



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ταυτόχρονη μικροσκοπία διφωτονικά και τριφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού για την ποσοτικοποιημένη καταγραφή συστατικών εγκεφαλικών τομών, σε μεγάλα βάθη.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 5: Ανάπτυξη νέων υπολογιστικών μοντέλων και τεχνολογιών για την έγκαιρη διάγνωση των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson και των πρόδρομων μορφών τους..

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): EMMANOYHΛ ΣΤΡΑΤΑΚΗΣ (ΙΤΕ)

Ταυτόχρονη μικροσκοπία διφωτονικά και τριφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού για την ποσοτικοποιημένη καταγραφή συστατικών εγκεφαλικών τομών, σε μεγάλα βάθη.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

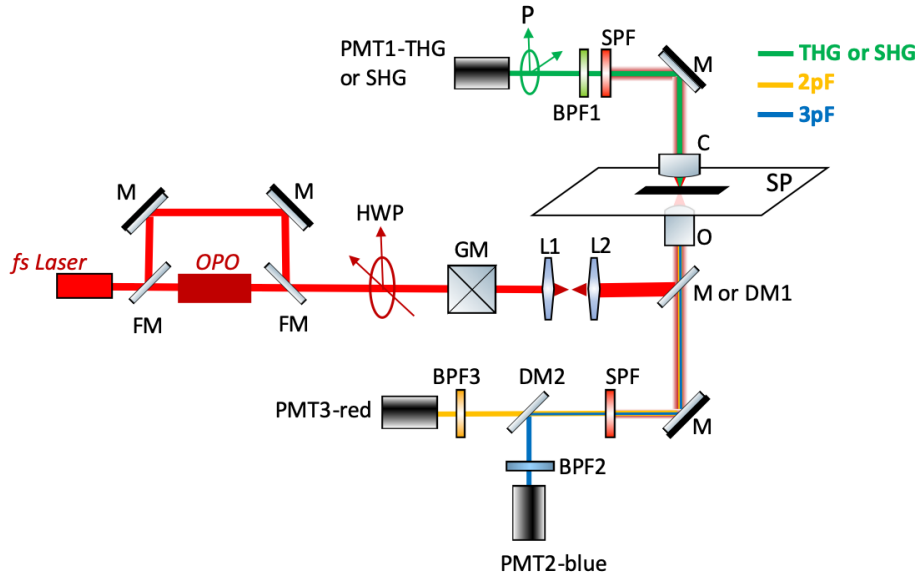
Έγινε χρήση του πολυφωτονικού μικροσκοπίου σάρωσης υπερβραχέων παλμών (fs) laser για τον εντοπισμό και καταγραφή επιλεγμένων συστατικών ενδιαφέροντος του εγκεφαλικού ιστού. Με χρήση του μήκους κύματος 1028nm επιτεύχθηκε η επιλεγμένη ταυτόχρονη πολυφωτονική διέγερση 2 χρωστικών και κατά συνέπεια η ταυτόχρονη απεικόνιση 2 περιοχών ενδιαφέροντος. Επειδή το μήκος κύματος διέγερσης βρισκόταν στην περιοχή του υπέρυθρου, μας δόθηκε η δυνατότητα για τρισδιάστατη απεικόνιση σε πολύ μεγάλα βάθη ιστού (της τάξης των εκατοντάδων μικρομέτρων) με πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα (της τάξης του μισού μικρομέτρου). Σε συνδυασμό με την αυτοματοποιημένη αντικειμενοφόρο του μικροσκοπίου και ειδικό λογισμικό οδήγησης των μοτέρ της, μας δόθηκε η δυνατότητα για απεικόνιση και παρατήρηση μεγάλου τρισδιάστατου όγκου ιστού με τη χρήση κολάζ εικόνων. Στη συνέχεια, με χρήση αυτοματοποιημένου λογισμικού καταγραφής έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των συστατικών ενδιαφέροντος (νευρικά κύτταρα με δραστηριότητα) της εκάστοτε τομής εγκεφαλικού ιστού

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ

Ανάπτυξη του πολυφωτονικού μικροσκοπίου.

Η ανάπτυξη του μικροσκοπίου σάρωσης λέιζερ υπερβραχέων (fs) παλμών, για την ταυτόχρονη διέγερση και ανίχνευση διαφορετικών μη-γραμμικών σημάτων, όπως διφωτονικά και τριφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού (2pF και 3pF, αντίστοιχα) καθώς και γέννησης δεύτερης και τρίτης αρμονικής (SHG και THG, αντίστοιχα), σε μεγάλα βάθη εστίασης, απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.

Η θεμελιώδης δέσμη προέρχεται από έναν υψηλής ισχύος (6W) ταλαντωτή (FLINT, Light Conversion) με κεντρικό μήκος κύματος 1028nm, ρυθμό επανάληψης 76MHz και διάρκεια παλμού 50fs (σύμφωνα με τον κατασκευαστή) και στη συνέχεια εισέρχεται σε έναν οπτικό παραμετρικό ταλαντωτή (Levante IR, APE) και εξέρχεται με κεντρικό μήκος κύματος 1542nm.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του πολυφωτονικού μικροσκοπίου που αναπτύχθηκε, για την καταγραφή μη-γραμμικών σημάτων 3pF, 2pF, SHG και THG. Συντομογραφίες: OPO: Οπτικός παραμετρικός ταλαντωτής, M: Καθρέφτης, FM: Καθρέφτης ανατροπής, HWP: Πλακίδιο καθυστέρησης μισού μήκους-κύματος, GM: Γαλβανομετρικοί καθρέπτες σάρωσης, L: Φακός, DM: Διχρωικός καθρέφτης, O: Αντικειμενικός φακός, SP: Επίπεδο του δείγματος, C: Συγκεντρικός φακός, SPF: Φίλτρο βραχείας-διέλευσης, BPF: Φίλτρο ζώνης-διέλευσης, P: Πολωτής, PMT: Φωτοπολλαπλασιαστής.

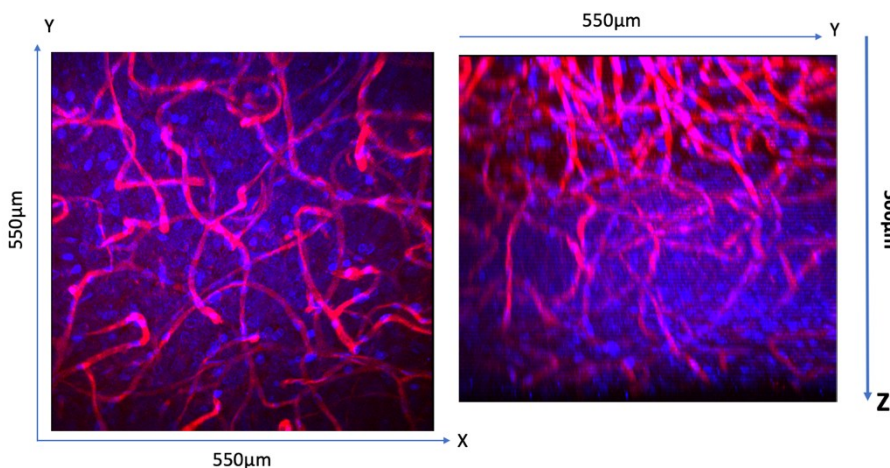
Συνδυασμός κατόπτρων (M) και κατόπτρων ανατροπής (FM) επιτρέπουν την επιλογή μεταξύ των δεσμών διέγερσης στα 1028nm ή στα 1542nm. Το μήκος κύματος των 1542nm χρησιμοποιείται για τη διέγερση της THG και το 1028nm για την ταυτόχρονη διέγερση 2pF, 3pF και SHG. Η δέσμη των 1542nm περνάει μέσω ενός πλακιδίου καθυστέρησης μισού μήκους κύματος (HWP) (AHWP10M-1600, ThorLabs) (το οποίο αφαιρείται όταν χρησιμοποιείται η δέσμη των 1028nm), Το HWP είναι τοποθετημένο σε ένα μοτέρ (Standa) που επιτρέπει την περιστροφή της κατεύθυνσης της γραμμικής πόλωσης της δέσμης διέγερσης 1542nm. Συνεπώς δίνεται η δυνατότητα για μετρήσεις THG, εξαρτώμενης από την πόλωση (P-THG). Στη συνέχεια, και οι δύο δέσμες (1028nm και 1542nm) χρησιμοποιούν την ίδια διαδρομή και κατευθύνονται σε ένα ζεύγος γαλβανομετρικών κατόπτρων (GM) (6215H, Cambridge Technology) που κινούνται αντίστοιχα για να σαρώσουν το δείγμα. Στη συνέχεια, οι δέσμες, πριν εισέλθουν στο μικροσκόπιο (Axio Observer Z1, Zeiss), περνούν μέσω ενός ζεύγους αχρωματικών φακών (L1, L2) (που σχηματίζουν ένα τηλεσκόπιο) που τις μεγάλωνουν (~7 φορές) για να καλύψουν το πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού. Μετά το τηλεσκόπιο, οι δέσμες ανακλώνται από έναν καθρέφτη (M) (PFR10-P01, ThorLabs) ή από έναν διχρωικό καθρέφτη (DM1) (FF700-SDi01, Semrock). Ο καθρέφτης (M) χρησιμοποιείται για την διέγερση των αρμονικών (SHG και THG) και τη συλλογή τους στην μπροστά διεύθυνση, και εναλλάσσεται με τον διχρωικό καθρέφτη (DM1) για την διέγερση του φθορισμού (2pF και 3pF) και συλλογή του στην πίσω διεύθυνση. Και οι δύο καθρέφτες (M και DM1) τοποθετούνται σε γωνία 45° ακριβώς κάτω από τον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου (Εικόνα 1). Για την επίτευξη: α) μεγάλου βάθους εστίασης, της τάξης των χιλιοστών, β) υψηλής διακριτικής ικανότητας, της τάξης μερικών εκατοντάδων νανομέτρων και γ) μεγάλου φασματικού εύρους μετάδοσης (350nm – 1600nm), έγινε χρήση του αντικειμενικού φακού Zeiss XLPLN25XWMP2 με μεγέθυνση 25x, αριθμητικό άνοιγμα 1.05NA και εστιακή απόσταση 2mm. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ο Zeiss 40x 1.3NA. Στο επίπεδο του δείγματος (SP), τα παραγόμενα σήματα THG (χρησιμοποιώντας τα 1542nm) ή SHG (χρησιμοποιώντας τα 1028nm) συλλέγονται στην εμπρός διεύθυνση από έναν φακό υψηλού αριθμητικού ανοίγματος (C) (achromatic-aplanatic, 1.4NA, Zeiss) και ανιχνεύονται αφού περάσουν μέσω ενός φίλτρου βραχείας διέλευσης (SPF) (FF01-680/SP, Semrock) και ενός φίλτρου ζώνης διέλευσης (BPF1) (FF01-514/3, Semrock), από έναν φωτοπολλαπλασιαστή (PMT1-THG/SHG) (H9305-04, Hamamatsu). Το SPF επιτρέπει την διέλευση μηκών κύματος μικρότερων των 680nm, οπότε φιλτράρει τα σήματα THG ή SHG από το λέιζερ, ενώ το BPF1 επιτρέπει την διέλευση μηκών κύματος 514±1.5nm πριν από τον

ανιχνευτή. Όταν χρησιμοποιείται η δέσμη 1028nm η παραγόμενη SHG είναι στα 514nm, ενώ όταν χρησιμοποιείται η δέσμη 1542nm η παραγόμενη THG είναι πάλι στα 514nm. Συνεπώς, το ίδιο φίλτρο ζώνης διέλευσης (BPF1) επιτρέπει την διέλευση και της SHG και της THG, πριν τον ανιχνευτή. Ακριβώς πριν από το PMT1 τοποθετούμε έναν αφαιρούμενο περιστρεφόμενο γραμμικό πολωτή (P) (LPVIS100-MP, ThorLabs), ο οποίος επιλέγει την κατεύθυνση της πόλωσης της THG που φτάνει στον PMT1. Κατά συνέπεια, μπορούμε να πραγματοποιήσουμε απεικόνιση THG ευαίσθητη στην πόλωση, με ή χωρίς την παρουσία του πολωτή μπροστά από τον ανιχνευτή. Τα σήματα φθορισμού (2pF και 3pF) (μετά την επιλογή του διχρωμικού καθρέφτη DM1 στο μικροσκόπιο) συλλέγονται στην πίσω διεύθυνση από τον αντικειμενικό φακό και φιλτράρονται από ένα φίλτρο βραχείας διέλευσης (SPF) (FF01-680/SP, Semrock) για να διασφαλιστεί ότι το λέιζερ δεν φτάνει στους ανιχνευτές.

Στη συνέχεια, η δέσμη διαχωρίζεται από έναν διχρωμικό καθρέφτη μακράς διέλευσης DM2 (509-FDi01, Semrock), ο οποίος ανακλά τα μήκη κύματος μικρότερα από 509nm και αφήνει να περάσουν μήκη κύματος μεγαλύτερα από 509nm. Τα ανακλώμενα μήκη κύματος φιλτράρονται περαιτέρω από ένα BPF2 (FF1-458/64, Semrock), το οποίο επιτρέπει τη διέλευση των μηκών κύματος στην περιοχή των $458 \pm 32\text{nm}$, πριν φτάσουν στο PMT2-blue (H9305-04, Hamamatsu). Τα μήκη κύματος που μεταδίδονται μεγαλύτερα από 509nm περνούν μέσω ενός BPF3 (FF-562/40, Semrock), το οποίο επιτρέπει τη διέλευση των μηκών κύματος στην περιοχή των $562 \pm 20\text{nm}$ πριν φτάσουν στο PMT3-red (H9305-04, Hamamatsu). Ο συντονισμός των καταγραφών των PMT με τους γαλβανομετρικούς καθρέφτες για τη δημιουργία εικόνας, καθώς και οι κινήσεις όλων των μοτέρ του μικροσκοπίου, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό LabView (National Instruments). Μία εικόνα 500x500 μετρήσεων (pixel) απαιτεί ~1 δευτερόλεπτο για να δημιουργηθεί και να καταγραφεί.

Πολυφωτονική απεικόνιση εγκεφαλικών τομών σε μεγάλα βάθη (μεγαλύτερα των 500μm)

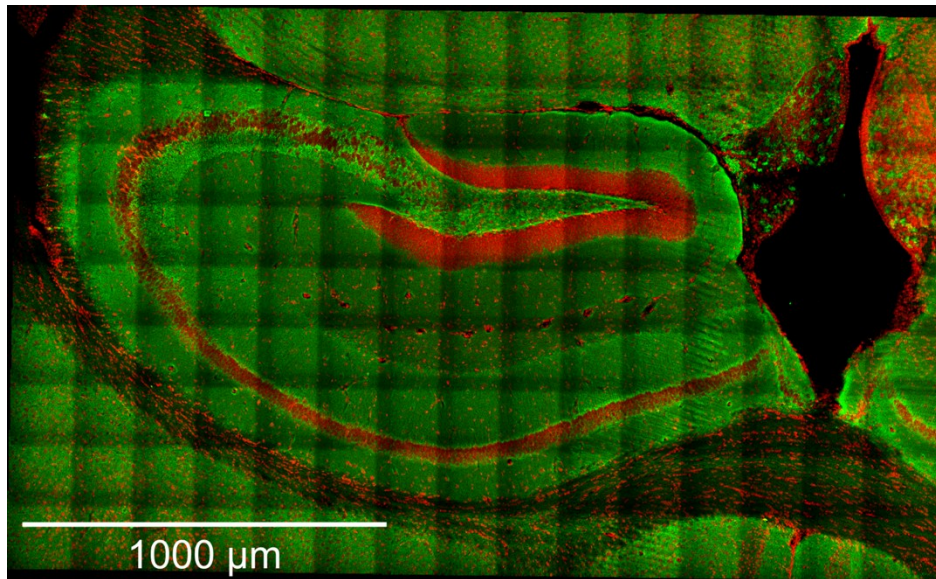
Χρησιμοποιώντας μόνο το μήκος κύματος διέγερσης 1028nm, διεγείρουμε και ανιχνεύουμε ταυτόχρονα 3pF και 2pF. Συγκεκριμένα, για την απεικόνιση τομών εγκεφάλου, ο PMT2-blue ανιχνεύει τον 3pF φθορισμό που εκπέμπεται από το DAPI (πυρήνες), ενώ ο PMT3-red ανιχνεύει τον 2pF φθορισμό που εκπέμπεται από το Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin (αιμοφόρα αγγεία), σε βάθος 0-500μm (Εικόνα 2). Παρόλο που ο αντικειμενικός φακός έχει εστιακή απόσταση 2mm, απεικονίσαμε μέχρι 500μm επειδή τόσο ήταν το πάχος του δείγματος. Περιμένουμε να μπορούμε να απεικονίσουμε σε μεγαλύτερα βάθη (έως 2mm) σε δείγματα (εγκεφαλικές τομές) με πάχος μεγαλύτερο των 500μm.



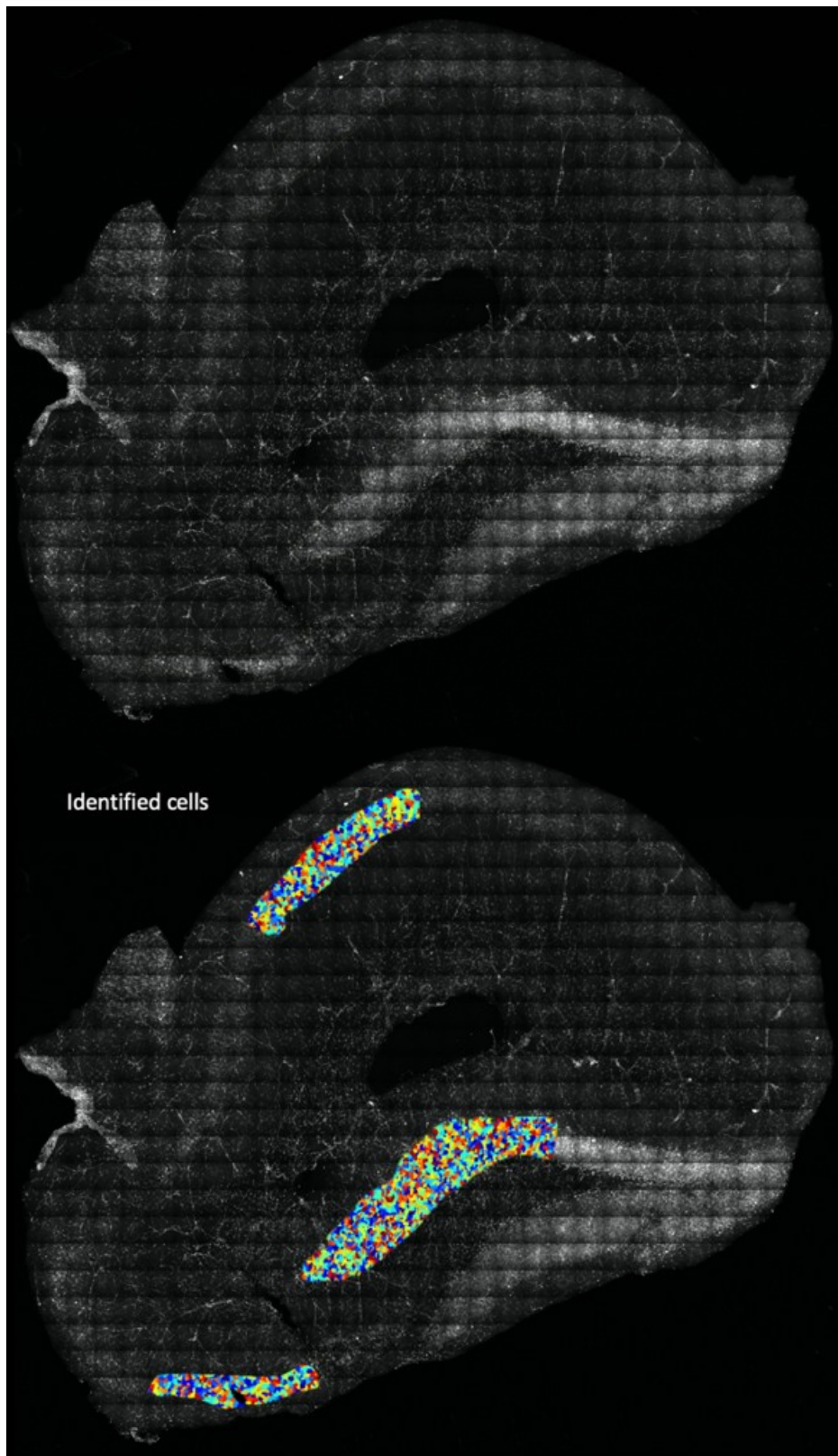
Εικόνα 2: Εγκεφαλική τομή, πάχους 500μm. Με μπλε φαίνεται το DAPI στους πυρήνες των κυττάρων, ενώ με κόκκινο φαίνεται το Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin από τα αιμοφόρα αγγεία. Απεικόνιση σε όλο το πάχος (άξονας-Z) του δείγματος (500μm)

Απεικόνιση ολόκληρης της έκτασης εγκεφαλικών τομών με χρήση κολλάζ εικόνων

Όμοια, χρησιμοποιώντας μόνο το μήκος κύματος διέγερσης 1028nm, διεγείραμε και ανιχνεύσαμε ταυτόχρονα 3pF και 2pF από το DAPI (πυρήνες), και από το alexa 555 (πρωτεΐνες) (Εικόνα 3) ή το c-Fos antibody (νευρική δραστηριότητα) (Εικόνα 4), αντίστοιχα, και δημιουργήσαμε κολλάζ εικόνων που καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια ή και ολόκληρη την έκταση της εγκεφαλικής τομής (της τάξης των χιλιοστών).



Εικόνα 3: Κολλάζ εικόνων πολυφωτονικής μικροσκοπίας σε εγκεφαλική τομή ποντικίου. Με κόκκινο φαίνεται το Dapi στους πυρήνες των κυττάρων, ενώ με πράσινο το alexa 555 (πρωτεΐνες).



Εικόνα 4: Κολάζ εικόνων πολυφωτονικής μικροσκοπίας σε εγκεφαλική τομή ποντικού με χρήση του c-Fos antibody (νευρική δραστηριότητα), καθώς και καταμέτρηση του αριθμού κυττάρων σε συγκεκριμένες περιοχές με χρήση του “FIJI-Cell Profiler”