

Zajrzeć w głąb mózgu – nowe techniki oczyszczania optycznego i obrazowania z zastosowaniem mikroskopu arkusza światła

Monika Pawłowska

Diana Legutko

Marzena Stefaniuk✉

Pracownia Neurobiologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

✉Pracownia Neurobiologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa;
e-mail: m.stefaniuk@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 9 stycznia 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 20 stycznia 2017 r.

Słowa kluczowe: oczyszczanie optyczne, mikroskopia oparta na arkuszu światła, obrazowanie całego mózgu

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów pracy finansowane były ze środków na naukę przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na realizację projektu NCN, OPUS 2015/17/B/NZ4/02631.

STRESZCZENIE

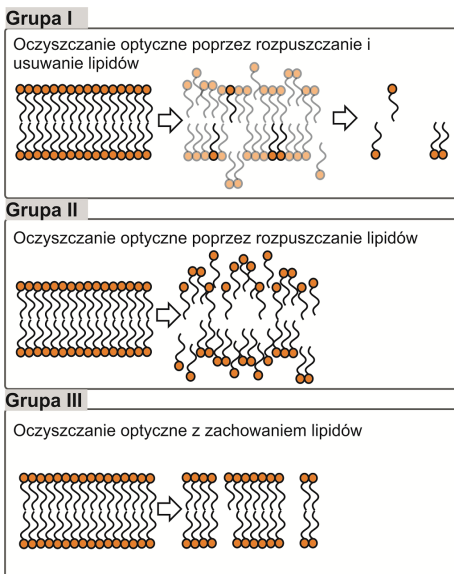
Zrozumienie działania mózgu jest jednym z największych wyzwań współczesnej neurobiologii. W osiągnięciu tego celu bardzo pomogłaby metoda obrazowania całego mózgu z przynajmniej komórkową rozdzielczością, jednocześnie zachowująca jego trójwymiarową strukturę i połączenia pomiędzy poszczególnymi obszarami. Większość dostępnych obecnie wysokorozdzielczych technik obrazowania polega na obrazowaniu cienkich skrawków jeden po drugim i rekonstrukcji obrazu większych obszarów. To podejście jest jednak pracochłonne i obciążone błędami. Opracowane ostatnio metody optycznego oczyszczania tkanki pozwalają otrzymać przezroczyste mózgi, które mogą być obrazowane w całości przy pomocy mikroskopu opartego na arkuszu światła. W niniejszej pracy omówione są najpopularniejsze metody oczyszczania optycznego z uwzględnieniem ich mechanizmu działania oraz mocnych i słabych stron. Opisujemy również mikroskopię opartą na arkuszu światła i jej zastosowanie w obrazowaniu całego mózgu. Na koniec podajemy przykłady opisanych w literaturze doświadczeń z neurobiologii i innych dziedzin, w których wykorzystano metody oczyszczania tkanek i mikroskopię opartą na arkuszu światła.

WPROWADZENIE

Zrozumienie działania mózgu to jedno z największych wyzwań współczesnej nauki. Mózg ludzki zawiera kilkadziesiąt miliardów gęsto upakowanych komórek nerwowych [1]. Każda z nich tworzy tysiące połączeń z innymi komórkami, często znajdującymi się w innych, odległych obszarach mózgu. Ta ogromna, trójwymiarowa sieć połączeń czyni mózg tak wyjątkowym, a jednocześnie tak trudnym do badania. Nawet w mierzącym niecały centymetr mózgu myszy, najczęściej wykorzystywanego zwierzęcia laboratoryjnego w neurobiologii, znajdują się dziesiątki milionów wzajemnie połączonych komórek [2].

Do badania mózgu potrzebna jest metoda obrazowania umożliwiająca zbieranie dużej ilości wysokorozdzielczych danych z całej objętości preparatu. Powinna ona umożliwiać nie tylko badanie struktury, ale również funkcjonowania mózgu. Obrazowanie optyczne spełnia większość tych warunków - umożliwia uzyskanie subkomórkowej rozdzielczości oraz badanie funkcji mózgu za pośrednictwem obrazowania znakowanych fluorescencyjnie białek czy fragmentów RNA. Jednak w klasycznej mikroskopii optycznej maksymalna głębokość obrazowania ograniczona jest przez rozpraszanie światła w tkance do kilkuset mikrometrów, lub około milimetra w przypadku mikroskopii wielofotonowej [3]. Dlatego dotychczasowe próby rejestracji sieci połączeń w całym mózgu myszy, takie jak the Mouse Brain Architecture Project (<http://brainarchitecture.org/>), the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas Project (<http://connectivity.brain-map.org/>) czy the Mouse Connectome Project (<http://www.mouseconnectome.org/>), wykorzystują technikę obrazowania kolejnych skrawków i komputerowej rekonstrukcji [4]. Takie podejście jest czasochłonne i skomplikowane.

Przełomem w obrazowaniu całego mózgu było połączenie dwóch metod: optycznego oczyszczania tkanek oraz mikroskopii fluorescencyjnej opartej na arkuszu światła (ang. *light-sheet fluorescence microscopy* albo LSFM), znanej również jako ultramikroskopia lub SPIM (ang. *selective plane illumination microscopy*). Oczyszczanie optyczne polega na chemicznym wypłukiwaniu lub rozpuszczaniu lipidów, głównego źródła rozpraszania światła w tkankach. Dzięki tym metodom, opisanym szczegółowo w dalszej części artykułu, możliwie jest uzyskanie przezroczystych preparatów grubości nawet około centymetra, przy jednoczesnym zachowaniu fluorescencji endogennej lub pochodzącej ze znakowania odpowiednimi markerami. Tak przygotowane preparaty można teoretycznie obrazować mikroskopem skanującym wyposażonym w obiektyw o długim zasięgu roboczym, jednak trwa to bardzo długo. W mikroskopii opartej na arkuszu światła preparaty są obrazowane płaszczyzna po płaszczyźnie zamiast punkt po punkcie, co znacznie skraca czas akwizycji danych.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie wpływu metod oczyszczania na błony komórkowe. Grupa I – błony lipidowe w trakcie oczyszczania są rozpuszczane a lipidy usuwane z preparatu. Grupa II – lipidy budujące błony są rozpraszane podczas procedury oczyszczania. Grupa III – oczyszczanie optyczne skutkujące permeabilizacją błon komórkowych.

W niniejszym artykule opisujemy znane obecnie metody oczyszczania tkanek i omawiamy potencjał i ograniczenia poszczególnych protokołów. Następnie przedstawiamy zasadę działania mikroskopii opartej na arkuszu światła. W ostatnim rozdziale podajemy przykłady badań, w których wykorzystano obrazowanie oczyszczonych tkanek.

METODY OPTYCZNEGO OCZYSZCZANIA

W przeciągu ostatnich kilku lat powstało wiele metod oczyszczania tkanek [5,6]. Bardzo szybko oczywistym stało się też to, że żadna z metod nie będzie uniwersalna, dlatego opisane zostaną metody, które pozwalają na osiągnięcie różnych rezultatów, skuteczne dla różnego rodzaju tkanek w zależności od szeregu właściwości takich jak: objętość, zawartość lipidów, endogennych chromoforów (np.: porfiryń, lipofuscyn) czy fluorochromów.

Metody oczyszczania optycznego tkanek można sklasyfikować na podstawie ich wpływu na błony lipidowe. Ze względu na fakt, że to właśnie błony lipidowe stanowią jeden z głównych elementów rozpraszających światło w tkance, badacze wypracowali trzy różne podejścia do tego problemu (Ryc. 1). Pierwsze polega na rozpuszczaniu błon lipidowych i wypłukiwaniu lipidów z preparatu. Po przepojeniu odpowiednim roztworem osiągamy końcowy współczynnik załamania światła dla tkanki około 1,47. Druga grupa metod bazuje na usuwaniu wody z preparatu i zastępowaniu jej przez roztwory rozpuszczalników organicznych. Roztwory te z jednej strony doprowadzają do zaburzenia integralności błon lipidowych, a z drugiej, dzięki dużemu współczynnikowi załamania (około 1,56), pozwalają na ujednoczenie go w obrębie preparatu bez konieczności wypłukiwania lipidów. Trzecią grupę stanowią metody, które mają na celu maksymalne zachowanie morfologii preparatu włącznie z zachowaniem błon lipidowych. Polegają

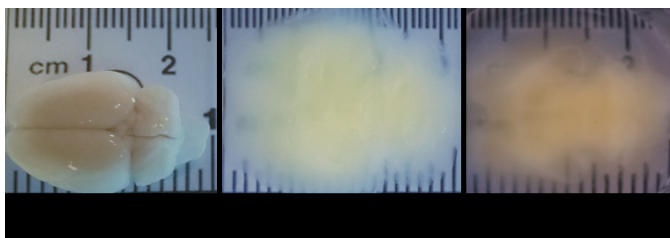
one wyłącznie na wyrównaniu współczynnika załamania światła dla tkanki poprzez przepajanie jej roztworami o współczynniku załamania około 1,51.

GRUPA I: CLARITY, CUBIC

CLARITY [7,8] to jedna z najbardziej znanych metod oczyszczania tkanek. Cechą charakterystyczną tej metody oraz jej wariantów PACT, PARS i ACT-PRESTO jest wykorzystanie hydrożelu spełniającego funkcję rusztowania, w którym zakotwiczone są białka. Metoda ta polega na przepojeniu tkanki roztworem zawierającym monomery akrylamidu. Można to osiągnąć zarówno dzięki perfuzji, jak i pasywnie poprzez umieszczenie uprzednio wyizolowanego organu w roztworze akrylamidu. Następnym krokiem jest polimeryzacja, która ma na celu utworzenie poliakrylamidowej sieci w obrębie tkanki. Gęstość usieciowania zależy od: stężenia akrylamidu (w różnych wariantach waha się ono od 1 do 4%), obecności substancji mającej wpływ na usieciowanie – bisakrylamidu i substancji wiążącej grupy aminowe z akrylamidem – paraformaldehydu (PFA) [9]. PFA wiąże elementy białkowe, a te posiadające pierwszorzędowe grupy aminowe zostają zakotwiczone kowalencyjnie w strukturze hydrożelu [10]. To pozwala na ograniczenie utraty białek w trakcie procedury usuwania lipidów z preparatu. Istnieje tu zależność między stopniem usieciowania preparatu, który im wyższy, tym bardziej sprzyja zachowaniu struktury i elementów białkowych preparatu, a usuwaniu lipidów, które w wariantach gęsto usieciowanych są trudniejsze do usunięcia ze względu na istnienie wiązań niekowalencyjnych między nimi a hydrożelem. Protokół CLARITY zawiera najskuteczniejszą metodę oczyszczania tkanki z lipidów. Elektroforeza w obecności SDS z łatwością zrywa te wiązania, zapewnia dokładne i równomierne usuwanie lipidów nawet z głębokich partii preparatu, jest również szybka. Niestety metoda ta wymaga stworzenia specjalnego aparatu bądź wykorzystania komercyjnego sprzętu (np.: X-Clarity™). Alternatywą jest pasywne wypłukiwanie lipidów. Pasywne oczyszczanie PACT sprawdza się podobnie dobrze do wariantu z elektroforezą na słabiej usieciowanych skrawkach o mniejszej grubości [10]. Podczas pasywnego oczyszczania najbardziej narażone na zniszczenie są struktury powierzchniowe. Dlatego nie jest to najlepsza metoda do oczyszczania dużych preparatów, np. mózgu szczura.

Ostatnim krokiem oczyszczania jest przepojenie tkanki roztworem wyrównującym współczynnik załamania światła. Na rynku dostępne są preparaty takie jak FocusClear™ czy RapiClear®. Inne, np. RIMS [10], można przygotować samodzielnie na podstawie dostępnych protokołów. Preparat ostatecznie posiada zwiększoną objętość i konsystencję delikatnej galaretki o zabarwieniu zależnym od rodzaju tkanki (patrz Ryc. 2).

Warto zauważyć, że w przypadku organów posiadających duże ilości endogennych barwników, usunięcie lipidów nie zapewnia całkowitej przezroczystości. Niektóre barwniki (np.: melanina i lipofuscyna) częściowo pozostają w strukturze preparatu i mogą wywoływać pochłanianie poszczególnych długości światła. W przypadku tego typu organów dobrą alternatywą jest kolejna metoda, również



Rycina 2. Mózgi dorosłych szczurów oczyszczone metodą CLARITY (pośrodku) i CUBIC (po prawej). Po lewej mózg nieoczyszczony. W obu przypadkach widoczne jest zwiększenie objętości oczyszczonego preparatu, a także nierównomierne oczyszczenie różnych struktur mózgu, związane np. z różną zawartością lipidów.

należąca do pierwszej grupy. CUBIC [11] w podstawowym wariantcie polega na pasywnym oczyszczaniu utrwalonego preparatu. Roztwór oczyszczający zawiera znaczne ilości mocznika, aminoalkoholu i detergentu. Mocznik ze względu na swoje hydrofilowe właściwości wpływa na zwiększenie objętości tkanki i ułatwia wypłukiwanie lipidów w obecności detergentu. Aminoalkohol z kolei ma działanie odbarwiająca tkanki dzięki chelatacji jonów metali należących do endogennych chromoforów [12]. Ma to szczególne znaczenie dla oczyszczania organów posiadających silne zabarwienie. Etap pierwszy może trwać od kilku do kilkunastu dni w zależności od objętości preparatu i zawartości lipidów w tkance. Również w przypadku tej metody silnie zmielinizowane obszary mózgu stanowią dużą przeszkodę. W dodatku wydłużanie czasu oczyszczania preparatu wiąże się z częściową utratą białek, a co za tym idzie fluorescencji, zwłaszcza z powierzchniowych warstw.

Kolejnym etapem w tej metodzie jest przepojenie tkanki drugim reagentem, którego zadaniem jest wyrównanie współczynnika załamania światła dla całej tkanki. Otrzymany w ten sposób preparat posiada zwiększoną objętość, jego struktura jest delikatna i może łatwo ulegać uszkodzeniu. Natomiast brak zabarwienia wpływa na bardzo znaczące ograniczenie tła w obrazie mikroskopowym (Ryc. 2).

Podsumowując, pierwsza grupa metod wiąże się ze zwiększaniem objętości preparatu, co jest korzystne w przypadku obrazowania niewielkich struktur. Przeszkodę natomiast stanowią duże rozmiary preparatów i obszary zmielinizowane, które zawierają duże ilości błon lipidowych. Dlatego metody te stosowane w wariantach pasywnych dla mózgów lepiej sprawdzają się dla myszy i młodych szczurów.

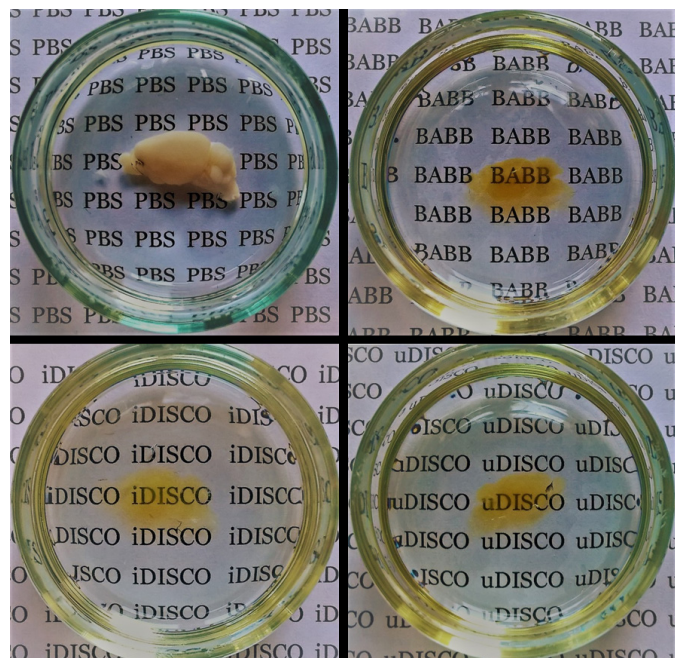
GRUPA II: BABB, FluoClearBABB, iDisco, uDisco

W tej grupie różnice pomiędzy metodami są bardzo niewielkie, a zasada działania jest bardzo podobna, dlatego zostaną opisane wspólnie. Różnice w protokołach stanowią głównie rodzaje wykorzystywanych odczynników.

Pierwszym etapem wspólnym jest odwadnianie preparatu przy pomocy roztworów alkoholi we wzrastających stężeniach. Od doboru alkoholu zależy spadek fluorescencji [13] i szybkość odwadniania preparatu. Przykładowo metanol wykorzystywany w metodzie iDISCO [14] lub etanol w pierwszej metodzie BABB [15] powodują znaczną utratę

endogennej fluorescencji, ale z drugiej strony zapewniają bardzo szybkie odwadnianie preparatu, nawet w ciągu jednego dnia. Tert-Butanol wykorzystywany w metodach takich jak FluoClearBABB [13] czy uDISCO [16] zapewnia dobre zachowanie fluorescencji, ale odwadnianie tkanki z jego wykorzystaniem jest znacznie wolniejsze. W przypadku mózgu szczura potrzeba na to około tygodnia.

Etapem kolejnym po odwodnieniu preparatu jest umieszczenie go w środowisku rozpuszczalników organicznych o dużym współczynniku załamania światła. Ten etap wpływa zarówno na przejrzystość, jak i stopień zachowania fluorescencji. Przejrzystość zależy od dopasowania współczynników załamania światła między elementami tkanki i roztworem je otaczającym, w tym przypadku związek wykorzystywany w niektórych procedurach z grupy DISCO – eter dibenzylowy (DBE) ma lepsze dopasowanie względem współczynnika załamania światła, niż roztwór BABB (mieszanka butanolu i benzoesu benzylu) wykorzystywany w protokole FluoClearBABB. Natomiast metoda FluoClearBABB ma przewagę w kwestii zachowania fluorescencji, dzięki zastosowaniu trietyloaminy bardzo dobrze zachowuje fluorescencję przy długim przechowywaniu. W protokole uDISCO użyta jest mieszanka rozpuszczalników organicznych zawierająca: alkohol benzylový, benzoesan benzylu oraz eter difenylowy w różnych proporcjach, z dodatkiem witaminy E. Porcje rozpuszczalników dostosowane są bezpośrednio do rodzaju tkanki pod względem współczynnika załamania światła. Witamina E zawarta w roztworze zapobiega utracie fluorescencji, jednak nadal obserwuje się jej stopniowy spadek na przestrzeni tygodni. Mózgi otrzymane w wyniku odwadniania alkoholem posiadają bursztynowe zabarwienie (patrz Ryc. 3). Wyjątkiem jest iDISCO, w którym zastosowanie perhydrolu zapewnia niemal brak zabarwienia preparatu. Barwa ta jest bardziej intensywna dla



Rycina 3. Oczyszczanie optyczne mózgów myszy. Mózgi zwierząt zostały przygotowane metodami opartymi o rozpuszczanie błon lipidowych. Lewe górne zdjęcie pokazuje jedną półkulę mózgu w roztworze buforu PBS przed oczyszczeniem. Pozostałe zdjęcia pokazują półkule po oczyszczeniu optycznym różnymi metodami (BABB, iDISCO i uDISCO). Zwraca uwagę przezroczystość tkanki i lekko bursztynowy kolor.

preparatów pochodzących od starszych osobników i wiąże się ze zwiększonym pochłanianiem krótkich fal świetlnych.

Preparaty poddane procedurom należącym do grupy drugiej są bardzo twarde i kruche. Ich ważną cechą jest zmniejszony rozmiar, w przypadku odwadniania mózgu z użyciem tert-Butanolu zmniejszenie jego rozmiarów jest najbardziej widoczne i wynosi ok 50% dla mózgow myszy [16]. W tym przypadku zostaje ograniczona rozdzielczość, natomiast preparaty są łatwiejsze do zobrazowania w całości, co w przypadku metod z grupy pierwszej nie zawsze jest możliwe ze względu na np. ograniczone rozmiary komory w której umieszczany jest obrazowany preparat.

GRUPA III: SeeDB2 i ScaleS

Metody z grupy trzeciej należą do najłagodniejszych metod i mają na celu maksymalne zachowanie morfologii preparatu. Metoda SeeDB2 [17] wiąże się z zastąpieniem detergentu saponiną, która wywołuje permeabilizację błony poprzez wiązanie z cholesterolem [18], dzięki czemu nie dochodzi do jej uszkodzenia. Natomiast w metodzie ScaleS [19] zastosowanie niskiego stężenia detergentu TX100 wpływa na zachowanie struktury komórek. Oczywiście ze względu na obecność różnic w gęstości optycznej między błonami lipidowymi a pozostałymi elementami preparatu, rozpraszanie światła jest silniejsze, niż w przypadku innych typów metod. Ten typ metod najlepiej sprawdza się w zastosowaniu do cienkich preparatów grubości do 2 mm, a w przypadku skrawków mózgu, poza grubością, ograniczenie stanowią również obszary silnie zmielinizowane, dlatego najlepsze wyniki uzyskuje się na mózgach pochodzących od zwierząt młodych.

PERFUZJA

Duże rozmiary niektórych preparatów mogą utrudniać oczyszczanie ich w sposób pasywny, poprzez zanurzenie w kolejnych roztworach. Rozwiązaniem tego problemu jest wykorzystanie systemu naczyń krwionośnych do bezpośredniego i równomiernego dostarczania odczynników do tkanki. Dzięki temu jesteśmy w stanie skrócić czas przygotowania preparatu i często poprawić jego jakość. Wykorzystanie perfuzji podczas oczyszczania preparatów jest możliwe w przypadku wszystkich opisanych metod. Polega to na pompowaniu płynów poprzez lewą komorę do dużego krwioobiegu zwierzęcia, które uprzednio zostało utrwalone. Większość opisanych metod posiada dostosowane protokoły dla wariantu perfuzyjnego [10,16,20].

BARWIENIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE: iDISCO, ACT-PRESTO

Metody oczyszczania organów zazwyczaj dotyczą preparatów posiadających endogenną fluorescencję, np. pochodzące od zwierząt transgenicznych. Niemniej jednak możliwe jest zastosowanie barwień immunohistochemicznych w połączeniu z metodami oczyszczania tkanek. Dla metod z grupy pierwszej barwienie może zostać wykonane po etapie usuwania lipidów a przed przepajaniem tkanki roztworem o docelowym współczynniku załamania światła (n). Dla grupy drugiej i trzeciej najlepiej przeprowadzić barwienie

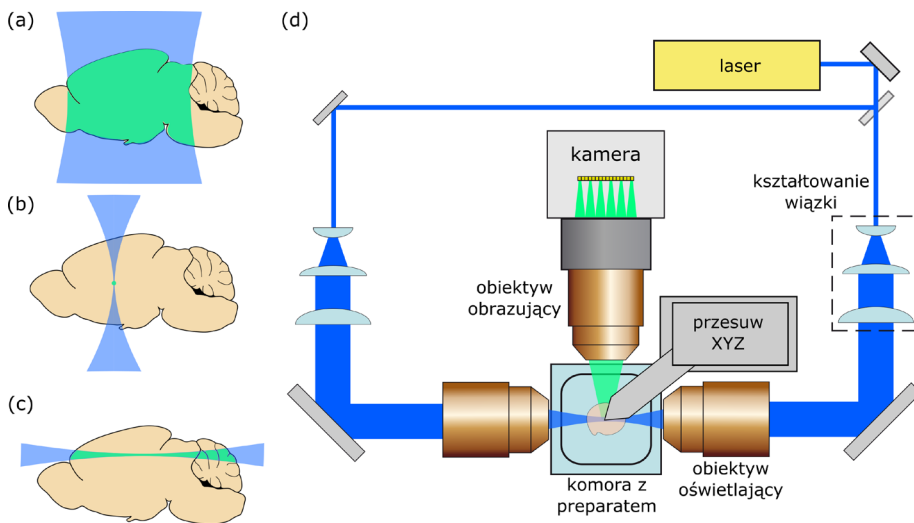
przed procedurą oczyszczania. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj metoda iDISCO, posiada ona protokół, który pozwala na przeprowadzenie barwienia immunochemicznego nawet na dużych preparatach. Kluczowa w protokole jest heparyna, która zapewnia możliwość głębokiego wnikania przeciwciał w głąb tkanki.

MIKROSKOPIA OPARTA NA ARKUSZU ŚWIATŁA

Mikroskopia wykorzystująca oświetlenie przy pomocy arkusza światła to technika wynaleziona ponad 100 lat temu przez Siedentopfa i Zsigmondy'ego, którzy jako pierwsi użyli nazwy ultramikroskopia [21]. Zsigmondy wykorzystał tę technikę do badania koloidów, za co otrzymał później nagrodę Nobla. Pierwszym znanym zastosowaniem tego rodzaju mikroskopii w biologii są prace Voie i wsp. [22], którzy zademonstrowali obrazowanie ślimaka ucha wewnętrznego świnki morskiej, oczyszczonego metodą opracowaną przez Spalteholz [23]. Jednak prawdziwy rozkwit mikroskopii opartej na arkuszu światła nastąpił około dekadę później, kiedy została ona zastosowana do obrazowania żyjących embrionów ryby ryżanki japońskiej [24]. Kilka lat później ukazała się praca z grupy Dodta, gdzie ultramikroskopia została zastosowana do obrazowania mózgu myszy oczyszczonego optycznie poprzez odwadnianie alkoholem i użycie rozpuszczalników [15]. Do dziś w literaturze opisane zostało wiele mikroskopów opartych na arkuszu światła, różniących się parametrami takimi jak rozdzielczość, pole widzenia, maksymalny rozmiar próbki czy rodzaj użytej immersji, a także stosujących wzbudzenie dwufotonowe. Wymienienie wszystkich jest poza zakresem tego opracowania, które skupia się na obrazowaniu oczyszczonych optycznie tkanek.

Mikroskopia oparta na arkuszu światła wypełnia lukę pomiędzy mikroskopią szerokiego pola, czyli tak zwaną zwykłą mikroskopią fluorescencyjną, a mikroskopią skanującą (konfokalną lub wielofotonową) (patrz Ryc. 4 (a-c)). W mikroskopie szerokiego pola oświetlony jest cały preparat, co powoduje, że sygnał pochodzący z różnych płaszczyzn nakłada się na kamerze, dlatego technika ta nie nadaje się do preparatów grubszych niż kilkanaście warstw komórek. Z drugiej strony, w mikroskopii konfokalnej światło wzbudzące skupione jest w jednym punkcie, a zastosowanie przesłony umożliwia zbieranie fluorescencji tylko z płaszczyzny ostrości. W teorii grubość obrazowanego preparatu – pod warunkiem wyeliminowania rozpraszania – jest ograniczona tylko zasięgiem roboczym obiektywu obrazującego. Obrazowanie dużych preparatów w mikroskopach skanujących trwa jednak bardzo długo. Szacowano, że zobrazowanie całego mózgu myszy z rozdzielczością komórkową trwałoby kilka dni [8].

Mikroskopia oparta na arkuszu światła rozwiązuje te problemy poprzez zastosowanie dwóch obiektywów, oświetlającego oraz zbierającego fluorescencję, których osie optyczne tworzą kąt prosty. Dodatkowo, przed obiektywem oświetlającym znajduje się soczewka cylindryczna, która kształtuje wiązkę lasera tak, że nie jest ona skupiona do punktu, ale tworzy cienki "arkusz światła", oświetlający pojedynczą płaszczyznę preparatu (stąd jedna z nazw tej metody, *Selective Plane Illumination Microscopy*, czyli mikro-



Rycina 4. (a–c) Obrazowanie grubych preparatów przy pomocy różnych metod mikroskopii optycznej. (a) W mikroskopii szerokiego pola, np. w standardowym mikroskopie fluorescencyjnym, oświetlony jest cały preparat, przez co sygnał pochodzący od różnych płaszczyzn nakłada się w kamerze. (b) W mikroskopii skanującej, np. konfokalnej lub dwufotonowej, sygnał zbierany jest punkt po punkcie, co znacznie redukuje tło, ale jednocześnie wydłuża czas obrazowania. (c) W mikroskopii opartej na arkuszu światła oświetlona jest wybrana płaszczyzna preparatu. (d) Schemat mikroskopu opartego na arkuszu światła przeznaczony do obrazowania oczyszczonych optycznie tkanek.

skopia oświetlenia wybranej płaszczyzny). Fluorescencja z oświetlonej płaszczyzny zbierana jest przez drugi obiektyw, którego płaszczyzna ostrości pokrywa się z arkuszem światła i obrazowana przez wysokorozdzielczą kamerę. Dzięki oświetlaniu pojedynczej płaszczyzny obraz jest praktycznie pozbawiony tła, a dodatkowo nie następuje fotowypalenie objętości preparatu znajdującej się poza płaszczyzną obrazowania. Aby zobrazować cały preparat, przesuwa się go w kierunku prostopadłym do arkusza światła i zbiera fluorescencję z kolejnych płaszczyzn. Do zebrania trójwymiarowego stosu obrazów konieczne jest skanowanie tylko w jednym wymiarze, a nie w trzech jak w przypadku mikroskopii skanującej konfokalnej czy wielofotonowej. Jeżeli preparat jest większy niż pole widzenia obiektywu, zamiast jednego zbiera się kilka lub kilkanaście stosów obrazów, z których następnie jest generowany trójwymiarowy obraz.

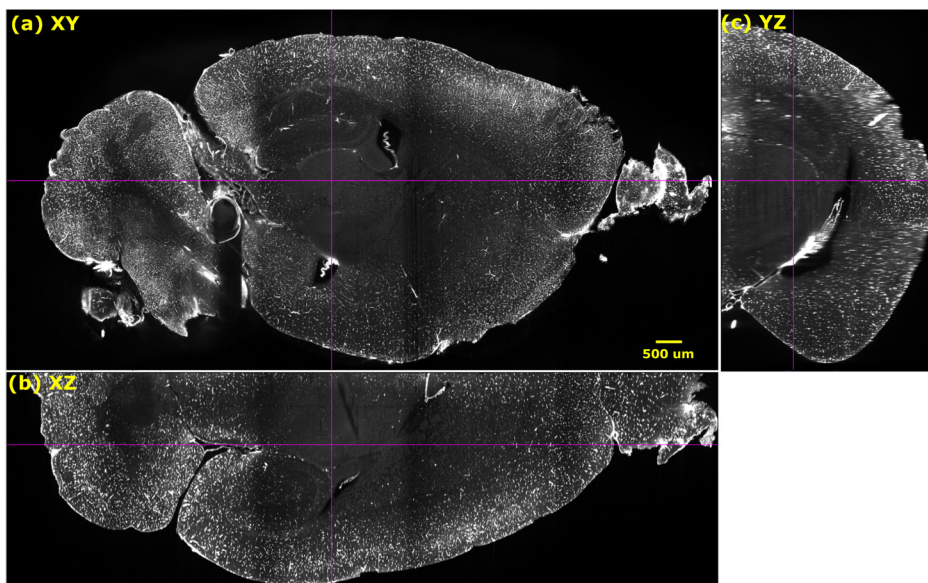
Konfiguracja mikroskopu opartego na arkuszu światła umożliwia nie tylko szybsze obrazowanie i redukcję tła, ale w niektórych przypadkach również zwiększenie rozdzielczości. W mikroskopii fluorescencyjnej rozdzielczość zależy od apertury numerycznej obiektywu obrazującego. Zależność ta jest liniowa dla rozdzielczości w płaszczyźnie obrazu i kwadratowa dla rozdzielczości osiowej (w kierunku prostopadłym do płaszczyzny obrazu). W praktyce oznacza to, że obiektyw z dużym zasięgiem roboczym i niewielką aperturą numeryczną (NA) ma rozdzielczość osiową znacznie gorszą od rozdzielczości w płaszczyźnie obrazu. Jest to kolejny czynnik utrudniający obrazowanie grubych, trójwymiarowych preparatów. W mikroskopii opartej na arkuszu światła rozdzielczość osiowa nie zależy od NA obiektywu obrazującego, tylko od grubości arkusza światła. Na przykład układ opisany przez Engelbrechta i Stelzera, wykorzystujący obiektyw 10X/0,3, ma rozdzielczość osiową około 6 mikrometrów, dwukrotnie lepszą niż mikroskop konfokalny wykorzystujący ten sam obiektyw [25]. Z drugiej strony,

rozdzielczość w płaszczyźnie obrazu jest ograniczona nie tylko przez NA obiektywu obrazującego, ale również przez wielkość piksela kamery, dlatego konieczne jest użycie kamery o możliwie dużej liczbie pikseli. Obecnie najczęściej wykorzystuje się kamery z sensorami CMOS posiadającymi 4–5 megapixeli.

Jednym z ograniczeń wynikających ze sposobu oświetlenia preparatu w mikroskopii opartej na arkuszu światła jest powstawanie charakterystycznych artefaktów w postaci pasów równoległych do kierunku propagacji lasera oświetlającego. Artefakty te są trudne do uniknięcia, bo nawet w najlepiej oczyszczonym preparacie pozostaną niejednorodności, na przykład ściany naczyń krwionośnych, które będą rozpraszały światło, powodując powstawanie cieni w kształcie pasów. Najprostszym sposobem częściowej redukcji tych artefaktów jest oświetlenie preparatu z obu stron (równoległe lub sekwencyjnie), tak jak w układzie

przedstawionym na rycinie 4d. Jeszcze lepszy efekt można osiągnąć, obracając arkusz światła o niewielki kąt w trakcie obrazowania tak, aby bardziej równomiernie oświetlić pole widzenia [26]. Dalszą poprawę jakości obrazu można uzyskać, łącząc arkusz światła z jednowymiarowym obrazowaniem konfokalnym wykorzystującym fizyczną lub wirtualną szczelinę [27].

W miarę rozwoju technik oczyszczania, dzięki któremu sukcesywnie rośnie przezroczystość oczyszczonych tkanek, maksymalna grubość obrazowanych preparatów przestaje być ograniczona przez rozpraszanie. Zamiast tego ograniczeniem staje się zasięg roboczy obiektywów. Obecnie większość dostępnych obiektywów o zasięgu roboczym większym niż 2–3 mm to obiektywy suche, rzadziej wodne. Tymczasem współczynnik załamania oczyszczonej tkanki to około 1,45–1,55, w porównaniu do 1 dla powietrza i 1,33 dla wody. Aby uniknąć aberracji i uzyskać ostry, nie zniekształcony obraz, należy używać obiektywu immersyjnego i cieczy immersyjnej jak najbardziej zbliżonej współczynnikiem załamania do obrazowanej tkanki. Ostatnio na rynku pojawiło się kilka obiektywów immersyjnych o dużym zasięgu roboczym [28]. Używając obiektywu 25X/0,95 o zasięgu roboczym 8 mm, Tomer i wsp. zademonstrowali obrazowanie z submikrometrową rozdzielczością na głębokości 5–6 mm we fragmencie mózgu mysiego oczyszczonego metodą CLARITY we własnej konstrukcji mikroskopie opartym na arkuszu światła [9]. Obiektywy dostosowane do immersji w oczyszczonej tkance są jednak bardzo drogie, poza tym nadal brakuje obiektywów kompatybilnych z rozpuszczalnikami takimi jak BABB. Dlatego w wielu układach wykorzystuje się obiektywy suche, czasami w połączeniu z układami korygującymi aberracje [29].



Rycina 5. Półkula mózgu myszy z wybarwionymi naczyniami, oczyszczona i wybarwiona metodą iDISCO. (a) pojedyncza płaszczyzna na głębokości około 2 mm, przekrój strzałkowy (b) przekrój horyzontalny i (c) przekrój koronalny.

Mimo, że od niedawna mikroskopy oparte na arkuszu światła są dostępne na rynku, wiele zespołów nadal decyduje się na układy własnej konstrukcji. Taki mikroskop jest nie tylko znacznie tańszy, ale przede wszystkim łatwiejszy do dopasowania do potrzeb konkretnego eksperymentu. Oprócz licznych publikacji, niektórzy badacze decydują się również na stworzenie strony internetowej ze schematem układu, listą wykorzystanych elementów, oprogramowaniem do ściągnięcia, a w niektórych przypadkach również szczegółowymi instrukcjami budowy układu. Przykładem takiego projektu jest układ OpenSPIM [30] opisany na stronie <http://openspim.org/>. Oryginalny OpenSPIM jest przystosowany do obrazowania małych preparatów zanurzonych w wodzie, jednak jego otwarta, modułowa konstrukcja umożliwia łatwe modyfikacje. Autorzy niniejszego opracowania zaprezentowali oparty na OpenSPIM mikroskop do obrazowania oczyszczonego mózgu szczura [31] (Ryc. 4d). Rycina 5 pokazuje przykładowe obrazowanie całej półkuli mózgu myszy.

Mikroskop oparty na arkuszu światła umożliwia obrazowanie całych organów, bez cięcia na skrawki i pracochłonnej, obciążonej błędami rekonstrukcji. Należy jednak pamiętać, że czas poświęcony na przygotowanie i zobrazowanie preparatów przesunął się w stronę czasu poświęconego na analizę danych. Zobrazowanie całego mózgu myszy z rozdzielczością komórkową może trwać jedynie około godziny. Zaś uzyskany plik danych ma rozmiar 20 GB [32] lub więcej w zależności od ilości i szczegółowości informacji, którą chcemy uzyskać. Wymaga to stworzenia specjalnych narzędzi informatycznych, które ułatwią analizę i interpretację danych. Dlatego równolegle do mikroskopów rozwijane są dedykowane narzędzia do przetwarzania uzyskanych obrazów, takie jak Terasticher [33], Brain Cell Finder [34] czy ClearMap [32].

Kolejnym dużym wyzwaniem jest stworzenie trójwymiarowych map referencyjnych. W przypadku tradycyj-

nych dwuwymiarowych preparatów histologicznych istnieją zwalidowane atlasy mózgow (np. Paxinos Franklin Academic Press 2001). Atlasy trójwymiarowe (np. Allen Brain Atlas czy clear3dbar (<http://www.3dbar.org/>)) nadal opierają się o preparaty dwuwymiarowe, co niesie ze sobą możliwość utraty informacji przy rekonstrukcji obrazów.

ZASTOSOWANIA OBRAZOWANIA CAŁEGO MÓZGU I INNYCH NARZĄDÓW

Pierwsze doniesienia opisujące techniki optycznego oczyszczania i obrazowania kładły szczególny nacisk na badania połączeń w mózgu (konektomiki) [4,35,36] czy konektomiki całego organizmu w przypadku *D. melanogaster* [37–39]. Dzięki zastosowaniu znaczników projekcji (ang. *tracer*) i technikom oczyszczania optycznego pokazano istnienie

połączeń między odległymi strukturami w mózgu i w rdzeniu kręgowym [13,16,40]. Tego rodzaju znaczniki mogą pokazywać wyjścia i wejścia do komórek nerwowych lub też znakować komórki między którymi istnieje aktywna synapsa [41,42]. W przyszłości pozwoli to na znakowanie pojedynczych ścieżek przekazywania informacji w mózgu.

Kolejnym zastosowaniem oczyszczania optycznego tkanek jest tworzenie mezomap, na przykład pokazujących wzory ekspresji znaczników wirusowych w małych obszarach mózgu. Hsiang i wsp. pokazali mapę komórek zaangażowanych w kodowanie i przechowywanie pamięci związanej z powstawaniem uzależnienia od kokainy w jądrze bocznym ciała migdałowatego u myszy w preparacie o grubości prawie milimetra [43]. Podobnie pokazano trójwymiarowe rekonstrukcje agregatów amyloidu we fragmentach mózgow pacjentów z chorobą Alzheimera [44] czy też atrofii rdzenia kręgowego w modelu autoimmunologicznego zapalenia rdzenia kręgowego [45].

Żeby lepiej zrozumieć funkcjonowanie mózgu, oprócz informacji topograficznej o neuronach, musimy też wiedzieć, jak poszczególne komórki przetwarzają informację i jak ta informacja jest przekazywana dalej, aby wywołać konkretne zachowanie. Połączenie znakowania projekcji wektorami wirusowymi z badaniem markerów aktywności komórkowej pozwoliło na stworzenie trójwymiarowych map funkcjonalno-strukturalnych w nienaruszonym mózgu. Ye i wsp. pokazali, że różne struktury mózgu zaangażowane w przetwarzanie informacji o bodźcach pozytywnych i negatywnych są wewnątrznie zróżnicowane pod względem zasilanych je projekcji, czy profilu ekspresji genów [40]. Badanie markerów aktywności neuronalnej (np. genów wczesnej odpowiedzi) w połączeniu z obrazowaniem całego mózgu w mikroskopie arkusza światła pozwoliło na przykład pokazać jednocześnie wszystkie obszary mózgu, które aktywują się w odpowiedzi na terapię farmakolo-

giczną [32]. Tego typu podejście pozwoli wyznaczyć nowe, dotychczas nieznanne obszary aktywowane po podawaniu leków, pozwoli oszacować liczbę aktywowanych komórek, czy też wreszcie porównując dane behawioralne pozwoli monitorować efekty niepożądane działania leków w badaniach przedklinicznych. W opisywanym badaniu pokazano na przykład, że po podaniu leku haloperidolu aktywowane są rejony kory czuciowej i jądra czerwienego. Ten drugi region jest powiązany z efektem ubocznym wspomnianego leku, czyli suchością w ustach i dystonią [32].

Techniki oczyszczania optycznego pozwalają też na obrazowanie biologiczne na poziomie RNA i DNA. Sylwestrak i wsp. opracowali metodę umożliwiającą wykrywanie i obrazowanie transkryptów i nie-kodujących RNA w preparatach mózgu o grubości 500 μm [46]. Warto nadmienić, że standardowe techniki wykrywające transkrypty (np. hybrydyzacja *in situ*) są stosowane do preparatów o grubości do kilkunastu mikrometrów.

Ciekawym zastosowaniem obrazowania w mikroskopie arkusza światła preparatów nie-neurologicznych jest na przykład wykorzystanie oczyszczania optycznego do obrazowania szpiku kostnego [47] czy węzłów chłonnych [48].

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie technik optycznego oczyszczania narządów umożliwia spojrzenie na obrazowanie biologiczne z zupełnie nowej perspektywy. Do tej pory obrazowanie z wysoką rozdzielczością wiązało się z koniecznością wyboru pojedynczych skrawków preparatu i analizą zebranych danych przy założeniu, że preparat jest jednorodny i zobrażone fragmenty zawierają tę samą informację, co niezobrazowane. Obrazowanie tkanek nienaruszonych pozwala ominąć ten problem. Techniki optycznego oczyszczania preparatów w połączeniu z obrazowaniem ich w mikroskopie arkusza światła umożliwiły pozyskiwanie informacji o kompletnych złożonych trójwymiarowych układach biologicznych na wielu poziomach jednocześnie – od anatomii poprzez funkcję, bez naruszania ich struktury. Dzięki temu możliwe jest jeszcze lepsze zrozumienie ich działania.

PIŚMIENICTWO

1. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-541
2. Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R (2006) Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12138-12143
3. Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth* 2: 932-940
4. Osten P, Margrie TW (2013) Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods* 10: 515-523
5. Richardson DS, Lichtman JW (2015) Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162: 246-257
6. Silvestri L, Costantini I, Sacconi L, Pavone FS (2016) Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J Biomed Opt* 21: 081205-081205
7. Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497: 332-337

8. Chung K, Deisseroth K (2013) CLARITY for mapping the nervous system. *Nat Methods* 10: 508-513
9. Tomer R, Ye L, Hsueh B, Deisseroth K (2014) Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc* 9: 1682-1697
10. Yang B, Treweek JB, Kulkarni RP, Deverman BE, Chen CK, Lubeck E, Shah S, Cai L, Gradinaru V (2014) Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158: 945-958
11. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, Yokoyama C, Onoe H, Eguchi M, Yamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Shimizu Y, Miyawaki A, Yokota H, Ueda HR (2014) Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157: 726-739
12. Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, Susaki EA, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H, Ueda HR (2014) Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* 159: 911-924
13. Schwarz MK, Scherbarth A, Sprengel R, Engelhardt J, Theer P, Giese G (2015) Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains. *PLoS One* 10: e0124650
14. Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M (2014) iDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159: 896-910
15. Dodt H-U, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, Deussing JM, Eder M, Ziegglänsberger W, Becker K (2007) Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4: 331-336
16. Pan C, Cai R, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Lourbopoulos A, Matryba P, Plesnila N, Dichgans M, Hellal F, Ertürk A (2016) Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* 13: 859-867
17. Ke M-T, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, Sato M, Imai T (2016) Super-resolution mapping of neuronal circuitry with an index-optimized clearing agent. *Cell Rep* 14: 2718-2732
18. Schlösser E (1969) Interaction of saponins with cholesterol, lecithin, and albumin. *Can J Physiol Pharmacol* 47: 487-490
19. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saïdo T, Miyawaki A (2015) ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* 18: 1518-1529
20. Susaki EA, Ueda HR (2016) Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution: toward organism-level systems biology in mammals. *Cell Chem Biol* 23: 137-157
21. Siedentopf H, Zsigmondy R (1903) Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Ann Phys* 4: 1-39
22. Voie AH, Burns DH, Spelman FA (1993) Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J Microsc* 170: 229-236.
23. Spalteholz W (1914) Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang.
24. Huisken J, Swoger J, Bene FD, Wittbrodt J, Stelzer EH (2004) Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* 305: 1007-1009
25. Engelbrecht CJ, Stelzer EH (2006) Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM). *Opt Lett* 31: 1477-1479
26. Huisken J, Stainier DYC (2007) Even fluorescence excitation by multi-directional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Opt Lett* 32: 2608
27. Silvestri L, Bria A, Sacconi L, Iannello G, Pavone FS (2012) Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain. *Opt Express* 20: 20582-20598
28. Marx V (2014) Microscopy: seeing through tissue. *Nat Methods* 11: 1209-1214
29. Dodt H-U, Saghafi S, Becker K, Jährling N, Hahn C, Pende M, Wanis M, Niendorf A (2015) Ultramicroscopy: development and outlook. *Neurophotonics* 2: 041407-041407

30. Pitrone PG, Schindelin J, Stuyvenberg L, Preibisch S, Weber M, Eliceiri KW, Huisken J, Tomancak P (2013) OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform. *Nat Methods* 10: 598-599
31. Stefaniuk M, Gualda EJ, Pawłowska M, Legutko D, Matryba P, Koza P, Konopka W, Owczarek D, Wawrzyniak M, Loza-Alvarez P, Kaczmarek L (2016) Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with Thy1-GFP transgene. *Sci Rep* 28209 doi:10.1038/srep28209
32. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, Olsen O, Dulac C, Osten P, Tessier-Lavigne M (2016) Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* 165(7): 1789-802
33. Bria A, Iannello G (2012) TeraStitcher - A tool for fast automatic 3D-stitching of teravoxel-sized microscopy images. *BMC Bioinformatics* 13: 316
34. Frasconi P, Silvestri L, Soda P, Cortini R, Pavone FS, Iannello G (2014) Large-scale automated identification of mouse brain cells in confocal light sheet microscopy images. *Bioinformatics* 30: i587-i593
35. Lichtman JW, Livet J, Sanes JR (2008) A technicolour approach to the connectome. *Nat Rev Neurosci* 9: 417-422
36. Shibata S, Komaki Y, Seki F, Inouye MO, Nagai T, Okano H (2014) Connectomics: comprehensive approaches for whole-brain mapping. *Microscopy* 103: 57-67
37. Chiang AS, Lin CY, Chuang CC, Chang HM, Hsieh CH, Yeh CW, Shih CT, Wu JJ, Wang GT, Chen YC, Wu CC, Chen GY, Ching YT, Lee PC, Lin CY, Lin HH, Wu CC, Hsu HW, Huang YA, Chen JY, Chiang HJ, Lu CF, Ni RF, Yeh CY, Hwang JK (2011) Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in *Drosophila* at single-cell resolution. *Curr Biol* 21: 1-11
38. Lemon WC, Pulver SR, Höckendorf B, McDole K, Branson K, Freeman J, Keller PJ (2015) Whole-central nervous system functional imaging in larval *Drosophila*. *Nat Commun* 6: 7924
39. Lo C-C, Chiang A-S (2016) Toward whole-body connectomics. *J Neurosci* 36: 11375-11383
40. Ye L, Allen WE, Thompson KR, Tian Q, Hsueh B, Ramakrishnan C, Wang AC, Jennings JH, Adhikari A, Halpern CH, Witten IB, Barth AL, Luo L, McNab JA, Deisseroth K (2016) Wiring and molecular features of prefrontal ensembles representing distinct experiences. *Cell* 165: 1776-1788
41. Wickersham IR, Finke S, Conzelmann K-K, Callaway EM (2007) Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat Methods* 4: 47-49
42. Callaway EM (2008) Transneuronal circuit tracing with neurotropic viruses. *Curr Opin Neurobiol* 18: 617-623
43. Hsiang H-L (Liz), Epp JR, Oever MC van den, Yan C, Rashid AJ, Insel N, Ye L, Niibori Y, Deisseroth K, Frankland PW, Josselyn SA (2014) Manipulating a "Cocaine Engram" in mice. *J Neurosci* 34: 14115-14127
44. Ando K, Laborde Q, Lazar A, Godefroy D, Youssef I, Amar M, Pooler A, Potier MC, Delatour B, Duyckaerts C (2014) Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol (Berl)* 128: 457-459
45. Spence RD, Kurth F, Itoh N, Mongerson CR, Wailes SH, Peng MS, MacKenzie-Graham AJ (2014) Bringing CLARITY to gray matter atrophy. *NeuroImage* 101: 625-632
46. Sylwestrak EL, Rajasethupathy P, Wright MA, Jaffe A, Deisseroth K (2016) Multiplexed intact-tissue transcriptional analysis at cellular resolution. *Cell* 164: 792-804
47. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, Jaiyeola C, Zhao Z, Luby-Phelps K, Morrison SJ (2015) Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526: 126-130
48. Abe J, Ozga AJ, Swoger J, Sharpe J, Ripoll J, Stein JV (2016) Light sheet fluorescence microscopy for in situ cell interaction analysis in mouse lymph nodes. *J Immunol Methods* 431: 1-10

Getting an insight into the brain - new optical clearing techniques and imaging using light-sheet microscope

Monika Pawłowska, Diana Legutko, Marzena Stefaniuk✉

Laboratory of Neurobiology, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: m.stefaniuk@nencki.gov.pl

Key words: optical clearing, light-sheet microscopy, whole-brain imaging

ABSTRACT

One of the biggest challenges in neuroscience is to understand how brain operates. For this, it would be the best to image the whole brain with at least cellular resolution, preserving the three-dimensional structure in order to capture the connections between different areas. Most currently available high-resolution imaging techniques are based on preparing thin brain sections that are next photographed one by one and subsequently bigger structures are reconstructed. These techniques are laborious and create artifacts. Recent optical clearing methods allow to obtain literally transparent brains that can be imaged using light-sheet microscope. The present review summarizes the most popular optical clearing techniques, describing their different mechanisms and comparing advantages and disadvantages of different approaches, and presents the principle of light-sheet microscopy and its use in imaging. Finally, it gives examples of application of optical tissue clearing and light-sheet imaging in neuroscience and beyond it.