

Háromdimenziós, gyors, kétfoton-pásztázó eljárások sejt- és hálózatszintű idegsejtvizsgálatokhoz

Szalay Gergely¹ ■ Judák Linda dr.¹ ■ Szadai Zoltán dr.¹
 Chiovini Balázs dr.¹ ■ Mezey Dávid^{1,3} ■ Pálfi Dénes³ ■ Madarász Miklós³
 Ócsai Katalin² ■ Csikor Ferenc dr.² ■ Veress Máté⁴ ■ Maák Pál dr.⁴
 Katona Gergely dr.^{1,2}

¹ Magyar Tudományos Akadémia, Kísérleti Orvostudományi Kutatóközpont, Kétfoton Képkalkotó Központ, Budapest

² Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai Kar, MTA–PPKE ITK–NAP B – Kétfoton Méréstechnológiai Csoport, Budapest

³ Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai Kar, Budapest

⁴ Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Atomfizika Tanszék, Budapest

Bevezetés: A kétfoton-mikroszkópia ideális eszköz annak tanulmányozására, hogy a különböző jeleket hogyan dolgozza fel az élő agyszövet. Kezdetben a pásztázó képalkotással teljes képeket készítettek, ami nem alkalmas gyors 3D-s jelek, mint például akciós potenciálok nyomon követésére. **Célkitűzés:** A szerzők célja különféle neuronális aktivitás mintázatok mérése volt optikai úton. **Módszer:** A szerzők új lézerpásztázó módszereket dolgoztak ki és kifejlesztették az ezeket megvalósító mikroszkóphardvert. **Eredmények:** Többszörös vonal menti pásztázás lehetővé teszi, hogy a kísérletező több, számára érdekes mintarészletet mérjen, ennek eredményeképpen nemcsak a mintavételi sebesség nő, hanem a fluoreszcens tranziensek jel-zaj viszonya is. Ezen elvet továbbíve kifejlesztettek egy akusztóoptikai eltérítő-kön alapuló 3D lézerpásztázó kétfoton-mikroszkópot, amely milliméteres mélységelérési tartománnyal és millisekundum alatti időfelbontással rendelkezik. Használhatóságának bizonyítására visszaterjedő akciós potenciálok terjedését vizsgálták több száz mikrométer hosszú nyúlványokban, továbbá egérlátókéregben idegsejtek százaiban mérték szimultán a sejtek Ca²⁺-tranzienseit 3D véletlen címzésű üzemmódban, *in vivo*. **Következtetések:** A pásztázás leszűkítése az érdekes területekre nagy jel-zaj viszonyt és gyors ismétlési sebességet tesz lehetővé, miközben a kétfoton-mikroszkópok nagy behatolási mélysége is megtartott. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(52), 2120–2126.

Kulcsszavak: mikroszkóp, háromdimenziós képalkotás, idegsejt-képalkotás

Fast three-dimensional two-photon scanning methods for studying neuronal physiology on cellular and network level

Introduction: Two-photon microscopy is the ideal tool to study how signals are processed in the functional brain tissue. However, early raster scanning strategies were inadequate to record fast 3D events like action potentials. **Aim:** The aim of the authors was to record various neuronal activity patterns with high signal-to-noise ratio in an optical manner. **Method:** Authors developed new data acquisition methods and microscope hardware. **Results:** Multiple Line Scanning enables the experimenter to select multiple regions of interests, doing this not just increases repetition speed, but also the signal-to-noise ratio of the fluorescence transients. On the same principle, an acousto-optical deflector based 3D scanning microscope has been developed with a sub-millisecond temporal resolution and a millimeter z-scanning range. Its usability is demonstrated by obtaining 3D optical recordings of action potential back-propagation in several hundred micrometers long neuronal processes of single neurons and by 3D random-access

scanning of Ca²⁺ transients in hundreds of neurons in the mouse visual cortex. *Conclusions:* Region of interest scanning enables high signal-to-noise ratio and repetition speed, while keeping good depth penetration of the two-photon microscopes.

Keywords: microscopy, three-dimensional imaging, neuronal imaging

Szalay, G., Judák, L., Szadai, Z., Chiovini, B., Mezei, D., Pálfi, D., Madarász, M., Ócsai, K., Csikor, F., Veress, M., Maák, P., Katona, G. [Fast three-dimensional two-photon scanning methods for studying neuronal physiology on cellular and network level]. *Orv. Hetil.*, 2015, 156(52), 2120–2126.

(Beérkezett: 2015. október 5.; elfogadva: 2015. október 29.)

Rövidítések

AO = (acousto-optic) akusztóoptikus; AOD = (acousto-optic deflector) akusztóoptikai eltérítő; AP = (action potential) akciós potenciál; PSF = (point spread function) ponteloszlási függvény; ROI = (region of interest) vizsgálati terület; SNR = (signal-to-noise ratio) jel-zaj arány

Hogyan működik az agyunk? Ez az ősi kérdés sok kiváló elmét foglalkoztatott már Arisztoteléstől kezdve Szentágothain keresztül a mai legkiválóbb kutatókig. Arisztotelész még csak a logikára támaszkodhatott, ám a Golgi-festés felfedezése megalapozta a neurobiológiát, kutathatóvá vált agyunk sejtszintű felépítése. Ez az anatómiai tudás és az elmúlt évtizedek szenzációs technológiai fejlődése egy új forradalmat indított el az agy működésének funkcionális megismerésére. A fentieket kiemeli a tény, hogy 2014-ben két Nobel-díjat is ítéltek a terület legkiválóbbjainak. *Stefan Hall és kollégái* úttörők voltak a szuperrezolúciós technikában, amellyel tanulmányozni lehet a nanométer felbontású sejtfolyamatokat is [1]. *John O’Keefe* és a *Moser házaspár* pedig olyan sejteket fedeztek fel, amelyek a helymeghatározásban játszanak fontos szerepet [2]. E kutatók az állatok agyába ültetett elektródákat használtak, de reméljük, hogy kutatásaink nyomán a kétfoton-képalkotással is képesek leszünk gazdagítani ezeket az ismereteket.

Az idegtudományok számára ideális kétfoton-mikroszkópnak két feltételnek kell egyszerre megfelelnie a lehető legnagyobb pásztázási térfogatot nyújtva. Cél egyrészt az egyedi idegsejtek dendritfájának gyors tér- és időbeli leképezése 3D-ben úgy, hogy a dendritűkék elkülöníthetők maradjanak, másrészt a nagy térfogatban nagy sebességgel történő mérés, a nagyszámú sejtől álló idegsejt-populáció aktivitásának rögzítéséhez.

A fénymikroszkópos vizsgálatokat a kontraszt és a felbontás leromlása nehezíti a szövetben. Minél mélyebbre hatolunk a szövetben, a képalkotás annál nehezebb, végül már a sejtek elkülönítése a szövet egyéb struktúráitól is gondot okoz. Az egy pontot gerjesztő kétfoton-mikroszkópia által lehetővé válik a szórt fluoreszcencia hatékony mérése, amely lehetővé teszi az akár milliméteres

mélységű [3] és sejtrészletszintű térbeli felbontású mérést alacsony fototoxicitás mellett. Élő, működő szövet mérésére ezért különösen alkalmas, hátránya azonban alacsony sebessége. Mivel csak egy pontot tudunk megvilágítani egy időben, speciális pásztázási technikákat kell kidolgozni a biológiai működések megfelelő időbeli felbontású méréséhez. Célunk az volt, hogy olyan új lézeres pásztázási módszereket dolgozzunk ki, amelyek lehetővé teszik a funkcionális vizsgálatokat, elkészítsük az új eszközöket és szoftvereket, továbbá teszteljük sejtszintű biológiai kísérletekben, agyseletekben vagy élő állatokban.

Módszer

Ez a munka szorosan kapcsolódik a mikroszkóphardver multidiszciplináris fejlesztéséhez [4, 5, 6, 7]. A mikroszkópokat speciális szoftverekkel terveztük (SolidWorks, ZEMAX, OrCAD). Az *in vitro* kísérletekben az újonnan fejlesztett pásztázómódszereket alkalmazva egér- és patkányagyseletekben, a fluoreszcens festékeket a patch-clamp technika használatával juttattuk be. Az *in vivo* kísérletekben az agyfelszint műtéttel tártuk fel, és a fluoreszcens festéket a bolus loading technika segítségével juttattuk be. Az új mérési algoritmusokat Matlab-ban és C++-ban írtuk meg. A Matlab szoftvert alkalmaztuk adatelemzésre és vizualizációra is.

Eredmények

Vizsgálati terület-alapú pásztázás (region of interest – ROI)

A kétfoton-képalkotás során a fókuszpont soronkénti mozgatásával és így a fluoreszcencia képpontonkénti mintavételezésével állítunk elő képet. Ezt nevezük rasterszkennelésnek, amelynek leggyorsabb megvalósítása a rezonáns szkennertechnika. Itt az x eltérítés rezonanciafrekvenciája tipikusan 8 kHz, így a rendszer 31 kép felvételére képes másodpercenként [8], egy 512×512-es felbontású videó esetén. Az idegsejtek működésének

tanulmányozásához azonban ennél jóval nagyobb, ideálisan a kHz-es mintavételezést megközelítő sebességre van szükség. Ennek eléréséhez fel kell adnunk a teljes képek készítését, és ehelyett csak a kísérletező által fontosnak ítélt területekből, a ROI-kból gyűjtjük a jeleket.

Mivel a beérkező fotonok száma (λ) csekély, a ROI-ból érkező fluoreszcens jel átlaga (μ) és annak varianciája (σ) Poisson-closzlású:

$$1. \text{ egyenlet} \quad \text{SNR} = \frac{\mu}{\sigma} = \frac{\lambda}{\sqrt{\lambda}} = \sqrt{\lambda}$$

Ez alapján a jel-zaj arányt (signal-to-noise ratio – SNR) a vizsgált területről egységnyi idő alatt beérkező fotonok száma határozza meg. Ugyanakkor az összes beérkező foton felírható az alábbi módon:

$$2. \text{ egyenlet} \quad \lambda = \eta \cdot \varphi \cdot \tau$$

– ahol η a kibocsátott fotonok detektálásának hatékonysága a rendszerben (konstans érték), φ a fotonosság és τ a ROI-ban töltött idő. Élő biológiai mintán történő mérésnél a fellépő szövetkárosodás és a fluoreszcens festék telítődése miatt φ nem növelhető tetszőlegesen, így az SNR javítása csak a ROI-ban töltött idő növelésével lehetséges.

Az SNR növeléséhez (ΔSNR) a mintavételezni kívánt területeket raszterszkennelés helyett vonal menti pásztázással érjük el, így a ROI-ból mintavételezett fotonok száma nő annak arányában, hogy az összehasonlított látómező-pásztázás során mennyi idő jutott a ROI-k mérésére. Ez az arány megegyezik a teljes látómező (A_{FOV}) ROI-hoz viszonyított arányával (A_{ROI}).

$$3. \text{ egyenlet} \quad \Delta\text{SNR} = \sqrt{\frac{A_{\text{FOV}}}{A_{\text{ROI}}}}$$

Ennek értelmében, ha a mintavételezni kívánt területek kicsik, és elszórtan helyezkednek el a látómezőben, akkor csak a ROI-k pásztázásával jelentős SNR-növekedés érhető el a raszterszkenneléshez képest, a pásztázott területek számától és alakjától függő mértékben.

Többszörös vonal menti pásztázás

A ROI-k pásztázásának legegyszerűbb megvalósítása galvomotoros tükrök használatával lehetséges [4]. A galvomotorokat megfelelő visszacsatolt elektronika vezérli, így abszolút helyzetük analóg jelekkel vezérelhető. Egy meghatározott pásztázási útvonal több egyenes vagy görbe vonalból illeszthető össze, amellyel sokféle alakú ROI lefedhető. Ezeket a szakaszokat a mikroszkóp egyenletes sebességgel futja be, míg az egyes szakaszok közötti ugrások 60–100 μs alatt történnek (1. ábra). Összetett, akár tucatnyi szakaszból álló útvonal esetében az ismétlési sebesség 100–200 Hz is lehet, rövid egyenes szakaszokon pedig akár a 2 kHz-et is elérheti. Az 1. áb-

rán egy dendritszakasz és a rajta levő több dendrittüske aktivitása látszik, amely egyidejűleg mutatja az egyes posztszinaptikus eseményeket és a kalciumjel kompartmentek közötti terjedését. Az SNR növekedése az 1. ábra esetében a 3. egyenlet alapján számszerűen 3,3-szeres (16 $\mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ képterület, 20 $\mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ ROI-terület).

A többszörös vonal menti pásztázás egy sokoldalú eszköz, amely képes több nyúlvány vagy sejttest egyidejű mintavételezésére is, és lehetővé teszi szubcelluláris komponensek aktivitásának megfigyelését, de alkalmas például a kapillárisokban áramló vér vizsgálására is. Ezenfelül használható még optogenetikai és más fotoaktivációhoz [6] is.

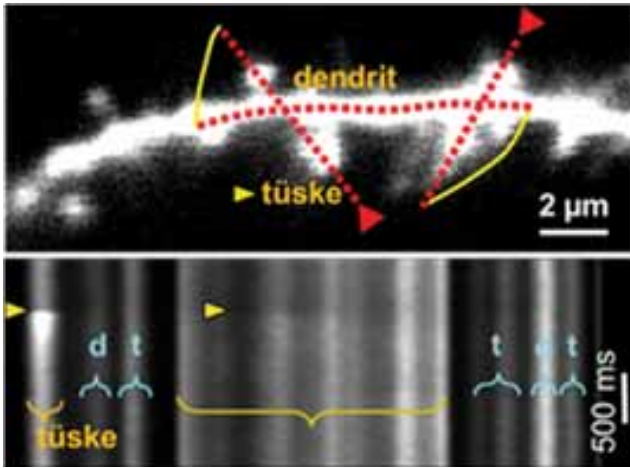
Akusztóoptikai pásztázás

A lézernyaláb eltérítéséhez pásztázótükröket használva lehetővé válik a fókuszpont gyors pozicionálása, de kizárólag az objektív fókusz síkjában. Ez azt jelenti, hogy a mérési területek, ROI-k csak egy vízszintes síkban helyezkednek el. Azonban néhány speciális esetet leszámítva az agyterületek kapcsolati struktúrája nem vizsgálható jól metszetek formájában, az agy *in vivo* körülmények közötti vizsgálata pedig mindenképpen olyan módszert igényel, amely három dimenzióban képes a gyors adatgyűjtésre.

Számos technológia létezik már, amely képes gyors populációs és dendritikus aktivitás 3D-s rögzítésére [6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18], ám csak az akusztóoptikai (AO) megoldásokon alapuló kétfoton-pásztázás volt képes a szükséges technikai paramétereket biztosítani, úgymint 20-nál több ROI pásztázása 30 μm -nél nagyobb z kiterjedésből, 100 Hz-nél nagyobb ismétlési sebességgel [5, 19, 20, 21]. A következőkben célunk az első olyan kétfoton-mikroszkóp megalkotása volt, amellyel lehetséges ROI-k véletlen elérésű pásztázása három dimenzióban, leküzdve a korábbi megoldások korlátait.

Az akusztóoptikai eltérítők (AOD) ultrahang alkalmazásával térítik ki a lézernyalábot a kívánt irányba. Működés közben egy piezoelektromos jelátalakító által keltett ultrahang hullámain térül el a lézernyaláb a jelátalakító vezérlési frekvenciájának függvényében (2. ábra). Az AOD ideális a nyaláb pozicionálására, mivel a vezérlőfeszültség gyorsan változtatható, a nyaláb pozicionálását nem korlátozza mozgó alkatrészek tehetetlensége.

Eltérítésen kívül az AOD-k a fókuszálás gyors állítására is használhatók, amennyiben az optikai apertúrában terjedő hanghullámok frekvenciája változik az idő függvényében. Ez a fókuszáláson kívül a fókuszpont oldalirányú csúsztatását is eredményezi, amelyet egy fordított irányban betett, második AOD használata kompenzál [22]. Az AOD optikai szempontból egy hengerlencsének felel meg, amely egy tengely mentén fókuszál. Hogy három dimenzióban tudjuk a nyalábot pozicionálni, két azonos fókusz távolságú, egymásra merőleges henger-



1. ábra

Több ROI-t lefedő vonalak pásztázása

Fent: Többszörös vonal menti pásztázás egy dendritszegmensen. Lent: Nyers fluoreszcens kép, a vízszintes tengely a vonal egyes pontjainak felel meg. A jelzett tüske egy erős beérkező szinaptikus jelet kap a sárga nyíl jelzett időpillanatban. A tüske nyakánál Ca^{2+} -kiáramlás figyelhető meg, amelynek eredményeként egy kisebb, diszperz Ca^{2+} -jel-emelkedés a fő dendritágon



2. ábra

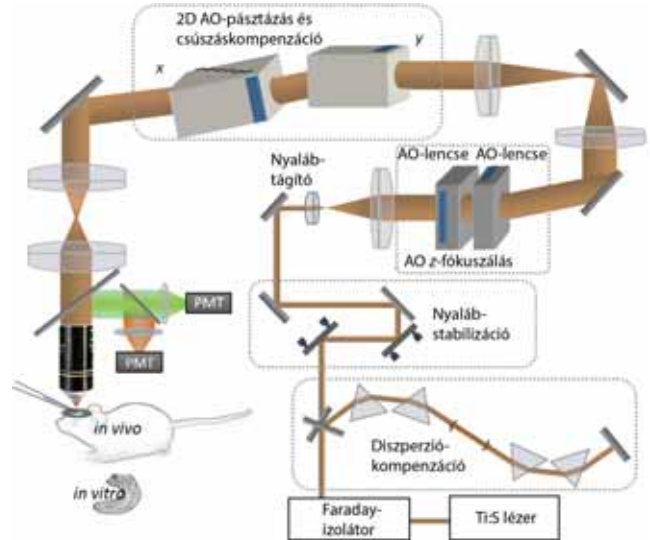
Az AOD működési elve

Színoszoid feszültségmoduláció hatására egy piezoelektromos meghajtó hanghullámokat bocsát ki. A hang belép a törőközegbe (TeO_2) és végighaladva rajta interakcióba lép az áthaladó fényvel, amely megtörik a hanghullámokon éppúgy, mint egy statikus optikai rács esetén

lencse kombinációja szükséges. Mivel mindkét AOD számára szükséges az oldalirányú csúszás kompenzálása, a 3D mikroszkópokhoz végül négy AOD-re van szükség.

Mint korábban említettük, pontszerű ROI-k esetében a vizsgálati terület pásztázása jelentősen növeli a ROI-ból érkező jelek jel-zaj arányát a klasszikus raszterpásztázáshoz képest. Számszerűsítve, a 3. egyenletet módosítva háromdimenziós esetre:

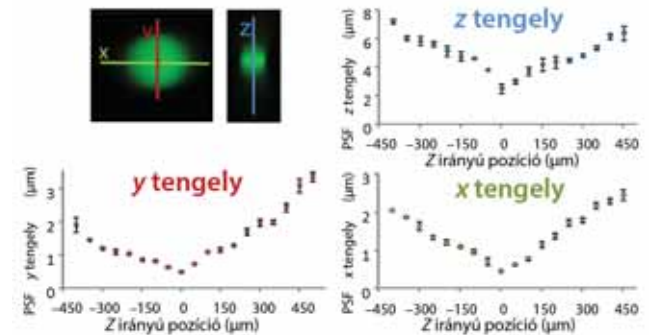
4. egyenlet
$$\Delta SNR = \sqrt{\frac{V_{FOV}}{V_{ROI}}}$$



3. ábra

A 3D AO mikroszkóp felépítése

A kétfoton-mikroszkóp pásztázását végző AO-eltérítők két funkcionális csoportban helyezkednek el, amelyek afokális leképezéssel csatolódnak egymáshoz. A lézer és az AO-pásztázóegység között összetett diszperziókompenzáció és nyalábstabilizáció vált szükségessé



4. ábra

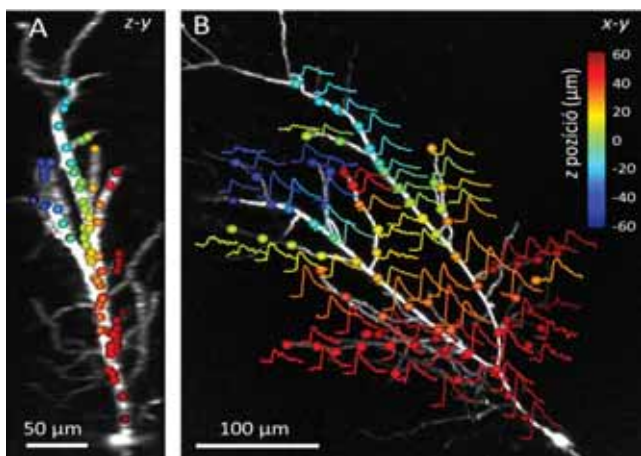
A ponteloszlási függvény mérete a 3D AO-pásztázott térfogatban

Egy, a középpontban elhelyezkedő, $0,1 \mu m$ átmérőjű fluoreszcens mikrogyöngy 20x-os objektívvel alkotott képe. A visszamért ponteloszlási függvény x, y és z tengely menti átmérője az objektív névleges tárgysíkjától mért axiális AO z pásztázás függvényében

– Ahol V_{FOV} a látómező teljes térfogata, és V_{ROI} a ROI-k által lefedett 3D térfogat. Egy átlagos *in vivo* mérés esetében $450 \times 450 \times 650 \mu m^3$ -es térfogatot figyelembe véve és 100 darab, $10 \mu m$ átmérőjű idegsejtrel számolva a tetzőleges elérési pásztázás kiemelkedő, 50-szeres SNR-növekedést eredményez.

A 3D akusztóoptikai mikroszkóp megvalósítása

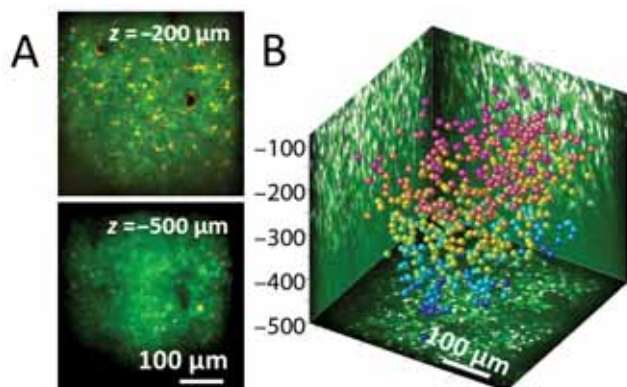
A mikroszkóp pásztázási fénypályájában elhelyezkedő aktív és passzív optikai elemek optimális kombinációjához részletes optikai modell készült. Optimális az a kombináció



5. ábra

Visszaterjedő akciós potenciál (bAP) mérése három dimenzióban

(A) CA1 piramisneuron 3D AO-pásztázással készített képének oldalsó maximális intenzitásvetülete. A színes gömbök a kijelölt 77 mérési helyet mutatják. (B) Az A ábra dendritfájának z irányú maximális intenzitásvetülete. A görbék az egyes mérési helyeken egyetlen bAP hatására létrejövő, közel szimultán mért Ca^{2+} -tranzienst mutatják (mindegyik görbe öt mérés átlaga). A mérés minden egyes mérési helyen 390 Hz-es gyakorisággal ismétlődött



6. ábra

Neuronok véletlen elérési *in vivo* pásztázása

(A) Az egér primer látókérgében az agyfelszíntől mért különböző mélységekben felvett háttérkorrigált képek (zöld: neuronok, piros és sárga: gliasejtek). (B) A teljes $400 \times 400 \times 500 \mu m^3$ -es Z-stack oldalsó és z irányú maximális intenzitásvetítése automatikusan észlelt sejtekkel. A gömbök színe a mélységet kódolja. Az adott észlelési küszöb 532 neuront jelölt ki

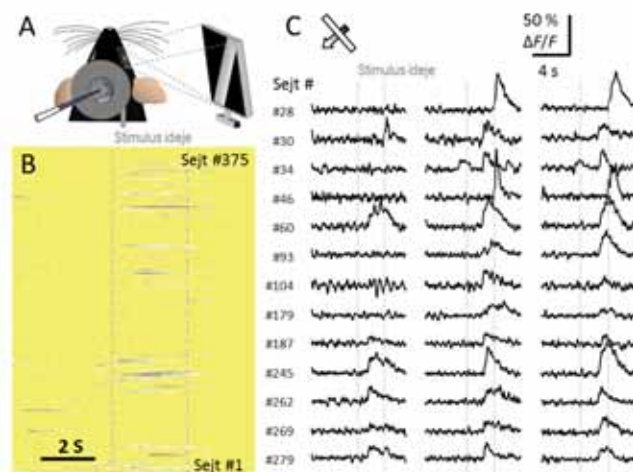
ció, amely a lehető legnagyobb pásztázott térfogatban, a lencsék apertúrájának maximális kihasználásával a lehető legjobb felbontást adja. A modell radikálisan új tervezési koncepciót eredményezett [5]. A fentiek szerint a legnagyobb pásztázási térfogatot úgy értük el, hogy a deflektorokat két funkcionális csoportba osztottuk, közöttük afokális leképezéssel (3. ábra).

A fényút elején egy titán-zafír lézer szolgáltatja a gerjesztő fényimpulzusokat. Egy négyprizmás rendszer se-

gítségével az optikai elemek csoportsebesség-diszperzióját kompenzáljuk, majd egy automata nyálábstabilizáló egység következik. A nyálábot ez után egy nyálábtágító az első AO deflektorpár apertúrájára nagyítja. Az első AOD-eket változó frekvenciájú hanghullámokkal hajtjuk meg és a z irányú fókuszálást végzik (AO z fókuszálás). A következő lépésben a nyálábot a 2D AO pásztázóegység x és y AO deflektoraira vetítjük. Ez az egység hajtja végre az oldalirányú pásztázást, ugyanakkor egyidejűleg kompenzáljuk az első kristályok által létrehozott fókuszpontosítást is. Végezetül a 3D pásztázórendszer egy kétfoton-mikroszkóphoz csatlakozik.

A 3D AO mikroszkóp jellemzői

Az új mikroszkóp teljesítményét a ponteloszlási függvénye (PSF) méretének az elérhető térfogatban mérhető változásával vizsgáltuk (4. ábra). A PSF félérték-szélessége a $20\times$ objektív közepén x , illetve y irányban 470 nm , illetve 490 nm volt, a z tengely irányában pedig 2490 nm . Habár a térbeli felbontás az objektív fókuszcsíkjától és az optikai tengelytől távolodva is csökkent (4. ábra), a PSF a mérhető térfogat közepén ($\sim 290 \times 290 \times 200 \mu m^3$) kicsi maradt ($< 0,8 \mu m$ átmérő, $< 3 \mu m$ axiális hossz). Ebben a zónában ily módon finom idegi struktúrák és folyamatok is felbonthatók. Ezen túlmenően, a PSF átmérője $1,9 \mu m$ és z irányú hossza $7,9 \mu m$ alatt marad egy nagyjából $1400 \mu m$ -es z irányú, és egy nagyjából $700 \mu m$ -es laterális pásztázási tartományban, ami még mindig lehetővé teszi a neuronok sejttestjeinek optikai felbontását.



7. ábra

In vivo vizuális stimulusra adott V1 látókérgi ideghálózati aktivitás

(A) Az *in vivo* kísérleti elrendezés vázlata (vizuális stimulus: 225° -os dőlésszögű mozgó sáv). (B) A mért idegrendszeri helyek Ca^{2+} válasza. Az egyes sorok egyetlen 3D mérés sejtjeire vonatkoznak. (C) A B kísérletben aktív neuronok Ca^{2+} -válasza a kísérlet háromszori ismétlése során. A sáv a szaggatott vonallal jelölt időszakban mozgott az állat látóterében. A mérést minden egyes sejtben 80 Hz -es ismétlési gyakorisággal végeztük

Az akciós potenciál terjedésének 3D véletlen elérésű pásztázása

A rendszerünk időbeli felbontását akciós potenciálok (AP) mérésével vizsgáltuk. Patch-clamp technikával vezettünk el egy CA1 piramissejtből, miközben megtöltöttük a zölden fluoreszkáló fluo-5F Ca²⁺ szenzorral. Ezután 3D AO-pásztázással egy referencia z-stacket készítettünk (5. ábra), majd mérési pontokat választottunk a megfestett neuron dendritfája mentén. Végezetül AP-t keltettünk a sejtben a szómájába injektált árammal, miközben a dendritek Ca²⁺-jelét a 3D koordináták ismétlődő pásztázásával mértük 29,7 kHz címzési frekvenciával (5. ábra). *In vitro* körülmények között 1190 μm AO z fókuszterületben és 760 μm AO laterális pásztázási tartományban mutattunk ki egyedi AP-kat 1-nél nagyobb jel-zaj viszonytal. A mikroszkóp időbeli felbontása a visszaterjedő AP-k (bAP) terjedési sebességének meghatározását is lehetővé teszi.

A neuronhálózat aktivitásának nagy sebességű 3D leképezése *in vivo* körülmények között

Módszerünk *in vivo* tesztelésére felnőtt, altatott egér látókérgében mértük neuronok populációjának Ca²⁺-választát. A sejteket egyszerre több anyaggal is megjelöltük: zöld OGB-1-AM-mel a sejtben belüli Ca²⁺-koncentrációk mérésére és piros szulfurhodamin-101-gyel a gliasejtek megjelölésére. A fenti esethez hasonlóan mérésünket egy referencia z-stack felvételével kezdtük, amelyen a neuronok sejttestjeit egy automatikus algoritmus kereste meg (6. ábra). A kiválasztott sejttestek helye alapján véletlen elérésű pontpásztázást végeztünk a neuroncsoportok aktivitásának mérésére. A 3D véletlen elérésű pontpásztázást 29,7 kHz/*N* ismétlési rátával végeztük, ahol *N* a kiválasztott mérési pontok száma. A pontonként háttérkorrigált és normalizált fluoreszcenciaadatokat úgy ábrázoltuk, hogy minden sorba egy-egy mért sejt aktivitása került (7. ábra). Az idegsejtek válaszait 7 és 28 közé eső jel-zaj viszonytal sikerült rögzítenünk.

Megbeszélés

A kétfoton-mikroszkópia ideális eszköz a funkcionáló agyszövet jelfeldolgozásának vizsgálatára. A korai rasterpásztázási stratégiák azonban nem voltak alkalmasak olyan gyors folyamatok mérésére, mint az akciós potenciálok, különösen nem 3D-ben. A célunk új pásztázási módszerek kifejlesztése volt gyors neurofiziológiai mérésekhez.

A többszörös vonal menti pásztázás több vizsgálati terület kiválasztását teszi lehetővé egy időben, és a mérés leszűkítését e régiókra. Ez nemcsak a mérés ismétlési frekvenciáját növeli meg, hanem a fluoreszcens tranziensek jel-zaj viszonyát is [4]. Kifejlesztettünk egy AOD-ken alapuló 3D pásztázó mikroszkópot milliméteres z

1. táblázat | Pásztázómódszerek összehasonlítása

	Vonal menti pásztázás galvanomotoros tükrökkel	3D akusztóoptikai pásztázás
Optikai felbontás (látómező közepe; 20×)	450 nm <i>xy</i> és 2400 nm <i>z</i> irányban	470 nm <i>xy</i> és 2490 nm <i>z</i> irányban
Látómező (20×) <i>z</i> irányú pásztázótartomány	650 μm Nincs	600 μm 2000 μm átlátszó mintában, 500 μm <i>in vivo</i>
Maximális pásztázósebesség	2 kHz rövid, egyenes vonal mentén	15 kHz két, tetszőleges pont között
Minimális tartózkodási idő a pixelen	0,1 μs, limitáló tényező: elektronika	10 μs, limitáló tényező: kristályok
Pásztázási mintázat limitáló tényezők	Tetszőleges 2D görbék, egyenes vagy görbe ROI-darabok, pontok pásztázása	Tetszőleges 3D görbék, egyenes vagy görbe ROI-darabok, 3D pontok pásztázása
Kis táv lépésidője	10 μs	10 μs
Nagy táv lépésidője	120 μs	10 μs
Jel/zaj arány növekedése látómező-pásztázás alatt	Tipikusan 3–4; elméletileg 29-ig	Tipikusan 50 ideghálózatokban; elméletileg 25 000-ig
Hullámhossz-tartomány	>400 nm Limitál: objektív	Rögzített hullámhossz-tartomány: 700–900 nm
Idegi folyamatok nyomon követése	Sokféle 2D mintázat	Sokféle 3D mintázat
Idegi hálózatok pásztázása	200 μs/sejt Kizárólag 2D	30 μs/sejt, 3D 2000 sejtig, <i>in vivo</i>

pásztázási tartománnyal és milliszekundum alatti időbeli felbontással, amely *in vivo* körülmények között képes 3D véletlen elérésű pont pásztázásra [5].

A módszerek összehasonlítására az 1. táblázatban összevetettük paramétereiket. A 2D galvanomotoros pásztázás egy egyszerű, viszonylag olcsó, mégis rugalmas megoldás, amely kiválóan alkalmas *in vitro* sejtvizsgálatokra. Az AO mikroszkóp összetett optikája miatt drágább, s ugyanezért a lézer hullámhosszának is gátat szab. Mégis, a 3D AO-pásztázás egyértelműen jobb megoldás a lehetséges pásztázási minták sokkal nagyobb rugalmassága miatt, amely szükséges a megfelelő SNR eléréséhez.

Anyagi támogatás: Munkánkat az alábbi pályázatok támogatták: Francia–Magyar együttműködés (TÉT_0389), Svájci–Magyar együttműködés SH/7/2/8, KMR_0214, FP7-ICT-2011-C 323945 és KTIA_NAP_12-2-2015-0006.

Szerzői munkamegosztás: M. P., V. M.: Optikai tervezés. Sz. G., J. L., Sz. Z., C. B., P. D., M. M., K. G.: Mérések kivitelezése. Sz. G., C. B., M. D., Ó. K., Cs. F., K.G.: Analízis. A dolgozatot K. G. a többi szerző közreműködésével írta. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Anyagi érdekeltség: K. G.-nek tulajdona van a Femtonics Kft.-ben.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük *Bojdan Alexandra, Vági András, Kaszás Attila, Rózsa Balázs, Roska Botond, Hillier Dániel, Gündisch Dorina, Erdélyi Ferenc, Szabó Gábor, Varjú Patricia* segítő közreműködését.

Irodalom

- [1] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., et al.: Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313, 1642–1645.
- [2] Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., et al.: Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 2005, 436, 801–806.
- [3] Theer, P., Hasan, M. T., Denk, W.: Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Optics Lett.*, 28, 1022–1024.
- [4] Lorincz, A., Rózsa, B., Katona, G., et al.: Differential distribution of NCX1 contributes to spine-dendrite compartmentalization in CA1 pyramidal cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104, 1033–1038.
- [5] Katona, G., Szalay, G., Maak, P., et al.: Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. *Nature Methods*, 2012, 9, 201–208.
- [6] Rózsa, B., Katona, G., Vizi, E. S., et al.: Random access three-dimensional two-photon microscopy. *Applied Optics*, 2007, 46, 1860–1865.
- [7] Katona, G., Kaszás, A., Turi, G. F., et al.: Roller coaster scanning reveals spontaneous triggering of dendritic spikes in CA1 interneurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, 2148–2153.
- [8] Fan, G. Y., Fujisaki, H., Miyawaki, A., et al.: Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons. *Biophys. J.*, 1999, 76, 2412–2420.
- [9] Grewe, B. F., Voigt, F. F., van 't Hoff, M., et al.: Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens. *Biomed. Optics Express*, 2011, 2, 2035–2046.
- [10] Cheng, A., Goncalves, J. T., Golshani, P., et al.: Simultaneous two-photon calcium imaging at different depths with spatiotemporal multiplexing. *Nature Methods*, 2011, 8, 139–142.
- [11] Botcherby, E. J., Smith, C. W., Kohl, M. M., et al.: Aberration-free three-dimensional multiphoton imaging of neuronal activity at kHz rates. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109, 2919–2924.
- [12] Nikolenko, V., Watson, B. O., Araya, R., et al.: SLM microscopy: Scanless two-photon imaging and photostimulation with spatial light modulators. *Front. Neural Circ.*, 2008, 2, 5.
- [13] Tomer, R., Khairy, K., Amat, F., et al.: Quantitative high-speed imaging of entire developing embryos with simultaneous multi-view light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 2012, 9, 755–763.
- [14] Duemani Reddy, G., Kelleher, K., Fink, R., et al.: Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity. *Nature Neurosci.*, 2008, 11, 713–720.
- [15] Grewe, B. F., Helmchen, F.: Optical probing of neuronal ensemble activity. *Current Opin. Neurobiol.*, 2009, 19, 520–529.
- [16] Iyer, V., Hoogland, T. M., Saggau, P.: Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy. *J. Neurophysiol.*, 2006, 95, 535–545.
- [17] Kirkby, P. A., Srinivas Nadella, K. M., Silver, R. A.: A compact acousto-optic lens for 2D and 3D femtosecond based 2-photon microscopy. *Optics Express*, 2010, 18, 13721–13745.
- [18] Vucinic, D., Sejnowski, T. J.: A compact multiphoton 3D imaging system for recording fast neuronal activity. *PLoS ONE*, 2007, 2, e699.
- [19] Cotton, R. J., Froudarakis, E., Storer, P., et al.: Three-dimensional mapping of microcircuit correlation structure. *Front. Neural Circ.*, 2013, 7, 151.
- [20] Fernandez-Alfonso, T., Nadella, K. M., Iacaruso, M. F., et al.: Monitoring synaptic and neuronal activity in 3D with synthetic and genetic indicators using a compact acousto-optic lens two-photon microscope. *J. Neurosci. Meth.*, 2014, 222, 69–81.
- [21] Chiovini, B., Turi, G. F., Katona, G., et al.: Dendritic spikes induce ripples in parvalbumin interneurons during hippocampal sharp waves. *Neuron*, 2014, 82, 908–924.
- [22] Kaplan, A., Friedman, N., Davidson, N.: Acousto-optic lens with very fast focus scanning. *Optics Lett.*, 2001, 26, 1078–1080.

(Katona Gergely dr.,
Budapest, Práter utca 50/A, 1083
e-mail: katonag@twophotonimaging.eu)