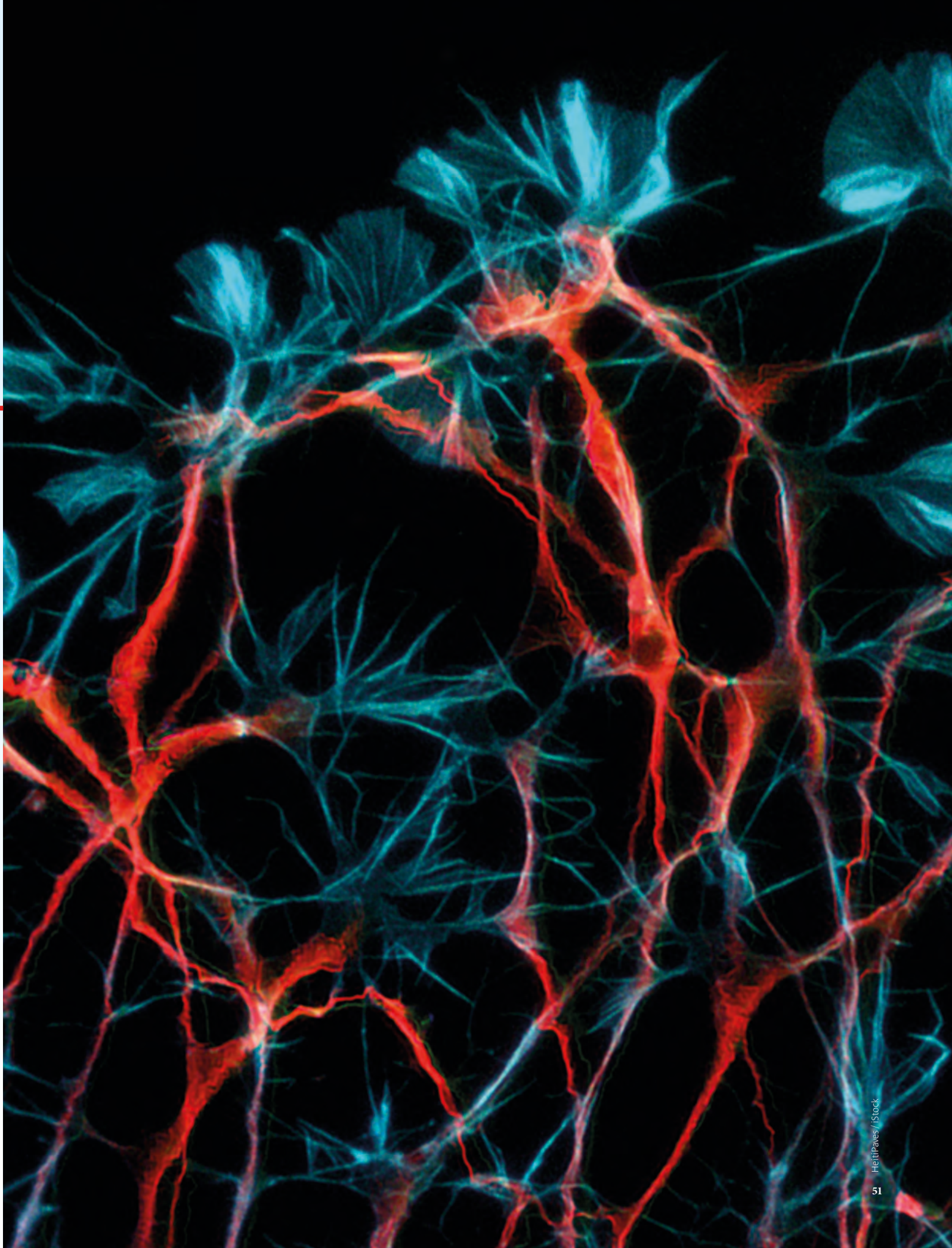


Derin Beyin Görüntülemesinde Yeni Bir Dönem

Mikroskoplardan Miniskoplara

Dr. Tuncay Baydemir [TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi

Bilim insanları geliştirdikleri mikroskoplar ve görüntüleme teknolojileriyle hem çeşitli organ, doku ve hücreleri derinlemesine incelemeyi hem de hücresel bileşenlerin yapılarını, işlevlerini ve işlev bozukluklarını daha iyi anlamayı hedefliyor. Daha önceki dönemlerde bu tür çalışmalar yapmak için doku örneklerinin alınması ve mikroskopla incelenmek üzere hazırlanması gerekiyordu. Günümüzde ise yeni nesil mikroskoplar sayesinde hareketli canlılar üzerinde bile gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlüklü üç boyutlu görüntülemeler uzun süreler boyunca yapılabiliyor.



Geleneksel optik mikroskopi teknikleri yüksek çözünürlüklü görüntülemeyi sadece doku yüzeyinin yakınlarında gerçekleştirebiliyor. Son yirmi yılda geliştirilen yeni optik mikroskopi teknikleri ise doğrusal olmayan ışık-madde etkileşimlerini kullanıyor. Bu teknikler sayesinde, dokulara zarar vermeden yüksek çözünürlüklü görüntüleme gerçekleştirilebiliyor. Böylece lenfatik organlar, böbrek, kalp, deri ve beyin örnekleri daha derinlemesine ve hasar görmeyecek şekilde incelenebiliyor.

Çoklu foton uyarma tekniklerinden olan iki-foton floresan mikroskobu, canlı dokuların derin görüntülenmesini sağlayan başarılı bir görüntüleme tekniği. İki-foton floresan mikroskobu, biyolojik örneklerin canlı içinde üç boyutlu olarak görüntülenmesine imkân tanıyor. Konfokal (eşodaklı) mikroskop ile kıyaslandığında ise daha derin bölgelerden görüntüleme sağlayabiliyor.

1990 yılında W. Denk, J. H. Strickler ve W.W. Webb tarafından iki-foton floresan mikroskobunun icadı, hücre ve dokuların üç boyutlu görüntülenmesinde çığır açıcı nitelikteydi. Bu icadın temelleri ise yaklaşık olarak bulunuşundan altmış yıl öncesine dayanıyor. Öyle ki iki-foton uyarımının teorik temelleri Maria Goeppert Mayer tarafından 1931 yılında

yazdığı doktora teziyle atılmıştı. Bu fotofiziksel etkinin deneysel olarak gösterilmesi ise tezin yayınlanmasından yaklaşık otuz yıl sonra Wolfgang Kaiser ve C.G.B. Garrett tarafından gerçekleştirildi.

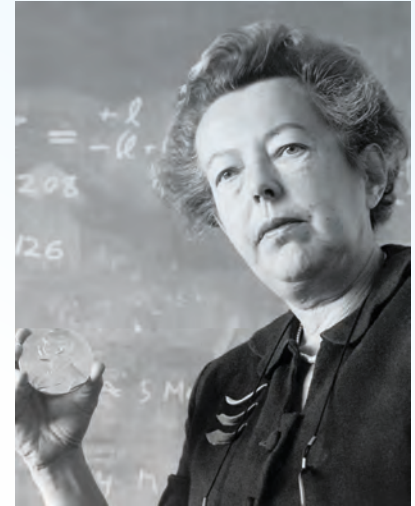
Floresan Mikroskobisinin Temelleri

Floresan mikroskobisi genel olarak şu basit prensibe dayanıyor. Moleküller enerjisi soğurduklarında elektronik olarak uyarılır ve yeniden kararlı hâle dönerken soğurdukları enerjisi ışıma yoluyla serbest bırakır. Çoğu mikroskopta bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla tek bir foton kullanılıyor. Ancak kalın dokuların incelenmesinde bu yeterli olmayabiliyor. Çünkü ışık hücresel katmanlardan geçerken soğuruluyor ve saçılıyor. İki-foton mikroskoplarda ise dokuya daha derin nüfuz edebilen daha uzun dalga boyuna sahip fotonlar kullanılarak bu sorunun üstesinden geliniyor. Ancak iki-fotonlu sistemlerin büyük olmasının yanında özel ışık kaynakları ve lensler gerektirmesi gibi dezavantajları bulunuyor. Bu nedenle araştırmacılar bu teknolojiyi geliştirmek amacıyla uzun süredir araştırmalar yapıyor.

İki-foton uyarımı bir floresan sürecidir, bu süreçte bir florofor (belirli bir dalga boyundaki ışığı

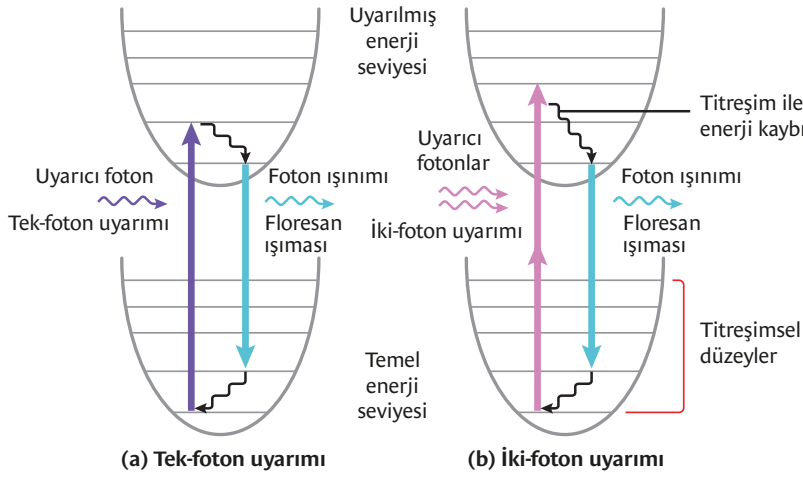
emen ve kısa bir gecikmeden sonra daha uzun bir dalga boyunda ışık yayan molekül) iki fotonu aynı anda soğurarak uyarılır. Tek fotonla gerçekleşen floresan sürecinde ise bir florofor temel enerji düzeyinden tek bir fotonla uyarılmış hâle geçirilir. Bu işlemde tipik olarak ultraviyole veya mavi/yeşil spektral aralıktaki fotonlar kullanılır. Aynı uyarma işlemi kızılötesi spektral aralıktaki daha az enerjili iki fotonun eşzamanlı soğurulması ile de gerçekleştirilebilir.

Tek-foton uyarılmasına göre dolaylı sayılan bu süreçte kullanılan iki fotonun enerjileri toplamı, molekülün uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkından büyük olmalı. Yani bu süreç bir florofor molekülü tarafından iki fotonun eşzamanlı



Bettmann/Getty Images

Maria Goeppert Mayer (1906-1972) Alman-Amerikalı teorik fizikçi. 1963 Nobel Fizik Ödülü'nü kazanan Mayer, Marie Curie'den sonra bu ödülü kazanmayı başaran ilk kadındır. Doktora çalışmasını atomlar tarafından iki-foton soğurma teorisi üzerine yazmıştır.

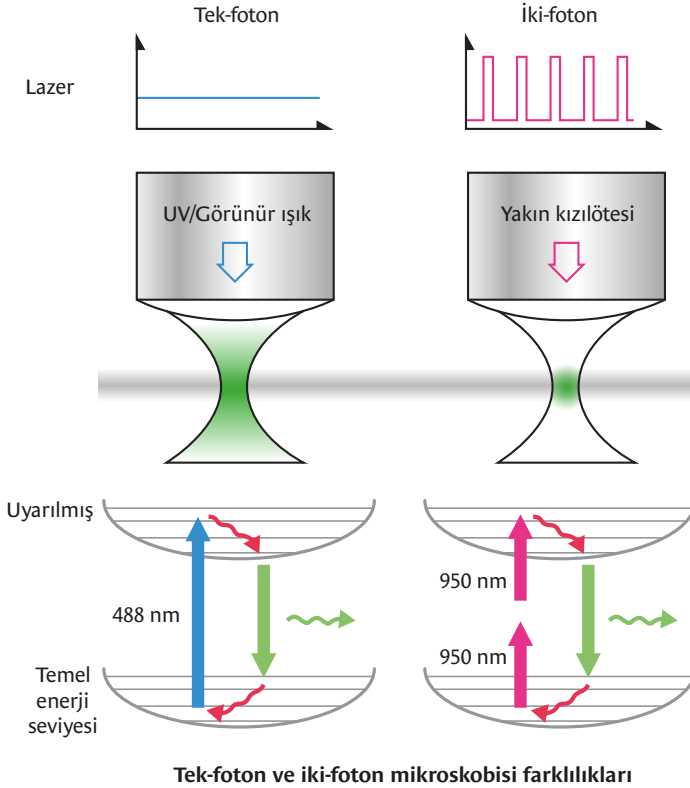


(a) Tek-foton uyarımı

(b) İki-foton uyarımı

İsmi floresan spektroskopisinin öncüsü olarak bilinen Polonyalı fizikçi Aleksander Jablonski'den (1898-1980) alan ve ışığın soğurulması ile emisyonu arasındaki süreçleri gösteren Jablonski diagramları

Tek-foton uyarımı tek bir fotonun soğurulması, iki-foton uyarımı ise iki düşük enerjili fotonun soğurulması ile gerçekleşir. Her iki durumda da uyarılan floroforun daha düşük enerji seviyesine dönerken gösterdiği floresan ışınım süreci hemen hemen aynıdır.



Tek-foton ve iki-foton mikroskopisi farklılıkları

Tek-foton mikroskopunda sürekli dalga lazerinden gelen UV/görünür dalga boylarında ışık kullanılırken iki-foton mikroskopunda yakın kızılötesi (NIR) dalga boylarında femtosaniye atım periyotlu lazer kullanılır.

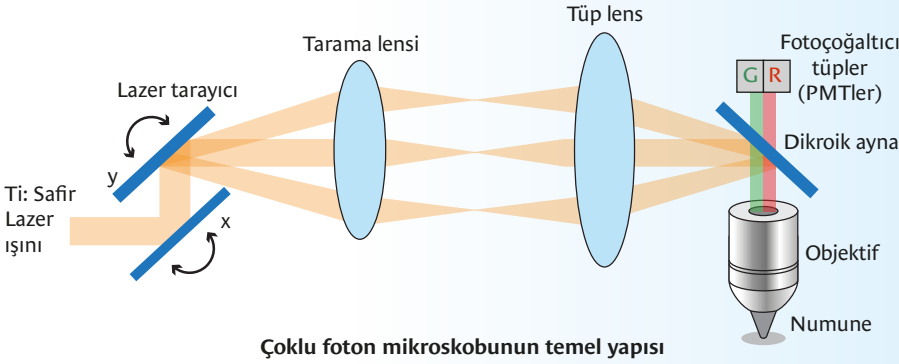
Tek fotonlu (konfokal) mikroskopta floresan ışığı koninin tamamında üretilirken iki fotonlu ise floresan ışınım yalnızca odak noktasının yakınında gerçekleşir. Böylece odak noktasından uzakta neredeyse hiç uyarılma olmadığı için odak düzleminin üstünde ve altında net bir görüntüleme sağlanır.

olarak soğurulmasına bağlı. Yeterince yoğun uygulamalarda ise üç veya daha fazla fotonun yer aldığı moleküler uyarımlar da gerçekleştirilebiliyor.

İki foton uyarımı, Maria Goeppert Mayer tarafından doktora tezinde teorik olarak ortaya konduğunda lazer henüz icat edilmemişti. Bu nedenle iki-foton uyarımının deneysel olarak gözlenmesi lazerin keşfinden hemen sonraki dönemde yani yaklaşık otuz yıl sonra gerçekleşti. Bu süreçte önemli ölçüde teorik ve deneysel bilgi birikimi elde edildi.

Foton enerjisi dalga boyuyla ters orantılı olduğundan, tek fotonlu uyarıma ile aynı işlevi sergilemesi beklenen iki fotonun dalga boylarının yaklaşık olarak iki katına çıkması gerekiyor. Örnek vermek gerekirse tek-foton sisteminde 350 nm dalga boylundaki morötesi foton ile uyarılan bir floroforu uyarım için 700 nm dalga boyuna sahip iki yakın kızılötesi foton gerekiyor.

Floroforlar uygun bir ışık kaynağı ile aydınlatıldığında, elektronlar emilen ışık tarafından uyarılır. Daha sonra, yüksek enerji seviyelerine uyarılmış bu elektronlar temel enerji seviyesine geri döndüğünde ise enerji foton olarak salınıyor ve böylece floresan ışınım gerçekleşiyor. Bu süreç tek fotonla gerçekleşirse doğrusal, birden fazla fotonun enerjisinin soğurulması ile



Çoklu foton mikroskopunun temel yapısı

Ultra hızlı atımlı yakın kızılötesi lazer ışını bir çift tarama aynasına (X/Y aynaları) gönderilir ve galvanometrik elemanlara uygulanan voltaja bağlı olacak şekilde lazer ışını iki boyutta yönlendirilir. Işın daha sonra tarama ve tüp merceklerden geçer ve bu lens kombinasyonu ışın odağının boyutunu ve görülebilir alanı belirler. Ardından lazer ışını yakın kızılötesini yansıtan ancak görünür aralıktaki ışığı geçiren dikroik bir ayna (bazı renkleri geçirip bazılarını yansıtmaya özelliği taşıyan yarı geçirgen özel bir ayna) tarafından hedefe yönlendirilir. Objektif mercekle kısa lazer atımlarını numunedeki küçük bir noktaya odaklar ve floresan moleküllerin çoklu foton uyarımı bu sayede gerçekleştirilir. Yayılan fotonlar iki kanala (kırmızı ve yeşil) bölünmeden önce dikroik aynadan geçer ve iki özel fotoçoğaltıcı tüp (PMT) tarafından toplanır. Bu tüpler elektromanyetik spektrumun ultraviyole, görünür ve yakın kızılötesi aralıklarında çalışan oldukça hassas ışık dedektörleridir. Gelen ışık tarafından üretilen elektrik akımını 100 milyon kata kadar yükseltebilen bu tüpler böylece ışık akısının çok düşük olduğu durumlarda bile fotonların tek tek algılanmasına imkân sağlar.

Lecoq, J., Orlova, N. ve Grewe, B. F., "Wide-Field, Fast-Deep: Recent Advances in Multiphoton Microscopy of In Vivo Neuronal Activity", *The Journal of Neuroscience*, 39(46): 9042-9052, 2019.

geliştirildi ve konfokal mikroskop ile erişilemeyen derinliklerde hücre görüntüleyebilmesiyle büyük önem kazandı. Floresan görüntülemedeki gelişmelerle birlikte çeşitli floroforlar kullanılarak farklı doku ve hücreler başarılı bir şekilde gözlemlendi.

1962'de bir denizanası türünden (*Aequorea victoria*) izole edilen yeşil floresan proteini, moleküler biyoloji çalışmalarında olduğu gibi floresan mikroskopisi çalışmaları için de çok önemli bir gelişmeydi. Biyolojik araştırmalarda hayli yaygın olarak kullanılan ve incelenen belirteçlerden birisi olan yeşil floresan proteini ve benzer farklı proteinler hem hücre hem de protein dinamiklerinin görselleştirilmesinde kullanılıyor. Böylece gen ve hücre araştırmalarında son derece önemli gelişmeler kaydedildi. Günümüzde canlılarda çeşitli floresan proteinler kullanılarak gerçekleştirilen görüntülemeler sayesinde biyolojik olayların dinamikleri hakkında bilgi sahibi olunabiliyor.

Çeşitli canlıların beyin sinir ağları üzerine yapılan çalışmalarda, protein lokalizasyonu ve hücre dinamiklerini daha iyi anlamak için kalın örneklerden üç boyutlu yüksek çözünürlüklü görüntüleme yapmak gerekiyor. Görüntüleme teknolojilerindeki son gelişmeler ile birlikte günümüzde hücre altı dinamik olayları gözlemek artık mümkün.

gerçekleşirse doğrusal olmayan şekilde sınıflandırılıyor. Yüksek foton yoğunluğu femtosaniye (saniyenin katrilyonda biri) darbeleri lazer ile elde ediliyor.

Yakın kızılötesi ışık kullanan iki-foton mikroskobu sadece derin dokulara nüfuz etmekle kalmıyor aynı zamanda daha az fototoksik özellik de gösteriyor. Bu sayede canlı doku çalışmaları için vazgeçilmez bir araç hâline gelen görüntüleme tekniği; sinirbilimi, canlı hayvan patolojisi ve bitki araştırmaları gibi alanlarda yaygın olarak kullanılıyor. Yakın zamanda canlı hücre görüntülemesine ek olarak sabit örneklerin de derin iki-foton görüntülemesi için yeni teknikler geliştirildi.

Yüz Yılı Aşan Bilgi Birikimi

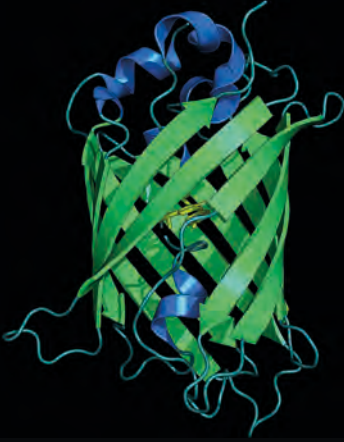
Floresan görüntüleme teknikleri yeni gelişmelerle birlikte her geçen gün daha fazla önem kazanıyor. Floresan terimi ilk olarak 1852'de İngiliz bilim insanı George G. Stokes tarafından florit mineralinin otofloresansını gözlemlediğinde ortaya atıldı. İki-foton uyarımının ilk olarak 1931 yılında Maria Goeppert Mayer tarafından teorik olarak ortaya konmasından uzun bir süre sonra, yani 1961 yılında, W. Kaiser ve C.G.B. Garrett iki-foton uyarımını deneysel olarak ilk defa gözlemlemeyi başardı. İki-foton mikroskobu ise ilk defa günümüzden yaklaşık 30 yıl önce W. Denk ve arkadaşları tarafından

Çoklu Foton Mikroskopisinin Sinir Bilimi Üzerine Etkisi

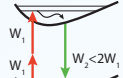
1930'ların sonlarına doğru çeşitli araştırmacılar anestezi uygulanmış hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarla aynı anda sınırlı sayıda nöronun aktivitesini kaydetmeyi başarmıştı. Canlı üzerinden kaydedilebilen ilk sinirsel veriler olması nedeniyle çok önemli sayılan bu başarılar günümüzde yerlerini çok daha fazlasına bıraktı.

Günümüzde uygulanan yeni görüntüleme yöntemleri ile uyanık durumdaki canlıların bile beyinlerindeki genetik olarak işaretlenmiş nöronları tek tek haftalar ve aylar boyunca görüntülemek mümkün. Modern görüntüleme teknolojilerinin son yıllardaki gelişiminin nöroteknoloji ve sinir bilimi araştırmalarına çok önemli katkıları oldu. Çoklu foton mikroskopisindeki gelişmeler ile canlı beyindeki derin bölge sinirsel aktiviteleri kolaylıkla izlenebilir hâle geldi. Böylece sinir biliminde önemli keşifler gerçekleştirilmeye başlandı. Örneğin, bölgesel sinirsel aktivite modellerinin duyuşsal bilgiyi nasıl temsil ettiği ve mikroglia gibi farklı türdeki beyin hücrelerinin rolünün daha iyi anlaşılması bu gelişmeler arasında sayılıyor.

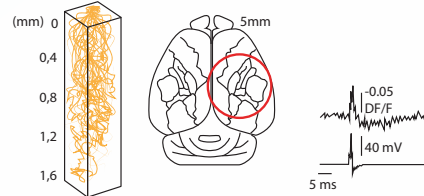
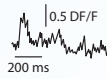
Deniz anası *Aequorea victoria* ve ilk olarak ondan izole edilen yeşil floresan proteinin (YFP) moleküler modeli. Üzerine ultraviyole veya mavi ışık düştüğünde yeşil floresan ışımaya yapan YFP hücre biyolojisi çalışmalarında tanımlayıcı gen ve hücre işaretleyici olarak kullanılıyor.



Uyarılmış enerji seviyesi



Temel enerji seviyesi



Zaman	
Çoklu foton mikroskopisi teorisi, Goppert Mayer 1931	Çoklu foton soğurma ilk deney 1961
İlk iki-foton mikroskopu 1990	Canlıda çoklu foton mikroskopu ile tek nöron görüntüleme 1997
İlk minyatür çoklu foton mikroskopu 2001	Canlıda çoklu foton mikroskopu ile popülasyon görüntüleme 2003
Canlıda rezonans ve yüksek hızlı çoklu foton görüntüleme 2008 & 2010	Canlıda çoklu foton mikroskopu ile derin doku görüntüleme 2011
Çift bölge ve orta ölçekli çoklu foton mikroskopisi 2014 & 2015	İki-foton mikroskopu ile voltaj görüntüleme 2018

Çoklu foton mikroskopisindeki önemli gelişmeler

Canlı ve derin görüntüleme sistemleri, organizmalar üzerindeki fizyolojik ve biyolojik çalışmalar için çok önemli bir yere sahip. Çoklu foton mikroskopisi gelişmeleri ile canlı dokuların derin görüntülenmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilebiliyor. 1990'da yapılan ilk iki-foton mikroskopundan bu yana farklı optik tasarımların yanı sıra lens ve lazer teknolojilerindeki gelişmelere de bağlı olarak önemli ilerlemeler kaydedildi. Ancak hâlâ zamansal çözünürlük, büyük ölçekte katmanlı sinir ağı izleme ve uzun süreli uygulanabilirlik gibi çeşitli konularda geliştirmelere ihtiyaç duyuluyor.

İki-Foton Görüntülemenin Sinir Ağı Analizlerindeki Önemi

Beynin karmaşık işlevsel yapısı ve sinir ağı dinamikleri bilim insanlarının üzerinde çok fazla araştırma yaptıkları konular arasında gösteriliyor. Sinir sisteminin nasıl çalıştığının anlaşılması canlı organizmadaki sinirsel ağ dinamiklerini analiz etme kabiliyetiyle orantılı. Dinamik beyin özellikleri makro ve mikro seviyelerde çeşitli tekniklerle başarılı bir şekilde ortaya konmuş olmasına rağmen araştırmacıların yüzlerce veya binlerce nörondan oluşan ve mikro devreler olarak adlandırılan

ölçekteki bilgi seviyesi yetersiz kalıyor. Bilim insanlarına bu konuda önemli imkânlar sunan iki-fotonlu görüntüleme ile canlı beyninden yüksek çözünürlüklü nöron ağı kayıtları yapılabiliyor. Böylece sinir devrelerinin temel işlevsel ilkelerinin daha iyi anlaşılması bekleniyor.

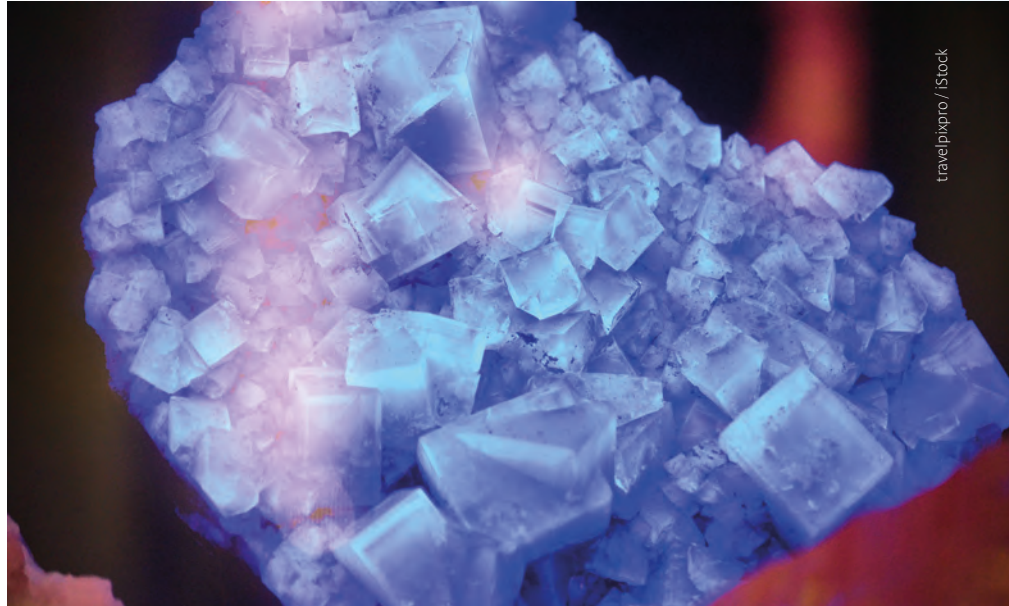
Mikro devre düzeyindeki nöron aktivitelerinin incelenmesi, temel süreçlerin anlaşılması ve davranışlarla ilişkisinin kurulması için çok önemli. Son yıllarda karmaşık sinirsel süreçlerin anlaşılması için fare gibi canlılarda görüntüleme sistemlerini kullanmak adına sinir bilimciler ve mühendisler ortak çalışmalar yürütüyor. Burada karşımıza "miniskop" olarak da adlandırılan küçültülmüş ışık mikroskobu sistemleri çıkıyor. Son yıllarda neredeyse parmak ucu kadar küçük boyutlara indirgenen taşınabilir

floresan mikroskopları ile serbest şekilde hareket eden memelilerin beyin aktiviteleri yakından incelenebiliyor.

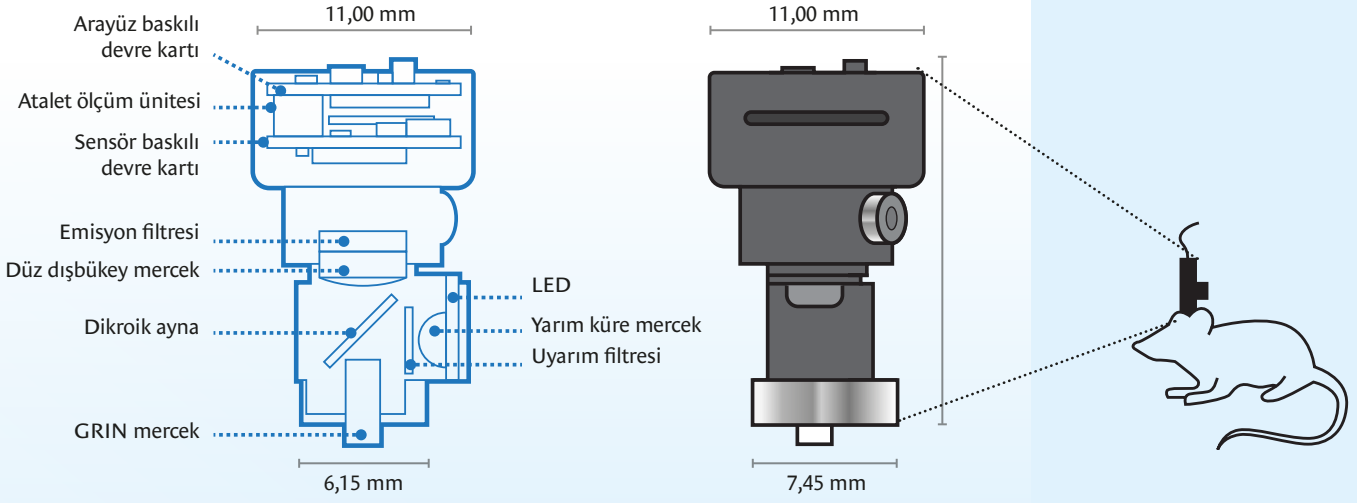
Bu Mikroskoplar Çok Minik ama Bir O Kadar da Maharetli

Kemirgen davranışlarını araştırmak için bu canlıların baş kısmına takılabilecek, hafif, yüksek hızlı tarama ve görüntüleme kapasitesine sahip, üç boyutlu görüntüleme yapabilen ve tüm bunları yaparken de canlının serbest hareketini kısıtlamayan miniskoplar geliştirilmesi için araştırmacılar son 20 yıldır yoğun şekilde çalışıyor.

Hâlihazırdaki son teknoloji miniskoplar ile aynı nöron



Ultraviyole ışık altındaki fluorit kristalleri



(Solda)-Küçük, hafif ve çok yönlü bir miniskop olan NINScope'un şematik gösterimi
(Sağda)-NINScope ile farelerde beyincik bölgesi görüntüleme çalışmaları

De Groot, A., Van den Boom, B.J.G. ve ark., "NINScope, a versatile miniskope for multi-region circuit investigations", *eLife*, 9:e49987, 2020.

kümesinin aktivitesi bir aydan daha uzun süreler boyunca takip edilebiliyor. Bu sayede öğrenme ve hafıza gibi uzun dönemli nörolojik süreçler ve hayvan davranış kontrol mekanizmaları hakkındaki soruların yanıtları bulunmaya çalışılıyor. Yeni gelişmelerle birlikte eski hantal ve ağır miniskoplar daha hafif ve taşınabilir versiyonlara dönüşürken, kablolu veri toplama ve sensör sistemleri gibi çevre birimleri de yerlerini kablosuz olanlara bırakıyor. Böylece serbest şekilde hareket eden birden fazla küçük canlı (örneğin farelerin) aynı anda uzun süreler boyunca nörolojik olarak görüntülenmesi mümkün olabiliyor.

İlk iki-foton miniskobunu 2001 yılında icat eden Alman bilim insanı Fritjof Helmchen, miniskopların gelişiminde öncü bir rol oynadı. Bir farenin kafasına takılabilen bu miniskop yaklaşık

25 gram ağırlığındaydı. Bundan sekiz yıl sonra serbest hareket eden canlılarda görüntüleme yapabilen 5,5 gram ağırlığında yeni bir miniskop geliştirildi. Cihaz aynı anda 20 nöronu izleyebilmesine rağmen fazla karmaşık bir sisteme sahip olması yüzünden beklenen ilgiyi görmedi.

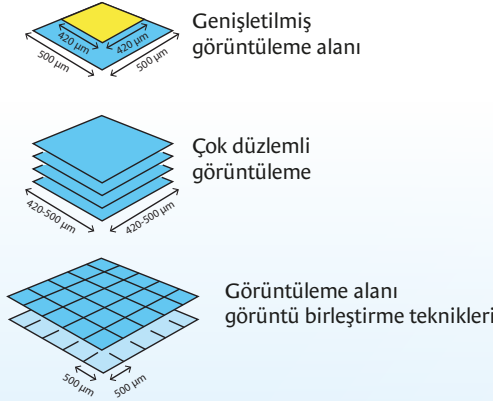
Hareketi kısıtlanmamış canlılardaki nöral sinyalleri izlemek için kullanılan önemli araçlar olan minyatür floresan mikroskopların bir kısmının açık kaynaklı olarak paylaşılması onları daha uygun maliyetli hâle getiriyor. Geliştirilen miniskopların büyük bir çoğunluğunun donanım ve yazılım bilgileri çoğu zaman açık kaynaklı olarak diğer araştırmacıların kullanımına sunuluyor. Örneğin bundan yaklaşık 10 yıl önce University of California, Los Angeles'da (UCLA) geliştirilen ve açık kaynaklı olarak

paylaşılan tek-foton miniskobu, yaklaşık 500 araştırma laboratuvarı tarafından araştırmalarda kullanılıyor.

Tek-foton miniskoplarının yeterli olmadığı durumlar için iki-fotonlu sistemler üzerine çalışmalar yapıldı. 2017 yılında Weijian Zong ve arkadaşları geliştirilen hızlı ve yüksek çözünürlüklü ilk miniskop sürümü oldukça başarılı bulunmasına rağmen geliştirilmesi gereken yönleri de bulunuyordu. Araştırmacılar miniskobun yeni versiyonlarında görüntüleme alanını artırmak, cihaz ağırlığını azaltmak ve aynı bölgedeki sinirsel aktiviteyi daha uzun süreler boyunca kaydetmek gibi çeşitli iyileştirmeleri gerçekleştirmeyi hedeflediler.

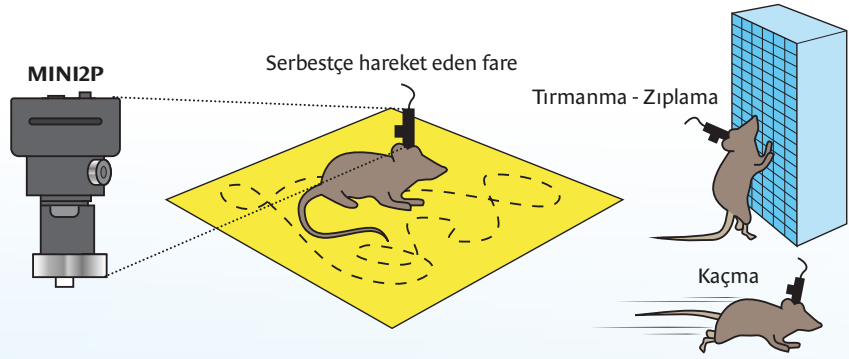
Son yıllarda yapılan önemli çalışmalardan birinde Hollanda Sinirbilim Enstitüsünden (NIN: Netherlands Institute for

Minyatür iki-foton mikroskobisi



Serbestçe hareket eden farelerde görüntüleme yapabilmek için geliştirilen iki-foton miniskobu olan MINI2P, aynı anda birden fazla düzlemdeki binden fazla hücrenin görüntülenmesine olanak sağlıyor.

Serbest hareket kabiliyeti



Zong, W. ve ark., "Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice", *Cell*, 185, 1240-1256, 2022.

Neuroscience) Andres de Groot ve arkadaşları tarafından oldukça hafif (1,6 g) bir miniskop geliştirildi. NINscope denilen bu miniskop ile farelerde ilk defa beyincik ve beyin zarı bölgelerinden eşzamanlı olarak hücresel çözünürlükte görüntüleme gerçekleştirildi. Böylece çoklu bölge sinürel aktivitelerini daha yakından incelemek mümkün hâle geldi.

En güncel miniskop çalışmalarından birisi de Norveç Bilim ve Teknoloji Üniversitesindeki Kavli Enstitüsü Sinirbilim Sistemleri Bölümünde ve Nöral Hesaplama Merkezinde araştırmacı olan optik mühendisi Weijian Zong ve arkadaşları tarafından yapıldı. Çalışmada serbest hareket edebilen farelerde anlık olarak 1.000'den fazla nöronun hızlı, yüksek çözünürlüklü ve çok düzlemlı görüntülemesi için MINI2P adı verilen iki-fotonlu mikroskop geliştirildi. Geliştirilen miniskop 2,4 gram ağırlığa sahip olup son derece esnek bağlantı kabloları içeriyordu. Böylece canlı hayvan koşarken,

tırmanırken ya da sıçarken kendisini hareket bakımından engellemeden ona ait binlerce nöronunun aktivitesi başarıyla izlendi ve beyninin görme, hafıza ve navigasyon merkezleri görüntüledi.

Genişletilmiş görüş alanı, artırılmış tarama aralığı ve hızının yanında mikro ayarlanabilir lense de sahip bir optik sistem tasarımı olan MINI2P, üç boyutlu fonksiyonel görüntüleme yapabiliyor; ayrıca birden fazla düzlemi de hızlı bir şekilde görüntüleyebiliyor. Araştırmacılar birden fazla bitişik görüş alanı arasında gerçekleştirilen görüntülemeler sayesinde aynı canlıda 10.000'den fazla nöronun kayıt yapmayı başardı.

Büyük boydaki muadillerine çözünürlük olarak büyük ölçüde yaklaşan MINI2P'nin yapımı için açık kaynaklı dokümanlar da ücretsiz olarak paylaşılıyor. Bununla birlikte yakın bir zamanda Kavli Enstitüsü ev sahipliğinde gerçekleştirilmesi

planlanan çalıştay ile araştırmacılar oldukça düşük maliyetlerle kendi iki-fotonlu miniskoplarını üretme fırsatı da bulacak.

Pek çok araştırmacı da daha üstün özelliklere sahip iki-foton miniskopları geliştirmeye çalışıyor. Öyle ki Kavli Enstitüsünden araştırmacıların MINI2P'yi bildirmesinden kısa bir süre sonra UCLA nöroloji profesörü Peyman Golshani ve araştırma ekibine iki-foton miniskopu geliştirmeleri için önemli miktarda fon ayrıldı. Geliştirilmesi planlanan miniskobun daha geniş bir görüntüleme alanına sahip olması, birden fazla beyin katmanını eş zamanlı görüntüleyebilmesi ve farelerle daha büyük canlılarda kolaylıkla kullanılabilmesi bekleniyor.

Optik, malzeme, veri toplama/işleme ve görüntüleme teknolojilerdeki gelişmeler ile birlikte miniskopların da kabiliyetleri sürekli artıyor. Özellikle sinir bilim,

araştırmalarında önemli keşiflere yol açması beklenen yeni nesil iki-fotonlu miniskoplar giderek daha fazla kullanılıyor. Her ne kadar iki-foton görüntülemenin temelleri yaklaşık yüz yıl öncesine dayansa da yeni nesil miniskopların döneminin daha uzun süreler boyunca devam etmesi bekleniyor.

Sonuç

İki-foton mikroskopisi, icadından sonra molekül incelenmesinden doku görüntülemesine kadar pek çok farklı alanda uygulama buldu. Biyolojik sistemleri canlı üzerinde çalışmanın önemi göz önüne alındığında, iki-foton görüntüleme teknolojilerindeki gelişmelerin akademik, klinik ve endüstriyel kullanımının daha da artacağı söylenebilir.

İki-foton mikroskopisi ile kalın örneklerdeki sıkı dokuların dinamik görüntülenmesi başarılı bir şekilde

gerçekleştirilebiliyor. Yeterli foton yoğunluğunu sağlamak üzere lazer kullanılarak gerçekleştirilen iki-foton uyarımı sayesinde fototoksosite engelleniyor. Çünkü fotonların verebileceği hasar sadece odak hacmiyle sınırlı kalıyor.

Konfokal mikroskoba kıyasla daha düşük çözünürlükte görüntüler elde edilse de kalın numunelerin derin görüntülenmesinin sağlanması, odak dışı soğurmanın olmaması ve uyarıcı ışığın saçılımının az olması iki-foton görüntülemenin önemli artıları arasında sayılabilir. Diğer yandan, nüfuz edilen derinliğin optimizasyonu için saçılan floresan fotonlarının verimli bir şekilde toplanması gerekiyor. Gelecekte lazerler, dedektör ve görüntüleme teknolojilerindeki ilerlemelere bağlı olarak iki-foton mikroskopunun uygulama alanı yelpazesinin daha da genişlemesi bekleniyor.

Son yıllarda parmak ucu kadar boyutlara küçültülen son teknoloji iki-foton miniskoplarının görüntüleme kapasiteleri, görece oldukça büyük iki-foton mikroskopları ile yarışır hâle geldi. Fare gibi canlıların kafasına kolaylıkla takılabilen bu mini cihazlar ile serbest şekilde hareket eden canlılarda uzun süreli yüksek çözünürlüklü nörolojik araştırmalar başarılı bir şekilde gerçekleştiriliyor.

Sonuç olarak teknolojik gelişmeler ve maliyet düşüşlerine bağlı olarak günden güne daha da popülerleşen çoklu foton görüntüleme teknikleri sayesinde daha önce mümkün olmayan araştırmaların yapılması ve dinamik verilerin toplanması mümkün hâle geliyor. Tüm bu gelişmeler ışığında heyecan verici pek çok keşif bilim insanları tarafından gerçekleştirilmeyi bekliyor. ■

Kaynaklar

- So, P.T.C., Dong, C.Y. ve ark., “Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy”, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 02:399-429, 2000.
- Benninger, R.K., Piston, D.W., “Two-Photon Excitation Microscopy for the Study of Living Cells and Tissues”, *Current Protocols in Cell Biology*, 59:4.11.1-4.11.24, 2013.
- Lütcke, H. ve Helmchen, F., “Two-photon imaging and analysis of neural network dynamics”, *Report on Progress in Physics*, 74, 086602, 2011.
- Barbera, G., Liang, B. ve ark., “A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice”, *Journal of Neuroscience Methods*, 323, 56-60, 2019.
- De Groot, A., Van den Boom, B.J.G. ve ark., “NINscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations”, *eLife*, 9:e49987, 2020.
- Zong, W., Obenhaus, H.A. ve ark., “Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice”, *Cell*, 185, 1240-1256, 2022.
- Landhuis, E., “Honey, I Shrunk The Microscope”, *Nature*, 610, 2022.
- So, P.T.C., “Two-photon Fluorescence Light Microscopy”, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002.
- Lecoq, J., Orlova, N. ve Grewe, B.F., “Wide. Fast. Deep: Recent Advances in Multiphoton Microscopy of In Vivo Neuronal Activity”, *The Journal of Neuroscience*, 39(46): 9042-9052, 2019.
- Mizuta, Y., “Advances in Two-Photon Imaging in Plants”, *Plant and Cell Physiology*, 62(8): 1224-1230, 2021.
- Helmchen, F., Denk, W., “Deep tissue two-photon microscopy”, *Nature Methods*, 2, 12, 2005.
- Cahalan, M.D., Parker, I., Wei, S.H., Miller, M.J., “Two-Photon Tissue Imaging: Seeing the Immune System in a Fresh Light”, *Nature Reviews, Immunology*, 2, 872-880, 2002.
- Kaiser, W., Garrettt, C.G.B., “Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺”, *Physical Review Letters*, 7(6), 229-231, 1961.
- Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W., “Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy”, *Science*, 248, 4951, 73-76, 1990.
- <https://www.microscopyu.com/techniques/multi-photon/multiphoton-microscopy>