



ЛАЗЕРЫ СОВЕРШЕНСТВУЮТ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОПТОГЕНЕТИКЕ*

Н.Олофсон, Я.Лазаридис, К.Мелетис, М.Карлен,
Каролинский институт;
Ульф Тингстром и Хакан Карлссон, Cobolt SE

Светочувствительными нейронами можно управлять с помощью света с очень большой временной и пространственной точностью, соответствующей нормальной обработке информации головным мозгом. Выбор лазерного источника для оптогенетики проблема довольно деликатная. В статье обсуждается вопрос, на какие параметры лазера, используемого для подобных исследований, нужно обратить особое внимание.

КРАТКО ОБ ОПТОГЕНЕТИКЕ

История концепции оптогенетики восходит к 1970-м годам, когда доктор Фрэнсис Крик, один из открывателей ДНК, описал словами, что в неврологии необходим метод управления нервными клетками одного типа, оставляя другие клетки не затронутыми, чтобы понять, как работает головной мозг [1]. Крик позже предположил, что таким средством управления нейронами извне будет свет. Свет позволит синхронизовать с произвольной временной точностью соответствующие сигналы, обрабатываемые мозгом.

Независимо от исследований Фрэнсиса Крика биологами того времени были выявлены микроорганизмы, способные регулировать поток ионов (электрический заряд) через их мембраны с помощью светочувствительных белков (опсины). Основываясь на том, что активность нейронов регулируется потоком ионов через плазматическую мембрану, ученые в конце 1990-х годов начали исследовать применение светочувствительных белков для контроля нейронов, но исследователи не признавали опсины как пригодные для неврологии до 2000-х годов. Совместные усилия нескольких исследовательских групп принесли свои плоды только в 2005 году. Тогда впервые

LASERS, OPTICS ENHANCE OPTOGENETICS STUDIES

N.Olofsson, I.Lazaridis, K.Meletis, M.Carlén,
Karolinska Institutet, and UlfTingström and Håkan
Karlsson, Cobolt SE

Light can have control over light sensitive neurons with a very high time and volumetric accuracy corresponding to normal brain information processing. The choice of a laser source for optogenetics is a fairly delicate question. What laser parameters should have special attention is discussed.

A BRIEF HISTORY OF OPTOGENETICS

The history of the concept of optogenetics dates back to the 1970s, when Dr. Francis Crick, co-discoverer of DNA, put to words that neuroscience needed a method to control one type of nerve cell while leaving the other cells unaffected, to understand how the brain works [1]. Crick later also suggested that light would be the means to control the neurons from the outside, allowing arbitrary timing precision at timescales relevant to the brain's processing.

Independently, biologists at the time had identified microorganisms capable of regulating the flow of ions (electric charge) through their membranes with the aid of light-sensitive proteins (opsins). Building on the fact that the activity of neurons is regulated by the flow of ions through the plasma membrane, scientists in the late 1990s started exploring the use of light-sensitive proteins for controlling neurons, but researchers did not recognize opsins as being suitable for neuroscience until the 2000s. A combined effort by several research groups bore fruit in 2005 when, for the first time, light plus a single-component light-sensitive ion channel was used to activate neurons and change the behavior of a living animal [2]. Light-activated proteins that could inhibit the activity of neurons were soon after identified, and in 2007 the first use of an inhibiting opsin for control of behavior was demonstrated [3].

Since 2005, when the expression was coined and the technology introduced, optogenetics has found many applications and is regarded as one of the biggest revolutions in the study of the

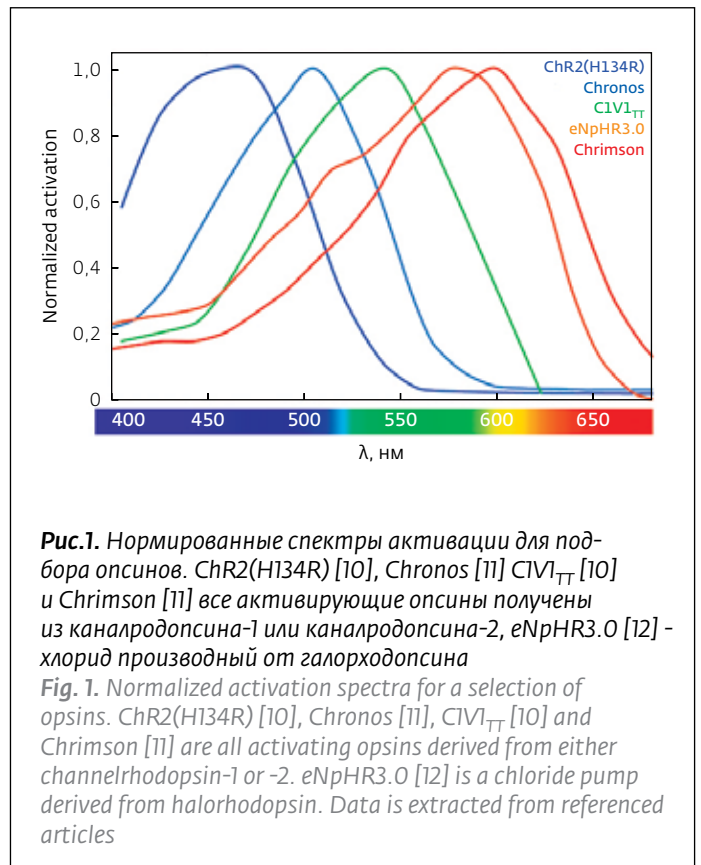
* Статья и перевод на английский язык предоставлены компанией ЗАО "НТК"АЗИМУТ ФОТОНИКС"

свет и однокомпонентный светочувствительный ионный канал были использованы для активации нейронов, что приводило к изменению поведения исследуемого животного [2]. Вскоре после этого были выявлены активируемые светом белки, которые могут подавлять активность нейронов, и в 2007 году впервые удалось использовать подавляющие опсины для демонстрации управления поведением исследуемого организма [3].

Начиная с 2005 года, когда было придумано само название "оптогенетика" и представлена технология управления, оптогенетика получила широкое применение и рассматривается как одна из самых больших революций в изучении головного мозга и его функций. Крайней границей нейронауки является понимание того, как головной мозг порождает наше поведение, и оптогенетика уже доказала свою беспрецедентную полезность. Активация и замедление опсинов были ориентированы на различные типы нейронов и области головного мозга у грызунов для выявления клеток и областей в центральном головном мозге, отвечающих за страх, тревогу, сон, голод, социальное поведение, обучение, память, агрессию, мотивацию и многое другое. Кроме того, оптогенетика широко используется для понимания того, как изменения в активности головного мозга могут проявляться в расстройствах, таких как депрессия, шизофрения, аутизм, болезнь Паркинсона, эпилепсия и наркомания [4].

Поведение исследуемого организма представляет собой не только оптогенетические манипуляции. О головном мозге можно многое узнать путем объединения оптогенетики с другими технологиями, такими как электрофизиология или диагностические исследования с визуализацией.

Опсины могут быть классифицированы по их эффективности (активация против замедления нервной активности), спектральной чувствительности (пик и интервал длин волн), по средствам переноса ионов через клеточную мембрану (канал или возбуждение), по включению и выключению кинетики, свойствам фототока и другим характеристикам. Большинство опсинов могут быть активированы в широком интервале длин волн (рис.1 и 2). На пике интервала генерируется максимальная активация и фототок. Доступные в настоящее время активируемые светом белки, использующиеся в оптогенетике, имеют длину волны и пик возбуждения в видимой или инфракрасной области спектра [5]. Наиболее часто для активации опсина используют каналродопсин 2



brain and its functions. The ultimate frontier of neuroscience is understanding how the brain gives rise to our behavior, and optogenetics has already proved its unprecedented utility. Activating and inhibiting opsins have been targeted to a variety of types of neurons and brain areas in rodents to identify cells and regions in the brain central to fear, anxiety, sleep, hunger, social behavior, learning, memory, aggression, motivation and more. In addition, optogenetics has been widely used for understanding how changes in brain activity can manifest themselves as disorders such as depression, schizophrenia, autism, Parkinson's disease, epilepsy and drug addiction, to mention a few [4].

But behavior does not constitute the only readout of optogenetic manipulations, and much can be learned about the brain by combining optogenetics with other technologies, such as electrophysiology or imaging.

Opsins can be categorized by their effect (activation vs. inhibition of neuronal activity), spectral sensitivity (peak and interval wavelengths), means of ion transport over the cell membrane (channel or pumps), on and off kinetics, photocurrent properties and more. Most opsins

(Channelrhodopsin-2 (ChR2)), который имеет пик активации около 470 нм (синий свет), и опсины, наиболее часто используемые для замедления нейронной активности, – галорходопсины (halorhodopsins, NpHRs), которые оптимально активируются желтым светом (пик активации около 590 нм).

Важно отметить, что в последние годы была разработана обширная флора опсинов для оптогенетики. Когда появилась необходимость одновременной манипуляции поведением исследуемого организма, были, например, разработаны опсины для того, чтобы поочередно активировать и замедлять популяции нейронов [6] или для параллельной активации двух различных популяций нейронов в пределах одной области головного мозга [7]. Главное, что показывают приведенные примеры – это возможность с помощью различных длин волн света избирательно активировать один опсин, оставляя другие опсины неизменными. Если два опсина должны быть ориентированы на одну область головного мозга, то при выборе длин волн стимуляции и интенсивности излучения должны быть приняты во внимание спектральное перекрытие и относительные усиления генерируемых фототоков.

Последние достижения в оптогенетике включают в себя разработку опсинов, которые активируются при одной длине волны света и замедляются разными длинами волн – так называемые ступенчатые опсины [5]. Одиночный импульс света одной длины волны активизирует опсин и вызывает постепенное изменение ионных потоков в мембране нейрона, которые могут быть остановлены световым импульсом с другой длиной волны. Чаще всего синий свет используется для активации, а красный для замедления. Однако были использованы и другие комбинации длин волн. Активацию опсинов, чувствительных к красному свету, инженеры исследуют давно [8].

Имплантирование волокна в живые ткани требует сложной и высокоточной микрохирургии и часто приводит к повреждению головного мозга. Синие и зеленые длины волн рассеиваются в головном мозге и поглощаются кровью, наконечник волокна должен быть размещен в непосредственной близости от нейронов для исследования эффективности активации опсинов, что затрудняет исследование с малыми и/или глубинными структурами головного мозга. Красный свет проникает в ткани головного мозга более эффективно

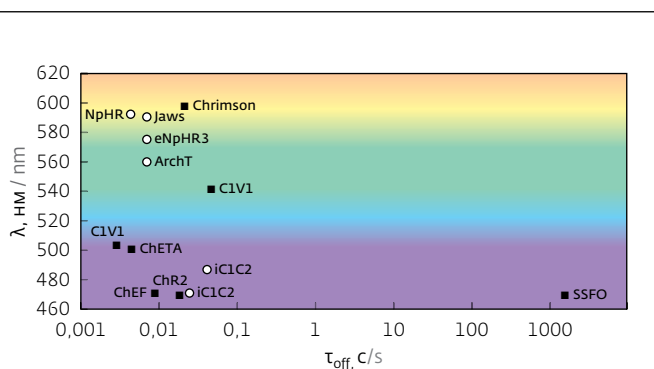


Рис.2. Кинетика (τ_{off}) и спектральных показателей (λ) для выбора опсинов. При планировании экспериментов оптогенетики, требующих активации двух отдельных популяций клеточных нейронов или одновременное включение и подавление одной нейронной популяции, длины волн активации сравниваются. Кинетика затухания опсина должна быть рассмотрена в экспериментах с использованием пульсирующего света на определенных частотах. Активация опсинов (белые круги): ChR2 (H134R) [5], CIV1_{TT} (= CIV1 Cheta (E122T/E162T)) [5], Cheta (= ChR2 (E123T)) [5], Chrimson [11], Chronos [11], ChIEF510 у SSFO (= ChR2 (C128S/D156A)) [5] замедляющих опсинов (черные квадраты): eNpHR3.0 [5], NpHR [5], Jaws [12], ArchT12 [12] и iC1C2 [9] Fig. 8. Kinetics (τ_{off}) and spectral parameters (λ) for a selection of opsins. In the planning of optogenetics experiments requiring activation of two separate neuronal cell populations or concurrent activation and inhibition of one neuronal population, the activation wavelengths are compared. The opsin's decay kinetics must be considered in experiments involving pulsing of light at defined frequencies. Activating opsins (white circles): ChR2 (H134R) [5], CIV1_{TT} (= CIV1 Cheta (E122T/E162T)) [5], Cheta (= ChR2 (E123T)) [5], Chrimson [11], Chronos [11], ChIEF510 у SSFO (= ChR2 (C128S/D156A)) [5] Inhibiting opsins (black squares): eNpHR3.0 [5], NpHR [5], Jaws [12], ArchT12 [12] и iC1C2 [9]

can be activated by a wide interval of wavelengths (Fig. 1 and 2). At the peak interval, maximum activation and photocurrent are generated. The currently available light-activated proteins used for optogenetics have a peak excitation wavelength somewhere in the visible or infrared spectrum [5]. The most commonly used activating opsin, Channelrhodopsin-2 (ChR2), has a peak activation around 470 nm (blue light), and the opsins most commonly used for inhibiting neuronal activity (halorhodopsins, NpHRs) are optimally activated by yellow light (peak activation around 590 nm).

Importantly, in recent years a vast flora of opsins has been engineered for optogenetics. As the need for concurrent manipulations has been realized, opsins have been developed that, for example, allow interchangeable activation



[8], демонстрируя меньшее рассеяние и поглощение в крови и может даже активировать нейроны через неповрежденный череп. Недавним важным событием в оптогенетике стало создание ингибирующего канального родопсина, чувствительного к синему свету [9]. Этот новый способ позволяет быстрее и в большей степени замедлить оптическое восприятие нервной активности и демонстрирует повышенную чувствительность к свету.

ВЫБОР ПОДХОДЯЩИХ ИСТОЧНИКОВ СВЕТА И ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ОСОБЫМ АКЦЕНТОМ НА ПОВЕДЕНИЕ ГРЫЗУНОВ

Использование лазеров и оптики для оптогенетики находится только в зачаточном состоянии. В следующем десятилетии мы можем ожидать от исследователей раскрытия многих внутренних тайн человеческого мозга, а возможно, найти и лекарства, и методы лечения для некоторых из наших самых сложных психиатрических расстройств и заболеваний.

Оптогенетика строится на том, что свет активирует молекулы, называемые опсинами, которые могут находиться в нейронах (рис.3). Светочувствительными нейронами можно управлять с помощью света с очень большой временной и пространственной точностью, соответствующей нормальной обработке информации головным мозгом. Разработка опсинов для оптогенетики – это бурно развивающаяся область, и многие новые и значительно измененные опсины неуклонно становятся доступными для удовлетворения потребностей научно-исследовательских применений, включая те, которые касаются исследования обезьян и человека.

Стремительно развиваясь и имея междисциплинарный характер, оптогенетика представляет собой важную задачу. В частности трудной задачей для многих исследователей является определение точного набора источников света и волоконно-оптических компонентов для их конкретного применения в оптогенетике. Для повышения удобства работы с лазерами, используемыми для оптогенетики, компания Sobolt AB (Швеция) совместно с лабораториями Мари Карлен и Константиноса Мелетиса в Каролинском институте в Стокгольме работала, серию новых лазерных инструментов для выполнения этой задачи.

and inhibition of a population of neurons [6] or parallel activation of two different populations of neurons within the same brain area [7] both achieved through application of light of different wavelengths. Crucial in these examples is the ability of the different wavelengths of light to selectively activate one opsin while leaving the other opsin unaffected. If two opsins are to be targeted to the same brain area, the spectral overlaps and the relative strengths of the photocurrents generated must be taken into account when choosing stimulation wavelengths and power densities.

Additional recent advances in optogenetics include the development of opsins that are activated by one wavelength of light and inactivated by a different wavelength – the so-called step-function opsins [5]. A single light pulse of one wavelength activates the opsin and triggers a gradual change in the ion flow over a neuron's membrane that can be terminated by a light pulse of a different wavelength. Most commonly, blue light is used for activation and red light for inactivation, but other combinations have also been used. There have long been efforts to engineer activating opsins sensitive to red light [8].

Fiber implantation requires complex and high-precision microsurgery, and often creates a certain degree of brain damage. As blue and green wavelengths scatter in the brain and are absorbed by blood, the fiber tip must be placed in the direct vicinity of the neurons under investigation for effective activation of the opsins, making it difficult to target small and/or deep brain structures. Red light penetrates brain tissue more effectively, displays less scattering and absorption in blood, and can even activate neurons through an intact skull [8]. An important and recent development has been the generation of an inhibiting channelrhodopsin, sensitive to blue light [9]. This new tool enables fast and more physiological optical inhibition of neuronal activity and displays increased light sensitivity.

A GUIDE TO SUITABLE LIGHT SOURCES AND FIBER OPTIC COMPONENTS FOR OPTOGENETICS RESEARCH, WITH A SPECIFIC EMPHASIS ON RODENT BEHAVIOR

The use of lasers and optics for optogenetics is only in its infancy. In the next decade, we can expect researchers to uncover many inner secrets of the human brain and possibly also find cures

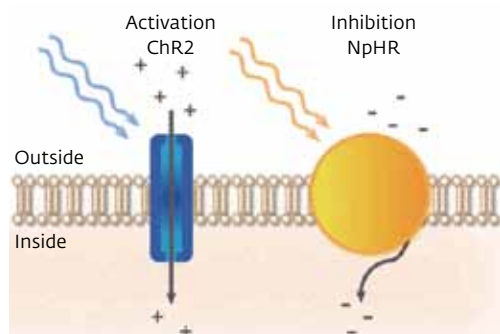


Рис.3. Принцип светоопосредованного контроля нейронной активности. Обычно используется активация опсина-каналродопсина-2 (ChR2), позволяющая вводить положительно заряженные ионы при освещении синим светом. В результате мембрана нейрона деполяризуется и генерируются потенциалы возбуждения. Замедляющий опсин - галорходопсин (NpHR) возбуждает отрицательно заряженные ионы при освещении желтым светом.

В результате мембрана нейрона гиперполяризуется и потенциал возбуждения тормозится

Fig. 3. Principle of light-mediated control of neural activity. The commonly used activating opsin ChR2 allows entry of positively charged ions upon illumination with blue light. As a result, the neuron's membrane is depolarized, and action potentials are generated. The inhibiting opsin NpHR pumps negatively charged ions into neurons upon illumination with yellow light. As a result, the neuron's membrane is hyperpolarized, and action potential initiation is inhibited

and treatments for some of our most challenging psychiatric disorders and diseases, helping us to a better life.

Optogenetics builds on the discovery that light-activated molecules called opsins can be expressed in neurons (Fig.3). Light-sensitive neurons can be manipulated with light with a very temporal and spatial precision at timescales relevant to the brain's normal processing. The engineering of opsins used for optogenetics is an exploding area in itself, with many new and drastically modified opsins steadily becoming available to meet the needs of research applications, including those relevant to monkeys and humans.

The fast-moving, multidisciplinary nature of optogenetics represents an important challenge. In particular, it is a demanding task for many researchers to determine an adequate set of light sources and fiber optic components for their specific optogenetics application. To address the need for user-friendly laser assemblies, Cobolt AB has worked with the laboratories of Marie Carlén and Konstantinos Meletis at Karolinska Institutet in Stockholm to develop a series of laser tools.

THE OPTOGENETICS SETUP

For optogenetic manipulations in live animals, the light sources used are almost exclusively lasers. Lasers produce a beam of almost parallel light with very low divergence, allowing it to be efficiently focused into an optical fiber - typically with a core diameter of 50 to 300 μm . Many optogenetics experiments can be conducted using one opsin and unilateral optical manipulation of the cells of interest (i.e., in one hemisphere).

Three different configurations have been carefully designed to meet the requirements of optogenetics experiments: single-line lasers with a fiber manipulator; two lasers on a common platform launched into one common fiber manipulator; or two lasers sitting side by side launched into one manipulator each, suitable for a two-into-one combination with a fused fiber. The lasers in the assemblies are available with 100 mW of adjustable output power at the wavelengths 473, 561, 594 and 638 nm, where the 561 and 594 nm are diode-pumped solid-state (DPSS) lasers with modulators or shutters.

Parameters to consider include the fiber core diameter and how to insert the fiber into the brain. Preassembled implantable sleeves holding a short fiber are available (Fig.2). During the experiment, a longer fiber is inserted into the

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИКИ

В оптогенетике для манипулирования поведением живых организмов в качестве источников света практически всегда применяются исключительно лазеры. Лазеры генерируют пучок почти параллельных лучей света с очень малой расходимостью, что позволяет эффективно фокусировать его на оптическое волокно - как правило, с диаметром сердцевины от 50 до 300 мкм. Многие эксперименты оптогенетики могут проводиться с использованием одного опсина и с односторонней оптической манипуляцией клетками, представляющими интерес (т.е. в одном полушарии головного мозга).

Были тщательно разработаны три различные конфигурации, которые соответствуют требованиям экспериментов оптогенетики: одномодовый лазер с волоконным манипулятором; два лазера на общей платформе, запускаемые в одно общее волокно манипулятора; или два лазера, находящиеся рядом и запускаемые каждый

в своем манипуляторе, состыкованные со сплавленным волокном в комбинации два в одном. Лазеры в установках доступны с регулируемой мощностью 100 мВт на длинах волн 473, 561, 594 и 638 нм, где 561 и 594 нм – это твердотельные лазеры с диодной накачкой (DPSS) с модуляторами или обтюраторами.

К параметрам, которые необходимо учитывать, относится диаметр сердцевины волокна, позволяющий вводить волокно в головной мозг. На рис.4. представлена общедоступная предварительно вживляемая гильза с закрепленным коротким волокном. В ходе эксперимента длинные волокна вставлялись в рукав, который требует идеальной поверхности контакта между коротким и длинным волокном. Кроме того, катетер может быть имплантирован и непрерывные длинные волокна вводятся через катетер в головной мозг в ходе эксперимента. Конец волокна соединен с разъемом, совместимым с разъемом на манипуляторе лазерной установки (например, SMA или FC).

Более сложные эксперименты могут потребовать применения света двух отдельных длин волн, билатеральной (двухсторонней) стимуляции обоих полушарий и свободного передвижения животного. В настоящее время используются две основные методики для доставки двух разных длин волн. В первом случае два световых луча направлены и объединены в одно волокно манипулятора с помощью оптики. Одиночное волокно соединено с лазерной установкой, но при необходимости его можно разделить на два волокна. Второй метод позволяет избежать использования оптики, и каждый из двух световых лучей направлен в отдельное волокно манипулятора. Два волокна затем подключаются к лазерной установке, и если это необходимо, то они могут быть соединены в одно волокно. Для обеспечения свободного передвижения животного и исключения вращения волокна могут быть добавлены вращательные шарниры (рис.3).

ЛАЗЕРЫ ДЛЯ ОПТОГЕНЕТИКИ

Основная задача для нейробиологов – добиться достаточной освещенности в области головного мозга без подвергания живых тканей повреждениям. Как правило, в заданном месте для успешной манипуляции нейронной активностью требуется интенсивность излучения от 1 до 10 мВт/мм², но опсины с повышенной светочувствительностью специально спроектированы



Рис.4. Наконечник для имплантации оптического волокна в головной мозг

Fig. 4. Ferrule used for implantation of optical fiber into the brain

sleeve, requiring perfect surface contact between the short and long fiber. Alternatively, a cannula guide can be implanted and a continuous, longer fiber inserted through the cannula into the brain during the experiment. The end of the fiber is coupled to a connector that is compatible with the connector on the laser assembly's manipulator (e.g., SMA or FC).

More complex experiments can require the application of light of two separate wavelengths, bilateral stimulation (both hemispheres) and the animal's free movement. Two main strategies are currently used to deliver two different wavelengths. In the first, the two light beams are directed and combined into one fiber manipulator using free-space optics. A single fiber is coupled to the laser assembly but can be split into two fibers, if needed. The second strategy avoids the use of free-space optics, and the two light beams are

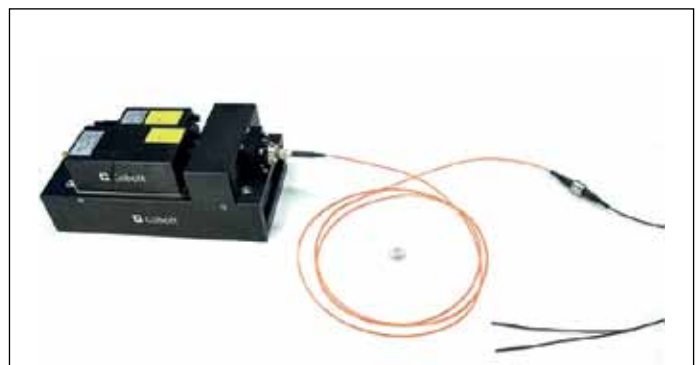


Рис.5. Лазерная установка с подключенным оптическим волокном с разделенными концами волокон и поворотным шарниром

Fig. 5. A laser assembly with connected optical fiber with split fiber ends and a rotary joint

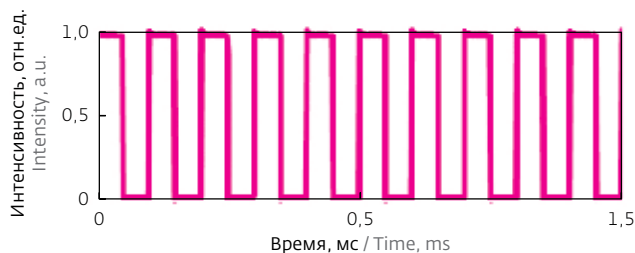


Рис.6. Типовой график стабильности импульса для лазера Cobolt MLD на 473 нм с прямой модуляцией
Fig.6. Typical pulse fidelity graph for a Cobolt MLD 473-nm laser with direct modulation

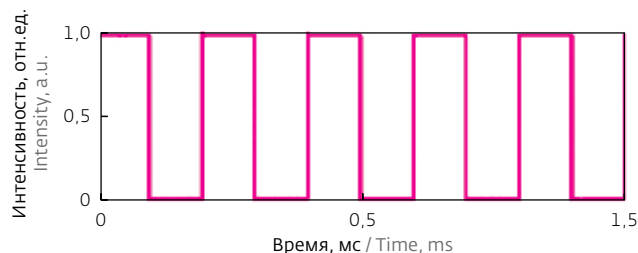


Рис.7. Типовой график стабильности импульса для лазера Cobolt Mamba 594 нм со встроенным модулятором
Fig.7. Typical pulse fidelity graph for a Cobolt Mamba 594-nm laser with built-in modulator

для уменьшения необходимого количества света. Выбор лазерного источника для оптогенетики является довольно деликатным вопросом. На какие параметры лазера нужно обратить особое внимание?

Во-первых, после того, как был выбран соответствующий опсин, необходимо выбрать лазер с выходной длиной волны, соответствующей чувствительности опсина. В настоящее время наиболее широко используются следующие длины волн: 473, 532, 561, 594 и 638 нм.

Во-вторых, лазер должен обеспечивать достаточную выходную мощность для успешной активации опсина. Таким образом, лазер должен иметь запас мощности для компенсации потерь при передаче сигнала по волокну. Также должна обеспечиваться регулировка мощности излучения, поскольку требования к свету для генерации фототока могут значительно различаться у различных животных, например, из-за разной степени экспрессии опсина. Регулировка мощности лазера также необходима, чтобы избежать повреждения живых тканей из-за избыточной освещенности. Стандартное значение номинальной мощности составляет не менее 100 мВт с полезной мощностью в диапазоне от 20 мВт и до номинального максимума.

Третьим важным параметром является стабильность излучения во времени. Ее поддержание очень важно, так как эксперимент может продолжаться в течение нескольких часов, а стабильность мощности гарантирует, что нежелательные структуры, вызванные обработкой лазерным излучением, не будут созданы из-за вариаций применяемого света. Следовательно, стабильность мощности лазера менее 2% является обязательным условием.

directed to one fiber manipulator each. Two fibers are then connected to the laser assembly and can be fused into one fiber, if needed. To allow for free movement of the animal and to avoid twisting and turning the fiber(s), a rotary joint can be added (Fig. 3).

LASERS FOR OPTOGENETICS

It is a true challenge for neuroscientists to achieve sufficient light exposure in an area of the brain without overexposing tissue and creating damage. At the target site, a power density of 1 to 10 mW/mm² is typically needed for successful manipulation of neuronal activity, but opsins with increased light sensitivity are constantly being engineered to reduce the amount of light needed. The selection of a laser source for optogenetics is quite delicate, and a few parameters must be considered with care.

First, after an appropriate opsin is selected, a laser with an output wavelength matching the sensitivity of the opsin must be chosen. Currently, the most commonly used wavelengths are 473, 532, 561, 594 and 638 nm.

Second, the laser must provide sufficient output power for successful activation of the opsin. Thus, the laser must have power headroom for all the losses in the fiber delivery system. The power also needs to be adjustable, as the light requirements for generating photocurrents can vary considerably from one animal to another because of varying degrees of expression of the opsin, for example. Adjustable power is also needed to avoid tissue damage from excessive light exposure. A typical need for rated power is at least 100 mW, with a useful power range from below 20 mW up to a rated maximum.

Также должна быть рассмотрена возможность лазерной модуляции. Частота модуляции зависит от физиологических процессов в оптогенетике, т.к. это определяется кинетическими свойствами опсина. Некоторые шаблоны активности в головном мозге длятся порядка секунд, в то время как другие достигают более 100 Гц.

Также очень важно, чтобы времена нарастания и спада светового импульса были короткими, точными и в миллисекундном диапазоне. Не менее важно, чтобы форма импульса и уровень мощности от импульса к импульсу являлись последовательными и повторяющимися в течение всего эксперимента.

Два основных типа лазеров, используемых в оптогенетике – это DPSS-лазеры и лазерные диоды. Оба типа энергоэффективны и имеют компактный дизайн, а также не требуют каких-либо систем охлаждения. Лазерные диоды – экономически наиболее эффективное решение, доступное в синем и красном спектральном диапазоне, хотя еще есть модели с излучением в зеленом, желтом или оранжевом спектре. Они могут быть напрямую модулированы с большой точностью и скоростью, ограниченной только электронной схемой драйвера (рис.6). Мощность лазерных диодов может быть изменена до непосредственной близости к нулю или до максимального номинального значения без разницы в стабильности.

Твердотельные лазеры с диодной накачкой (DPSS-лазеры) представляют собой мощные высокопроизводительные источники излучения, используемые во многих сложных задачах. Они доступны с различным диапазоном длин во всем видимом спектре. Как правило, в оптогенетике используются DPSS-лазеры с длинами волн 532, 561, 594 нм. Лазеры с оптической накачкой будут работать стабильно только в непрерывном режиме и при максимальной номинальной мощности, если детально не разработаны условия, чтобы они функционировали по-другому. Ограничение связано с конструкцией лазеров с оптической накачкой, таких как DPSS-лазеры, так как диодный лазер накачивает кристалл лазера внутри оптического резонатора.

DPSS-лазеры могут работать в широком динамическом диапазоне мощности, но имеют ограничения по возможности модуляции. Тем не менее модулированные DPSS лазеры, как правило, не имеют достаточно хорошей согласованности от импульса к импульсу и стабильности питания во время модуляции для

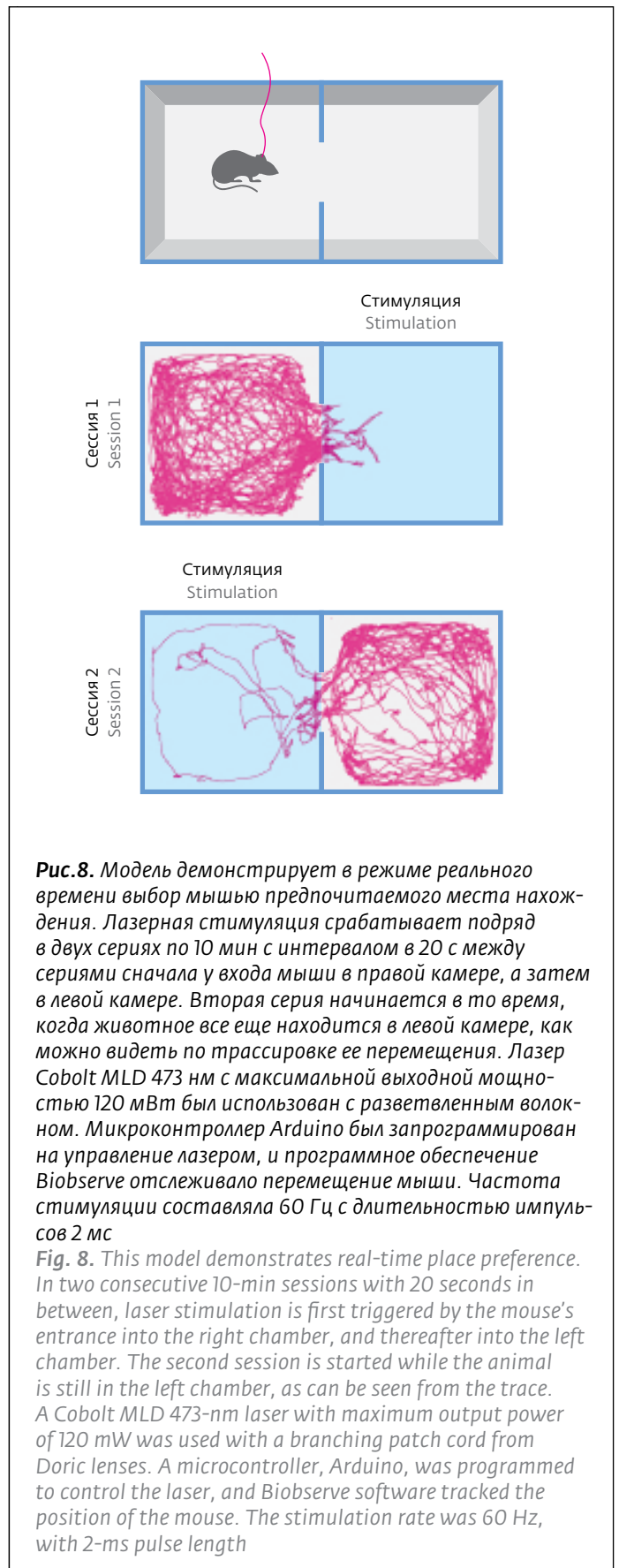


Рис.8. Модель демонстрирует в режиме реального времени выбор мышью предпочитаемого места нахождения. Лазерная стимуляция срабатывает подряд в двух сериях по 10 мин с интервалом в 20 с между сериями сначала у входа мыши в правой камере, а затем в левой камере. Вторая серия начинается в то время, когда животное все еще находится в левой камере, как можно видеть по трассировке ее перемещения. Лазер Cobolt MLD 473 нм с максимальной выходной мощностью 120 мВт был использован с разветвленным волокном. Микроконтроллер Arduino был запрограммирован на управление лазером, и программное обеспечение Biobserve отслеживало перемещение мыши. Частота стимуляции составляла 60 Гц с длительностью импульсов 2 мс

Fig. 8. This model demonstrates real-time place preference. In two consecutive 10-min sessions with 20 seconds in between, laser stimulation is first triggered by the mouse's entrance into the right chamber, and thereafter into the left chamber. The second session is started while the animal is still in the left chamber, as can be seen from the trace. A Cobolt MLD 473-nm laser with maximum output power of 120 mW was used with a branching patch cord from Doric lenses. A microcontroller, Arduino, was programmed to control the laser, and Biobserve software tracked the position of the mouse. The stimulation rate was 60 Hz, with 2-ms pulse length



удовлетворения требований задач оптогенетики. Поэтому для использования в оптогенетике DPSS-лазерам нужен встроенный модулятор или быстрый затвор для модуляции света, что позволяет устройствам работать непрерывно и, следовательно, с как можно более высокой стабильностью (рис.7).

ПРИМЕР ЭКСПЕРИМЕНТА

В предлагаемом эксперименте зондируют нейроны, отвечающие за управление поведением живой мыши, чтобы избежать попадания в неприятные ситуации. Синий светочувствительный опсин ChR2 предназначен для активации нейронов в одном полушарии головного мозга у мыши, и одно оптическое волокно диаметром 200 мкм имплантируется в кончик волокна, непосредственно прилегающего к нейронам, для манипуляции поведением мыши. Прямоугольная коробка разделяется на две камеры стенкой с открытым проходом для исследования поведения. Программное обеспечение отслеживает движение мыши. Вход мыши в одну из камер запускает активацию синего лазера, который приводит к активации нейронов, представляющих интерес для исследования.

Рис.8 показывает, что применение света приводит к непосредственному выражению аверсивного поведения, т.е. мышь полностью избегает камеру, где активируется лазер. Для подтверждения факта, что аверсивное поведение вызвано именно активацией нейронов, а не внешними факторами, лазер впоследствии срабатывает в другой камере. В результате мышь теперь избегает и этой камеры.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Crick F.H.** Thinking about the brain. – Sci Am, 1979, v. 241, p. 219–232.
2. **Nagel G. et al.** Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. – Curr Biol, 2005, p. 2279–2284.
3. **Zhang F. et al.** Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. – Nature, 2007, v. 446, p. 633–639.
4. **Tye K.M. and Deisseroth K.** Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. – Nat. Rev. Neurosci, 2012, v. 13, p. 251–266.
5. **Yizhar O. et al.** Optogenetics in neural systems. – Neuron, 2011, v. 71, p. 9–34.

The third important parameter is the power stability over time. This is crucial, as an experiment can run for hours, and stable power ensures that artifacts are not created from variations in the light application. Therefore, power variation of less than 2 percent is a must.

The laser's modulation capability must also be considered. The frequency of modulation is dictated by the physiological process the optogenetic manipulation intends to replicate or model; it is influenced by the opsin's kinetic properties. Some activity patterns in

It is also very important that the rise/fall times of the light pulse are short, accurate and on the millisecond scale. It is equally important that the pulse shape and the power level from one pulse to another are consistent and repeatable throughout the experiment.

The two main types of lasers used for optogenetics are DPSS lasers and laser diodes. Both compact in design and power efficient, they do not require any cooling systems. Laser diodes, the most cost-effective solution, are available in blue and red wavelengths, although not yet in green, yellow or orange. They can be directly modulated with great accuracy and speed, limited only by the electronic drive circuitry (Fig.6). Laser diodes can be set at powers of close to zero or up to their maximum rated power with no difference in stability.

DPSS lasers are powerful, high-performance devices commonly used in many demanding applications. They are available in many wavelengths across the visible spectrum, with 532, 561 and 594 nm typically used in optogenetics. All optically pumped lasers, such as DPSS lasers, are inherently limited by their construction where a diode laser is pumping a laser crystal inside a laser cavity. The optically pumped lasers will run stable only at continuous operation and at maximum rated power, unless carefully engineered to function differently.

DPSS lasers can be designed for a wide dynamic power range and also with limited modulation capability. However, directly modulated DPSS lasers typically do not have good enough pulse-to-pulse consistency and power stability during modulation to meet the demands of optogenetic applications. Therefore, DPSS lasers used for optogenetics need a built-in modulator or a fast shutter to modulate the light, allowing the devices to operate continuously and hence with as much stability as the design allows (Fig.7).



6. **Zhang F. et al.** Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. – *Nat. Rev. Neurosci*, 2007, v. 8, p. 577–581.
7. **Yizhar O. et al.** Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. – *Nature*, 2011, v. 477, p. 171–178.
8. **Lin J.Y. et al.** ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. – *Nat. Neurosci*, 2013, v. 16, p. 1499–1508.
9. **Berndt A. et al.** Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel. – *Science*, 2014, v. 344, p. 420–424.
10. **Mattis J. et al.** Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. – *Nat Methods*, 2012, v. 9, p. 159–172.
11. **Klapoetke N.C. et al.** Independent optical excitation of distinct neural populations. – *Nat. Methods*, 2014, v. 11, p. 338–346.
12. **Chuong A.S. et al.** Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin. – *Nat Neurosci*, 2014, v. 17, p. 1123–1129.

SAMPLE EXPERIMENT: REAL-TIME PLACE PREFERENCE

In this experiment, a population of neurons involved in aversive behavior – i.e., responsible for driving a behavior where unpleasant situations are avoided – is probed. The blue-light-sensitive activating opsin ChR2 is targeted to the neurons of interest in one hemisphere of a mouse's brain, and a single 200- μm optical fiber is implanted with the fiber tip placed directly adjacent to the neurons to be manipulated. A rectangular box divided into two chambers by a wall holding an open passage is used to probe the behavior. Tracking software detects the mouse's movement, and the mouse's entrance into one of the chambers triggers activation of the blue laser, resulting in activation of the neurons of interest.

Fig.8 shows that application of light leads to direct expression of aversive behavior, as the mouse completely avoids the chamber where the laser is activated. To certify that place aversion is driven by activation of the neurons of interest and not by external factors, the laser is subsequently triggered in the other chamber. As a result, the mouse now avoids this chamber.