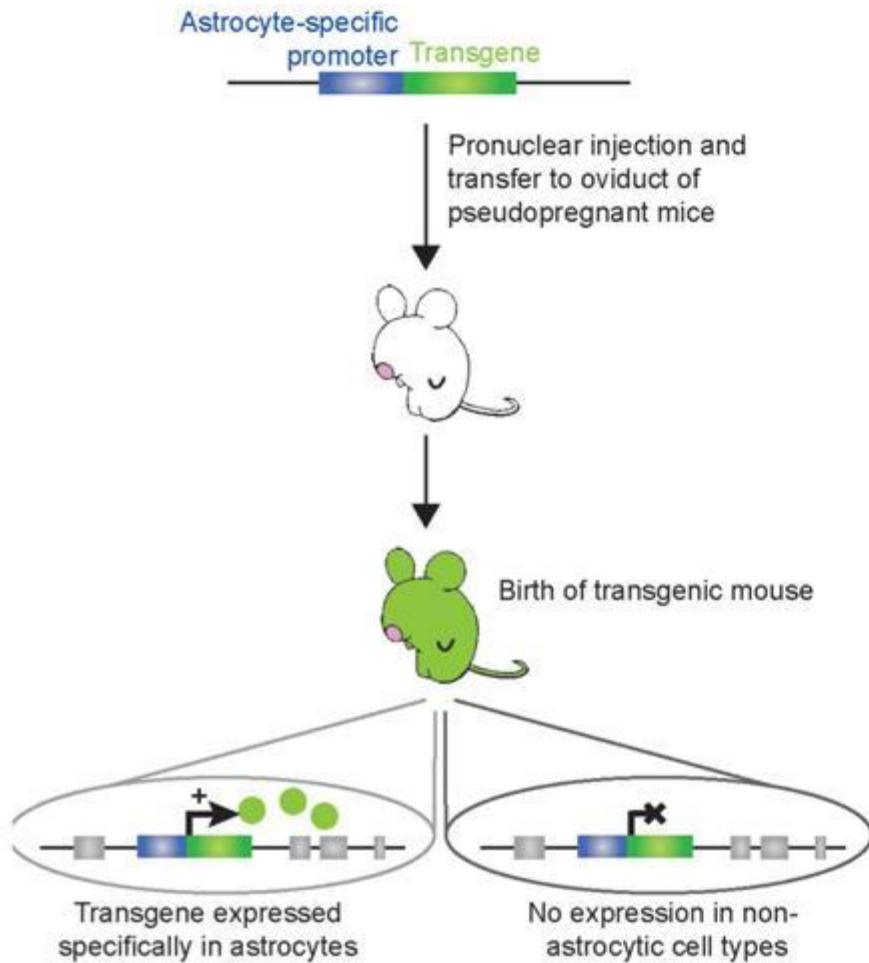
Jean Livet¹, Tamily A. Weissman¹, Hyuno Kang¹, Ryan W. Draft¹, Ju Lu¹, Robyn A. Bennis¹, Joshua R. Sanes¹ & Jeff W. Lichtman¹

a XFP combinations

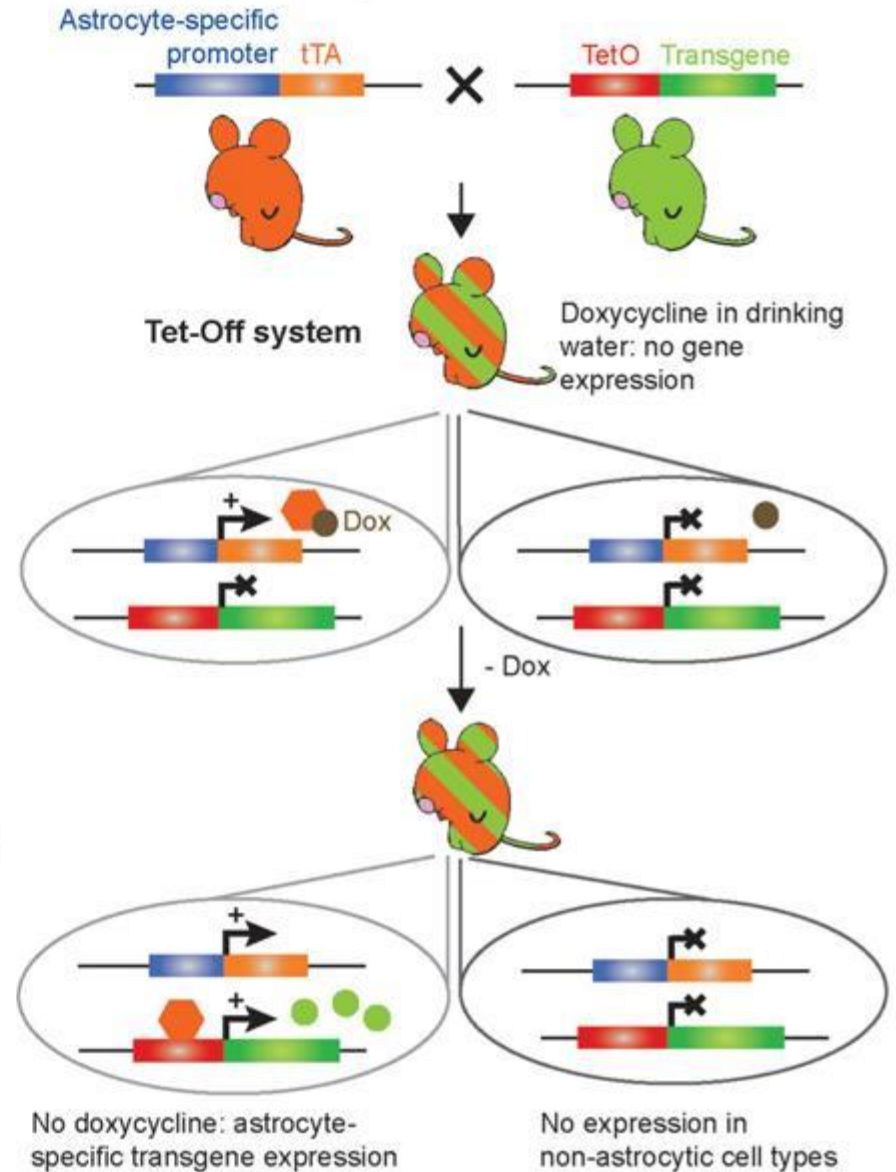
Outcome for each copy			Resulting colour
1	2	3	
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey



A Conditional transgenic



B Inducible transgenic



ОПТОГЕНЕТИКА

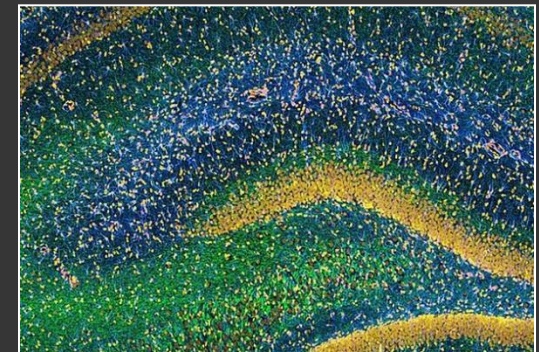
*«Одна из основных задач науки —
измерить то, что измеримо,
и сделать измеримым то, что
ещё не измерено»
Г. Галилей*



**Карл Диссерот (в центре)
с К. Шенойем и Д.
Хендерсоном,
Стэнфорд, Калифорния**



*«..Оптогенетика -..это подарок Бога
нейрофизиологам»
(Р. Десемон,
директор Института мозга, МТИ)*



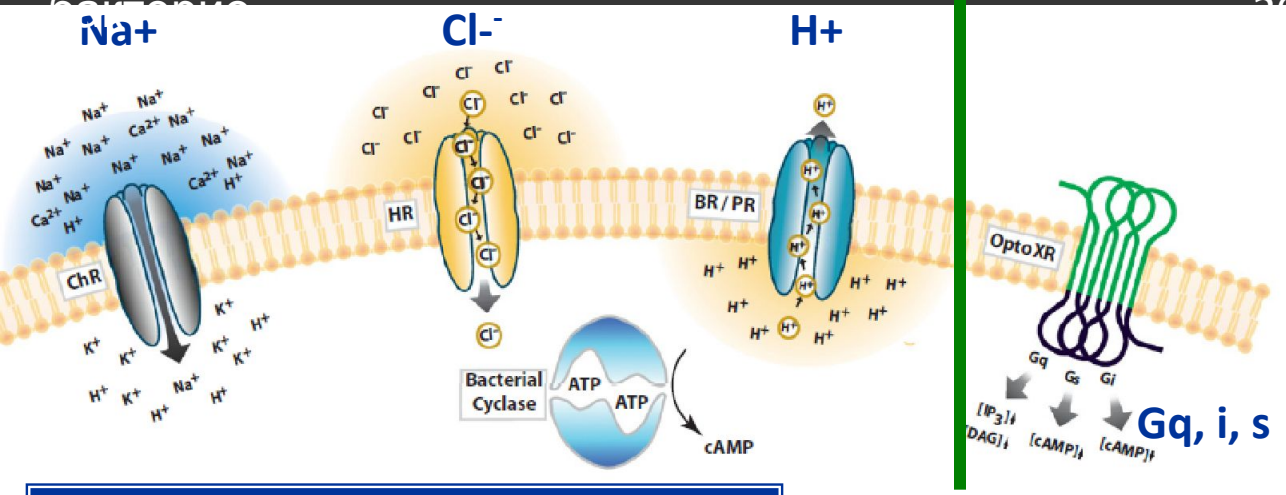
Нейроны головного мозга;
оранжевым окрашены ядра клеток,
синим — аксональные отростки (Фото Thomas Deerinck,

РОДОПСИНЫ

каннало-

гало-

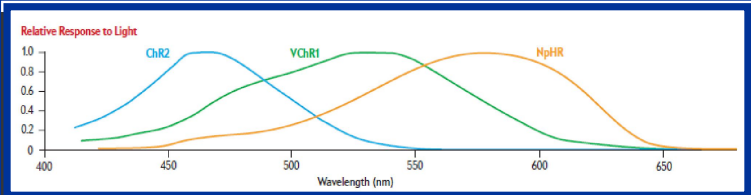
GPCR



Открытие родопсинов:
 1971 - бактериальный
 1977 - галородопсин
 2002 - каналородопсин

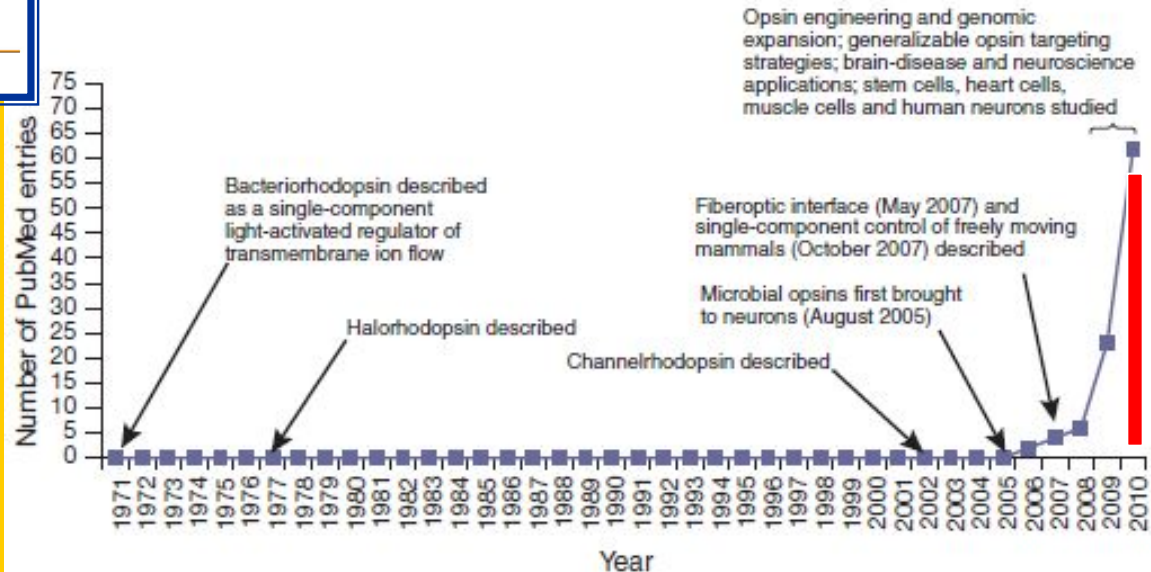
2005 – начало
Оптогенетики

(Nature Methods, 2010)



Число публикаций

2012	187
2013	347
2014	413
2015	878
2016	926



ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ТЕХНОЛОГИИ ОПТОГЕНЕТИКИ

STEP 1

Piece together genetic construct.

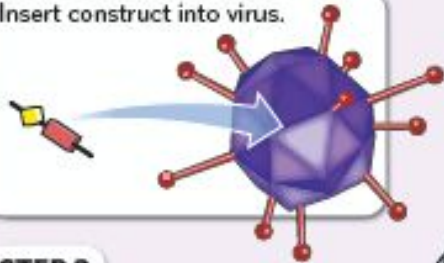


Promoter
to drive
expression

Gene encoding opsin
(light-sensitive
ion channel)

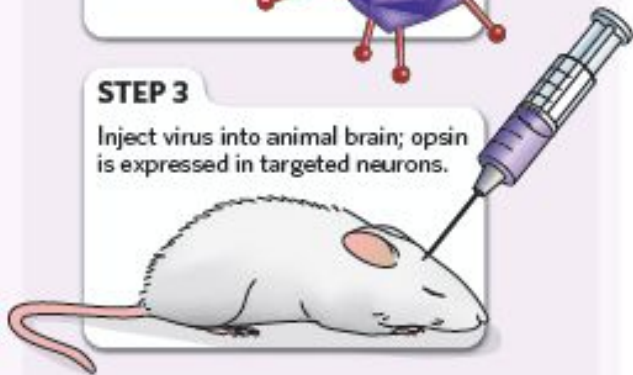
STEP 2

Insert construct into virus.



STEP 3

Inject virus into animal brain; opsin is expressed in targeted neurons.



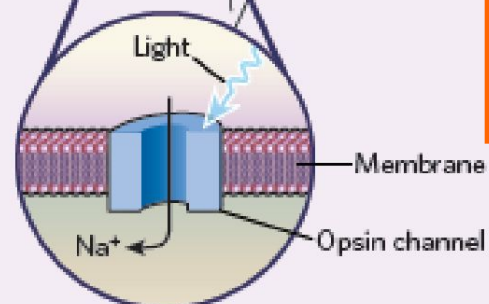
STEP 4

Insert 'optrode', fibre-optic cable plus electrode.



STEP 5

Laser light of specific wavelength opens ion channel in neurons.



STEP 6

Record electrophysiological and behavioural results.



**Основное
преимущество
оптогенетики:**

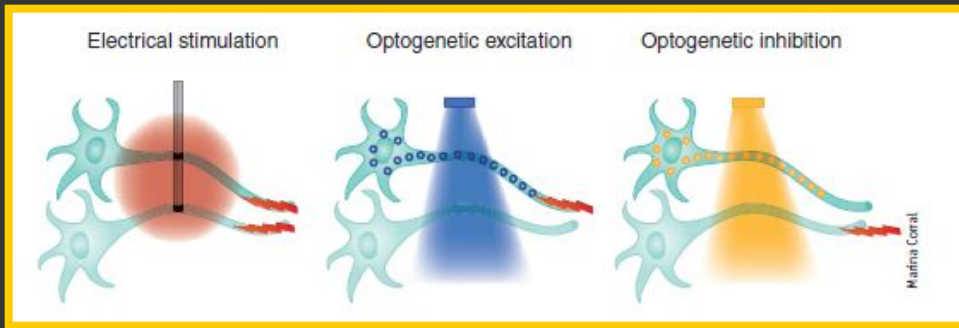
- высокая избирательность;
- быстрота ответа.

**Основная проблема
оптогенетики:**

доставка опсинов в клетку

- вирусы (AAV), лентивирусы;
- Cre-Lox рекомбинация
- электропорация in utero

} МЫШИ



Может дополнять регистрацию электрической активности методом fMRI.

Применение оптогенетики:

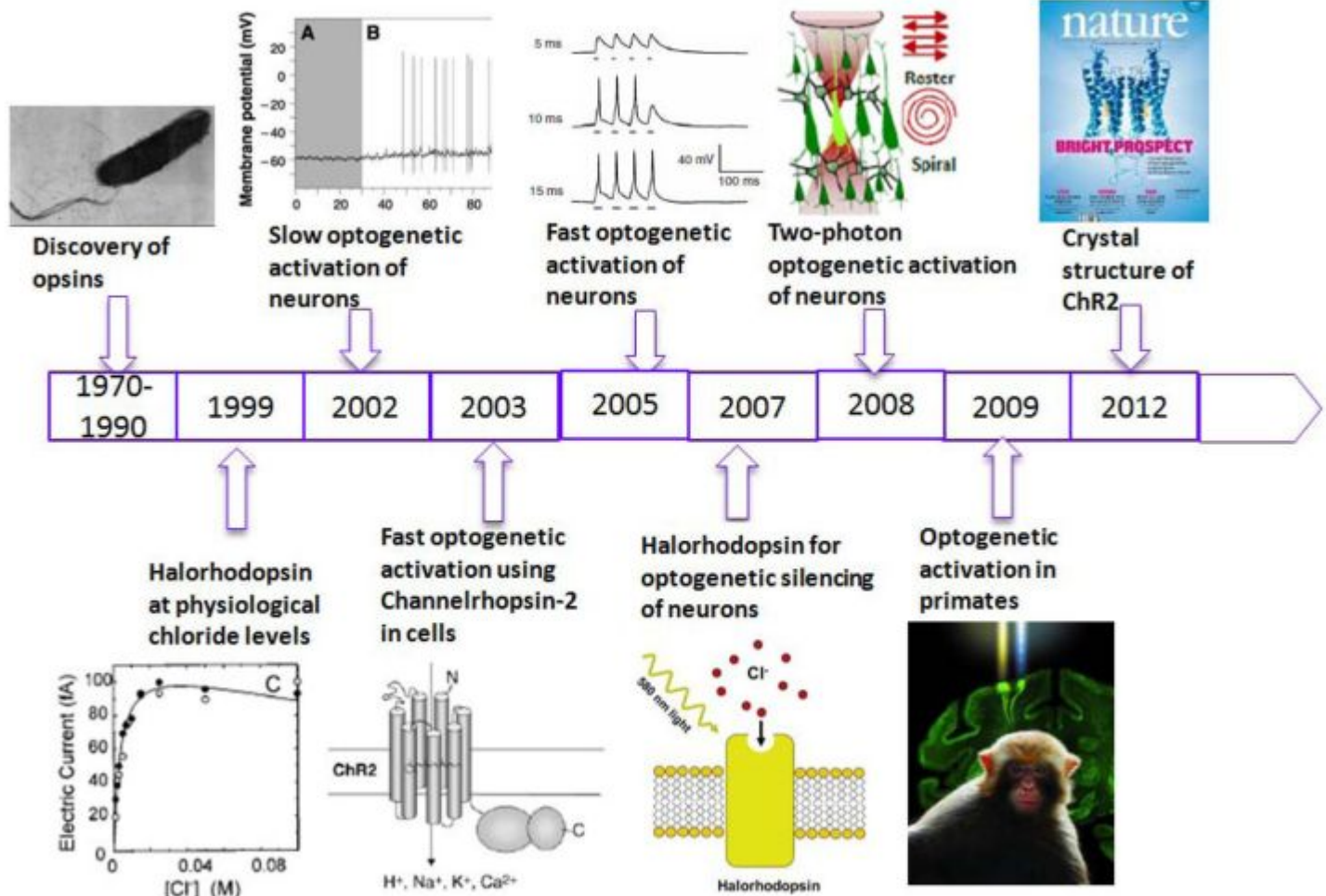
- активация нейронов → нейронные связи → поведение ;
- поведение → активация нейронов → нейронные связи; для исследования механизмов восприятия, подкрепления, обучения.

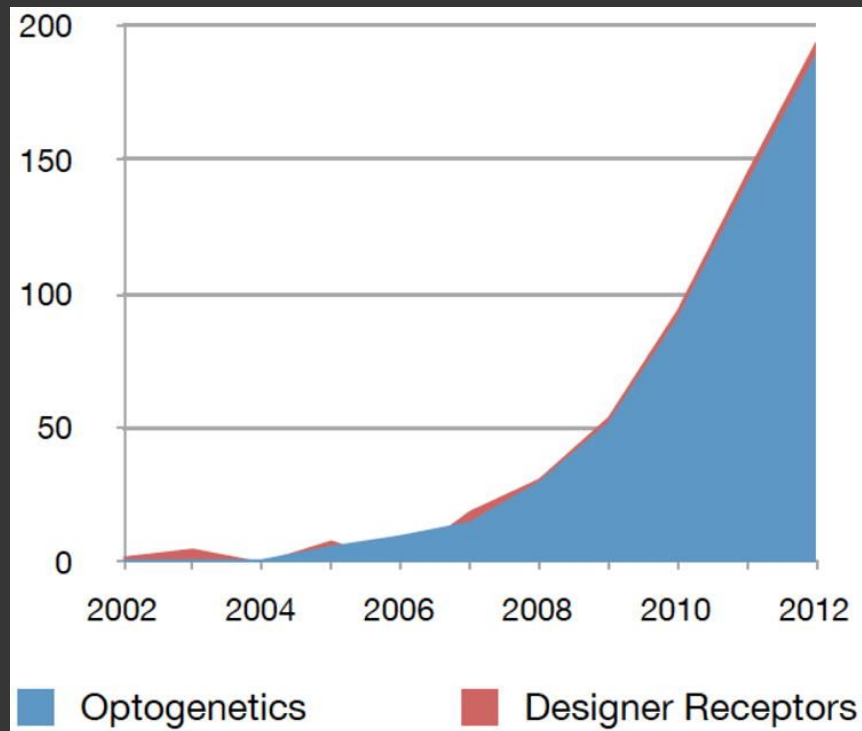
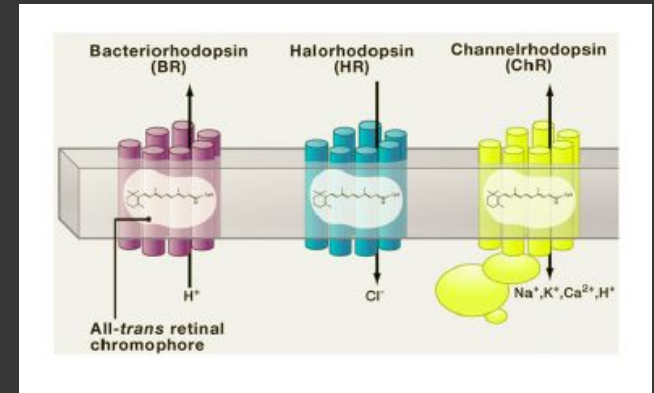
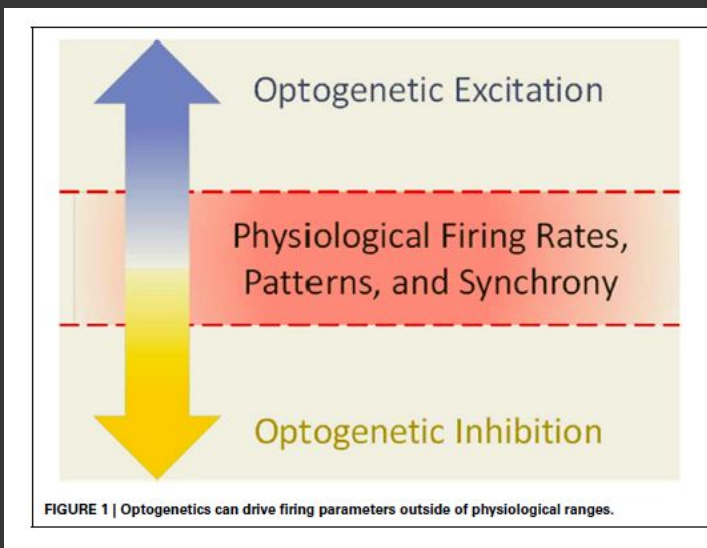
Объекты оптогенетики:

C. elegans, дрозофила, данио-рерио
мыши, крысы, приматы, человек

*...Для достижения успеха надо ставить цели несколько выше, чем те, которые в настоящее время могут быть достигнуты...
Макс Планк*

История развития Оптогенетики

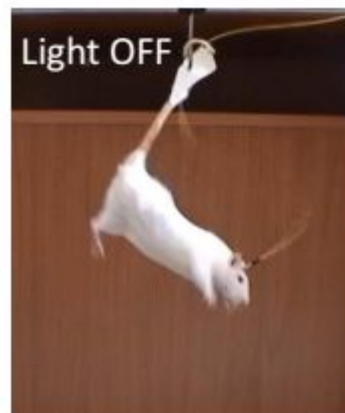
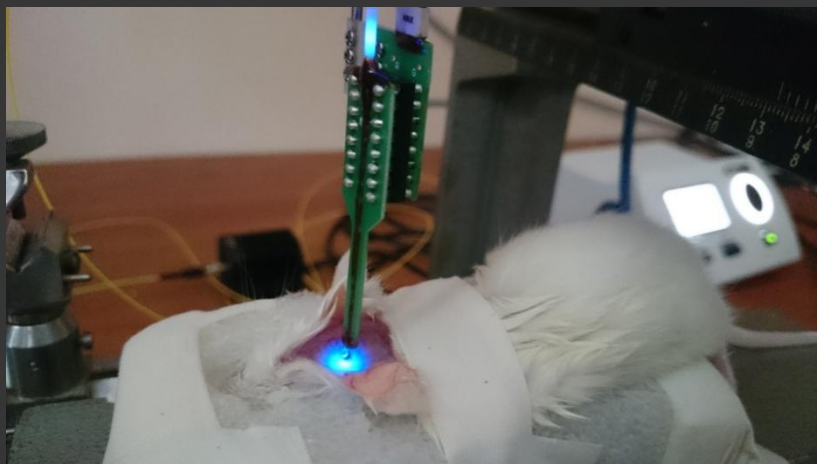




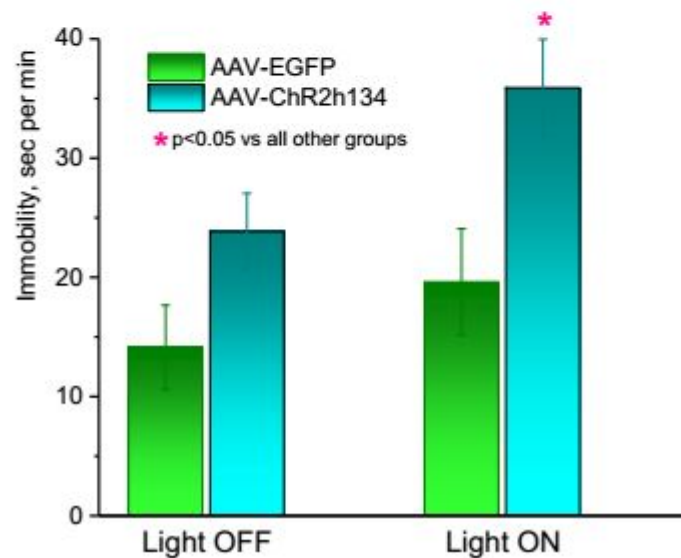
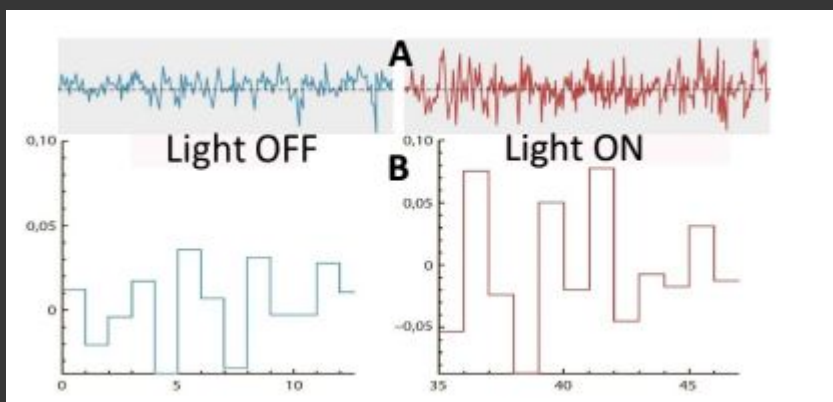
Applications:

- State (sleep-wake, anesthesia)
- Sensory detection/discrimination
- Perception
- Network activity/patterns
- Learning
- Memory
- Decision
- Habit/deliberation
- Reward processing (feeding/addiction)
- Aversion
- Motivation
- Depression
- Alzheimer's/Parkinson's treatments
- Autonomic regulation
- Intracellular signalling mechanisms

ОПТОГЕНЕТИКА В РОССИИ



Illumination of the hippocampal neurons with blue light significantly affected behavior of photosensitive animals.





Optogenetics, physiology, and emotions

Alexxai V. Kravitz^{1*} and Antonello

¹ Diabetes, Endocrinology, and Obesity Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

² National Institute of Drug Abuse, Baltimore, MD, USA

*Correspondence: lex.kravitz@nih.gov

Edited by:

Mary K. Lobo, University of Maryland School of Medicine

Reviewed by:

Melissa R. Warden, Cornell University, USA

Dipesh Chaudhury, Mount Sinai School of Medicine, USA

Keywords: optogenetics, emotions, anxiety, depression



Optogenetics

Sarah C. P. Williams^a and Karl Deisseroth^b

^aScience Writer

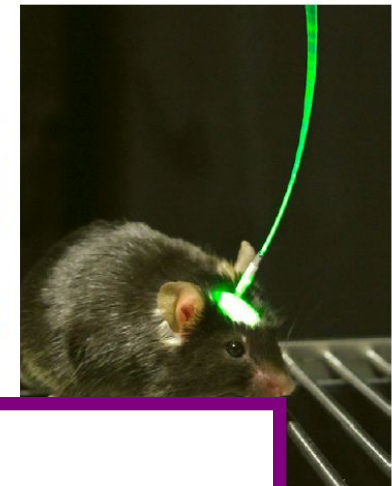
^bDepartment of Bioengineering and Psychiatry and Department of Behavioral Sciences, Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, Stanford, CA 94305

A story spanning four decades that began with one of the most basic of science questions—how microscopic organisms sense light—has changed the way researchers approach brain science. Turning on and off neurons in the brains of mice, by coopting the microbial sensors, has become almost as easy as flicking a light switch.

In the past, determining which collections of neurons in the brain carry out which functions—mediating behaviors, storing

of those in the field isn't to genetically engineer humans to have opsins in their brains and control people's behaviors with light, but rather to use the optical control of neurons in model organisms to reveal how the brain works.

Early behavioral applications of the technique induced mice to act in certain, easily observable ways: to awaken (8), or to turn in a circle when the light shone (12), for example. In the past decade, however, optogenetics has helped answer many clinically relevant



Published in final edited form as:

Brain Res. 2013 May 20; 1511: 1–5. doi:10.1016/j.brainres.2013.01.026.

Recent advances in optogenetics and pharmacogenetics

Gary Aston-Jones^{a,*} and Karl Deisseroth^b

^aDepartment of Neurosciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425

^bDepartments of Bioengineering and Psychiatry, Stanford University, Stanford, California 94305, USA

Behavioral/Cognitive

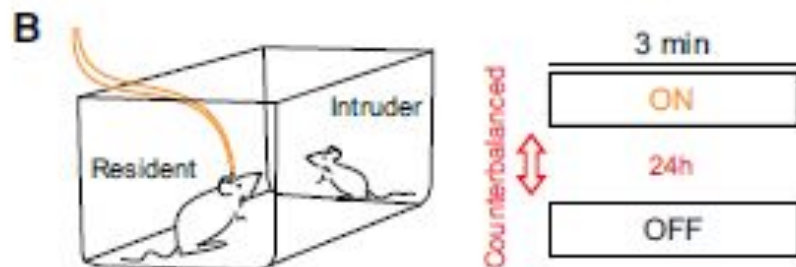
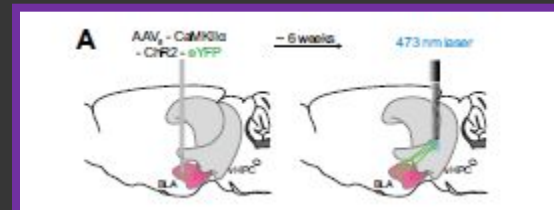
Amygdala Inputs to the Ventral Hippocampus Bidirectionally Modulate Social Behavior

Ada C. Felix-Ortiz and Kay M. Tye

Picower Institute for Learning and Memory, Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139

Impairments in social interaction represent a core symptom of a number of psychiatric disease states, including autism, schizophrenia, depression, and anxiety. Although the amygdala has long been linked to social interaction, little is known about the functional role of connections between the amygdala and downstream regions in noncompetitive social behavior. In the present study, we used optogenetic and pharmacological tools in mice to study the role of projections from the basolateral complex of the amygdala (BLA) to the ventral hippocampus (vHPC) in two social interaction tests: the resident–juvenile–intruder home-cage test and the three chamber sociability test. BLA pyramidal neurons were transduced using adeno-associated viral vectors (AAV₅) carrying either channelrhodopsin-2 (ChR2) or halorhodopsin (NpHR), under the control of the CaMKII α promoter to allow for optical excitation or inhibition of amygdala axon terminals. Optical fibers were chronically implanted to selectively manipulate BLA terminals in the vHPC. NpHR-mediated inhibition of BLA–vHPC projections significantly increased social interaction in the resident–juvenile intruder home-cage test as shown by increased intruder exploration. In contrast, ChR2-mediated activation of BLA–vHPC projections significantly reduced social behaviors as shown in the resident–juvenile intruder procedure as seen by decreased time exploring the intruder and in the three chamber sociability test by decreased time spent in the social zone. These results indicate that BLA inputs to the vHPC are capable of modulating social behaviors in a bidirectional manner.

Key words: amygdala; ChR2; hippocampus; NpHR; optogenetics; social



Оптостимуляция или оптоингибирование одних и тех же нейронов в миндалине запускают

РАЗВИТИЕ ОПТОГЕНЕТИКИ

www.rndsystems.com



Injectable, Cellular-Scale Optoelectronics with Applications for Wireless Optogenetics

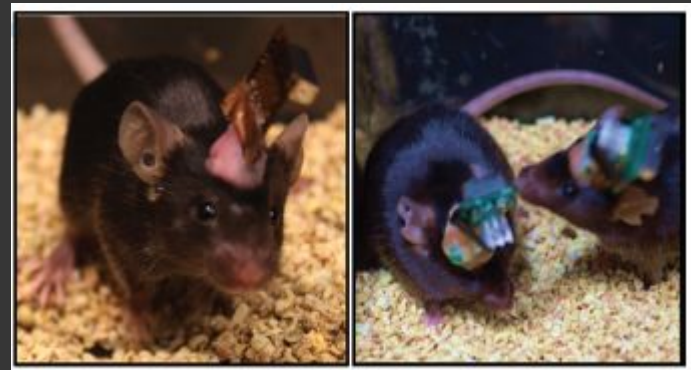
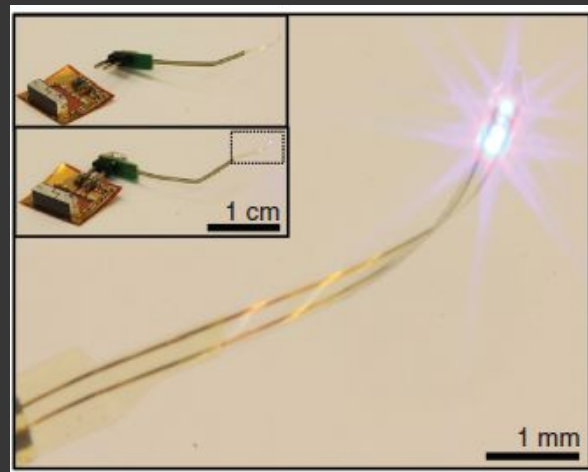
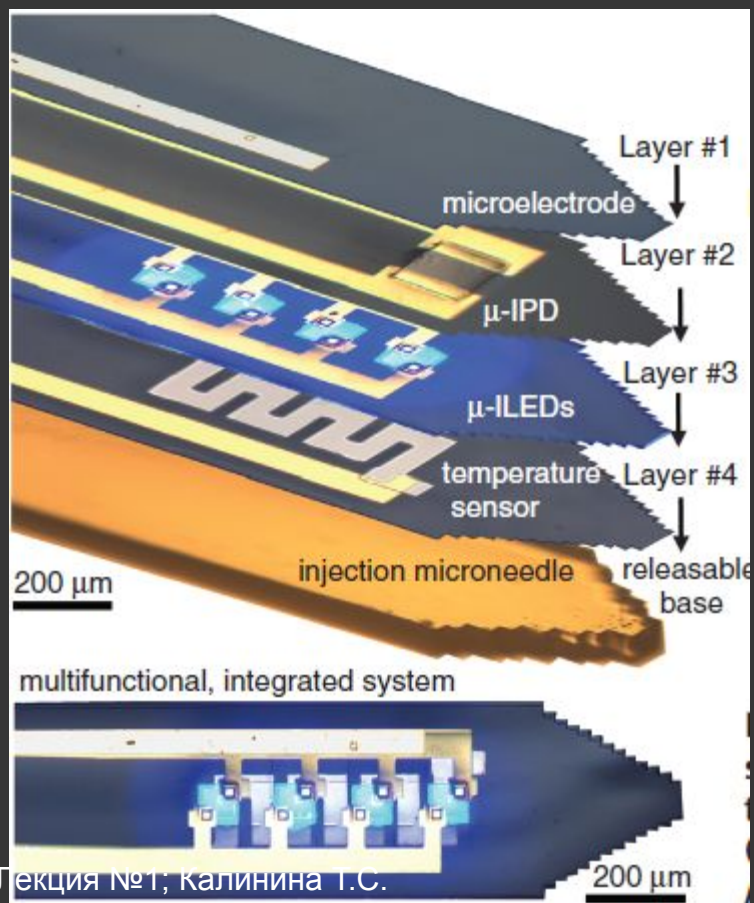
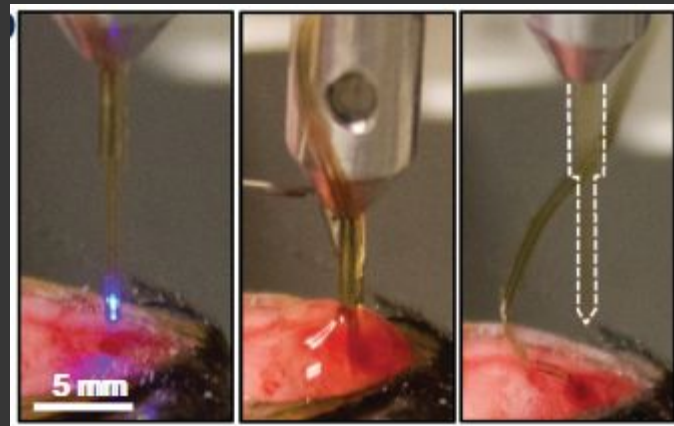
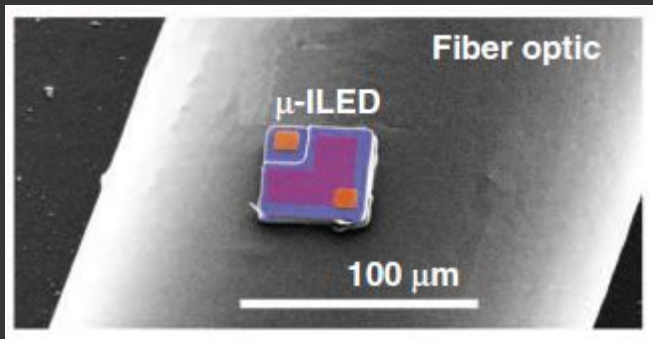
Tae-il Kim *et al.*

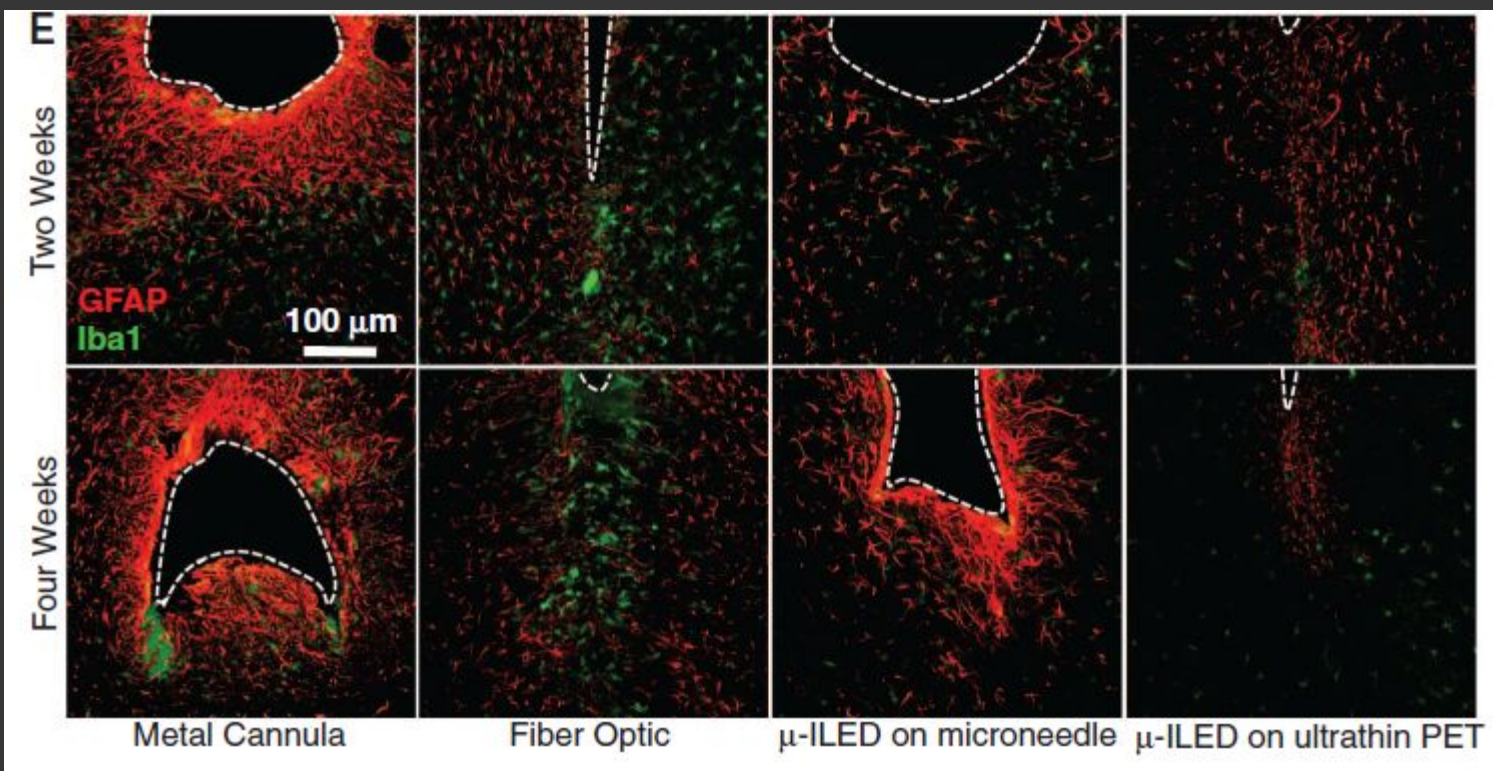
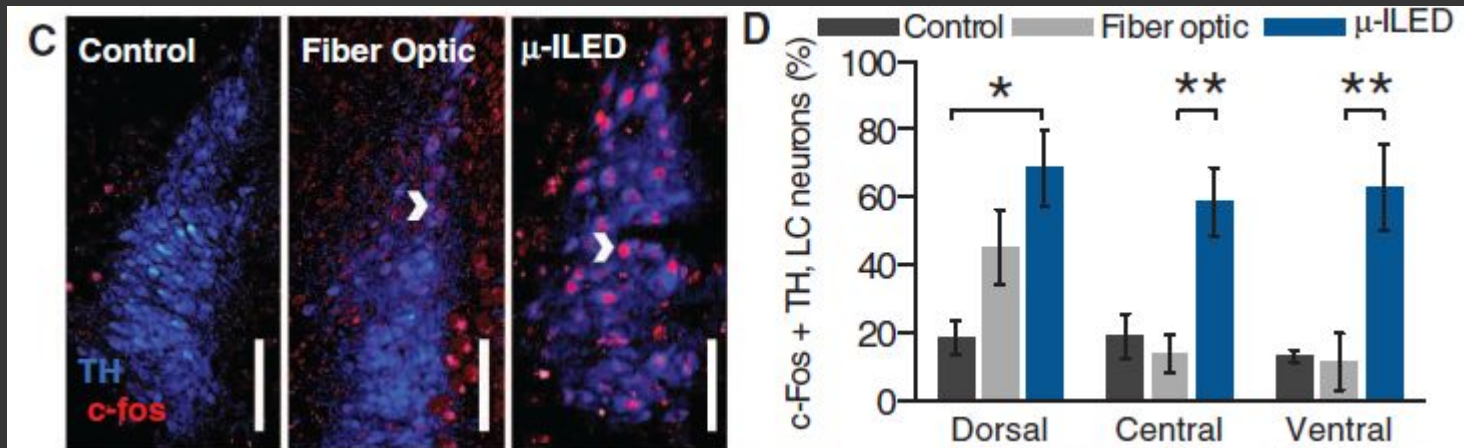
Science **340**, 211 (2013);

DOI: 10.1126/science.1232437

Injectable, Cellular-Scale Optoelectronics with Applications for Wireless Optogenetics

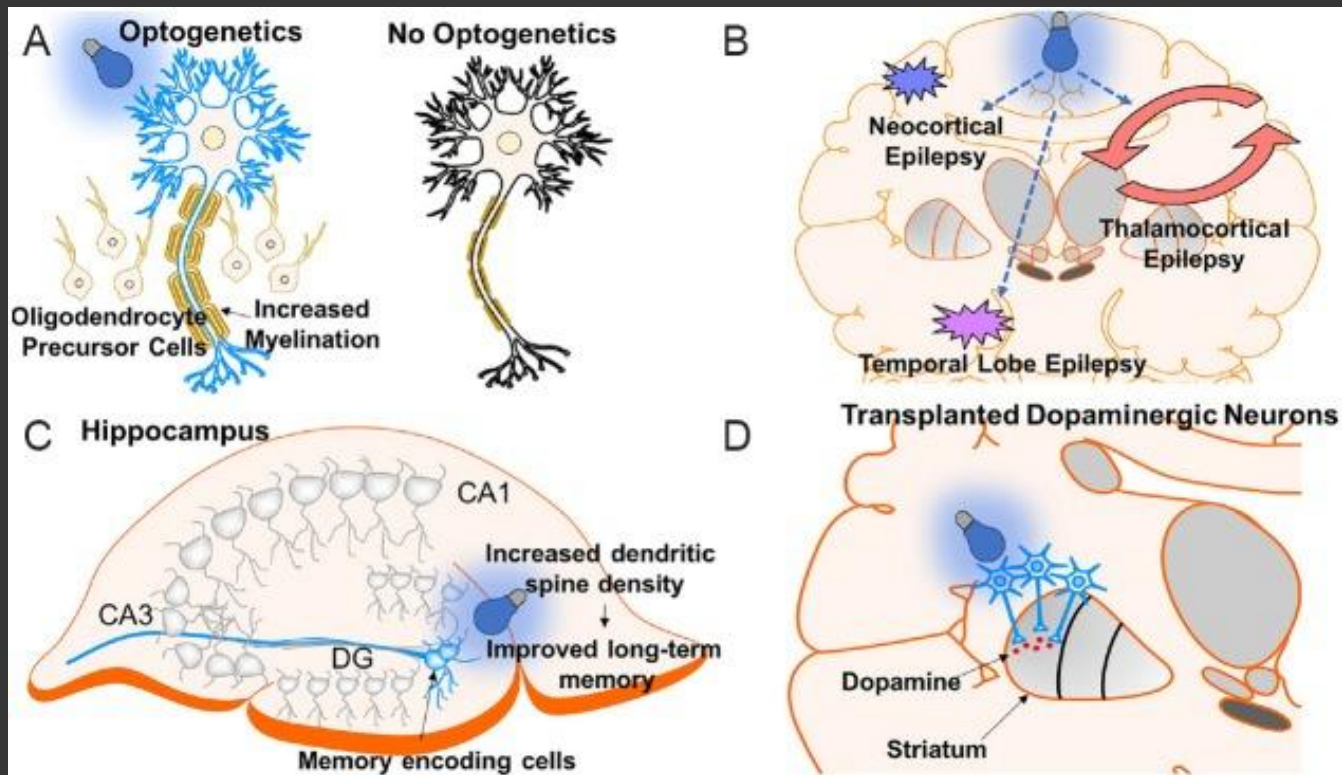
Tae-il Kim,^{1,2*} Jordan G. McCall,^{3,4,5,6*} Yei Hwan Jung,^{1†} Xian Huang,¹ Edward R. Siuda,^{3,4,5,6} Yuhang Li,⁷ Jizhou Song,⁸ Young Min Song,¹ Hsuan An Pao,¹ Rak-Hwan Kim,¹ Chaofeng Lu,⁹ Sung Dan Lee,¹⁰ Il-Sun Song,¹¹ Gunchul Shin,¹ Ream Al-Hasani,^{3,4,5} Stanley Kim,¹ Meng Peun Tan,¹⁰ Yonggang Huang,⁷ Fiorenzo G. Omenetto,^{12,13} John A. Rogers,^{1,10,11,14*‡} Michael R. Bruchas^{3,4,5,6*‡}





Optogenetics and its application in neural degeneration and regeneration

Josue D. Ordaz, Wei Wu, and Xiao-Ming Xu, M.D., Ph.D.



- (A) Оптогенетическая индукция активности нейронов увеличивает пролиферацию предшественника миелинизации и олигодендроцитов.
- (B) Оптогенетика была апробирована для лечения неокортикальной, таламокортикальной и височной эпилепсии у грызунов (подавление активности таламуса + стимуляция ГАМК нейронов височной доли коры).
- (C) Оптогенетическая активация зубчатой извилины гиппокампа в моделях мышей AD улучшает долговременную память за счет усиления роста дендритов.
- (D) Оптогенетический контроль высвобождения дофамина в полосатом теле из трансплантированных дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона.

Контроль движений

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114529#s5>

Контроль аппетита

<http://www.nature.com/neuro/journal/v17/n9/full/nn.3767.html>

Контроль агрессии

<http://www.nature.com/nature/journal/v509/n7502/full/nature13169.html>

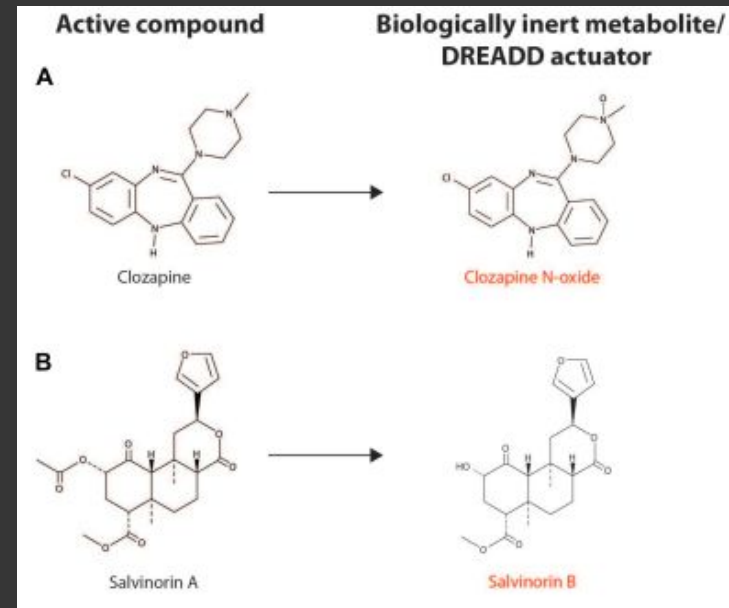
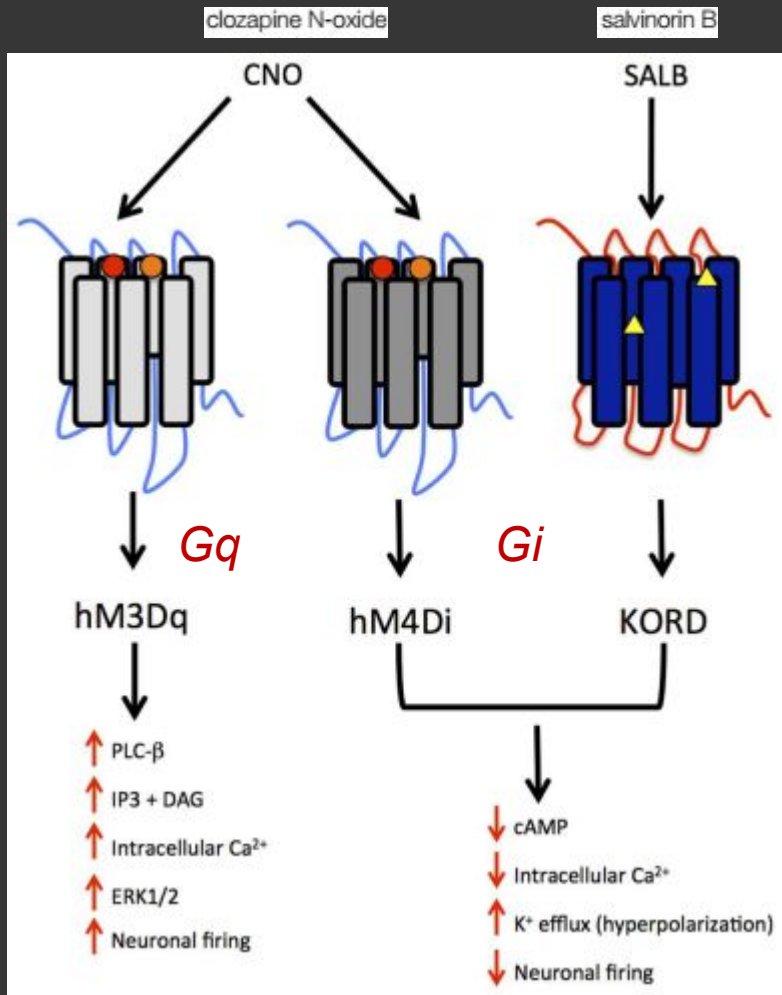
Технология DREADD (ХЕМОГЕНЕТИКА)

DREADD - Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
 Автор концепции - Bryan L. Roth

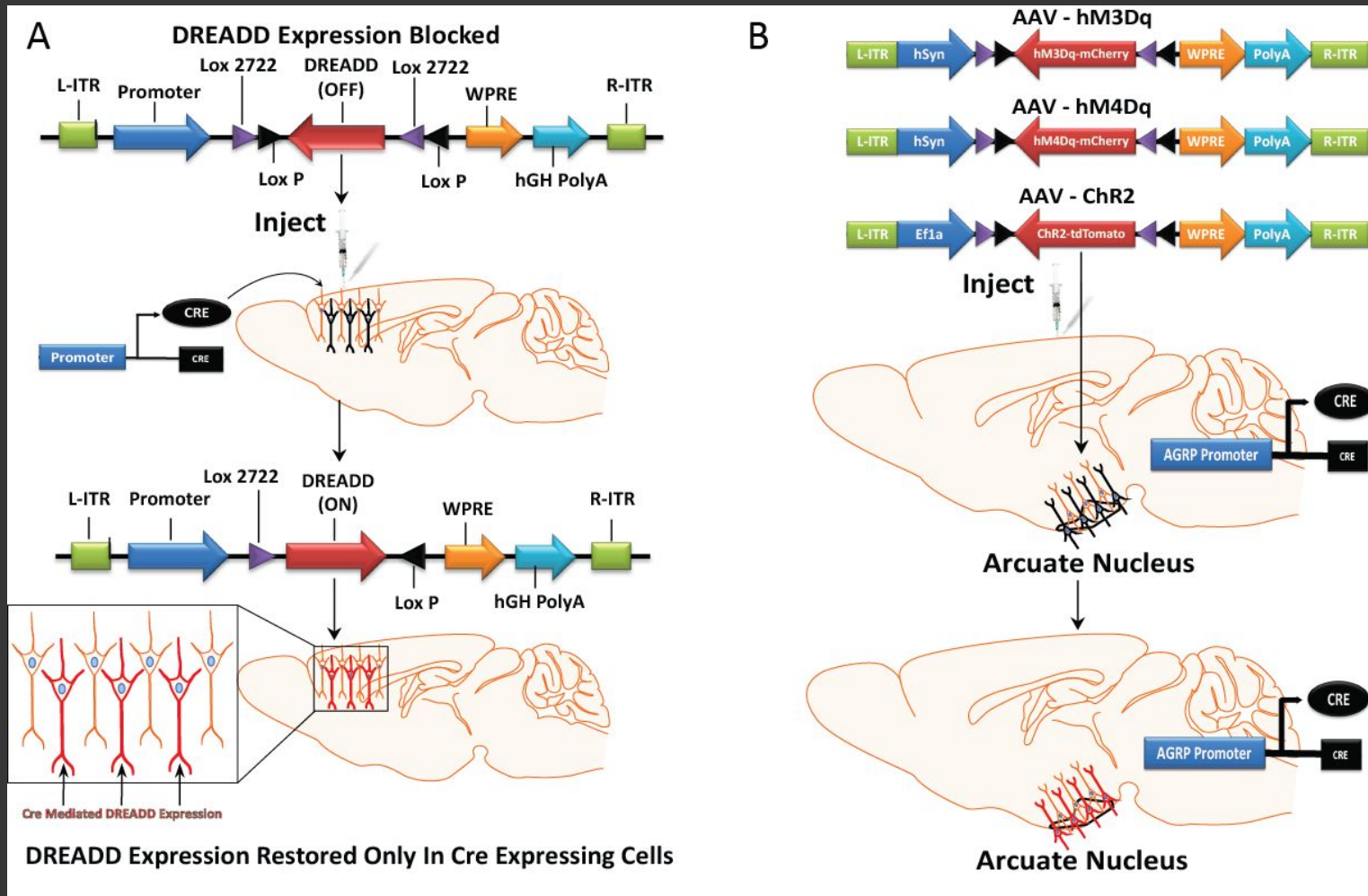


Bryan Roth
 Targeting G Protein Coupled Receptor Signaling Pathways: A Novel Approach for Psychiatric Drug Discovery

School of Medicine at the University of North Carolina, USA

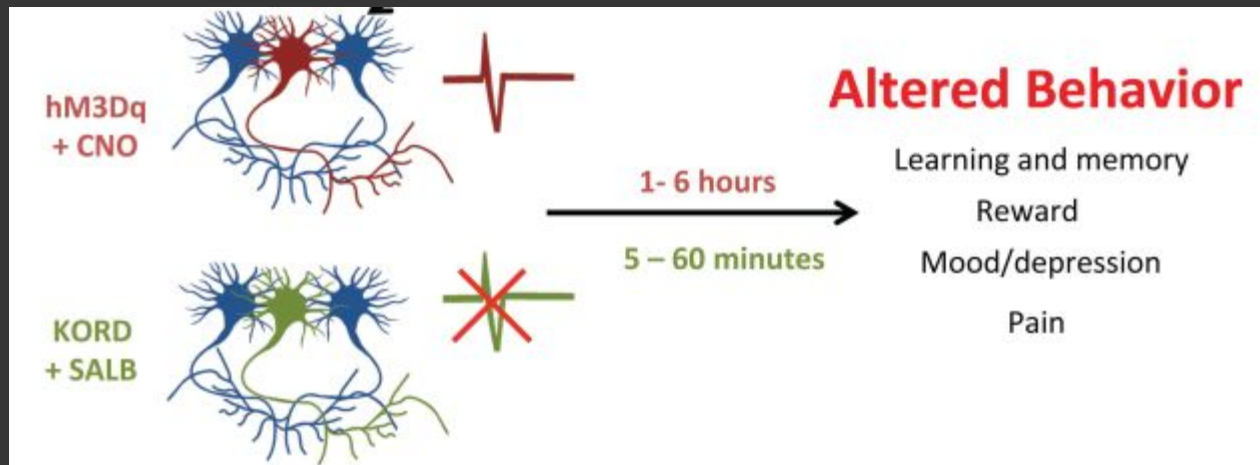
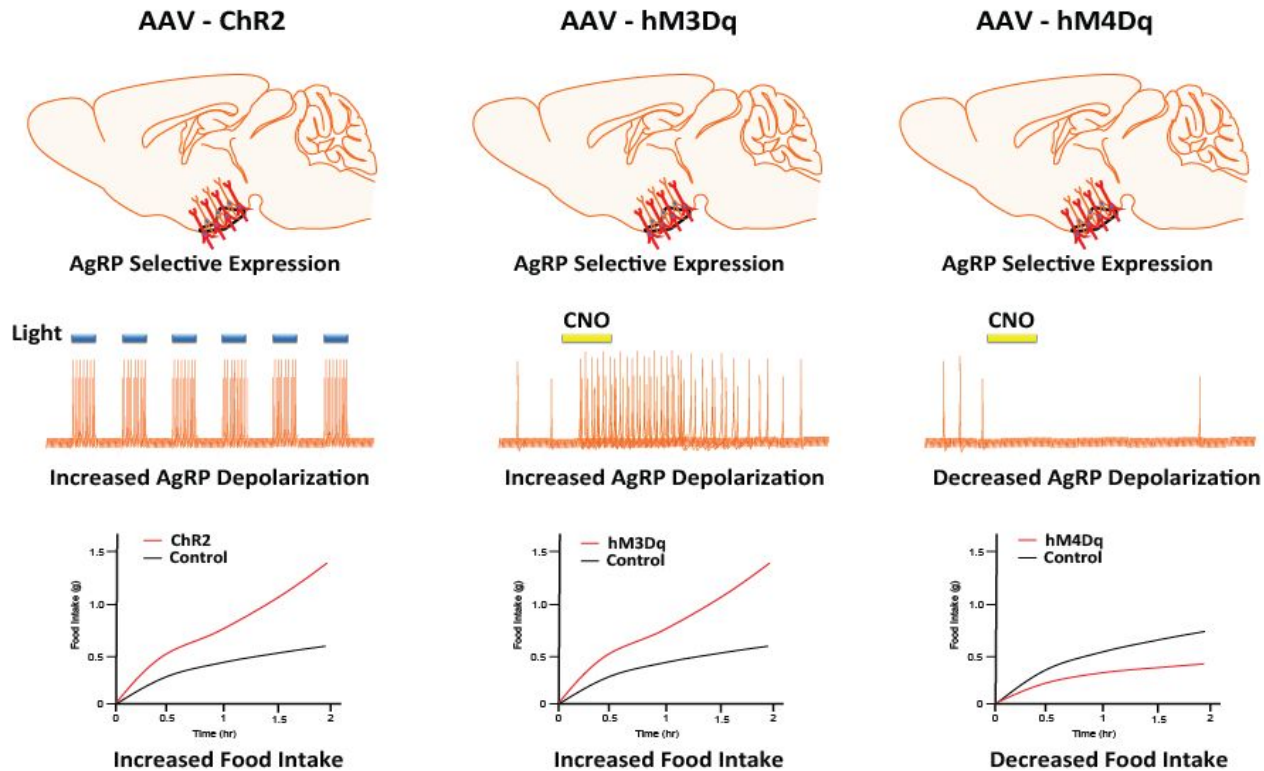


Способы введения хемо-оптических составляющих

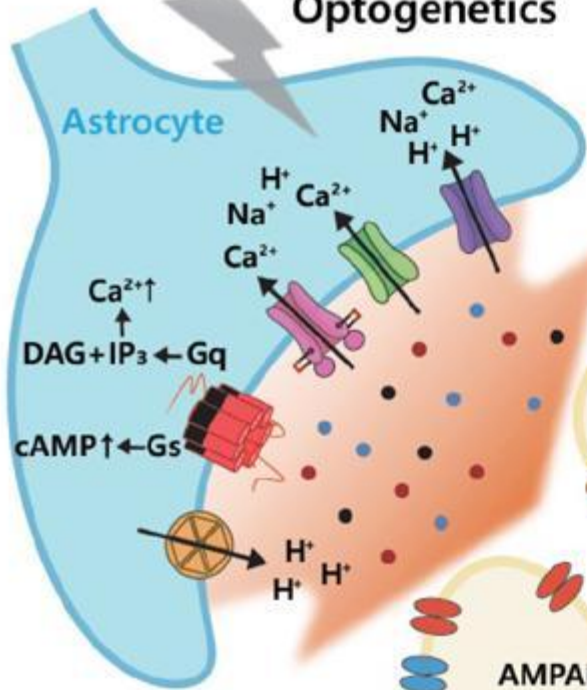







Опто vs Хемогенетика

C

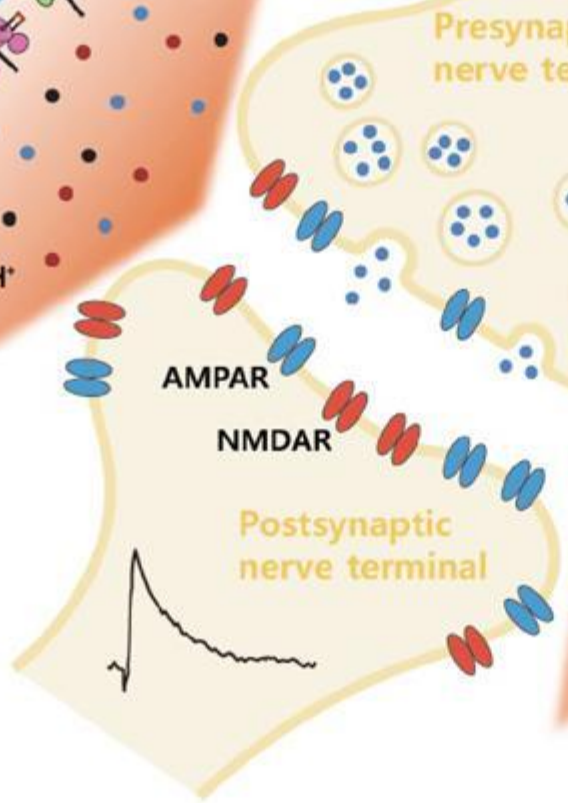


Optogenetics







-  ChR2(H134R)
ChR2(C128S)
-  Catch(L132C)
-  LiGluR
-  OptoXRs
-  ArchT

Presynaptic nerve terminal

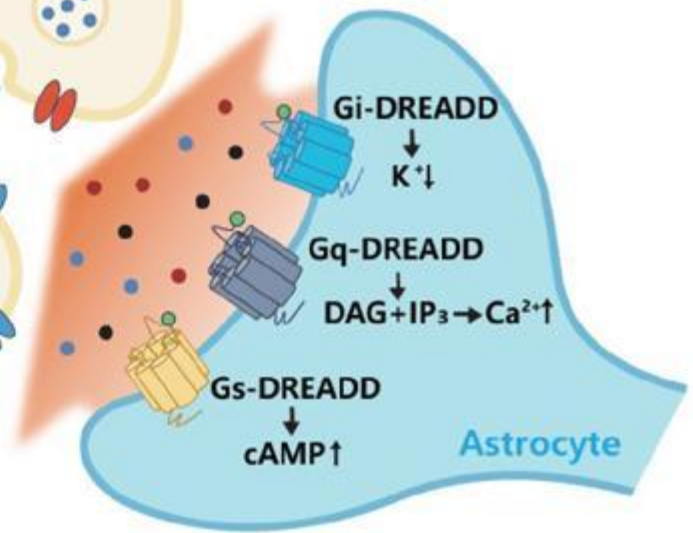


Postsynaptic nerve terminal

AMPA
NMDAR

-  Glutamate
-  ATP
-  L-lactate
-  CNO

Chemogenetics



Astrocyte

Новый метод исследования мозга

CLARITY

Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging
/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel

ARTICLE

doi:10.1038/nature12107

Structural and molecular interrogation of intact biological systems

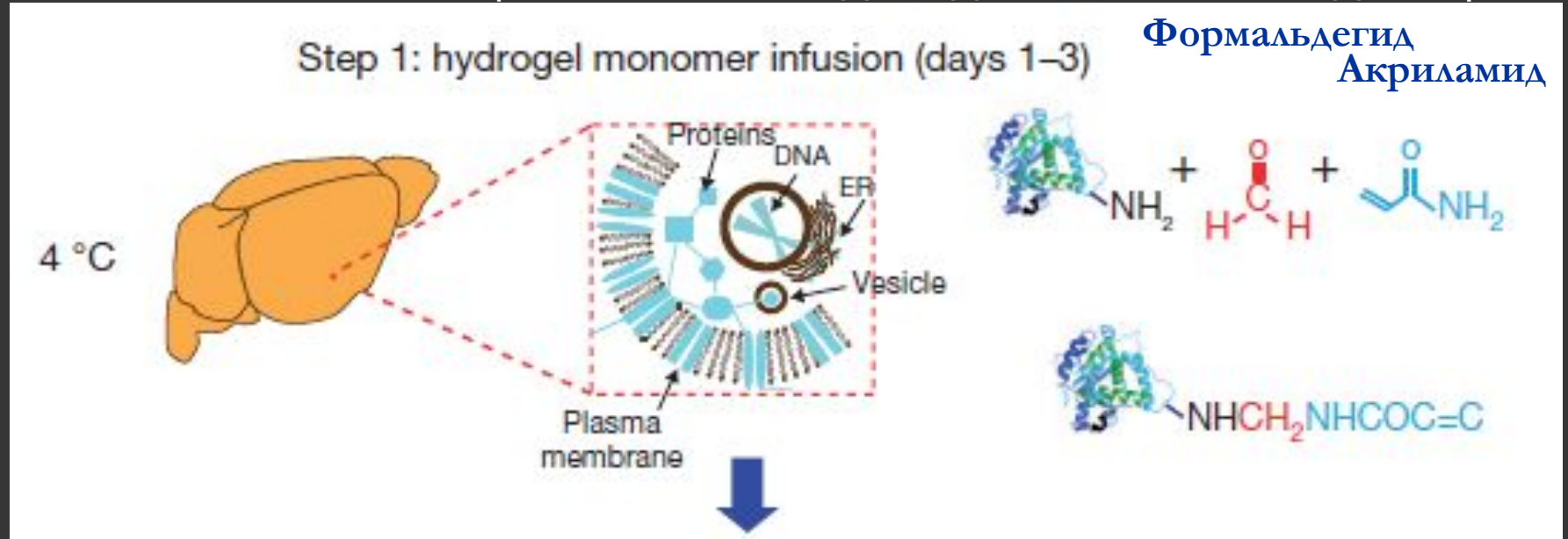
Kwanghun Chung^{1,2}, Jenelle Wallace¹, Sung-Yon Kim¹, Sandhiya Kalyanasundaram², Aaron S. Andalman^{1,2}, Thomas J. Davidson^{1,2}, Julie J. Mirzabekov¹, Kelly A. Zalocusky^{1,2}, Joanna Mattis¹, Aleksandra K. Denisin¹, Sally Pak¹, Hannah Bernstein¹, Charu Ramakrishnan¹, Logan Grosenick¹, Viviana Gradinaru² & Karl Deisseroth^{1,2,3,4}

Проект “BRAIN”

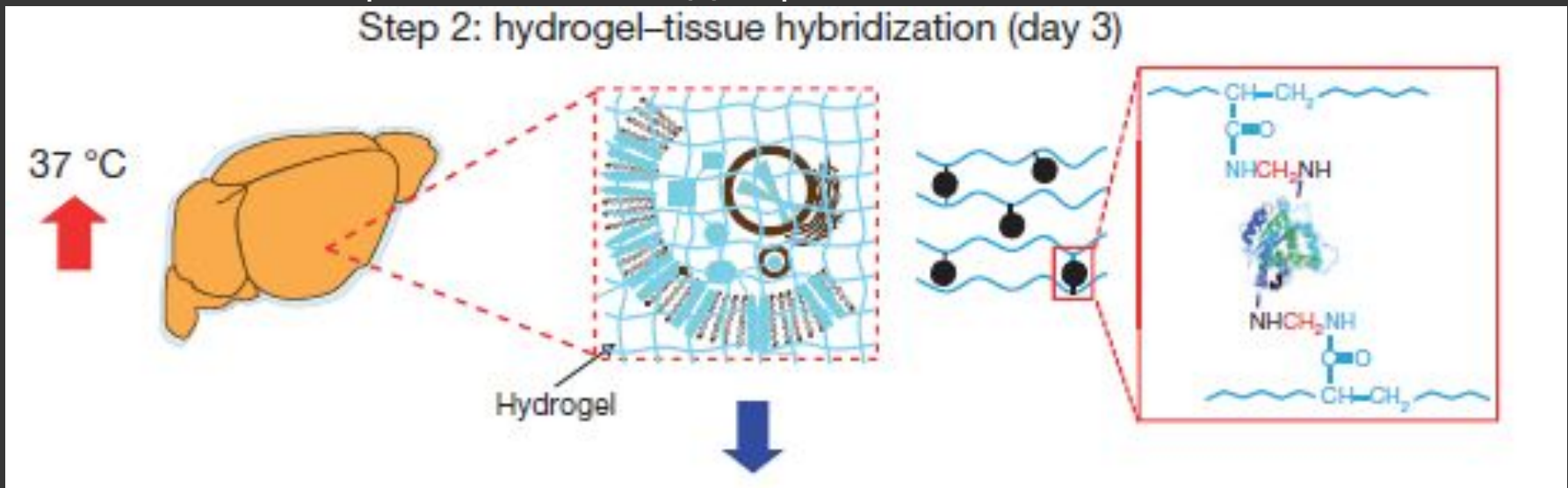
Nature, 2013, 10 Apr, Epub ahead of print.

ПРИНЦИП МЕТОДА CLARITY

1. ПАССИВНОЕ НАСЫЩЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ И АКРИЛАМИДОМ при 4°C

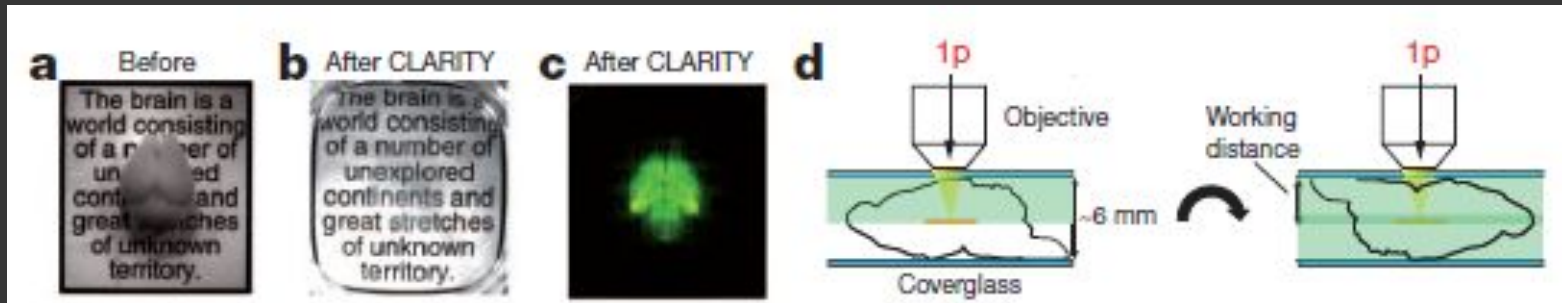
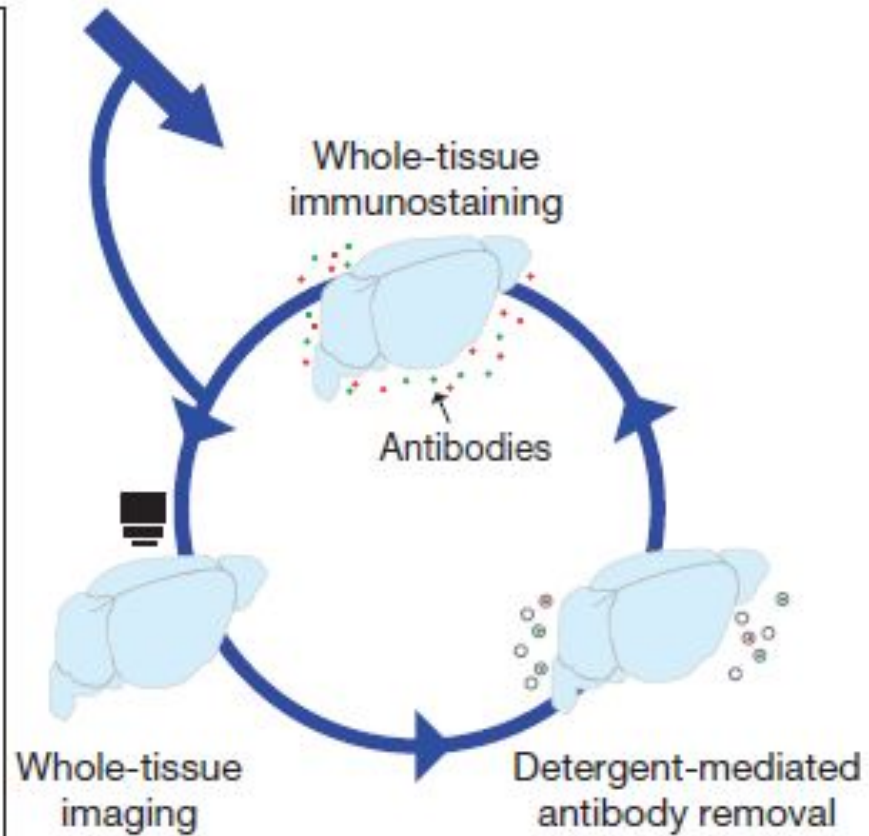
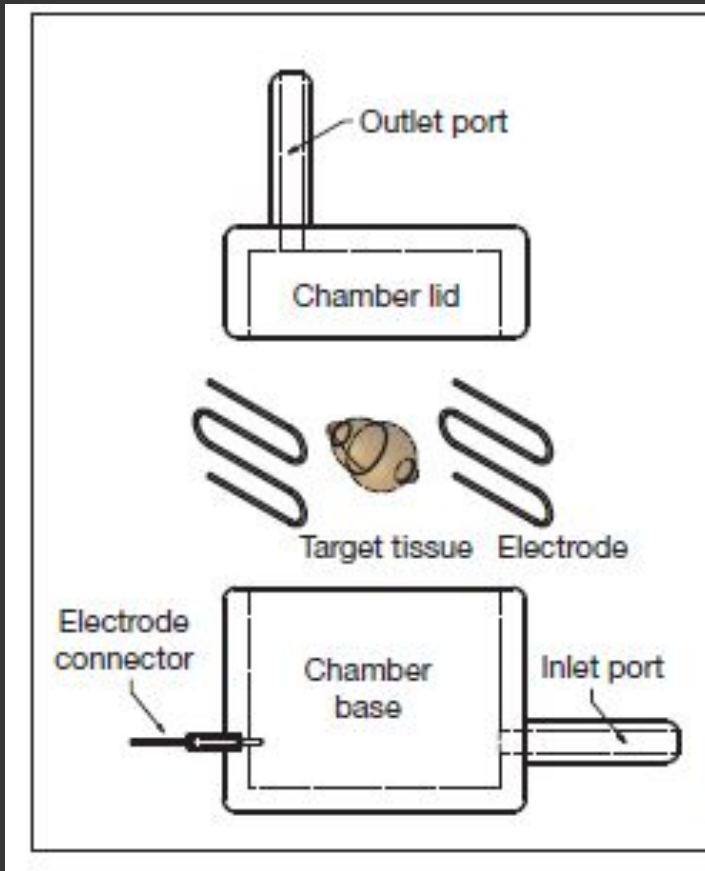


2. ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АКРИЛАМИДА при 37°C



3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ с SDS

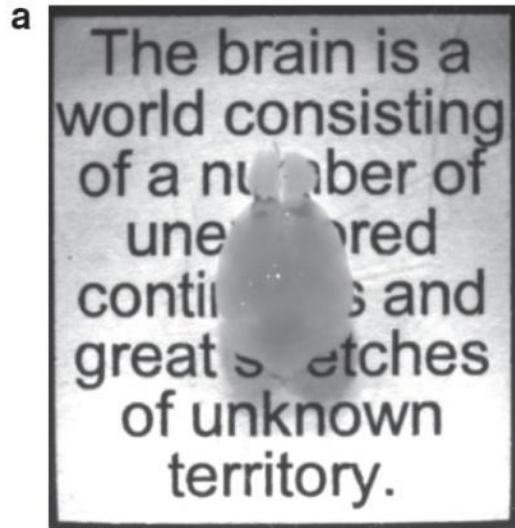
4. ИММУНОГИСТОХИМИЯ



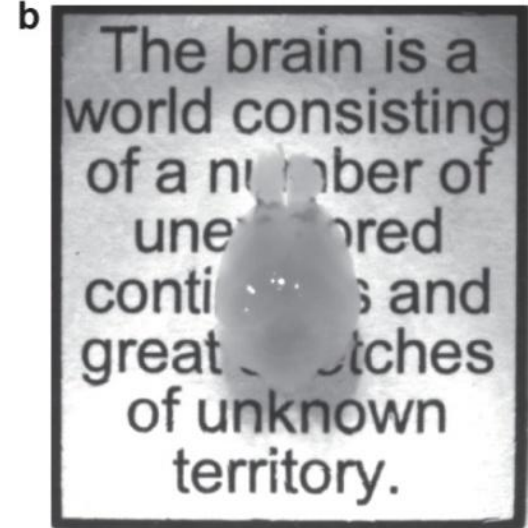


Karl Deisseroth, M.D., Ph.D.

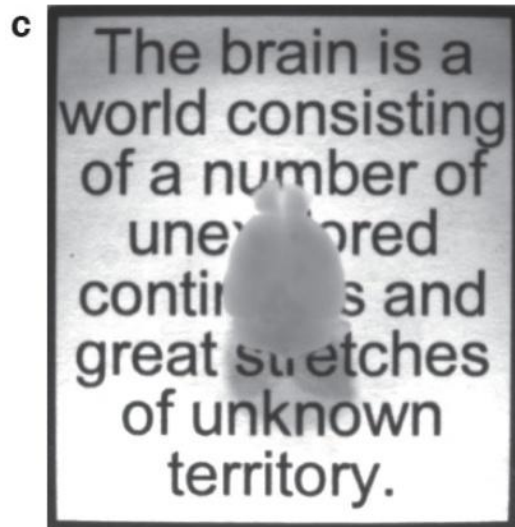
**«Мозг — это мир,
состоящий из
множества
неоткрытых
континентов и
огромных
неизведанных
пространств»**



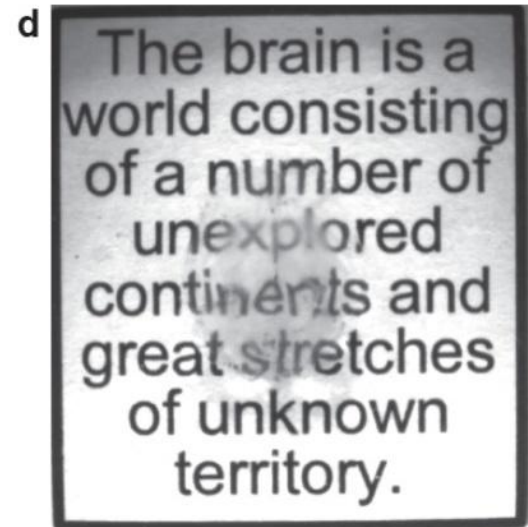
Hydrogel-embedded/non-ETC
2 days in Focusclear



Hydrogel-embedded/non-ETC
8 days in Focusclear



Hydrogel-embedded/non-ETC
4 days in 85% glycerol



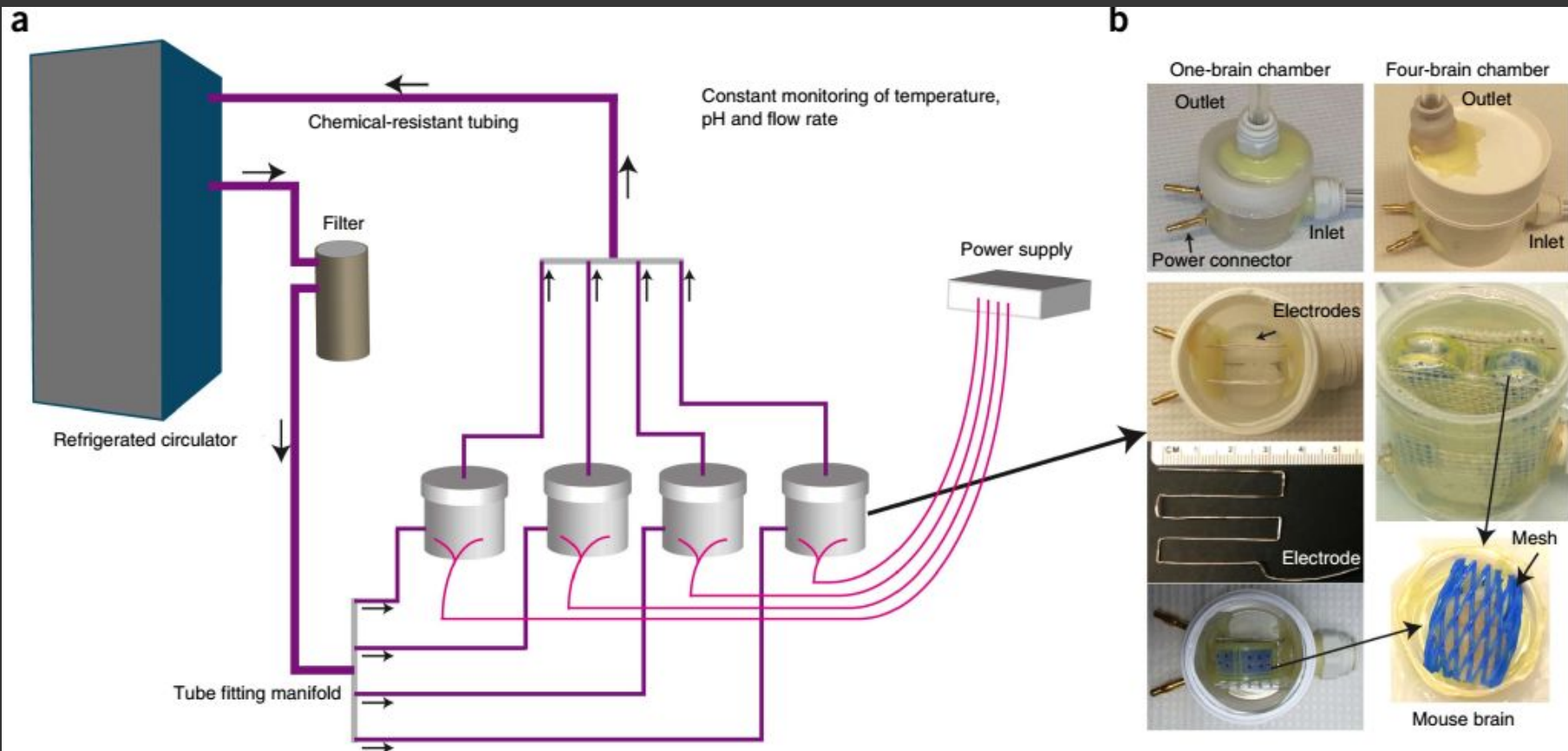
Hydrogel-embedded/ETC-cleared
2 days in 85% glycerol

Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues

Raju Tomer¹⁻³, Li Ye¹⁻³, Brian Hsueh^{1,3} & Karl Deisseroth¹⁻⁴

¹Department of Bioengineering, Stanford University, Stanford, California, USA. ²Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, Stanford, California, USA. ³CNC Program, Stanford University, Stanford, California, USA. ⁴Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University, Stanford, California, USA. Correspondence should be addressed to K.D. (deissero@stanford.edu).

Published online 19 June 2014; doi:10.1038/nprot.2014.123



Проект «Прозрачный мозг»

Неонатальный мозг мыши



+ глицерин



К.В. Анохин

Проект "прозрачный мозг"

Результаты

РОССИЯ К

Нейроны гиппокампа мыши,
экспрессирующие индуцированный обучением ген c-Fos



Bringing CLARITY to the human brain: visualization of Lewy pathology in three dimensions

A. K. L. Liu^{*,†}, M. E. D. Hurry^{*}, O. T. W. Ng^{†,‡}, J. DeFelice^{*}, H. M. Lai^{*,§}, R. K. B. Pearce^{*}, G. T-C. Wong^{‡,¶}, R. C-C. Chang^{†,§,¶} and S. M. Gentleman^{*}

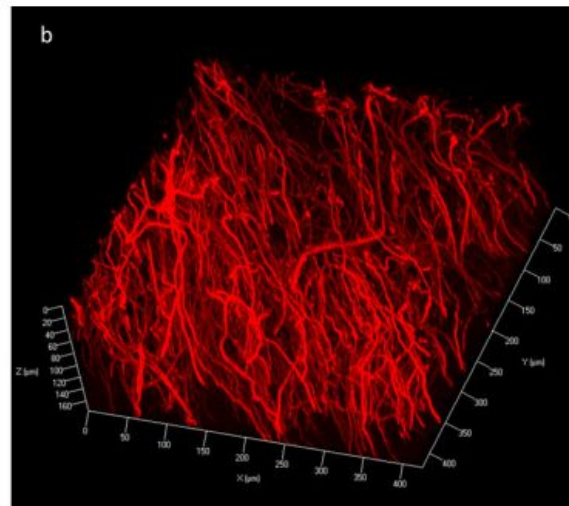
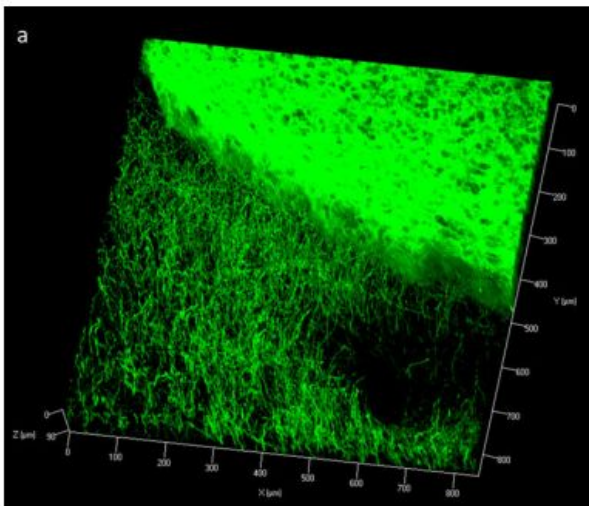


Figure 3. Z-stack image of Immunofluorescence with tyrosine hydroxylase (TH) staining on rat coronal block showing TH-positive neuronal processes at the cortex and dense, homogenous staining within the striatum (z-stack step size 3.3 μm) (a). Staining in the human midbrain block showed dense TH-positive axonal processes (z-stack step size 1.5 μm) (b).

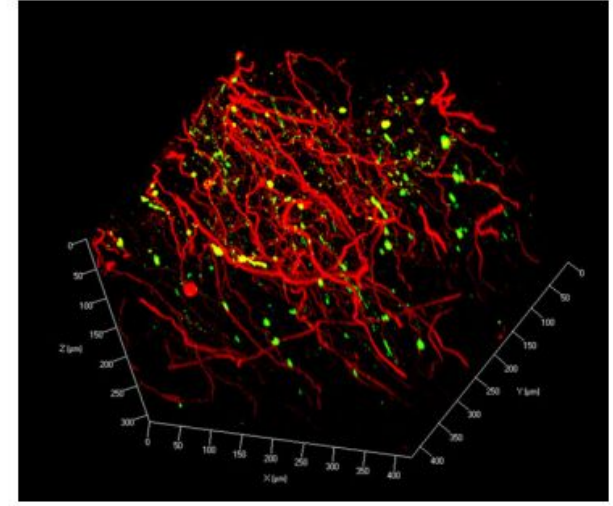
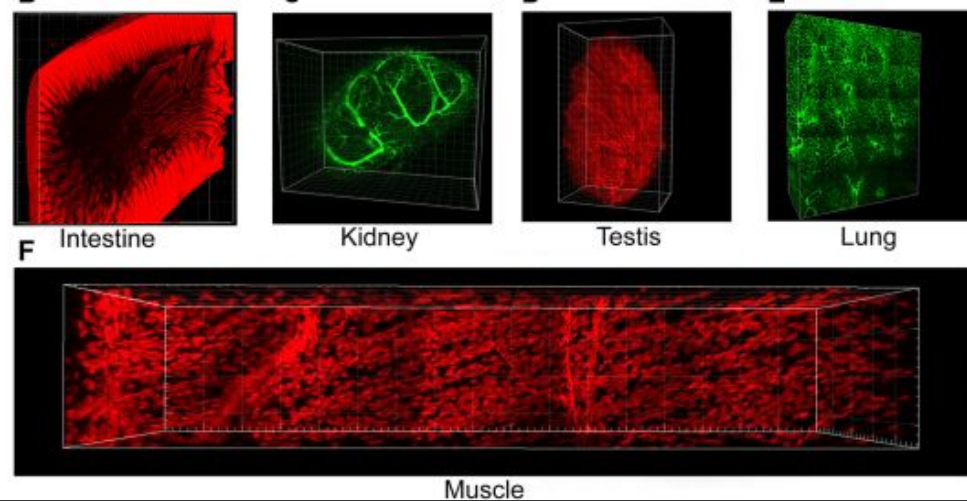
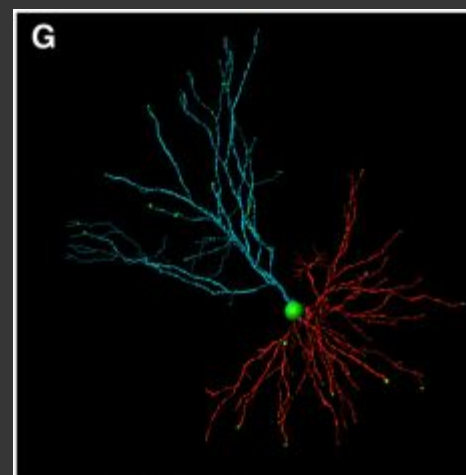
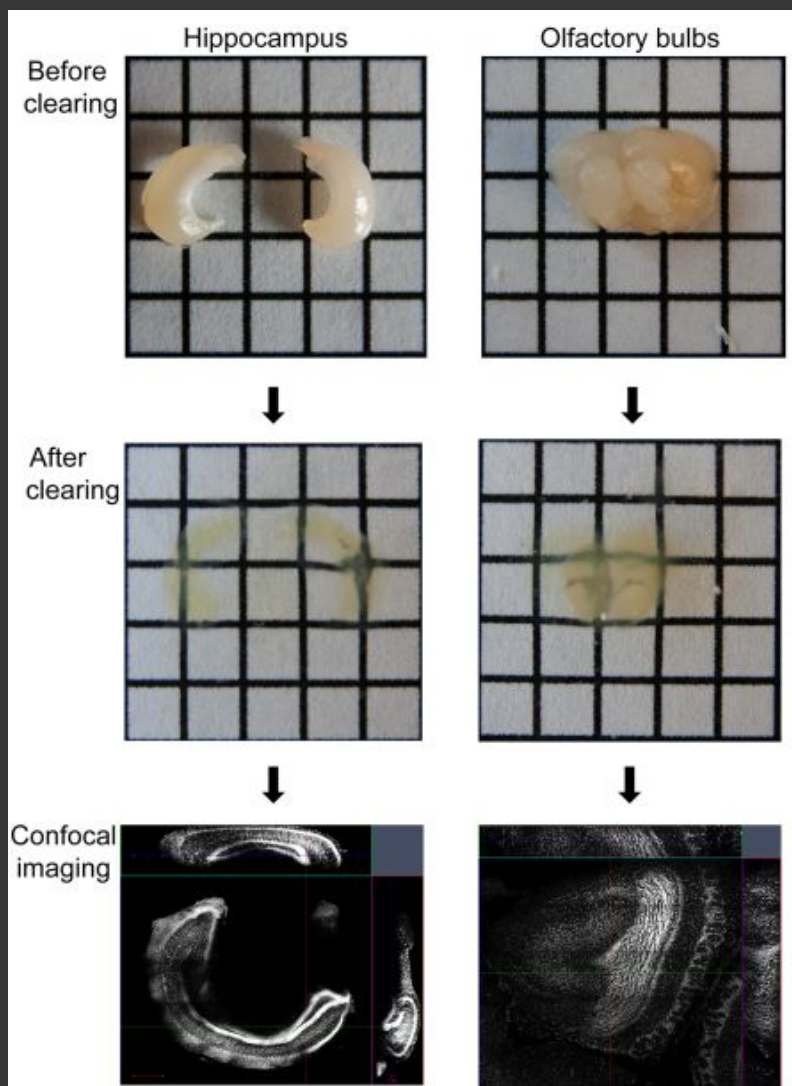


Figure 6. Z-stack image of double immunofluorescence with anti- αSN (green) and anti-TH (red) antibodies on human midbrain block (z-stack step size 1.5 μm).

Optimization of CLARITY for Clearing Whole-Brain and Other Intact Organs^{1,2,3}

Jonathan R. Epp,^{1,2,3} Yosuke Niibori,^{1,2,3} Hwa-Lin (Liz) Hsiang,^{1,2,3} Valentina Mercaldo,^{1,2,3} Karl Deisseroth,⁴ Sheena A. Josselyn,^{1,2,3} and Paul W. Frankland^{1,2,3}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0022-15.2015>



Received: 28 April 2017 | Revised: 14 August 2017 | Accepted: 14 September 2017

DOI: 10.1002/jbio.201700106

Journal of
BIOPHOTONICS

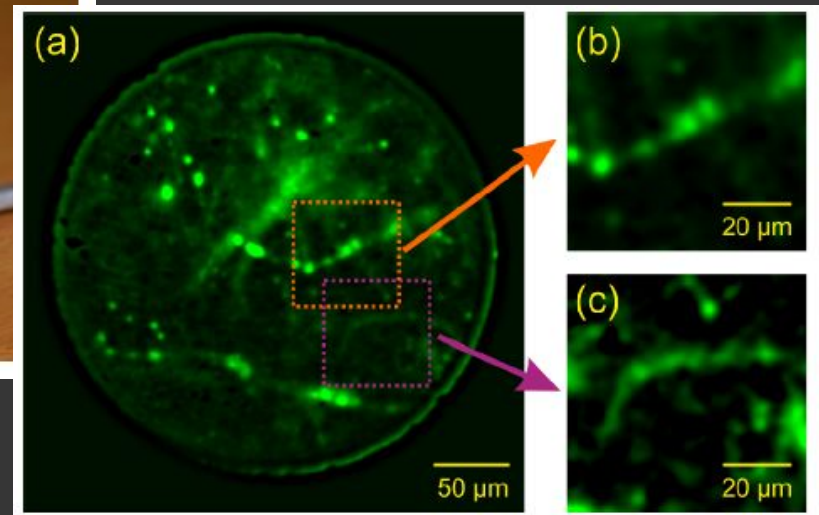
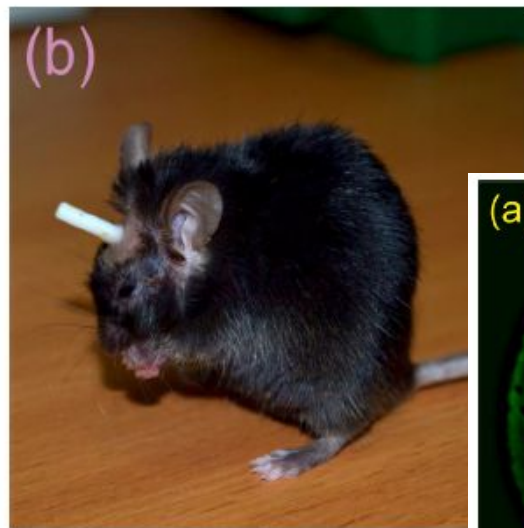
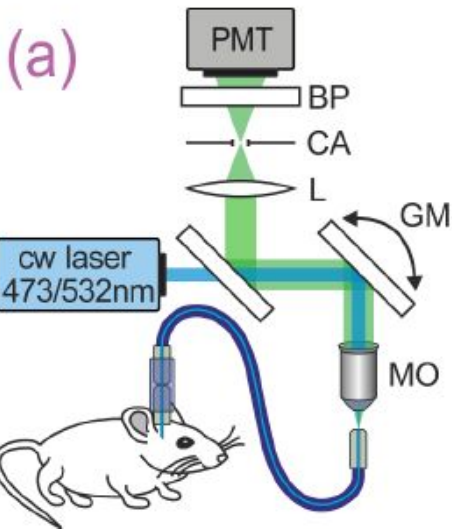
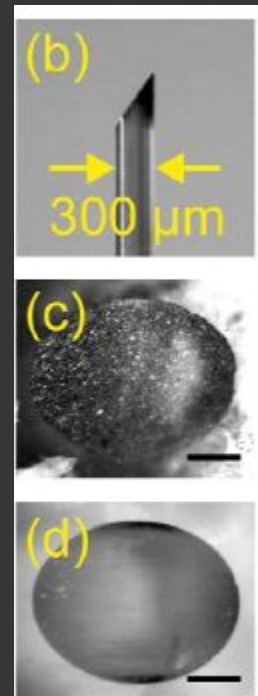
FULL ARTICLE

Reconnectable fiberscopes for chronic in vivo deep-brain imaging

M. S. Pochechuev^{1,2} | I. V. Fedotov^{1,3,4,5} | O. I. Ivashkina^{2,4} | M. A. Roshchina^{2,4} |

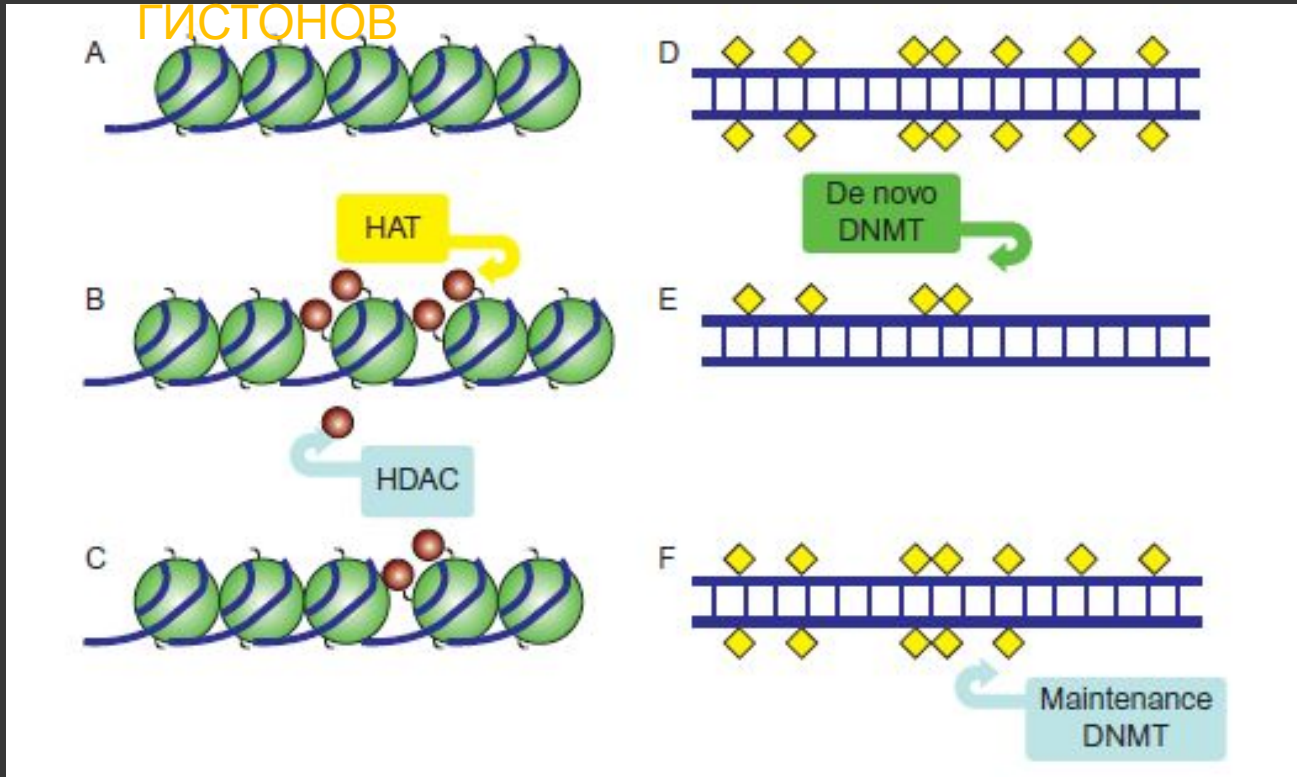
D.V. Meshchankin¹ | D. A. Sidorov-Biryukov^{1,2,4,5} | A. B. Fedotov^{1,2,4,5} | K. V. Anokhin^{2,4,6} |

A. M. Zheltikov^{1,2,3,4,5*}



doi: 10.1002/jbio.201700106

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИСТОНОВ



HAT – ацетилтрансфераза гистонов – \uparrow доступность хроматина;
HDAC – деацетилаза гистонов – \downarrow доступность хроматина;
DNMT – метилтрансфераза

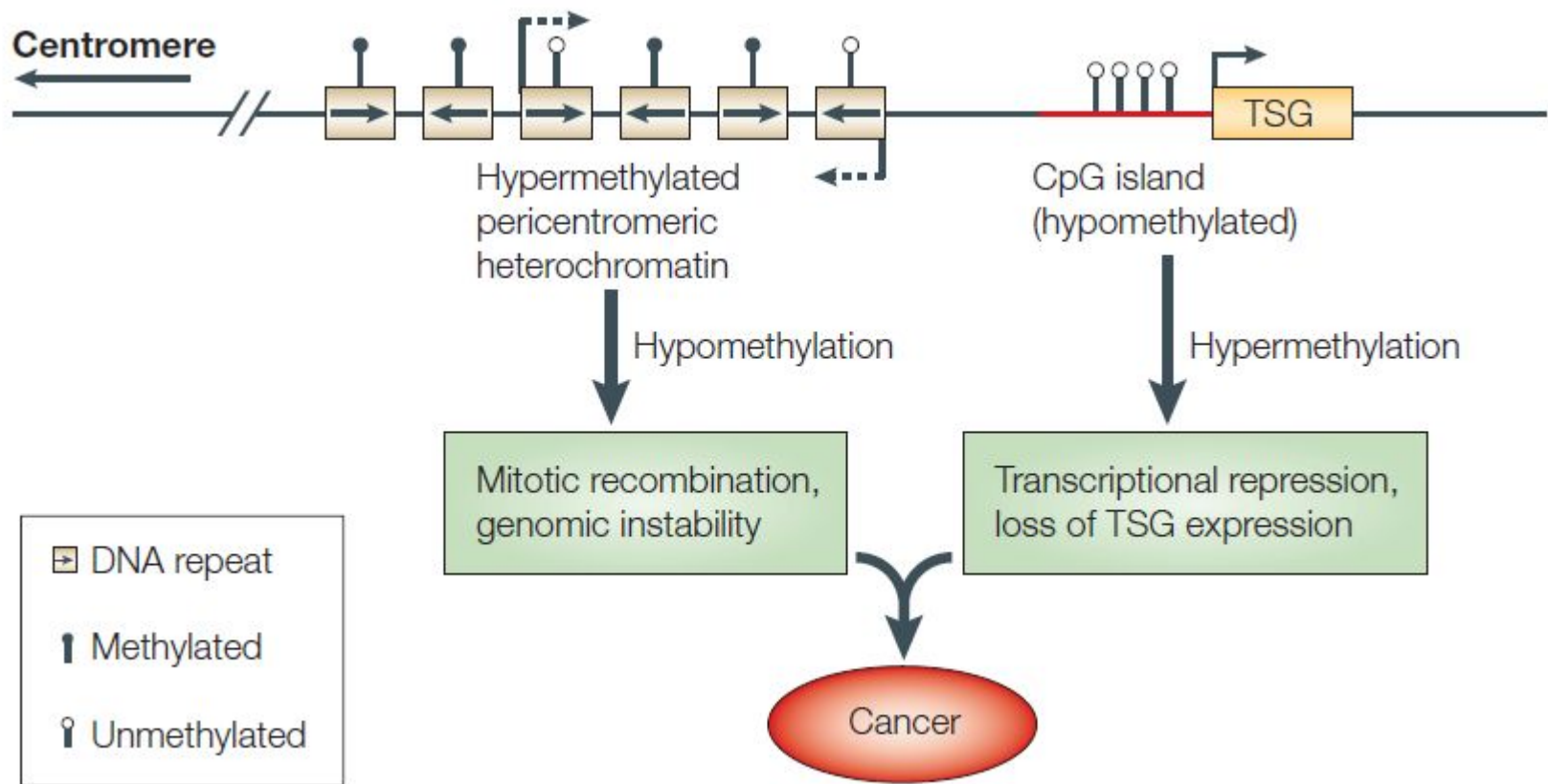


Figure 1 | DNA methylation and cancer. The diagram shows a representative region of genomic DNA in a normal cell. The region shown contains repeat-rich, hypermethylated pericentromeric heterochromatin and an actively transcribed tumour suppressor gene (TSG) associated with a hypomethylated CpG island (indicated in red). In tumour cells, repeat-rich heterochromatin becomes hypomethylated and this contributes to genomic instability, a hallmark of tumour cells, through increased mitotic recombination events. *De novo* methylation of CpG islands also occurs in cancer cells, and can result in the transcriptional silencing of growth-regulatory genes. These changes in methylation are early events in tumorigenesis.

Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome

X. Shawn Liu,^{1,4} Hao Wu,^{1,4} Xiong Ji,^{1,5} Yonatan Stelzer,¹ Xuebing Wu,¹ Szymon Czauderna,^{1,3} Jian Shu,¹ Daniel Dadon,^{1,2} Richard A. Young,^{1,2} and Rudolf Jaenisch^{1,2,6,*}

¹Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA 02142, USA

²Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA

³Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University, 31-007 Kraków, Poland

⁴Co-first author

⁵Present address: School of Life Sciences, Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

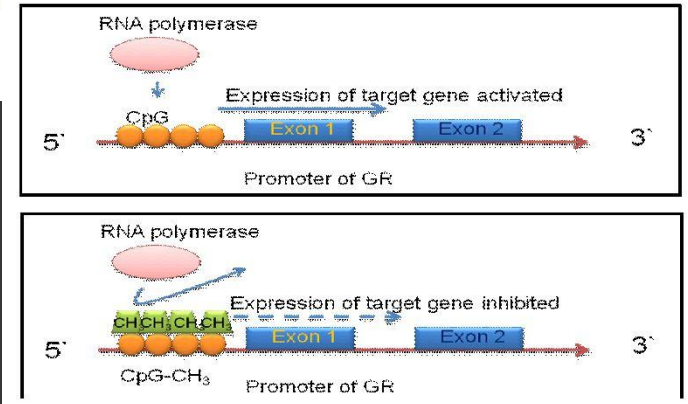
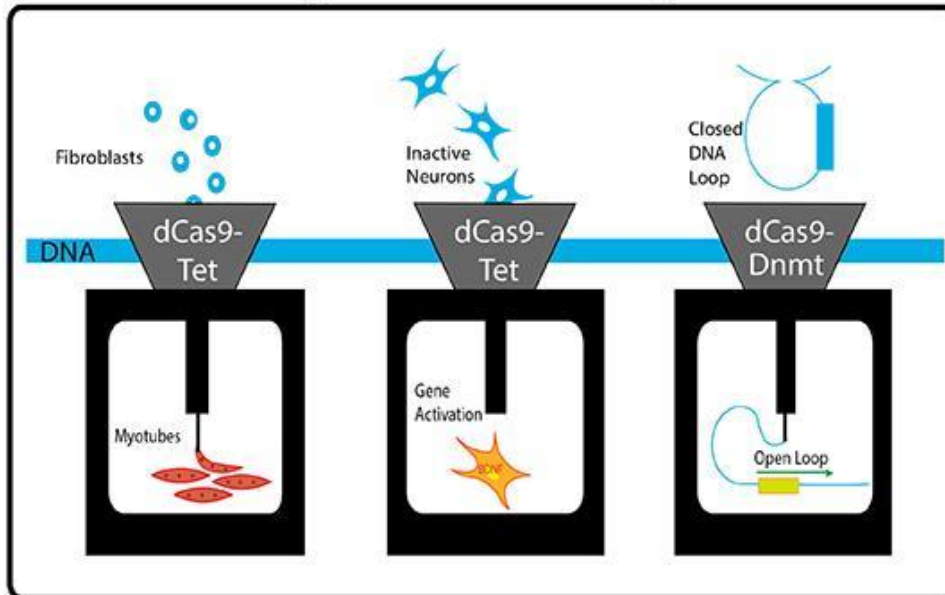
⁶Lead Contact

*Correspondence: jaenisch@wi.mit.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>

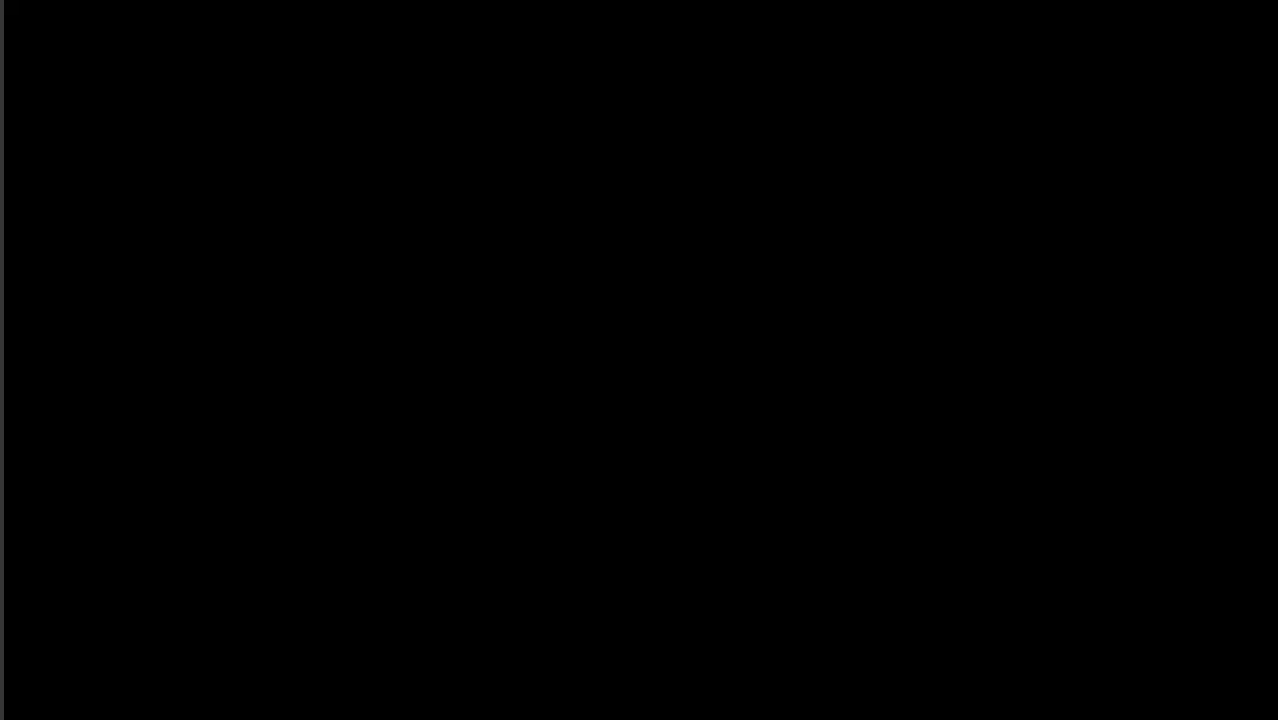
Liu et al., 2016, Cell 167, 233–247
September 22, 2016 © 2016 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>

Editing of DNA Methylation



Модификация системы редактирования генов CRISPR / Cas9, которая изменяет состояние метилирования при добавлении в систему редактирования ферментов, которые добавляют (Dnmt3a) или удаляют метильные группы (Tet1), смогли изменить клетки кожи в мышечные клетки (слева), активировать специфические гены в нейронах (в центре) и изменить трехмерную структуру ДНК клетки (справа).

Video CLARITY



Hot points:

- *Эволюция мировоззрения взаимосвязи мозга и сознания;*
- *Й. Прохазка – термин рефлекс;*
- *Роль русской нейрофизиологической школы (Сеченов, Павлов, Бехтерев);*
- *Сложность мозга (≈100 млрд. нейронов) и необходимость его исследования;*
- *Методы исследования мозга:*

ЭЭГ, ПЭГ, КТ, МРТ, фМРТ, ГМС и др.

Нейромедиаторы, рецепторы, белки, гены

Оптогенетика, Хемогенетика, CLARITY, CRISPR/Cas9 и др..



ПРОЩЕННОЕ ВОСКРЕСЕНЬЕ?

ЗНАЧИТ ПРОСТЯТ