

Temperatuursveranderingen in rat hersenen tijdens optogenetische experimenten

Hannelore Verhoeven, Lies de Ceuninck²

Abstract

Keywords

Keyword1 — Keyword2 — Keyword3

¹Fysica Departement, Katholieke Universiteit Leuven

Contents

1 Inleiding	1
1.1 Optogenetica	1
1.2 De levering van straling naar het brein	2
1.3 Interactie van weefsel met straling	3
2 Theoretische achtergrond	3
2.1 De bioheat vergelijking	5
2.2 Oplossing van de bioheat vergelijking	5
2.3 Continue stimulatie	5
2.4 Gepulste stimulatie	5
3 Methode	6
References	8

1. Inleiding

Neurowetenschap houdt zich bezig met de werking van het zenuwstelsel. Momenteel is er over de hele wereld veel onderzoek op de hersenen en begrijpt men elk jaar meer over de werking van het menselijk brein. Vaak gebruikte proefdieren voor neurologische proeven zijn apen, ratten, muizen, vissen, ... In dit onderzoek specificeren we ons op het rattenbrein.

Om de werking van het hersenen te begrijpen is een eerste grote en noodzakelijke stap het controleren van de activiteit van de hersencellen, *neuronen*. Neuronen zijn cellen die voortdurend signalen ontvangen en versturen door ons hele lichaam. Wanneer de activiteit kan gehintereerd worden of een neuron kan gestimuleerd worden om signalen te sturen kan de functie van die cel achterhaald worden. Bijvoorbeeld, wanneer een neuron gehintereerd wordt tijdens een test waarbij het proefdier moet onthouden waar een beloning ligt, en hij achteraf niet meer weet waar de beloning lag, kan worden afgeleid dat deze cel verantwoordelijk is voor ruimtelijke oriëntatie. Activiteit controle van de hersencellen is dus essentieel

in neurologisch onderzoek en er zijn dan ook heel wat technieken voor ontwikkeld.

Een eerste mogelijkheid is elektrische stimulatie van de neuronen met elektroden. Omdat de signalen tussen neuronen van elektrische aard zijn is dit een logische techniek. Een tweede mogelijkheid is het gebruik van elektromagnetische straling om neuronen te activeren of inhiberen. Hierbij worden de neuronen genetisch gemanipuleerd zodat ze lichtgevoelig worden, *Optogenetica*. Helaas interageert elektromagnetische straling met weefsels en kan het dus nog andere reacties induceren ¹. Een belangrijk effect is de temperatuursopwarming en dat is het onderwerp van dit onderzoek.

1.1 Optogenetica

Eerder werd al gezegd dat de signalen tussen neuronen van elektrische aard waren. Hoe werkt dit nu precies? Neuronen hebben net zoals alle andere cellen in ons lichaam een plasmamembraan die de scheiding vormt tussen het intercellulair en extracellulair medium. Dit bestaat uit een dubbellaag van fosfolipiden en membraanproteïnen, zie figuur 1. Deze laatste functioneren als doorgangskanalen voor moleculen en zijn dan ook verantwoordelijk voor de communicatie van cellen onder elkaar. Een belangrijke soort van membraanproteïnen zijn ionenkanalen die specifiek ionen transporteren. Door dit transport ontstaat er een potentiaal over het plasmamembraan. Een cel in rust heeft een membraanpotentiaal van ongeveer $-70mV$.

Om een signaal te sturen moet de membraanpotentiaal omhoog. Dit kan door positieve ionen in de cel te transporteren. Dit gebeurt eerst traag tot een bepaalde *threshold* potentiaal ($\approx 40 - 55mV$) bereikt wordt. Op dat moment openen de ionenkanalen volledig en stijgt de membraanpotentiaal exponentieel. Dit neuron signaal wordt een actie potentiaal genoemd. Belangrijk om op te merken is dat de actie potentiaal automatisch

¹zie paragraaf 1.3

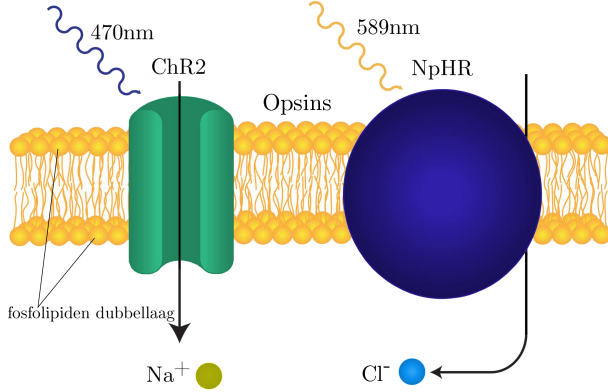


Figure 1. Schematische weergave van een plasmamembraan met lichtgevoelige ionenkanalen of opsins (membraanproteïnen). ChR2 is een veelgebruikt voorbeeld van een Na^+ kanaal en NpHR van een Cl^- kanaal. De eerste werkt optimaal bij stimulatie van 470nm en de tweede bij 560nm.

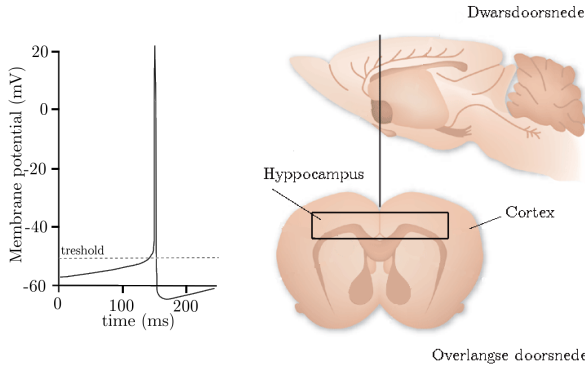


Figure 2. (a) Een opname van een actiepotentiaal in een neocorticale neuron uit een rat brein [?]. De rust membraan potentiaal ligt daar iets hoger $\approx 68mV$ [?]. (b) De anatomie van een ratten brein [?].

gegenereerd wordt eens de thresholdpotentiaal bereikt is. Om de celactiviteit te inhiberen kan het omgekeerde gebeuren; de membraanpotentiaal naar beneden brengen door negatieve ionen te transporteren en het bereiken van de thresholdpotentiaal bemoeilijken. Het controleren van neuron activiteit is dus hetzelfde als het controleren van de activiteit van de ionenkanalen in de cel.

Veel microorganismen zijn prachtig geëvolueerd naar organismen die licht kunnen oogsten. Licht gevoelige proteïnen absorberen de straling en gebruiken de energie om de membraanpotentialen te onderhouden of om een geschikte levensomgevingen te identificeren [?]. Een belangrijke soort van deze lichtgevoelige proteïnen, *Opsins*, zijn transmembrane rodopsines. Ze zorgen voor het transport van ionen over het plasmamembraan en doen dit na stimulatie met elektromagnetische straling van een specifieke golflengte (zie figuur 1). Ook hebben ze zeer snelle kinetische eigenschappen en worden ze gecodeerd door slechts één gen. Dat maakt ze zeer inter-

essant voor gebruik in optogenetische experimenten.

De laatste jaren is veel vooruitgang gemaakt in de genetica en kan men cellen genetisch modificeren. Dit betekent dat de opsins tot expressie gebracht kunnen worden in geïnfecteerde cellen. Wanneer deze cellen nu met licht van de juiste golflengte bestraald worden zullen de opsins ionen transporteren en kan de activiteit van de neuronen beïnvloedt worden. Met behulp van fluorescentie technieken is precies te achterhalen welke neuronen geactiveerd of gehinhibeerd zijn en kan de functie van de neuronen bestudeerd worden.

1.2 De levering van straling naar het brein

Om het brein te stimuleren met elektromagnetische straling gebruikt men vaak optische vezels. Dit zijn draden bestaande uit twee delen met verschillende brekingsindex; een kern en een mantel. Door het verschil in brekingsindex wordt elektromagnetische straling in de kern intern gereflecteerd tegen de mantel en kan een optische vezel licht begeleiden [?]. De brekingsindex van een materiaal is gedefinieerd als de verhouding van de sinussen van de hoek θ_1 van inval en de brekingshoek θ_2 wanneer licht vanuit het vacuum invalt.

$$n = \frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2}$$

De reflectie aan het scheidingsvlak wordt beschreven door de wet van Snell.

$$n_1 \sin\phi_1 = n_2 \sin\phi_2$$

hierin is ϕ_1 de invallende hoek en ϕ_2 de brekingshoek. Totale interne reflectie treedt op wanneer de invallende hoek groter wordt dan de kritische hoek ϕ_{krit} .

$$\phi_{krit} = \frac{n_1}{n_2}$$

Dit is het basisprincipe waarop de werking van een optische vezel steunt (zie figuur). Een belangrijke eigenschap van een optische vezel is de numerieke apertuur NA.

$$NA = n_0 \cdot \sin\alpha = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (1)$$

α is de spreidingshoek van de uitgaande straling in vacuum/lucht (zie figuur). Ook wordt een onderscheidt gemaakt tussen *multi-mode* en *single-mode* vezels (zie figuur). Een vezel met een kleinere kerndiameter d , en bijgevolg ook kleinere numerieke apertuur NA, kan slechts één lichtstraal of mode² begeleiden. De diameter is dan meestal gelijkaardig aan de golflengte van de straling. Een multi-mode vezel heeft een grotere diameter d en numerieke apertuur NA zodat meerdere modes tegelijk begeleid kunnen worden. Beide vezels worden gebruikt in optogenetische experimenten.

²lichte mode refereert naar een oplossing van de Maxwell vergelijkingen

1.3 Interactie van weefsel met straling

Er zijn verschillende soorten interacties van straling met weefsel die kunnen voorkomen afhankelijk van de energie, intensiteit en blootstellingsperiode van de straling. De moleculen in het weefsel absorberen de fotonen en de mogelijke effecten worden opgedeeld in vijf categorieën^[?] (zie figuur 3). De combinatie van zeer hoge intensiteit en korte blootstellings tijd (hoge irradiantie) zorgt voor volledige ionisatie van de moleculen, wat resulteert in een kettingreactie en plasmavorming. Langere blootstellingstijd zorgt dan voor de mechanische effecten die samen gaan met plasmavorming zoals schokgolven, bubbel vorming, . . . Ze worden gegroepeerd onder de naam fotodisruptie. Dit maakt het weefsel kapot vind dus een toepassing in de geneeskunde voor bijvoorbeeld het verwijderen van nierstenen. Bij lagere irradianties worden de elektronen geëxiteerd. Foto-ablatie (zie figuur 3) zorgt voor dissociatie van de moleculen. De elektronen absorberen hoog energetische fotonen en verplaatsen van een bindende naar een niet bindende orbitaal. Elektronen van moleculen kunnen ook verplaatsen van een bindend orbitaal naar een ander bindend orbitaal (op een hoger energie niveau). Een geëxiteerd molecule zal andere chemische bindingen ondergaan, vaak met apoptose (geprogrammeerde celdood) tot gevolg. Deze fotochemische reacties treden op bij lage irradiantie en lange blootstellings tijd. Wanneer de moleculen de energie van de fotonen absorberen³, wordt deze omgezet in warmte via moleculaire vibraties en botsingen.

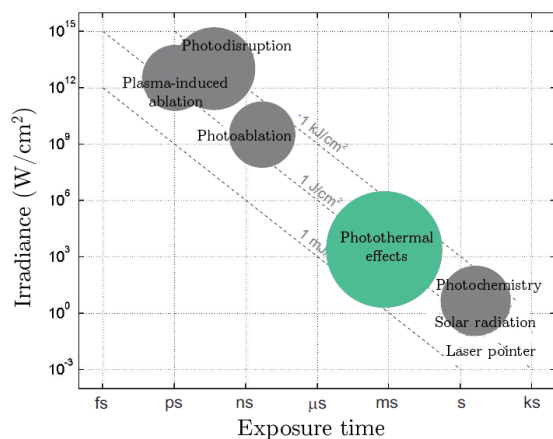


Figure 3. Caption here

De drempel irradiantie nodig voor opsin activatie in optogenetische experimenten varieert van opsin tot opsin, ongeveer $\geq 1 \frac{mW}{mm^2}$, en de nodige blootstellingstijd is in de milliseconde range. Uit figuur 3 blijkt dus dat bij optogenetische experimenten vooral *fotothermische* effecten zullen optreden. De schade aan het weefsel hangt af van de temperatuursstijging en de duur van

Table 1. Temperatuureffecten in weefsel

T (°C)	Effect
≈ 37	Normale lichaamstemperatuur
≈ 38	denaturatie van proteïnen (reversibel)
≈ 41	denaturatie van proteïnen (irreversibel)
≈ 45	weefsel coagulatie met bloedklonter vorming

de opwarming. Tabel 1 geeft een overzicht. Over vanaf wanneer er precies onomkeerbare schade optreedt is wat discussie. Sommige zeggen al vanaf $0.5^\circ C$, andere pas vanaf $1.5^\circ C$. In ieder geval denatureren proteïnen al zeer snel, maar het lichaam is daar tot op zeker hoogte tegen beschermd. In het cytoplasma van de cel zijn er de zogenaamde *Chaperonne-eiwitten*. Deze helpen bij de opvouwing van de proteïnen en houden de proteïnen in vorm tijdens stress situaties zoals een te hoge temperatuur. Chaperonne proteïnen die voornamelijk de tweede functie hebben worden ookwel *stress proteïnen* of *heat-shock proteins* (Hsps) genoemd^[?]. Vanaf echter $41^\circ C$ is dit mechanisme niet meer voldoende en zal permanente denaturatie optreden. Hogere temperatuursstijgingen geven aanleiding tot afbraak van het weefsel.

Het is duidelijk dat significante temperatuursstijgingen in de hersenen door elektromagnetische straling vermeden moeten worden. Daarom is het belangrijk om een duidelijk model op te stellen voor de temperatuursstijging in het weefsel en dit voor verschillende stimulatie protocols; energie, intensiteit, puls frequentie, . . . van de laserbeam.

2. Theoretische achtergrond

³licht absorberende moleculen noemt men chromoforen

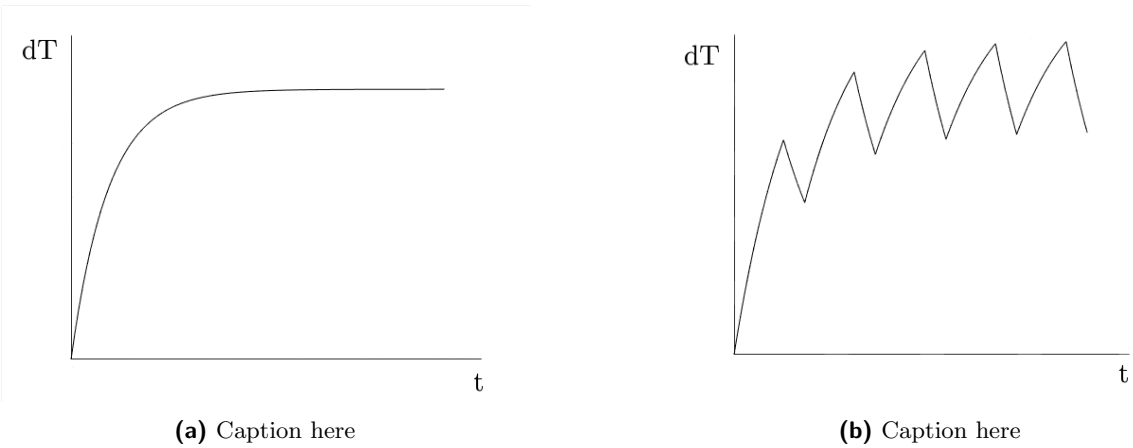


Figure 4. two subfigures

2.1 De bioheat vergelijking

De temperatuurstijging in hersenweefsel kan bepaald worden met behulp van de bioheat vergelijking:

$$\frac{\partial \Delta T(t, z, r)}{\partial t} = \frac{\mu_a \phi(z, r)}{\rho c} + \frac{k}{\rho c} \left[\frac{\partial^2 \Delta T}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 \Delta T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \Delta T}{\partial r} \right] \quad (2)$$

Met ΔT de temperatuurstijging, μ_a de absorptiecoëfficiënt van het weefsel [m^{-1}], k de thermische geleidbaarheid [$W m^{-1} \circ C^{-1}$], ρ de dichtheid van het weefsel [$kg m^{-3}$], c de warmtecapaciteit [$J kg^{-1} \circ C^{-1}$] en $\phi(z, r)$ de fluence rate van het laserlicht [$W m^{-2}$]. Al deze parameters zijn gekend van voorgaande experimenten, behalve de fluence rate. Deze laatste zal berekend worden met behulp van een Monte Carlo methode, zie sectie ??.

Het rechterlid van de bioheat vergelijking bestaat uit twee delen. Het eerste deel stelt de temperatuurstijging voor in het weefsel ten gevolge van absorptie van fotonen. Het tweede deel van het rechterlid toont de temperatuurdaling door warmtegeleiding.

2.2 Oplossing van de bioheat vergelijking

De bioheat vergelijking werd opgelost door Martin J.C. van Gemert met de methode van scheiding van variabelen. De oplossing wordt gegeven door:

$$\Delta T(t, z, r) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}). \quad (3)$$

Hierbij werd een tijdsconstante τ ingevoerd, deze geeft een maat voor hoe snel de temperatuur in het weefsel zal stijgen ten gevolge van interactie met elektromagnetische straling.

$$\tau = \left(\frac{1}{\tau_z} + \frac{1}{\tau_r} \right)^{-1} \quad (4)$$

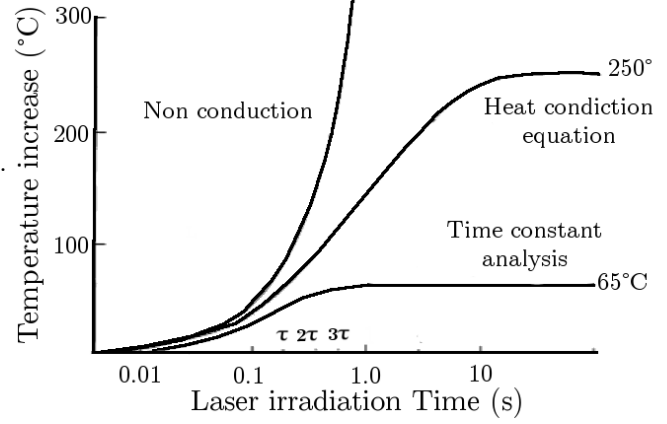
Met τ_z de axiale en τ_r de radiale component van τ .

$$\frac{1}{\tau_z} = \frac{k}{\rho c} \left(\frac{\pi(\mu_a + (1-g)\mu_s)}{4} \right)^2 \quad (5)$$

$$\frac{1}{\tau_r} = \frac{k}{\rho c} \left(\frac{2.4}{w_L} \right)^2 \quad (6)$$

Men kan zien dat de axiale component van τ bepaald wordt door weefselparameters (μ_a , g en μ_s) en de radiale component door de gebruikte optische vezel (w_L is de straal van de vezel).

Bij het opstellen van oplossing (3) werden een aantal benaderingen gemaakt, zodat een analytische oplossing mogelijk was. Dit werd gedaan omdat een analytische oplossing meer inzicht geeft in het probleem dan een numerieke oplossing. Deze benaderingen hebben wel tot



$w_L = 0.5 \text{ mm}$
 $t_0 = 0.5 \text{ mm}$
 $z_0 = 0.462 \text{ mm}$
 $g = 0.91$
 $\mu_a = 0.6 \text{ mm}^{-1}$
 $\mu_s = 41.4 \text{ mm}^{-1}$

gevolg dat de oplossing niet meer exact is. In figuur ?? wordt de oplossing gevonden door tijdsconstante analyse (3) vergeleken met een exacte numerieke oplossing en een oplossing die uitgaat van geen warmtegeleiding. Men ziet dat de temperatuur voor de oplossing zonder warmtegeleiding naar oneindig gaat, wat logisch is aangezien geleiding de temperatuur laat afnemen. Geen warmtegeleiding zorgt ervoor dat de temperatuur onbeperkt kan toenemen. Bovendien is te zien dat de oplossing met tijdsconstanten slecht voor een korte tijdsduur overeenkomt met de exacte numerieke oplossing. Vanaf een tijdsduur van langer dan ongeveer drie keer de tijdsconstante, wijkt oplossing (3) te sterk af van de exacte oplossing. De rede hiervoor is dat τ eigenlijk temperatuur afhankelijk is omdat de absorptiecoëfficiënt en de brekingscoëfficiënt afhankelijk zijn van de temperatuur. Hierdoor zal de benaderende oplossing slechts bruikbaar zijn voor laserstimulaties korter dan 3τ .

Vergelijking (3) kan nu gebruikt worden om de temperatuurstijging te meten in hersenweefsel door continue en gepulste laserstimulatie.

2.3 Continue stimulatie

Voor de continue stimulatie wordt verwacht dat de temperatuur in het begin snel stijgt en dat er na een bepaalde tijd saturatie optreedt, zoals te zien is op figuur 5a. Dit komt omdat er enerzijds opwarming zal zijn door absorptie, maar anderzijds ook afkoeling door warmtegeleiding. In het begin zal de absorptie groter zijn dan de geleiding, waardoor de temperatuur sterk stijgt. Na een tijd echter zal de geleiding steeds groter worden, tot ze even groot is als de absorptie en er saturatie optreedt.

2.4 Gepulste stimulatie

Om de fysiologische omstandigheden in de neuronen zo goed mogelijk te benaderen, wordt vaak gebruik gemaakt van gepulste stimulatie. Tijdens een puls verwacht men een exponentiele stijging van de temperatuur zoals bij de continue stimulatie. Tussen twee pulsen zal de temperatuur exponentieel dalen, met dezelfde tijdsconstante als

dat de temperatuur steeg. Wanneer er nu een volgende puls start zal de temperatuurstijging ten gevolge van de vorige puls nog niet helemaal naar nul gezakt zijn, deze zal er dus bij opgeteld moeten worden. Bij de puls die daarop volgt moet dan de temperatuurstijging van de twee vorige pulsen meegeteld worden. De temperatuurstijging tijdens een puls kan dus telkens geschreven worden als een som van een stijgende functie en allemaal dalende functies ten gevolge van de voorgaande pulsen. De temperatuurstijging tussen twee pulsen is dan een som van enkel dalende functies.

$$\Delta T(t) = \begin{cases} \Delta T_s(t) & \text{voor } 0 < t < t_L \\ \Delta T_d(t - t_L) & \text{voor } t_L < t < F \\ \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_s(t - F) & \text{voor } F < t < F + t_L \\ \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_d(t - F - t_L) & \text{voor } F + t_L < t < 2F \\ \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_d(t - F - t_L) + \Delta T_s(t - 2F) & \text{voor } 2F < t < 2F + t_L \\ \dots & \dots \end{cases} \quad (7)$$

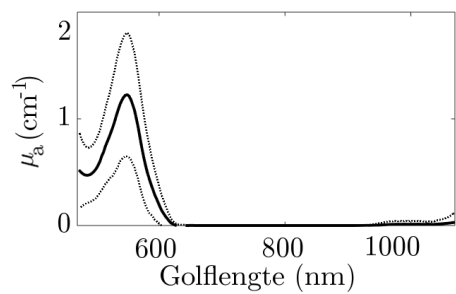
Waarbij t_L de lengte van een puls is, F de tijd tussen twee pulsen en $T_s(t)$ en $T_d(t)$ stijgende en dalende exponentiele functies zijn, respectievelijk gegeven door:

$$\Delta T_s(t) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (8)$$

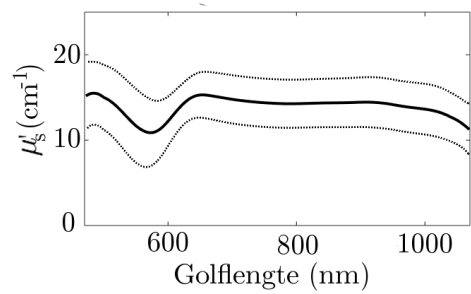
$$\Delta T_d(t) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t_L}{\tau}}) e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

Bij de gepulste stimulatie kan er op twee manieren saturatie optreden. Enerzijds zal er, wanneer een puls lang genoeg duurt, saturatie optreden binnen in een puls, net zoals bij de continue stimulatie. Anderzijds zal na een bepaalde tijd de bijdrage van de eerste puls naar nul gezakt zijn. Bij de daarop volgende puls zal ook de bijdrage van de tweede puls niet meer relevant zijn. Vanaf dat moment zal er dus telkens een gelijk aantal dalende functies zijn die een niet-triviale bijdrage leveren, waardoor de daaropvolgende pieken telkens even hoog zullen zijn. Dit is duidelijk te zien op figuur 5b. Men kan zien dat de vierde en de vijfde piek even hoog zijn, dit komt omdat de bijdrage van de eerste puls bij de vierde piek reeds naar nul gezakt is.

3. Methode



(a) Caption here



(b) Caption here

Figure 5. two subfigures

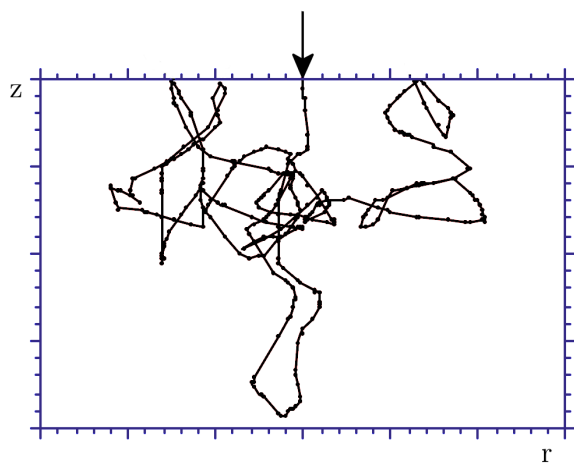


Figure 6. Caption here

References