

lek. Paweł Matryba

**Opracowanie roztworu optycznie oczyszczającego
i rozszerzającego tkanki, służącego do precyzyjnej akwizycji
i segmentacji danych pochodzących z mikroskopii
fluorescencyjnej**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Jakub Gołąb

Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

Słowa kluczowe: optyczne oczyszczanie tkanek, mikroskopia oparta na rozszerzeniu, mikroskopia fluorescencyjna, immunohistochemia, węzły limfatyczne, ISEE.

Key words: tissue optical clearing, expansion microscopy, fluorescence microscopy, immunohistochemistry, lymph nodes, ISEE.

Dedykacje

Pragnę przede wszystkim podziękować mojemu promotorowi, Panu Profesorowi Jakubowi Gołąbowi za błyskotliwe, merytoryczne rady, zagwarantowanie wybitnych warunków do prowadzenia badań oraz całokształt 6 owocnych lat współpracy.

Chciałbym również serdecznie podziękować naukowcom Zakładu Immunologii WUM oraz Instytutu Biologii Doświadczalnej za stymulowanie naukowego rozwoju i życzliwość, a w szczególności:

Panu Profesorowi Leszkowi Kaczmarkowi – za wprowadzenie w świat nauki i unikatowy styl mentoringu,

Marzenie Stefaniuk – za wzięcie pod skrzydła kogoś skrajnie nieopierzonego,

Arturowi Wolnemu – za wspólne analizy, humor i pokazanie innych wartości w życiu,

a także Kacprowi Łukasiewiczowi i Łukaszowi Bożyckiemu – za to, że zawsze mogłem na nich liczyć.

Dziękuję mojej Rodzinie i przyjaciołom, a w szczególności Mysi (i Dyziowi) za pełne zrozumienie, wsparcie i wiarę wtedy, gdy nawet ja ją traciłem.

Feci, quod potui, faciant meliora potentes

Spis treści

Dedykacje.....	3
Spis rycin.....	6
Wykaz stosowanych skrótów	7
Streszczenie w języku polskim	9
Streszczenie w języku angielskim.....	11
1. Wstęp.....	13
1.1 Rola optycznego oczyszczania tkanek w obrazowaniu narządów.	13
1.2 Charakterystyka technik TOC.	15
1.2.1 Metody rozpuszczalnikowe.	15
1.2.2 Metody rozwadniające.	19
1.2.3 Metody wodne o wysokim współczynniku załamania światła.	20
1.2.4 Metody transformujące tkankę.	23
1.3 Mikroskopia oparta na rozszerzeniu.....	24
1.4 Histocytometria, jako przykład zaawansowanej ilościowej analizy danych mikroskopowych.	25
1.4.1. Zarys problematyki segmentacji sygnału jądrowego.....	26
1.5. Podsumowanie.....	27
2. Założenia i cel pracy.	28
3. Materiał i metody	29
3.1 Tkanki wykorzystane w doświadczeniach.	29
3.2 Poszukiwanie związków chemicznych o potencjalnie do rozszerzania tkanek i analiza danych dotyczących powierzchni tkanek.	29
3.3 Przygotowywanie skrawków histologicznych.....	30
3.4 Barwienia immunofluorescencyjne i barwienia jądrowe.	30
3.5 Optyczne oczyszczanie.....	31
3.5.1 ISEE.	31
3.5.2 C _e 3D.....	31
3.6 Obrazowanie konfokalne.	31
3.7 Porównanie detekcji jąder komórkowych i sygnałów błonowych w skrawkach 40 μm.	32
3.8 Porównanie detekcji jąder komórkowych w skrawkach 100 μm.	33
3.9 Analiza statystyczna.	34
4. Wyniki.....	35
4.1 Poszukiwanie roztworu rozszerzającego tkanki o potencjalnie wysokim współczynniku załamania światła.....	35
4.2 ISEE dokonuje błyskawicznego oraz trwałego oczyszczenia i rozszerzenia grubych skrawków tkanek.	38

4.3 ISEE gwarantuje stabilizację sygnału fluorescencyjnego podczas IHC z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał.....	39
4.4 ISEE umożliwia detekcję endogennych fluoroforów po wcześniejszym ich wybarwieniu podczas IHC.	41
4.5 ISEE poprawia dokładność segmentacji w porównaniu z klasycznym protokołem obrazowania konfokalnego.....	42
4.6 ISEE poprawia dokładność segmentacji w porównaniu z referencyjną techniką TOC.	45
4.8 ISEE i optyczne oczyszczanie innych narządów.....	50
5. Dyskusja	51
6. Wnioski	56
7. Piśmiennictwo	57

Spis rycin

Rycina 1. Etapy optycznego oczyszczania tkanek, strona 14.

Rycina 2. Podział metod TOC na podstawie chemicznej natury wykorzystywanych związków, strona 15.

Rycina 3. Techniki umożliwiające zachowanie długotrwałej aktywności białek fluorescencji w wypadku metod rozpuszczalnikowych, strona 18.

Rycina 4. WBC może być stosowane do efektywnej wizualizacji przerzutów oraz mikroprzerzutów w ciele gryzoni laboratoryjnych, strona 20.

Rycina 5. Wstępna ocena potencjału rozszerzania WL przez badane związki chemiczne, strona 35.

Rycina 6. Stężenie imidazolu i API odgrywa ważniejszą rolę podczas rozszerzania mysich WL niż stężenie mocznika, strona 36.

Rycina 7. Opracowane roztwory nie różnią się potencjałem rozszerzania WL, strona 37.

Rycina 8. Wykres transmitancji roztworu ISEE w spektrum światła widzialnego, strona 38.

Rycina 9. ISEE rozszerza skrawki WL gwałtownie i równomiernie, strona 39.

Rycina 10. ISEE jest kompatybilne z barwieniem z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał, strona 40.

Rycina 11. ISEE umożliwia detekcję endogennych białkowych fluoroforów po uprzednim barwieniu IHC, strona 42.

Rycina 12. ISEE ułatwia detekcję jąder komórkowych, strona 44.

Rycina 13. Ce3D nie zmienia kształtu oczyszczanej tkanki, strona 45.

Rycina 14. ISEE ułatwia detekcję jąder komórkowych w porównaniu do referencyjnej metody TOC, strona 46.

Rycina 15. ISEE pozwala na obrazowanie grubych skrawków z zachowaniem wysokiej jakości sygnału, strona 47.

Rycina 16. ISEE ułatwia segmentację sygnału błonowego w wypadku jego gęstego upakowania, strona 49.

Rycina 17. ISEE wykazuje kompatybilność z IHC innych niż mysie WL narządów, strona 50.

Wykaz stosowanych skrótów

AF – Alexa Fluor

ANOVA – (ang. *analysis of variance*) analiza wariancji

BABB – mieszanina składająca się z benzoesu benzyłu (BB) oraz alkoholu benzyłowego (BA)

C_e3D - (ang. *clearing-enhanced 3 dimensional microscopy*) trójwymiarowa mikroskopia wsparta oczyszczaniem

CLARITY – [ang. *Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

CUBIC – [ang. *clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

DBE – eter benzyłowy

EDTA – (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*) kwas wersenowy

ExM – (ang. *expansion microscopy*) mikroskopia oparta na rozszerzeniu

FITC – izotiocyjanian 5-fluoresceiny

FOCM – [ang. *ultrafast optical clearing method* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

FRC – (ang. *fibroblastic reticular cells*) fibroblastyczne komórki siateczkowe

GFP – (ang. *green fluorescent protein*) białko zielonej fluorescencji

IHC – (ang. *immunohistochemistry*) immunohistochemia

OptiMuS – [ang. *Optimized single-step optical clearing Method that preserves fluorescence and Size of the sample for 3D volume imaging* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

PBS – (ang. *phosphate buffered saline*) sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) reakcja łańcuchowa polimerazy

PE – fikoerytryna

PFA – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd

RI – (ang. *refractive index*) współczynnik załamania światła/refrakcji

RNA – (ang. *ribonucleic acid*) kwas rybonukleinowy

ROI – (ang. *region of interest*) obszar zainteresowania

SDS – (ang. *sodium dodecyl sulfate*) laurylosiarczan sodu

SeeDB – [ang. *See Deep Brain* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

SHIELD - [ang. *stabilization under harsh conditions via intramolecular epoxide linkages to prevent degradation* (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

SRM – (ang. *super-resolution microscopy*) mikroskopia super-rozdzielcza

THF – tetrahydrofuran

TOC – (ang. *tissue optical clearing*) optyczne oczyszczanie tkanek

UbasM – [ang. Urea-Based Amino-Sugar Mixture (metoda optycznego oczyszczania tkanek)]

v/v – (ang. volume to volume) objętość do objętości

w/v – (ang. weight to volume) waga do objętości

WBC – (ang. *whole-body clearing*) optyczne oczyszczanie całych organizmów

WD – (ang. working distance) dystans roboczy

WL – węzeł limfatyczny

Streszczenie w języku polskim

W ciągu dwóch ostatnich dekad mikroskopia dynamicznie zmieniła swoje oblicze z techniki niemal wyłącznie jakościowej w wysoce ilościową, zapewniającą unikatowy dostęp do zrozumienia relacji przestrzennych pomiędzy komórkami dzięki wizualizacji ich dystrybucji. Podstawowym ograniczeniem dotychczasowych badań ilościowych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej było zawężenie zakresu obrazowania do maksymalnie kilku warstw komórek wynikające z nieprzejrystości tkanek – a co za tym idzie zdecydowanym osłabieniem jakości danych wraz ze wzrastającą głębokością obrazowania.

Niedawno zaprezentowane techniki optycznego oczyszczania tkanek (ang. tissue optical clearing, TOC) niemal w całości znoszą tę barierę, pozwalając na przeprowadzanie pomiarów mikroskopowych nawet całych ciał gryzoni laboratoryjnych z wysoką, bliską komórkowej, rozdzielczością. Z jednej strony otwiera to zupełnie nowe możliwości zadawania i weryfikacji pytań badawczych w prawdziwym kontekście 3D narządów, z drugiej zaś jeszcze jaskrawiej uwidacznia niedoskonałości metod stosowanych podczas rekonstrukcji i segmentacji uzyskiwanych danych. Podstawowym podejściem, które łączy zalety TOC z dramatycznie poprawioną rozdzielczością obrazowania jest mikroskopia oparta o rozszerzenie (ang. expansion microscopy, ExM) bazującym na transformacji komórek/tkanek w żelowe hybrydy. Niestety, nawet pomijając znaczny poziom skomplikowania dostępnych protokołów oraz trudność pracy z powstałymi delikatnymi hybrydami, należy pamiętać iż minimalna wartość powiększenia objętości tkanek w wypadku ExM to aż $20\times$ (2000%), co czyni obrazowanie nawet najcieńszych skrawków zadaniem praktycznie niemożliwym pod względem czaso- i pracochłonności a także pracy z bezlikiem generowanych danych. Niedawno, korzystając z serii roztworów składających się z imidazolu oraz antypiryny, zaprezentowano pierwszą metodę oczyszczającą i rozszerzającą w sposób kontrolowany bez potrzeby syntezy hydrożeli – CUBIC-X. Niestety, CUBIC-X zaaplikowany do mysiego mózgowia również, podobnie do klasycznych metod ExM oferuje bardzo znaczący wzrost objętości narządu na poziomie $\sim 10\times$, co niemal praktycznie wyklucza go z codziennej praktyki laboratoryjnej.

Bazując na metodologii poszukiwania związków chemicznych o potencjale rozszerzającym tkanki w CUBIC-X, podjęto próbę opracowania pierwszego roztworu dokonującego optycznego oczyszczenia i umiarkowanego, acz powtarzalnego rozszerzenia tkanek. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów odkryto ISEE – roztwór gwarantujący wysoką przezroczystość, rozszerzający tkanki o $\sim 15\%$ w każdej z osi i znacznie poprawiający jakość

segmentacji sygnału zarówno jądrowego, jak i pochodzącego z błony komórkowej z zastosowaniem metod półautomatycznych. Zweryfikowano użyteczność ISEE ze wszystkimi podstawowymi typami detekcji sygnału immunofluorescencyjnego potwierdzając pełną kompatybilność w wypadku immunohistochemii z wykorzystaniem przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych (w tym skierowanych przeciwko endogennym białkowym fluoroforom). Ostatecznie, zaprezentowano kompatybilność ISEE z obrazowaniem tkanki mózgowej, a także grubych ($\sim 200 \mu\text{m}$) skrawków węzłów limfatycznych.

Streszczenie w języku angielskim

Over the past two decades, microscopy has dynamically changed from an almost exclusively qualitative technique to a highly quantitative one, providing unique avenue to understanding the spatial relationships between cells by visualizing their distribution. So far, the main limitation of the quantitative studies using confocal microscopy was the imaging depth, limited to a maximum of few cell layers because of the natural opacity of tissues - and thus a significant deterioration of data quality along with the increasing depth of imaging.

The recently presented techniques of tissue optical clearing (TOC) almost completely removed this barrier by allowing to perform the imaging of even the whole body of laboratory rodents with high, close to cellular, resolution. On the one hand, it opens up completely new set of scientific questions to be answered in the real 3D context of organs, but on the other, it exhibits the imperfections of the methods currently used during the reconstruction and segmentation of the obtained data even more vividly. Expansion microscopy (ExM) is the approach that combines the advantages of TOC with dramatically improved imaging resolution and is based on the transformation of cells/tissues into tissue-gel hybrids. Unfortunately, even if the significant level of complexity of the available protocols and the difficulty of working with the resulting delicate hybrids are omitted, it should be underlined that the minimum value of tissue volume enlargement in the case of ExM is as much as $20\times$ (2000%), which makes the acquisition of even the thinnest sections a task practically impossible in terms of required time, workload and finally data handling. Recently, using a series of solutions consisting of imidazole and antipyrine, the first method of combined TOC and expanding in a controlled manner without the need for hydrogel synthesis, CUBIC-X, was presented. Unfortunately, when applied to mouse brain, CUBIC-X, similarly to the classic ExM methods, offers a very significant increase in organ volume of $\sim 10\times$, which almost excludes it from everyday laboratory practice.

Based on the presented methodology in CUBIC-X, an attempt was made to develop the first solution that performs optical clearing and moderate, but reproducible, tissue expansion. As a result of the conducted experiments, ISEE was discovered – a first-in-class solution that guarantees high transparency, expands tissues by $\sim 15\%$ in each axis and significantly improves the quality of signal segmentation, both nuclear and cellular, using semi-automatic methods. ISEE was also verified compatible with immunohistochemistry using primary and secondary antibodies (including those directed against endogenous proteinaceous fluorophores). Finally,

compatibility of ISEE with imaging of brain tissue, as well as thick ($\sim 200 \mu\text{m}$) sections of murine lymph nodes, was shown.

1. Wstęp

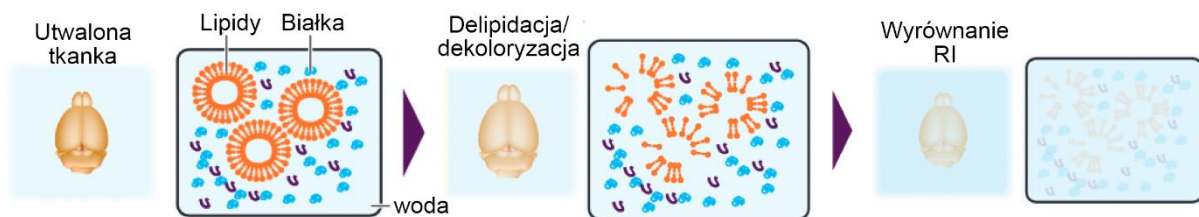
1.1 Rola optycznego oczyszczania tkanek w obrazowaniu narządów.

Potrzeba precyzyjnego opisanego anatomii organizmu, będącej podstawą do zrozumienia jego fizjologii, była podnoszona przez środowiska lekarzy już w starożytnej Grecji oraz Egipcie i została celnie podsumowana słowami francuskiego lekarza okresu renesansu, Jean François Fernela: *Anatomia dla fizjologii jest niczym geografia dla historii, opisuje miejsce w którym rozgrywa się spektakl* (1).

W dotychczasowych badaniach skoncentrowanych na pogłębianiu wiedzy o budowie organizmu zastosowanie miały techniki, w których eksperymentator musiał wybierać pomiędzy znaczną wielkością obrazowanego obszaru (tomografia komputerowa [CT], rezonans magnetyczny [MRI]), a dokładnością lub rozdzielczością, z którą tego dokona (histologia). W związku z tym, mimo iż możliwość przyżyciowego obrazowania oferowana przez CT i MRI ma krytyczne znaczenie dla codziennej opieki klinicznej, techniki te wciąż wykazują ograniczoną rozdzielczość przestrzenną, daleką od rozdzielczości komórkowej, pomijając pojedyncze zastosowania eksperymentalne (2). Z drugiej zaś strony histologia umożliwia wizualizację struktur komórkowych i subkomórkowych, zawężając jednak pole widzenia do maksymalnie kilku warstw komórek w wypadku klasycznych technik obrazowania mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Ograniczenie to próbuje się przezwyciężyć z wykorzystaniem technik krokowego sekwencyjnego cięcia histologicznego, co niestety jest niezmiernie czasochłonne, pozwala na przeprowadzanie obrazowania w jednej tylko płaszczyźnie preparatu i z wykorzystaniem pojedynczej rundy barwienia immunohistochemicznego [IHC, (3,4)]. Ponadto, niezależnie od wybranego podejścia, nieodzownym etapem procedury histologicznej pozostaje cięcie tkanki, co doprowadza do częściowej utraty materiału i powstawania utrudniających lub wręcz uniemożliwiających analizę przestrzenną artefaktów oraz ubytków.

Na styku powyższych metod obrazowania pozycjonuje się optyczne oczyszczanie tkanek (ang. *tissue optical clearing*, TOC) łączące podstawowe korzyści płynące z obrazowania makroskopowego i histologii, czyli odpowiednio obrazowanie całych narządów (aktualnie głównie gryzoni laboratoryjnych) z rozdzielczością komórkową i subkomórkową (5,6). Obrazowanie całego narządu bez uprzedniego cięcia na mniejsze, mikroskopijne fragmenty, wymaga uczynienia go przezroczystym dla światła widzialnego co, w połączeniu z odpowiednimi technikami mikroskopii fluorescencyjnej, otwiera drogę do przeprowadzania wirtualnego „cięcia”, warstwa po warstwie, z wykorzystaniem światła zamiast fizycznego ostrza. W związku z tym podstawową, unikatową korzyścią płynącą ze stosowania TOC, jest

możliwość obrazowania grubych wycinków lub całej objętości narządu w dowolnej płaszczyźnie bez utraty materiału i obecności artefaktów związanych z cięciem histologicznym. Niezależnie od metody efekt przezroczystości przy jednoczesnym zachowaniu natywnej (lub bliskiej natywnej) lokalizacji białek i kwasów nukleinowych uzyskiwany jest podczas dwóch głównych etapów – (1) usunięcia związków rozpraszających i/lub absorbujących światło oraz (2) wyrównania współczynnika załamania światła (ang. *refractive index*, RI) pomiędzy pozostałą próbką i roztworem, w którym ta próbka pozostaje zanurzona i będzie docelowo obrazowana [Ryc. 1, (7)]. Do czynników rozpraszających zaliczamy lipidy, włókna kolagenowe i elastynowe oraz cytoszkieletu, a także niejednorodną dystrybucję wymienionych związków w przestrzeni narządu (8). Choć opisane zostały techniki TOC zachowujące tłuszcze, takie jak SeeDB (9), ScaleS (10), czy UbasM (11), oferują one mierny poziom przezroczystości, a ich zastosowanie jest z reguły ograniczone do niewielkiego zwiększenia głębokości obrazowania, nie oczyszczania *sensu stricto*. Z kolei związki chemiczne uznane za silnie absorbujące światło to hem, melanina oraz lipofuscyna, przy czym specyficzne protokoły usuwające zostały opisane dla pierwszych dwóch spośród wymienionych.

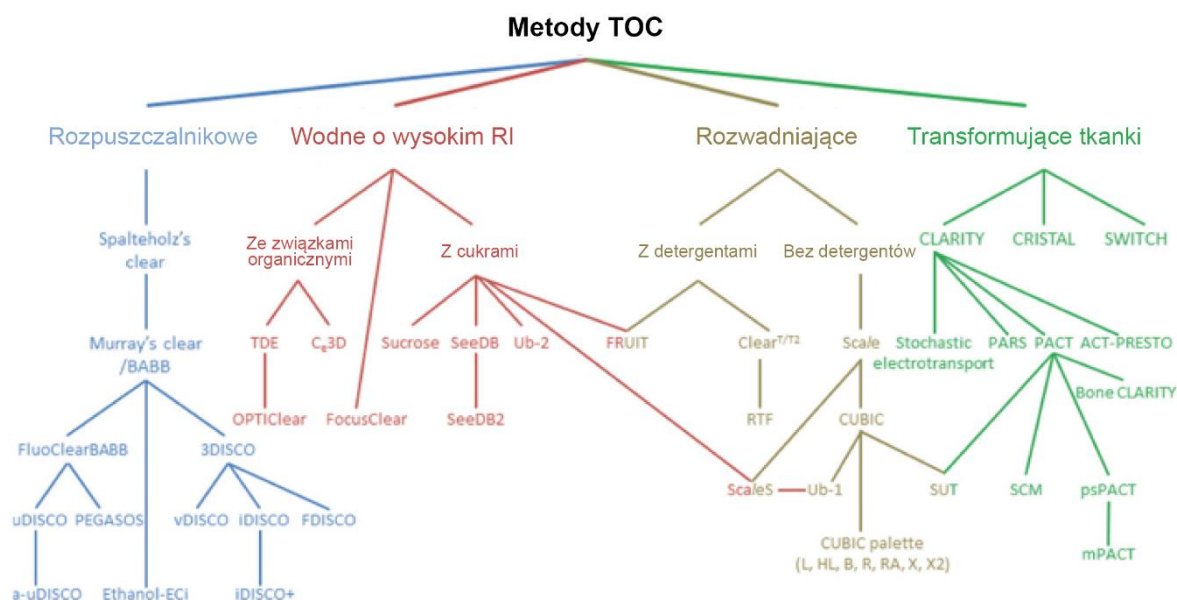


Rycina 1. Etapy optycznego oczyszczania tkanek.

Niezależnie od zastosowanej techniki TOC, tkanka podczas uzyskiwania przezroczystości przechodzi przez 2 kluczowe etapy – delipidacji i/lub dekoloryzacji (przede wszystkim usunięcia cząsteczek hemu) oraz wyrównania RI. Ostatni etap znacząco zmniejsza liczbę rozpraszających się w tkance fotonów, co odpowiada za końcowy efekt przezroczystości. Zmodyfikowano na podstawie (7).

Podkreślić należy, iż choć pierwotna koncepcja TOC została zaproponowana i wdrożona już na początku XIX wieku przez Wernera Spalteholza (12), brak zaawansowanych technik mikroskopii opóźnił jej zastosowanie o niemal 100 lat. Obecnie, w ciągu niecałych 2 dekad od ponownego odkrycia potencjału technik TOC przez grupę Dodta (13), doczekaliśmy się opublikowania ponad 100 protokołów TOC, które na podstawie wykorzystywanych w nich odczynników klasyfikujemy do czterech chemicznych kategorii metod: rozpuszczalnikowych (ang. *solvent-based tissue optical clearing*), rozwodniających (ang. *hyperhydrating solutions*), transformujących tkanki (ang. *tissue transforming methods*) oraz wodnych o wysokim

współczynnika załamania światła (ang. *high-refractive index aqueous solutions*) (**Ryc. 2**). Aby lepiej zrozumieć istotę opisanego przeze mnie roztworu zarówno optycznie oczyszczającego, jak i rozszerzającego tkanki, przedstawię obecny stan wiedzy, możliwości i ograniczenia technik TOC, mikroskopii opartej na rozszerzeniu (ang. *expansion microscopy*, ExM) oraz zarys podejść służących do segmentacji i analizy danych mikroskopowych.



Rycina 2. Podział metod TOC na podstawie chemicznej natury wykorzystywanych związków.

Metody TOC dzielimy obecnie na 4 podstawowe, wyszczególnione na rycinie grupy, z którymi związane są charakterystyczne możliwości, ale też ograniczenia obserwowane podczas akwizycji i analizy danych mikroskopowych. Na schemacie zawarto metody najważniejsze z uwagi na ich użyteczność i/lub pionierski charakter. Zmodyfikowano na podstawie (14).

1.2 Charakterystyka technik TOC.

1.2.1 Metody rozpuszczalnikowe.

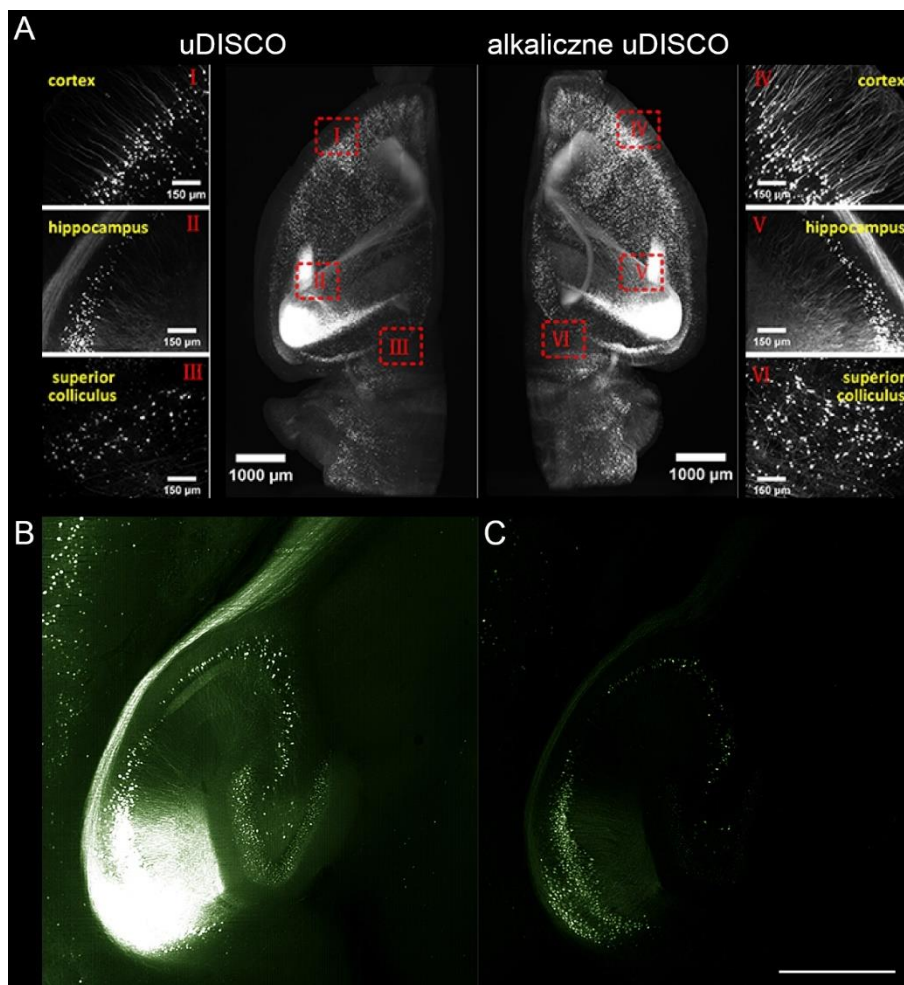
Jak wspomniano, pionierem TOC był Spalteholz, który poprzez zastosowanie (1) gradientu alkoholu oraz (2) mieszaniny o wysokim (>1,50) RI złożonej z salicylanu metylu, benzoesu benzylu oraz olejku Wintergreen zainicjował tzw. podejście rozpuszczalnikowe. Dzięki dehydratacji zachodzącej podczas pierwszego etapu procedury zanika problem znacznego zróżnicowania RI składników tkanki – woda o niskim (1,31) RI ulega usunięciu, pozostawiając mieszaninę białek, tłuszczów i kwasów nukleinowych o wysokim (~1,50), a co równie ważne znacznie jednorodnym, RI. Aktualnie metody rozpuszczalnikowe są najczęściej wybieranymi spośród mnogości technik TOC z uwagi na prostotę i krótki czas przeprowadzania oczyszczania (w zależności od wielkości preparatu czas zawiera się w granicach godziny – dni)

oraz wysoki stopień przezroczystości preparatu. Z drugiej zaś strony techniki te nierzadko doprowadzają do zniszczenia endogennej fluorescencji pochodzącej z białkowych fluoroforów tkankowych, a także, z uwagi na etap dehydratacji, zawsze prowadzą do obkurczenia preparatu a w konsekwencji pogorszenia rozdzielczości danych uzyskiwanych z układami optycznymi tej samej mocy i jakości. Co interesujące, wartość skurczenia badanego narządu nie jest bezpośrednio zależna od ilości wody wchodzącej w jego skład, ale przede wszystkim od odczynnika wykorzystanego podczas etapu dehydratacji (15,16). W wypadku techniki uDISCO (ang. *ultimate DISCO*) odwadniającej z zastosowaniem alkoholu tert-butyłowego, wartości obkurczenia są jednymi z największych i dochodzą do aż 30-40% pierwotnej objętości tkanki (17–19). Oczywiście ogranicza to rozdzielczość obrazowania, jednak jeśli pozostaje ona wystarczająca aby odpowiedzieć na zadane pytanie badawcze – daje istotną korzyść w postaci znacznie krótszego czasu obrazowania tkanki, objętości generowanych danych oraz szybkości ich późniejszej analizy. Aktualnie, korzystając z efektu obkurczenia tkanek, możliwe jest obrazowanie całych ciał gryzoni laboratoryjnych (17,20,21), a nawet ludzkich embrionów i płodów (22) jako całości z wykorzystaniem mikroskopii opartej na arkuszu światła (ang. *light-sheet fluorescence microscopy*, LSM). Dzięki połączeniu tej technologii TOC wraz z zaawansowanymi metodami detekcji obiektów opartej na uczeniu maszynowym, Pan i wsp. (23) zaprezentowali zautomatyzowane podejście do wykrywania nie tylko przerzutów nowotworowych w obrębie całego ciała myszy, ale również pomiaru odsetka komórek przerzutowych wykrywanych przez wyznakowane fluoroforami przeciwciała monoklonalne. Przykładowo, w wypadku zwierząt którym podano komórki linii ludzkiego raka piersi, MDA-MB-231, oraz monoklonalne przeciwciała terapeutyczne 6A10 skierowane przeciwko ludzkiej anhidrazie węglanowej (CA12) a skoniungowane z barwnikiem Atto-647N, średnio 77% wszystkich wykrytych mikroprzerzutów współwystępowało ze znacznikiem przeciwciała, przy czym dla płuc wartość ta była istotnie wyższa i wynosiła 85%.

Wykorzystanie barwnika Atto-647N we wspomnianym powyżej doświadczeniu nie jest przypadkowe, a wynika z jednej z bardziej znaczących restrykcji większości technik TOC (choć przede wszystkim rozpuszczalnikowych) - silnej autofluorescencji tkanek zwierzęcych w spektrum koloru niebieskiego i zielonego [od ~400 do ~500 nm, (24)]. Istotna autofluorescencja w tkance oczyszczonej metodą rozpuszczalnikową ogranicza inspekcje do dwóch epitopów/kanałów (czerwieni i dalekiej czerwieni). Dotychczas jedynym znanym postępowaniem obniżającym autofluorescencję kompatybilnym z TOC jest inkubacja z wysokim (3-10%) stężeniem H₂O₂ (25,26), rozszerzająca możliwości znakowania

immunohistochemicznego o dodatkowe 2 kanały (w spektrum niebieskim i zielonym). Dodatkowo, inkubowanie tkanki z H₂O₂ jest niezwykle przydatne w kontekście usuwania melaniny, a więc jednego z głównych związków absorbujących światło lasera, co ma szczególne znaczenie w wypadku badań transparentnych gałek ocznych (27) i skóry oraz bogatych w melanofory ciał bezkręgowców (28). Niestety, takie postępowanie nie pozostaje wolne od wad, spośród których najważniejszą pozostaje opisywana destrukcja niektórych epitopów (29,30).

Ostatnim spośród znaczących dla eksperymentatorów ograniczeniem technik przede wszystkim rozpuszczalnikowych jest wyzarcenie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z endogennych białkowych fluoroforów (31,32). Efekt ten był początkowo przypisywany etapowi dehydratacji i założeniu, iż białka fluorescencji wymagają obecności molekuł wody do utrzymania zdolności emisji (5). Pionierska praca, w której opisano metodę FluoClearBABB (33) oraz wiele po niej następujących potwierdziły, że niezależnie od substancji wykorzystywanej podczas dehydratacji (tert-butanol, 1-propanol, etanol, tetrahydrofuran [THF]) możliwe jest niemal pełne zachowanie fluorescencji endogennych białkowych fluoroforów w wypadku zastosowania roztworów o alkalicznym pH [9,0 – 9,5, **Ryc. 3A**, (34)]. Hahn wraz ze współnikami (35) rozszerzyli to podejście o usunięcie nadtlenu i aldehydów zarówno w roztworze odwadniającym (THF), jak i eterze benzylovym (ang. *dibenzyl ether*, DBE) wyrównującym RI. Wykorzystując chromatografię kolumnową z tlenkiem glinu, a następnie dodanie galusanu propylu (silnego przeciwutleniacza stosowanego w przemyśle spożywczym i kosmetykach) do DBE, ustabilizowali białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) na ponad rok (Ryc. 3B-C).



Rycina 3. Techniki umożliwiające zachowanie długotrwałej aktywności białek fluorescencji w wypadku metod rozpuszczalnikowych.

(A) Alkalizacja zarówno związków dehydratujących (tu: tert-butanol), jak i wyrównujących RI tkanki (tu: BABB) powoduje znaczący wzrost zachowania sygnału fluorescencyjnego podczas procedury oczyszczania. (B) Mózg myszy poddany TOC i utrzymany w pozbawionym nadtlenków i aldehydów DBE (C) traci niemal całą fluorescencję w ciągu 3 dni po przeniesieniu do DBE nieoczyszczonego z aldehydów. Skala w B i C odpowiada 500 μm. Zmodyfikowano na podstawie [A (34)] oraz [B-C (35)].

Podsumowując, nowoczesne rozpuszczalnikowe metody TOC oferują niemal perfekcyjny stopień przezroczystości przy stosowaniu krótkich, nieskomplikowanych protokołów i są zdolne do długotrwałego zachowania fluorescencji endogennych fluoroforów. Podstawowym i wydaje się, że niezbywalnym ograniczeniem pozostaje obniżenie rozdzielczości w wyniku kurczenia preparatów, a także możliwość skutecznej wizualizacji do maksymalnie dwóch odrębnych epitopów z uwagi na silną autofluorescencję widoczną w spektrum światła niebieskiego i zielonego. Ostatecznie, nie bez znaczenia pozostaje chemiczna reaktywność roztworów wykorzystywanych jako związki wyrównujące RI

(np. BABB, DBE), co wymaga znacznej ostrożności podczas pracy z metodami rozpuszczalnikowymi oraz korzystania ze specjalnych, odpornych na ich działanie obiektywów mikroskopowych.

1.2.2 Metody rozładniające.

W przeciwieństwie do metod rozpuszczalnikowych dążących do wyrównania RI w obrębie tkanki poprzez usunięcie cząsteczek wody, techniki rozładniające obniżają ich średni RI poprzez przewodnienie i często częściową denaturację. Pionierzy w zakresie tych technik dokonali pierwotnie przypadkowej obserwacji, iż 4-molowy roztwór mocznika czyni membrany z polifluorku winylidenu przezroczystymi (36). Wynikiem przeprowadzonych przez nich testów dodatkowych substancji chemicznych jest roztwór *Scale* złożony z mocznika oraz glicerolu o RI = 1,38 umożliwiający obrazowanie całej mysiej półkuli mózgu oraz zachowujący fluorescencję endogennych białkowych fluoroforów. Niestety, bardzo długi czas inkubacji niezbędny do osiągnięcia przezroczystości (aż 6 miesięcy dla mysiego embrionu w stadium E13.5) oraz proces niekontrolowanego rozszerzania (nawet podwajania) objętości preparatów sprawił, że *Scale* miało dotychczas ograniczone zastosowanie. Obydwie bolączki *Scale* zostały częściowo rozwiązane prezentacją metody CUBIC [clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis, (37)], która jak się później okazało, stała się najistotniejszą techniką rozładniającą i punktem wyjścia wielu zoptymalizowanych protokołów (38). Oryginalny CUBIC składał się z dwóch roztworów (CUBIC-1 i CUBIC-2), z których pierwszy dokonywał delipidacji oraz dekoloryzacji preparatu, drugi zaś wyrównywał RI (1,49) oraz przywracał kształt narządu do niemal pierwotnego stanu. Zawarty w CUBIC-1 quadrol (będący aminoalkoholem) odpowiadał za zdolność roztworu do dekoloryzacji, w tym przede wszystkim wypłukiwania zalegającego w utrwalonej tkance hemu. Własność ta pozwoliła początkowo rozszerzyć zastosowanie CUBIC do oczyszczania wielu narządów, aby ostatecznie doprowadzić do opisanego techniki optycznego oczyszczania całych organizmów [ang. *whole-body clearing*, WBC, (39)]. Dotychczas WBC z wykorzystaniem roztworów CUBIC został zaaplikowany do charakteryzacji dynamiki powstawania mikroprzerzutów wielu linii komórkowych [**Ryc. 4**, (40)] oraz dystrybucji nekrozy reprezentowanej przez złogi wapnia w komórkach mięśni szkieletowych mysiego modelu dystrofii mięśniowej Duchenne'a [mysz *mdx* oraz *mdx-beta geo*, (41)]. Należy podkreślić, że aktualnie paleta roztworów typu CUBIC jest szeroka i pozwala na precyzyjne dostosowanie efektywności delipidacji, dekoloryzacji, dekalcyfikacji, czy nawet wartości RI ostatecznego roztworu do potrzeb badanej tkanki (38).

CUBIC wraz ze swymi modyfikacjami został zaaplikowany nie tylko do obrazowania narządów gryzoni, ale także poznania trójwymiarowej struktury zakrzepów (42), czy dystrybucji poszczególnych etapów rozwojowych zarodźca malarycznego w organizmie komara (43).



Rycina 4. WBC może być stosowane do efektywnej wizualizacji przerzutów oraz mikroprzerzutów w ciele gryzoni laboratoryjnych.

Zmodyfikowana metoda CUBIC pozwala na oczyszczenie całego organizmu, jednocześnie pozostając na tyle delikatną, iż możliwe jest obrazowanie komórek (w tym wypadku nowotworowych) wykazujących endogenną ekspresję białek fluorescencyjnych. Rycina przedstawia przykładowe obrazowanie trzustki, płuc, wątroby oraz jelit myszy po inokulacji z wykorzystaniem linii komórkowej SUIT-2. Zmodyfikowano na podstawie (40).

Podsumowując, metody rozładniające, reprezentowane przede wszystkim przez szeroką paletę roztworów CUBIC, wykorzystują nietoksyczne substancje o szerokim zastosowaniu, bezpieczne dla optyki większości klasycznych obiektywów, gwarantujące dość dobry stopień przezroczystości większości narządów gryzoni laboratoryjnych oraz dobre zachowanie sygnału endogennych białkowych fluoroforów. Ich podstawowe ograniczenia to wyraźnie niższy stopień przezroczystości w porównaniu z metodami rozpuszczalnikowymi, oraz znacznie dłuższy (dni – tygodnie) czas inkubacji niezbędny do zakończenia protokołu.

1.2.3 Metody wodne o wysokim współczynniku załamania światła.

W tej heterogenicznej grupie klasyfikuje się związki nierozpuszczalnikowe o wysokim RI, dobrze zachowujące fluorescencję z białkowych fluoroforów oraz pierwotny kształt preparatów. Protokoły z ich wykorzystaniem polegają na inkubacji tkanek z roztworami o wzrastającym stężeniu substancji odpowiedzialnych za efekt optycznego oczyszczenia (44,45), lub pojedynczym roztworze i trwają, w zależności od wielkości preparatu, od kilku godzin w wypadku skrawków do 1 mm grubości, po kilka dni dla całych mysich narządów. Wiele spośród zaprezentowanych technik miało charakter raczej anegdotyczny i nie zostało zaadoptowane przez badaczy np. FRUIT (44), UbasM (11), OPTIClear (46) czy Clear^{T/T2} (47). Z drugiej strony w grupie tej znajdziemy jedyny często wykorzystywany komercyjny

odczynnik FocusClear, będący mieszaniną DMSO, kwasu diatrizowego, kwasu wersenowego (EDTA), pochodnej megluminy i innych, zastosowany do badania tkanek ssaków (48), roślin (49), owadów (50), czy też *Danio pręgowanego* (51). Najbardziej zaawansowane badania z wykorzystaniem FocusClear pochodzą z grupy prowadzonej przez Tanga, który korzystając z tego odczynnika początkowo udowodnił jego użyteczność w badaniu nabłonka (52), naczyń krwionośnych (53) oraz unerwienia jelit myszy oraz ludzi (54), aby ostatecznie odkryć nowy, okołonaczyniowy typ komórek Cajala w jelicie grubym człowieka (55). Niedawno Lin i wsp. wykorzystując FocusClear i zmodyfikowany system obrazowania *spinning disk*, zobrazowali cały mózg *Drosophila melanogaster*, uzyskując przy tym rozdzielczość poniżej 20 nm w osi bocznej (56).

Kolejnym ważnym rozwiązaniem reprezentującym metody wodne o wysokim RI jest C_e3D [*clearing-enhanced 3 dimensional microscopy*, (57)] – technika opracowana przez Gernera, pioniera histocytometrii (58), z myślą o rozszerzeniu koncepcji histocytometrii mysich węzłów limfatycznych (WL) o analizę w trójwymiarze. Pomijając nieefektywność C_e3D w oczyszczaniu tkanek grubszych niż kilka milimetrów, można uznać ten roztwór za niemal uniwersalny – wybitnie zachowuje zarówno natywne epitopy, jak i fluorescencję białkowych fluoroforów, pozostaje kompatybilny z hybrydyzacją *in situ* (59), a także działa dość szybko (pełne oczyszczanie mysiego WL zachodzi w ciągu doby) i gwarantuje wysoki stopień przezroczystości. W związku z powyższym nie dziwi fakt, iż liczne badania porównujące użyteczność metod TOC w stosunku do różnych tkanek zwierzęcych wskazują na C_e3D jako technikę pierwszego wyboru, o ile preparat jest wystarczająco cienki (60,61).

Na jeszcze cieńszych skrawkach mysich mózgow (<100 μm) Ke i wsp. (62) opisali nowe zastosowanie TOC – możliwość przeprowadzania trójwymiarowego obrazowania z użyciem super rozdzielczej mikroskopii (ang. *super-resolution microscopy*, SRM). Na bazie joheksolu (jodowego niejonowego środka cieniującego wykorzystywanego w diagnostyce obrazowej) oraz saponiny opracowali protokół SeeDB2 o RI = 1,518, który precyzyjnie odpowiada RI większości obiektywów przystosowanych do obrazowania w wysokiej rozdzielczości w immersji olejowej oraz RI typowych szkiełek nakrywkowych (RI = 1,52). Co ważne, w serii doświadczeń z wykorzystaniem zróżnicowanej aparatury i typów obrazowania (STED, SR-SIM, PALM, FV-OSR, SD-OSR, SP8-HyVolution oraz Airyscan) autorzy wykazali, że oczyszczanie z wykorzystaniem SeeDB2 nie wpływa na morfologię struktur nawet tak drobnych, jak szijki kolców dendrytycznych, znacznie ułatwiając ich wykrywanie. Podstawowe ograniczenia SeeDB2 to relatywnie długi czas inkubacji (4-5 dni dla

cienkich skrawków mózgu) z wykorzystaniem kilku następujących po sobie roztworów, których wymiana z pewnością może doprowadzić do uszkodzenia tak delikatnych preparatów, a także brak potwierdzonego zastosowania dla tkanek innych niż mózgowie (myszy oraz *D. melanogaster*).

Pod względem prostoty i czasu niezbędnego do zakończenia oczyszczania, niekwestionowanym liderem jest FOCM (ang. ultrafast optical clearing method). Z wykorzystaniem FOCM, Zhu i wsp. (63) uzyskali wysoki stopień transparentności 300 μm skrawków mózgu myszy już w ciągu 120 sekund. W połączeniu z deklarowaną stabilizacją sygnału fluorescencyjnego oraz nietoksyczną i niedrogą recepturą, pozycjonowało to FOCM jako bardzo użyteczne narzędzie do obrazowania 3D preparatów o ograniczonej grubości. Istotne wątpliwości dotyczące przydatności FOCM zostały zaprezentowane w niedawnym artykule Kim i wsp. (64), którzy wykazali iż FOCM co prawda dokonuje szybkiego oczyszczenia preparatów, jednak równie szybko (<1 doby) wyżarza obecne w nich fluorofory oraz obkurcza preparaty, tym samym utrudniając późniejszą segmentację danych. Autorzy przedstawili roztwór alternatywny, OptiMuS (ang. *Optimized single-step optical clearing Method that preserves fluorescence and Size of the sample for 3D volume imaging*) złożony z joheksolu, mocznika oraz D-sorbitolu o RI = 1,47. W porównaniu do FOCM, OptiMuS charakteryzuje się porównywalnie krótkim czasem inkubacji (1-mm skrawek mózgu szczura oczyszcza się optycznie w ciągu 1,5 godziny) i, co najważniejsze, zachowuje oryginalny kształt preparatu, nie doprowadzając do jego obkurczenia.

Podsumowując, techniki wodne o wysokim współczynniku załamania światła w ogromnej większości bazują na nietoksycznych odczynnikach (zarówno dla eksperymentatora, jak i obiektów mikroskopowych), które nie powodują wyżarzenia fluoroforów i pozwalają na efektywne oczyszczanie skrawków niewielkiej grubości (~100 - ~2000 μm).

1.2.4 Metody transformujące tkankę.

Rozwój ostatniej spośród chemicznie odrębnych gałęzi TOC zapoczątkowała pionierska praca grupy Deisserotha (65), w której mózgowie myszy zostało poddane inkubacji z monomerami akrylamidu oraz bisakrylamidu. W wyniku sieciowania wskazanych monomerów uzyskano hybrydę tkankową, w której białka i kwasy nukleinowe, ich lokalizacja oraz konformacja, są skutecznie stabilizowane. Umożliwiło to zastosowanie podczas oczyszczania silnego związku delipidującego i częściowo dekoloryzującego – laurylosiarczanu sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), uzyskując niemal idealnie transparentne narządy myszy. Podejście to nazwano CLARITY (ang. *Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel*) i stanowiło wyłącznie punkt wyjścia do licznych optymalizacji protokołu z uwagi na pierwotnie długi czas oraz złożoność procesu inkubacji. Ponadto konieczność stosowania elektroforezy podczas delipidacji i barwienia z wykorzystaniem przeciwciał prowadziła do mocno zróżnicowanego stopnia przezroczystości, a nierzadko również zniszczenia preparatów w wyniku ich uszkodzenia termicznego. Obecnie istnieje wiele modyfikacji usprawniających pierwotne CLARITY, które dotyczą m.in. opracowania pasywnych protokołów oczyszczania [bez potrzeby stosowania niestabilnej w wypadku tkanek delipidacji z wykorzystaniem elektroforezy (66)], dostosowania stężeń monomerów, ich modyfikacji (67,68), a także opracowania tańszych i bardziej skutecznych roztworów wyrównujących RI powstałych hybryd (69). Yang i wsp. pokazali, że odpowiednio zmodyfikowane CLARITY pozwala również na przeprowadzenie procedury WBC (66). Niestety zmienna wartość pęcznienia poszczególnych narządów pod wpływem tego typu oczyszczania oraz wysoki koszt IHC całego organizmu z wykorzystaniem jego unaczynienia, ograniczyły stosowanie tej techniki przez inne laboratoria.

Rezygnacja z elektroforezy podczas delipidacji i IHC sprawiła, że proces TOC był bardziej powtarzalny, jednak pozostawał problem penetracji przeciwciał i homogennego barwienia całych narządów. Interesujące rozwiązanie tej kwestii zaprezentował Murray (70), który opracował dwa roztwory – SWITCH-off oraz SWITCH-on. SWITCH-off utrudniał wiązanie przeciwciał do rozpoznawanych przez nie epitopów, co pozwalało na jednorodną, niezaburzoną penetrację przeciwciał przez cały narząd, zaś SWITCH-on przywracał zdolność wiązania przeciwciał. To istotne odkrycie doczekało się również optymalizacji dokonującej stabilizacji fluorescencyjnych białek – SHIELD [stabilization under harsh conditions via intramolecular epoxide linkages to prevent degradation (71)]. SHIELD niemal ostatecznie znosi znany problem nierównomiernej dystrybucji przeciwciał i późniejszego, zbyt intensywnego

świecenia skoniungowanych z nimi fluoroforów na obwodzie tkanki, z jednoczesnym niedoświetleniem głębi preparatu (tzw. *edge effect*).

Obecnie metody transformujące są wykorzystywane stosunkowo rzadko, z uwagi na długie czasy inkubacji (dni – tygodnie) niezbędne do uzyskania przezroczystości (72) oraz wciąż dość zróżnicowany (między innymi pod względem zachowania kształtu preparatów) efekt końcowy. I choć z perspektywy tkanki/całych narządów nie prezentują żadnych ogólnych korzyści w porównaniu do metod rozpuszczalnikowych lub rozgadniających, w przeciwieństwie do tych ostatnich mogą służyć trójwymiarowemu obrazowaniu próbek amorficznych, takich jak zbadana już plwocina chorych cierpiących z powodu mukowiscydozy (73).

1.3 Mikroskopia oparta na rozszerzeniu.

W wypadku transformujących metod TOC efekt rozszerzania tkanki po jej uprzednim usieciowaniu był powszechnie uznawany za ograniczenie techniki, z uwagi na nieprzewidywalny, zależny od tkanki oraz składu żelu akrylamidowego, charakter pęcznienia preparatu (74). W wypadku ExM rozszerzanie jest procesem w pełni kontrolowanym i pożądanym, osiąganym podczas 4 etapów: (1) inkubacji ze związkami sieciującymi, (2) polimeryzacji *in situ*, (3) homogenizacji enzymatycznej (zazwyczaj z wykorzystaniem proteiny K) lub mechanicznej tkanki oraz (4) rozszerzenia żelu z wykorzystaniem wody. W wypadku klasycznych protokołów ExM, preparat ulega $\sim 4.5\times$ liniowemu rozszerzeniu, co oznacza że jego objętość rośnie około 100-krotnie i w 98-99% składa się z wody (75). Dzięki ExM klasyczne obiektywy, których dotychczasowa rozdzielczość wynosiła 270 nm, pozwalają na wizualizację tkanek z efektywną rozdzielczością na poziomie 60 nm ($270 \text{ nm} / 4,5$), a więc znacznie poniżej poziomu dyfrakcji klasycznych mikroskopów świetlnych.

Jak wspomniano, w wypadku ExM wartość powiększenia jest w pełni kontrolowana i może być modyfikowana poprzez zastosowanie odmiennych chemicznie monomerów (zawierających więcej hydrofilowych grup bocznych lub tworzących mniej połączeń krzyżowych) bądź kolejnej rundy rozszerzania wcześniej rozszerzonego preparatu. Standardowy hydrożel wykorzystywany w ExM i gwarantujący $4.5\times$ rozszerzenie składa się z akrylanu sodu, akrylamidu oraz *N,N'*-metylenodiakrylamidu. Aby jeszcze bardziej zwiększyć efektywną rozdzielczość obrazowania zamieniono dwa ostatnie związki na *N,N*-dimetyloakrylamid, co w sposób powtarzalny pozwoliło osiągnąć aż $10\times$ liniowe powiększenie preparatów podczas jednej rundy rozszerzania (76,77). Niedawno grupa Boydena przesunęła granicę jeszcze dalej, opracowując protokół dwukrotnego rozszerzenia ($2*4.5\times$) dzięki któremu osiągnięto sumaryczne $\sim 20\times$ rozszerzenie liniowe przekładające się na osiągalną rozdzielczość na

poziomie ~25 nm przy użyciu konwencjonalnych mikroskopów świetlnych (78). Należy podkreślić, iż stosowanie protokołów o tak znaczących wartościach rozszerzania wymaga dużego doświadczenia, szczególnie na etapie kontroli, czy rozszerzanie zostało przeprowadzone w sposób izotropowy, jak podają to liczne oryginalne prace.

Niezależnie od techniki rozszerzenia, ostateczna hybryda składa się z ~1% pierwotnego materiału biologicznego oraz ~99% wody, co czyni ją w pełni przezroczystą i teoretycznie dostępną do obrazowania w kontekście 3D również z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technik obrazowania, takich jak LSM. Mimo to, ExM służy obecnie badaniu pojedynczych komórek lub struktur subkomórkowych, takich jak mikrotubule czy chromatyna. Z jednej strony dystans roboczy obecnych obiektywów przystosowanych do imersji wodnej uniemożliwia obrazowanie tak znacznie rozszerzonych preparatów, z drugiej zaś czas niezbędny do przeprowadzenia obrazowania i późniejszej analizy nawet niewielkich obszarów aktualnie skutecznie odstręcza od podejmowania takich prób. Warto również zwrócić uwagę na podstawowe ograniczenie ExM - przestrzenne „rozcieńczenie” cząsteczek fluorescencyjnych obecnych w tkance, którego nasilenie narasta wraz z głębokością obrazowania. W wypadku mniej gęsto rozdystrybuowanych epitopów lub suboptymalnego barwienia IHC okazać się może, że struktury w rzeczywistości ciągłe, np. mikrotubule, są obrazowane w sposób nieciągły, prowadząc do fałszywego odzwierciedlenia rzeczywistości.

1.4 Histocytometria, jako przykład zaawansowanej ilościowej analizy danych mikroskopowych.

Histocytometria to podejście, które od 2012 roku wyznacza drogę dla ilościowej analizy danych pochodzących z mikroskopii konfokalnej (58). Protokół histocytometrii zakłada (1) obrazowanie z rozdzielczością komórkową oraz (2) segmentowanie komórek na podstawie (i) sygnału jądrowego w wypadku komórek o resztkowej ilości cytoplazmy (np. limfocyty i komórki dendrytyczne) lub (ii) najbardziej charakterystycznego markera dla danej populacji (np. podoplaniny dla fibroblastycznych komórek siateczkowych, FRC). Tak przygotowane dane dają wgląd w intensywność fluorescencji każdego użytego markera w każdym wysegmentowanym obiekcie i zawierają informacje o jego lokalizacji w tkance. Przykładowo, jeśli do barwienia immunohistochemicznego zastosowano przeciwciała anty-B220, -CD3 i CD11b, możliwe będzie wykorzystanie uzyskanych danych w programie FlowJo (wiodącym programie oryginalnie stworzonym do analiz danych cytometrycznych) i ocena nie tylko tego, jaki odsetek komórek stanowią limfocyty B (komórki B220⁺), limfocyty T (komórki CD3⁺) oraz komórki mieloidalne (komórki CD11b⁺), ale również precyzyjne określenie ich dystrybucji przestrzennej w tkance. Podejścia takie jak histocytometria niosą ze sobą trzy

fundamentalne korzyści – pierwsza z nich to wspomniana analiza w 3D, która pozwala na badanie interakcji pomiędzy komórkami w tkance, spojrzenie na ich zależności z punktu widzenia architektury narządu. Druga, to możliwość przeprowadzenia dokładnych badań na populacjach komórek niepoddających się optymalnej izolacji z wykorzystaniem klasycznych technik stosowanych podczas przygotowania materiału do cytometrii np. komórek dendrytycznych, czy budujących zrąb narządu fibroblastów. W końcu trzecia, to łatwość badania populacji komórek, które występują w niewielkich odsetkach, a tym samym pozostających niedoreprezentowanymi lub wręcz nieobecnymi w wynikach oznaczeń pochodzących z cytometrii przepływowej.

1.4.1. Zarys problematyki segmentacji sygnału jądrowego.

Niestety, jak podkreślono we wstępie, podstawą całej procedury histocytometrii [na której opiera się wiele zupełnie nowoczesnych narzędzi analizy danych, takich jak CytoMAP (79)] jest udana, precyzyjna segmentacja pojedynczych komórek, zazwyczaj na podstawie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z ich jądra. Okazuje się, że pomimo rozwoju technik optycznego oczyszczania oraz licznych narzędzi służących do wykrywania jąder komórkowych, segmentacja tych ostatnich, szczególnie w wypadku tkanek o wysokim zagęszczeniu komórek, wciąż pozostaje ogromnym wyzwaniem (80). Najlepiej świadczy o tym trudność, z którą dostępnymi programami przychodzi rozpoznanie nawet nienachodzących na siebie jąder komórkowych w niewielkich zbiorach danych. Przykładowo, Piccinini przetestował 9 automatycznych i półautomatycznych narzędzi do segmentacji jąder komórkowych w 3D na dwóch zbiorach danych, zawierających zaledwie ~50 komórek (81). Ostatecznie tylko 5 spośród 9 programów rozpoznało więcej niż 90% komórek w tych nieporównywalnie prostszych w analizie zbiorów w stosunku do choćby mikroskopii konfokalnej grubego skrawka mysiego WL lub mózgowia. Co więcej, mimo stosowania zaawansowanych metod opartych na sztucznej inteligencji, szeroko obserwowanym problemem jest użyteczność poszczególnych metod segmentacji wyłącznie w stosunku do konkretnych typów preparatów lub sposobu ich barwienia, na których były pierwotnie przygotowywane. Dlatego też społeczność akademicka czyni znaczący wysiłek upubliczniając jak najbogatsze w oznaczone obiekty zbiory danych służące do weryfikacji coraz to nowszych algorytmów rozpoznawania jąder komórkowych (82). Niestety, w porównaniu do dość powtarzalnego barwienia z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny (83), mikroskopia fluorescencyjna wraz ze zróżnicowaną klasą wykorzystywanych instrumentów oraz ich

ustawień, dokłada kolejną niezwykle znaczącą trudność dla naukowców podejmujących temat segmentacji jąder, co ostatecznie znacznie ogranicza użyteczność programów typu CytoMAP.

1.5. Podsumowanie.

TOC wraz z postępem w dziedzinie analizy danych otworzyło potencjalną drogę do badania komórek oraz relacji pomiędzy ich populacjami w 3D. Niestety, gęstość upakowania komórek w tkankach oraz ich obkurczanie podczas najczęściej stosowanych metod TOC - technik rozpuszczalnikowych, czyni ich segmentację i późniejszą analizę zadaniem niezwykle trudnym, a obecnie wręcz niewykonalnym.

Do tej pory brakowało metody, która znacznie ułatwiłaby proces segmentacji pojedynczych komórek, jednocześnie nie zwiększając objętości badanych narządów o kilkanaście – kilkadziesiąt razy, czyniąc ich obrazowanie niemożliwym do ukończenia w normalnych warunkach pracowni mikroskopii. Opisanie techniki TOC, która gwarantowałaby łatwość stosowania i szybkość przeprowadzenia procedury z jednoczesnym umiarkowanym rozszerzeniem tkanek, a tym samym przestrzeni pomiędzy komórkami, mogłoby przyczynić się do znacznego poprawienia jakości przeprowadzanego obrazowania i następowej analizy danych z narzędziami typu CytoMAP. Jednocześnie, umiarkowane rozszerzenie tkanki oznaczałoby potencjalną maksymalizację dokładności przy niewielkim wydłużeniu czasu obrazowania, co mogłoby odmienić oblicze ExM z techniki czasochłonnej i ograniczonej do badania pojedynczych komórek lub anegdotycznego obrazowania mysiego mózgowia.

2. Założenia i cel pracy.

Głównym celem niniejszej pracy było opracowanie składu roztworu umożliwiającego uzyskanie optycznego oczyszczenia i powtarzalnego rozszerzenia tkanek, którego stosowanie umożliwiłoby obrazowanie grubych ($>40\ \mu\text{m}$) skrawków mysich narządów i zwiększało dokładność ilościowej analizy danych pochodzących z mikroskopii fluorescencyjnej. W związku z wyróżniającym się wysokim stopniem upakowania komórkowego WL, pozytywnie skorelowanym z trudnością segmentacji obiektów, to właśnie mysie WL obrano za główny materiał służący do weryfikacji użyteczności nowego roztworu.

Sformułowano następujące cele szczegółowe:

1. Identyfikacja związków potencjalnie rozszerzających tkankę, charakteryzujących się wysokim ($>1,40$) współczynnikiem załamania światła, weryfikacja ich wpływu na wielkość tkanek i opracowanie ostatecznego roztworu.
2. Zbadanie kompatybilności opracowanego roztworu z protokołami obrazowania fluorescencyjnego, tj. (1) właściwości roztworu podczas wielogodzinnego obrazowania w warunkach obniżonej temperatury (22°C) pracowni mikroskopii konfokalnej, wpływu na (2) integralność epitopów oraz (3) kształt tkanki, (4) zachowania emisji pochodzącej z endogennie kodowanych białek fluorescencji, (5) zachowania sygnału pochodzącego z komercyjnie dostępnych fluoroforów.
3. Zbadanie użyteczności stosowania roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego w kontekście akwizycji i segmentacji danych mikroskopowych w porównaniu do standardowego schematu obrazowania tkanek.
4. Zbadanie użyteczności stosowania roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego w kontekście akwizycji i segmentacji danych mikroskopowych w porównaniu do referencyjnej techniki optycznego oczyszczania mysich WL - Ce3D .

3. Materiał i metody

3.1 Tkanki wykorzystane w doświadczeniach.

W eksperymentach wykorzystano tkanki pobrane od myszy ze szczepu wsobnego C57BL/6Jcldb (hodowane w Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku oraz Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego w Warszawie), C57BL/6-Tg(Foxp3-DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax, B6.129S4-Arg1tm1.1Lky/J oraz B6.Cg-Tg(CAG-DsRed*MST)1Nagy/J (hodowane w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym).

Zwierzęta miały zapewnione kontrolowane środowisko (temperatura 24°C, cykl dobowy 12/12) i zapewniony dostęp do wody i paszy *ad libitum*. Zwierzęta uśmiercano poprzez dyslokację rdzenia kręgowego, poprzedzoną ekspozycją na izofluran (FDG9623, Baxter). Izolowane tkanki były utrwalane przez 1 dobę w 4% roztworze paraformaldehydu (BD Cytifix/Cytoperm™, No. 554722, BD Biosciences) w 4°C przed wykorzystaniem w doświadczeniach.

Wszystkie czynności zostały przeprowadzone w zgodzie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady (2010/63/UE) i polskim Prawem. Myszy były jedynie donorami tkanek, co oznacza brak konieczności uzyskania zgody Komisji Etycznej.

3.2 Poszukiwanie związków chemicznych o potencjalnie do rozszerzania tkanek i analiza danych dotyczących powierzchni tkanek.

Na podstawie wcześniejszych badań (84) wyselekcjonowano 10 związków chemicznych potencjalnie rozszerzających tkanki i gwarantujących wysoki RI ostatecznego roztworu. Mysie WL były fotografowane z wykorzystaniem trinokularu (BIO000629, Jangar) wyposażonego w kamerę cyfrową USB 5MP (BIO000695, Jangar) przed procedurą oczyszczenia i rozszerzenia, a następnie inkubowane w 2 ml testowanych roztworów i fotografowane ponownie po 24 godzinach od rozpoczęcia inkubacji. Ostatecznie zdjęcia były obrysowywane, a powierzchnie tkanek mierzone w programie ImageJ (wersja 1.52n; National Institutes of Health) z wykorzystaniem narzędzia *polygon selections*.

W pierwszej serii eksperymentów testowano wpływ pojedynczych roztworów na objętość WL. Zastosowano następujące stężenia: 100%, 75%, 50%, 25%, 15% oraz 5% (waga do objętości, w/v lub objętość do objętości, v/v, w zależności od stanu skupienia substancji w temperaturze pokojowej), przy czym wartość 100% oznaczała maksymalną rozpuszczalność substancji w wodzie w temperaturze pokojowej, z wyjątkiem glicyny, N-laurylosarkozyny oraz Tricine, których stężenia odpowiadały stężeniom wagowym. W kolejnej serii eksperymentów testowano 10% mieszaniny związków potencjalnie najbardziej optymalnych substancji (powodujących rozszerzenie powierzchni o ~25%).

3.3 Przygotowywanie skrawków histologicznych.

Utrwalone narządy zatapiano w 3% w/v roztworze agarozy (Sigma-Aldrich) w wodzie, po czym skrawano na zadaną grubość z wykorzystaniem Vibratomu (VT1000S, Leica). Skrawki przechowywano w 1× buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS, Sigma-Aldrich) z dodatkiem 0,05% azynu sodu (NaN₃, Sigma-Aldrich).

3.4 Barwienia immunofluorescencyjne i barwienia jądrowe.

Aby zminimalizować niespecyficzne wiązanie przeciwciał skrawki inkubowano przez godzinę w roztworze blokującym składającym się z 2% surowicy wołowej (BSA, *bovine serum albumin*, Jackson ImmunoResearch) oraz 0,3% Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) w PBS w temperaturze pokojowej. Do skrawków w roztworze blokującym dodawano mieszaninę przeciwciał pierwszorzędowych lub bezpośrednio skoniugowanych z fluorochromami (lista oraz stężenia wykorzystanych przeciwciał została przedstawiona w **Tabeli 1**) oraz barwnik jądrowy – Hoechst 33342 (1:10 000, Thermo Fisher Scientific) dla tkanek poddawanych oczyszczaniu z wykorzystaniem C₆3D, lub jodek propidyny (1:5000, Thermo Fisher Scientific) w wypadku wszystkich pozostałych.

Następnego dnia skrawki płukano w 0.3% Tritonie X-100 w PBS (3×10 minut). W wypadku przeciwciał pierwszorzędowych, po ostatnim płukaniu dodawano przeciwciała drugorzędowe sprzężone z fluoroforem (Tabela 1) i inkubowano przez 120 minut. Skrawki płukano w PBS (3×10 minut) i nakładano na szkiełka. Wszystkie etapy barwienia i płukania odbywały się na rotorze Mini-Shaker PSU-2T (BS-010155-AAG, Biosan).

Do zatapiania preparatów kontrolnych wykorzystywano odczynnik Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific), pozostałe preparaty zatapiane były w ostatecznym roztworze oczyszczającym i rozszerzającym lub C₆3D, w zależności od zastosowanej metody TOC.

Tabela 1. Lista przeciwciał wykorzystanych w pracy.

Nazwa przeciwciała	Producent, numer katalogowy	Typ przeciwciała/ koniugat	Wykorzystane stężenie
ER-TR7	Thermo Fisher Scientific, MA1-40076	Pierwszorzędowe	1:500
LYVE1	Thermo Fisher Scientific, 53-0443-82	AF 488	1:500
CD172 (SIRP α)	Biologend, 144006	FITC	1:500
CD21/35 (CR2/CR1)	Biologend, 123424	AF 647	1:500

CD3	Biologend, 100272	PeFire 700	1:500
CD45R/B220	Biologend, 103202	Pierwszorzędowe	1:500
GFP	MBL, 598	Pierwszorzędowe	1:500
GFAP	Thermo Fisher Scientific, PA1-10019	Pierwszorzędowe	1:2000
NeuN	Merck, MAB377	Pierwszorzędowe	1:500
Anti-Rat	Thermo Fisher Scientific, A-21247	AF 647	1:1000
Anti-Rat	Thermo Fisher Scientific, A-11007	AF 594	1:1000
Anti-Rat	Thermo Fisher Scientific, A-21434	AF 555	1:1000
Anti-Rat	Thermo Fisher Scientific, A-11006	AF 488	1:1000
Anti-Mouse	Thermo Fisher Scientific, A-21235	AF 647	1:1000
Anti-Rabbit	Thermo Fisher Scientific, A-21428	AF 555	1:1000
Anti-Syrian Hamster	Jackson ImmunoResearch, 107-295-142	RRX	1:1000

3.5 Optyczne oczyszczanie.

3.5.1 ISEE.

Opracowany nowy roztwór do optycznego oczyszczania i rozszerzania składa się z 25% imidazolu (I202-100G, Merck), 20% mocznika (U5378-5KG, Sigma–Aldrich), 30% 1-(3-Aminopropyl)imidazolu (272264-50G, Merck) oraz 25% wody i ma RI = 1,47. W wypadku oczyszczania z ISEE, tkanki o grubości 40 µm inkubowane były w roztworze przez 15 minut, zaś 100-200 µm przez 30 minut, po czym zatapiane i obrazowane.

3.5.2 C_e3D.

Roztwór przygotowano zgodnie z opublikowanym protokołem (59). W skrócie, przygotowano 40% v/v roztwór N-metylacetamidu (M26305-100G, Sigma–Aldrich) w PBS, którego używano do rozpuszczania Histodenz (D2158-100G, Sigma–Aldrich) do 86% w/v w 37°C. Po całkowitym rozpuszczeniu, które następowało po 5-6 godzinach, do roztworu dodawano Triton X-100 (0.1% v/v, Sigma–Aldrich) oraz 1-tioglicerol (0.5% v/v, M1753-100ML, Sigma–Aldrich). W celu oczyszczenia mysich węzłów limfatycznych, inkubację przeprowadzano przez 24 godziny z delikatną rotacją.

3.6 Obrazowanie konfokalne.

Do obrazowania preparatów wyznakowanych fluorescencyjnie użyto mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) wyposażonego w moduł Navigator oraz

obiektywy HC PL APO CS2 20x/0.75 oraz HC PL APO CS2 40x/1.30 z imersją olejową. Wzbudzenia dokonywano z wykorzystaniem lasera światła białego (WLL) lub argonowego w odpowiednich dla danych fluoroforów długościach. W ogromnej większości detekcja była przeprowadzana z wykorzystaniem detektorów hybrydowych, HyD, w rozdzielczości 1024×1024, obraz 8-bitowy, prędkość 600, krok w osi z = 2 μm.

3.7 Porównanie detekcji jąder komórkowych i sygnałów błonowych w skrawkach 40 μm.

Wybarwione, 40 μm skrawki mysich WL, obrazowano z wykorzystaniem SP8 i obiektywem 40×/1.3 NA, po czym poddawano oczyszczaniu i rozszerzaniu z ISEE. Po 15 minutach inkubacji skrawki obrazowano powtórnie z wykorzystaniem obiektywu 40×/1.3 NA oraz 20×/0.75 NA. Uzyskane dane odtwarzano z wykorzystaniem ImageJ (National Institutes of Health) i za pomocą *polygon selections* na plikach pochodzących z obrazowania z obiektywem 40× po ISEE. Wyznaczano 2 grupy regionów poddawanych analizie o odmiennym stopniu upakowania komórek: (1) regiony w obrębie grudek limfocytów B oraz (2) poza grudkami. Następnie te same, zapamiętane regiony, aplikowano do danych zobrazowanych z obiektywem 20× po ISEE oraz, po uprzednim pomniejszeniu o 12,7%, do danych kontrolnych. Wszystkie regiony wycinano z oryginalnych plików oraz zapisywano w formacie tiff. Następnie, z wykorzystaniem Imaris File Converter (Bitplane) dokonywano konwersji do formatu .ims (Imaris, Bitplane). W programie Imaris przeprowadzano analizę z wykorzystaniem 2 funkcji – *surface* dla detekcji jąder komórkowych oraz *cells* dla detekcji sygnału błonowego pochodzącego z barwienia anty-B220 (dokładne parametry segmentacji sygnałów zostały przedstawione w Tabeli 2 i 3), po czym dane ilościowe dotyczące liczby wykrytych obiektów eksportowano do formatów csv./.xlsx.

Tabela 2. Parametry segmentacji jąder komórkowych w programie Imaris.

Rycina; grupa	Wielkość ROI (XY)* (μm)	„Surface Grain Size” (μm)	“Diameter of Largest Sphere” (μm)	“Manual Threshold”	“Region Growing Estimated Diameter” (μm)	“Volume” (μm ³)
14C; ISEE,	232×232	0,568	80	25 – max	4,04	66,5 – 238,0
14D; ISEE	232×232	0,568	80	25 – max	4,04	66,5 – 365,0
14C; C _e 3D	200×200	0,568	80	25 – max	3,59	36,4 – 163,0
14D; C _e 3D	200×200	0,568	80	25 – max	3,59	36,4 – 243,0

12; 40x/20x ISEE	Cały obszar grudki lub 119×116 poza grudką	0,568	80	25 – max	4,04	66,5 – 365,0
12; 40x PBS	Cały obszar grudki lub 104×102 poza grudką	0,568	80	25 – max	3,59	36,4 – 243,0
12; 40x/20x ISEE, 12 μm, grudka	Cały obszar grudki	0,568	100	7 – max	4,04	66,5 – 365,0
12; 40x PBS, 10 μm	Cały obszar grudki lub 104×102 poza grudką	0,568	100	1 – max	3,59	36,4 – 243,0
12; 40x/20x ISEE, 12 μm poza grudką	119×116	0,568	100	1 – max	4,04	66,5 – 365,0

*W osi z analizowano całą grubość preparatu lub 10/12 μm w wyszczególnionych grupach.

Tabela 3. Parametry segmentacji limfocytów B w programie Imaris.

Rycina; grupa	Wielkość ROI (XY)* (μm)	„Cell Smallest Diameter” (μm)	„Cell Membrane Detail”	„Intensity Threshold” (μm)	„Quality Threshold”	„Volume” (μm ³)
16B; ISEE, grudka	Cały obszar grudki	5,02	0,568	20 - max	0,600	66,5 – 365,0
16B; PBS, grudka	Cały obszar grudki	4,12	0,568	20 - max	0,600	36,0 – 243,0
16B; ISEE, poza grudką	119×116	5,02	0,568	3,6 - max	0,600	66,5 – 365,0
16B; PBS, poza grudką	104×102	4,12	0,568	7,5 - max	0,600	36,0 – 243,0

*W osi z analizowano całą grubość preparatu lub 10/12 μm w wyszczególnionych grupach.

3.8 Porównanie detekcji jąder komórkowych w skrawkach 100 μm.

Tkanki (pochodzące z następujących po sobie skrawków tego samego WL) wybarwione i oczyszczone zgodnie z powyższym opisem, poddawano obrazowaniu z wykorzystaniem SP8 wyposażonego w obiektyw 40×/1.3 NA. Aby odnaleźć oczekiwaną objętość obiektów poddawanych segmentacji, zmierzono po 100 średnic przekrojów jąder komórkowych

zlokalizowanych na terenie grudek limfocytów B. Dane były następnie poddawane analizie w oprogramowaniu Imaris (Bitplane) z wykorzystaniem funkcji *surface*. Analizie poddawano identyczną liczbę regionów o ściśle określonych parametrach zawartych w Tabeli 2.

3.9 Analiza statystyczna.

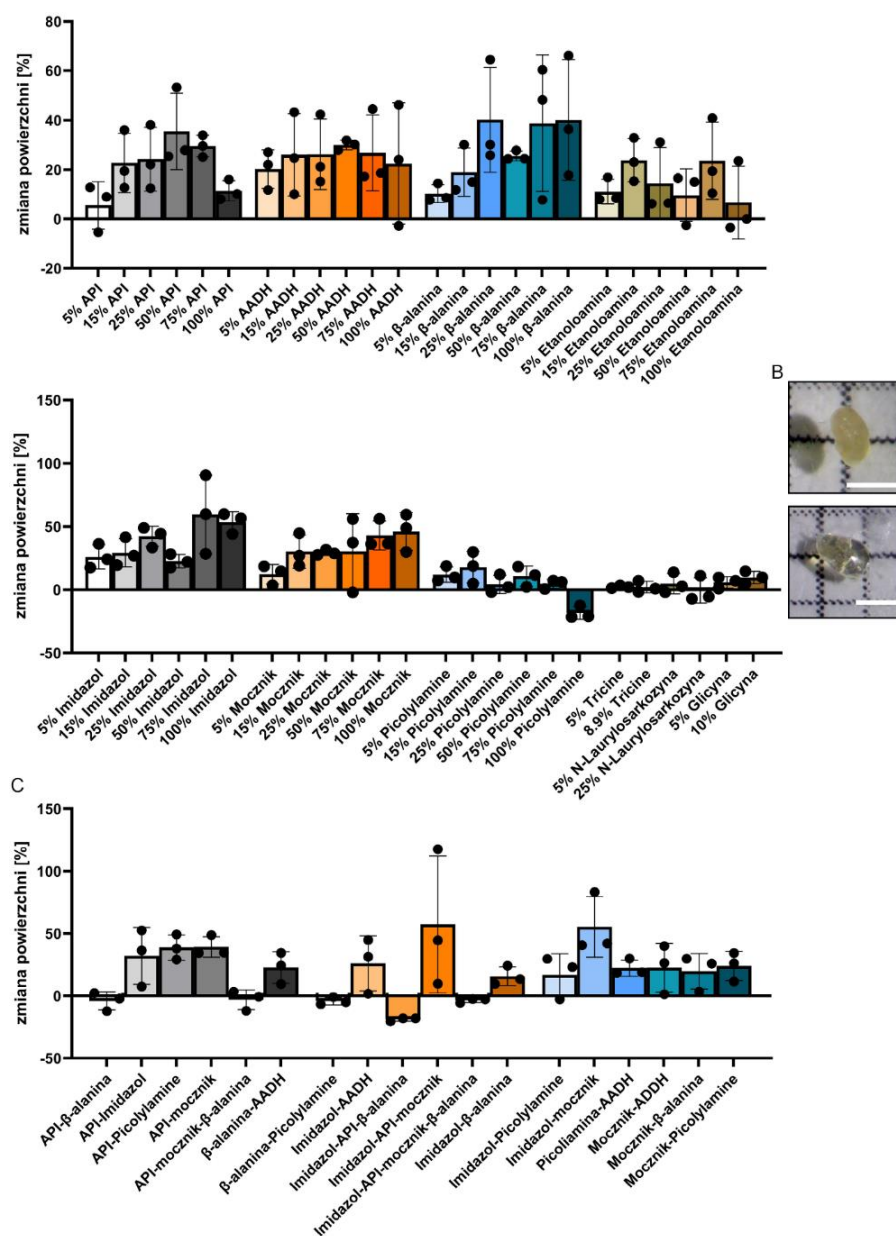
Na wykresach przedstawiono średnie ze słupkami błędów jako błędów standardowego średniej. Dane uznawano za statystycznie istotne dla $P < 0.05$. Liczbę badanych elementów podano w legendach rycin. Dane przeanalizowano statystycznie w programie GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). W wypadku danych o rozkładzie normalnym (testowano przy użyciu testu Shapiro-Wilka) i równych wariancjach pomiędzy grupami stosowano test *t*-Studenta lub jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA). W wypadku analizy wariancji dla istotnych statystycznie wyników przeprowadzano test post-hoc Tukeya.

4. Wyniki

4.1 Poszukiwanie roztworu rozszerzającego tkanki o potencjalnie wysokim współczynniku załamania światła.

Wykorzystując dotychczas przeprowadzone obszerne (1 691 substancji) badanie przesiewowe związków o potencjale do rozszerzania tkanek i utrzymywania wysokiego (>1,45) RI w roztworach wodnych (84), wyselekcjonowano 10 związków do oceny ich wpływu na zmianę powierzchni mysich WL. Pierwsza seria doświadczeń wykazała, iż wszystkie testowane związki, oprócz N-laurylosarkozyny, glicyny oraz Tricine, doprowadzały do znacznego (co najmniej 20%) powiększenia powierzchni tkanek już w ciągu 24 godzin od rozpoczęcia inkubacji (**Ryc. 5A**). Ponadto, zauważono że imidazol doprowadza do oczyszczenia optycznego WL (**Ryc. 5B**).

A

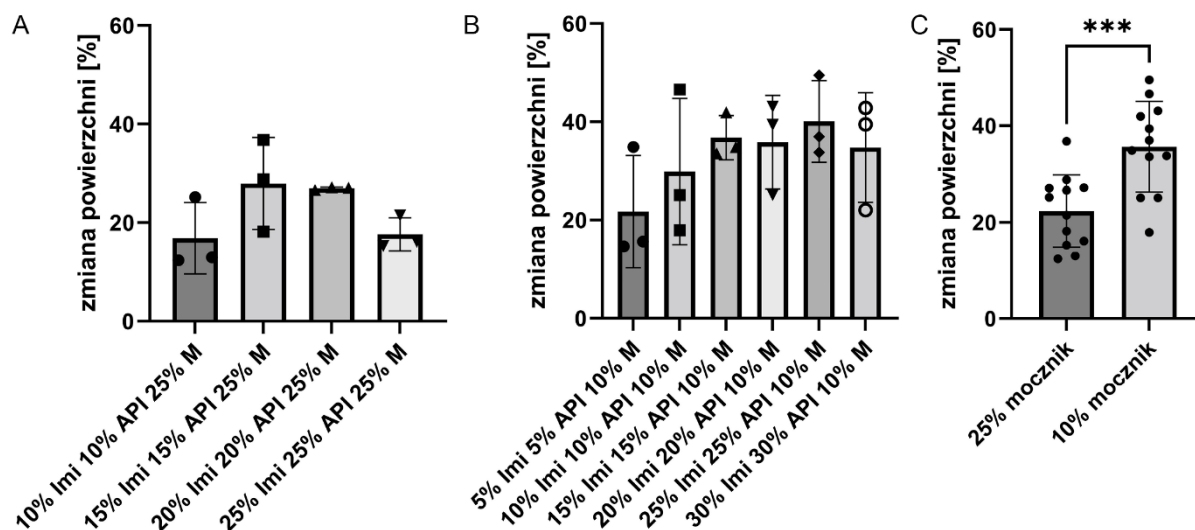


Rycina 5. Wstępna ocena potencjału rozszerzania WL przez badane związki chemiczne.

(A) W wyniku przeprowadzonego testu przesiewowego wykluczono z dalszych badań 3 związki o niskim (<20% wzrostu powierzchni) potencjale rozszerzania mysich WL – N-laurylosarkozynę, glicynę oraz Tricine. (B) Imidazol dokonuje nie tylko znaczącego rozszerzenia WL, ale również prowadzi do ich oczyszczenia optycznego. (C) 10% roztwory zawierające imidazol, API lub mocznik charakteryzują się najwyższym potencjałem do ograniczonego rozszerzania tkanek. Skala, 1 mm.

Następnie zbadano, czy możliwe jest uzyskanie nasilonego powiększenia narządów po łącznym zastosowaniu mieszanin wyselekcjonowanych związków, obserwując najwyższe wartości średniego rozszerzania powierzchni (co najmniej o 30%) w wypadku 5 par związków: (I) 1-(3-aminopropyl)imidazolu (API) z imidazolem, (II) API z mocznikiem, (III) mocznika z imidazolem, (IV) API z imidazolem i mocznikiem oraz (V) API z 3-Picolylaminą (Ryc. 5C). W tym etapie usunięto 3-Picolylaminę z dalszych analiz z uwagi na brak korzystnego działania w połączeniu przy jednoczesnej tendencji do powodowania obkurczenia tkanki w wyższych niż 15% stężeniach (Ryc. 5A), których użycie byłoby zapewne niezbędne do osiągnięcia wysokiego RI ostatecznego roztworu.

Aby zweryfikować, czy w wypadku kombinacji API z imidazolem i mocznikiem, to ten ostatni [jako związek znany ze swych właściwości indukujących pęcznienie tkanek (37)] wywiera najsilniejsze działanie, przeprowadzono obserwację wpływu różnych stężeń API i imidazolu z dwoma, stałymi stężeniami mocznika – 10% oraz 25% (Ryc. 6A-B).



Rycina 6. Stężenie imidazolu i API odgrywa ważniejszą rolę podczas rozszerzania mysich WL niż stężenie mocznika.

Aby ocenić rolę imidazolu, API oraz mocznika w rozszerzaniu mysich WL, przetestowano związki o różnych stężeniach imidazolu i API przy stałych stężeniach mocznika (A) – 25% i (B) – 10%. (C) Roztwory zawierające

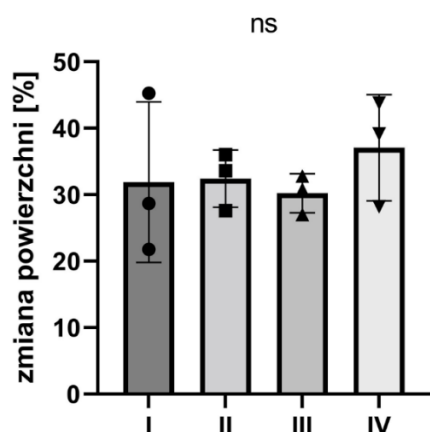
10% mocznika charakteryzują się wyższym potencjałem do rozszerzania WL. Test *t*-Studenta dla niezależnych grup: $t=3,841$, $df=22$, $p = 0,0009$. Imi – imidazol, API - 1-(3-aminopropyl)imidazol, M – mocznik.

Wykazano, iż kumulatywnie roztwory zawierające 25% mocznika charakteryzują się niższym potencjałem rozszerzania tkanek (średnio 22,34% vs 35,64%, Ryc. 6C). Jednocześnie zaobserwowano, iż roztwór składający się w 30% z API, 30% imidazolu, 25% mocznika i 15% wody, był roztworem spełniającym definicję roztworu przesyconego – możliwym do rozpuszczenia w warunkach podwyższonej temperatury (~40°C), jednak szybko krystalizującym po ekspozycji na powietrze lub w temperaturze pracowni mikroskopii konfokalnej (~22°C).

Opierając się na powyższych obserwacjach, poczyniono próby uzyskania roztworu będącego mieszaniną API, imidazolu, mocznika i wody o wysokim RI (> ~1,45), zawierającym mniej niż 25% mocznika oraz mniej niż 30% API oraz imidazolu. Opracowano 4 alternatywne roztwory o podobnym RI oraz składzie (**Tabela 4**), a także potencjałe do rozszerzania powierzchni węzłów limfatycznych o ~30-35% (**Ryc. 7**).

Tabela 4. Skład testowanych roztworów.

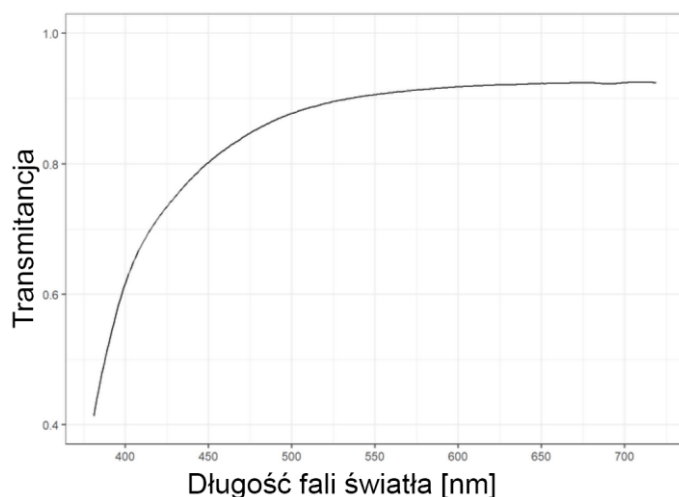
Numer	Stężenie imidazolu [%]	Stężenie API [%]	Stężenie mocznika [%]	Stężenie wody [%]	RI
I	26	25	23	26	1,465
II	27,5	27,5	20	25	1,467
III	25	30	20	25	1,470
IV	30	25	20	25	1,465



Rycina 7. Opracowane roztwory nie różnią się potencjałem rozszerzania WL.

Żaden spośród czterech opracowanych roztworów nie odbiega znacząco pod względem potencjału rozszerzania WL. Dokładny skład roztworów zawiera Tabela 4. Jednokierunkowa ANOVA, $p > 0,05$.

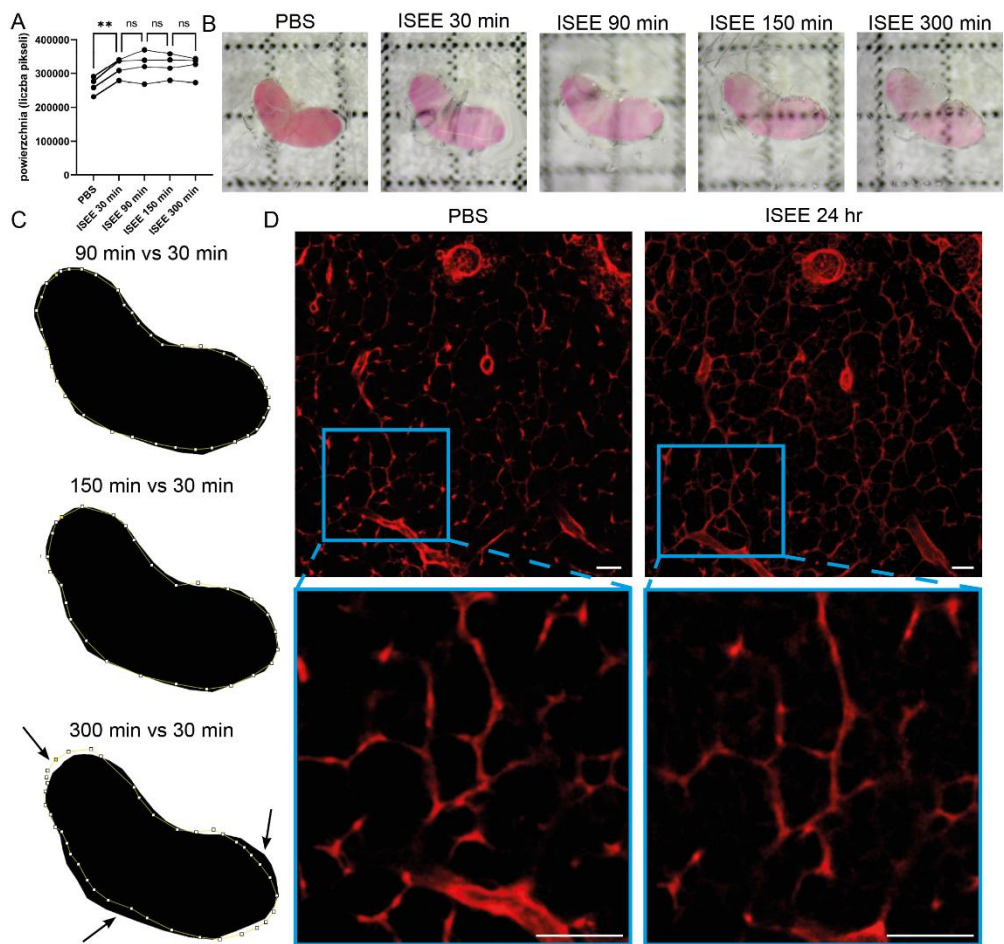
Z uwagi na wymienione podobieństwa, do dalszych badań wybrano roztwór charakteryzujący się najwyższym RI (roztwór „III”). W skład ostatecznego roztworu ISEE (ang. **I**mproved **S**egmentation with **bE**ning **E**xpansion), który posłużył do dalszych eksperymentów, wchodzi 30% w/v API, 25% w/v imidazolu, 20% w/v mocznika oraz 25% wody. ISEE ma RI = 1,47, pH ~12 oraz charakteryzuje się wysoką transmitancją w zakresie widma światła widzialnego (**Ryc. 8**).



Rycina 8. Wykres transmitancji roztworu ISEE w spektrum światła widzialnego.

4.2 ISEE dokonuje błyskawicznego oraz trwałego oczyszczenia i rozszerzenia grubych skrawków tkanek.

W celu zweryfikowania po jakim czasie reakcja rozszerzania się wysyca, 200- μ m skrawki WL inkubowano w ISEE przez 5 godzin okresowo je fotografując. Co interesujące, reakcja rozszerzenia wysycała się już po pierwszych 30 minutach inkubacji, a powierzchnia pozostawała taka sama w ciągu kolejnych 4,5 h (**Ryc. 9A-B**). Pomimo niezmiennej w czasie powierzchni WL, zauważono niewielkie odchylenia kształtów ich powierzchni w trakcie trwania inkubacji (**Ryc. 9C**). Aby sprawdzić, czy obserwowane niewielkie odchylenia od kształtu pierwotnego to wynik działania ISEE, czy mechanicznej manipulacji eksperymentatora, przeprowadzono obrazowanie konfokalne sieci komórek FRC charakteryzujących się skomplikowaną strukturą. Obrazowanie preparatów wyznakowanych przeciwko antygenowi ER-TR7 przed oraz po dobie od rozpoczęcia inkubacji z ISEE potwierdza, iż roztwór ten dokonuje rozszerzania izometrycznego i tym samym utrzymuje strukturę subkomórkową preparatów (**Ryc. 9D**).



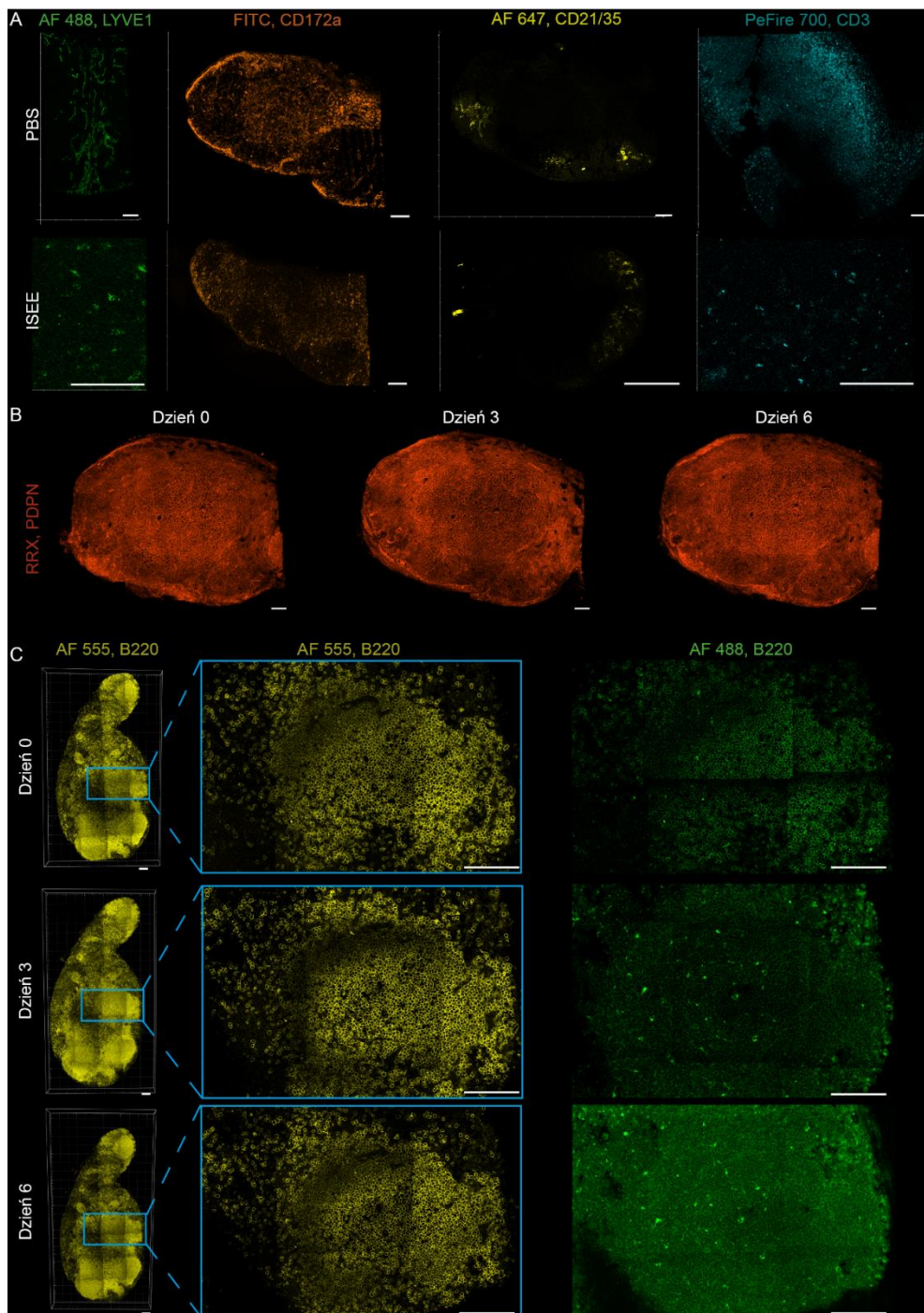
Rycina 9. ISEE rozszerza skrawki WL gwałtownie i równomiernie.

(A) W ciągu 30 minut od rozpoczęcia inkubacji, 200- μ m skrawki WL uzyskują ostateczną wartość rozszerzenia powierzchni [n = 4; jednokierunkowa ANOVA, test post-hoc Tukeya; **p < 0,01, *p < 0,05]. (B) Zdjęcia makroskopowe przedstawiające zmianę reprezentatywnego skrawka podczas 5 godzin inkubacji w ISEE (1 kratka = 1 mm). (C) Na maskę kształtu wybranego węzła inkubowanego 30 minut (kolor czarny) naniesiono obrys kształtów tego samego węzła po 150 i 300 minutach inkubacji (kolor żółty). Kształt uchwycony po 150 minutach niemal idealnie odpowiada kształtowi z 30 minuty inkubacji, jednak w 300 minucie widoczne są niewielkie zmiany kształtu (strzałki). (D) Obrazowanie tego samego skrawka wybarwionego anty-ER-TR7 przed (PBS) i po dobie rozszerzenia (ISEE 24 hr), prezentujące zachowany kształt subkomórkowy pomimo makroskopowego rozszerzenia. Skala, 25 μ m.

4.3 ISEE gwarantuje stabilizację sygnału fluorescencyjnego podczas IHC z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał.

Z uwagi na to, iż wiele spośród technik TOC wykazuje tendencję do gwałtownego wyżarzania fluoroforów, podjęto próbę weryfikacji kompatybilności ISEE z IHC z przeciwciałami bezpośrednio skoniugowanymi z następującymi 7 cząsteczkami: Alexa Fluor (AF) 488, -594 i -647, FITC, Pe, PeFire 640 i -700. Co zaskakujące, już w ciągu 30 minut nie uzyskano specyficznego sygnału w żadnym z wykonanych barwień IHC (**Ryc. 10A**). Jako, że już wcześniej wykonywano testowe obrazowania z drugorzędowymi przeciwciałami nie

obserwując znaczącego osłabienia intensywności fluorescencji, przeprowadzono ponowne barwienie z tym samym roztworem ISEE z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko podoplaninie oraz B220 oraz drugorzędowymi skoniugowanymi z odpowiednio czerwoną rodaminą (podoplanina) i AF 488, -555, -594 i -647 (B220). 3-krotne obrazowanie tych samych tkanek wykazało zachowanie sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z rodamininy (Ryc. 10B) oraz AF 555 (Ryc. 10C lewy panel) a także AF 594 i 647 (wyniki nie załączone), na przestrzeni minimum 6 dni. W wypadku AF 488 silny sygnał utrzymywał się wyłącznie w dniu oczyszczania i rozszerzania (Ryc. 10C prawy panel).

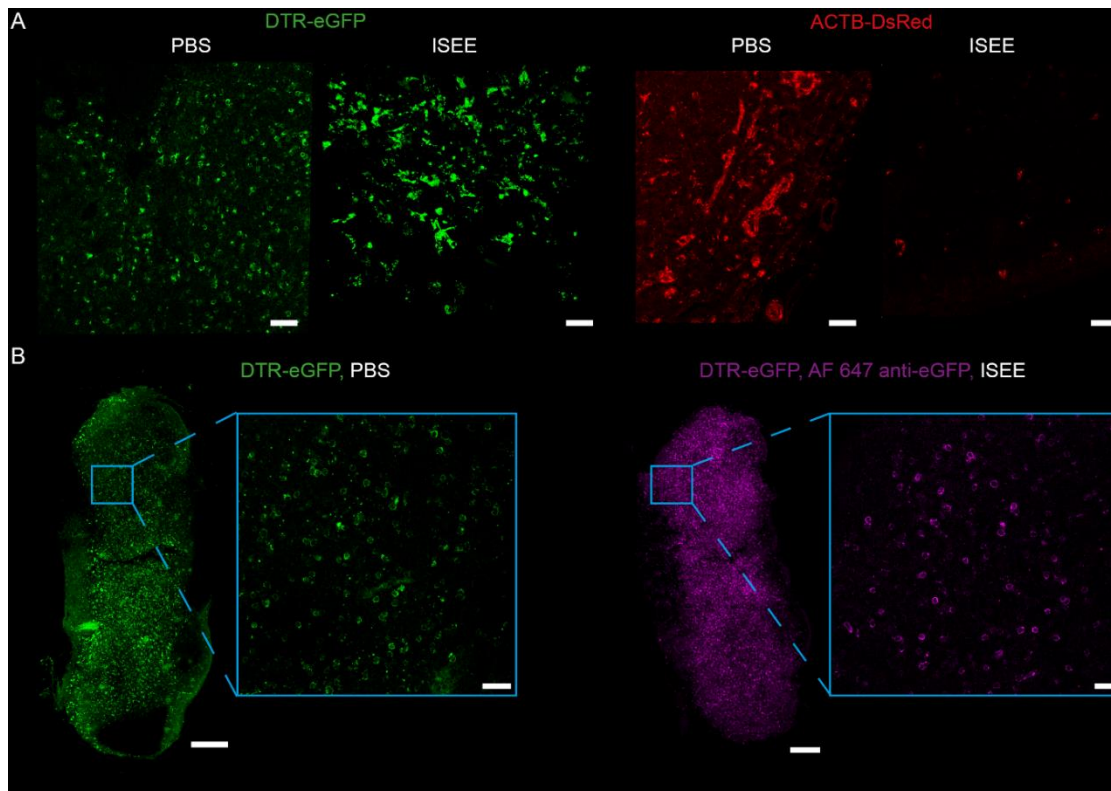


Rycina 10. ISEE jest kompatybilne z barwieniem z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał.

(A) W ciągu 30 minut od rozpoczęcia inkubacji, sygnał pochodzący ze wszystkich badanych fluoroforów w wypadku przeciwciał bezpośrednio skoniugowanych zanika lub staje się niespecyficzny. W wypadku przeciwciał drugorzędowych, (B) koniugaty rodamininy czerwonej, (C) AF 555 i AF 488 zachowują sygnał fluorescencyjny pod wpływem ISEE, choć tylko przez dobę w wypadku tego ostatniego. Skala, 100 μm . RRX – Rhodamine RedTM-X, AF – Alexa Fluor, PDPN – podoplanina.

4.4 ISEE umożliwia detekcję endogennych fluoroforów po wcześniejszym ich wybarwieniu podczas IHC.

Następnie zweryfikowano wpływ ISEE na zachowanie fluorescencji emitowanej przez endogenne białkowe fluorofory (**Ryc. 11A**) – eGFP w wypadku myszy DTR-eGFP (u których białko fuzyjne receptora dla toksyny błoniczej oraz eGFP ulega ekspresji pod promotorem *Foxp3*), DsRed w tkankach myszy ACTB-DsRed.MST (u których DsRed ulega ekspresji pod promotorem aktyny) oraz YFP w tkankach myszy YARG (u których gen kodujący eYFP został ulokowany poniżej sekwencji kodującej arginazę 1). ISEE już po 30 minutach inkubacji dokonuje pełnego wyżarzenia wskazanych fluoroforów, pozostawiając w tkance wyłącznie autofluorescencyjny sygnał, szczególnie widoczny w wypadku kanału pobudzonego w zakresie światła zielonego ~ 488 nm (Ryc. 11A). Z uwagi na niski z reguły stosunek sygnału pochodzącego z białkowych fluoroforów do tła tkanki (z wyłączeniem kilku modeli zwierzęcych o nadzwyczaj silnej fluorescencji np. myszy reporterowych Thy1-GFPM) nierzadką praktyką pozostaje wzmocnienie sygnału endogennej fluorescencji poprzez barwienie IHC. Korzystając z przeciwciała skierowanego przeciwko GFP zweryfikowaliśmy, iż podobnie jak w wypadku innych barwień z przeciwciałami drugorzędowymi, możliwa jest skuteczna detekcja białkowych fluoroforów pomimo ich pierwotnego wyżarzenia.

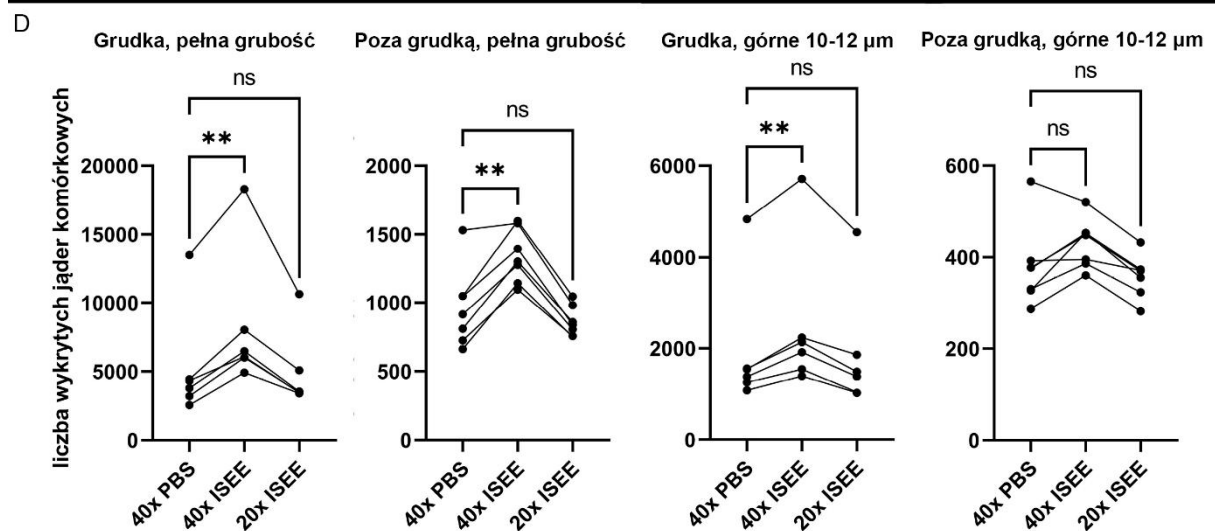
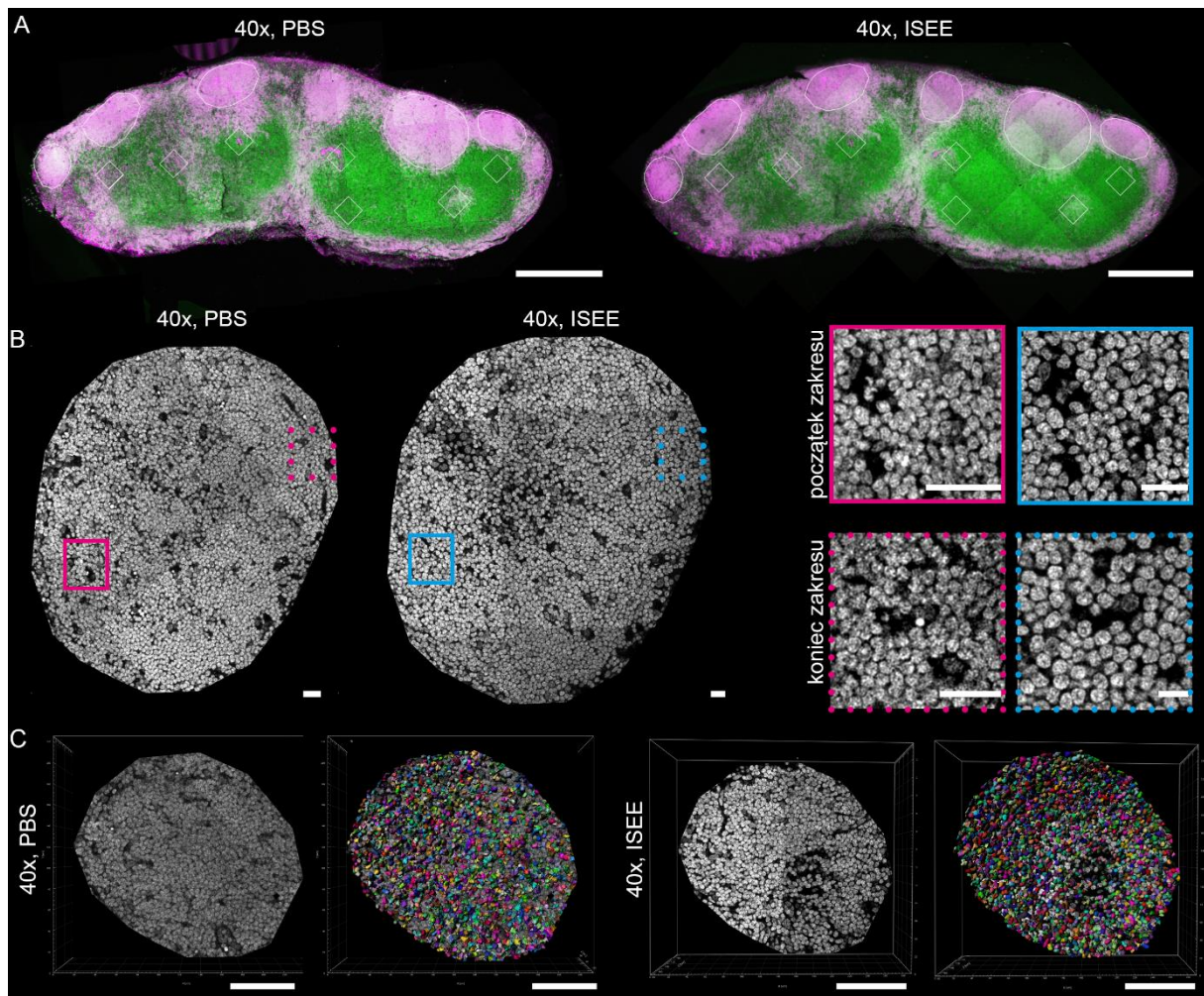


Rycina 11. ISEE umożliwia detekcję endogennych białkowych fluoroforów po uprzednim barwieniu IHC. (A) W ciągu 30 minut od rozpoczęcia inkubacji, sygnał pochodzący ze wszystkich badanych endogennych białkowych fluoroforów ulega wyżarzeniu, pozostawiając sygnał autofluorescencyjny. (B) Zastosowanie barwienia skierowanego przeciwko eGFP (prawy panel) pozwala dokonać detekcji pierwotnego sygnału (lewy panel). Skala, 30 μm dla panelu A oraz powiększonych obszarów, 100 μm dla pozostałych.

4.5 ISEE poprawia dokładność segmentacji w porównaniu z klasycznym protokołem obrazowania konfokalnego.

Po zweryfikowaniu użyteczności ISEE wyrażonej (1) bardzo szybkim i równomiernym rozszerzaniem i oczyszczaniem oraz (2) kompatybilnością z barwieniem IHC z wykorzystaniem najczęściej stosowanych fluoroforów, przeprowadziliśmy doświadczenie porównujące dokładność segmentacji sygnału pochodzącego z barwienia jądrowego. Aby zweryfikować hipotezę zakładającą, że rozszerzenie obiektów zainteresowania (jąder komórkowych) oraz przestrzeni pomiędzy nimi wraz z efektem oczyszczenia poprawi dokładność analizy, przeprowadzono obrazowanie tych samych fragmentów tkanek przed oczyszczeniem z obiektywem 40 \times /1.30 (warunki kontrolne) oraz z obiektywami 40 \times /1.30 i 20 \times /0.75 po ISEE (warunki eksperymentalne). Żeby jak najbardziej zbliżyć się do typowych warunków obrazowania, doświadczenie przeprowadzono na tkankach o grubości 40 μm (obrazując je w całości w osi z) w rozdzielczości 1024 \times 1024 i prędkości 600 w formacie 8-bitowym, dostosowując moc lasera tak, aby minimalizować liczbę pikseli wykraczających poza

zakres detekcji. W obrębie WL oznaczono dwa typy regionów charakteryzujące się odmiennym stopniem upakowania komórek: (1) gęsto upakowane grudki oraz (2) regiony w obrębie strefy limfocytów T o niższym stopniu zagęszczenia komórkowego (**Ryc. 12A**). Objętość regionów w wypadku ISEE była automatycznie zwiększona z wykorzystaniem ImageJ przy założeniu liniowego rozszerzenia tkanki o 14,5%, co pozwoliło na skuteczne dopasowanie i wycięcie tych samych regionów (Ryc. 12A-B) stanowiąc kolejny dowód na izometryczność procesu rozszerzania. Poprawa rozdzielczości obrazowania po ISEE jest widoczna zarówno w górnych częściach zakresu obrazowania (ang. *stack*, efekt rozszerzania) jak i w częściach dolnych, gdzie obserwuje się nakładający efekt rozszerzania i oczyszczania (Ryc. 12B prawy panel). Zgodnie z hipotezą, poprawienie rozdzielczości obrazowania pod wpływem ISEE pozwoliło na dokonanie dokładniejszej segmentacji z wykorzystaniem półautomatycznego procesu tworzenia powierzchni w programie Imaris (Bitplane, Ryc.12C, założenia przyjęte do segmentacji dotyczące wielkości obiektów zostały opisane w Materiałach i metodach oraz Tabeli 2). Widząc, jak znacząco wraz ze wzrostem głębokości, zmniejsza się jakość uzyskiwanych obrazów w wypadku regionów kontrolnych, postanowiono powtórzyć analizę w obrębie tych samych regionów, jednak włączając wyłącznie pełne przekroje z pierwszych 10 (obrazowanie kontrolne) lub 12 μm (obrazowanie po rozszerzeniu) tkanki. Tak znaczące ograniczenie obrazowania z jednej strony pozwala na zbadanie przede wszystkim efektu rozszerzania, a nie oczyszczania (z uwagi na dość podobną jakość danych przy wierzchu tkanki), faworyzuje jednak segmentację dla warunków kontrolnych (które zakładają obecność odpowiednio mniejszych obiektów, a które to w sposób sztuczny pojawią się na liniach cięcia tkanki). W wyniku pogłębionej analizy ilościowej wykazano skuteczność ISEE w wypadku grudek, co jednak nie miało miejsca w wypadku mniej gęsto upakowanych regionów limfocytów T (Ryc. 12D prawy panel).



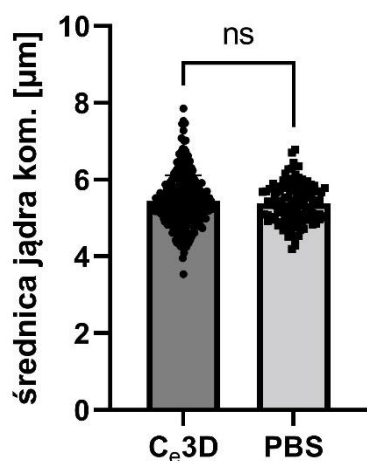
Rycina 12. ISEE ułatwia detekcję jąder komórkowych.

(A) Te same regiony 40- μ m skrawka mysiego WL zostały zobrazowane przed (PBS) i po optycznym oczyszczeniu i rozszerzeniu (ISEE) i wykorzystane do analizy ilościowej pod względem liczby jąder komórkowych (elipsy prezentują analizowane grudki zaś kwadraty – regiony pozagrudkowe). (B) ISEE poprawia jakość i rozdzielczość obrazowania zarówno na początku, jak i na końcu zakresu, (C) co pozwala na dokonanie dokładniejszej segmentacji. (D) ISEE zwiększa liczbę wykrywanych jąder komórkowych przy zastosowaniu takiego samego powiększenia układu optycznego nie tylko w całej objętości badanych regionów, ale również wierzchnich

warstwach obrazowanego zakresu w wypadku grudek. Jednokierunkowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya, $**p < 0,01$, $n = 6$ regionów grudkowych i $n = 7$ pozagrudkowych. Skala, (A) 500 μm , (B) 20 μm , (C) 100 μm .

4.6 ISEE poprawia dokładność segmentacji w porównaniu z referencyjną techniką TOC.

Choć uzyskane wyniki wykazały poprawę segmentacji jąder komórkowych po zastosowaniu ISEE w porównaniu do grupy kontrolnej, obrazowanej w sposób klasyczny po wcześniejszym zatopieniu w Fluoromount-G[®], zweryfikować należało, czy efekt ten pozostanie utrzymany w porównaniu z inną techniką TOC. W tym celu zastosowano technikę C_e3D – metodę referencyjną dla oczyszczania mysich WL, o udokumentowanym braku wpływu na wielkość tkanki lub minimalnie ją obkurczającą (w przeprowadzonych oznaczeniach nie zaobserwowano różnic pomiędzy średnimi średnicami jąder komórkowych zlokalizowanych w regionie grudek pomiędzy C_e3D i obrazowaniem kontrolnym, **Ryc. 13**). Dzięki temu możliwa była weryfikacja, czy samo rozszerzanie (niezależnie od oczyszczania) może poprawiać segmentację jąder komórkowych w wypadku mysich WL.

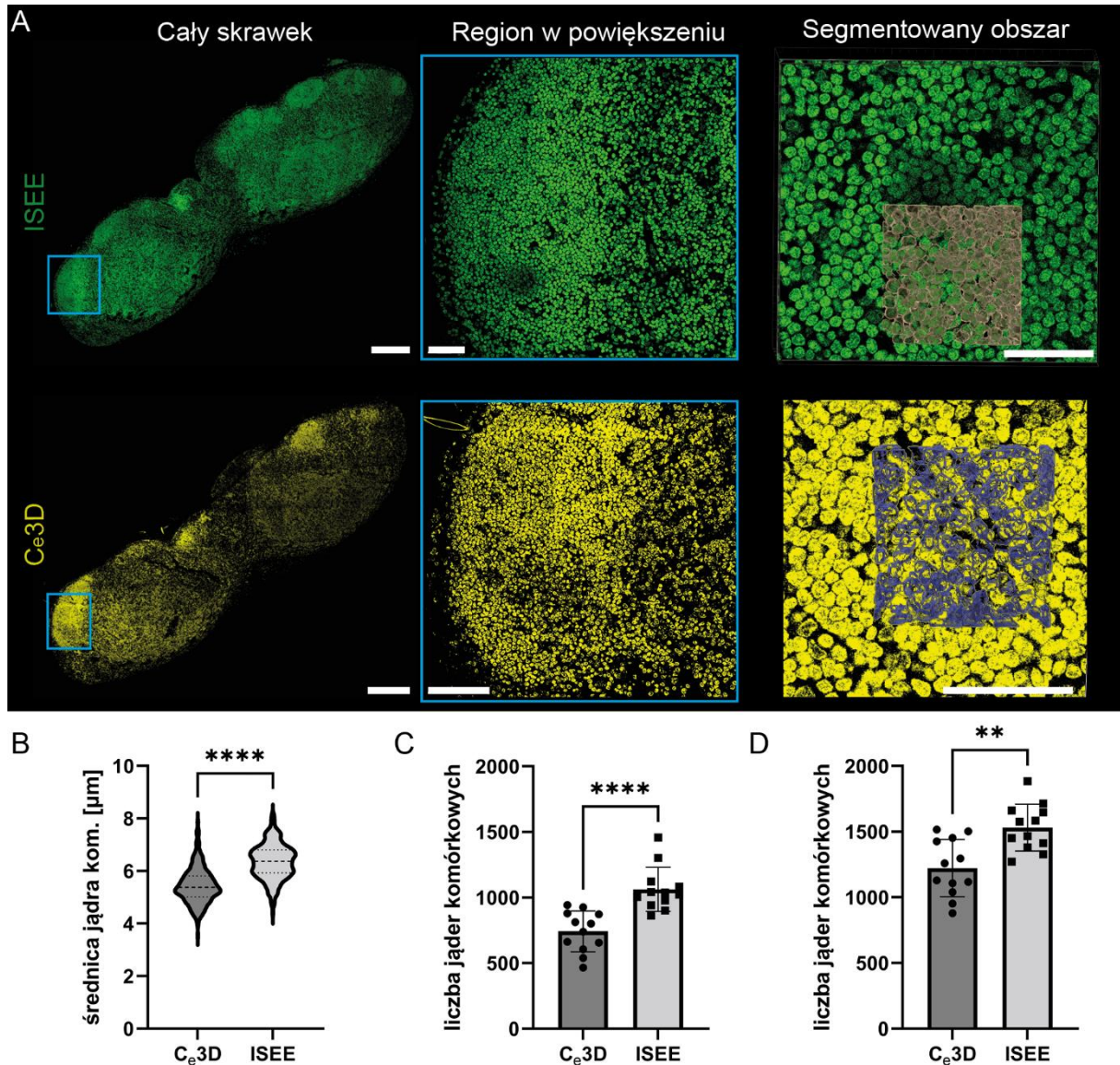


Rycina 13. C_e3D nie zmienia kształtu oczyszczanej tkanki.

Średnica jąder komórkowych mierzonych w obrębie grudek WL w tkankach poddanych oczyszczaniu z wykorzystaniem C_e3D nie odbiega od średnicy obserwowanej w tkankach kontrolnych. Test t-Studenta dla niezależnych grup: $t=0,8354$, $df=419$, $p = 0,4039$.

Z uwagi na brak możliwości dokonania obrazowania tych samych regionów w ISEE i po C_e3D i na odwrót, obrazowano kolejne, 100- μm skrawki pochodzące z tego samego WL, zakładając jednorodny stopień upakowania grudek (**Ryc. 14A**). W wyniku analizy ilościowej potwierdzono powiększenie wężła po ISEE o $\sim 15\%$ liniowo w porównaniu do niezmiennącej wielkości tkanki C_e3D (**Ryc. 14B**) oraz udowodniono, iż widoczne „gołym

okiem” powiększenie przestrzeni pomiędzy jądrami komórkowymi w wypadku ISEE poprawia jakość segmentacji w stosunku do C_e3D niezależnie od przyjętych warunków wstępnych tego procesu (Ryc. 14C-D).

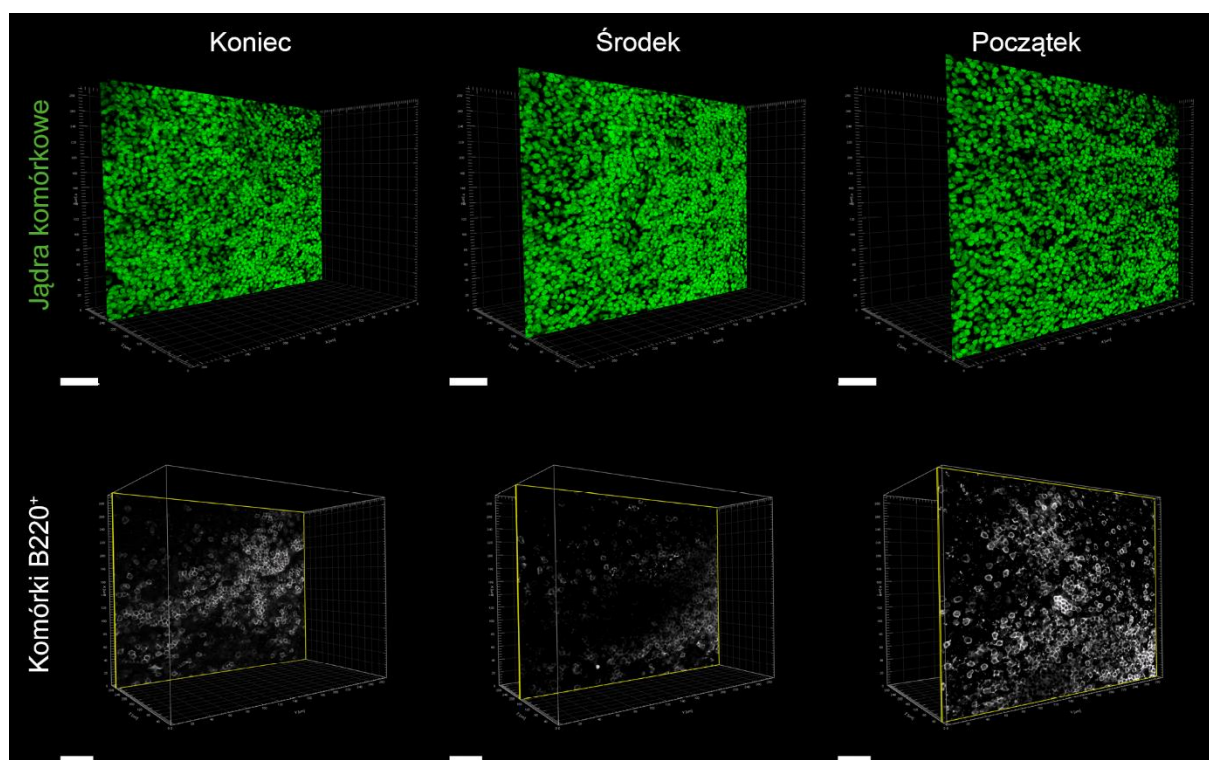


Rycina 14. ISEE ułatwia detekcję jąder komórkowych w porównaniu do referencyjnej metody TOC.

(A) 100- μ m skrawki pochodzące z tego samego mysiego WL zostały zobrazowane po optycznym oczyszczeniu i rozszerzeniu (ISEE) oraz oczyszczeniu (C_e3D) i wykorzystane do analizy ilościowej pod względem liczby jąder komórkowych. (B) ISEE zwiększa średnicę jąder komórkowych zmierzonych w grudkach o ~15% [test *t*-Studenta dla niezależnych grup: $t=16,75$, $df=598$, **** $p < 0,0001$], (C-D) co przekłada się na poprawę detekcji jąder komórkowych w wypadku ISEE niezależnie od przyjętych założeń segmentacji. (C) Na potrzeby segmentacji założono, iż wykrywane obiekty to idealne kule których promień, plus i minus dwa odchylenia standardowe, wyliczono na podstawie zmierzonych średnic [test *t*-Studenta dla niezależnych grup: $t=4,839$, $df=22$, **** $p < 0,0001$]. (D) W wypadku tej analizy do górnego zakresu wyliczonej w (C) objętości dodano 50%, kompensując

spadek rozdzielczości w osi z [test *t*-Studenta dla niezależnych grup: $t=3,789$, $df=22$, $**p = 0,01$]. Skala, całe skrawki 300 μm , pozostałe regiony 50 μm .

Należy podkreślić, iż możliwość obrazowania konfokalnego z wykorzystaniem ISEE nie ogranicza się do 100 μm skrawków. Aby to zweryfikować, przeprowadzono obrazowanie skrawka WL o pierwotnej grubości 200 μm (czyli ~ 230 μm po rozszerzeniu), co stanowi wartość graniczną dla katalogowego dystansu roboczego obiektywu HC PL APO CS2 40 \times /1.30 (WD = 0,24 mm). Zarówno w wypadku barwienia jądrowego, jak i IHC z wykorzystaniem przeciwciała anti-B220, uzyskano wysokiej jakości dane na początku i na końcu obrazowanego obszaru (**Ryc. 15**).



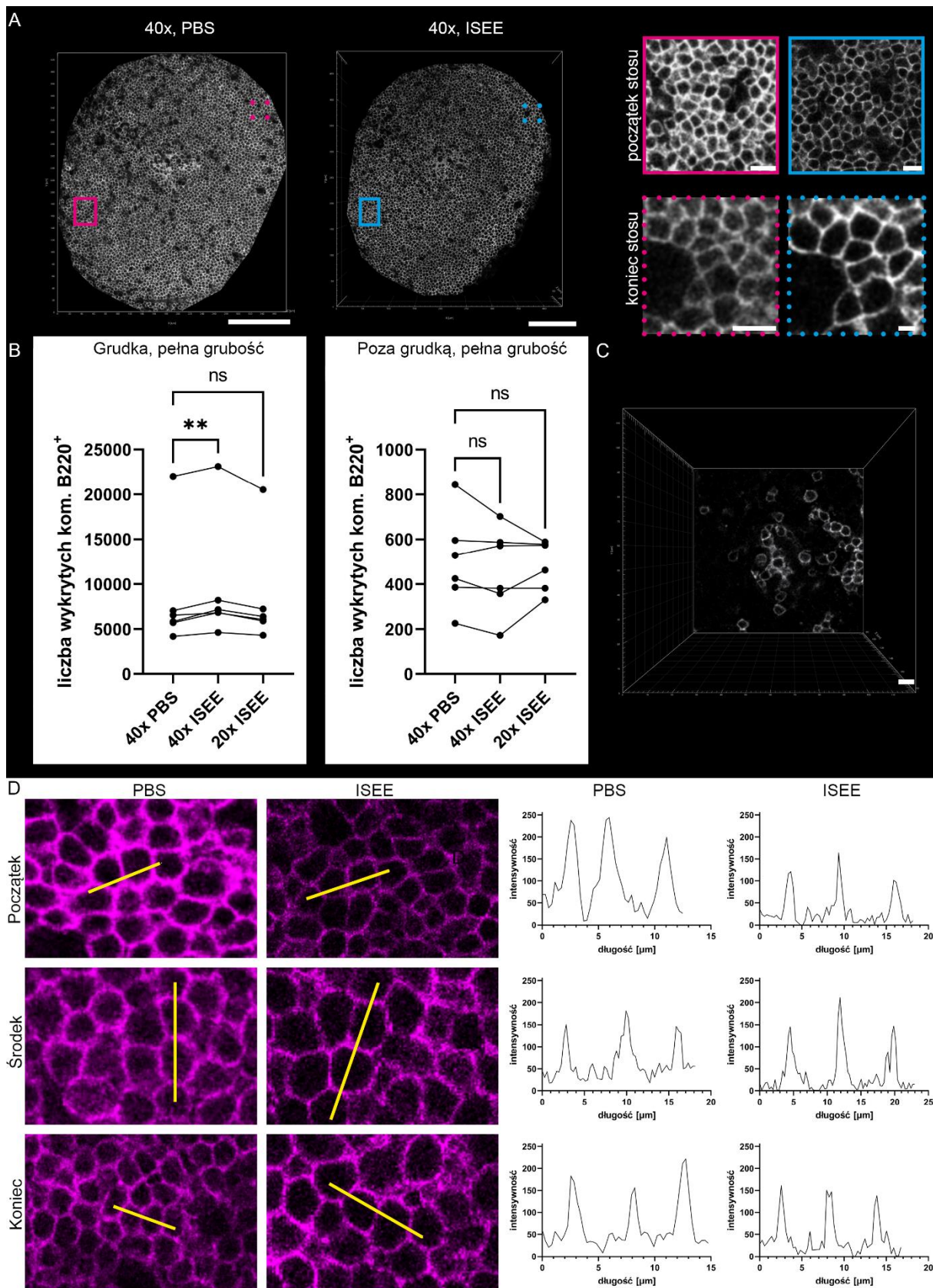
Rycina 15. ISEE pozwala na obrazowanie grubych skrawków z zachowaniem wysokiej jakości sygnału.

Pierwotnie 200- μm skrawki mysich WL zobrazone z wykorzystaniem obiektywu HC PL APO CS2 40 \times /1.30 potwierdzają wysoki stopień przezroczystości uzyskiwanych preparatów. Skala, 50 μm .

4.7 ISEE gwarantuje preferencyjne warunki detekcji sygnału błonowego .

Po obserwacji użyteczności rozszerzania w stosunku do detekcji bardzo gęsto upakowanego sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z jąder komórkowych, podjęto próbę weryfikacji potencjalnej korzyści ze stosowania ISEE do wykrywania sygnału błonowego. W tym celu ponownie zastosowano barwienie anti-B220 pozwalające na detekcję ogromnej

większości limfocytów B i dokonano analizy w sposób analogiczny do sygnału jądrowego, tj. z wykorzystaniem WL o grubości 40 μm obrazowanych przed (PBS) i po oczyszczeniu i rozszerzeniu (ISEE, **Ryc. 16A**). Podobnie jak w wypadku jąder komórkowych, sygnał błonowy charakteryzował się podwyższoną jakością oraz obniżonym sygnałem pochodzącym z tła, co przełożyło się na skuteczniejszą detekcję obiektów z wykorzystaniem modułu *cells* w programie Imaris w wypadku gęsto upakowanych grudek, jednak pozostawało bez znaczenia w regionach pozagrudkowych charakteryzujących się znacznie rozproszonym sygnałem (Ryc. 16B-C). Skuteczność detekcji błonowego sygnału fluorescencyjnego dodatkowo zweryfikowano poprzez zbadanie intensywności pikseli pochodzących z tych samych komórek na trzech wysokościach zakresu obrazowania (Ryc. 16D). Sygnał B220 z grup kontrolnych wykazuje wyższe tło oraz mniejszą specyficzność (szerszą podstawę szczytów). Podkreślić należy, że do optymalnego obrazowania poszczególnych grup zastosowano odmienne moce lasera (z uwagi na inną transmitancję/absorbancję tkanki nieprzezroczystej i po ISEE), więc przedstawione maksima intensywności nie powinny być porównywane bezwzględnie, a stanowić wskazówkę dotyczącą charakterystyki fluorescencji.

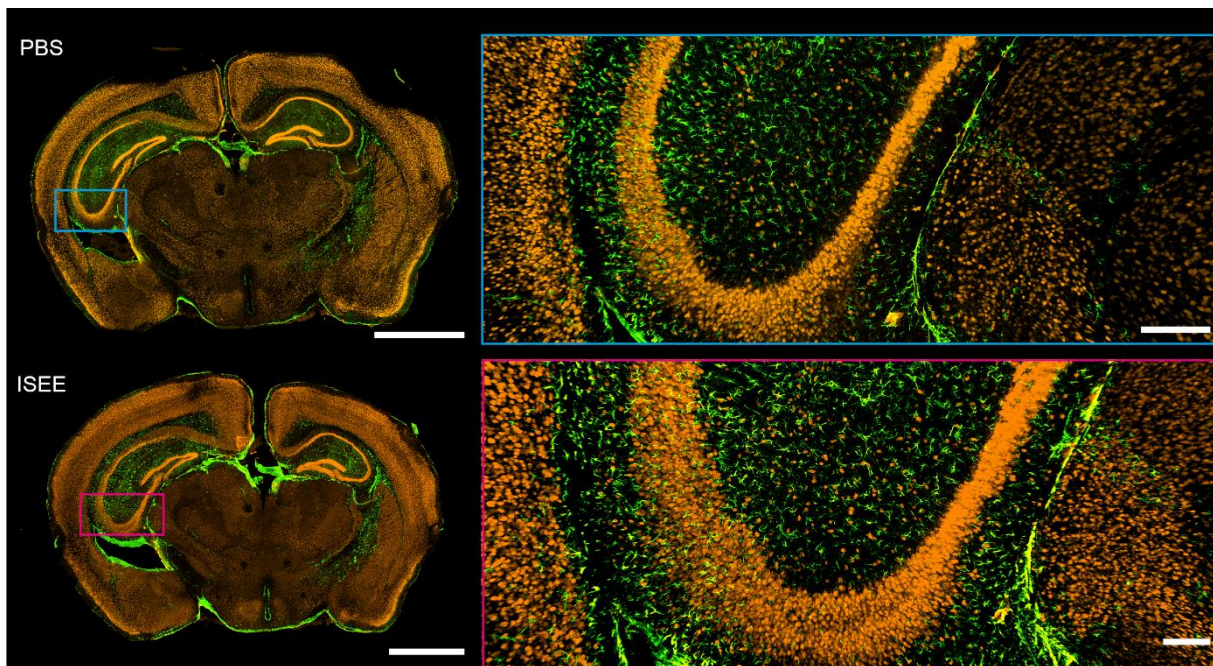


Rycina 16. ISEE ułatwia segmentację sygnału błonowego w wypadku jego gęstego upakowania.

(A) 40- μm skrawki mysiego WL zostały zobrazowane przed (PBS) i po optycznym oczyszczeniu i rozszerzeniu (ISEE) i wykorzystane do analizy ilościowej pod względem liczby komórek B220⁺. (B) ISEE zwiększa liczbę wykrywanych na podstawie sygnału błonowego komórek przy zastosowaniu takiego samego powiększenia układu optycznego w wypadku gęsto upakowanych w komórki B220⁺ grudek, ale już nie w rozproszonym sygnale z regionów pozagrudkowych. Jednokierunkowa ANOVA z testem post-hoc Tukeya, ****p** < 0.01, n = 6 regionów grudkowych i pozagrudkowych. (C) Przykładowy przekrój prezentujący komórki B220⁺ w regionie pozagrudkowym. (D) Pomiary intensywności sygnału pochodzącego z barwienia na komórki B220⁺ w funkcji przestrzeni potwierdzają, iż ISEE obniża tło oraz czyni obraz błonowy bardziej specyficznym/mniej rozlanym na sąsiadujące piksele. Skala, (A) całe obszary 100 μm , regiony powiększone oraz (C) - 10 μm .

4.8 ISEE i optyczne oczyszczanie innych narządów.

Ostatecznie zweryfikowano użyteczność ISEE w stosunku do oczyszczania i rozszerzania wszystkich głównych narządów myszy (wątroby, mózgu, płuc, śledziony, serca, nerek) uzyskując wyniki bardzo zbliżone do WL, tj. bardzo wysoki poziom przezroczystości oraz rozszerzenie liniowe na poziomie ~10-18% w zależności od narządu (dane nieuwzględnione). W wypadku mózgu przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne 150 μm skrawka skierowane przeciwko antygenom GFAP i NeuN, dokonując obrazowania przed (PBS) i po oczyszczeniu i rozszerzeniu (ISEE, **Ryc. 17**). Uwagę zwraca w pełni zachowany sygnał fluorescencyjny wraz z pierwotnym kształtem tkanki, pomimo jej rozszerzenia.



Rycina 17. ISEE wykazuje kompatybilność z IHC innych niż mysie WL narządów.

150- μm skrawek mysiego mózgu wybarwiony anty-GFAP (kolor zielony) oraz anty-NeuN (kolor pomarańczowy) i zobrazowany przed (PBS) oraz po zastosowaniu ISEE. Widok zarówno na całe skrawki, jak i powiększone

obszary (prawy panel) dowodzi zachowania sygnału fluorescencyjnego oraz kształtu rozszerzonej tkanki mózgu. Skala, całe obszary – 2 mm, regiony powiększone, 200 μm .

5. Dyskusja

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano ISEE – pierwszy roztwór optycznie oczyszczający i rozszerzający tkanki w sposób umiarkowany, powtarzalny oraz izometryczny (o ~15% liniowo). ISEE może wypełnić bardzo istotną lukę pomiędzy obecnie stosowanymi technikami TOC oraz ExM, pozwalając na istotnie dokładniejszą segmentację danych, bez olbrzymiego wzrostu ich objętości.

W wypadku oceny użyteczności danej techniki do obrazowania grubych (>40 μm) skrawków tkanek należy brać pod uwagę liczne czynniki wpływające zarówno na tkankę, ale również komfort pracy oraz dokładność i czas niezbędny do przeprowadzenia zaplanowanej analizy (85). Na jednym biegunie łatwości przeprowadzania TOC i późniejszej pracy z danymi pozycjonujemy metody rozpuszczalnikowe. Ich proste, krótkie protokoły, gwarantujące najwyższy stopień przezroczystości (86) i powodujące obkurczenie tkanek (a więc i ostatecznych plików) o kilkadziesiąt procent czynią z nich świetne narzędzie do wizualizacji dużych objętości tkanek w eksperymentach skoncentrowanych na ocenie rzadko występujących populacji komórek lub dużych struktur o charakterze tubularnym. Dzięki tym właściwościom metod rozpuszczalnikowych, Cai i wsp. (24) zbadali dystrybucję wszystkich głównych nerwów, a Pan i wsp. (23) liczbę mikroprzerzutów wykrywanych przez terapeutyczne przeciwciała monoklonalne w całych organizmach myszy. Z kolei obrazowanie z wykorzystaniem 3DISCO oraz iDISCO posłużyło do opracowania dwóch zautomatyzowanych metod segmentacji unaczynienia mózgowia – odpowiednio VesSAP (87) i TubeMap (88). Z drugiej strony, obkurczenie spowodowane zastosowaniem sDISCO uniemożliwiło analizę dystrybucji przestrzennej progenitorów komórek dendrytycznych w narządach limfatycznych, ograniczając badanie do tkanek nielimfoidalnych, np. płuc. (89).

ISEE oferuje znaczną przewagę w porównaniu do wymienionych, z uwagi na powtarzalne rozszerzanie tkanek o 15% liniowo. Dzięki temu, możliwe było uzyskanie preferencyjnych warunków segmentacji w porównaniu do tkanek kontrolnych zarówno w wypadku wybitnie gęsto upakowanego sygnału jądrowego w WL, jak i sygnału błonowego uzyskanego poprzez barwienie anti-B220 (Ryc. 12 i 16). Widząc jak znacząca jest różnica jakości uzyskiwanego sygnału wraz ze wzrostem głębokości obrazowania nawet cienkich (40- μm) skrawków WL, postanowiliśmy rozszerzyć analizę o wyłącznie bardzo dobrze oświetlone

obszary kontrolne (wierzchnie 10- μ m tkanki) oraz odpowiadający im zakres po ISEE (12- μ m). Mimo że podejście to faworyzuje tkanki kontrolne z uwagi na pojawiającą się powierzchnię cięcia, a wraz z nią małe obiekty (których szerszy zakres został naturalnie przyjęty w wypadku warunków dla segmentacji przed rozszerzeniem) ISEE wciąż pozwolił na znamienne skuteczniejszą detekcję sygnału jądrowego w wypadku gęsto upakowanych regionów grudek (Ryc. 12D). Idąc dalej, równie istotna była odpowiedź na pytanie, czy w istocie to efekt rozszerzenia, a nie samego oczyszczenia i zwiększenia jakości sygnału poprzez lepszy stosunek i profil sygnału do tła, odpowiada za poprawę warunków segmentacji. W tym celu przeprowadzono obrazowanie grubych (100- μ m) skrawków pochodzących z tego samego WL z wykorzystaniem ISEE oraz referencyjnej metody TOC dla WL – C_e3D, która wywiera neutralny lub minimalnie kurczący wpływ na ich wielkość. Proces segmentacji oferowany przez większość dostępnych programów, w tym wykorzystywany w badaniu Imaris, jest półautomatyczny. Oznacza to, że wyniki segmentacji/liczba wykrytych obiektów w dużym stopniu zależy od wartości objętości, czy sferyczności segmentowanych obiektów, zadanych przez eksperymentatora. Aby zminimalizować możliwość ingerencji w jakość segmentacji w poszczególnych warunkach, segmentację sygnału jądrowego przeprowadzono w 2 wariantach, z bardzo sztywnymi, ale i obiektywnymi założeniami dotyczącymi wielkości i kształtów obiektów, zakładając że przyjmują one kształt idealnej kuli i wyliczając ich objętość na podstawie średnic jąder komórkowych zmierzonych w obrębie grudek (Ryc. 14B). Niezależnie od przyjętej strategii segmentacji, jej wykonanie po ISEE było bardziej skuteczne, co potwierdzono zarówno ilościowo (Ryc. 14A), jak i było jasno zauważalne jakościowo (Ryc. 14B). Mimo że w aktualnym badaniu skupiono się na warunkach (zarówno obrazowania, jak i analizy danych) zbliżonych do tych stosowanych w większości laboratoriów biologicznych, a więc pozbawionych dostępu i doświadczenia do zaawansowanych technik segmentacji z wykorzystaniem sieci neuronalnych i uczenia maszynowego, w przyszłych doświadczeniach planowana jest weryfikacja użyteczności segmentacji po ISEE również w tak wysublimowanych warunkach (80).

Należy podkreślić, iż niektóre spośród dotychczas opisanych metod TOC powodują rozszerzenie powierzchni tkanek o kilkanaście-kilkadziesiąt procent, np. ScaleS w wypadku wątroby (19), UbasM jelita (15), czy CUBIC-L/R WL (16). W wypadku wymienionych roztworów stanowi to jednak efekt uboczny, który jest niekontrolowany, wysoce zmienny i zależny od tkanki. Przykładowo, SeeDB2 opisane na potrzeby super-rozdzielczego obrazowania mózgu w pełni zachowuje jego kształt (62), doprowadzając do wysoce

zmiennego, choć średnio ~20% wzrostu powierzchni inkubowanych WL (16). Dla porównania, zwiększenie powierzchni obserwowane w wypadku ISEE nie jest efektem mniej lub bardziej losowego procesu denaturacji i pęcznienia, prowadzących do deformacji tkanki, a pozwala na bardzo precyzyjne zachowanie struktury komórkowej (Ryc. 12B i 16B) oraz subkomórkowej (Ryc. 19D). Zachowanie tej ostatniej zweryfikowano z wykorzystaniem barwienia skierowanego przeciwko antygenowi ER-TR7 (90) umożliwiającemu wizualizację komórek oraz wypustek FRC tworzących niezwykle skomplikowaną strukturę przestrzenną, odpowiedzialną między innymi za poprawne przemieszczanie limfocytów i dystrybucję rozpuszczalnych antygenów w obrębie WL (91). Z uwagi na brak wykonania obrazowania metodami SRM i porównania tkanki przed i po ISEE, nie można wykluczyć obecności jakichkolwiek deformacji, niemniej przeprowadzone obrazowania konfokalne zarówno z WL, jak i mózgiem pozwalają stwierdzić, iż traktowanie ISEE nie wprowadza błędów do analizy dystrybucji przestrzennej komórek i odległości pomiędzy nimi (należy jednak z uwagą manipulować delikatną po rozszerzeniu tkanką, gdyż może to wprowadzać zmiany w jej kształcie, Ryc. 9C). Choć wydawać by się mogło że zaskakujący, wykazany izometryczny charakter rozszerzania z ISEE można lepiej zrozumieć w perspektywie najnowszych wyników grupy Uedy, która wykazała iż budowa utrwalonej, delipidowej tkanki, przypomina „elektrolitowy żel” podatny na powtarzalne kurczenie i rozciąganie (92). Ta sama grupa opisała pierwszy roztwór rozszerzający mysie mózgowie, bez korzystania z żeli akrylamidowych charakterystycznych dla ExM. Niestety, znaczny współczynnik uzyskiwanego rozszerzenia (~10× pod względem objętości) sprawia że obrazowanie 1 mózgowia z wykorzystaniem LSFM (z krokiem w osi z = 5 μm) trwa 4 dni, zaś dane zajmują 14 Tb. Istotną przewagą ISEE w kontekście obrazowania konfokalnego jest stosunkowo niewielkie rozszerzenie objętości na poziomie ~60-70%. Wierzymy, że może stanowić to rozsądny wybór, „złoty środek”, pomiędzy zwiększeniem czasu obrazowania i objętości danych, a korzyścią oferowaną przez znacznie lepsze warunki detekcji, co potwierdzają nie tylko wyniki przeprowadzonej segmentacji, ale również poprawa sygnału do tła w całym zakresie obrazowanej tkanki (Ryc. 16D).

Na uwagę zasługuje również łatwość i czas inkubacji niezbędny do przeprowadzenia reakcji rozszerzania i oczyszczania z wykorzystaniem ISEE. Cały proces w wypadku pracy ze skrawkami o grubości 40-200 μm oparty jest w ISEE o kilkunastominutową inkubację z jednym tylko odczynnikiem o $RI = 1,47$, pełniącym dodatkowo funkcję ostatecznego medium, w którym dochodzi do obrazowania. Dotychczas najszybszym i bazującym na jednym odczynnikiem była technika FOCM (63). Techniki oparte na 1 odczynnikiem, prócz prostoty

stosowania przez badaczy pozbawionych wcześniejszego doświadczenia z TOC, oferują dodatkową korzyść, fundamentalną podczas pracy z dość cienkimi (jak na obrazowanie wolumetryczne) skrawkami – ograniczają ryzyko zniszczenia preparatu podczas kolejnych etapów wymiany roztworów. Niestety, niedawno przeprowadzone porównanie (wykonane w kontakcie z autorami FOCM) wykazało około ~20% skurczenie liniowe 1-mm skrawków mózgu oraz gwałtowny zanik sygnału fluorescencyjnego (64). ISEE co prawda również nie pozwala na detekcję sygnału emitowanego przez endogenne białkowe fluorofory (eGFP, eYFP i DsRed), pozostaje jednak w pełni kompatybilne z IHC skierowaną na te cząsteczki, co udowodniono na przykładzie eGFP (Ryc. 11B).

IHC uwidacznia podstawowe ograniczenie ISEE – kompatybilność wyłącznie z barwieniem z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał. To interesująca, pierwsza tego typu obserwacja w dziedzinie TOC, która bez wątpienia wymaga pogłębienia badań i przedstawienia mechanizmu. W wypadku IHC z przeciwciałami drugorzędowymi, ISEE wykazuje kompatybilność ze wszystkimi najczęściej stosowanymi fluoroforami, tj. AF488, -555, -594, -647 i czerwoną rodaminą (Ryc. 10). Z wyłączeniem AF488, wszystkie pozostałe fluorofory utrzymują niemal niezmienną fluorescencję przez 6 dni (a nawet ponad miesiąc, dane niezłączone), co umożliwi powrót do preparatu w wypadku niepowodzenia pierwszego lub kolejnych obrazowań.

W obecnym badaniu obrazowanie konfokalne przeprowadzaliśmy na pierwotnie 200- μm (~230 μm po rozszerzeniu) skrawkach WL z uwagi na nominalne ograniczenie dystansu roboczego stosowanego przez nas obiektywu 40x/1.3 NA do 240 μm . Należy podkreślić, że uzyskiwany poziom przezroczystości zdecydowanie nie ogranicza stosowania ISEE do skrawków o tej grubości, pozwalając na uzyskiwanie niemal identycznych jakościowo obrazów na początku i końcu zakresu obrazowania (Ryc. 15). Znacznie większym problemem, szczególnie w wypadku gęsto upakowanych komórek i IHC skierowanemu na epitopy występujące w dużej ilości, może okazać się zagwarantowanie równomiernie silnego sygnału (70,92,93), gdyż nawet w wypadku relatywnie cienkich skrawków, zaobserwowaliśmy pewne jego pogorszenie po środku obrazowanego zakresu (Ryc. 15). W przyszłych badaniach zaplanowano weryfikację kompatybilności ISEE z obrazowaniem z wykorzystaniem LFSM, choć z uwagi na ograniczony dostęp do samego LFSM, jak i stacji roboczych przystosowanych do pracy z plikami zawierającymi setki GB danych (z jednej próbki), obrazowanie konfokalne

skrawków do 200- μm zapewne pozostanie ogólnoświatowym standardem w ciągu najbliższych dekad.

6. Wnioski

Z przeprowadzonych badań opisanych w tej pracy wynikają następujące wnioski:

1. ISEE to pierwszy roztwór TOC, który gwarantuje izometryczne, powtarzalne rozszerzenie mysich węzłów limfatycznych o 15% liniowo. Wartość ta tylko nieznacznie (o ~60-70%) wydłuża czas akwizycji danych i zwiększa ich późniejszą objętość, jednocześnie oferując korzystne warunki dla skutecznego procesu segmentacji.
2. ISEE poprawia skuteczność segmentacji sygnału pochodzącego z jąder komórkowych, jak i sygnału błonowego. Efekt ten jest szczególnie znaczący w wypadku gęsto upakowanych regionów, takich jak grudki limfocytów B, zarówno w wypadku porównania z klasycznymi warunkami obrazowania, jak i referencyjną techniką TOC – C_e3D.
3. ISEE, na poziomie rozdzielczości mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem obiektywu powiększającego 40-krotnie, nie prowadzi do deformacji tkanki lub poszczególnych typów jej komórek.
4. ISEE, o współczynniku załamania światła = 1,47, pełni jednocześnie funkcję roztworu optycznie oczyszczającego, rozszerzającego i wyrównującego współczynnik refrakcji, co pozwala na wykorzystywanie go jako medium podczas obrazowania.
5. Podstawowym ograniczeniem ISEE jest niekompatybilność z IHC z wykorzystaniem przeciwciał bezpośrednio skoniugowanych. Weryfikacji wymaga również kompatybilność grubszych skrawków traktowanych ISEE z LSFM oraz użyteczność rozszerzania w kontekście segmentacji z wykorzystaniem zaawansowanych technik opartych o uczenie maszynowe.

7. Piśmiennictwo

1. Tubbs RS. “Anatomy is to physiology as geography is to history; it describes the theatre of events”. *Clinical Anatomy*. 2015;28(2):151–151.
2. Chen HY, Wilson CB, Tycko R. Enhanced spatial resolution in magnetic resonance imaging by dynamic nuclear polarization at 5 K. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 31 maj 2022;119(22):e2201644119.
3. Economo MN, Clack NG, Lavis LD, Gerfen CR, Svoboda K, Myers EW, i in. A platform for brain-wide imaging and reconstruction of individual neurons. *Elife*. 20 styczeń 2016;5:e10566.
4. Kelch ID, Bogle G, Sands GB, Phillips ARJ, LeGrice IJ, Dunbar PR. High-resolution 3D imaging and topological mapping of the lymph node conduit system. *PLOS Biology*. 19 grudzień 2019;17(12):e3000486.
5. Richardson DS, Lichtman JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell*. 16 lipiec 2015;162(2):246–57.
6. Costantini I, Costantini I, Cicchi R, Cicchi R, Silvestri L, Silvestri L, i in. In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review. *Biomed Opt Express*, BOE. 1 październik 2019;10(10):5251–67.
7. Tainaka K, Kuno A, Kubota SI, Murakami T, Ueda HR. Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 6 październik 2016;32:713–41.
8. Yu T, Zhu J, Li D, Zhu D. Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *iScience*. 19 marzec 2021;24(3):102178.
9. Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*. sierpień 2013;16(8):1154–61.
10. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, i in. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci*. październik 2015;18(10):1518–29.
11. Chen L, Li G, Li Y, Li Y, Zhu H, Tang L, i in. UbasM: An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging. *Sci Rep*. 22 wrzesień 2017;7(1):12218.
12. Spalteholz W. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung. Leipzig, Germany: S. Hirzel; 1914.
13. Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, i in. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*. kwiecień 2007;4(4):331–6.
14. Matryba P, Kaczmarek L, Gołąb J. Advances in Ex Situ Tissue Optical Clearing. *Laser & Photonics Reviews*. 2019;13(8):1800292.

15. Bossolani GDP, Pintelon I, Detrez JD, Buckinx R, Thys S, Zanoni JN, i in. Comparative analysis reveals Ce3D as optimal clearing method for in toto imaging of the mouse intestine. *Neurogastroenterology & Motility*. 2019;31(5):e13560.
16. Matryba P, Sosnowska A, Wolny A, Bozycki L, Greig A, Grzybowski J, i in. Systematic Evaluation of Chemically Distinct Tissue Optical Clearing Techniques in Murine Lymph Nodes. *The Journal of Immunology* [Internet]. 17 styczeń 2020 [cytowane 21 luty 2022]; Dostępne na: <https://www.jimmunol.org/content/early/2020/01/16/jimmunol.1900847>
17. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Lourbopoulos A, Matryba P, i in. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods*. październik 2016;13(10):859–67.
18. Wan P, Zhu J, Xu J, Li Y, Yu T, Zhu D. Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain. *Neurophotonics*. lipiec 2018;5(3):035007.
19. Xu J, Ma Y, Yu T, Zhu D. Quantitative assessment of optical clearing methods in various intact mouse organs. *J Biophotonics*. luty 2019;12(2):e201800134.
20. Jing D, Zhang S, Luo W, Gao X, Men Y, Ma C, i in. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res*. sierpień 2018;28(8):803–18.
21. Zhu J, Yu T, Li Y, Xu J, Qi Y, Yao Y, i in. MACS: Rapid Aqueous Clearing System for 3D Mapping of Intact Organs. *Advanced Science*. 2020;7(8):1903185.
22. Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, i in. Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell*. 23 marzec 2017;169(1):161-173.e12.
23. Pan C, Schoppe O, Parra-Damas A, Cai R, Todorov MI, Gondi G, i in. Deep Learning Reveals Cancer Metastasis and Therapeutic Antibody Targeting in the Entire Body. *Cell*. 12 grudzień 2019;179(7):1661-1676.e19.
24. Cai R, Pan C, Ghasemigharagoz A, Todorov MI, Förstera B, Zhao S, i in. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections. *Nat Neurosci*. luty 2019;22(2):317–27.
25. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, i in. Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*. 16 czerwiec 2016;165(7):1789–802.
26. Zhao S, Todorov MI, Cai R, -Maskari RA, Steinke H, Kemter E, i in. Cellular and Molecular Probing of Intact Human Organs. *Cell*. 20 luty 2020;180(4):796-812.e19.
27. Henning Y, Osadnik C, Malkemper EP. EyeCi: Optical clearing and imaging of immunolabeled mouse eyes using light-sheet fluorescence microscopy. *Experimental Eye Research*. 1 marzec 2019;180:137–45.
28. Pende M, Vadiwala K, Schmidbaur H, Stockinger AW, Murawala P, Saghabi S, i in. A versatile depigmentation, clearing, and labeling method for exploring nervous system diversity. *Sci Adv*. maj 2020;6(22):eaba0365.

29. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 6 listopad 2014;159(4):896–910.
30. Susaki EA, Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. *Cell Chem Biol*. 21 styczeń 2016;23(1):137–57.
31. Becker K, Jährling N, Saghafi S, Weiler R, Dodt HU. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One*. 2012;7(3):e33916.
32. Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, i in. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*. listopad 2012;7(11):1983–95.
33. Schwarz MK, Scherbarth A, Sprengel R, Engelhardt J, Theer P, Giese G. Fluorescent-Protein Stabilization and High-Resolution Imaging of Cleared, Intact Mouse Brains. *PLOS ONE*. 20 maj 2015;10(5):e0124650.
34. Li Y, Xu J, Wan P, Yu T, Zhu D. Optimization of GFP Fluorescence Preservation by a Modified uDISCO Clearing Protocol. *Frontiers in Neuroanatomy* [Internet]. 2018 [cytowane 14 czerwiec 2022];12. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2018.00067>
35. Hahn C, Becker K, Saghafi S, Pende M, Avdibašić A, Foroughipour M, i in. High-resolution imaging of fluorescent whole mouse brains using stabilised organic media (sDISCO). *Journal of Biophotonics*. 2019;12(8):e201800368.
36. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, i in. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 30 sierpień 2011;14(11):1481–8.
37. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, i in. Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*. 24 kwiecień 2014;157(3):726–39.
38. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, i in. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep*. 21 sierpień 2018;24(8):2196-2210.e9.
39. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc*. listopad 2015;10(11):1709–27.
40. Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, i in. Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution. *Cell Rep*. 5 lipiec 2017;20(1):236–50.
41. Bozycki L, Łukasiewicz K, Matryba P, Pikula S. Whole-body clearing, staining and screening of calcium deposits in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 19 lipiec 2018;8(1):21.

42. Höök P, Brito-Robinson T, Kim O, Narciso C, Goodson HV, Weisel JW, i in. Whole blood clot optical clearing for nondestructive 3D imaging and quantitative analysis. *Biomed Opt Express*. 1 sierpień 2017;8(8):3671–86.
43. Mori T, Hirai M, Mita T. See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector. *Sci Rep*. 11 luty 2019;9(1):1768.
44. Hou B, Zhang D, Zhao S, Wei M, Yang Z, Wang S, i in. Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Front Neuroanat*. 24 luty 2015;9:19.
45. Hildebrand S, Schueth A, Wangenheim K von, Mattheyer C, Pampaloni F, Bratzke H, i in. hFRUIT: An optimized agent for optical clearing of DiI-stained adult human brain tissue. *Sci Rep*. 19 czerwiec 2020;10(1):9950.
46. Lai HM, Liu AKL, Ng HHM, Goldfinger MH, Chau TW, DeFelice J, i in. Next generation histology methods for three-dimensional imaging of fresh and archival human brain tissues. *Nat Commun*. 14 marzec 2018;9(1):1066.
47. Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C. ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development*. 15 marzec 2013;140(6):1364–8.
48. Moy AJ, Capulong BV, Saager RB, Wiersma MP, Lo PC, Durkin AJ, i in. Optical properties of mouse brain tissue after optical clearing with FocusClear™. *J Biomed Opt*. 2015;20(9):95010.
49. Lee B ha, Johnston R, Yang Y, Gallavotti A, Kojima M, Travençolo BAN, i in. Studies of aberrant phyllotaxy1 mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem. *Plant Physiol*. maj 2009;150(1):205–16.
50. Wu CL, Fu TF, Chou YY, Yeh SR. A single pair of neurons modulates egg-laying decisions in *Drosophila*. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121335.
51. Diekmann H, Kalbhen P, Fischer D. Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 2015 [cytowane 14 czerwiec 2022];9. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2015.00118>
52. Fu YY, Lin CW, Enikolopov G, Sibley E, Chiang AS, Tang SC. Microtome-free 3-dimensional confocal imaging method for visualization of mouse intestine with subcellular-level resolution. *Gastroenterology*. sierpień 2009;137(2):453–65.
53. Fu YY, Tang SC. Optical clearing facilitates integrated 3D visualization of mouse ileal microstructure and vascular network with high definition. *Microvasc Res*. grudzień 2010;80(3):512–21.
54. Fu YY, Peng SJ, Lin HY, Pasricha PJ, Tang SC. 3-D imaging and illustration of mouse intestinal neurovascular complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1 styczeń 2013;304(1):G1-11.

55. Liu YA, Chung YC, Shen MY, Pan ST, Kuo CW, Peng SJ, i in. Perivascular Interstitial Cells of Cajal in Human Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* styczeń 2015;1(1):102–19.
56. Lin HY, Chu LA, Yang H, Hsu KJ, Lin YY, Lin KH, i in. Imaging through the Whole Brain of *Drosophila* at $\lambda/20$ Super-resolution. *iScience.* 26 kwiecień 2019;14:164–70.
57. Li W, Germain RN, Gerner MY. Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 29 sierpień 2017;114(35):E7321–30.
58. Gerner MY, Kastentmuller W, Ifrim I, Kabat J, Germain RN. Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes. *Immunity.* 24 sierpień 2012;37(2):364–76.
59. Li W, Germain RN, Gerner MY. High-dimensional cell-level analysis of tissues with Ce3D multiplex volume imaging. *Nat Protoc.* czerwiec 2019;14(6):1708–33.
60. Gómez-Gavira MV, Sanderson D, Ripoll J, Desco M. Biomedical Applications of Tissue Clearing and Three-Dimensional Imaging in Health and Disease. *iScience.* 21 sierpień 2020;23(8):101432.
61. Schega Y, Flinner N, Hansmann ML. Quantitative assessment of optical clearing methods on formalin-fixed human lymphoid tissue. *Pathol Res Pract.* listopad 2020;216(11):153136.
62. Ke MT, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, i in. Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Reports.* 22 marzec 2016;14(11):2718–32.
63. Zhu X, Huang L, Zheng Y, Song Y, Xu Q, Wang J, i in. Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 4 czerwiec 2019;116(23):11480–9.
64. Kim K, Na M, Oh K, Cho E, Han SS, Chang S. Optimized single-step optical clearing solution for 3D volume imaging of biological structures. *Commun Biol.* 9 maj 2022;5(1):1–10.
65. Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, i in. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature.* 16 maj 2013;497(7449):332–7.
66. Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, Lubeck E, i in. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell.* 14 sierpień 2014;158(4):945–58.
67. Epp JR, Niibori Y, Liz Hsiang HL, Mercaldo V, Deisseroth K, Josselyn SA, i in. Optimization of CLARITY for Clearing Whole-Brain and Other Intact Organs. *eNeuro.* czerwiec 2015;2(3):ENEURO.0022-15.2015.
68. Ding Y, Lee J, Ma J, Sung K, Yokota T, Singh N, i in. Light-sheet fluorescence imaging to localize cardiac lineage and protein distribution. *Sci Rep.* 6 luty 2017;7(1):42209.

69. Jensen KHR, Berg RW. Advances and perspectives in tissue clearing using CLARITY. *J Chem Neuroanat.* grudzień 2017;86:19–34.
70. Murray E, Cho JH, Goodwin D, Ku T, Swaney J, Kim SY, i in. Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell.* 3 grudzień 2015;163(6):1500–14.
71. Park YG, Sohn CH, Chen R, McCue M, Yun DH, Drummond GT, i in. Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nat Biotechnol.* styczeń 2019;37(1):73–83.
72. Feng Y, Cui P, Lu X, Hsueh B, Möller Billig F, Zarnescu Yanez L, i in. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci Rep.* 23 marzec 2017;7:44810.
73. DePas WH, Starwalt-Lee R, Van Sambeek L, Ravindra Kumar S, Gradinaru V, Newman DK. Exposing the Three-Dimensional Biogeography and Metabolic States of Pathogens in Cystic Fibrosis Sputum via Hydrogel Embedding, Clearing, and rRNA Labeling. *mBio.* 27 wrzesień 2016;7(5):e00796-16.
74. Wassie AT, Zhao Y, Boyden ES. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat Methods.* styczeń 2019;16(1):33–41.
75. Gallagher BR, Zhao Y. Expansion microscopy: A powerful nanoscale imaging tool for neuroscientists. *Neurobiology of Disease.* 1 lipiec 2021;154:105362.
76. Truckenbrodt S, Maidorn M, Crzan D, Wildhagen H, Kabatas S, Rizzoli SO. X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes. *EMBO Rep.* wrzesień 2018;19(9):e45836.
77. Truckenbrodt S, Sommer C, Rizzoli SO, Danzl JG. A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat Protoc.* marzec 2019;14(3):832–63.
78. Chang JB, Chen F, Yoon YG, Jung EE, Babcock H, Kang JS, i in. Iterative expansion microscopy. *Nat Methods.* czerwiec 2017;14(6):593–9.
79. Stoltzfus CR, Filipek J, Gern BH, Olin BE, Leal JM, Wu Y, i in. CytoMAP: A Spatial Analysis Toolbox Reveals Features of Myeloid Cell Organization in Lymphoid Tissues. *Cell Reports.* 21 kwiecień 2020;31(3):107523.
80. Dunn KW, Fu C, Ho DJ, Lee S, Han S, Salama P, i in. DeepSynth: Three-dimensional nuclear segmentation of biological images using neural networks trained with synthetic data. *Sci Rep.* 4 grudzień 2019;9(1):18295.
81. Piccinini F, Balassa T, Carbonaro A, Diosdi A, Toth T, Moshkov N, i in. Software tools for 3D nuclei segmentation and quantitative analysis in multicellular aggregates. *Comput Struct Biotechnol J.* 3 czerwiec 2020;18:1287–300.
82. Kumar N, Verma R, Sharma S, Bhargava S, Vahadane A, Sethi A. A Dataset and a Technique for Generalized Nuclear Segmentation for Computational Pathology. *IEEE Transactions on Medical Imaging.* lipiec 2017;36(7):1550–60.

83. Janowczyk A, Doyle S, Gilmore H, Madabhushi A. A resolution adaptive deep hierarchical (RADHicaL) learning scheme applied to nuclear segmentation of digital pathology images. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization*. 4 maj 2018;6(3):270–6.
84. Murakami TC, Mano T, Saikawa S, Horiguchi SA, Shigeta D, Baba K, i in. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat Neurosci*. kwiecień 2018;21(4):625–37.
85. Weiss KR, Voigt FF, Shepherd DP, Huisken J. Tutorial: practical considerations for tissue clearing and imaging. *Nat Protoc*. czerwiec 2021;16(6):2732–48.
86. Orlich M, Kiefer F. A qualitative comparison of ten tissue clearing techniques. *Histol Histopathol*. luty 2018;33(2):181–99.
87. Todorov MI, Paetzold JC, Schoppe O, Tetteh G, Shit S, Efremov V, i in. Machine learning analysis of whole mouse brain vasculature. *Nat Methods*. kwiecień 2020;17(4):442–9.
88. Kirst C, Skriabine S, Vieites-Prado A, Topilko T, Bertin P, Gerschenfeld G, i in. Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell*. 20 luty 2020;180(4):780–795.e25.
89. Cabeza-Cabrerizo M, van Blijswijk J, Wienert S, Heim D, Jenkins RP, Chakravarty P, i in. Tissue clonality of dendritic cell subsets and emergency DCpoiesis revealed by multicolor fate mapping of DC progenitors. *Sci Immunol*. 1 marzec 2019;4(33):eaaw1941.
90. Schiavinato A, Przyklenk M, Kobbe B, Paulsson M, Wagener R. Collagen type VI is the antigen recognized by the ER-TR7 antibody. *European Journal of Immunology*. 2021;51(9):2345–7.
91. Li L, Wu J, Abdi R, Jewell CM, Bromberg JS. Lymph node fibroblastic reticular cells steer immune responses. *Trends in Immunology*. 1 sierpień 2021;42(8):723–34.
92. Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, i in. Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues. *Nat Commun*. 27 kwiecień 2020;11(1):1982.
93. Kim SY, Cho JH, Murray E, Bakh N, Choi H, Ohn K, i in. Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 listopad 2015;112(46):E6274–6283.