

Application Note

Il Neurone come non l'avete mai visto: visualizzare la cellula più affascinante



Figura 1: Uno dei celebri disegni di Cajal. Premio Nobel per la Medicina nel 1906, Cajal divenne il primo uomo a visualizzare i neuroni utilizzando un semplice microscopio ottico.

Introduzione

Tra tutti i sistemi di cui è composto il nostro corpo, quello nervoso è senza dubbio il più misterioso. Un complesso e intricato circuito di cellule altamente specializzate che affascina neuroscienziati e non. Il primo a tentare di districare tale rompicapo fu Santiago Ramón y Cajal, medico spagnolo che approcciò il misterioso sistema con la microscopia. Dotato di un rudimentale microscopio ottico, Cajal osservò numerosi campioni istologici utilizzando la colorazione cromoargentica e iniziò a disegnare "le scene più accattivanti della vita degli infinitamente piccoli" [1]. Infatti, Cajal rappresentava graficamente le particolari cellule che visualizzava con i suoi strumenti generando delle vere e proprie opere d'arte (**Figura 1**). Tali disegni divennero subito celebri nella comunità scientifica e valsero il premio Nobel per la medicina a Cajal, nonché la gloria di aver visualizzato il primo neurone nella storia.

Fu così che Cajal divenne il padre della neuroscienza moderna utilizzando un semplice microscopio ottico con lampada a gas. Da quel giorno, la microscopia ha fatto passi da gigante permettendoci di osservare e descrivere i neuroni in maniera sempre più dettagliata. Dall'ottica all'elettronica, dalla fluorescenza all'olotomografia, numerose tecnologie hanno permesso di osservare i neuroni in modalità totalmente differenti. In questa application note, cercheremo di riassumere le più importanti tecniche di microscopia nel campo delle neuroscienze [2] (**Figura 2**).

[1] Estratto da uno dei libri di Cajal, *Vida, Pensamiento y Ombra*

[2] A titolo informativo, tratteremo solamente strumenti impiegati comunemente nella ricerca, escludendo sistemi per la diagnostica come TAC, MRI e PET.

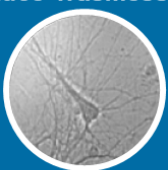
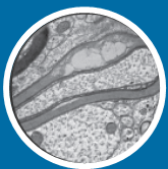
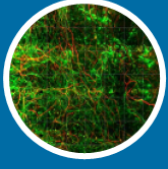
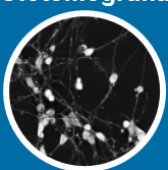
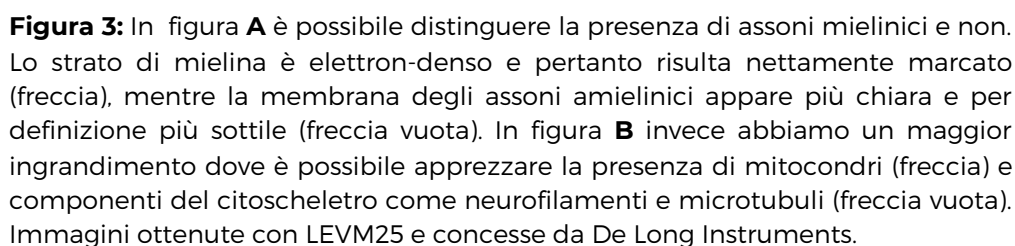
Luce Trasmessa 	La microscopia a luce trasmessa fu la prima tecnica di microscopia inventata e la prima ad essere utilizzata per visualizzare i neuroni. In generale questa metodologia si basa sull'indice di rifrazione e produce immagini in bianco e nero a basso contrasto e risoluzione. La microscopia ottica fu sufficiente a Cajal per osservare il primo neurone nei primi del 900, ma attualmente trova sempre meno impiego nelle neuroscienze, pertanto non la tratteremo in questo articolo.
Elettronica 	La tecnica di microscopia che garantisce il massimo ingrandimento possibile è indubbiamente la microscopia elettronica (TEM e SEM). L'alta risoluzione della microscopia elettronica a trasmissione venne sfruttata già negli anni 50 per osservare neuroni. Ad oggi, la preparativa complessa del campione e la staticità delle immagini ottenibili con questi strumenti ne limitano il loro impiego, ma giocano ancora un ruolo importante nelle neuroscienze.
Fluorescenza 	Tra le tecniche più utilizzate in biologia troviamo la microscopia fluorescenza. Dalla modalità base Widefield alla microscopia confocale, la fluorescenza è ormai onnipresente in tutti i laboratori di ricerca ed ha contribuito enormemente alle neuroscienze. Questi strumenti hanno subito enormi cambiamenti ed evoluzioni negli anni, portando alla microscopia a 2 fotoni (trattata a parte) e ai microscopi super-resolution.
2 Fotoni 	La tecnologia principe delle neuroscienze è senza ombra di dubbio la microscopia a 2 fotoni. Sfruttando la fluorescenza, i sistemi a 2 fotoni implementano laser con lunghezze d'onda maggiori e dunque minor energia. Tali caratteristiche conferiscono un maggior poter penetrante e minor danno al campione, permettendo di visualizzare campioni spessi o tessuti vivi, dunque perfetto per esperimenti di neuroscienze.
Olotomografia 	I primi holotomographic microscopes al mondo sono stati prodotti da Nanolive, pionieri di questa tecnologia. Combinando olografia e tomografia permettono di ottenere un'immagine ad altissima risoluzione e sensibilità senza danneggiare il campione. Ad oggi, Nanolive rappresenta il gold-standard del Live-imaging Label-free in vitro e permette di visualizzare ogni tipo di coltura cellulare, tra cui colture neuronali.

Figura 2: Tabella riassuntiva con le principali tecniche di microscopia per la visualizzazione dei neuroni.

Microscopia Elettronica

Cajal non fu solamente pioniere della microscopia, ma teorizzò svariate ipotesi sul funzionamento dei neuroni. Tra le più importanti teorie di Cajal troviamo la sinapsi; secondo il medico spagnolo i neuroni erano unità comunicanti, ma separate da piccolissimi spazi che definì sinapsi. Tale ipotesi scaturì numerosi dibattiti nella comunità scientifica e venne validata solamente decine di anni dopo grazie alla microscopia elettronica.



L'alta risoluzione dei TEM consente di risolvere dettagliatamente densi e complessi circuiti neuronali quando visualizzati in 3D. Nonostante la laboriosa preparativa del campione, è infatti possibile ottenere immagini 3D con il TEM. Ciò implica l'utilizzo di un ultramicrotomo in grado di produrre sottilissime sezioni del campione (40nm) per poi analizzarle in maniera seriale. Purtroppo però, tale procedura è tutt'oggi effettuata manualmente da un operatore, complicando e rallentando ulteriormente la preparazione del campione.

Esistono anche sistemi automatizzati per l'acquisizione di immagini seriali con microscopia elettronica, ma l'utilizzo di supporti opachi impedisce l'utilizzo del TEM (dove il fascio attraversa completamente il campione per poi colpire il detector sottostante) e dunque sono implementabili solamente con il SEM (microscopia elettronica a scansione). In questi sistemi, l'impiego di bassi voltaggi è necessario e la tipologia di immagini ottenibili è molto simile a quelle ottenute con i TEM. Sono disponibili varie strategie per ottenere immagini 3D con microscopi SEM che per brevità non tratteremo in questa application note, ma che sono riassunte dettagliatamente in questo articolo **(1)**.

In conclusione, la microscopia elettronica è una tecnologia ad alta risoluzione e di difficile impiego, ma che genera risultati indispensabili per le neuroscienze. La struttura dei circuiti neuronali è infatti un'informazione essenziale al fine di comprendere le funzionalità e i collegamenti tra i vari neuroni di una data regione cerebrale.

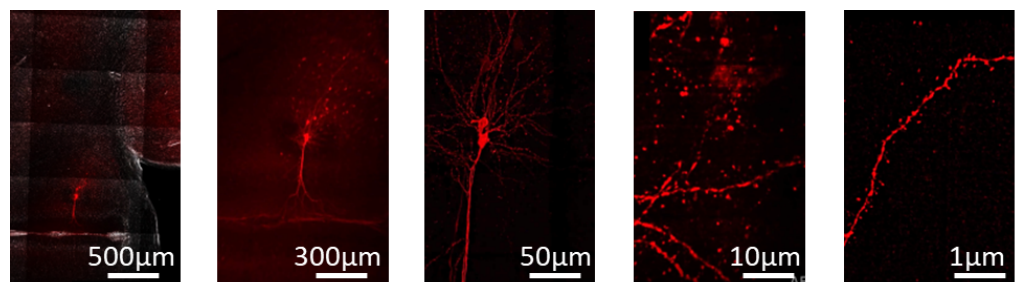


Figura 4: Sezione di cervello murino visualizzata con Aurox Clarity. Il campione è stato visualizzato prima con un obiettivo 10x e poi con un obiettivo 63x per creare una panoramica del neurone piramidale, dalla sua struttura generale, al dettaglio di un singolo dendrite. Da sottolineare che la prima immagine è sia fluorescenza che contrasto di fase (bianco), mentre le immagini ad alto ingrandimento sono state risolte utilizzando il plug-in di ImageJ SRRF. Queste immagini sono gentilmente concesse da Dr. Theresa Riedemann dell'Università di Monaco.

I microscopi confocali laser scanning e spinning disk hanno e continuano a contribuire enormemente nelle neuroscienze. Purtroppo però, la risoluzione spaziale di questi sistemi è limitata dalla diffrazione della luce, dunque non maggiore della metà della lunghezza d'onda utilizzata (tipicamente attorno ai 250nm). Considerando che il diametro di alcuni assoni è inferiore ai 200nm o che le sinapsi sono attorno ai 30nm, è chiaro che i sistemi confocali non sono sufficienti per risolvere queste particolari strutture. Fortunatamente, negli ultimi decenni è stato superato questo limite di risoluzione grazie a svariate tecniche, dette Super-Resolution Microscopy. Dallo STED (stimulated emission depletion microscopy) alla SIM (structured illumination microscopy), dal PALM (photo-activated localization microscopy) allo STORM (stochastic optical reconstruction microscopy), numerose tecnologie a super risoluzione hanno aperto nuovi orizzonti sperimentali nel campo delle neuroscienze e contribuito notevolmente all'avanzamento di questo campo. Data la vastità di applicazioni e la complicatezza dei vari sistemi, non tratteremo questa categoria di strumenti che è però riassunta nella completa review di Tønnesen & Nägerl (2).

Microscopia a 2 fotoni

La metodologia principe nelle neuroscienze è senza dubbio la microscopia a 2 fotoni, tecnologia in grado di penetrare e visualizzare sezioni spesse o tessuti vivi senza danneggiarli. A differenza dei laser utilizzati per la microscopia a fluorescenza convenzionale, i quali forniscono singoli fotoni di luce visibile (lunghezza d'onda corta e quindi alta energia), i laser per la microscopia multifotone eccitano il campione sfruttando l'assorbimento simultaneo di due fotoni infrarossi (lunghezza d'onda lunga e quindi bassa energia). L'utilizzo di lunghezze d'onda più lunghe comporta principalmente due vantaggi: da una parte la riduzione di energia minimizza i danni generati dall'irradiazione aumentandone il potere penetrante, dall'altra, la necessità dell'assorbimento simultaneo di due fotoni implica che l'eccitazione del fluoroforo avviene solamente dove il laser è più concentrato, ovvero sul piano focale. Per tale proprietà, nella microscopia multifotone non avviene la generazione di fluorescenza secondaria derivante dai piani sopra e sotto il piano focale, aumentando quindi il signal-to-noise ratio (SNR).

I sistemi a 2 fotoni sono dunque adatti ai quesiti biologici dei neuroscienziati permettendo l'imaging in vivo e in vitro di tessuti cerebrali profondi. In figura 5 è possibile osservare un classico esempio di corteccia cerebrale ottenuto con un sistema multifotone FEMTONICS (FEMTO SMART). In questo esperimento, si può notare l'attività di calcio di uno specifico neurone immerso in un complesso circuito (**Figura 5**).

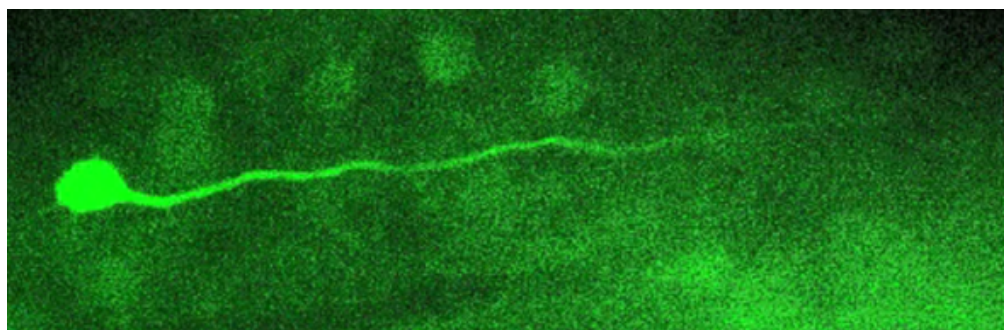


Figura 5: Frame di un live-imaging di neuroni della corteccia cerebrale di topo. In questo preciso istante è visibile l'attività di calcio di un neurone grazie all'indicatore di calcio GCaMP6 (verde acceso). Il dendrite apicale parte dal corpo neuronale e attraversa numerosi strati corticali. Immagine concessa da Femtonics

I benefit della microscopia a 2 fotoni però non si limitano solamente all'imaging, infatti un enorme vantaggio di questi strumenti è la possibilità di stimolare specifici neuroni. L'irradiazione mirata di neuroni opportunamente modificati a livello genetico provoca l'innescò di un potenziale d'azione, il quale risulterà nell'attivazione del circuito neuronale e conseguente comportamento. Questa tecnica, detta anche fotostimolazione, permette la correlazione di stimoli esterni a attività neuronali ed è essenziale nel campo delle neuroscienze. Un elegante esempio di fotostimolazione è descritto nel nostro precedente articolo **(3)**.

Un momento chiave nell'evoluzione delle neuroscienze è stata l'implementazione di modulatori Acousto-Optic (AO) nei sistemi due fotoni da parte di Femtonics. Questa azienda ha infatti prodotto FEMTO 3D ATLAS, il primo acousto-optic 2-photon microscope al mondo. Tale tecnologia permette di controllare l'orientamento dei laser con elevata precisione e velocità rispetto ai 2 fotoni convenzionali e soprattutto di visualizzare un'immagine 3D. Poiché ogni network neuronale si estende nelle tre dimensioni o su layer corticali differenti tale upgrade tecnologico fornisce ai neuroscienziati un potere di investigazione molto più ampio e completo.

I vantaggi della tecnologia AO non si limitano all'estetica dell'imaging in 3 dimensioni, ma comporta sostanziali vantaggi anche dal punto di vista dell'acquisizione e dell'analisi dei campioni. Ottenendo un'immagine 3D è possibile navigare all'interno di tale volume e selezionare specificamente più regioni di interesse di ogni forma e orientamento (**Figura 6**). Questo sistema, permette di orientare il piano focale in qualsiasi direzione (senza spostare campione o microscopio) e di acquisire solamente le aree desiderate ottimizzando il processo di acquisizione. Inoltre, acquisendo un volume 3D si ottengono informazioni anche nelle circostanze del punto/zona di interesse. Tali informazioni, analizzate con l'apposito software di Femtonics, permettono di correggere eventuali movimenti o vibrazioni del campione. È infatti molto comune durante gli esperimenti in vivo di avere movimenti indesiderati, e inevitabili, del campione vivo. Grazie all'Anti-motion correction di FEMTO 3D ATLAS è ora possibile correggere tali vibrazioni sia live che in post-acquisition per ottenere video più stabili e quantificazioni più precise.

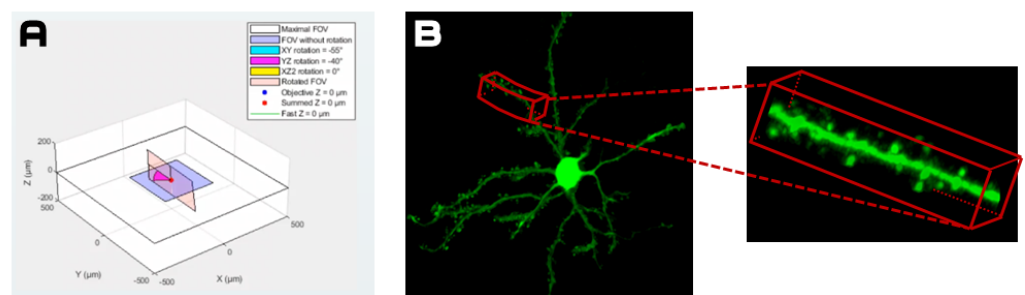


Figura 6: A. Rappresentazione schematica dell'arbitrary frame scanning, modalità di acquisizione esclusiva di FEMTO 3D ATLAS. Grazie alla tecnologia AO è possibile posizionare il FOV d'interesse (rosa) all'interno della regione 3D in acquisizione (bianca) in qualsiasi orientamento. B. Il region scanning di Femntonics permette la selezione di più regioni o volumi di interesse, per ottenere acquisizioni più precise e dettagliate. Nello specifico, qui possiamo osservare la visualizzazione 3D di uno specifico dendrite di un neurone stellato.

L'Olotomografia di Nanolive

Uno degli strumenti più rivoluzionari nella ricerca è senza dubbio il 3D Cell Explorer di Nanolive, primo microscopio olotomografico al mondo in grado di visualizzare cellule vive in 3D e in timelapse senza l'utilizzo di marcatori fluorescenti. L'assenza di fluorescenza elimina totalmente tutti i problemi legati alla fototossicità, rendendo Nanolive un microscopio perfettamente adatto ad esperimenti di live-imaging anche con colture cellulari delicate, come ad esempio i neuroni. La fragilità del sistema nervoso che tutti noi conosciamo è verificata anche nelle piastre in laboratorio: le colture neuronali sono infatti tra le linee più delicate da coltivare complicando ulteriormente tutti gli esperimenti in vitro. Nanolive rappresenta dunque un'ottima soluzione per questa tipologia di linee cellulari nel caso in cui si vogliano visualizzare dinamiche cellulari e subcellulari nel corso di ore, giorni o addirittura settimane.

Ad esempio, in **figura 7** è possibile osservare il differenziamento di cellule LUHMES in neuroni dopaminergici. Questi precursori neuronali sono stati visualizzati per quasi 3 giorni (68 ore) con un'immagine ogni ora: nonostante la lunghezza del video, durante l'esperimento le cellule embrionali appaiono in salute e non alterate dallo strumento, concludendo il processo di differenziamento e dimostrando la totale innocuità di Nanolive. È dunque evidente che le potenzialità di Nanolive, almeno in vitro, sono infinite: con l'olotomografia è possibile visualizzare qualsiasi tipologia cellulare in maniera unbiased senza perdere alcun dettaglio e dinamica subcellulare e di popolazione. Per il video completo, e per ulteriori esempi, consigliamo la visualizzazione della galleria di neuroscienze di Nanolive **[3]**.

[3]<https://www.nanolive.ch/applications/overview/neuroscience/>

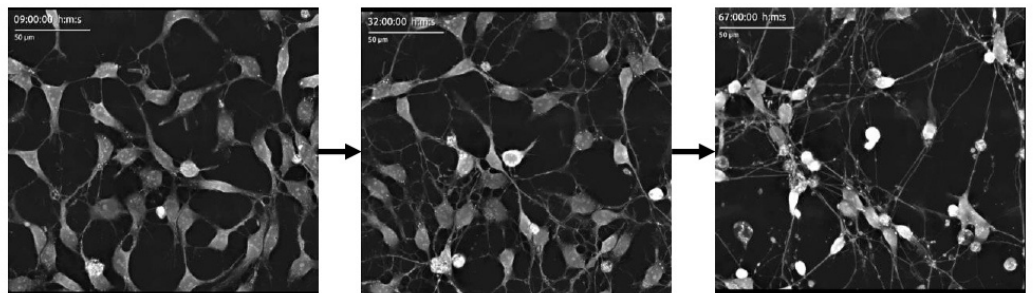


Figura 7: 3 frame di un video di precursori Neuronal LUHMES che differenziano in neuroni dopaminergici. La registrazione è durata 68 ore con 1 acquisizione ogni ora. Il dettaglio subcellulare e le informazioni dell'intera popolazione sono disponibili grazie all'alta qualità delle immagini olotomografiche. Esperimento condotto con Nanolive CX-A da Urs Luthi e Alexandre Peter di Swiss Biotech.

(1) Briggman KL, Bock DD. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. Curr Opin Neurobiol. 2012 Feb;22(1):154-61. doi: 10.1016/j.conb.2011.10.022. Epub 2011 Nov 24. PMID: 22119321.

(2) Tønnesen J, Nägerl UV. Superresolution imaging for neuroscience. Exp Neurol. 2013 Apr;242:33-40. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.10.004. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23063602.

(3)[https://www.linkedin.com/posts/media-system-lab-s-r-l-_neuroscienze-neuroni-zebrafish-activity-6947857823770808320--oOk?](https://www.linkedin.com/posts/media-system-lab-s-r-l-_neuroscienze-neuroni-zebrafish-activity-6947857823770808320--oOk?utm_source=linkedin_share&utm_medium=member_desktop_web)
utm_source=linkedin_share&utm_medium=member_desktop_web



Conclusione

In poco più di un secolo, siamo passati da “semplici” disegni a mano libera a video 3D di neuroni in vivo live-imaging. Nonostante la complessità del sistema nervoso rimanga ancora un difficile rompicapo da risolvere, l'evoluzione tecnologica ha permesso di compiere passi da gigante nelle neuroscienze, scoprendo, dimostrando e descrivendo incredibili sfaccettature del misterioso organo. Sicuramente la tecnologia farà altri passi, nel frattempo, non ci resta che affrontare questa sfida con i fantastici microscopi a nostra disposizione.

