

ОПТОГЕНЕТИКА: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

© 2023 г. М. П. Кирпичников^{a,b,*}, М. А. Островский^{b,c,**}

^aИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^cИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

*E-mail: kirpichnikov@inbox.ru

**E-mail: ostrovsky3535@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2023 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принята к публикации 10.08.2023 г.

Статья посвящена оптогенетике как методу, позволяющему клеткам организма приобретать светочувствительность. Коротко рассматривается история возникновения и развития оптогенетики, обсуждается её роль в изучении как фундаментальных механизмов работы мозга, так и в понимании механизмов ряда неврологических и психических заболеваний, в том числе связанных с потерей памяти.

Авторы уделяют пристальное внимание перспективам клинического применения методов оптогенетики, в первую очередь применительно к офтальмологии. Клинические испытания показали принципиальную возможность оптогенетического протезирования “слепой” сетчатки и частично-восстановления зрительных функций. Приводятся данные об одном из четырёх ведущихся сейчас успешных клинических испытаний. Подробно обсуждаются условия дальнейшего развития технологий оптогенетического протезирования “слепой” сетчатки на последних стадиях нейродегенеративного процесса. Обсуждается вопрос о типе нервных клеток дегенерирующей сетчатки, наиболее перспективных для оптогенетического протезирования. Авторы полагают, что гены зрительных, G-белок-связывающих родопсинов (скорее всего колбочек), запускающие ферментативный каскад усиления светового сигнала, наиболее перспективны для оптогенетического протезирования. При этом не отрицается возможность использования генов генно-модифицированных канальных родопсинов, как показывают клинические испытания.

Ключевые слова: оптогенетика, мозг, оптогенетическое протезирование сетчатки глаза, адено-ассоциированный вирус, биполярные и ганглиозные клетки сетчатки, зрительные родопсины, генно-модифицированные канальные родопсины, клинические испытания.

DOI: 10.31857/S0869587323090086, EDN: SMSXLA



КИРПИЧНИКОВ Михаил Петрович – академик РАН, академик-секретарь Отделения биологических наук РАН, заведующий отделом биоинженерии ИБХ РАН, декан биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. ОСТРОВСКИЙ Михаил Аркадьевич – академик РАН, заведующий кафедрой молекулярной физиологии МГУ им. М.В. Ломоносова, заведующий лабораторией физико-химических основ рецепции ИБХФ РАН.

Оптогенетика – это метод, который позволяет клеткам организма приобретать светочувствительность благодаря доставке в клетки гена светочувствительного белка родопсина. При поглощении света родопсин, экспрессированный геном и встроенный в мембрану клетки, управляет её физиологической активностью. В 2010 г. ведущие мировые журналы назвали оптогенетику перспективнейшей медико-биологической технологией будущего. Само же понятие и термин “оптогенетика” появились за пять лет до этого.

Истоки оптогенетики лежат в Петербургском и Московском университетах. 160 лет назад профессор Санкт-Петербургского университета, известный ботаник академик Андрей Сергеевич Фаминцын (1835–1918) описал фототаксис у одноклеточных зелёных водорослей, то есть их двигательную реакцию на свет [1]. В конце 1970-х годов профессор Биологического факультета МГУ

Феликс Фёдорович Литвин и его молодые сотрудники, братья Олег и Виталий Синешёковы, показали, что фототаксисом этих одноклеточных водорослей управляет светочувствительный белок родопсин [2]. Их статья была опубликована в журнале “Nature” и никак не предвещала появление оптогенетики. Прошло ещё четверть века и в начале 2000-х годов в Германии ген родопсина этих водорослей был экспрессирован в культуре клеток. Оказалось, что родопсин работает как светоактивируемый катионный канал, и он был назван *канальным родопсином (Channelrhodopsin)* [3]. А ещё через пару лет, теперь уже в Америке, ген канального родопсина экспрессировали в нейронах мозга мыши и показали, что в ответ на свет в них возникает импульсная активность, то есть физиологическое возбуждение [4]. Так родилась *оптогенетика*, основанная на трёх китах — физиологии, геной инженерии и свете.

Надо сказать, что идею точно управлять нейронами впервые высказал в 1979 г. Френсис Крик — один из родоначальников молекулярной биологии. Двадцать лет спустя он предложил использовать для этого свет. Оптогенетика превратила идею Крика в реальность. Благодаря ей за последние 10–15 лет достигнуты поразительные успехи в экспериментальных исследованиях, особенно в нейробиологии. Открыты ранее не известные функции нейронов мозга, описаны новые нейронные цепи, стали понятнее механизмы патогенеза ряда неврологических и психических заболеваний, что позволяет наметить новые пути их лечения. С помощью оптогенетики становится возможной направленная эпигенетическая регуляция. В будущем это может найти применение в лечении такого заболевания, как мышечная дистрофия.

Что касается *нейрофизиологических основ поведения*, то, например, у мышей и крыс с помощью оптогенетики идентифицированы нейроны, отвечающие за принятие поведенческого решения, нейроны в гипоталамусе мышей, контролирурующие агрессию. В последнее время успешно разрабатываются оптогенетические подходы к исследованию нейрофизиологических механизмов поведения не только у грызунов, но и у приматов, скажем, у макак-резусов [5]. Иначе говоря, открываются перспективы изучения на животной модели с хорошо развитым мозгом сложного сенсорного, моторного и когнитивного поведения. Впечатляющие результаты получены с помощью оптогенетики при изучении *механизмов памяти* — запоминания и вспоминания. Становится всё понятнее, как именно образуется память — краткосрочная и долгосрочная, как мозг хранит информацию, какие воспоминания останутся надолго, а какие исчезнут, как укрепить память, как восстановить работу мозга после болезни (инсульта) или травмы. Оптогенетика позволила визуализи-

ровать *энграммы* — следы в мозге. Речь идёт о нейронных цепях, которые возникают при формировании памяти или которые реактивируются при извлечении информации из памяти, то есть при воспоминании. С помощью оптогенетических методов оказалось возможным активировать те или иные нейроны, отключать или запускать определённые энграммы — вполне конкретные сети нейронов, иными словами, произвольно вызывать воспоминания, как это ни удивительно. В эксперименте показано, что при искусственной активации определённой энграммы мышь замирает, то есть проявляет типичную для неё поведенческую реакцию на опасность.

На недавней, уже третьей по счёту, конференции по оптогенетике в Петербурге были представлены данные, согласно которым энграммы запоминания перетекают в энграммы хранения памяти, откуда воспоминания могут быть извлечены. Несколько лет тому назад опубликованы результаты поразительного исследования, авторам которого удалось создать у мышей полностью искусственную память [6]. Основываясь на технологии формирования и исследования условных рефлексов И.П. Павлова, авторы заменили естественный условнорефлекторный сигнал (запах) на оптогенетическую стимуляцию определённого обонятельного клубочка в обонятельной луковице, а естественный безусловный сигнал — на оптогенетическую стимуляцию конкретной области мозга, ответственной за создание либо чувства отвращения, либо наслаждения. Было показано, что и искусственная, и естественная память обеспечивается одними и теми же нервными цепями (энграммами). Иначе говоря, используя оптогенетические методы, у экспериментальных животных (мышей) удалось создать память в отсутствие как такового естественного события (или сигнала), которое надо было бы запомнить.

Сейчас оптогенетика играет ключевую роль не только в изучении фундаментальных нейрофизиологических механизмов работы мозга, но и в понимании механизмов неврологических и психических заболеваний, в том числе связанных с потерей памяти или с образованием патологической памяти. В первом случае речь идёт о патогенезе и возможных путях лечения болезни Альцгеймера, во втором — о наркомании, которую специалисты рассматривают как аномальный процесс обучения и памяти. Обнаружение нейронных сетей, отвечающих за патологическое обучение и память, и возможное вмешательство в их работу открывает перспективу лечения наркомании.

Несомненные успехи достигнуты в понимании патогенеза и путей лечения ряда тяжёлых неврологических заболеваний. Одна из самых распространённых нейродегенеративных патоло-

гий — болезнь Паркинсона, хроническая и пока не поддающаяся лечению. Работы последних лет на модельных животных свидетельствуют, что оптогенетическая стимуляция определённых глубинных отделов мозга приводит к исчезновению моторных симптомов болезни Паркинсона. В перспективе это путь к облегчению и даже лечению этого тяжелейшего расстройства. Другим неврологическим заболеванием, для исследования механизмов которого и лечения перспективна оптогенетика, является эпилепсия. Сейчас до 30% пациентов невосприимчивы к практикуемым способам её лечения. Структуры мозга, механизмы и нейронные цепи, ответственные за судорожные припадки, в настоящее время достаточно хорошо известны. Поэтому вмешательство в работу соответствующих нейронных цепей, их регуляция с помощью оптогенетических технологий эффективно прекращают эпилептический припадок, как это многократно показано на экспериментальных животных. Вполне реальная возможность клинического применения соответствующих методов также обсуждалась на конференции в Петербурге. Ещё одно чрезвычайно важное направление, в изучении которого оптогенетика становится одной из ведущих методик, — это депрессия и боль. К настоящему времени накоплены важнейшие данные, касающиеся нейрофизиологических механизмов различных форм как депрессии, так и боли, в особенности мигрени.

Свидетельством всё возрастающей роли оптогенетики в различных областях экспериментальных и, будем надеяться, клинических исследований стало создание в 2020 г. сорока пятью лабораториями мира базы данных существующих оптогенетических ресурсов. Как показывает практика, эта база оказалась исключительно востребованной.

Следует иметь в виду, что для реальных клинических применений оптогенетических методов в неврологии, психиатрии или терапии внутренних органов есть одно существенное препятствие — необходимость доставки света к нейронам мозга или клеткам внутренних органов. Ведь не станет же хирург делать отверстие в черепе пациента, чтобы вставить в него световод и освещать клетки мозга! Поэтому во многих лабораториях мира ведутся активные поиски неинвазивных методов воздействия на оптогенетически “протезированные” клетки. К таким методам относятся тепло и сфокусированный ультразвук. Обсуждению этого направления под общим названием *термогенетика* уделялось довольно большое внимание на третьей оптогенетической конференции в Петербурге. Речь шла о способах управления (пока что у экспериментальных животных) активностью мозга, сердечным ритмом, выбросом инсулина из поджелудочной железы. До клинических испытаний термогенетике предстоит пройти ещё до-

вольно большой путь, но надежда на успех весьма велика.

Реальной областью клинических применений методов оптогенетики уже сегодня является офтальмология. Действительно, свет самым естественным образом доходит до сетчатки глаза. В то же время потребность в восстановлении зрения у пациентов, полностью или практически слепых, исключительно велика и продолжает расти, поскольку население мира и увеличивается, и стареет. По данным журнала “Lancet” за 2017 г. около 40 млн человек считаются слепыми, а к 2050 г., как предполагается, это число может достичь 60 млн. На долю нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в первую очередь возрастной макулярной дегенерации, приходится около четверти слепых людей. Важно понимать, что при большинстве нейродегенеративных заболеваний сетчатки, независимо от их формы, погибают зрительные клетки — сначала палочки, а затем и колбочки. Но при этом в сетчатке как “части мозга, помещённой в глаз” (по определению великого испанского гистолога С. Рамон-и-Кахала) сохраняются частично или даже полностью неповреждёнными её нервные, несветочувствительные клетки. Именно то обстоятельство, что ганглиозные клетки сетчатки — её “выходные” нейроны, посылающие по своим длинным отросткам (аксонам) информацию в мозг, остаются дееспособными, стало основой *электронного протезирования зрения*. Имплантация электронных чипов в “слепую” сетчатку позволяет частично возвращать пациентам зрение: различать крупные предметы, даже буквы, ориентироваться в пространстве. За последние примерно 15 лет по этому вопросу накопилась обширная литература. Однако перспективы электронного протезирования сетчатки остаются не слишком радужными. Дело в том, что неизбежным следствием такого протезирования становится зарастание места контакта чипа с нейронами глиальных клеток. В результате сложная и весьма дорогостоящая операция через год-полтора становится бесполезной. Основная же идея *оптогенетического протезирования сетчатки* состоит не в том, чтобы с помощью чипа возбуждать нервные клетки, а в том, чтобы превратить сохранившиеся в ходе дегенеративного процесса нервные клетки в светочувствительные (псевдофоторецепторы). Именно потому, что свет через оптическую систему глаза естественным образом фокусируется на сетчатке и что нервные клетки дегенеративной сетчатки остаются “здоровыми” (вопрос, насколько здоровыми, по-прежнему дискуссионный), практически сразу после появления оптогенетики как метода начались исследования по оптогенетическому протезированию нейродегенеративной сетчатки. Первая такая работа была опубликована в 2006 г.,

за ней последовали работы многих лабораторий мира [7].

Остановимся на состоянии оптогенетического протезирования нейродегенеративной сетчатки в настоящее время. Важнейшим событием в этой области стало проведение четырёх независимых клинических испытаний. Одно из них, самое, по-видимому, успешное, причём о нём имеется достаточно полная информация, выполнено франко-швейцарской группой [8]. Пациенту, полностью ослепшему более 10 лет назад, удалось частично восстановить зрение. Сам он осознал это во время прогулки, когда понял, что может различать белые полосы на пешеходном переходе, а затем “он смог увидеть тарелки, кружки, телефон, предметы мебели в комнате, двери в коридоре, но только при использовании очков”. К очкам мы ещё вернёмся, но принципиально важно, что это первый зарегистрированный случай частичного восстановления зрения при нейродегенеративном заболевании в результате оптогенетической терапии. Однако, несмотря на то, что в последние годы успехи генной терапии некоторых нейродегенеративных заболеваний сетчатки впечатляющие, многие из таких недугов не могут быть излечены этим методом, поскольку причиной, например пигментного ретинита, нередко являются мутации нескольких десятков разных генов. “Исправление” же такого количества дефектных генов методами генной терапии вряд ли возможно.

Дойти до клинических испытаний оптогенетического протезирования зрения стало возможным благодаря большому массиву экспериментальных данных, полученных в основном на нокаутных мышах, а также на собаках и приматах, с фенотипом пигментного ретинита. Из совокупности всех этих данных следовало, что для доставки гена светочувствительного белка родопсина к нервным клеткам сетчатки наиболее приемлемым вектором является адено-ассоциированный вирус. Он давно и широко используется в клинике и для генной терапии различных заболеваний, и в составе противовирусных вакцин как эффективный и безопасный вектор. Его недостаток – небольшая ёмкость вирусного капсида, но поскольку гены опсинов (светочувствительные рецепторы) сравнительно малы, то этот недостаток пока что не препятствует оптогенетическому протезированию. В ходе экспериментальных работ получены модифицированные серотипы адено-ассоциированных вирусов, обладающие повышенным сродством к нейронам сетчатки модельных животных. Для доставки же генов опсина в клетки дегенеративной сетчатки человека были разработаны специальные сочетания серотипа адено-ассоциированного вируса AAV2 и промотора. В упомянутой работе франко-швейцарской группы использовался именно “человеческий” серотип 2.7m8 адено-ассоциированного вирусного вектора, не-

сущего ген модифицированного канального родопсина ChrimsonR-tdTomato13 и промотора CAG (AAV2.7m8-CAG-ChrimsonR-tdTomato).

Как уже было сказано выше, именно канальный родопсин зелёных водорослей породил оптогенетику. Различные генно-модифицированные канальные родопсины и сейчас служат инструментами для почти всех экспериментальных исследований. У канальных родопсинов как светочувствительных инструментов оптогенетики масса преимуществ. С ними выполнено большинство экспериментальных работ на модельных животных по оптогенетическому протезированию дегенеративной сетчатки. Во всех четырёх ведущихся сейчас клинических испытаниях используются генно-модифицированные канальные родопсины. В работе франко-швейцарской группы ген модифицированного канального родопсина ChrimsonR-tdTomato13 – это всё тот же генно-инженерно-модифицированный канальный родопсин, спектр поглощения которого сдвинут в длинноволновую, красную, область. Сделать это было необходимо потому, что с точки зрения светового повреждения сетчатки красный свет наименее опасен. “Классический” же канальный родопсин поглощает свет в синей области спектра, а синий свет, особенно яркий, опасен, он легко повреждает сетчатку. Хорошо известно, что сетчатка чрезвычайно чувствительна к фотоповреждению, причём именно в фиолетово-синей области спектра. Однако сместить спектр поглощения канального родопсина в красную область оказалось недостаточным. Для того чтобы пациент смог что-то увидеть, понадобились “очки”. Вот что пишут авторы: “У слепого пациента мы объединили внутриглазную инъекцию адено-ассоциированного вирусного вектора, содержащего ChrimsonR (генно-инженерный модифицированный вариант канального родопсина2), со световой стимуляцией с помощью специальных светостимулирующих очков”. Иными словами, пациент был снабжён сложным оптическим устройством с видеокамерой снаружи и проектором внутри, выполненным в виде “очков”. Без таких “очков” он ничего не видел, потому что канальные родопсины мало чувствительны к свету. Чтобы физиологически возбудить или затормозить протезированную канальным родопсином клетку, нужно дать довольно яркий свет. Однако если для нейронов мозга это не столь страшно, то для сетчатки крайне опасно. Освещая слишком ярко, её можно повредить.

Какие же требования должны предъявляться к родопсину как инструменту для оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки? В их числе высокая светочувствительность и высокая скорость фотответа; минимальный риск фототоксичности и минимальная иммуногенность. Всем этим требованиям отвечает не ка-

нальный родопсин из водорослей, а естественный зрительный родопсин палочек и колбочек сетчатки глаза. Суть различия между естественным зрительным родопсином палочек и колбочек и канальным родопсином состоит в уровне деполаризации (возбуждения) протезированной ими клетки в ответ на поглощённый квант света. Один квант света, поглощённый одной молекулой канального родопсина, открывает один канал, через который внутрь клетки поступают ионы натрия. Один же квант света, поглощённый одной молекулой зрительного родопсина, активирует ферментативный каскад усиления, и результатом становится открытие многих ионных каналов; через них внутрь клетки поступает гораздо больше ионов натрия. Другими словами, уровень деполаризации (возбуждения) протезированной зрительным родопсином клетки дегенеративной сетчатки в ответ на поглощённый квант света во много раз больше, то есть её чувствительность к свету гораздо выше. А значит, не нужны никакие “очки”. Расчёты показывают, что если пороговая чувствительность канального родопсина равна $10^{13}–10^{15}$ квантов/см²/сек, то пороговая чувствительность зрительного родопсина $10^{11}–10^{12}$ квантов/см²/сек. Таким образом, чувствительность протезируемой клетки сетчатки к свету в случае зрительного родопсина на два-три порядка выше, чем в случае канального родопсина.

Путь к оптогенетическому протезированию сетчатки с помощью зрительного родопсина только начал – в экспериментах на модельных животных. По этому поводу к сегодняшнему дню опубликовано всего несколько работ. Оказалось, что лучше всего для протезирования подходят колбочковые родопсины. В успешной работе американских авторов были получены крайне обнадеживающие в этом смысле результаты с колбочковым средневолновым родопсином, то есть с геном родопсина из зелёно-чувствительных колбочек, который они экспрессировали в ганглиозных клетках [9]. Мы в нашей последней работе экспрессировали коротковолновый колбочковый опсин, притом неселективно – и в биполярных, и в ганглиозных клетках дегенеративной сетчатки нокаутной мыши [10]. Основным результатом, полученный в этой работе, сводится к тому, что неселективная экспрессия колбочкового опсина в нервных клетках сетчатки приводит к достоверному восстановлению зрительной функции у нокаутных мышей с пигментным ретинитом, у которых дегенерировал фоторецепторный слой. На рисунке 1 представлен результат поведенческих исследований, из которых следует что протезированные колбочковым родопсином слепые мыши способны найти правильный путь в лабиринте Морриса.

Что же касается важнейшего вопроса о том, какие клетки дегенерирующей сетчатки глаза че-

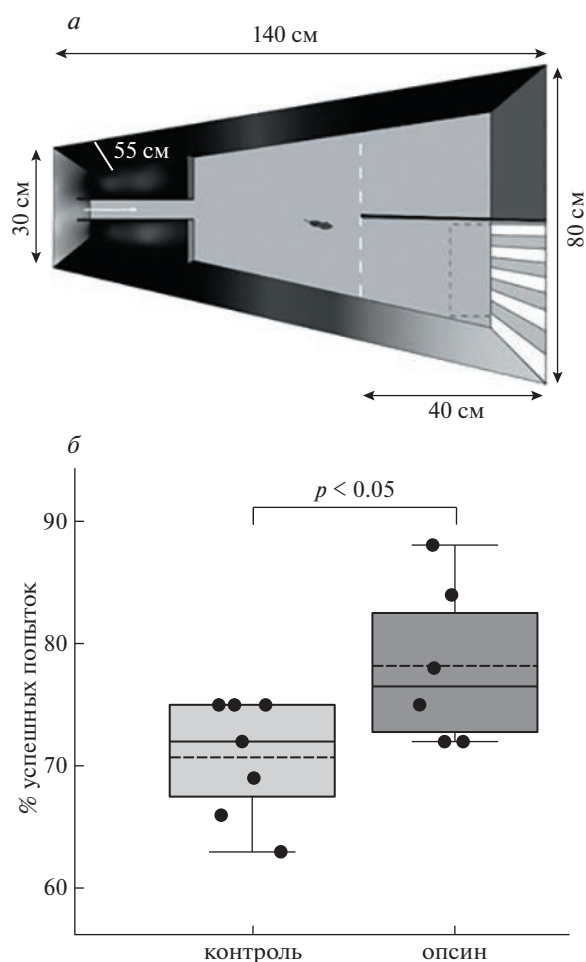


Рис. 1. Поведенческое тестирование мышей после интравитреальной инъекции вирусных частиц, содержащих ген колбочкового опсина: *вверху* – внешний вид трапециевидного водного лабиринта Морриса; *внизу* – процент правильных решений у мышей контрольной и опытной групп, усреднённый за последние 4 дня обучения. Процент правильных решений у мышей, протезированных колбочковым опсином, равен $8.1 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$, t -критерий Стьюдента) [10]

ловека перспективны для оптогенетического протезирования, то совокупность полученных к настоящему времени данных свидетельствует: в зависимости от стадии дегенеративного процесса протезированы могут быть и биполярные, и ганглиозные нервные клетки сетчатки, при этом неселективное протезирование нервных клеток дегенеративной сетчатки также может рассматриваться в качестве одной из возможностей.

На рисунке 2 схематически показаны строение сетчатки и принцип её оптогенетического протезирования. Можно было бы протезировать остатки колбочек, уже потерявших светочувствительные наружные сегменты, поскольку остатки колбочек некоторое время сохраняются в дегене-

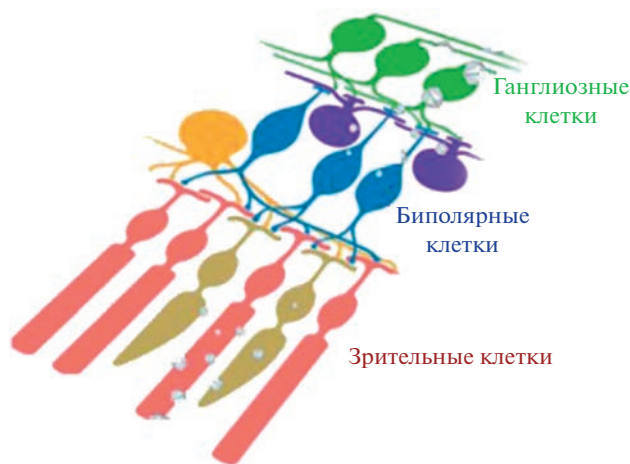


Рис. 2. Упрощённая схема клеточного строения сетчатки: *зрительные клетки* в ходе дегенеративного процесса — сначала палочки, а потом и колбочки — погибают; *биполярные клетки* достаточно долго остаются жизнеспособными; *ганглиозные клетки*, длинные отростки которых (аксоны) в составе зрительного нерва посылают информацию в мозг, остаются жизнеспособными; биполярные и ганглиозные клетки могут быть оптогенетически протезированы

ративной сетчатке, в то время как палочки погибают в ходе дегенеративного процесса. Конечно, было бы замечательно протезировать остатки колбочек, так как процесс обработки информации в сетчатке в таком случае сохранялся бы. Как мы помним, *сетчатка* — это часть мозга, помещённая в глаз, и на всех уровнях её клеточной организации происходит сложнейшая обработка зрительной информации. В сильно обработанном виде она поступает по зрительному нерву в зрительные центры мозга. В одной из первых работ на слепых мышках с пигментным ретинитом удалось показать, что при протезировании остатков колбочек инициируется ферментативный каскад фототрансдукции¹, реализуется обработка информации на всех уровнях сетчатки, при этом у мыши восстанавливаются светочувствительность, способность к пространственному ориентированию, зрительно-опосредованное поведение [11]. Однако, к великому сожалению, остатки колбочек в ходе дегенеративного процесса через какое-то время тоже погибают, а потому их протезирование представляется мало перспективным. К тому же, чтобы доставить в них генетический материал, требуется субретинальная инъекция, то есть введение вирусного конструкта за сетчатку. А это довольно сложная хирургическая процедура.

Следующие за фоторецепторными клетками идут синаптически связанные с ними горизонтальные и биполярные клетки. Биполярные клет-

ки, получая информацию от фоторецепторов, передают её в обработанном виде дальше, ганглиозным клеткам. Преимущества протезирования биполярных клеток очевидны. Действительно, частично сохраняется естественный процесс обработки информации (теряется только его первый этап — между фоторецепторами и биполярными клетками); немаловажно, что не до конца утрачивается обработка информации и по горизонтали — с участием амакриновых клеток (подробнее о протезировании биполярных клеток см. обзор [12]). Однако очевидный недостаток этого подхода — вполне реальная опасность того, что вслед за колбочками последует дегенерация (ремоделирование) и биполярных клеток. К тому же на этом этапе дегенеративного процесса происходит реорганизация синаптических связей биполярных клеток с другими клетками. Кроме того, протезировать в настоящее время можно только так называемые ON-биполяры (описано около десяти функциональных типов биполяров сетчатки). Правда, протезирование ON-биполяров, для которых известны промоторы, оказалось достаточно для восстановления многих зрительных функций [7]. Проблема состоит в том, что биполярные клетки труднодоступны для доставки в них ген-содержащего конструкта, поскольку они находятся в середине сетчатки. Тем не менее существующие методы доставки позволяют вводить вирусный конструкт непосредственно в стекловидное тело (интравитреально), который затем достигает биполярных клеток.

Нельзя не сказать о протезировании ганглиозных клеток — классических нейронов, генерирующих импульсную активность. Преимущества в этом случае несомненны. Опасность дегенерации ганглиозных клеток в ходе дегенеративного процесса, по сравнению с другими клеточными элементами сетчатки, наименьшая. Ганглиозные клетки, “смотрящие наружу”, расположены ближе всех к стекловидному телу; они намного доступнее для доставки в них ген-содержащего конструкта путём интравитреальной инъекции, которая в офтальмологии стала рутинным путём доставки лекарств к сетчатке. Промоторы для целенаправленной доставки гена родопсина в ганглиозные клетки хорошо известны. Однако и недостатки протезирования ганглиозных клеток весьма велики. Главный из них связан с тем, что естественный процесс обработки зрительной информации в сетчатке не сохраняется. Весьма существенно, что протезирование преобразует все сорок с лишним функциональных типов ганглиозных клеток в один функциональный тип. Нет сомнения, это большой недостаток оптогенетического протезирования — теряется весь смысл сложнейшей обработки информации в нервных слоях сетчатки. Но что удивительно так это то, что зрительные функции при таком протезирова-

¹ Фототрансдукция — это преобразование и усиление (почти в миллион раз) светового сигнала в зрительной клетке, в результате чего возникает биоэлектрический сигнал.

нии в значительной мере восстанавливаются, и это свидетельствует о поразительной пластичности мозга. При электронном протезировании, когда вживлённые чипы возбуждают какую-то долю ганглиозных клеток из примерно 1 млн 200 тыс., находящихся в сетчатке глаза человека, то совершенно неясно, какие функциональные типы этих клеток они возбуждают. Тем не менее зрительные функции у человека частично восстанавливаются. Например, сообщается, что наиболее совершенный электронный протез Аргус-2 позволяет в некоторых случаях слепым людям даже читать буквы, набранные очень крупным шрифтом.

При оптогенетическом протезировании ганглиозных клеток, когда количество светочувствительных клеток стало во много-много раз больше, чем при электронном протезировании, пластичность мозга проявляется особенно ярко. В эксперименте у слепой мыши, протезированной колбочковым родопсином, успешно восстановился целый ряд важнейших зрительных функций, включая зрительную адаптацию [13]. В клиническом исследовании, о котором мы уже говорили, оптогенетическое протезирование генно-модифицированным канальным родопсином позволило пациенту увидеть предметы на столе и пешеходный переход [8]. Поистине, пластичность мозга необыкновенно велика, и её механизмы ещё предстоит выяснить.

* * *

Таким образом, в настоящее время наиболее вероятное применение методов оптогенетики в клинической практике — это протезирование дегенеративной сетчатки. Клинические испытания показали принципиальную возможность этого подхода и его эффективность для частичного восстановления зрительных функций. Всё очевидно, что *зрительные G-белок-связывающие родопсины* (скорее всего, родопсины колбочек), запускающие ферментативный каскад усиления светового сигнала, перспективны для оптогенетического протезирования. Хотя, и это важно подчеркнуть, использование *генно-модифицированных канальных родопсинов* как инструментов оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки тоже возможно. Что касается протезируемых клеток, то это могут быть не только *ганглиозные*, что уже доказано, но и *биполярные клетки* дегенеративной сетчатки. Наиболее приемлемый вектор для доставки гена родопсина к сохранившим жизнеспособность нервным клеткам сетчатки — разрешённый для клинического применения адено-ассоциированный вирус. Наконец следует особо подчеркнуть, что только результаты клинических испытаний позволяют с уверенностью говорить о качестве оптогенетического протезирования слепой сетчатки человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Famintzin A.* Die Wirkung des Lichtes auf die Bewegung der Chlamidomonas pulvisculus Ehr., Euglena viridis Ehr. und Oscillatoria insignis Tw. Mélanges // Biol. Tirés Bull. Acad. Imp. Sci. St.-Petersb., 1866. 6: 73–93.
2. *Litvin F.F., Sineshchekov O.A., Sineshchekov V.A.* Photoreceptor electric potential in the phototaxis of the alga Haematococcus pluvialis // Nature. 1978. № 271. P. 476–478.
<https://doi.org/10.1038/271476a0>
3. *Nagel G., Szellas T., Huhn W. et al.* (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light gated cation selective membrane channel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. № 100. P. 13940–13945.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>
4. *Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E. et al.* (2005) Millisecond timescale, genetically targeted optical control of neural activity // Nat. Neurosci. 2005. № 8. P. 1263–1268.
<https://doi.org/10.1038/nn1525>
5. *Rajalingham R., Sorenson M., Azadi R. et al.* (2021). Chronically implantable LED arrays for behavioral optogenetics in primates // Nat. Methods. 2021. № 18. P. 1112–1116.
<https://doi.org/10.1038/s41592-021-01238-9>
6. *Vetere G., Tran L.M., Moberg S. et al.* (2019). Memory formation in the absence of experience // Nat. Neurosci. 2019. № 22. P. 933–940.
<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0389-0>
7. *Островский М.А., Кирпичников М.П.* Перспективы оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки глаза // Биохимия. 2019. Т. 84. № 5. С. 634–647.
<https://doi.org/10.1134/S0320972519050038>
8. *Sahel J.A., Boulanger-Scemama E., Pagot C. et al.* Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy // Nat Med. 2021. № 27(7). P. 1223–1229.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01351-4>
9. *Berry M.H., Holt A., Salari A. et al.* (2019) Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin // Nat. Commun. 2019. № 10 (1). P. 1221.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>
10. *Иджилова О.С., Колотова Д.Е., Смирнова Г.Р. и др.* Неселективная экспрессия коротковолнового колбочкового опсина улучшает обучение мышей с дегенерацией сетчатки в задаче с восприятием зрительных стимулов // ДАН: науки о жизни. 2023. Т. 510. С. 297–302. EDN: QHNBHW
<https://doi.org/10.31857/S268673892360005X>
11. *Busskamp V., Duebel J., Balya D. et al.* Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa // Science. 2010. № 329(5990). P. 413–417.
<https://doi.org/10.1126/science.1190897>
12. *Ротов А.Ю., Фирсов М.Л.* Оптопротезирование биполярных клеток сетчатки // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2022. Т. 58. № 6. С. 457–467.
13. *Berry M.H., Holt A., Salari A. et al.* Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin // Nat. Commun. 2019. № 10 (1). P. 1221.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x>

OPTOGENETICS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS**M. P. Kirpichnikov^{1,2,#} and M. A. Ostrovsky^{2,3,##}**

¹*M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

³*N.M. Emanuel Institute of biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[#]*E-mail: kirpichnikov@inbox.ru*

^{##}*E-mail: ostrovsky3535@mail.ru*

The paper is devoted to optogenetics as a method that allows the cells of an organism to acquire light sensitivity. The history of the origin and development of optogenetics is briefly reviewed. The role of optogenetics in studying both the fundamental mechanisms of brain functions and in understanding the mechanisms of a number of neurological and psychiatric diseases, including those associated with memory loss, is discussed. The real field of clinical application of optogenetics methods to date, namely in ophthalmology, is discussed in detail. Clinical trials have shown the principal possibility of optogenetic prosthetics of “blind” retina and partial restoration of visual functions. Data on one of the four ongoing clinical trials, its success and limitations are presented. The conditions and prospects for further development of optogenetic prosthetic technologies for blind retina in the last stages of the neurodegenerative process are discussed in detail. The question of the type of nerve cells in the degenerating retina most promising for optogenetic prosthetics is discussed. The authors believe that genes of visual, G-protein-binding rhodopsins (most likely cones), which trigger the enzymatic cascade of light signal amplification, are the most promising for optogenetic prosthetics. The use of genes of genetically modified channel rhodopsins as “tools” for optogenetic prosthetics of degenerative retina is undoubtedly possible and, as clinical trials show, quite realistic.

Keywords: optogenet, brain, optogenetic prosthetics of the retina, adeno-associated virus, bipolar and ganglion cells of the retina, visual rhodopsins, genetically modified channel rhodopsins, clinical trials.