



*Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine*  
Pavel Belan

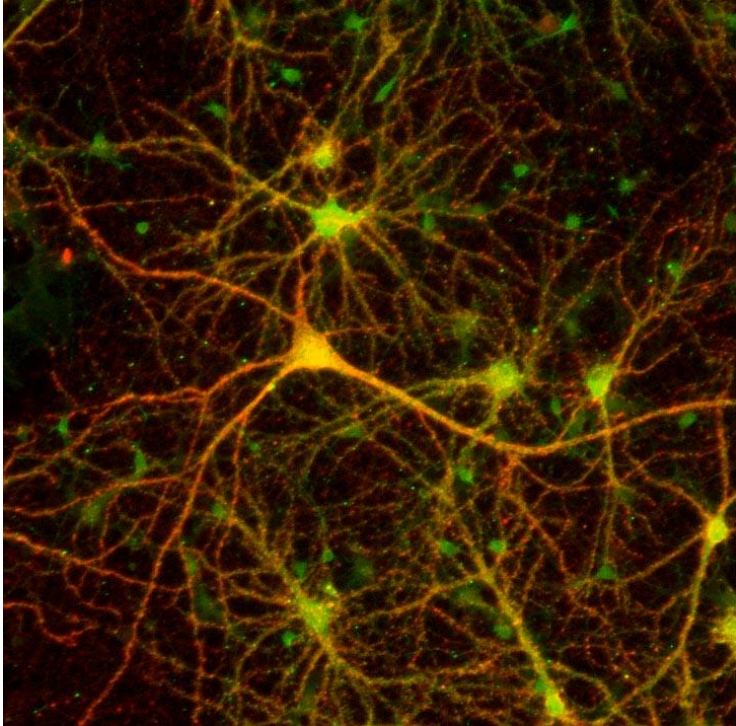
## ***Advanced methods of brain research***

Biophysical Methods in Neuroscience

Kiev 20.04.2016

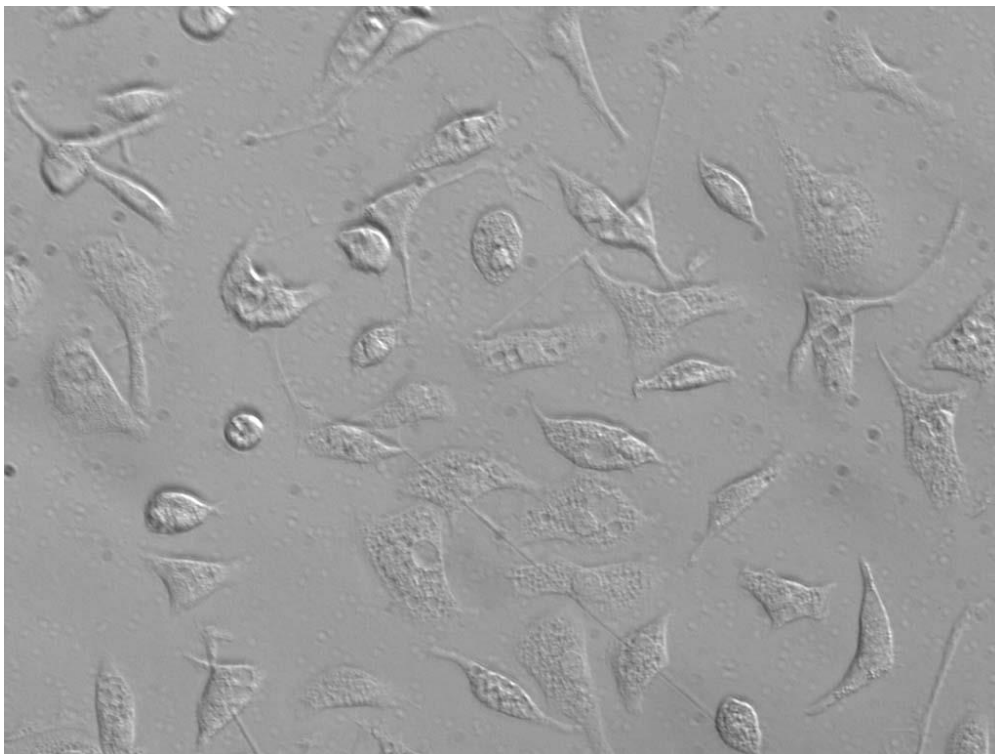
# План

- Проблемы при регистрации работы мозга
- Флуоресцентные метки, Зеленый флуоресцентный белок, Green Fluorescent Protein (GFP)
- Малые объекты и их Конектосомы. Методы их исследования.
- Конектосомы Кору Головного Мозга
- «Листовая» микроскопия
- Оптогенетика



- Каким образом можно увидеть как устроен мозг на уровне отдельных клеток (нейронов)
- Каким образом можно увидеть и понять процессы, происходящие при нейрональных взаимодействиях

## Изображение клеток в проходящем свете

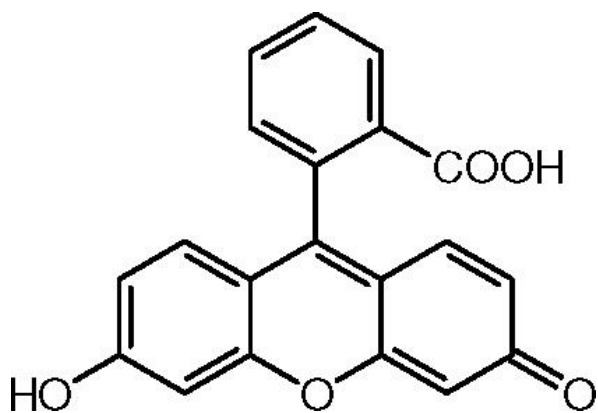


Молекулы невидимы

Нейроны прозрачны

Ткани непрозрачны

# Флуоресцентные метки



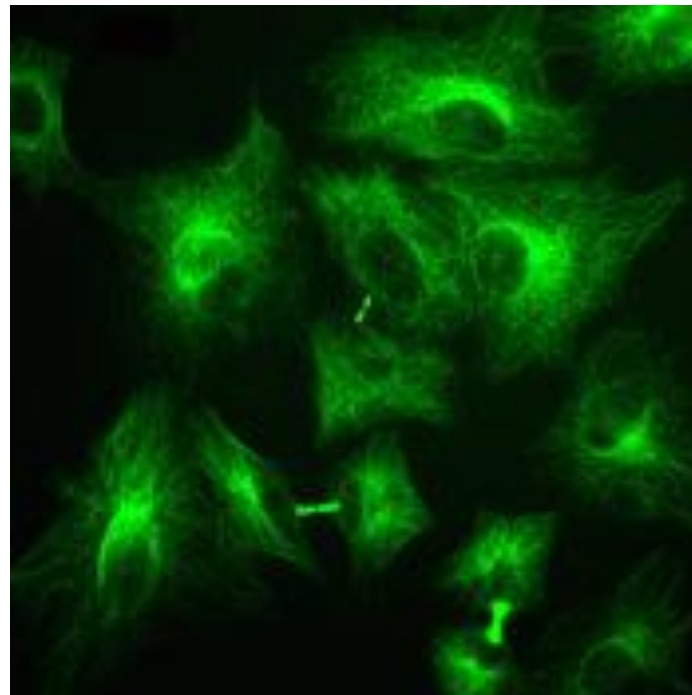
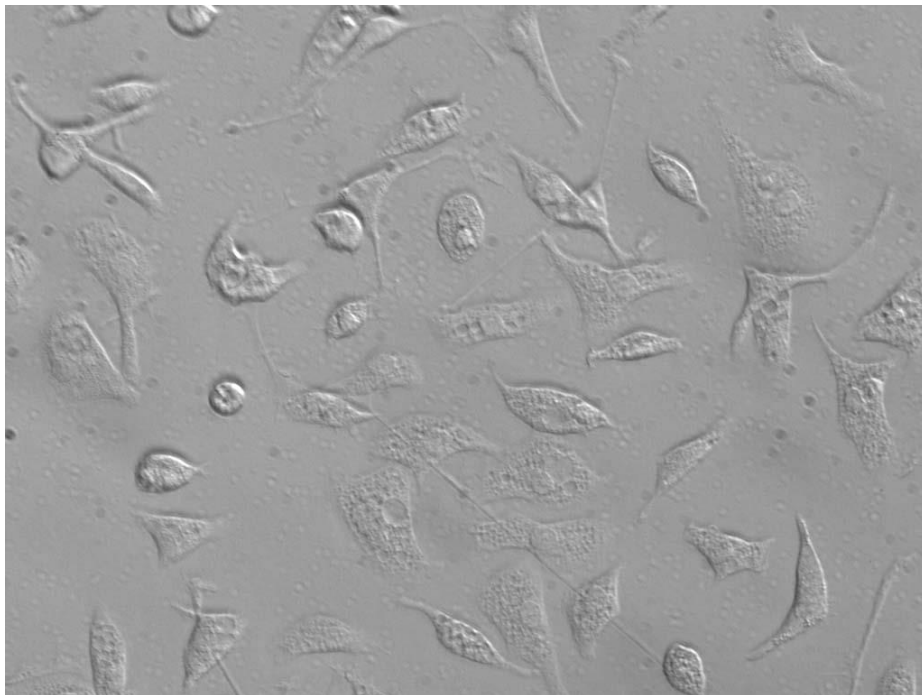
Молекула  
флуоресцеина  
а



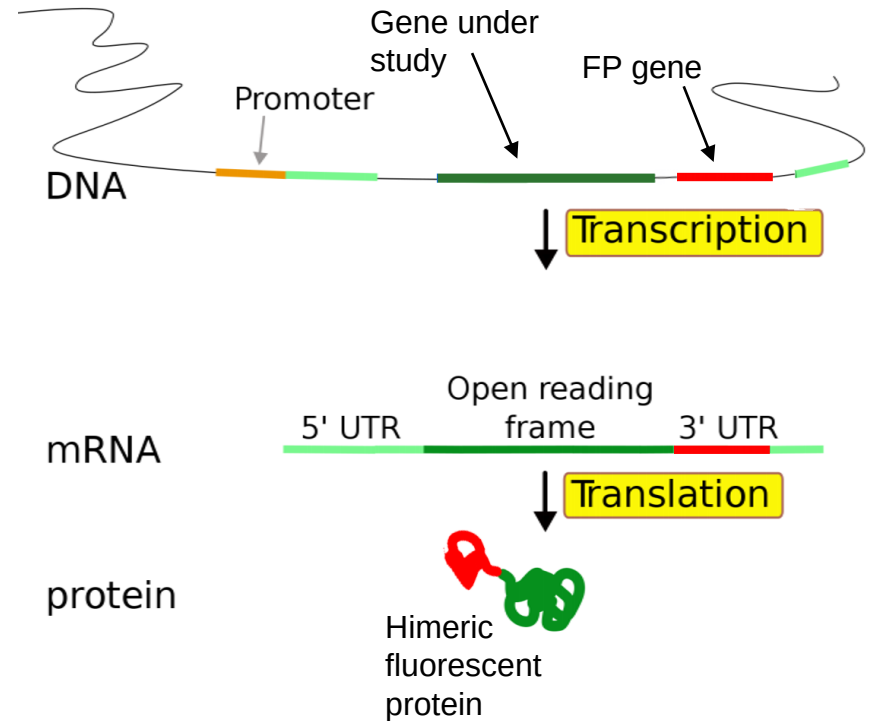
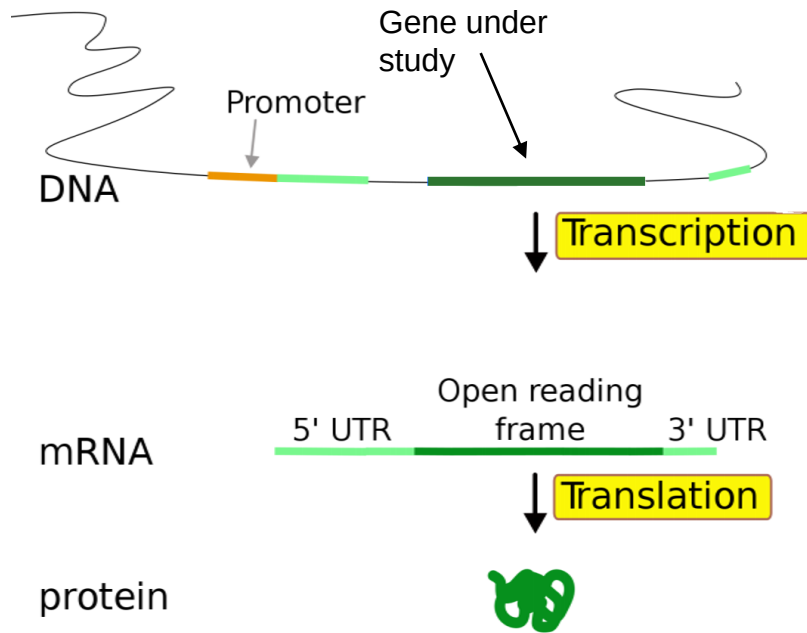
# Мечение белковых молекул флуоресцентными метками



# Мечение белковых молекул флуоресцентными метками



# Экспрессия химерных белков



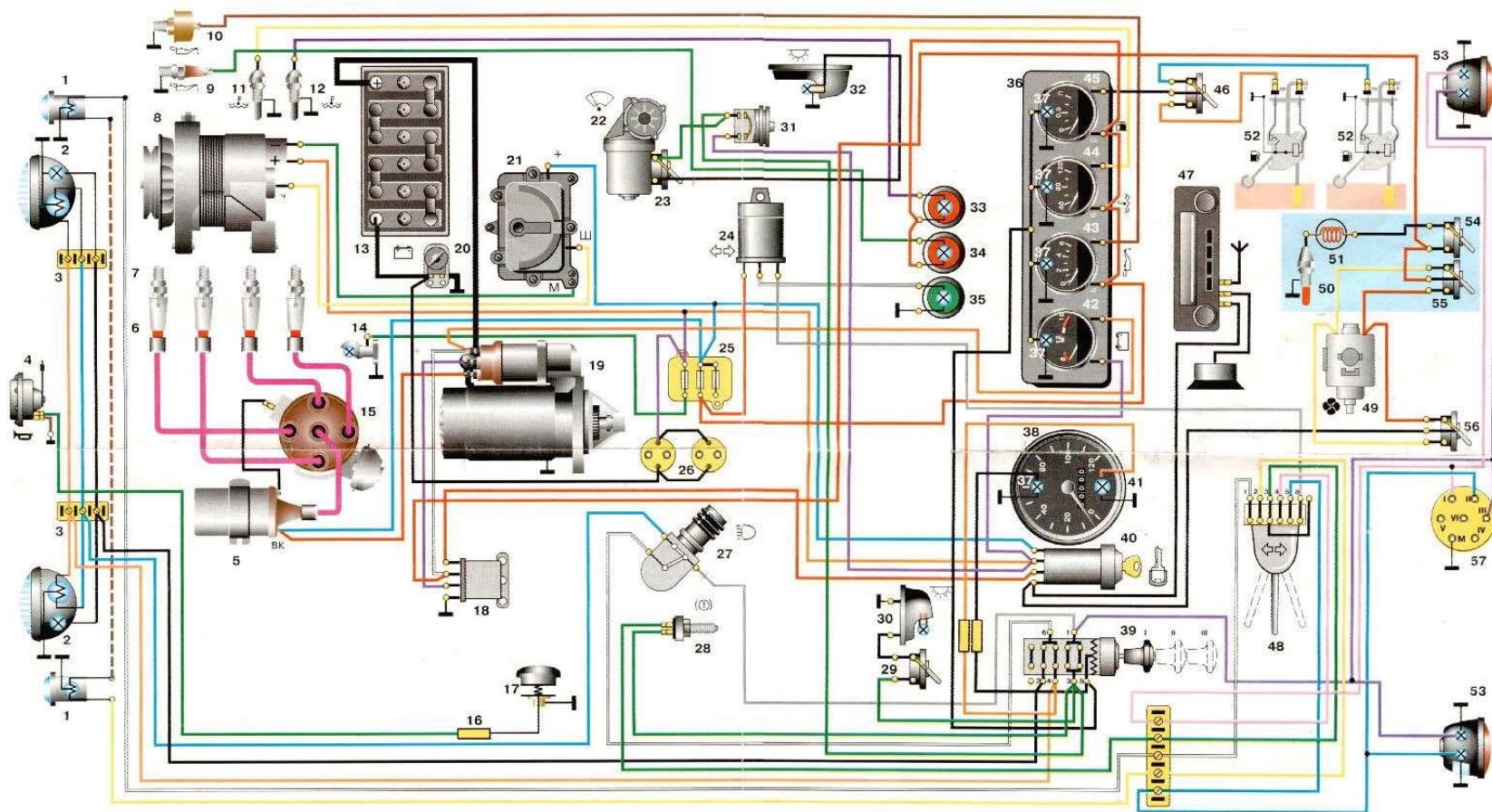


# Экспрессия химерных белков



# Конектосомика – наука о «деталях» и «соединениях» в мозге

## СХЕМА ЭЛЕКТРООБОРУДОВАНИЯ АВТОМОБИЛЕЙ УАЗ-469

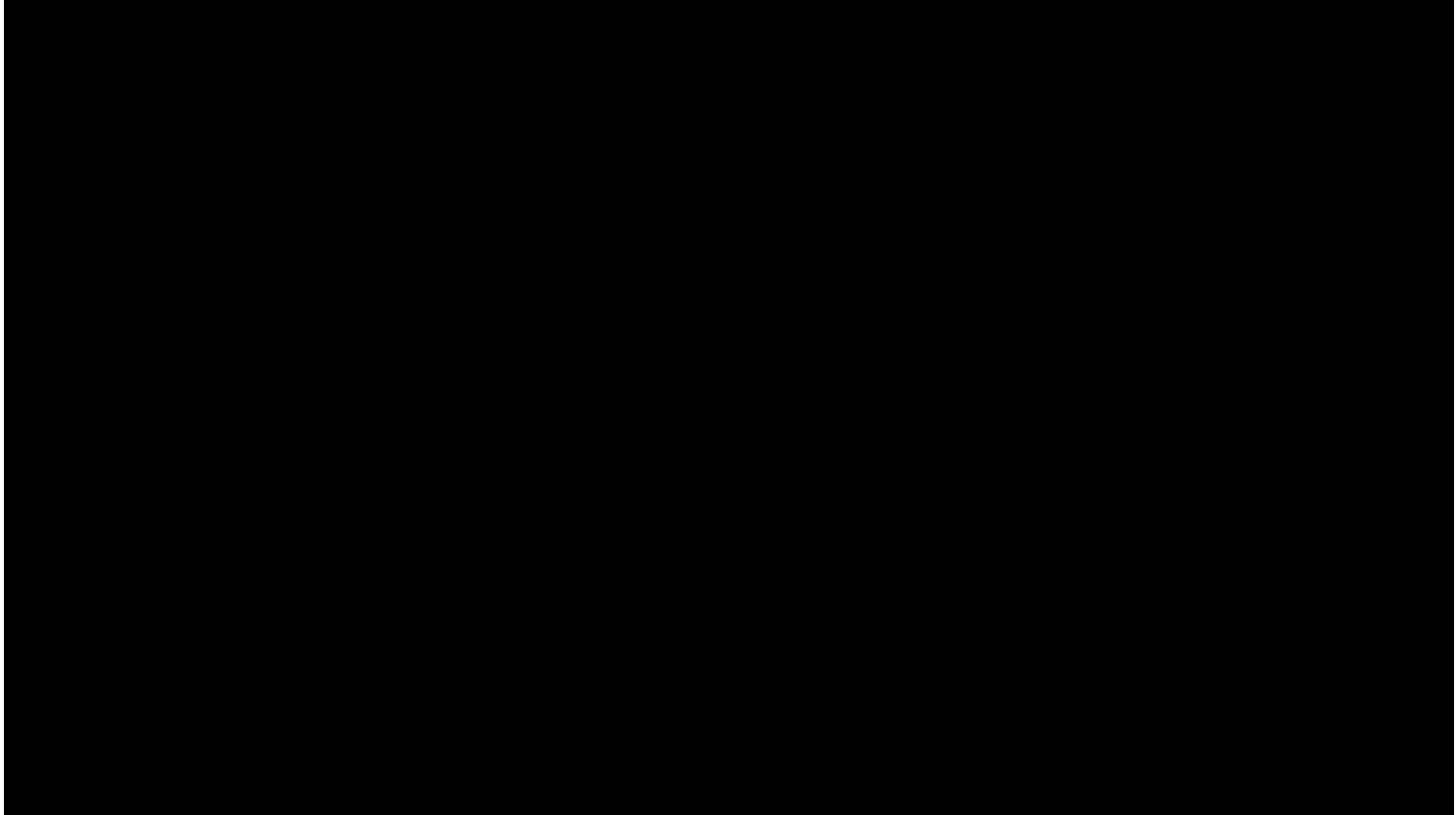


1 – подфарники и указатели поворота; 2 – фары; 3 – соединительная панель; 4 – звуковой сигнал; 5 – катушка зажигания; 6 – помехоподавительные резисторы; 7 – свечи зажигания; 8 – генератор; 9 – датчик сигнализатора аварийного давления масла; 10 – датчик указателя давления масла; 11 – датчик указателя температуры охлаждающей жидкости в блоке двигателя; 12 – датчик контрольной лампы охлаждающей жидкости в радиаторе; 13 – аккумуляторная батарея; 14 – подкапотная лампа; 15 – прерыватель-распределитель зажигания; 16 – соединительная колодка; 17 – кнопка звукового сигнала; 18 – реле включения стартера; 19 – стартер; 20 – выключатель «массы»; 21 – регулятор напряжения; 22 – электродвигатель стеклоочистителя; 23 – выключатель электродвигателя стеклоочистителя; 24 – прерыватель указателей поворотов; 25 – блок плашек предохранителей; 26 – штепсельные розетки; 27 – ножной переключатель света; 28 – выключатель стоп-сигнала; 29 – выключатель освещения кабины; 30 – фонарь освещения кабины; 31 – тепловой предохранитель; 32 – плафон кузова; 33 – сигнализатор температуры охлаждающей жидкости в радиаторе; 34 – сигнализатор аварийного давления масла; 35 – контрольная лампа указателя поворота; 36 – комбинация приборов; 37 – лампы освещения кабины; 38 – спидометр; 39 – центральный переключатель света; 40 – выключатель зажигания; 41 – индикатор дальнего света фар; 42 – амперметр; 43 – указатель давления масла; 44 – указатель температуры охлаждающей жидкости; 45 – указатель уровня топлива; 46 – переключатель датчиков бензобаков; 47 – радиоприемник; 48 – переключатель указателей поворотов; 49 – электродвигатель отопителя; 50 – свеча накаливания; 51 – контрольная спираль свечи накаливания; 52 – датчик указателя уровня топлива; 53 – задние фары; 54 – выключатель свечи накаливания; 55 – переключатель электродвигателя отопителя; 56 – выключатель электродвигателя отопителя; 57 – штепсельная розетка прицепа.

Ткани непрозрачны.

Как заглянуть внутрь организма?

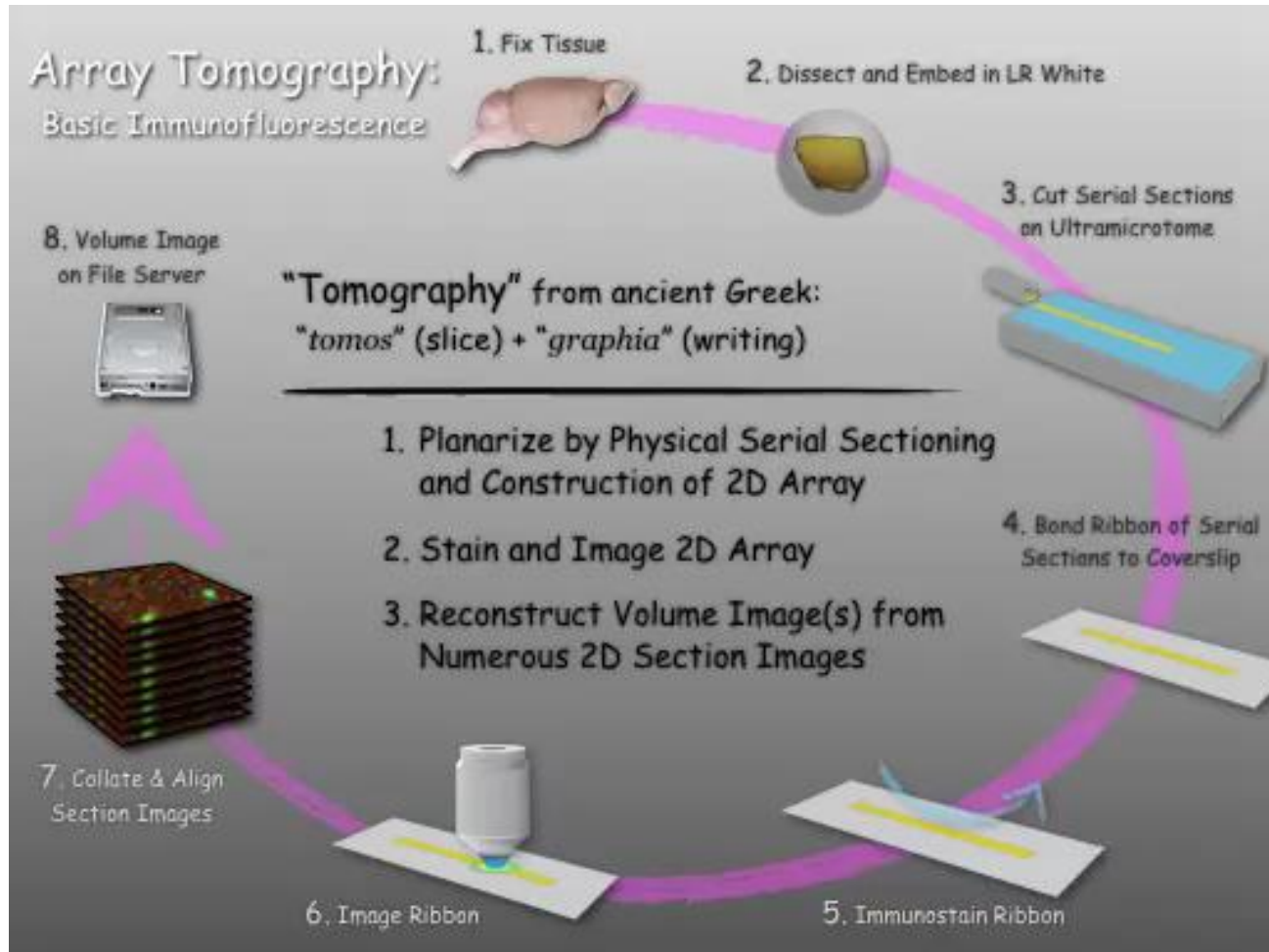
# Нематода *C. elegans* прекрасный прозрачный объект для исследования



<https://www.youtube.com/watch?v=zjqLwPgLnV0>

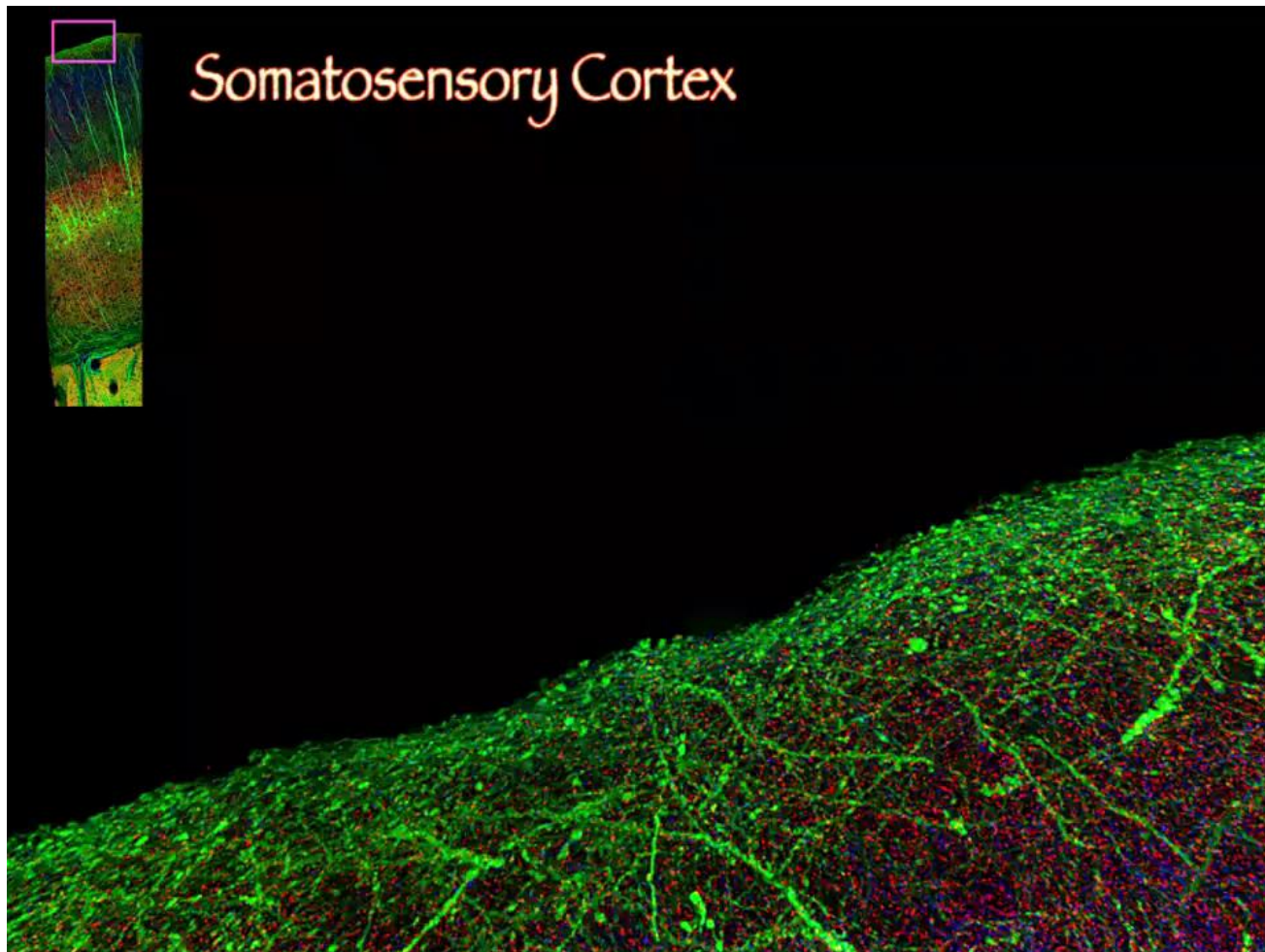
2 хв  
10с

# Комплексная Томография

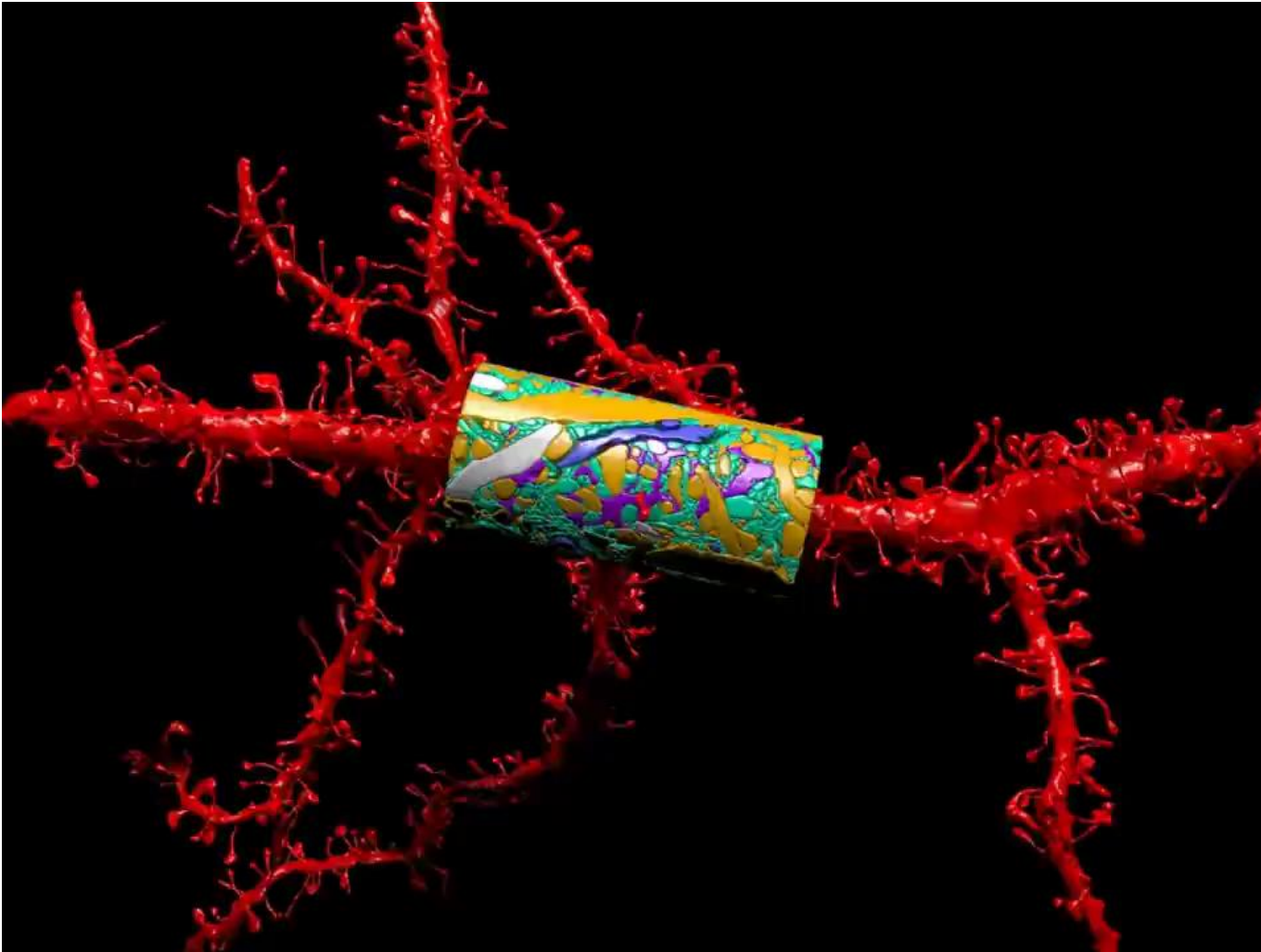




# Комплексная Томография Кору Головного Мозга Мыши



# Конектосомы Кору Головного Мозга Мыши

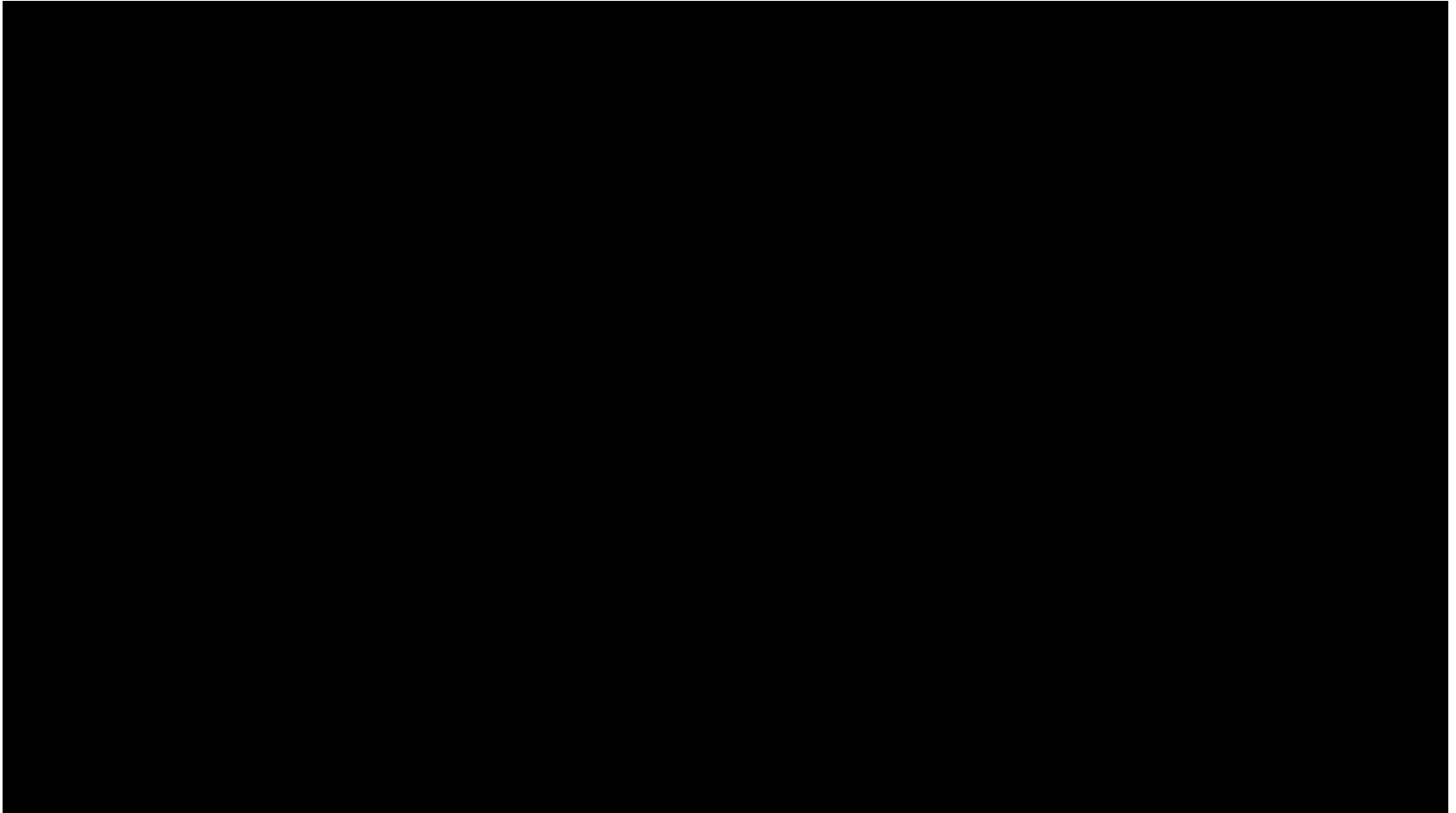


Все нейриты в малой части коры мозга мыши

20c

<http://www.youtube.com/watch?v=-wg2WTPmeW4>

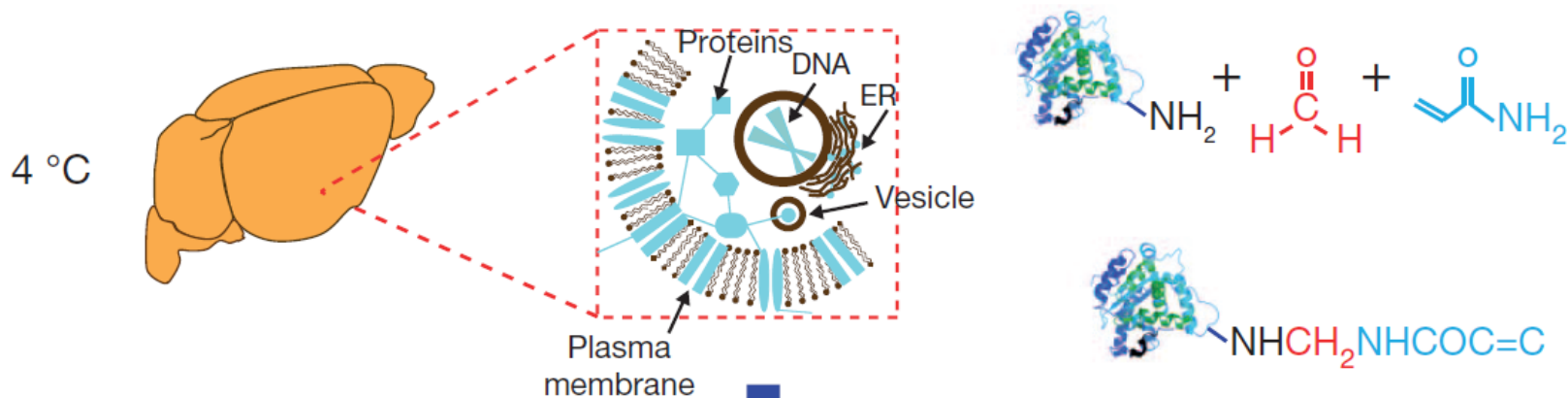
# Конектосомы Кору Головного Мозга Мыши



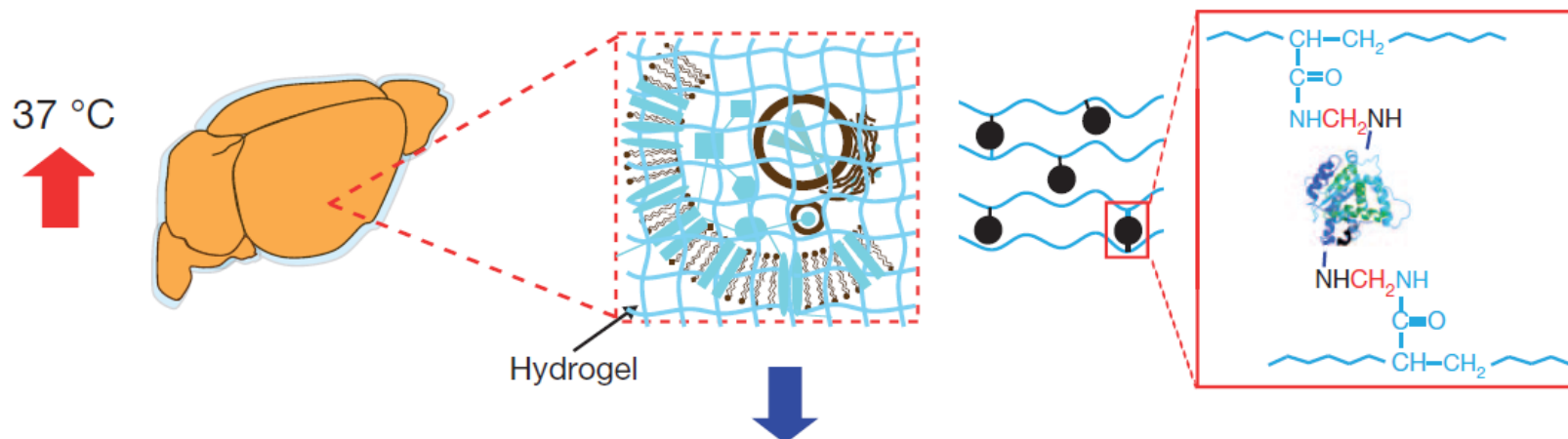


# Методика «ПРОЗРАЧНОСТИ»

Step 1: hydrogel monomer infusion (days 1–3)

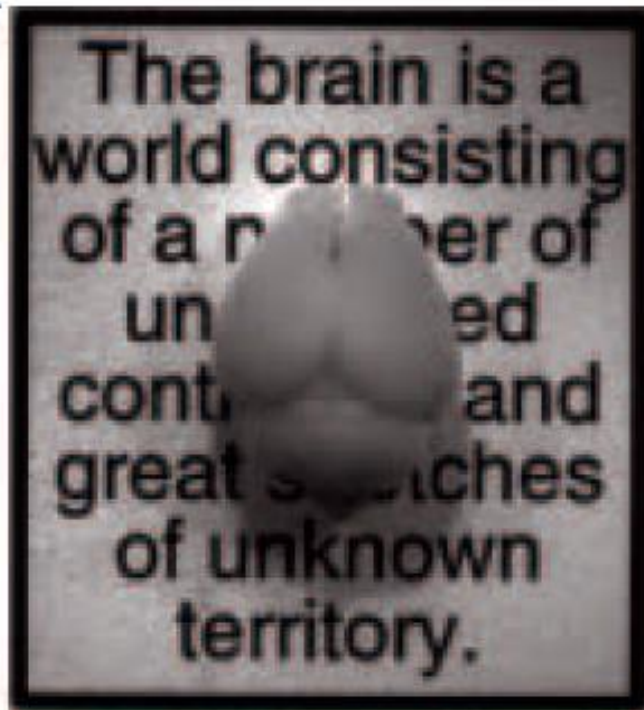


Step 2: hydrogel–tissue hybridization (day 3)

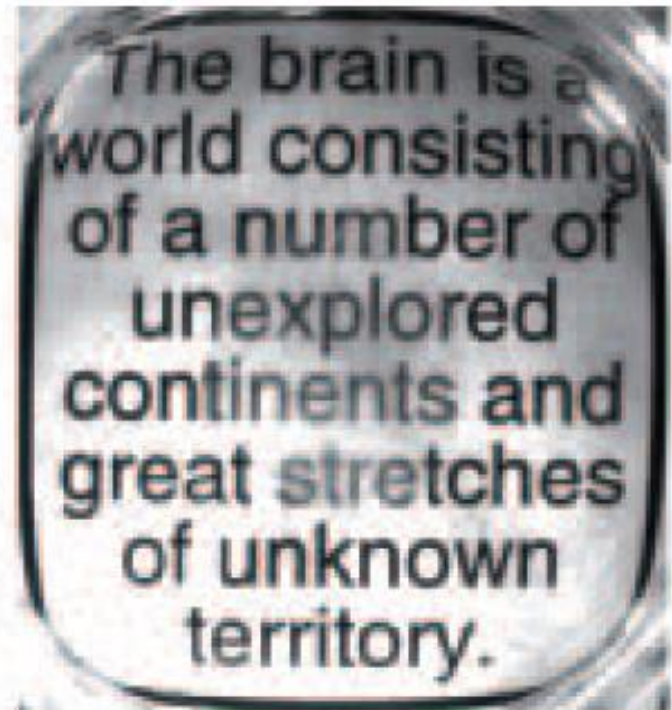


# Методика «ПРОЗРАЧНОСТИ»

Before



After CLARITY



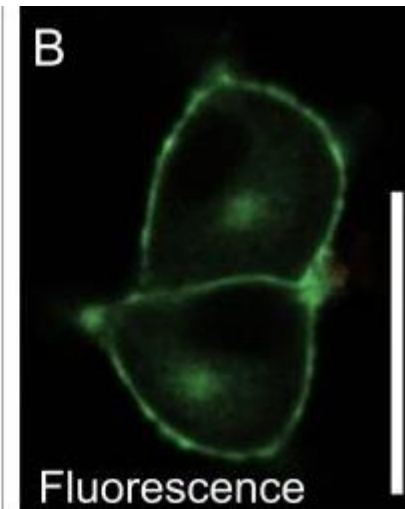
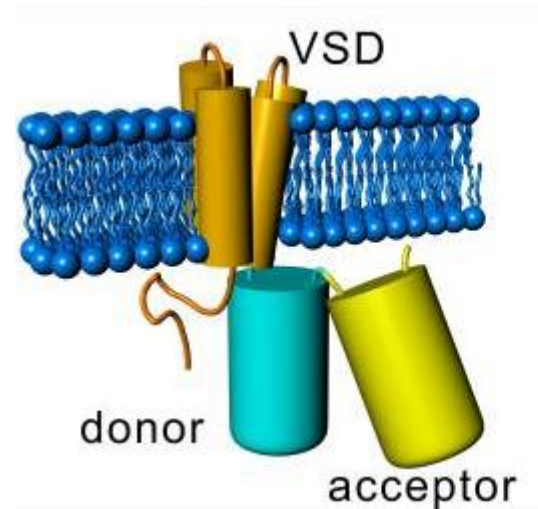
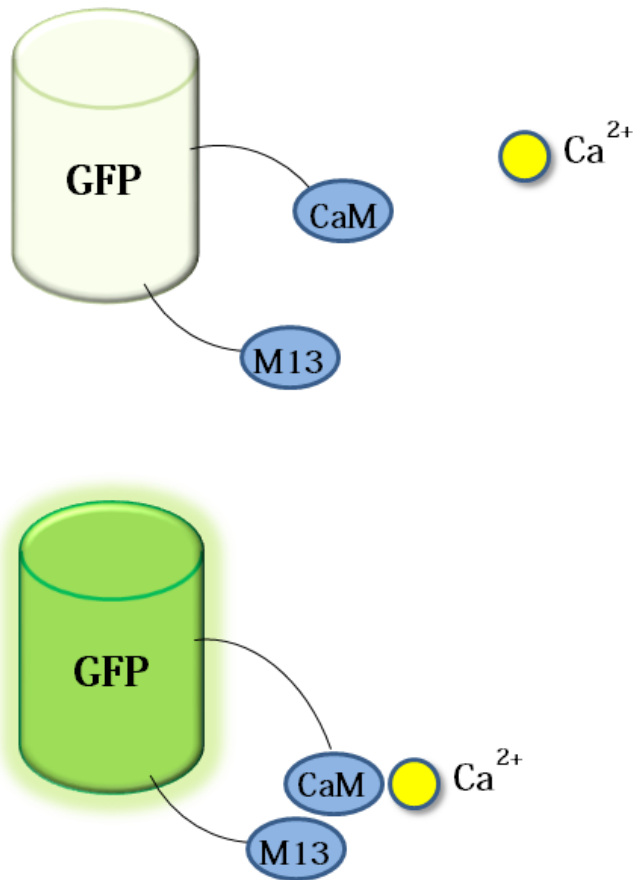
# Методика «ПРОЗРАЧНОСТИ»



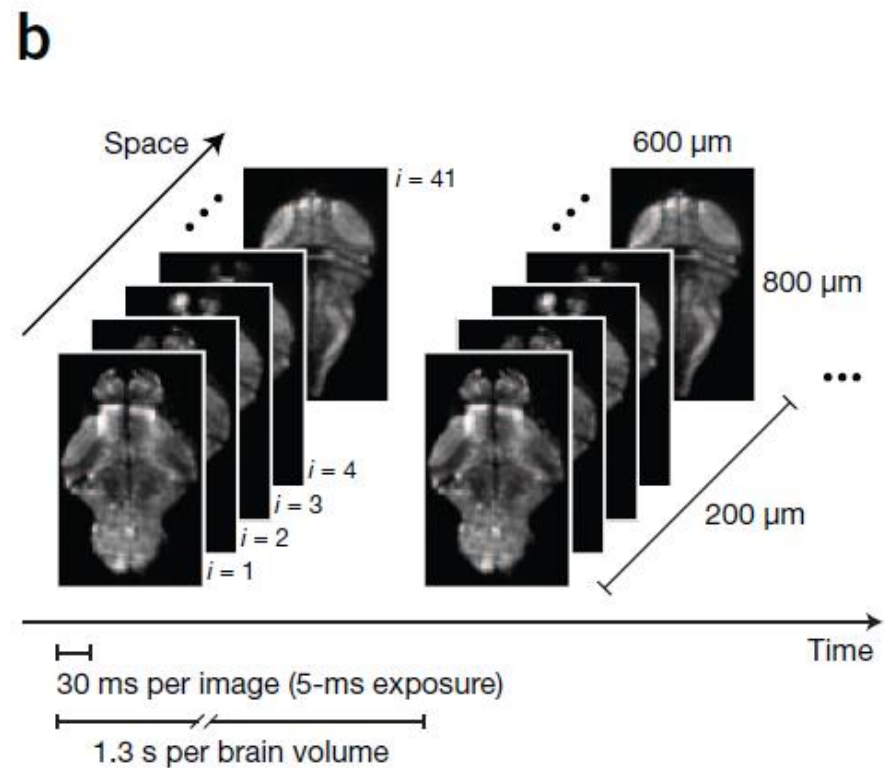
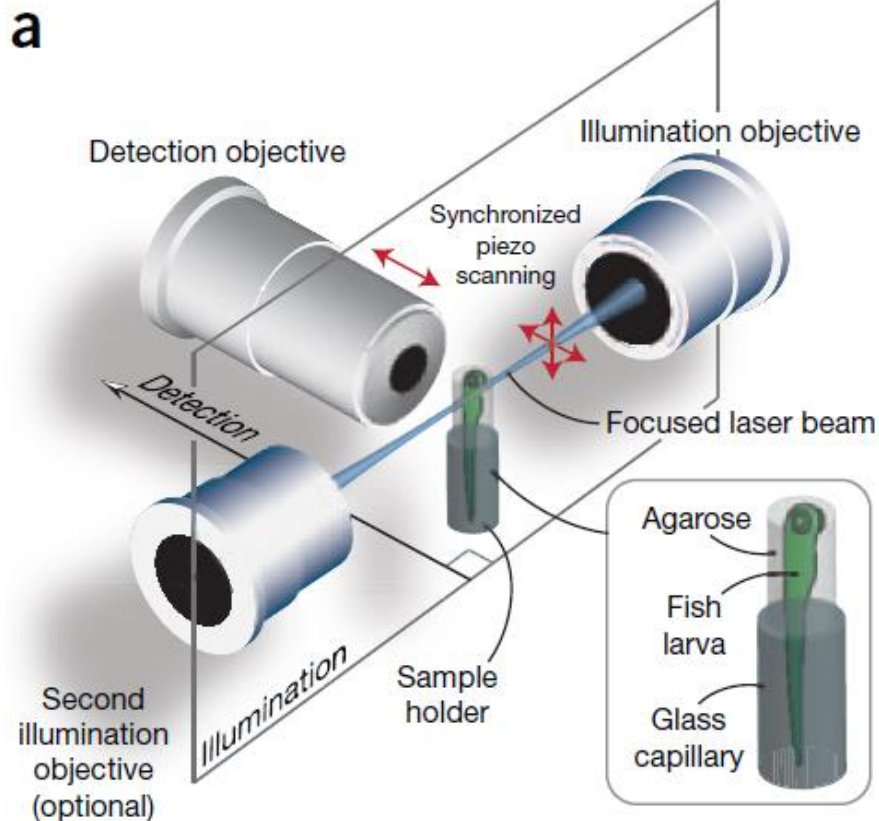
Исследование структуры и взаимосвязей нейронов не позволяет тем не менее понять как нейроны взаимодействуют в процессе нормальной жизнедеятельности организма.

***Как обеспечить возможности быстрой регистрации активности всех нейронов мозга?***

# Молекулы используемые для регистрации активности нейронов

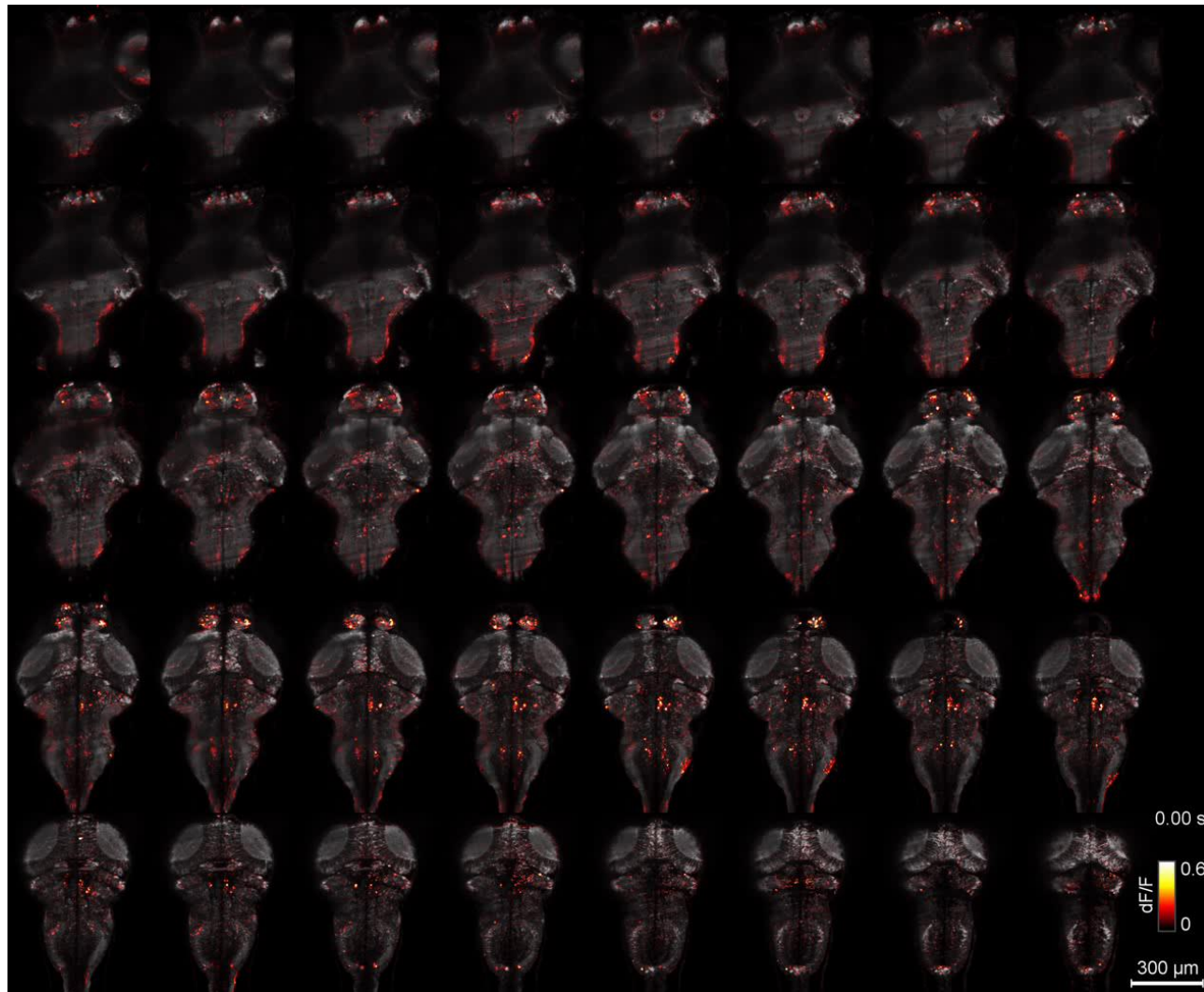


# «Листовая» микроскопия активности всех нейронов мозга личинки zebrafish



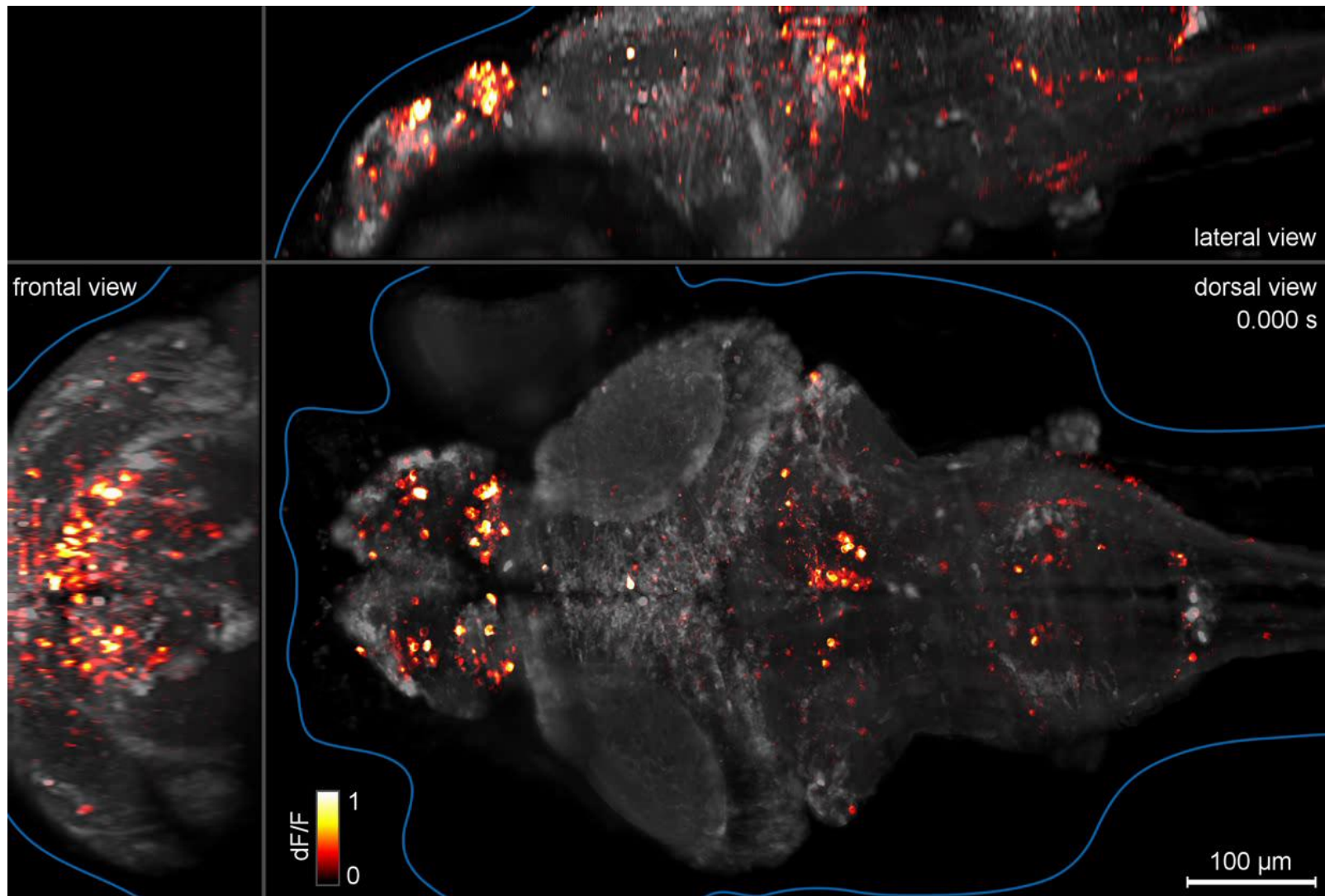


# Нейрональная активность всего мозга личинки zebrafish

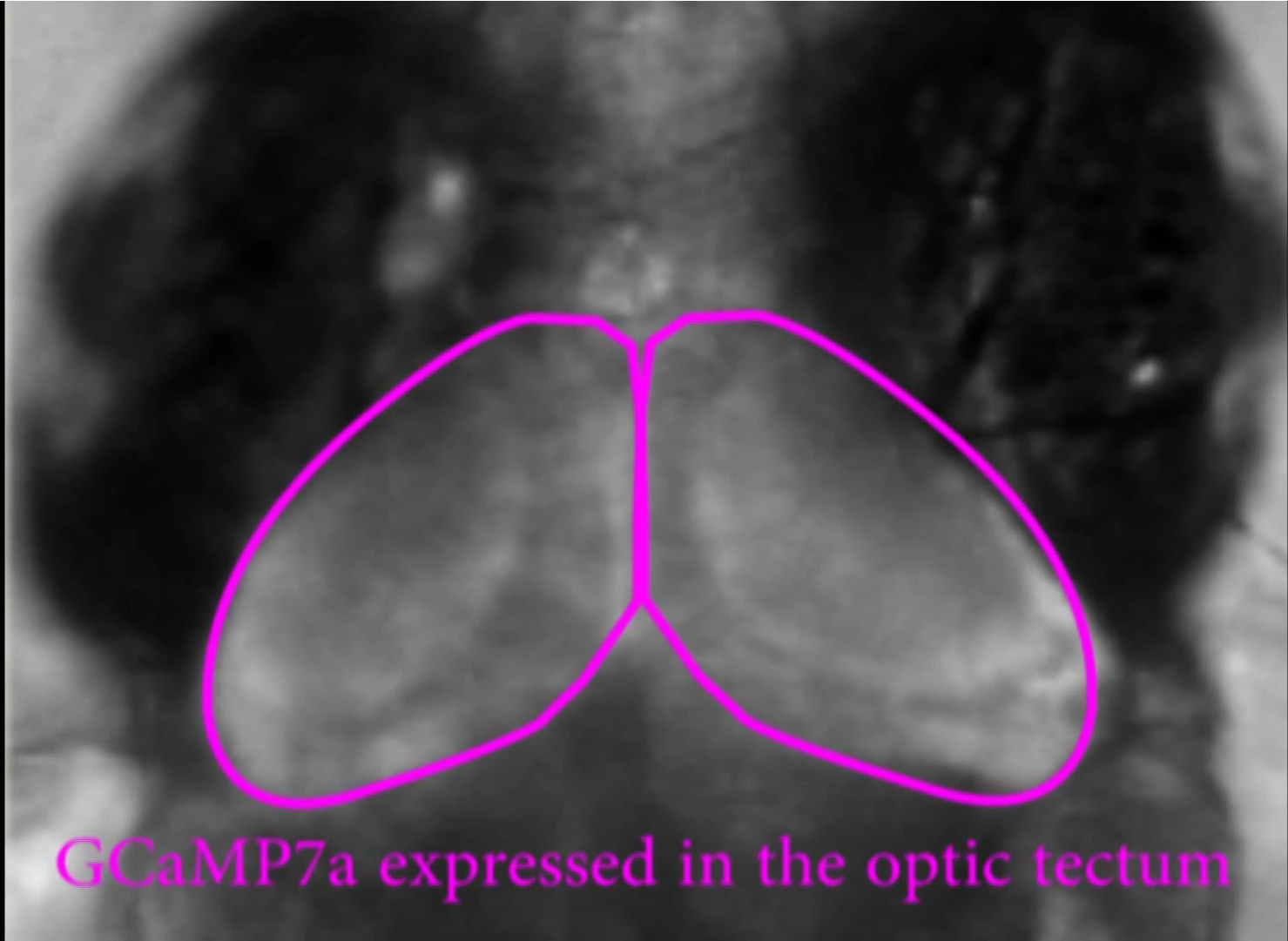




# 3D реконструкция нейрональной активности всего мозга личинки zebrafish



# Визуализация активности нейронов личинки zebrafish



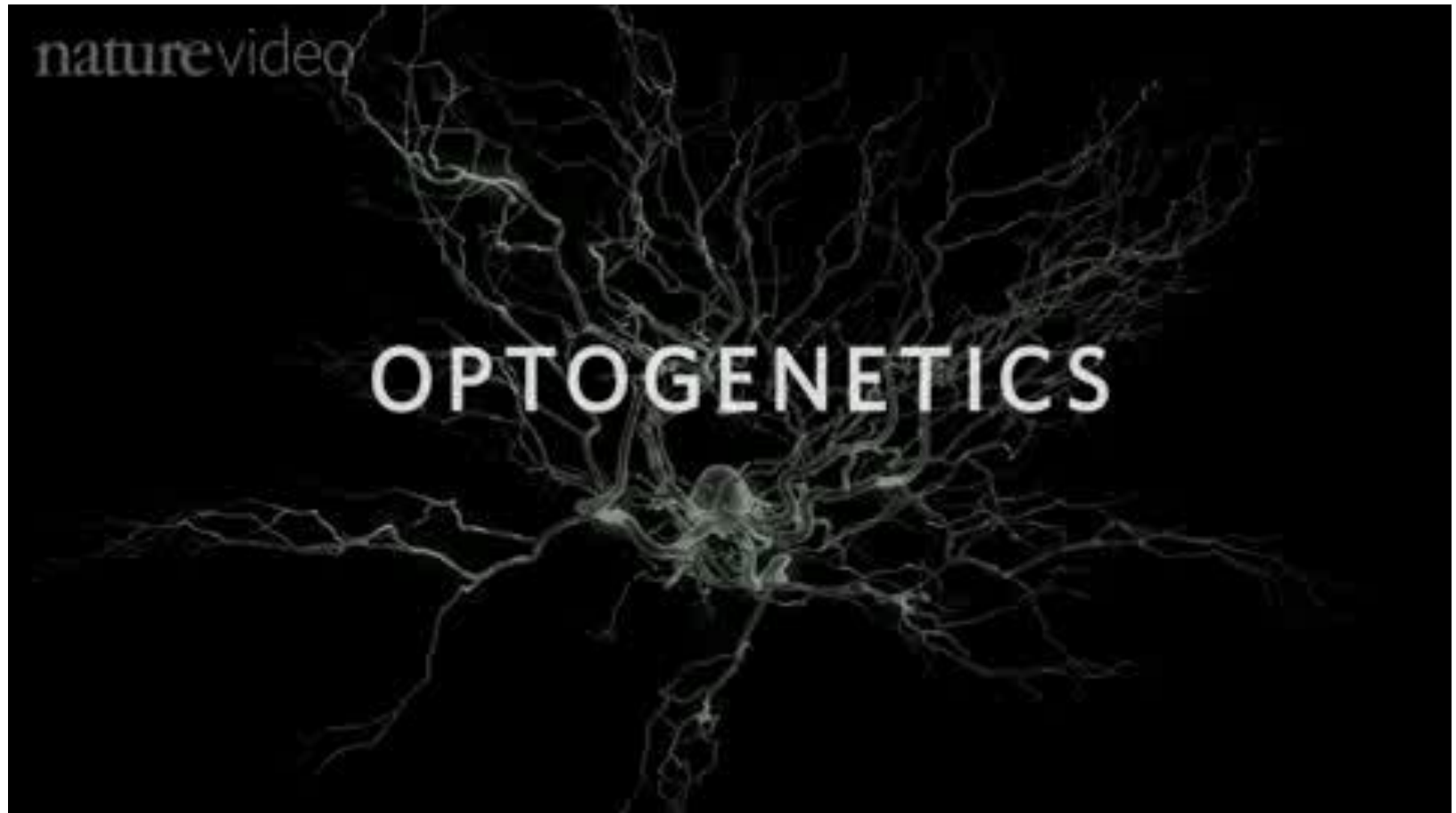
- Но можно ли не только исследовать клеточные процессы, но и управлять ими?

# Оптогенетика (Optogenetics)

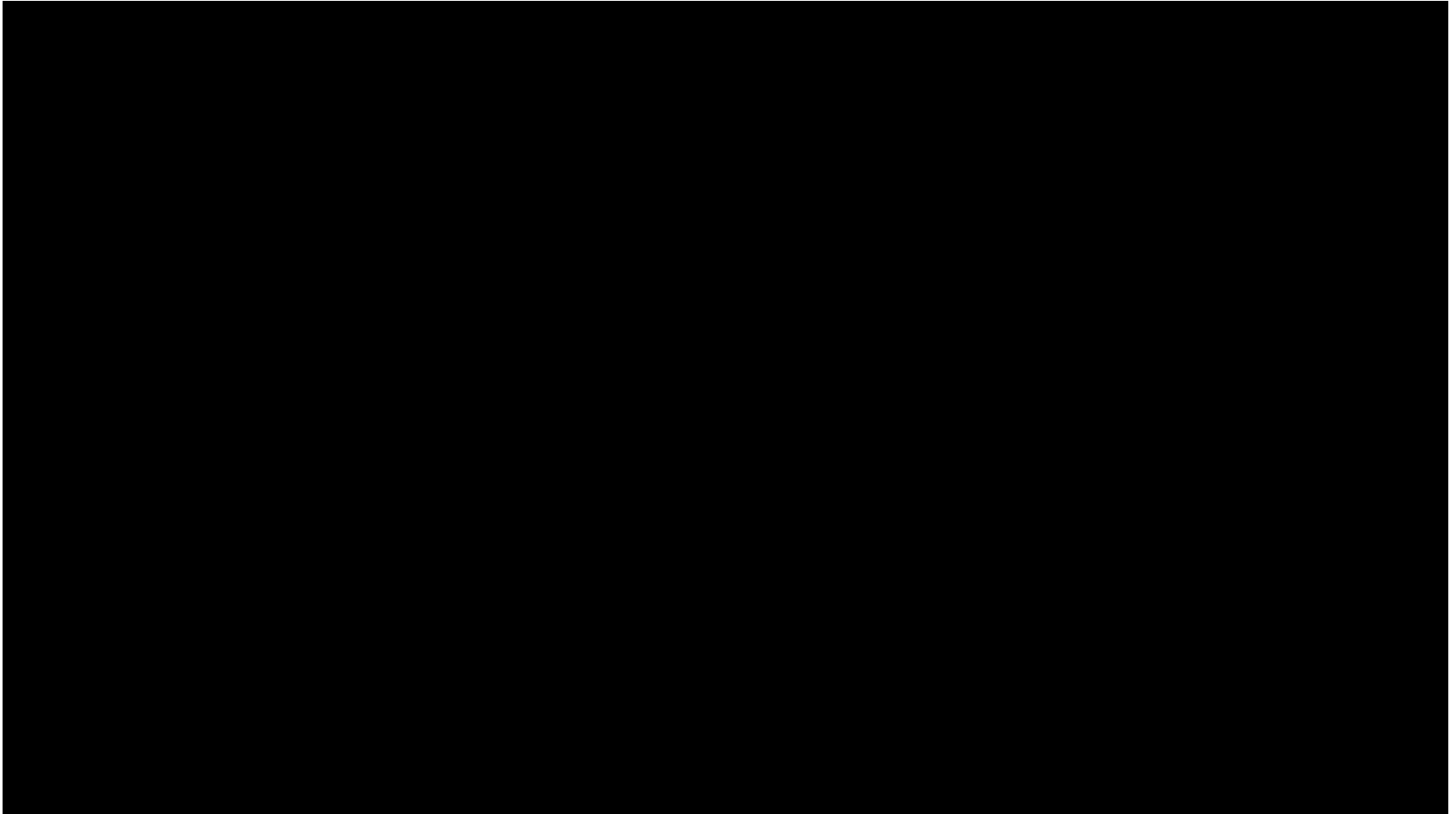
Оптогенетика это комбинация генетических и оптических методов с целью контролировать специфические события в определенных клетках живых тканей с миллисекундным временным разрешением.

**Optogenetics** is the combination of genetic and optical methods to control specific events in targeted cells of living tissue, even within freely moving [mammals](#) and other animals, with the temporal precision ([millisecond](#)-timescale) needed to keep pace with functioning intact biological systems.

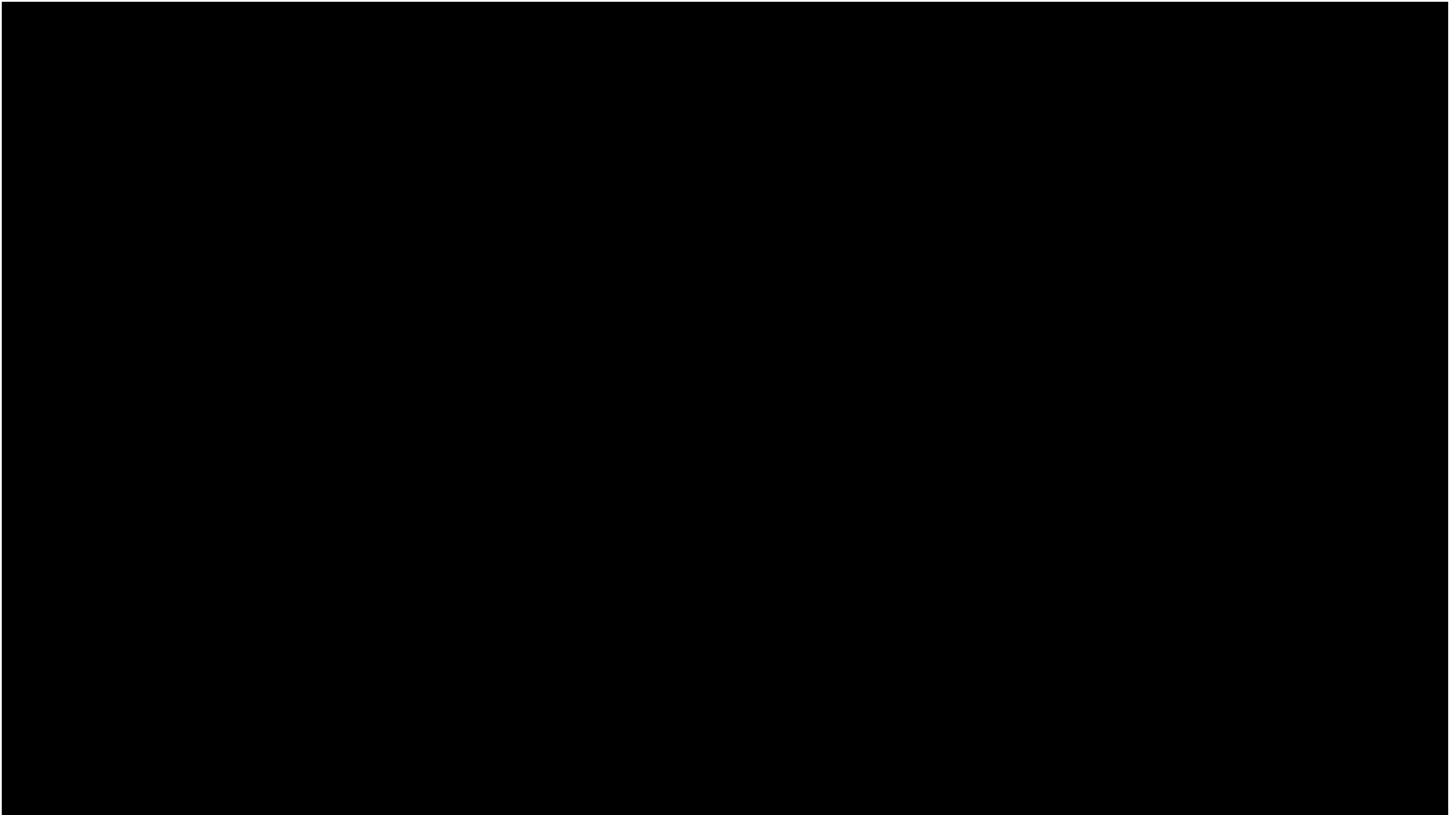
# Фоточувствительные бактерии – основатели оптогенетики



Каналородопсин (Channelrhodopsin (ChR2)) –  
«фототумблер», возбуждающий нейроны

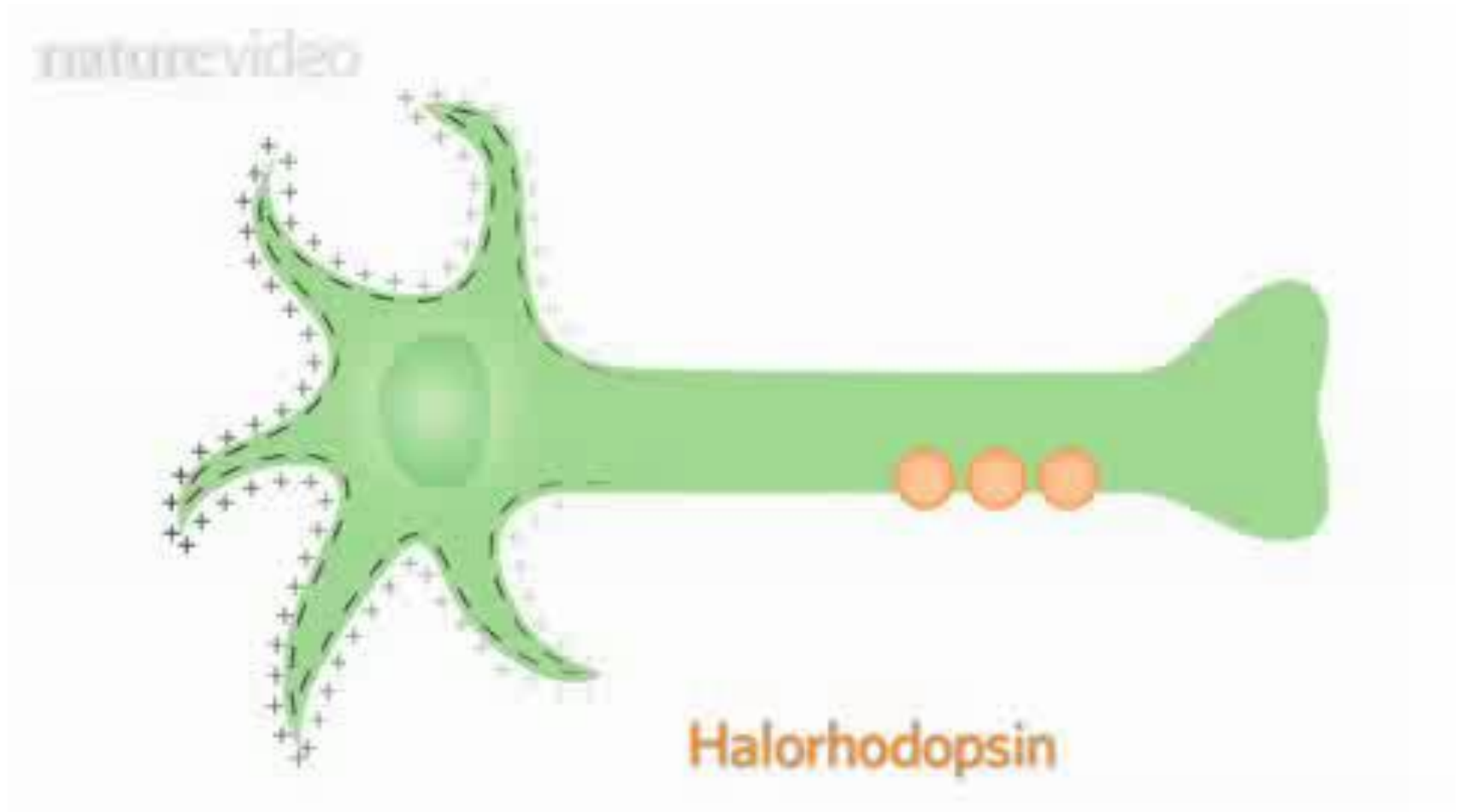


# Примеры того как каналородопсин может контролировать работу клеток и поведение простых организмов



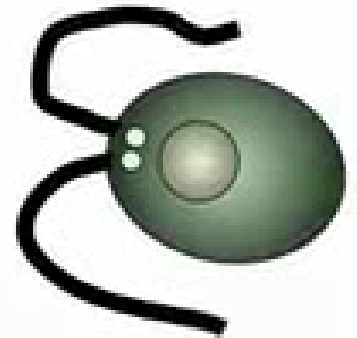


Халородопсин (Halorhodopsin (NpHR)) –  
«фототумблер», тормозящий нейроны



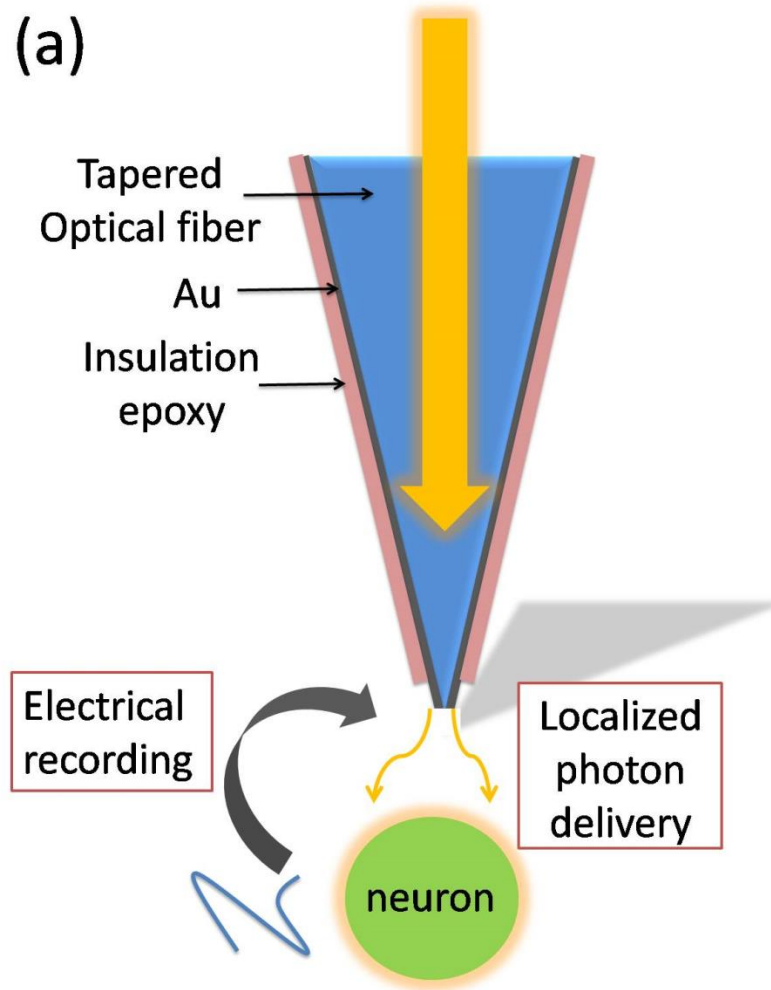
# Молекулярно-генетические подходы для введения оптогенетических конструкций в мозг

naturevideo

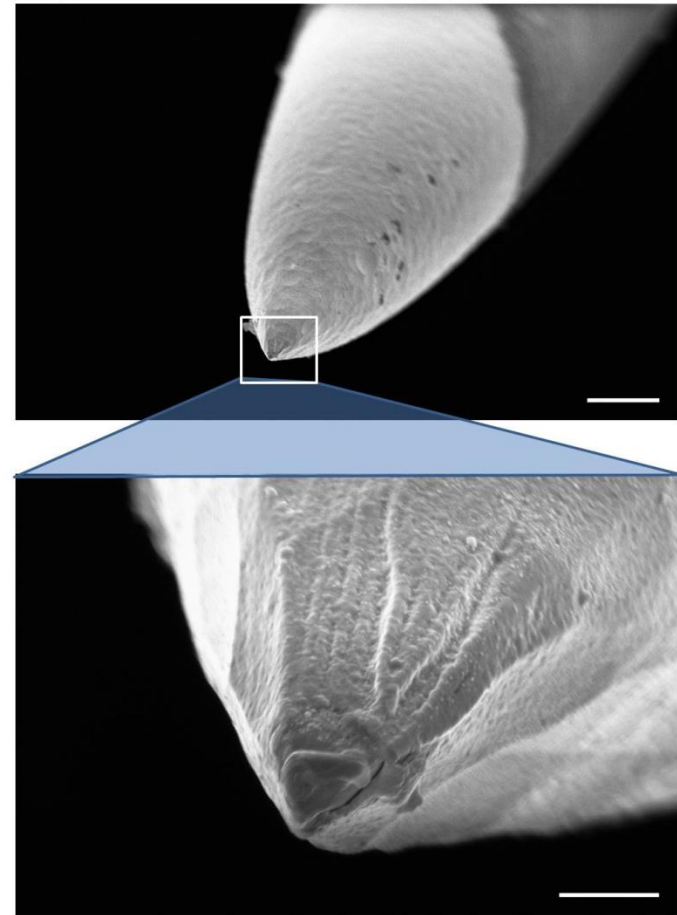


# Схема и ЭМ фотографии оптродов

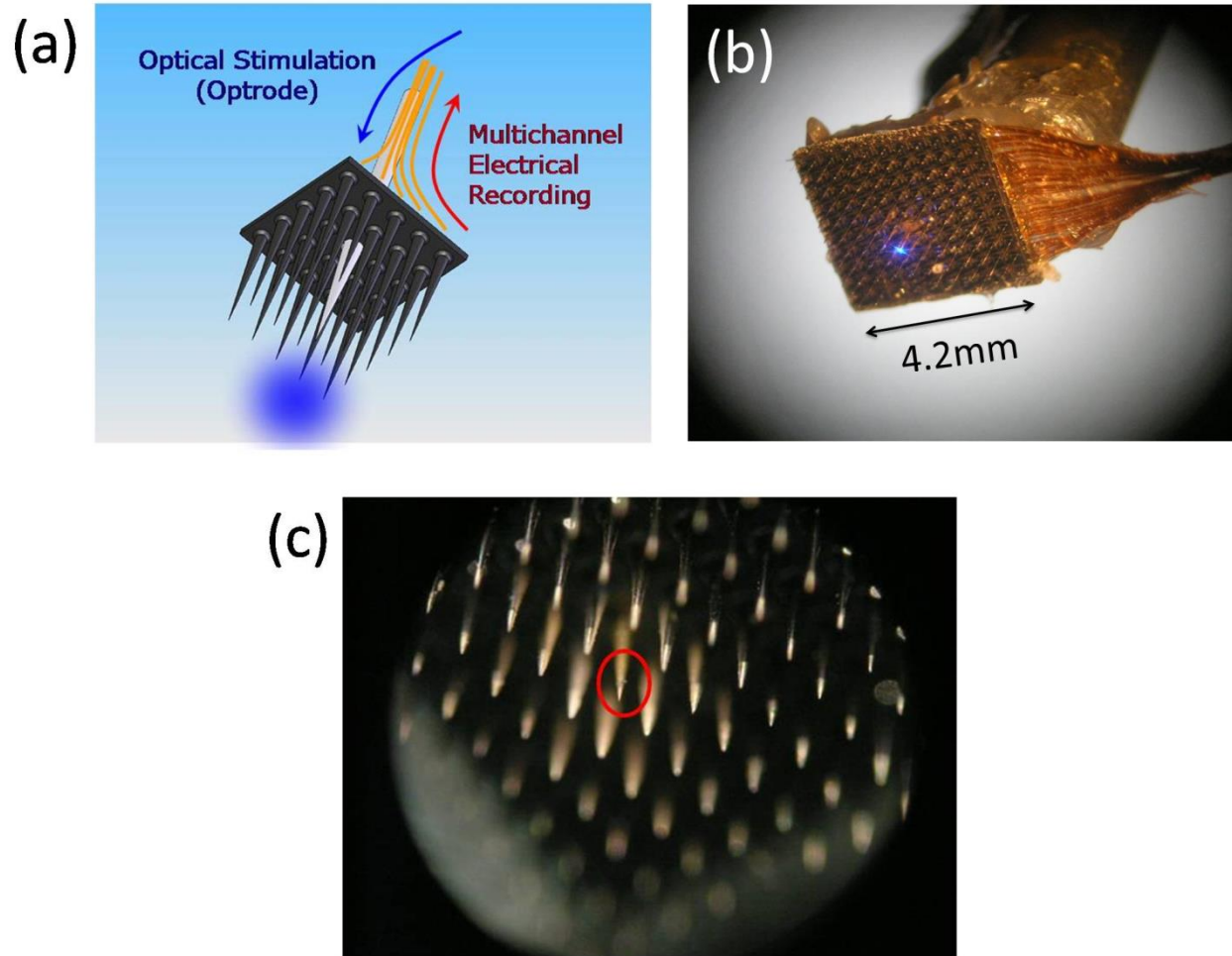
(a)



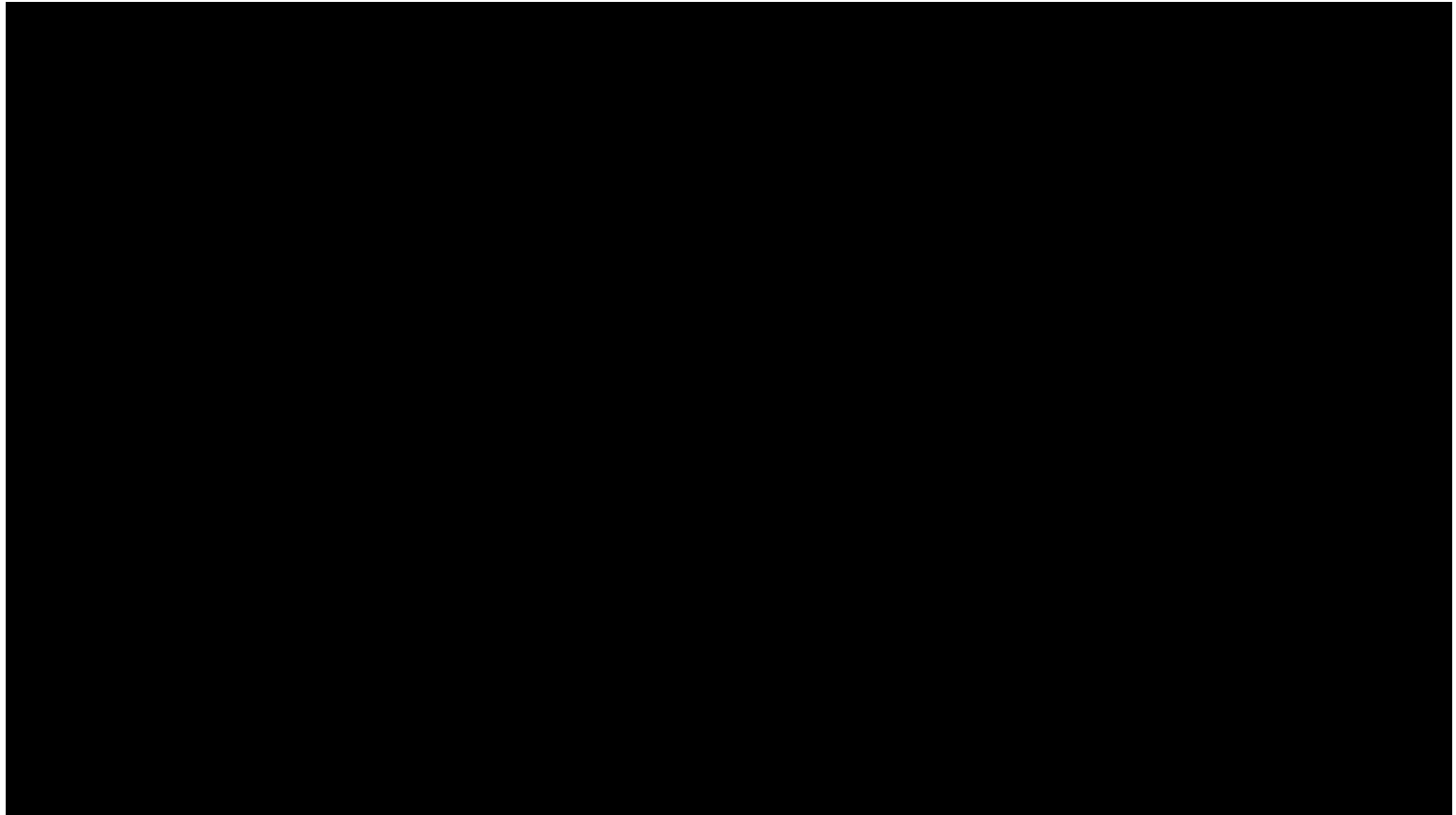
(b)



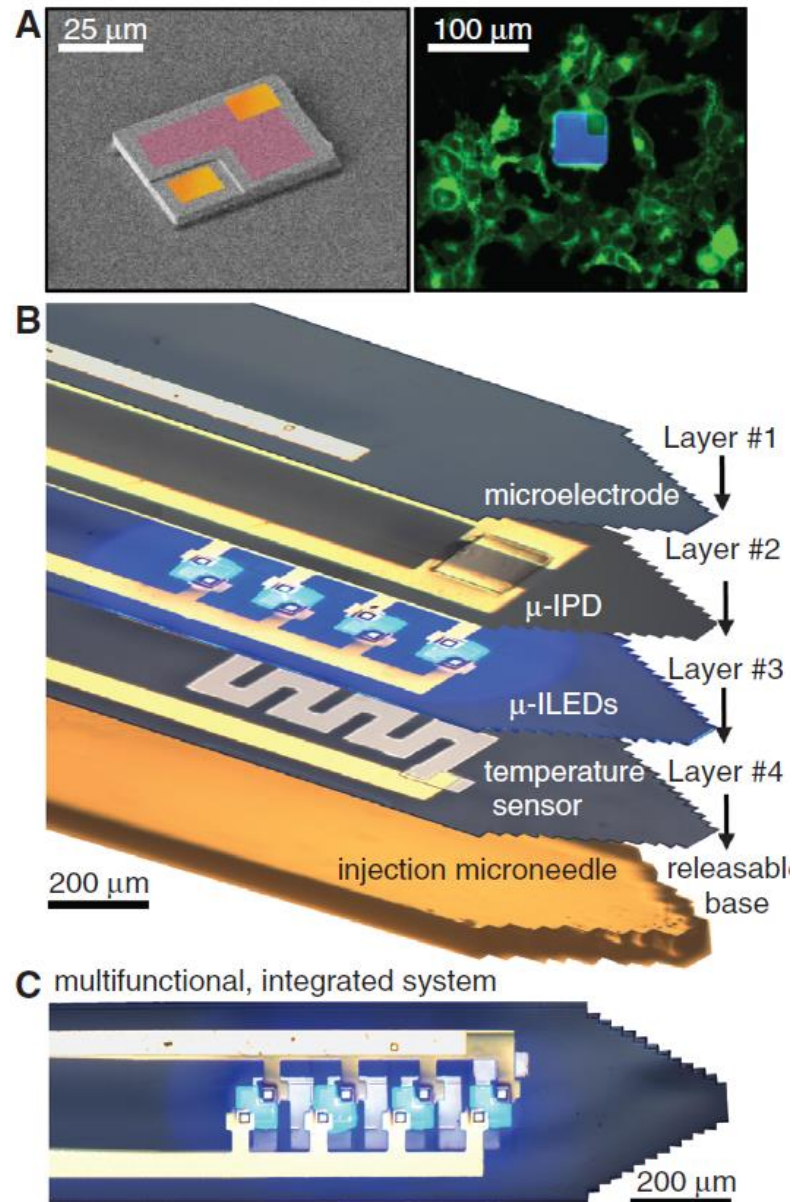
# Оптродные сборки



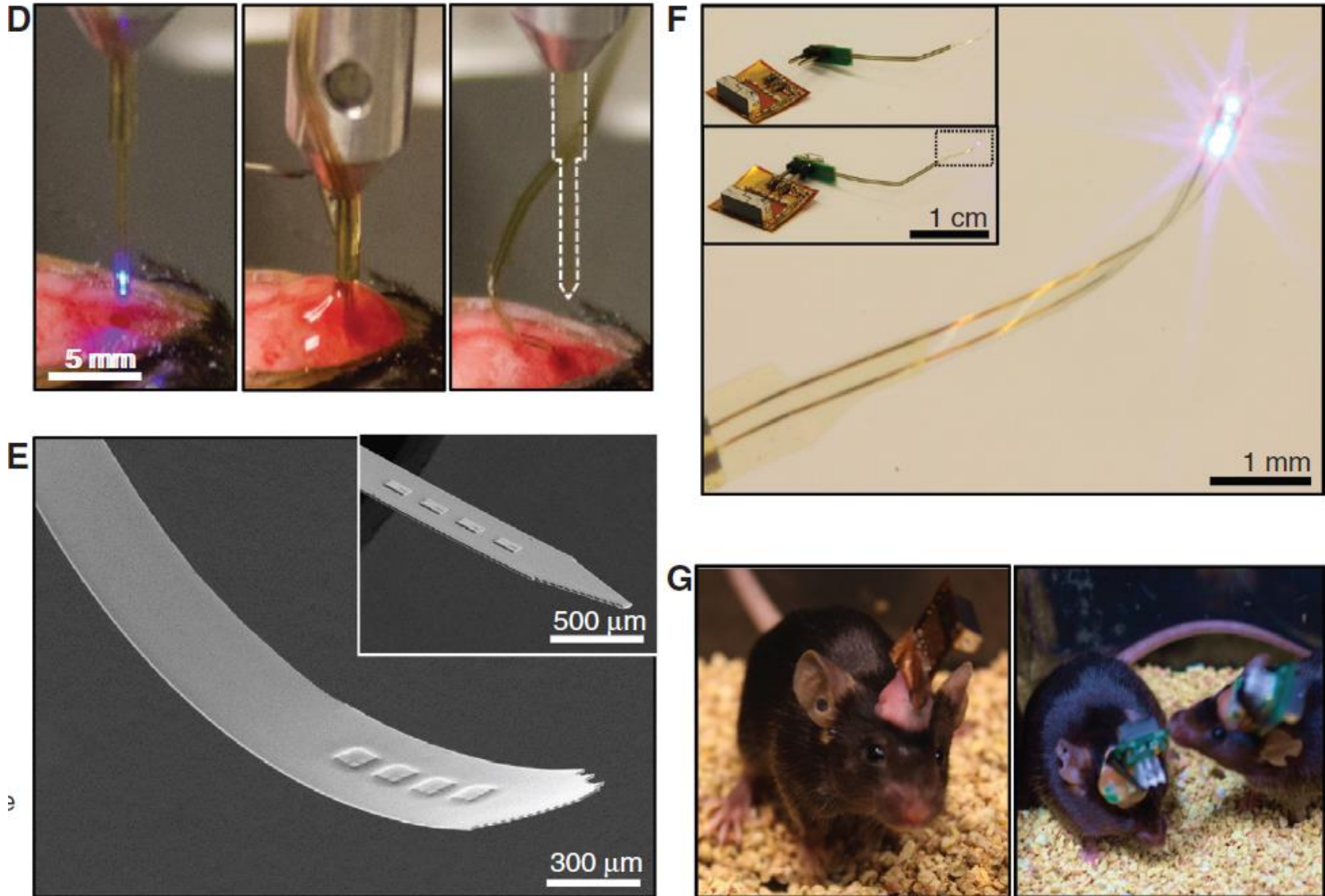
# Мыши специфически зараженные ChR2



# Инжектируемые, миниатюрные полупроводниковые приборы

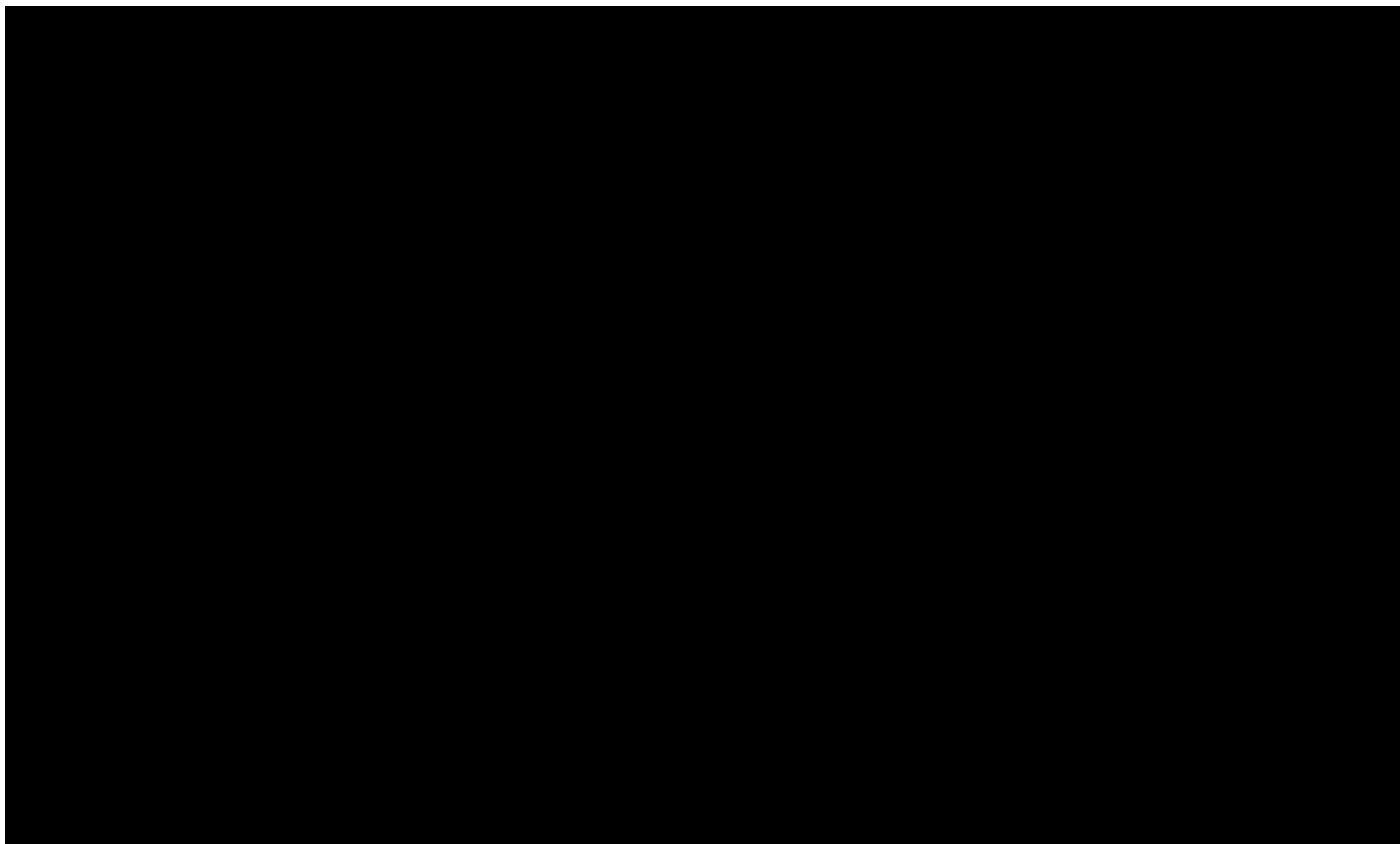


# Injectable, cellular-scale semiconductor devices

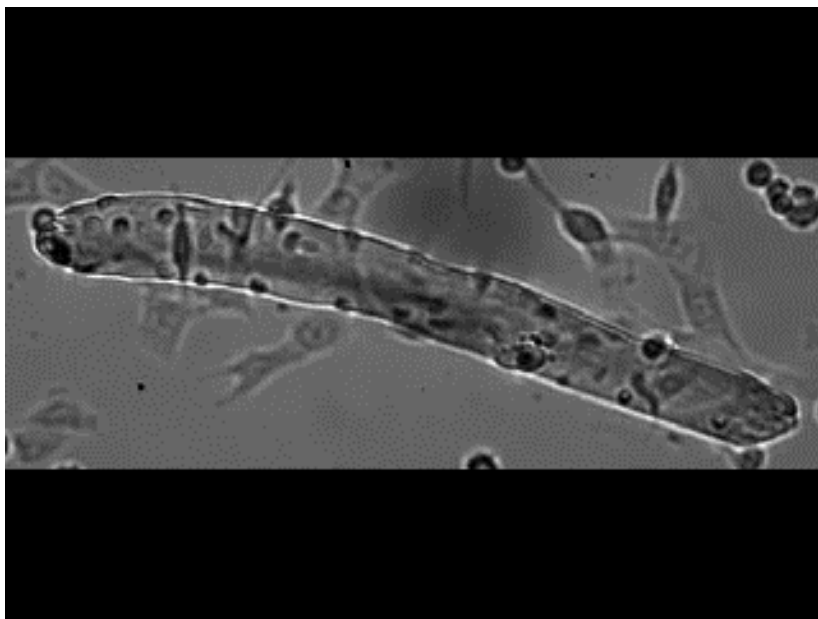




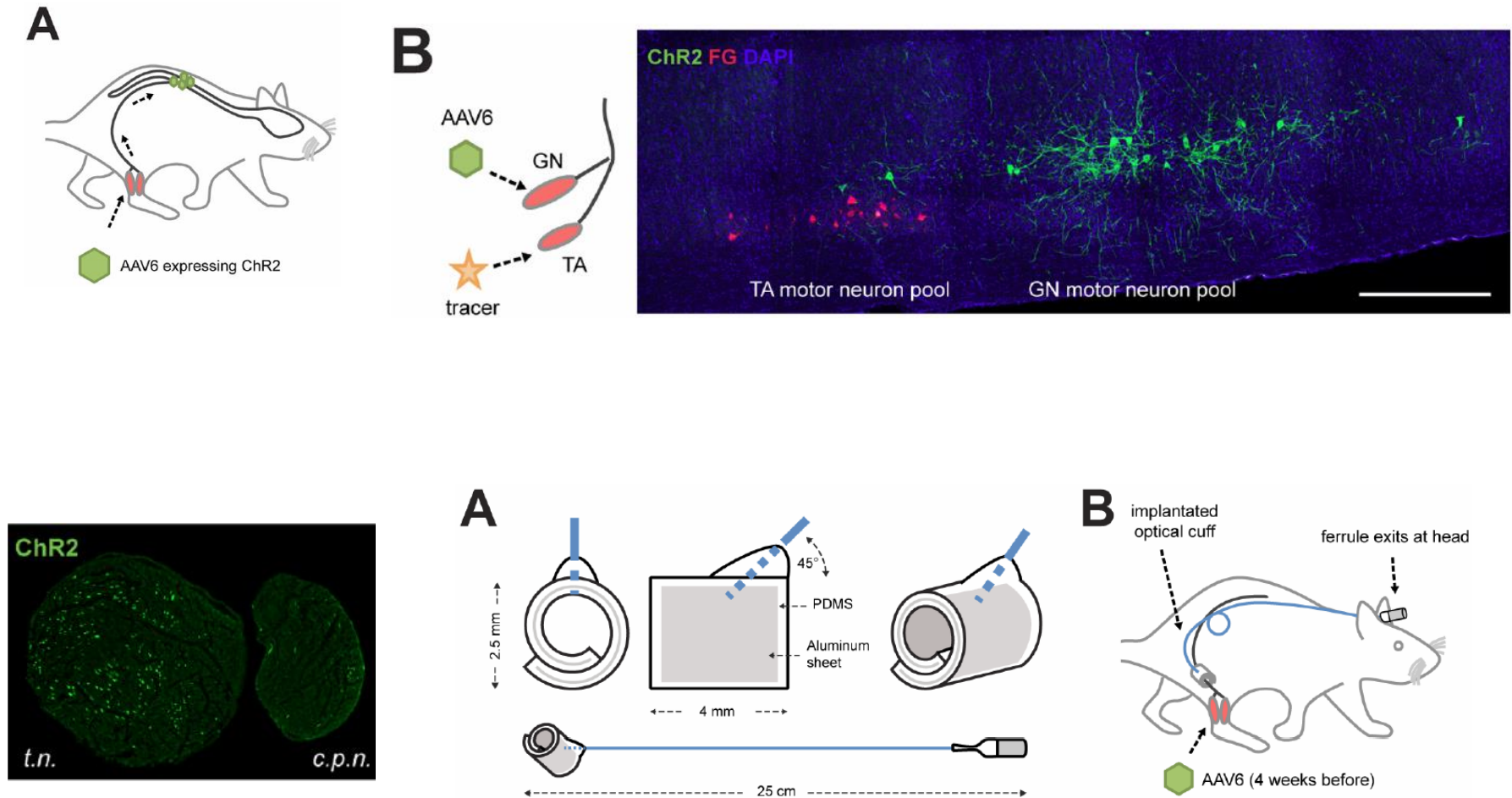
# Лечение боли с помощью оптогенетики



# Оптогенетический контроль сокращений мышц горла трансгенной мыши

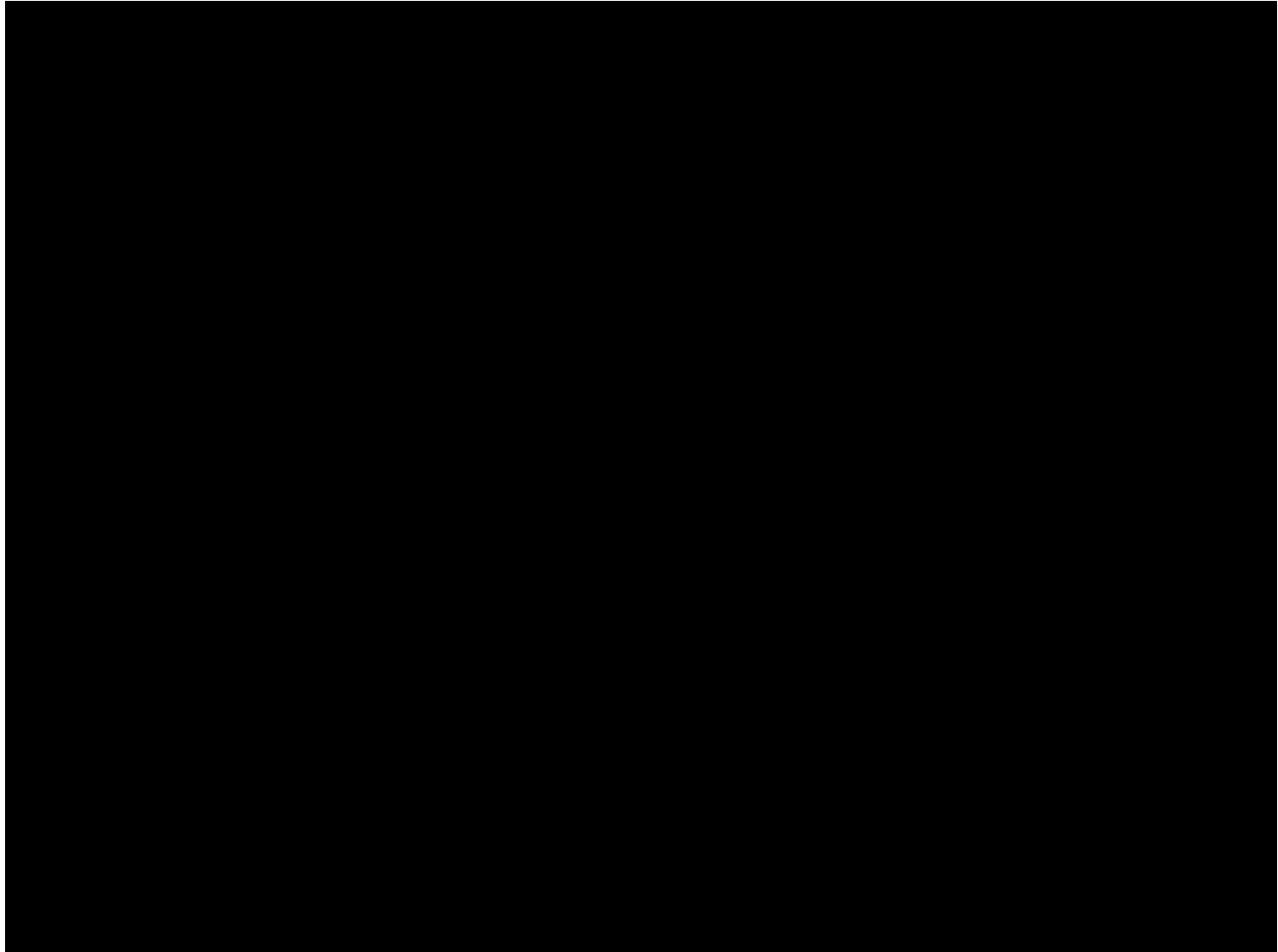


# Имплантируемый «оптический» нерв

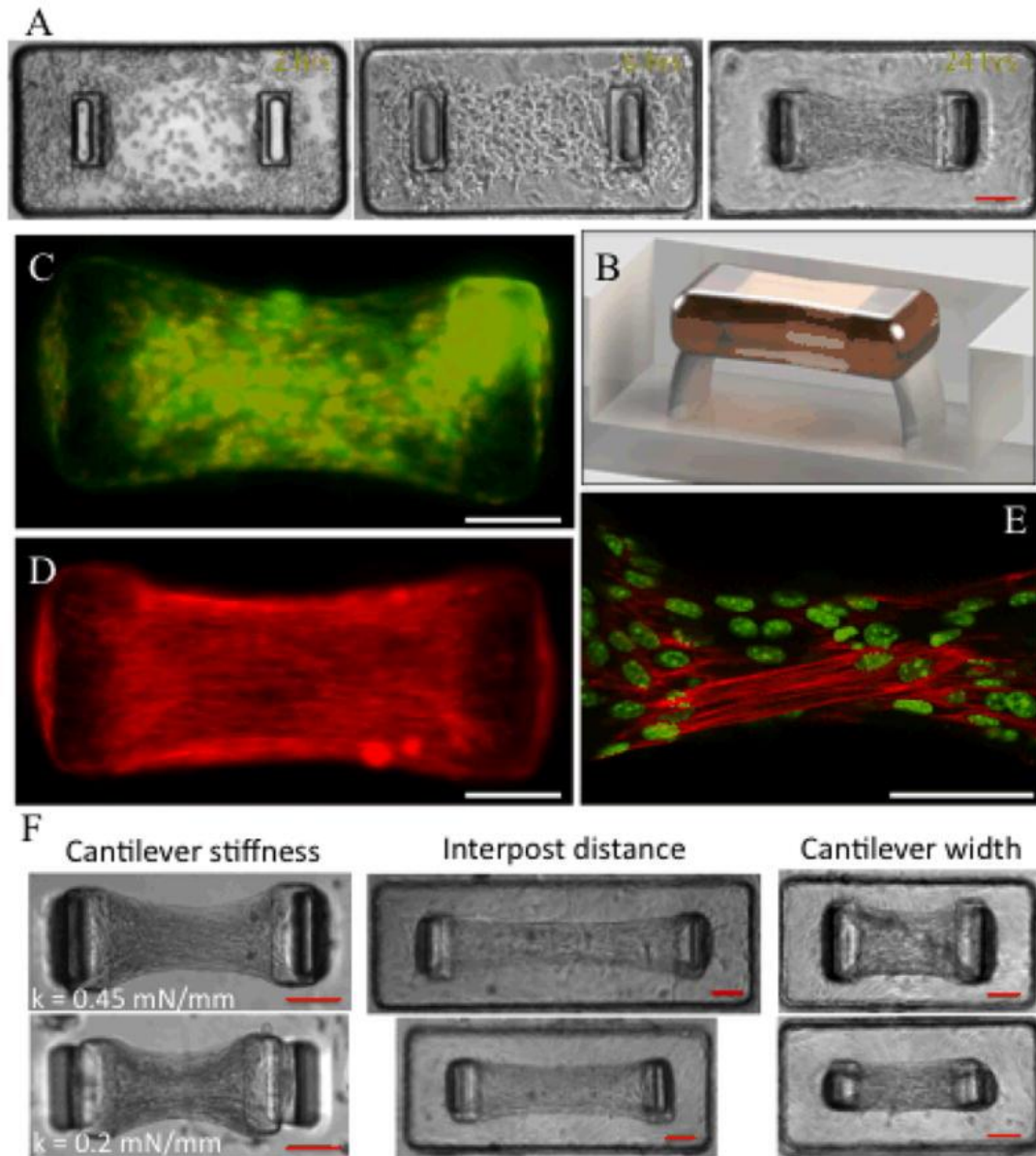


Towne C, Montgomery KL, Iyer SM, Deisseroth K, et al. (2013) Optogenetic Control of Targeted Peripheral Axons in Freely Moving Animals. PLoS ONE 8(8): e72691. doi:10.1371/journal.pone.0072691  
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0072691>

# Свето-активируемые скелетные мышцы



# Роботы на свето-активируемых скелетных мышцах



- Спасибо за внимание 😊

# Conclusions

- **Optogenetics** is a new experimental methodology based upon the combination of genetic and optical methods to control specific mainly electrical events in targeted cells of living tissue.
- **Optogenetics** allows to almost instantaneously switch on and off certain neuronal groups in order to study their functions and relationships with other cells of animal body.
- **Optogenetics** also allows to correct pathological changes of signaling processes being a prerequisite for treatment of many neurodegenerative disorders.