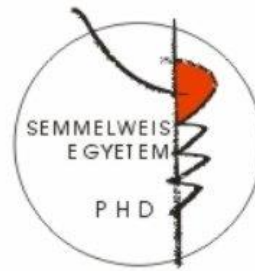


# Két-foton 3D acousto-optikus mérési technológiák fejlesztése idegtudományi vizsgálatokhoz

Doktori tézis

Szalay Gergely

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Rózsa Balázs, PhD, csoportvezető

Hivatalos bírálók: Dr. Szabadics János, PhD, csoportvezető  
Dr. Kis Petik Katalin, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati biz. elnöke: Dr. Kellermayer Miklós, DSc, egyetemi tanár  
Szigorlati biz. tagjai: Dr. Tretter László, DSc, egyetemi tanár  
Dr. Ulbert István, DSc, csoportvezető

Budapest  
2018

## KIVONAT

---

A központi idegrendszerben történő adatfeldolgozás mind jobb megértéséhez elengedhetetlen az aktivitás mintázatok gyors kiolvasási módszereinek fejlesztése, hiszen az akciós potenciálok, a küszöb alatti EPSP és IPSP jelek, a dendritikus integráció mind milliszekundumos időskálán történnek. Ráadásul az idegsejtek diverzitása, az információ feldolgozás rétegfüggő jellege, az idegsejti mechanizmusok agyterületenkénti egyedi jellemzői, a lokálisan keletkező aktivitás mintázatok, vagy akár az időben dinamikusan változó hálózatos tulajdonságok mind azt bizonyítják, hogy gyors aktivitás mérések nem csak az egyes sejtek vagy kétdimenziós területek szintjén, hanem nagyobb sejhálózatok szintjén, három dimenzióban is szükségesek. Mindezek mellett az ideghálózatok kódolása nem csak a szomatikus integráció és a szomatikus hálózatok aktivitásának szintjén történik, hanem az erősen nemlineáris dendritikus integrációs szintjen is, az információ feldolgozásának ez a szintje azonban a szomatikus mérések során általában rejtve marad. Ezért, ezeknek a funkcióknak a pontosabb megértéséhez az idegsejtek aktivitásának sejt és dendrit szintű párhuzamos kiolvasására van szükség, megfelelő tér ( $\mu\text{m}$ -es) és időbeli (ms-os) felbontással.

## BEVEZETŐ

---

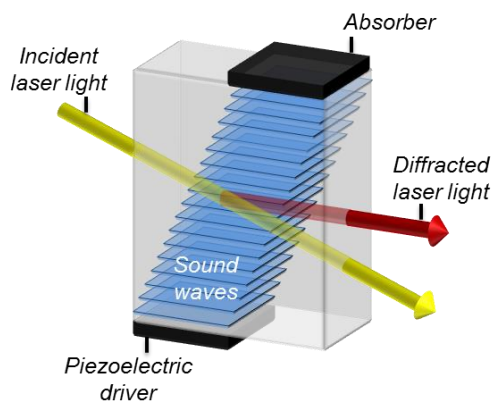
### **Acousto-optikus két-foton fluoreszcens képalkotás**

A két-foton fluoreszcens képalkotás optikai úton teszi lehetővé az idegsejtek aktivitásának monitorozását mélyen a szövetben, kiváló térbeli feloldással. A fluoreszcens képalkotás során az acousto-optikai eszközöket arra használjuk, hogy a lézer nyalábokat eltérítsük egy ultraszónikus rácson. Az acousto-optikai hatás a törésmutató periodikus modulációján alapul magas törésmutatójú speciális kristályokban. A modulációt hanghullámok periodikus nyomásváltozása hozza létre, mely olyan optikai rácsot hoz létre, ami ugyanúgy eltéríti a fényt, akár egy hagyományos optikai rács, azonban itt a rácsállandó a meghajtó szignál függvényében szabadon változtatható.

Az acousto-optikus szkennelés segítségével a lézernyaláb fókuszpontja rendkívül gyorsan újra pozícionálható, mozgó alkatrészek használata nélkül, lehetővé téve ezzel több száz mérési pont majdnem egyidejű mérését a három-dimenziós tér különböző pontjaiból.

### Acousto-optikus eltérítés

Mivel a kristályokban az eltérítés szöge az ultrahang hullámok hangfrekvenciájának függvénye, ezért az acousto-optikus eltérítőkkel szabályozható az optikai nyaláb térbeli pozíciója. A nyaláb eltérítésének szöge az acousto-optikus közegben a következő egyenlet szerint alakul:  $\Delta\theta_d = \lambda/v * \Delta f$ , ahol  $\lambda$  az optikai nyaláb hullámhossza,  $v$  a hanghullám hullámhossza,  $\Delta f$  pedig a hang frekvencia változása.



*Az acousto-optikus eltérítő működési elve. Az elektromos jelgenerátor frekvenciájának függvényében a piezoelektromos meghajtó rádiófrekvenciás hanghullámokat generál a kristályban. A hang belép és áthalad a diffrakciós közegen mialatt kölcsönhat a fényel, ezáltal a fény eltérül a hanghullám generálta optikai rácson. A stabil optikai rács kialakulása után az eltérítés szöge a meghajtó frekvencia függvénye szerint alakul.*

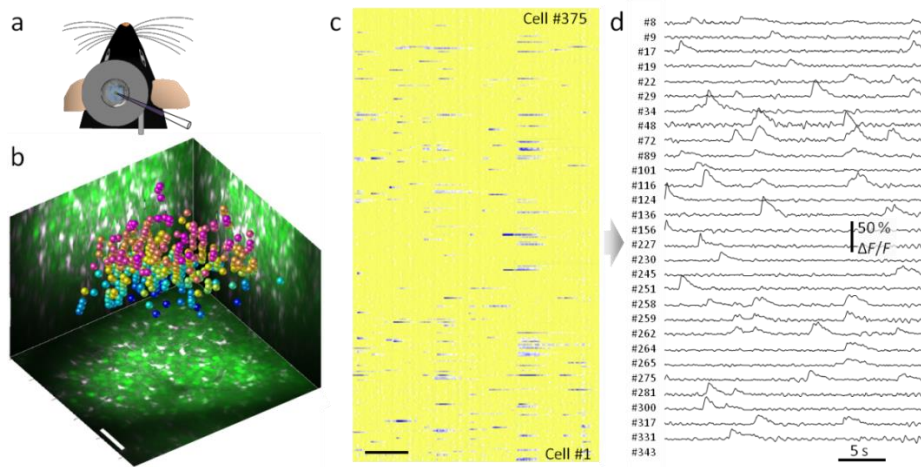
### 3D szkennerek konfigurációk

Négy darab acousto-optikus kristály használatával megoldható a fókuszpontnak a három-dimenziós térben történő tetszőleges mozgatása. Két, egymásra merőlegesen elhelyezett, kristály szükséges az X és Y irányú szkenneléshez, egy harmadikkal oldható meg a Z-beli fókuszálás, a negyedik kristály pedig azért kell, hogy kompenzálja a Z fókuszálás okozta nyaláb elcsúszást. A mikroszkóp teljes optikai fényútjának részletes megtervezése során olyan elrendezést kerestünk, ami optimális kitöltést biztosít a fényút apertúráin különböző X, Y és Z nyaláb pozíciókban, ezáltal biztosítva a lehető legkisebb felbontást a lehető legnagyobb szkennelési tartományban.

### Véletlen elérésű 3D acousto-optikai szkennelés

A három-dimenziós képalkotás *in vivo* körülmények között történő demonstrációja céljából egyedi neuronok populációjából mértem  $Ca^{2+}$  aktivitás egér vizuális kéregben. A kijelölt 375 sejt mindegyikén 80Hz-es mérési sebességgel vettem fel az aktivitást, majd sejtenként háttér korrigáltam és  $\Delta F/F$  számolással normálam az egyedi görbéket. Az aktivitás minták sejtenként jó jel-zaj arányt mutatnak. A hosszú távú mérések

stabilitásának biztosítása az alapvonal fluoreszcens intenzitásának monitorozásával történt.



**Spontán in vivo hálózati aktivitás.** (a) A mérési elrendezés vázlatja. (b) A mérés háttérként használt z-stack oldal- és mélységi vetülete ( $280 \times 280 \times 230 \mu\text{m}^3$ -es térfogat, OGB1-AM és SR101 festékekkel jelölve), a 375 mérési pont megjelölésével. Mérték:  $50 \mu\text{m}$ . (c) A 375 sejtben párhuzamosan mért aktivitás mintázat, 3D véletlen elérésű szkenneléssel mérve, 80Hz-es mérési sebességgel. Mérték: 5s. (d) Példa  $\text{Ca}^{2+}$  görbékre a (c) panelen ábrázolt sejtek aktivitásokból..

## MÓDSZEREK

Ez a dokumentum csak a módszerek rövid összefoglalóját tartalmazza, részletesebben a disszertáció fő szövegében kerül kifejtésre.

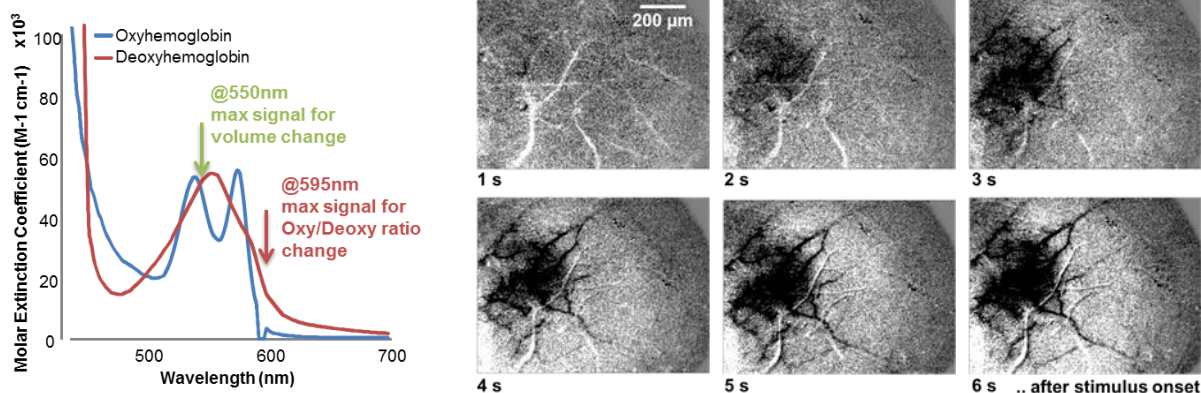
### Kísérleti egerek

Az in vivo méréseket C57BI/6J és Thy1-Cre, vip/IRES-Cre egér törzsek vizuális kérgében végeztük, az állatok kora 60-120 nap között volt. Az egereknek szabad víz és táplálék hozzáférést biztosítottunk, kontrolált hőmérséklet, páratartalom és fény viszonyok között tartottuk őket. A transzgenikus vonalak kifejlesztése és tenyésztése a MTA Kísérleti Orvosi Kutatóintézetének Géntechnológiai Egységében (OGR) történt.

### Intrinsic képalkotás

Az egér vizuális kortexének lokalizációja az injektálást vagy mérést megelőzően intrinsic képalkotás segítségével történt. Az intrinsic jel felvételéhez az egér bőrét megnyitottuk, és a koponyát megtisztítottuk. A regisztráció alatt ugyanolyan paraméterekkel (tér- és időbeli frekvenciával) rendelkező vizuális stimulációt

használtunk, mint amit később a két-foton mérések alatt is. A megfelelő régió a stimuláció és a köztes időszakok alatt felvett reflexió változásából határozható meg.



**Intrinsic képalkotás.** (Balra) Az oxy- és deoxy hemoglobin abszorpciós spektruma alapján megállapítható, hogy a legnagyobb relatív különbség 595nm körül látható, mégha az abszolút jel 590nm körül ennél nagyobb is, ezért mi az előző hullámhosszú megvilágítást használtunk a méréseink során. (Jobbra) A reflexió változás normalizált képe a stimulus kezdete után 1-6 másodperccel.

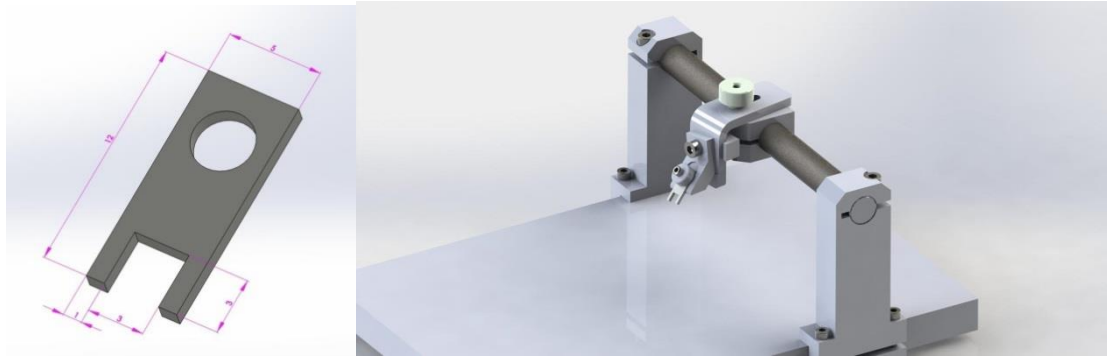
### AAV vírus injekció

Az injektlás során először egy 0,5 mm átmérőjű lyukat fúrtunk a V1 régió centruma felett (melyet az intrinsic képalkotással határoztunk meg). Egy üveg mikropipettát (hegy átmérő kb. 10  $\mu\text{m}$ ) megtöltöttünk a megfelelő vírus vektorral (kb. 0,5  $\mu\text{l}$ ;  $\approx 6 \times 10^{13}$  partikulum/ml), majd lassú sebességgel ( $\approx 2$  nl/mp) körülbeül 450  $\mu\text{m}$ -es kortikális mélységben injektáltuk. A populációs mérésekhez AAV9.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 vagy (a Thy-1-Cre egerekben) AAV9.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 vektorokat használtunk, mindkettőt a Penn Vector Core-tól (Philadelphia, PA) beszerezve. A ritkított jelöléshez az 1:1-es elegyét használtuk az AAV9.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 vektornak és az AAV1.hSyn.Cre.WPRE.hGH vektor 10000x-esen hígított oldatát.

### Műtéti eljárás

A vírus injektlást követően két héttel az egereket először elaltattuk midazolam, fentanyl, és medetomidine keverékével (rendre 5 mg, 0,05 mg és 0,5 mg/testtömeg kg), majd egy 3 mm átmérőjű kerek kraniális ablakot nyitottunk a V1 felett fogorvosi fúróval, a dura máter érintése nélkül, amit ezután egy dupla üveglemezzel lezártunk.

Egy saját fejlesztésű fejlemezt rögzítettünk pillanatragasztó segítségével az egér koponyához, mely az állat a mikroszkópban való stabil rögzítésére szolgált. A mérések előtt az állatot a mérő setupban, a fejbefogóhoz rögzítve tartottuk kb. 1 órán keresztül, hogy alkalmazkodjon a mérési körülményekhez.



*A mérések során használt egyedi fejlesztésű fejrögzítő berendezés. (Balra) A fejlemez, melyet az egér fejéhez rögzítünk. (Jobbra) A több szögbe állítható fejlemez tartó berendezés.*

### **Vizuális stimuláció**

A stimuláció megjelenítéséhez egy 15"-es monitort (Acer, 1280 x 768 pixeles felbontás) helyeztünk 20 centiméterre az egér szemétől (ezzel látóteréből  $\sim 100^\circ \times 70^\circ$ -ot lefedve). Az objektíven keresztül bejutó fényzennyezés kiszűréséhez a monitor és az egér szeme közötti terület fekete, fényelnyelő anyaggal volt lefedve. Minden stimuláció fekete képernyővel indult 2 mp-ig, ezután 1s-ig statikus, 6s-ig mozgó, majd újabb 1s-ig ismét statikus rácsot vetítettünk az egérnek. A rácsok orientációja 8 féle lehetett 45 fokos különbségekkel, mozgásuk a rács orientációjára merőlegesen történt.

### **In vivo elektrofiziológia**

A kalcium tranziensek nagysága és az akciós potenciálok közötti összefüggés meghatározásához in vivo elektrofiziológiai méréseket végeztünk. A műtét a korábban ismertetthez hasonlóan történt, azzal a különbséggel, hogy egy keskeny, kb. 1mm-es rést hagytunk a kraniotómia és az üveglemez széle között, ezen a résen keresztül tudtuk a patch pipettát az üveglemez alatti mérési területre juttatni. Az üveglemez alatt a minta mozgása kellően kicsi volt, mind a megfelelő elektromos elvezetéshez, mind a kalcium mérésekhez. A mérésekhez 7-8 M $\Omega$  ellenállású borosilicát üvegből húzott elektródákat használtunk, megtöltve (mM-ban) az alábbi oldattal: 126 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> és 100  $\mu$ M Alexa 594 a pipetta hegy vizualizációjának



érdekében. Az elektrofiziológiai adatokat current-clamp módban vettük fel 0 mV-os tartó feszültség mellett. A jeleket 1-5kHz között sávszűrővel szűrtük.

### Adat feldolgozás

Az analízis számos lépését, úgymint video renderelés, mozgás korrekció, szűrés és  $\Delta F/F$  számolás, a mérő szoftver (MES, Femtonics Kft., Budapest) beépített moduljaival végeztük el. A 3D projekcióhoz, 3D rendereléshez és a 4D adat megjelenítéshez ImageJ programot használtuk, beépített és saját fejlesztés makrókat használva.

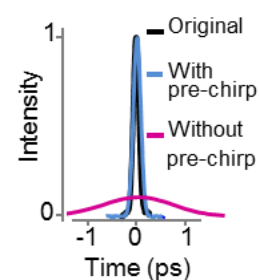
## CÉLOK ÉS EREDMÉNYEK

A 3D véletlen elérésű AO mikroszkóp kézenfekvő előnyei mellett ennek a szkennelési módnak van néhány korlátja, amikor éber, viselkedő egerekből szeretnénk hosszú időn keresztül méréseket végezni, mivel ezeknél a kísérleteknél a hosszú távú stabilitásnak kiemelt jelentősége van. Munkám során meghatároztam ezeket a korlátozó tényezőket és a dolgozatban lehetséges megoldási módszert kínáltam mindegyikre.

### Diszperzió kompenzáció

Az acousto-optikus kristályok magas törésmutatójú anyagból készültek, ezért az optikai rendszer magas anyagi diszperzióval rendelkezik, amely a két-foton képalkotás során használt rövid (körülbelül 100fs hosszúságú) lézerimpulzusok jelentősen megnyújtja, töredékére csökkentve ezáltal két-foton hatáskeresztmetszetüket. Teljes optikai rendszerünk által generált csoport diszperzió (GDD) összesen  $72\,000\text{ fs}^2$ , ami a lézerimpulzusokat piko-szekundumos hosszúságúra nyújtja, szinte nullára csökkentve ezzel a két-foton szignált *in vivo* körülmények között. Ezen hatás korrigálására először megalkottuk a rendszer teljes optikai modelljét, melyből az összes optikai elem pontos optikai paraméterei meghatározhatók, majd kiszámoltuk az ezek által okozott összes anyagi diszperziót. Végül egy olyan négyprizmás impulzus kompresszort terveztem és építettem, ami teljesen korrigálja ezt az optikai hibát.

*Az egyedi fényimpulzusok hossza anyagi diszperzió kompenzálásával és kompenzálása nélkül. (Az impulzus hossza a lézer kilépő apertúrájánál 97fs; kompenzációval ez 108 fs-ra nő a rendszeren áthaladva; kompenzáció nélkül 1.4ps-ra.)*

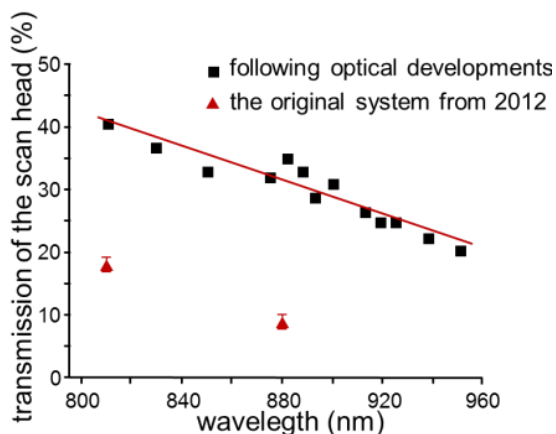


Az anyagi diszperzió mellett a kristályok erős szög diszperziót is bevisznek a rendszerbe, amit a kristályok és más optikai elemek szférikus inhomogenitásának köszönhető. Ez a hiba a fókuszfolt egyre nagyobb, sugárirányú megnyúlását okozza a látómező széle felé közeledve. A látómező legszélén ez a hatás olyan nagy lehet, hogy a felbontás annyira lecsökken, hogy a vizsgálni kívánt struktúrák felbontásához nem elegendő, illetve, lévén a lézer energia nagyobb területen oszlik szét, a kvantum hatásfok sem elégséges megfelelő két-foton jel generálásához. Ezen hiba korrigálásra ismét a rendszer optikai modelljét használtuk. Első lépésben kiszámoltuk a teljes rendszer által okozott összes szög diszperziót, majd egy olyan lencsét terveztünk, és installáltunk a rendszerben, melyben az fénytörő felület úgy van kialakítva, hogy a látómező minden pontjában pontosan az ott lévő szög diszperziót kompenzálja.

#### **Az rendszer áteresztő képességének növelés hosszabb hullámhosszokon**

Az új, genetikailag kódolt festékek megjelenésével az idegtudományban (például GFP, vagy a genetikailag kódolt kalcium indikátorok, mint a GCaMP6) alapvető fontosságúvá vált hosszabb hullámhosszak használata, hogy ezeket a molekulákat megfelelően gerjeszteni tudjuk. Azonban az acousto-optikai cellák transzmissziós hatásfoka erősen, és fordítottan arányos a hullámhosszal. Mivel a fényútban ebből a kristályokból négyet is használunk, az áteresztett fényenergia drasztikusan csökken a hullámhossz növelésével. Ha a hullámhosszat 800 nm-ről 875 nm-re emelnénk, egyéb kompenzációs technikák használata nélkül, a transzmisszió 10%-ról nagyjából 1,5%-osra csökkenne. Ez még a modern 2-3 W-os femto-szekundumos bemenő lézer forrás használata esetében is csak 30-45mW teljesítményt eredményezne az objektív előtt, ami nem elégséges *in vivo* mérésekre mélyen az agyszövetben. Ezen limitáció kiküszöbölése érdekében a rendszer számos optikai és elektronikai komponensét újra terveztük, így olyan transzmissziós hatásfokot sikerült elérni a 900 nm körüli tartományban, ami korábban csak 800 nm körül volt lehetséges.



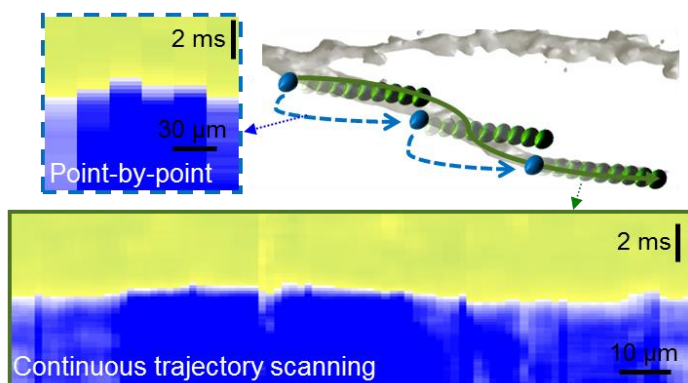


Maximális transzmissziós képesség az AO szkennelők fejein keresztül a hullám függvényében (fekete pontok). A transzmisszió az optikai középpontban ( $x, y, z = 0$ ) lett mérve, és látható, hogy a hullámhosszat növelve ez egyre csökken. A piros pontok a transzmissziós hatásfokot mutatják, az adott hullám-hosszakon, a korábbi rendszerben.

### AO csúszó-szkennelés

Az AO scannelés ismétlési frekvenciájának egyik limitáló tényezője a cellák fizika mérete, optikai apertúrája, hiszen ezekben a hanghullámoknak keresztül kell érnie, mielőtt egy újabb mérőpontra fókuszálhatunk. Rendszerünkben, a jó optikai felbontás megőrzése érdekében, viszonylag nagy cellákat használunk, így pont-szkennelés során az egyes pontok elérési ideje viszonylag hosszú (20-33  $\mu$ s), ami a mérési elrendezés függvényében, az ismétlési frekvenciáját, vagy a mérhető pontok számát limitálja. *In vivo* mérések során, ahhoz hogy megfelelő mennyiségű adatot biztosítsunk a mozgás korrekcióhoz, sejtenként, dendritenként vagy dendrit tuskékként több környező pontból is kell adatot felvennünk. Véletlen elérésű pont-szkennelést használva ezeknél a méréseknél a mérési frekvencia az 1-2 Hz-es tartományba esne vissza, ami nem elégséges a gyors kalcium jelek detektálásához.

Ezen probléma megoldására kifejlesztettük a 3D DRIFT szkennelési technikát, amivel, az adott kísérleti elrendezés függvényében akár hetvenszeresére is növelhető a szkennelési frekvencia.



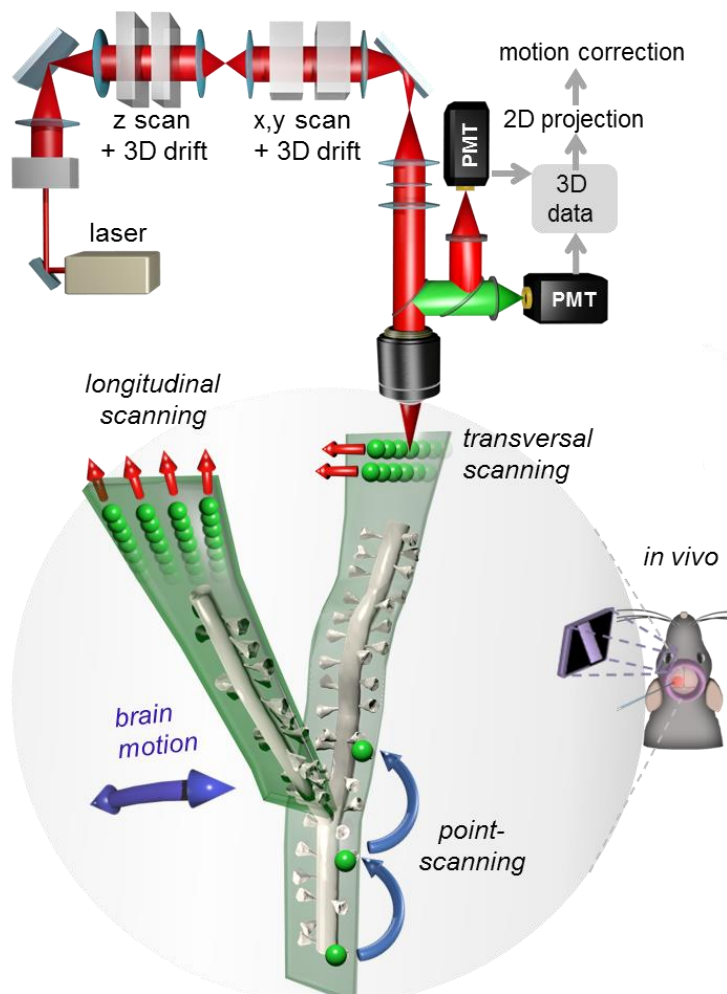
**Dendritikus spike terjedésének vizsgálat 3D DRIFT szkennelés segítségével.** Pont- és DRIFT szkennelési technikák összehasonlítása ugyanazon dendrit szakasz kétféle mérésének segítségével.

Jobb felül: A két technika szemléletes összehasonlítása (kék pontok: pont-szkennelés, zöld pontok: DRIFT szkennelés, azonos időfelbontással felvéve). Bal felül és alul: Példa a kalcium aktivitásra a két módszerrel mérve. Az időfelbontás a két ábrán azonos, a görbék térben normáltak.

## **Mozgás korrekció**

Több publikációban bemutatták, hogy a sejtek válasza egészen eltérőek lehetnek éber és altatott állatokban. Ráadásul *in vivo* mérések során a fluoreszcens információt erősen befolyásolják a mozgási műtermékek, hiszen az egyes mérendő objektumok pozíciója folyamatosan változik a kéreg mozgásának következtében. Ezen mozgások forrása a kéregben futó erek pulzálása, az állat légzése, vagy akár a teljes állat motoros mozgása is lehet. Ezek mindegyike műtermékeket okoz a fluoreszcens jelben, elsősorban a vizsgált objektumok térbeli inhomogenitása miatt, mind a háttér fluoreszcenciában, mind az aktivitás alatt mért jelszint változásának következtében. Ráadásul a mozgás okozta intenzitás változás amplitúdója összemérhető a genetikailag kódolt kalcium indikátor 1-2 akciós potenciálra adott válaszával, emiatt nehéz, vagy sokszor lehetetlen, pusztán a kalcium jelek analízise alapján szétválasztani ezt a két hatást, mozgás korrekció szükséges. A 3D DRIFT szkennelés segítségével az egyedi pontok három-dimenzióban elterülő vonalakra, felület vagy térfogat elemekre terjeszthetők ki, így a mérési pontok mellett azok közeli környezete is felvehető, anélkül, hogy az mintavételezési frekvenciát jelentősen csökkentenénk. A vizsgálni kívánt régiók környezetében felvett területek vagy térfogati elemek térbeli információja lehetővé teszi a képek offline, finom felbontású mozgás korrekcióját. Ezáltal a mozgási műtermék mentes fluoreszcens aktivitás mintázatot kinyerhetjük az előre kiválasztott régiókból, akkor is, ha az állat éber, viselkedik, és ezáltal az agya és a mérési pontok mozognak a mikroszkóp koordináta rendszeréhez képest. A mérések során megőrizzük a korábbi 20-400 Hz-es ismételési frekvenciát, ami elégséges ahhoz, hogy időben megfelelően felbontsuk a vizsgálni kívánt aktivitás mintázatokat.

A mozgás okozta hibák másik forrása a fényút optikai elemeinek instabilitása, amely a pásztázó nyaláb apró, időben sztochasztikus elmozdulását okozza. Az acouto-optikus mikroszkóp fényútja több mint 6 méter hosszú, és több mint száz optikai komponens, illetve ezek mozgására több mint hatszáz optomechanikai mozgató elemet tartalmaz, melyek mind érzékenyek a hőmérséklet és páratartalom változásra. Emellett a mozgó elemek, eltérő mértékben, de hiszterézissel rendelkeznek. Ezen mozgások korrigálásához az optikai nyaláb aktív stabilizálása szükséges. Ezt a stabilizációt egy kvadráns detektorokból és motorizált tükrükből álló egyedi tervezésű szabályzó rendszerrel oldottam meg.



*A 3D DRIFT AO mikroszkóppal végzett 3D in vivo mérések sematikus rajza. A hagyományos pontról pontra történő szkenneléssel szemben, itt a fókuszpont egy tetszőleges irányú és orientációjú egyenes mentén csúsztatható. Ezáltal az egyedi mérőpontok kis felület vagy térfogat elemekre bővíthetők ki, mint például az ábrán látható longitudinális vagy transzverz szkennelés esetében. Ezáltal a felület elemek a mozgás fő irányára merőlegesen orientálhatók, és az elkészült felvételek mozgás korrekciója után, az eredeti, mozgás mentes, fluoreszcens görbe visszanyerhető.*

### Megnövelt időbeli felbontás

Hogyha az eddigieknél még gyorsabb aktivitások szeretnénk vizsgálni, mint például a sharpe-wave oszcillációk finom időbeli részleteit vagy lokális regeneratív aktivitás terjedését a dendritek mentén, akkor néha a 20-400 Hz-es szkennelési sebesség is kevésnek bizonyulhat. Ez a korlátozó tényező egyes speciális esetekben megkerülhető, például ha a vizsgálni kívánt eseményt sokszor, igen precíz időzítéssel tudjuk megismételni. Ezekben az esetekben, a véletlen időzítésű pumpa-próba módszer segítségével, milliszekundumos alatti, vagy akár mikroszekundumos időskálán történő események is vizsgálhatóak. Például dendrit menti terjedési sebességet tudtam mérni egy 10-20  $\mu\text{m}$ -es dendrit szakasz mentén.

## DISZKUSSZIÓ

---

A PhD disszertációmban részletezett fejlesztések segítségével sikerült megnövelni az optikai felbontást és a transzmissziós hatásfokot a rendszerben, hosszabb hullámhosszak estében is, ami szükséges a genetikailag kódolt kalcium indikátorokkal történő mérésekhez, mialatt a megcímezhető szekennelési tartomány, a korábbiakhoz hasonló,  $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m} \times 650\ \mu\text{m}$ -es maradt *in vivo* körülmények között is.

A véletlen időzítésű pumpa-próba módszer segítségével bemutattam, hogy akár már 100 ismétlés alkalmazásával is, a kalcium tranziensek terjedése akár 10-20  $\mu\text{m}$ -es dendritikus szakasz mentén is követhető, lehetővé téve ezzel magasabb rendű, rövidebb dendrit szakaszokban végbemenő jelintegráció vizsgálatát is. Ennek a technikának a használatával kimutattam a fizioiógias és szoba hőmérsékleten történő jelterjedésben tapasztalható sebesség különbséget. Ez a meglévő, szignifikáns eltérés bizonyítja, hogy a dendritikus integráció vizsgálatát célzó kísérletek tervezése során fontos szerepe lehet a mérés során használt hőmérsékletnek.

Az dolgozatban bemutatott újszerű 3D DRIFT AO szkennelési technika segítségével hat új szkennelési stratégiát javasoltam, úgymint 3D-szallag-szkennelés, 3D-sakktábla-szkennelés, 3D-többszörös-sík-többszörös-felület-szkennelés, 3D-kígyó-szkennelés, 3D-többszörös-térfogata-szkennelés, és 3D-többszörös-vonal-szkennelés. Módszerünk segítségével először van lehetőség arra, hogy éber viselkedő állatokban, három dimenzióban vizsgáljuk a hálózati aktivitás, akár a szomatikus felbontás alatti aktivitások szintjén is. Még abban az esetben is, ha az állat viselkedési kísérletben vesz részt, ezáltal mozgása nagymértékű mozgási műtermékeket hoz létre az állat agyban.

### **Az új 3D szkennelési technikák előnyei az idegtudomány számára**

Jelen dolgozatban a korábbi megoldásokhoz képest számos technikai fejlesztést mutattam be:

- i) A korábbi rendszerhez képest kétszer nagyobb szkennelési tartomány, megőrzött optikai felbontás mellett, mellyel jó jel-zaj arányú mérések kivitelezhetőek genetikailag kódolt kalcium szenzorokkal történő kísérletek esetén is.
- ii) Megteremtettük a 3D gyors szkennelés lehetőségét, bármilyen térbeli orientáció mentén, a sebesség és a mintavételezés teoretikus korlátja nélkül.

- iii) A rendszer mozgóalkatrész mentes, így a felület és térfogat elemek elrendezése a szkennelési térben tetszőlegesen megadható.
- iv) Lehetővé vált a gyors mozgási műtermékek kompenzációja, miközben megőriztük a két-foton mikroszkópokra jellemző jó optikai felbontást a 3D mérések során.
- v) Lehetőség nyílt az időbeli túlmintavételezés (LOTOS) technika általánosítására, és annak akár több z-beli mélységben történő párhuzamos megvalósítására.

Egy térfogat mérése során a teljes térfogati szkennelés lecserélése a 3D DRIFT AO technikával történő egyedi mérési felületek vagy térfogatok lokális mérésére, a sebesség és jel-zaj arány szorzatában mért javulása, az  $v_{gain} * (SNR_{gain})^2$  egyenlet szerint, arányos a lefedett területek arányával. Szórványos jelölés esetében ez az arány igen magas, akár  $10^6$  is lehet. Tehát a mérési régiók térbeli szabad megválasztása a sebességben és/vagy a jel-zaj arányban több nagyságrendnyi javulást eredményezhet. Például 136 sejt mérése esetén, sejtenként egy-egy 25x25 pixel felbontású kerettel mérve az adott sejt aktivitását, a teljes térfogat méréséhez képest a jel-zaj arányban 25-szörös növekedés érhető el, a mérési sebesség állandóan tartása mellett; vagy, ha a jel-zaj arányt tartjuk állandóan, akkor a sebességben érhető el 600-szörös növekedés.

Ezen technikák kidolgozásával az következő mérések megvalósítására voltam képes ember, viselkedő egerekben:

- i) Több mint 150 dendritikus spine egyidejű mérése,
- ii) egy sejt 12, térben különféle orientációban elhelyezkedő, dendritikus szakaszának mérése,
- iii) a mért térfogatban található egyedi spineok (vagy dendritikus szegmensek) precíz tér és időbeli szétválasztása, melyek más módszerekkel mérve (mivel z-ben egymás alatt helyezkednek el) összemosódnának,
- iv) egy sejt dendrit fájának követése, annak teljes z-beli kiterjedése mentén, azaz közel 650  $\mu\text{m}$ -es z-menti tartományban,
- v) több mint 100 sejt egyidejű mérése egy 500  $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m} \times 650 \mu\text{m}$ -es szkennelési tartományból, mozgás alatt, a korábbi pont szkennelési technikához képest, akár egy nagyságrenddel jobb jel-zaj aránnyal,
- vi) illetve mozgás alatt, akár 10-szer nagyobb jel-zaj arány egy akciós potenciál mérése során.

Jelenleg az idegsejtek nyúlványaiban megfigyelhető dendritikus aktivitás mintázatok, és jel integráció vizsgálatának egyik legnagyobb korlátozó tényezője, hogy azok a teljes megértéséhez, a dendrit fa mentén, komplex, három-dimenzióban elhelyezkedő, lokális integrációs zónákban is szükséges az aktivitás mérése. Eddig ezen mintázatok vizsgálata éber, viselkedő állatokban nem volt lehetséges. Új 3D szkennelési technikánk lehetőséget teremt erre, a korábbi tér és időbeli felbontás megőrzése mellett. Ez a technika, többek között, lehetővé teszi, a spike időzítés függő plaszticitás és az azt létrehozó mechanizmusok vizsgálatát *in vivo* körülmények között, emellett regeneratív dendritikus aktivitások kiindulási pontjainak megtalálását, dendritikus spikeok terjedésének megfigyelését, receptív mezők finom struktúrájának vizsgálatát, dendritikus szegmensek közti kommunikáció vizsgálatát, különböző bemeneti mintázatok tér és időbeli mintázatának megfigyelését, az asszociációs tanulás, valamint a multi szenzoros integráció, illetve spine, dendrit vagy szomatikus szintű hálózatok tér és időbeli mintázatainak vizsgálatát, illetve a szórványosan elhelyezkedő sejthálózatok, pl. parvalbumin, szomatosztatin vagy VIP interneuronok hálózatának mérését. Ezek a 3D szkennelési technikák szintén segíthetnek azoknak a párhuzamosan zajló integrációs folyamatoknak a megértésében, melyekben lokális hálózat szintű, és nagyobb skálás folyamatok egyszerre játszanak közre. Ezen kísérletek segíthetik az agy integrációs tulajdonságainak vagy akár egyes központi idegrendszeri betegségeknek a jobb megértését. Fontos, hogy ezek a komplex kérdések rendszerünkkel jól vizsgálhatóak, hiszen az lehetővé teszi, hogy a hálózat különböző szintjeit (dendritikus spineok, dendrittek, szomatikus hálózatok) párhuzamosan vizsgáljuk.

### **Agyi aktivitás vizsgálata mozgás közben**

Már korábban is bemutattak *in vivo* futó egerekben spineokból történő optikai kalcium méréseket, azonban ezek két-dimenziós mérések voltak, emellett ezekben a publikációkban csupán néhány spinet tudtak párhuzamosan vizsgálni, viszonylag alacsony jel-zaj aránnyal. Nagyobb spine populációból vagy több dendrit szakaszból történő három-dimenziós mérések kivitelezése éber, futó, viselkedő egerekből továbbra is kihívást jelent. Egy ilyen technikára az igényét mutatják azok a nemrégiben megjelent publikációk is, melyek kimutatták, hogy mozgás alatt az aktivitás minták változhatnak,

és a sejtek akár kétszer nagyobb aktivitást mutathatnak, ami teljesen más hálózati aktivitást feltételez ezekben a kondíciókban. Másrészt, a sejtek szintjén történő adatfeldolgozás egy jelentős része a távoli apikális és bazális dendrit szakaszokban történik, azonban a korábban bemutatott 2D vagy 3D technikák egyike sem adott lehetőséget ezeknek a komplex, de vékony dendritekből álló rendszereknek a vizsgálatára a futási periódusok vagy különböző viselkedési események alatt. Ennek egyik oka, hogy egy tipikus viselkedéses vizsgálat során a mozgás okozta fluoreszcencia változás hasonló kinetikát és amplitúdót mutat, mint a kalcium tranziensek. Ráadásul ezek a tranziensek sokszor éppen a viselkedési feladat végrehajtása, azaz épp a mozgás alatt lennének megfigyelhetőek, ami igen nehézé teszi ezt a szétválasztást. Ezért az itt bemutatott szkennelési technikák, önmagukban vagy egymással kombinálva, egy régóta hiányzó eszközt adnak az idegtudomány kezébe a dendritikus aktivitás viselkedés alatt történő tanulmányozásához.

### **Az agy mozgásainak kompenzációja**

Az idegtudományban használt technikák között korábban már bemutatásra került zárt-hurkú, három-dimenziós mozgási műtermék kompenzációs megoldás. Ennek sebessége azonban viszonylag alacsony ( $\approx 10$  Hz), illetve a technika használhatósága *in vivo* körülmények között ez idáig nem lett bemutatva, ugyanúgy ahogy dendritikus mérések során, vagy nagyobb szkennelési sebesség esetében sem. Ráadásul, az agy komplex, pókháló szerű mozgásainak, és a véredények pulzálása által generált mozgás inhomogenitása miatt, az agy nem csak translációs elmozdulásokat, hanem jelentős deformációt is szenved, így a mozgás okozta deformációk az egyes mért alrégiókban eltérőké lehetnek. Emiatt az egyszerű, translációs elven működő mozgás korrekció sokszor nem elégséges. Ez a hatása különösen jelentős lehet amikor kis amplitúdójú jeleket (1-2 akciós potenciál kiváltotta válaszok) vagy kis struktúrákat (dendritikus spinokat) vizsgálunk. Az általunk bemutatott három-dimenziós mérési, és a hozzá kapcsolódó analízis technika, segítségével alrégióként eltérő irányú és amplitúdójú elmozdulások is korrigálhatóak.

A 3D szkennelési és mozgás korrekciós módszerünk előnyét szintén mutatja, hogy az egyedi kalcium tranziensek zaja jelentősen csökkent (20-ad részére a pont szkenneléshez képest), ezáltal ezeknek a görbéknek a zaja kisebb lehet, mint az egy



akciós potenciál által generált kalcium jel amplitúdója, különösen a sakktábla mérési módszer alkalmazása esetén. Ezáltal megfelelő mérési körülmények mellett lehetővé válik az egy akciós potenciál szintű felbontást, viselkedő egerekben GCaMP6-os kalcium szenzor használata esetében. Az egy akciós potenciál szintű felbontás fontosságát hálózatos mérések során néhány nemrégiben megjelent publikáció is bizonyítja, ahol megmutatták, hogy a populáció kód egyedi akciós potenciálok szintjén is kódol információt a burst aktivitás mellett.

### **Apikális és bazális dendritikus régiók párhuzamos mérése**

A közelmúltban megjelent cikkek bemutatták, hogy a távoli apikális dendritikus régió a kortikális piramis sejtekre érkező visszaterjedő szignálok elsődleges célpontja, ahol lokális NMDA spikeok erősítik a beérkező jeleket, hogy ezek elérjék a dendritikus kalcium, illetve a szomatikus nátrium integrációs régiókat, ahol a bazális bementekkel integrálódhatnak, melyek szintén NMDA spikeok által erősödnek meg. Tehát a top-down és bottom-up bemenetek integrációja párhuzamosan történik egymástól távoli integrációs zónákban, egymástól több száz mikrométerre, ezért ezek vizsgálatához olyan mérési technikára van szükség, ami több száz mikrométeres z tartományban tesz lehetővé 3D méréseket. Az AO mikroszkóp által jelenleg is elérhető 1000  $\mu\text{m}$ -es z-beli szkennelési tartomány, ami ugyan a lézer források maximális intenzitása miatt 650  $\mu\text{m}$ -re korlátozódik *in vivo* körülmények között, de már így is elégséges a II/III-as réteg neuronjainak apikális és bazális dendritikus régiójának párhuzamos mérésére, vagy egy V-ös réteg beli sejt teljes dendit fájának vizsgálatára.

Habár a 2D képalkotási technikákkal is lehetőség van hosszú dendritikus szakaszok mérésére, ez csak olyan esetekben lehetséges, amikor ezek horizontálisan orientáltak, és maximum 1-2 rétegen haladnak keresztül (például az I-es réteg interneuronjainak hosszú dendritikus szakaszai), az ortogonálisan elhelyezkedő neuronok dendrit fáinak csak keresztmetszete vagy rövid szakaszai láthatóak ezekkel a technikákkal. Ráadásul, habár a megfelelő régió megválasztásával elérhető, hogy több rövid dendritikus szakaszt vizsgáljunk párhuzamosan, de ezek szinte soha nem tartoznak egy neuronhoz, így ez a technika nem teszi lehetővé a kiterjedt dendritikus hálózatban végbemenő komplex jelintegráció vizsgálatát. A 3D-szallag- és 3D-kígyó-szkennelési technikák legnagyobb előnye, hogy tetszőleges számú régió, azok tetszőleges térbeli elrendezésével,

kiválasztását teszik lehetővé, az egyes szegmensek orientációját akár egyedileg beállítva, alkalmassá téve ezzel a módszert dendritikus integráció precíz tér és időbeli felvételének és vizsgálatára.

### **Mélységi szkennelés**

Habár több hatékony módszert dolgoztak ki teljes térfogatok gyors mérésére, mint a SPIM, DSLM-SI, SimView, SCAPE vagy OPLUL mikroszkópos technikák, melyeknek számos felhasználási lehetősége létezik, legnagyobb limitációjuk, hogy *in vivo* egérben történő mérések során, eddig bemutatott, legnagyobb z-beli szkennelési tartományuk csupán 130  $\mu\text{m}$ . Ezekkel a technikákkal a mélyebb rétegekből történő képalkotás csak a felsőbb rétegek mechanikus sérülése mellett lehetséges. A 3D DRIFT AO szkennelés egyik legfőbb előnye, hogy teljes látómezős detekciót tesz lehetővé, ezért a z szerinti szkennelési tartománya akár 1000  $\mu\text{m}$  is lehet átlátszó mintában, és körülbelül 650  $\mu\text{m}$  *in vivo* mintában (főleg a rendelkezésre álló lézer energia korlátja miatt). Adaptív optika használatával a felbontás és jel-zaj arány a mélyebb régiókban is javítható.

A dolgozatban bemutatott szkennelési technikai legfőbb fejlesztési lehetősége, hogy a szkennelési tartományt, amit jelenleg elsősorban a lézerek limitált intenzitása korlátoz, tovább növeljük. A jövőben várhatóan megjelenő nagyobb teljesítményű lézerek megjelenésével, adaptív optika használatával, és a pirosabb emissziós hullámhossz tartomány felé eltolt kalcium szenzorok használatával, az eddigieknél sokkal nagyobb szkennelési mélységek is elérhetővé válnak, így a legalsó kortikális régiók vagy akár a hippocampus mérése is lehetővé válik, a cortex eltávolítása nélkül.

Habár négy AO eltérítő és a passzív optikai elemek számos elrendezésével megvalósítható a 3D szkennelés, ezen elrendezések mindegyikében a második kristály párban ellentétes irányban haladó hanghullámokat alkalmaznak a fókusz pont csúszásának kompenzálására. Ezért az itt bemutatott szkennelési technikák könnyen alkalmazhatóak más, már meglévő 3D rendszerekben is. Ráadásul, ugyan a szkennelési tartomány rovasára, de akár egy két-dimenziós rendszer is tovább fejleszthető három-dimenziós rendszerré, négy AO cella telepítésével. Ezért meggyőződésem, hogy az itt bemutatott technikák nagyon körben is új lehetőséget fognak nyitni az *in vivo* képalkotás területén.

## **KÖZREMŰKÖDŐK RÉSZVÉTELI ARÁNYAI**

---

A munkában használt kísérletes technikákat Hillier Dániel, Kaszás Attila, Judák Linda, Szadai Zoltán és Farkas Zoltán segítségével vezettük be a laborba és alkalmaztuk saját méréseink során. Maák Pál dolgozta ki az acusto-optikai eltérítőket, amiket Pál, Veress Máté, Fehér András és én alkalmaztunk a rendszer optikai megvalósítása során. Az anyagi diszperzió kompenzálásához szükséges kalkulációkat, illetve a prizmás kompenzáló rendszer összeszerelését én végeztem. A szférikus aberrációt korrigáló lencse számításait Maák Pál végezte, annak a rendszerbe való beépítése során az optikai megvalósításban részt vevők segítségével. A mozgás korrekciós szoftver Katona Gergely és Ócsai Katalin fejlesztették. A dolgozatban bemutatott minden típusú mérésben részt vettem, Judák Linda, Kaszás Attila, Chiovini Balázs és Rózsa Balázs segítségével. Az analízisben Rózsa Balázs, Maák Pál, Katona Gergely és Judák Linda segített. Az új szkennelési technikák kidolgozásában Katona Gergely, Rózsa Balázs és én vettem részt. A dolgozatban bemutatott szimulációkat önállóan végeztem, Rózsa Balázs hasznos tanácsaival. Az *in vivo* patch clamp méréseket Judák Linda, Juhász Gábor és én végeztem.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

---

1: Szabó Zs, Héja L, Szalay G, Kékesi O, Füredi A, Szebényi K, Dobolyi Á, Orbán TI, Kolacsek O, Tompa T, Miskolczy Zs, Biczók L, Rózsa B, Sarkadi B, Kardos J. Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity *in vivo*. *Scientific Reports* 2017 07 20;7:6018. doi:10.1038/s41598-017-06073-7. **IF: 4.259**

2\*\*: Szalay G\*, Judák L\*, Katona G\*, Ócsai K, Juhász G, Veress M, Szadai Z, Fehér A, Tompa T, Chiovini B, Maák P, Rózsa B. Fast 3D Imaging of Spine, Dendritic, and Neuronal Assemblies in Behaving Animals. *Neuron*. 2016 Nov 23;92(4):723-738. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.002. PubMed PMID: 27773582. **IF: 13.974**

3: Deneux T, Kaszas A, Szalay G, Katona G, Lakner T, Grinvald A, Rózsa B, Vanzetta I. Accurate spike estimation from noisy calcium signals for ultrafast three-dimensional imaging of large neuronal populations *in vivo*. *Nat Commun*. 2016 Jul 19;7:12190. doi: 10.1038/ncomms12190. PubMed PMID: 27432255. **IF: 11.329**

4: Szalay G\*, Martinecz B\*, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, Fekete R, West BL, Katona G, Rózsa B, Dénes Á. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun*. 2016 May 3;7:11499. doi: 10.1038/ncomms11499. PubMed PMID: 27139776; PubMed Central PMCID: PMC4857403. **IF: 11.329**

5\*\*: Szalay G, Judák L, Szadai Z, Chiovini B, Mezey 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*. 2016 May 1;157(18):724. doi: 10.1556/650.2016.30457. Hungarian. PubMed PMID: 27106729. **IF: 0.291**

6: Kerekes BP, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, Pálfi D, Bagó A, Spitzer K, Rózsa B, Ulbert I, Wittner L. Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex *in vitro*. *Neurophotonics*. 2014 Jul;1(1):011013. doi: 10.1117/1.NPh.1.1.011013. Epub 2014 Sep 11. PubMed PMID: 26157969; PubMed Central PMCID: PMC4478968. **IF: 5.104**

7: Wertz A, Trenholm S, Yonehara K, Hillier D, Raics Z, Leinweber M, Szalay G, Ghanem A, Keller G, Rózsa B, Conzelmann KK, Roska B. PRESYNAPTIC NETWORKS. Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules. *Science*. 2015 Jul 3;349(6243):70-4. doi: 10.1126/science.aab1687. PubMed PMID: 26138975. **IF: 33.61**

8: Chiovini B, Turi GF, Katona G, Kaszás A, Pálfi D, Maák P, Szalay G, Szabó MF, Szabó G, Szadai Z, Káli S, Rózsa B. Dendritic spikes induce ripples in parvalbumin interneurons during hippocampal sharp waves. *Neuron*. 2014 May 21;82(4):908-24. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.004. Erratum in: *Neuron*. 2014 Aug 6;83(3):749. PubMed PMID: 24853946. **IF: 13.974**

9\*\*: Katona G\*, Szalay G\*, Maák P\*, Kaszás A\*, Veress M, Hillier D, Chiovini B, Vizi ES, Roska B, Rózsa B. Fast two-photon *in vivo* imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. *Nat Methods*. 2012 Jan 8;9(2):201-8. doi: 10.1038/nmeth.1851. PubMed PMID: 22231641. **IF: 23.565**

\* Ezek a szerzők egyenlő arányban vettek részt a munkában.

\*\* Ezek a munkák képzik a PhD dolgozat törzsanyagát.