

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.

Streszczenie w języku polskim

W ciągu dwóch ostatnich dekad mikroskopia dynamicznie zmieniała 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.