

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Ерофеев Александр Игоревич

**Динамика мембранных токов и потенциалов, индуцированных светом в
пирамидальных нейронах гиппокампа мыши**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Ерофеев А.И.
Научный руководитель: зав.кафедрой,
д.ф.-м.н., доцент Власова О.Л.

Санкт Петербург – 2018

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Зав. кафедрой:	<i>Власова Ольга Леонардовна</i> <i>д.ф.-м.н., доцент</i>
Научный руководитель:	<i>Власова Ольга Леонардовна</i> <i>д.ф.-м.н., доцент</i>
Рецензент:	<i>Амахин Дмитрий Валерьевич</i> <i>к.б.н., в.н.с. ИЭФБ РАН</i>

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Традиционно для изучения механизмов активности нервной ткани используют электрическую стимуляцию электродами, помещенными во внеклеточное пространство [1, 2]. Несмотря на то, что этот метод позволяет легко контролировать временное разрешение, в большинстве случаев многие нейроны в электрическом поле подвергаются одновременному воздействию. По этой причине исключается возможность стимуляции нейронов определенного типа, которым свойственен свой специфический характер активности [3, 4]. Альтернативным вариантом является внутриклеточная стимуляция, которая имеет необходимое пространственное и временное разрешение. Однако применение такого метода обычно ограничено нейронами в культуре или в срезах.

В 2005 году появилась одна из основных публикаций, которая представила новый метод, позволивший решить проблемы внутриклеточной и электрической стимуляции электродами [5]. Этот метод получил название оптогенетика – биофизический метод исследования работы нервных клеток, основанный на генетической модификации клеточной мембраны, целью которой является внедрение в мембрану нервных клеток специальных ионных каналов — опсинов, реагирующих на световые воздействия определенной длины волны. Одним из представителей семейства опсинов является каналродопсин-2 (ChR2), который не селективно закачивает в цитоплазму катионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+) при возбуждении светом длиной волны 470 нм. Каналродопсины-2 достаточно часто используется в экспериментах на отдельных участках головного мозга, например, на гиппокампе для изучения механизмов нарушения памяти, связанных с повреждением пирамидальных нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера [6] и Хантингтона [7, 8].

Для неселективного прохождения катионов через каналы ChR2 обычно применяется световая стимуляция с параметрами аналогичными внеклеточной

и внутриклеточной электрической стимуляции. В некоторых случаях такой подход может быть оправдан, например, когда применяется однократная световая стимуляция, т.к. в этом случае вклад в суммарную нейрональную активность за счет ионов, поступающих в клетку через систему каналов ChR2, будет одинаковым. Однако при многократном световом воздействии ситуация может кардинально измениться, например, из-за десенсibilизации [9] части каналов при длительной световой стимуляции. С точки зрения биофизики важно понимать, как совокупность экспрессированных в клеточной мембране каналродопсинов-2 будет изменять активность нейрона в ответ на изменение параметров световой стимуляции.

Так как активность нейронов, экспрессирующих ChR2, может изменяться при различных параметрах световой стимуляции (длительность, частота, интенсивность), актуальной задачей становится определение зависимостей между активностью нейрона и параметрами светового стимула, особенно при многократном воздействии.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключается в определении параметров светового стимула, при которых активность пирамидного нейрона гиппокампа, экспрессирующего каналродопсины-2, в ходе многократной световой стимуляции будет стабильна.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие **задачи**:

1. Определение частоты светового стимула, при которой будут генерироваться потенциалы действия на протяжении всего периода стимуляции.
2. Определение зависимости амплитуды мембранного тока от длительности и интенсивности светового стимула.
3. Определение зависимости времени достижения максимума амплитуды мембранного тока (τ) от длительности светового стимула.
4. Выбор рабочих параметров светового стимула на основе полученных ранее зависимостей.

5. Применение полученных ранее параметров светового стимула в эксперименте.

Научная новизна

Научная новизна выпускной квалификационной работы аспиранта определяется тем, что в ней представлены результаты, полученные при помощи поставленного и апробированного автором работы современного метода исследования активности нервных клеток – оптогенетики. Впервые исследована работа системы светочувствительных каналов в динамике в режиме длительной световой стимуляции. Определены зависимости между активностью гиппокампальных мышиных пирамидных нейронов, экспрессирующих светочувствительный (длина волны возбуждения 470нм) каналородопсин-2, и параметрами световой стимуляции при многократном воздействии. В работе впервые:

1. Определены зависимости между активностью пирамидного нейрона в первичной культуре, экспрессирующего каналродопсина-2 и параметрами светового стимула при многократном световом воздействии.
2. Показано, что при коротких (1-5мс) и длительных (100-500мс) световых импульсах при многократном световом воздействии наблюдается статистически значимое уменьшение значения амплитуды мембранного тока между первым стимулом и последующими у нейронов в первичной культуре гиппокампа, экспрессирующих каналродопсин-2.
3. Проведено сравнение электрофизиологической активности нейронов мышей дикого типа (C57BL/6J) и мышей-модели болезни Альцгеймера (PS1-M146V) в первичной культуре оптогенетическим методом.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты позволяют более глубоко понять работу системы светозависимых ионных каналов ChR2, а также подобрать условия для стабильной активации нейронов, экспрессирующих каналродопсина-2, в ходе многократной световой стимуляции. Это даёт возможность

оптимизировать проведение оптогенетических экспериментов с учетом минимального нагрева тканей, а также регулировать минимальный и максимальный клеточный ответ при световой стимуляции в экспериментах *in vitro* и в перспективе *in vivo*, например, при оценке синаптических связей между нейронами коры и стриатума при болезни Хантингтона или при исследовании механизмов памяти [10] и др.

Апробация работы

Результаты исследования докладывались на 3-й международной школе-конференции «Saint-Petersburg OPEN 2016» по оптоэлектронике, фотонике, нано- и нанобиотехнологиям, на конференции по нейробиологии «Volga «Неделя науки СПбПУ», на 4-й международной школе-конференции «Saint- нанобиотехнологиям, а также, на нейрофоруме «Возможности для развития НейроНет на глобальном рынке», конференции с международным участием рынка и точки экономического роста», на Всероссийской конференции с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология» и европейской

к

о

н

ф

е

р

е

Публикации

По результатам научно-квалификационной работы опубликовано 14 научных работ, в том числе 8 статей из них 3 по материалам конференций в изданиях, входящих в перечень ВАК, а также 7 статей из них 6 по материалам конференций в изданиях, не вошедших в перечень ВАК.

я

п

о

н

е

й

р

Представление научного доклада: основные положения

В результате исследования были сформулированы следующие основные положения:

1. Эффективная частота световой стимуляции, вызывающая стабильную генерацию потенциалов действия у нейронов гиппокампа в культуре, находится в диапазоне от 1 Гц до 5 Гц.
2. Зависимость величины амплитуды мембранного тока нейронов гиппокампа, от длительности светового стимула при многократной световой стимуляции является нелинейной.
3. Величина амплитуды мембранного тока нейронов гиппокампа возрастает при увеличении интенсивности светового стимула при многократной световой стимуляции.
4. Время, необходимое для достижения максимума амплитуды мембранного тока (τ), при увеличении длительности светового стимула изменяется нелинейно.
5. Электрофизиологическая активность пирамидных нейронов гиппокампа мышей-модели Болезни Альцгеймера (PS1-M146V) отличается от контрольной линии при многократной световой стимуляции с выбранными рабочими параметрами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе исследована динамика фототоков каналродопсинов-2, экспрессированных в мембране пирамидных нейронов гиппокампа в культуре в зависимости от частоты, длительности и интенсивности светодиодного источника. Основная цель работы направлена на поиск параметров светового стимула, при которых фототоки не будут значительно изменяться в динамике. Показано, что зависимость между длительностью светового импульса и амплитудой мембранного тока при многократном воздействии имеет максимум и сохраняет стабильность в диапазоне длительностей от 10 до 30 мс с последующим спадом; зависимость амплитуды мембранного тока от интенсивности близка к линейной, т.е. с увеличением интенсивности происходит увеличение амплитуды мембранного тока.

Определен режим светового стимула, при котором амплитуда мембранных фототоков практически не изменялась в динамике. Эти сведения будут полезны при исследовании нейронов в норме и при патологии, т.к. позволят определить вклад системы каналродопсинов-2 и выделить искомые различия в норме и при патологии.

Объекты, (предмет) и методы исследования

Объектом исследования выпускной квалификационной работы аспиранта являются пирамидные нейроны гиппокампа в первичной культуре, экспрессирующие ChR2.

Предметом исследования выпускной квалификационной работы является система каналродопсинов-2, в частности режимы стабильной работы системы каналов при многократной световой стимуляции.

В ходе работы над выпускной квалификационной работой применялись следующие **методы**: культивирование диссоциированных нейронов гиппокампа мышей, выделение плазмидной ДНК, кальций-фосфатная ко-трансфекция, patch-clamp, методы статистической обработки.

Результаты и их обсуждение

Для записи активности нейронов, экспрессирующих каналродопсин-2 отбирались пирамидные нейроны гиппокампа, флуоресцирующие при возбуждении зеленым (530нм) и синим светом (470нм). Запись активности пирамидных нейронов осуществлялась в режиме фиксации тока и потенциала в конфигурации целая клетка. Световая стимуляция осуществлялась синим светодиодом ($\lambda = 470\text{нм}$, $I_{\text{max}} = 35 \text{ мВ} \cdot \text{мм}^{-2}$, $\varphi = 250 \text{ мВ}$).

Зависимость между частотой светового стимула и генерацией потенциалов действия. Для определения зависимости между активностью пирамидного нейрона гиппокампа, экспрессирующего ChR2 и параметрами светового стимула были проведены эксперименты, в которых при многократной световой стимуляции – 10 световых стимулов, подбиралась частота, при которой на каждый световой стимул генерировался ответный потенциал действия (ПД) (рис.1). Рассматривалась именно генерация ПД, т.к. при любой заданной частоте происходило изменение мембранных токов в ответ на световые стимулы.

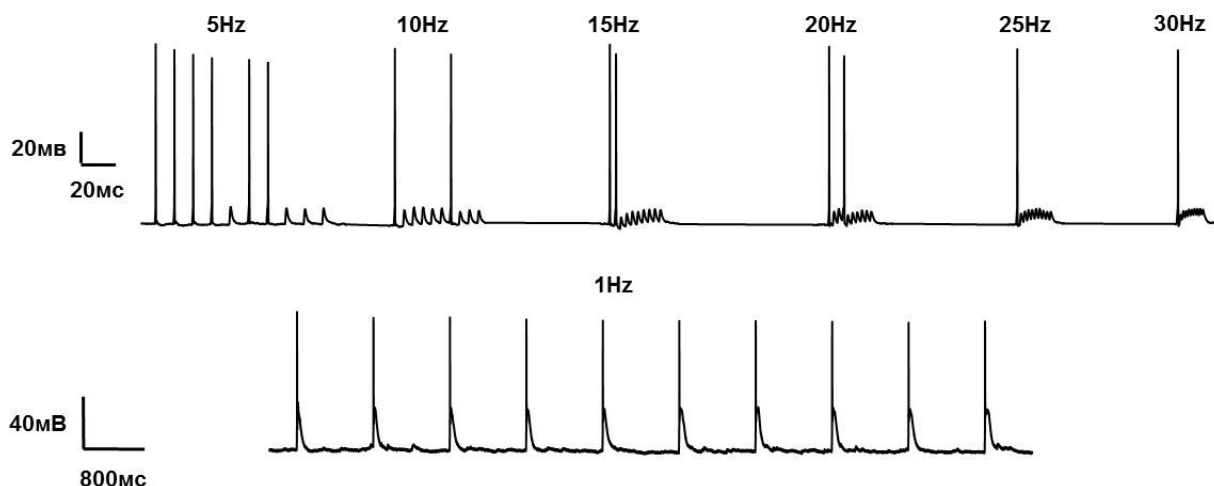


Рис. 1. Генерация потенциалов действия у пирамидного нейрона гиппокампа, экспрессирующего каналродопсин-2 при разных значениях частоты светового стимула ($t = 20\text{мс}$, I_{max})

Согласно полученным результатам было выбрано значение частоты равное 1Гц. Все дальнейшие измерения проводились с этой частотой.

Результаты схожи с данными, опубликованными в статье [11], однако начиная со значения 5Гц и выше наблюдаются расхождения в количестве генерируемых светозависимых потенциалов действия. Данный факт можно объяснить разным уровнем экспрессии ChR2 [11].

Зависимость амплитуды мембранного тока от длительности светового стимула. Следующим этапом работы была оценка влияния длительности светового стимула (1-5мс, 10-50мс, 100-500мс) на амплитуду мембранного тока при разных интенсивностях (рис.2).

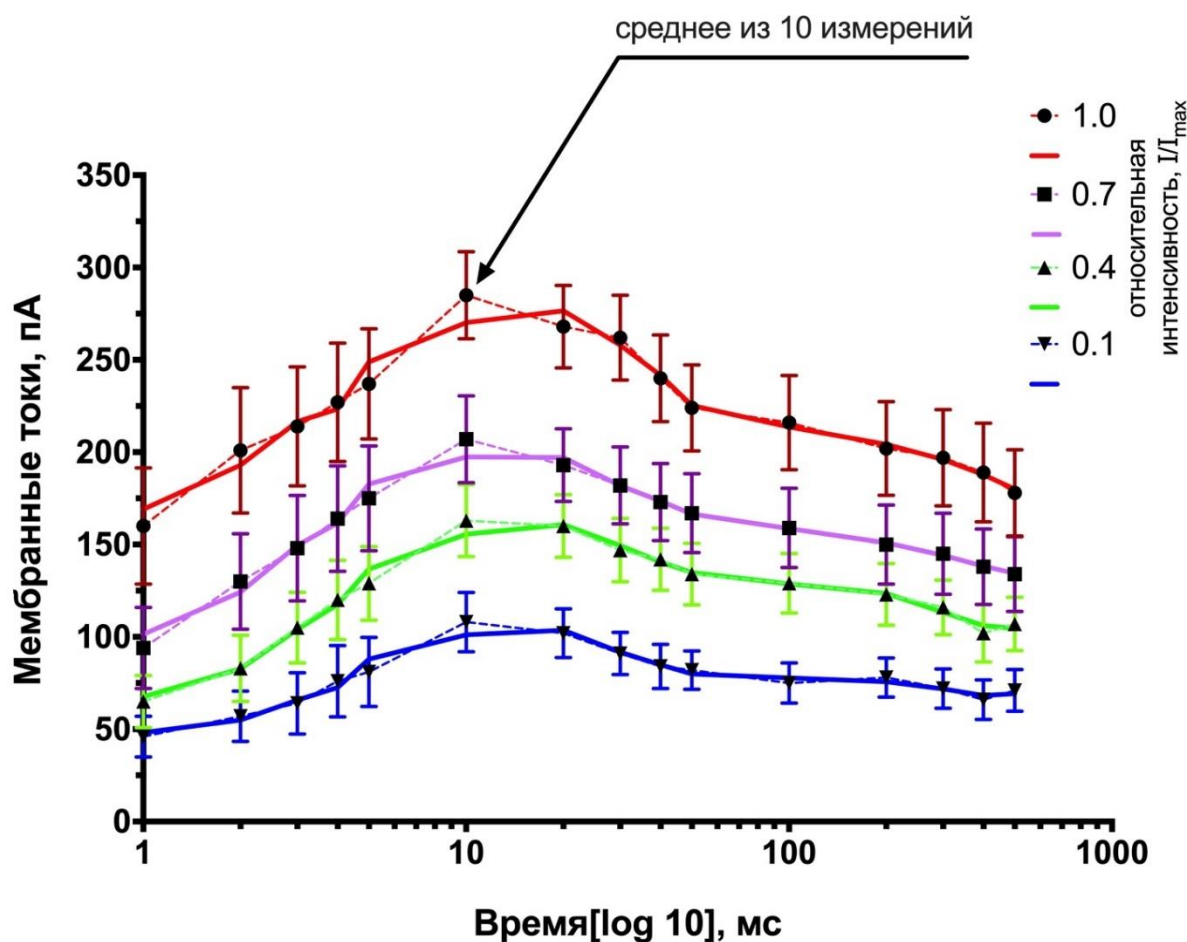
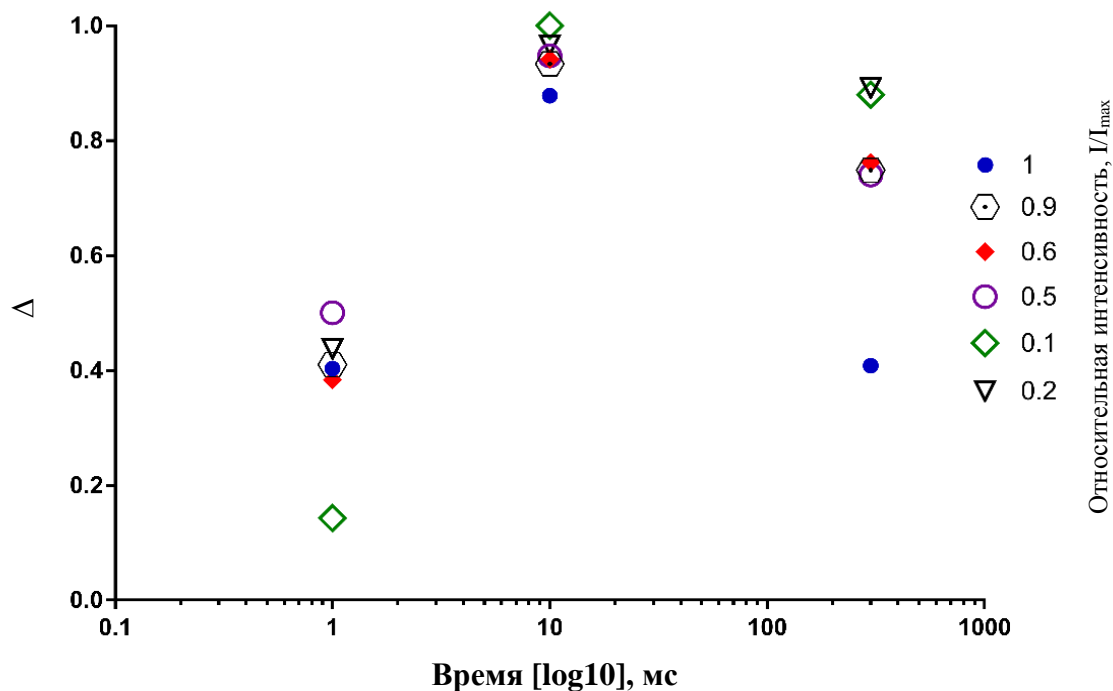


Рис.2. Зависимость амплитуды мембранного тока нейронов гиппокампа от длительности светового стимула при разных интенсивностях света (максимальное значение $I_{\max}=35$ мВ·мм⁻² принималось за 1, n = 10).

Кривая зависимости значения амплитуды мембранного тока от длительности светового стимула имеет максимум в диапазоне длительностей от 10 до 30мс с последующим спадом. Схожая зависимость наблюдалась для всех рассматриваемых интенсивностей. Падение значения амплитуды

мембранного тока при больших длительностях светового стимула (100-500мс) в случае многократного воздействия может быть обусловлено десенсibilизацией части каналродопсинов-2. Для обобщения полученных результатов и их дальнейшего использования на практике была построена диаграмма, в которой по оси абсцисс отмечали длительность светового стимула, по оси ординат отмечали разницу между амплитудами мембранных



токов первого и второго ответов на световой стимул. (Рис. 3).

Рис. 3. Диаграмма, отображающая зависимость между разницей амплитуд мембранного тока для первого и второго стимулов (Δ) и длительностью светового импульса при разных интенсивностях светового потока.

Наименьший разброс между значениями амплитуд мембранных токов первого и второго ответов на световой стимул приходится на промежуток длительностей светового стимула 10-30 мс. При увеличении длительности светового стимула разница между значениями амплитуд мембранных токов увеличивается, т.е. чем дольше происходит световая многократная стимуляция, тем меньше становится значение амплитуды фототоков. В качестве объяснения такой зависимости может быть использован тот факт, что

при длительной световой стимуляции часть каналродопсинов-2 инактивируется.

Впервые объяснение этого факта для одного канала было предложено в [9], где рассматривалась модель фотоцикла ChR2, состоящая из трех состояний: открытого (O), десенсibilизированного (D) и закрытого (C). Однако, после спектрального исследования каналродопсина-2 [12], результаты которого указали на существование четырех кинетических состояний P_1 , P_2 , P_3 и P_4 (рис. 4.) были предложены другие модели, описывающие кинетику ChR2: модель четырех [13, 14] и шести [15] состояний. В качестве основной модели для объяснения полученных в диссертационной работе аспиранта результатов использовалась модель четырех состояний.

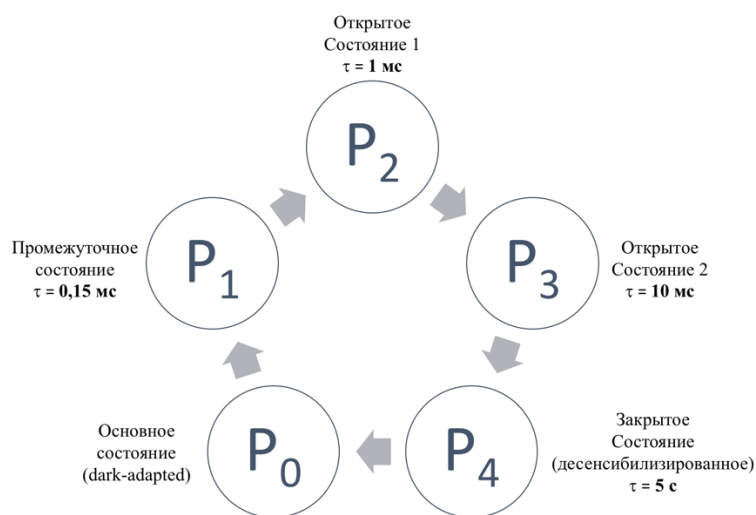


Рис. 4. Схема фотоцикла на основе спектрального анализа [13].

В этой модели выделялись два открытых состояния ($O_1 \rightarrow O_2$) и два закрытых ($C_1 \rightarrow C_2$), при этом состояние O_2 обладало меньшей проводимостью, а состояние C_2 длилось порядка секунд, что может объяснить потерю чувствительности части каналродопсинов-2 при длительных световых стимуляциях (Рис. 2). Состояния, определенные в спектральном анализе канала, можно интерпретировать следующим образом $O_1 \rightarrow O_2$ соответствуют состояниям P_2 и P_3 (открытые состояния с постоянного времени 1 мс и 10 мс соответственно), состояние C_2 (постоянная времени 5 с) соответствует

состоянию P_4 (десенсibilизированное). Состояние C_1 является основным состоянием канала и соответствует P_0 [13]. Вероятно, при больших длительностях светового стимула начинает преобладать состояние P_4 , которое переводит канал в десенсibilизированное состояние, что объясняет полученные результаты (Рис. 1, 2).

Зависимость амплитуды мембранного тока от интенсивности светового стимула. Далее определялась зависимость между значениями амплитуды мембранного тока пирамидного нейрона гиппокампа, экспрессирующего ChR2, от интенсивности светового стимула (рис. 5).

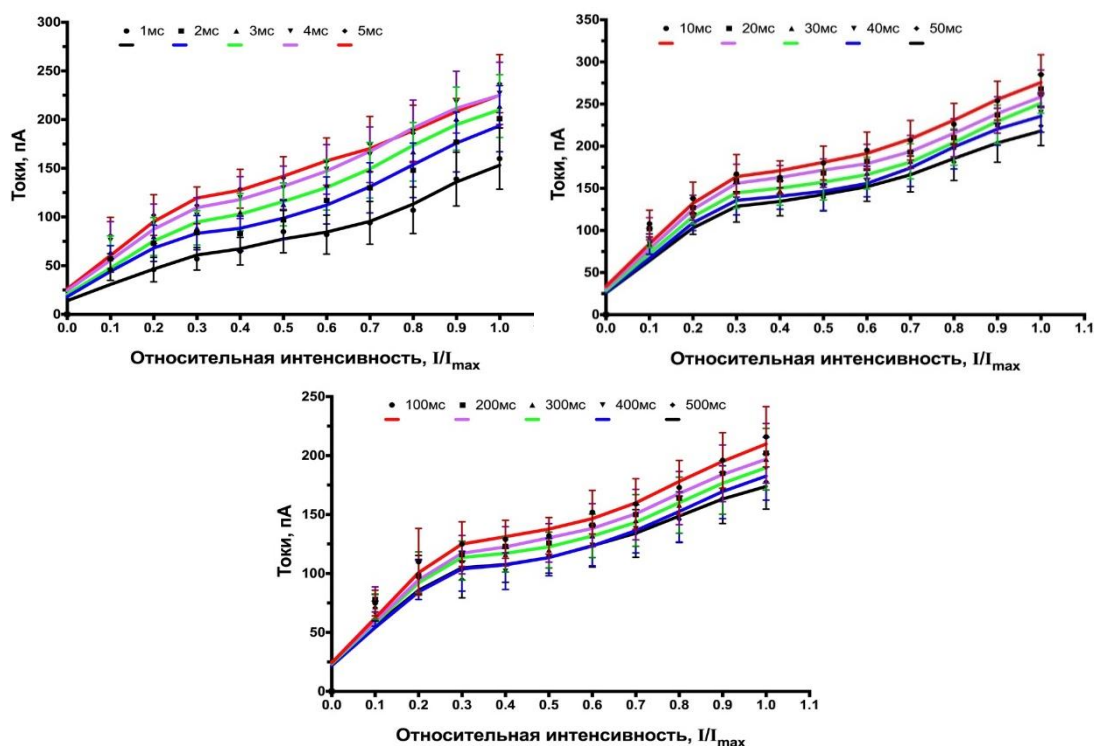


Рис. 5. Зависимость амплитуды мембранного тока от интенсивности светового стимула при разных длительностях светового импульса 1-5 мс (слева), 10-50 мс (по центру), 100-500 мс (справа).

Во всем диапазоне длительностей светового стимула при увеличении интенсивности светового потока происходит увеличение значения амплитуды мембранного тока пирамидального нейрона, экспрессирующего каналродопсины-2.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что максимальное значение амплитуды мембранного тока, вызванное световым воздействием, достигается

при максимальной интенсивности в диапазоне длительностей светового стимула 10-30 мс. Все выявленные зависимости согласуются с опубликованными ранее для ChR2 [9, 13].

Время достижения максимума амплитуды. Представленные ранее зависимости характеризуют изменение амплитуды светоиндуцированных токов в зависимости от выбранных параметров светового стимула. Одним из важных параметров наравне с амплитудой фототоков, который необходимо учитывать при выборе параметров световой стимуляции является время (τ). Под τ понимается временной интервал между началом световой стимуляции и моментом достижения максимального значения амплитуды мембранного тока.

Полученные результаты показали, что при увеличении длительности светового стимула увеличивается τ , однако это происходит до длительности светового стимула (t) равного 50мс включительно, после чего кривая зависимости $\tau \backslash t$ выходит на плато. Полученная зависимость $\tau \backslash t$ имеет сигмоидный характер (Рис. 6).

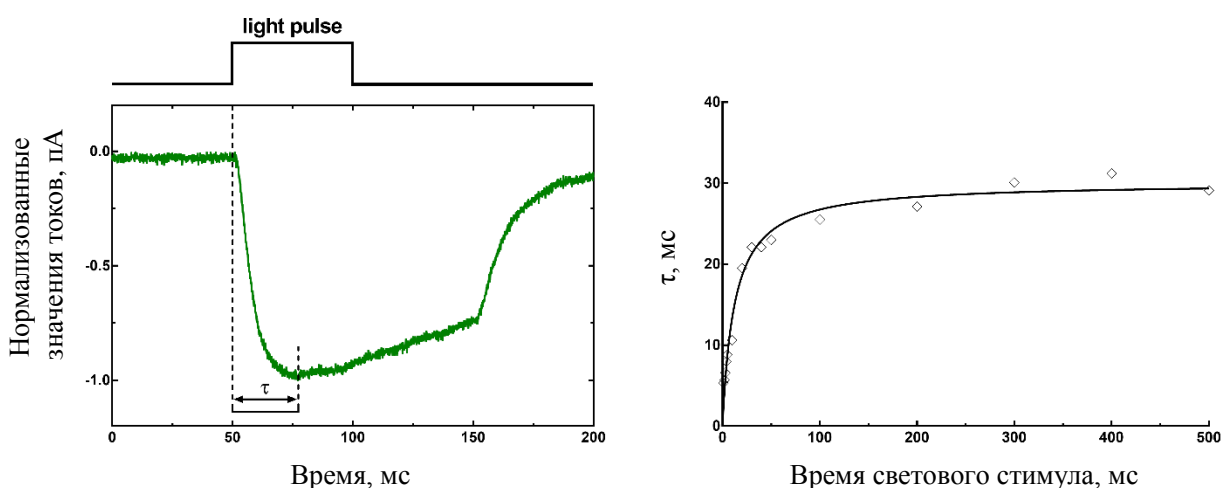


Рис. 6. Фототоки зарегистрированные в режиме фиксации потенциала конфигурации целая клетка при длительности светового стимула $t = 100\text{мс}$, $T = 1\text{Гц}$, $I = I_{\text{max}}$ (слева), зависимость времени τ от длительности светового стимула (справа).

Зависимость $\tau \backslash t$, вероятно, можно объяснить тем, что множество ChR2 каналов синхронизируются между собой, и время этой синхронизации в среднем занимает 50мс. Подтверждением этого факта может служить

значение амплитуды первого ответа нейрона при световом возбуждении, который всегда имеет самое большое значение, по сравнению с остальными значениями амплитуд. Т.е. в начале система ChR2 каналов открывается одномоментно, что дает максимальный поток ионов через мембрану, после чего часть каналов находится в десенсibilизированном состоянии (см. фотоцикл ChR2 рис. 4), а часть каналов в активном. После чего чередование этих состояний входит в некоторое синхронизированное состояние, что объясняется выходом зависимости $\tau \backslash t$ на плато.

Сравнение светоиндуцированной активности пирамидных нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели Болезни Альцгеймера. На основе полученных зависимостей (рис. 3) выбраны параметры светового стимула необходимые для сравнения активности нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели Болезни Альцгеймера (БА).

Выбор трансгенной линии был обусловлен тем, что у мышей-модели БА (экспрессирующих мутантный белок пресенилин-1), несмотря на отсутствие амилоидных отложений в мозгу, ученые обнаружили возникновение дефектов памяти, начиная с 3–4 месячного возраста [16, 17], а также аномалии в активности нейронов, обусловленные нарушением внутриклеточной кальциевой сигнализации. Использование светочувствительных ионных каналов (опсинов) может открыть путь к пониманию механизмов, вызывающих различные патологии и нарушения, например, при БА.

Для сравнения активности нейронов контрольной и мутантной группы оптогенетическим методом были выбраны следующие параметры световой стимуляции: длительность светового стимула – 10мс, частота – 1 Гц, интенсивность – I_{\max} . В режиме фиксации тока в конфигурации «целая клетка» осуществлялось измерение потенциалов на мембране пирамидных нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели БА в ответ на световой стимул с заданными параметрами (Рис. 7).

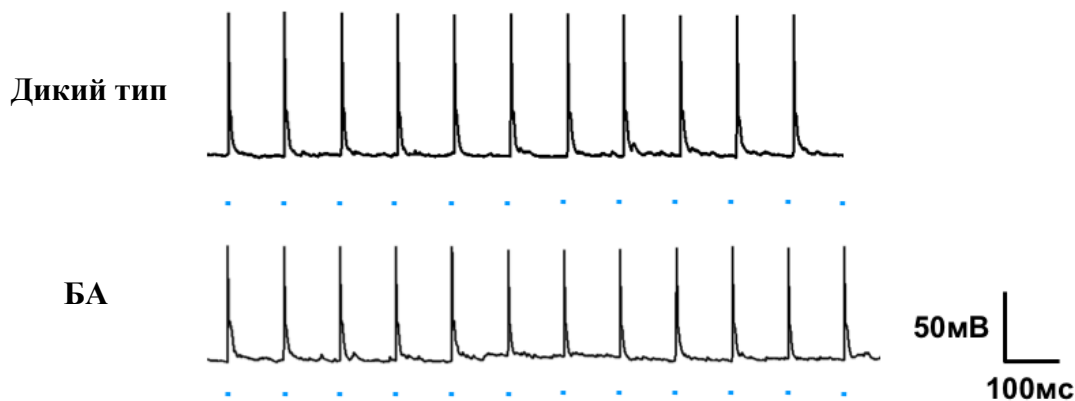


Рис. 7. Активность нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели БА при возбуждении синим светом (470нм, $t = 10\text{мс}$, $T = 1\text{Гц}$, $I = I_{\text{max}}$), зарегистрированная в режиме фиксации тока, конфигурации целая клетка.

При сравнение светоиндуцированных ПД у здоровых клеток и с патологией БА не было обнаружено достоверных отличий при многократной световой стимуляции в подобранных условиях. По этой причине длительность светового стимула была увеличена и выбрана по аналогии с электростимуляцией [18]. Далее проведены аналогичные измерения со следующими параметрами светового стимула: $t = 500\text{мс}$, $T = 1\text{Гц}$, $I = I_{\text{max}}$. Результаты представлены на рисунке 8.

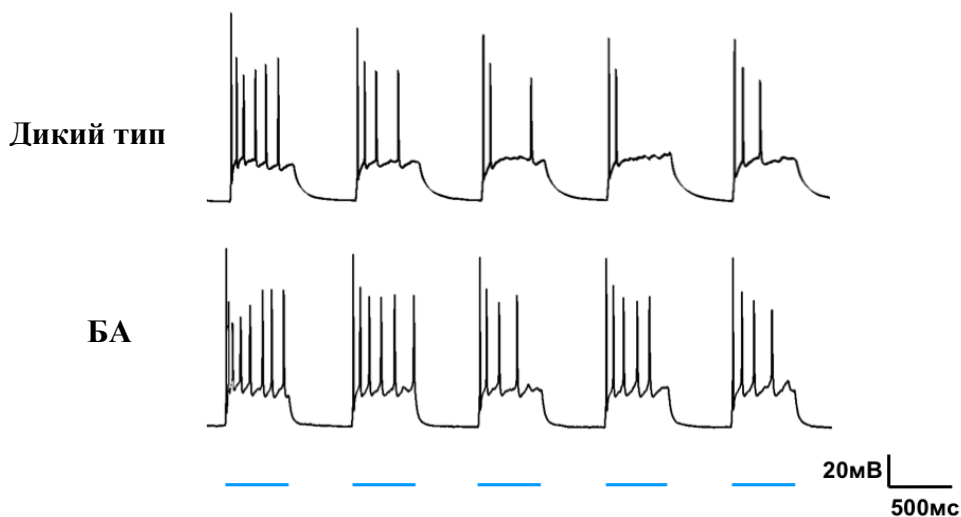


Рис. 8. Активность нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели БА при возбуждении синим светом (470нм, $t = 500\text{мс}$, $T = 1\text{Гц}$, $I = I_{\text{max}}$), зарегистрированная в режиме фиксации тока, конфигурации целая клетка.

Полученные результаты показали (Рис. 9) изменение амплитуды и количества ПД у нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели БА. Количество светоиндуцированных ПД у клеток с патологией на протяжении всего периода световой стимуляции было статистически больше, чем у контрольной группы клеток. При этом значение амплитуды ПД у патологических клеток было статистически меньше, чем у нейронов контрольной группы.

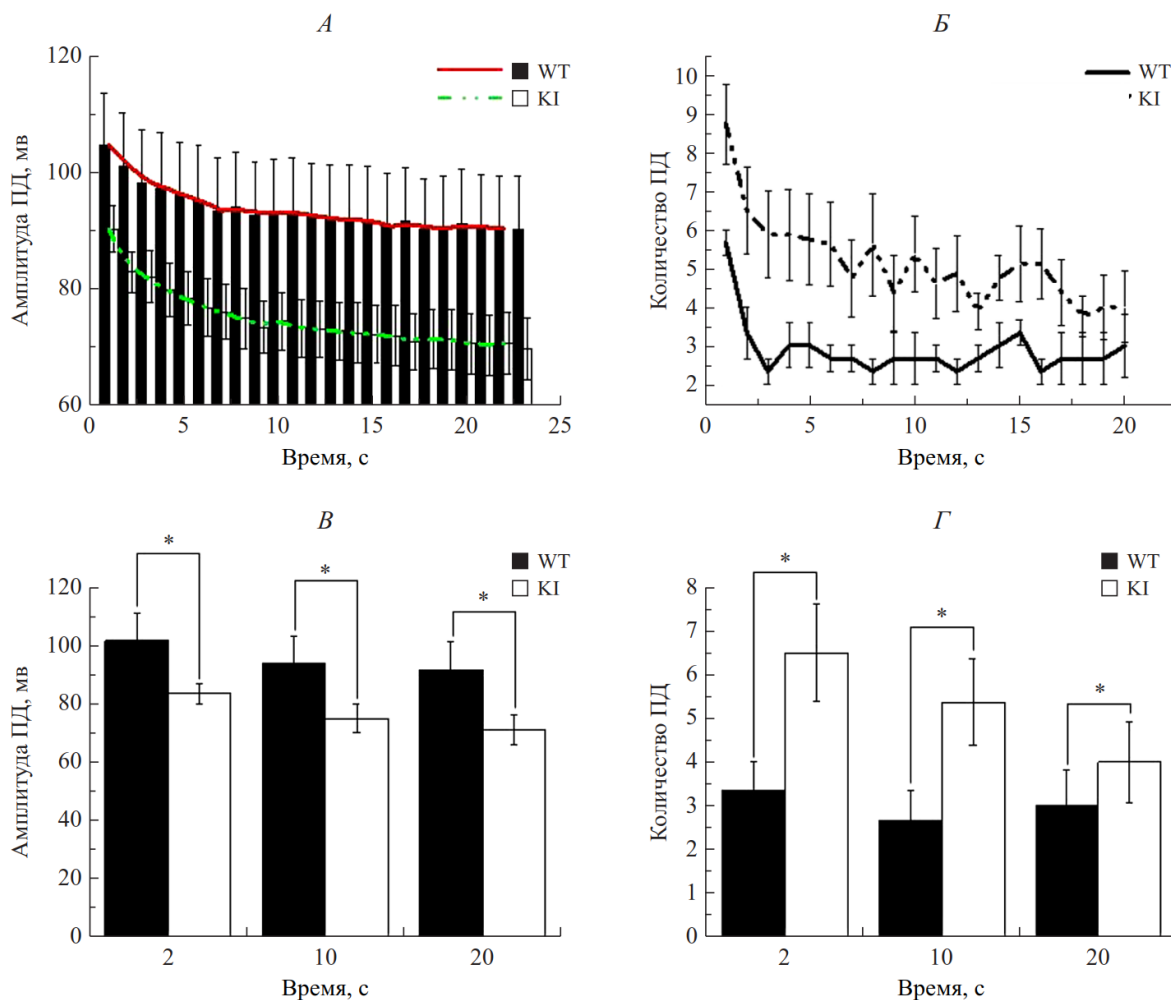


Рис. 9. Динамика изменения амплитуды ПД (А, Б) и их количества (В, Г) у нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей модели БА при световой стимуляции, $p < 0,05$.

Разницу в активности нейронов гиппокампа при световой стимуляции между нейронами контрольной группы и с патологией БА можно объяснить разным начальным потенциалом на мембране, который может быть связан с нарушением кальциевого обмена у мышей-моделей БА. У нейронов с патологией БА мембранный потенциал всегда был смещен в положительную

область, а значит нейроны были более возбудимы. На рис. 10 наглядно продемонстрирована разница в генерации потенциалов действия у здоровых нейронов и с патологией БА, экспрессирующих каналродопсин-2.

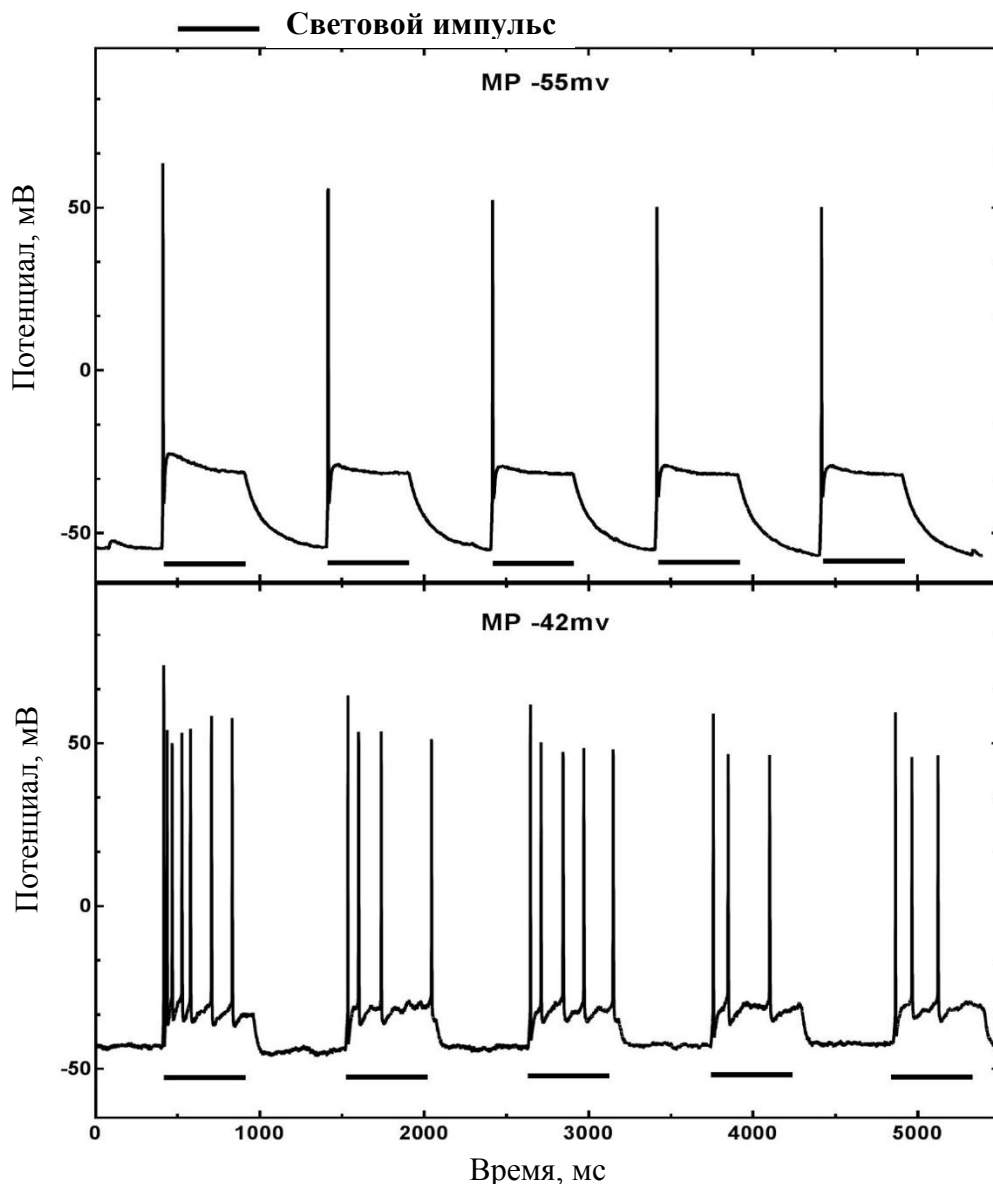


Рис. 10. Генерация потенциалов действия, индуцированная синим светом (470нм, $t = 500\text{мс}$, $T = 1\text{Гц}$, $I = I_{\text{max}}$), записанная в режиме фиксации тока, конфигурации целая клетка для нейронов дикого типа (сверху) и нейронов мышей-моделей БА (снизу) значения мембранных потенциалов указаны без учета погрешности *liquid junction potential*, $n = 5$.

Таким образом, следует отметить, что наряду с выявленными ранее отличиями в активности нейронов дикого типа и БА, с помощью химической активации путем ингибирования ГАМК-рецепторов, электрической стимуляции [18], оптическая стимуляция и оптогенетические инструменты

позволили выявить новые отличия. Молекулярно-клеточные механизмы этого явления могут служить предметом для дальнейших исследований, как фундаментального, так и прикладного характера.

Список литературы

1. Han C.-L. Electrical stimulation of hippocampus for the treatment of refractory temporal lobe epilepsy / Han C.-L., Hu W., Stead M., Zhang T., Zhang J.-G., Worrell G.A., Meng F.-G. // *Brain Research Bulletin* – 2014. – Т. 109 – С.13–21.
2. Jacobs J. Direct Electrical Stimulation of the Human Entorhinal Region and Hippocampus Impairs Memory / Jacobs J., Miller J., Lee S.A., Coffey T., Watrous A.J., Sperling M.R., Sharan A., Worrell G., Berry B., Lega B., Jobst B.C., Davis K., Gross R.E., Sheth S.A., Ezzyat Y., Das S.R., Stein J., Gorniak R., Kahana M.J., Rizzuto D.S. // *Neuron* – 2016. – Т. 92 – № 5 – С.983–990.
3. Hutcheon B. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons // *Trends Neurosci.* – 2000. – Т. 23. – № 5. – 216–222с.
4. Somogyi P. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus // *J. Physiol.* – 2005. – Т. 562. – № 1. – 9–26с.
5. Boyden E.S. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity / Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. // *Nature Neuroscience* – 2005. – Т. 8 – № 9 – С.1263–1268.
6. Liu X. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall / Liu X., Ramirez S., Pang P.T., Puryear C.B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S. // *Nature* – 2012. – Т. 484 – № 7394 – С.381–385.
7. Ramirez S. Identification and optogenetic manipulation of memory engrams in the hippocampus / Ramirez S., Tonegawa S., Liu X. // *Frontiers in Behavioral Neuroscience* – 2014. – Т. 7.
8. Hodges J.R. Differential impairment of semantic and episodic memory in Alzheimer's and Huntington's diseases: A controlled prospective study / Hodges J.R., Salmon D.P., Butters N. // *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* – 1990. – Т. 53 – № 12 – С.1089–1095.
9. Nagel G. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane

channel / Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2003. – T. 100 – № 24 – C.13940–13945.

10. Vann K.T. Optogenetics for neurodegenerative diseases // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2016. – T. 8. – № 1. – 1–8c.

11. Ishizuka T. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels / Ishizuka T., Kakuda M., Araki R., Yawo H. // *Neuroscience Research* – 2006. – T. 54 – № 2 – C.85–94.

12. Bamann C. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond / Bamann C., Gueta R., Kleinlogel S., Nagel G., Bamberg E. // *Biochemistry* – 2010. – T. 49 – № 2 – C.267–278.

13. Nikolic K. Photocycles of channelrhodopsin-2 / Nikolic K., Grossman N., Grubb M.S., Burrone J., Toumazou C., Degenaar P. // *Photochemistry and Photobiology* – 2009. – T. 85 – № 1 – C.400–411.

14. Hegemann P. Multiple photocycles of channelrhodopsin / Hegemann P., Ehlenbeck S., Gradmann D. // *Biophysical Journal* – 2005. – T. 89 – № 6 – C.3911–3918.

15. Grossman N. The spatial pattern of light determines the kinetics and modulates backpropagation of optogenetic action potentials / Grossman N., Simiaki V., Martinet C., Toumazou C., Schultz S.R., Nikolic K. // *Journal of Computational Neuroscience* – 2013. – T. 34 – № 3 – C.477–488.

16. Wang R. Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis / Wang R., Dineley K.T., Sweatt J.D., Zheng H. // *Neuroscience* – 2004. – T. 126 – № 2 – C.305–312.

17. Sun X. Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation / Sun X., Beglopoulos V., Mattson M.P., Shen J. // *Neurodegenerative Diseases* – 2005. – T. 2 – № 1 – C.6–15.

18. Zhang H. Calcium Signaling, Excitability, and Synaptic Plasticity Defects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease / Zhang H., Liu J., Sun S., Pchitskaya E.,

Popugaeva E., Bezprozvanny I. // Journal of Alzheimer's Disease – 2015. – Т. 45 – № 2 – С.561–580.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлен интервал частот (1–5 Гц, I_{\max}), при котором в ответ на многократный световой стимул происходит регулярная генерация потенциалов действия. Определен интервал длительностей светового стимула (10–30 мс), при котором амплитуда мембранного тока при световой стимуляции (1Гц, I_{\max}) достигала максимального значения и сохраняла стабильность при многократном воздействии. Показано, что амплитуда мембранного тока увеличивается при увеличении интенсивности светового стимула. В результате сравнения нейронов гиппокампа мышей дикого типа и мышей-модели Болезни Альцгеймера оптогенетическим методом выявлены различия в количестве генерируемых потенциалов действия и их амплитуде при длительной многократной световой стимуляции (500мс, 1Гц, I_{\max}), предположительно обусловленные различиями в начальном потенциале на клеточной мембране в норме и при патологии.

Полученные результаты позволят в дальнейшем подобрать необходимые условия для проведения оптогенетических экспериментов, в том числе на мышах-моделях нейродегенеративных заболеваний.

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. Ерофеев А.И., Матвеев М.В., Терехин С.Г., Захарова О.А., Плотникова П.В., Власова О.Л. Оптогенетика -новый метод исследования нейрональной активности. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2015. 3(225):61-74.
2. Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Терехин С.Г., Плотникова П.В., Воробьев К.В., Власова О.Л. Имплантируемые устройства для оптогенетических исследований и стимуляции возбудимых тканей. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2015. 3(225):75-85.
3. Ерофеев А.И., Захарова О.А., Терехин С.Г., Плотникова П.В., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Оптогенетическое исследование электрофизиологических особенностей нейронов гиппокампа трансгенных мышей линии PS1-M146V (модель болезни Альцгеймера). Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, 2017. Т. 67. № 5. С. 63-74.
4. Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Пяташев Е.Н., Акульшин Ю.Д., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Опто-электродная система нейростимуляции с адаптивной обратной связью. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, 2017. Т. 67. № 5. С. 86-93.
5. S
m
i
r
6. Ерофеев А.И., Матвеев М.В., Терехин С.Г., Захарова О.А., Плотникова П.В., Власова О.Л. Оптогенетика -новый метод исследования v
a
E
E

- нейрональной активности. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2015. 3(225):61-74.
7. Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Терехин С.Г., Плотникова П.В., Воробьев К.В., Власова О.Л. Имплантируемые устройства для оптогенетических исследований и стимуляции возбудимых тканей. Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2015. 3(225):75-85.
 8. Ерофеев А.И., Захарова О.А., Терехин С.Г., Плотникова П.В., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Оптогенетическое исследование электрофизиологических особенностей нейронов гиппокампа трансгенных мышей линии PS1-M146V (модель болезни Альцгеймера). Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, 2017. Т. 67. № 5. С. 63-74.
 9. Матвеев М.В., Ерофеев А.И., Пятышев Е.Н., Акульшин Ю.Д., Безprozванный И.Б., Власова О.Л. Опто-электродная система нейростимуляции с адаптивной обратной связью. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, 2017. Т. 67. № 5. С.86-93.
 - 10.1. Смирнова Е.Ю., Ерофеев А.И., Власова О.Л., Чижов А.В., Зайцев А.В. Система биологической обратной связи для подавления эпилептической активности в оптогенетическом эксперименте. Российский физиологический журнал им. Сеченова, 104(6), 2018

Публикации в других изданиях

1. Erofeev A.I., Zakharova O.A., Terekhin S.G., Plotnikova P.W., Bezprozvanny I.B., Vlasova O.L., Future of Optogenetics: Potential Clinical Applications? Opera medica et physiologica. 2016. 2(2):117-121.
2. Терехин С.Г., Ерофеев А.И., Захарова О.А., Власова О.Л. Освоение методики и отработка условий проведения оптогенетических исследований на клетках в культуре. Неделя науки СПбПУ. материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. 2017. С. 475-478.

3. Ерофеев А.И., Арзамасцев Г.А., Герасимов Е.И., Власова О.Л. Определение параметров светового воздействия на нейроны гиппокампа в оптогенетических экспериментах. Неделя науки СПбПУ. материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. 2017. С. 450-452.
4. Ерофеев А.И., Безпрозванный И.Б., Власова О.Л. Режимы световой стимуляции нейронов в культуре. Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология», Сборник научных трудов / Под общ. ред. д.б.н. М.Л. Фирсова.— СПб: ВВМ, 2018.
5. Ерофеев А.И., аспирант, Власова О.Л. Световые кванты как инструмент для изучения и регулирования электрической активности нейронов. Материалы 3-ей Международной научной конференции “Технологическая перспектива
6. В рамках евразийского пространства: новые рынки и точки экономического роста” / Под. ред. доц. М.И. Барабановой и др. — СПб: Астерион, 2017.
1. Смирнова Е.Ю., Ерофеев А.И., Власова О.Л., Чижов А.В., Зайцев А.В. Система биологической обратной связи в оптогенетическом эксперименте. Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием «Оптогенетика и оптофармакология», Сборник научных трудов / Под общ. ред. д.б.н. М.Л. Фирсова.— СПб: ВВМ, 2018.

Аспирант _____ **Ерофеев А.И.**

(подпись)