Dalla cellula alle forme macroscopiche: microscopia “light sheet” a basso impatto ambientale.

Le moderne tecniche di microscopia "light sheet" associate all’elaborazione e analisi d’immagine tridimensionale con supporti informatici ad alta potenza di calcolo, consentono la visualizzazione di strutture microscopiche a partire da un intero organo o addirittura un intero roditore da laboratorio. Questo è reso possibile da procedure di preparazione del campione che lo rendono trasparente alla luce laser ("chiarificazione”). I metodi pubblicati prevedono l’impiego di solventi organici altamente tossici, in ambienti protetti sia nella fase di chiarificazione che di visualizzazione del campione, e lo smaltimento dei reagenti residui come rifiuti speciali. IRET, in collaborazione con Miltenyi Biotec, ha sviluppato un workflow completo utilizzando prodotti Miltenyi atossici, ad oggi ottimizzato per la visualizzazione e quantificazione mediante analisi d’immagine "voxel-based" dell’intero sistema vascolare cerebrale e delle strutture assoniche in cervello e midollo spinale.

Laboratorio	IRET
Area di specializzazione	Salute e Benessere
Referenti	Laura Calzà
Keyword	Microscopia “light sheet”, Microscopia 3D, Microcircolo

"Microscopia 3D: dalla cellula alla struttura macroscopica"



Fig. 1: Fondazione IRET, soggetto gestore del Tecnopolo di Bologna sede di Ozzano dell’Emilia “Rita Levi-Montalcini”

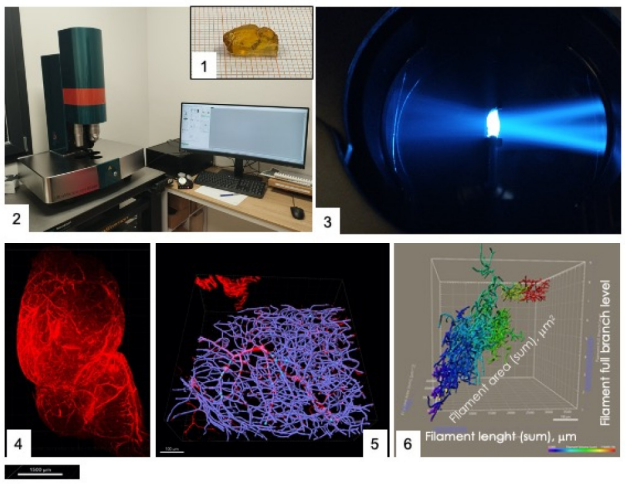


Fig. 2: Flowchart di lavoro per la visualizzazione tridimensionale di campioni grandi di tessuto. 1. chiarificazione; 2-3. acquisizione; 4. visualizzazione; 5. image post processing; 6. quantificazione

Descrizione

Il workflow sviluppato comprende la procedura di preparazione dei campioni ad oggi ottimizzata per cervello e midollo spinale attraverso una procedura di chiarificazione che utilizza il "MACS® Clearing Kit" di Miltenyi Biotec, e che può essere eseguita in ambiente di laboratorio convenzionale con alcuni passaggi sotto normale cappa chimica. L'osservazione del campione immerso nella "MACS® Imaging Solution" di Miltenyi Biotec, eseguita mediante UltraMicroscope Blaze™, è anch'essa condotta in ambiente convenzionale. UltraMicroscope Blaze™ è dotato di obiettivi 1×, 4× e 12×, con "magnification lenses" fino ad un massimo di 36×, consentendo l'acquisizione a diversi livelli di risoluzione cellulare e subcellulare (0,5 µm). Le immagini acquisite (dataset) dal Blaze, hanno dimensioni nell'ordine dei giga/tera byte e la gestione è garantita da una workstation dedicata. La tappa finale della procedura prevede l'utilizzo di un software di analisi d'immagine basato sui voxel costitutivi l'immagine stessa, consentendo procedure di quantificazione delle immagini (anche assistite da algoritmi di machine learning/AI) a partire dall'intensità di fluorescenza.

Aspetti innovativi

Questa microscopia, quando ottimizzata, consente la visualizzazione e l'analisi di campioni macroscopici con risoluzione cellulare. Non solo offre una visione tridimensionale dell'organizzazione istologica di organi e tessuti di particolare impatto visivo ma ne consente la valutazione quantitativa. Può essere utilizzata per visualizzare segnali fluorescenti endogeni (es. fluorescence genetically encoded proteins) ma anche con anticorpi singoli o in combinazione.
La tecnologia Light Sheet "UltraMicroscope Blaze", può essere utilizzata sia per ricerca di base che per ricerca traslazionale. Consente dunque, l'analisi robusta e ripetibile di campioni sani e patologici, e il suo impiego risulta promettente anche nell'indagine di efficacia di terapie farmacologiche e non.
Comparativamente alle tecniche microscopiche 2D, consente una più rapida analisi di tutte le aree di interesse all'interno dell'organo analizzato.
Rispetto alle tecniche di chiarificazione correntemente impiegate (iDISCO, 3DISCO, etc) il workflow utilizzato si avvale di solventi non tossici quindi pienamente in linea con il principio DNSH (*Do No Significant Harm*) introdotto dal Regolamento UE 852/2020.

Applicazioni

Le applicazioni sviluppate ad oggi riguardano:
1. Studio del letto vascolare cerebrale, visualizzabile sia con somministrazione di traccianti quali il destrano-FITC, sia attraverso l'uso di anticorpi per target endoteliali (CD31). La contemporanea visualizzazione di destrano-FITC e CD31 consente l'*imaging* e la quantificazione dell'intero sistema circolatorio, di arterie e vene fino ai capillari più piccoli (diametro 3-4 µm);
2. Studio dei pathways cerebrali e spinali, mediante anticorpo *anti-neurofilament* (NF) per studio in modelli di lesione (es. lesione contusiva del midollo spinale).

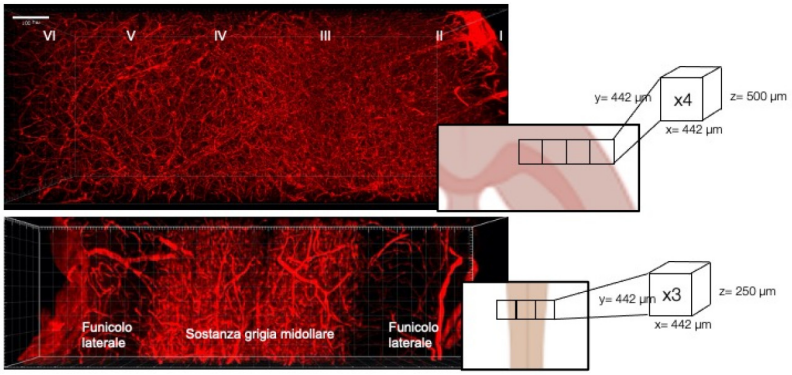


Fig. 3: Visualizzazione di CD31 in "whole hemibrain and spinal cord" di topo. Gli schemi a destra riportano la strategia di campionamento e le dimensioni dell'immagine 3D finale.

Partner coinvolti	Miltenyi Biotec S.r.l., Italia
Tempi di realizzazione	Per ottimizzazione del workflow per anticorpo:60gg
Livello di maturità tecnologica	TRL 9 - sistema reale testato in ambiente operativo
Valorizzazione applicazione	IRET, soggetto gestore del Tecnopolo di Bologna-Ozzano, insieme a Miltenyi Biotec, ha organizzato nel corso del 2023, tre eventi "*Blazing Days*", giornate di presentazione del *workflow* completo (prodotti e strumento). L'ultimo evento (nov. 2023) è stato destinato alle vincitrici del *Creative BraYns award*, organizzato da *BraYn Association*.

Esempio di applicazione

Il workflow presentato può essere applicato a:

• studi di base per una migliore comprensione dell'organizzazione istologica di organi e tessuti

• ricerca traslazionale per lo studio di alterazioni strutturali in modelli animali

• ricerca farmacologica per lo studio di efficacia di trattamenti innovativi

• sviluppo di nuovi algoritmi per l'analisi tridimensionale di immagini

Alterazioni strutturali e funzionali del microcircolo sono riconosciute essere un fattore patogenetico primario in molte patologie degenerative. La procedura illustrata è stata applicata allo studio del microcircolo in modelli murini di malattia di Alzheimer con l'obiettivo di definirne l'evoluzione temporale, dalla fase asintomatica alla fase conclamata di malattia definita dalla presenza delle alterazioni istopatologiche caratteristiche (placche amiloidi) e dal difetto cognitivo (apprendimento e memoria).
Sono state analizzate le diverse aree cerebrali, definendo una mappa tridimensionale comprensiva delle diverse aree corticali, diverse regioni ippocampali e cervelletto. Tale mappa rappresenta la base per la sovrapposizione di immagini istologiche ma anche derivate da *spatial transcriptomic* consentendo quindi una correlazione fra microcircolo in volumi tissutali ed espressione di geni di interesse. I risultati saranno oggetto di pubblicazione scientifica su rivista internazionale.

IRET

FONDAZIONE IRET - L'OCCHIO DELLA CONOSCENZA SUL CERVELLO - ETS



La Fondazione IRET ETS è un ente di ricerca scientifica in campo biomedico, dedicata allo studio delle malattie "senza cura" quali le degenerative e le lesioni del sistema nervoso centrale (sclerosi multipla, demenza di Alzheimer, demenze vascolari, atassie, malattia di Parkinson, lesioni traumatiche e lesioni vascolari di cervello e midollo spinale, dolore cronico). Svolge ricerca nei settori della neurologia, malattie rare e dismetaboliche, medicina rigenerativa, drug discovery, development e screening, terapie avanzate, ingegneria tissutale.
IRET dispone di una vasta esperienza nella modellistica *in vitro* (linee cellulari, cellule primarie e cellule staminali coltivate con tecniche 2D e 3D) e *in vivo* (animali transgenici, lesioni indotte chirurgiche, chimiche, immunologiche). La ricerca svolta ha lo scopo di individuare strategie innovative per contrastare il progredire di malattie, ripararne i danni, individuare le cause per prevenire la loro insorgenza. Dispone di una vasta facility per la sperimentazione animale (ratti e topi), provvista di sala operatoria e laboratori per lo studio di comportamenti complessi; laboratori di colture cellulari, di biologia molecolare, di proteomica. Dispone di una importante facility di microscopia avanzata e analisi computerizzata di immagini in 2D, 3D, 4D.
La Fondazione IRET ha siglato accordi di collaborazione alla ricerca con diversi dipartimenti dell'Università di Bologna e Ferrara e con aziende ospedaliere della Regione. IRET è inoltre convenzionata con il Montecatone Rehabilitation Institute di Imola e con l'Istituto ISMETT/Fondazione Ri.MED di Palermo.
La Fondazione IRET è la sede di Ozzano dell'Emilia del Tecnopolo di Bologna intitolata a Rita Levi-Montalcini.

Sito web	https://iret-foundation.org/home/
Direttore	Luciana Giardino
Data pubblicazione	12/12/2023