

Schlussbericht

zum Vorhaben: Qualifizierung der Lichtblattmikroskopie sowie Konzepte für eine multimodale Korrelation

des Verbundprojekts: Einfaches und schnelles Lichtblatt-Fluoreszenz-Mikroskopsystem zur tomographischen Erfassung von biologischen Proben für den klinischen Alltag in der Pathologie (3Dpatho)

Zuwendungsempfänger: Georg-August-Universität Göttingen - Universitätsmedizin

Förderkennzeichen: 13N14371

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2017 – 30.04.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

Zusammenfassung

Die mikroskopische Diagnostik in der Pathologie beschränkt sich derzeit auf die Beurteilung mikrometerdünner Gewebeschnitte, wodurch wichtige 3D-anatomische Einsichten verloren gehen. Das Projekt 3Dpatho zielte darauf ab, der Pathologie diese fehlenden 3D-Einblicke bei größeren Gewebeproben zu ermöglichen.

Das Projekt wurde im Rahmen des Förderprogramms „Photonik Forschung Deutschland“ in der Bekanntmachung „Photonische Systemlösungen für Medizin und Biotechnologie“ durchgeführt. Ziel war die anwendungsorientierte Erforschung eines einfachen und robusten Lichtblattnikroskop-Gerätesystems, das auf die pathologische Nutzung ausgerichtet ist. Das System bildet ganze Gewebelöcher mittels Lichtblatt-Fluoreszenz-Mikroskopie (LSFM) optisch in drei Dimensionen ab. Beteiligt waren die industriellen Partner Omicron-Laserprodukte GmbH, PCO AG, Marienfeld Superior GmbH & Co. KG, MoBiTec GmbH und TILL I.D. GmbH, sowie unsere Arbeitsgruppen — Prof. Dr. Wouters und Dr. Bunt — am Institut für Neuropathologie und die klinischen Partner, das Institut für Neuropathologie und das Institut für Pathologie, der Universitätsmedizin Göttingen (UMG).

Um die LSFM-Technik direkt im Anschluss an das Projekt erfolgreich in der klinischen Praxis einführen zu können, wurde ein mit der routinemäßigen pathologischen Gewebediagnostik vereinbares Gesamtkonzept erarbeitet, das sowohl die Hardware-Seite des Gerätes als auch die verfahrens- und anwendungstechnische Seite der Probenpräparation und der Bilddarstellung integriert. Aufgabe dieses Vorhabens war es, die Voraussetzungen für die Einführung der Lichtblattnikroskopie in der pathologischen Routine zu schaffen und die klinische Anwendung zu validieren. Dafür haben wir (1) die Bildqualität untersucht und verbessert, (2) Konzepte für die digitale Darstellung diagnostisch relevanter optischer Signale erarbeitet und (3) die Kompatibilität der Gewebeaufbereitung mit der routinemäßigen diagnostischen Anwendung überprüft. Dies führte zu neuen multimodalen Bildgebungsansätzen und Darstellungsmöglichkeiten sowie maßgeschneiderten Lösungen für das Clearen und Färben von Gewebe. Zudem konnte die volle Kompatibilität unseres Gewebeclearingverfahrens mit der Routinediagnostik der Pathologie, einschließlich der Paraffinverarbeitung, sichergestellt werden. Zusammen mit Pathologen an der UMG und dem Städtischen Krankenhaus Karlsruhe wurde das LSFM-System in ausgewählten pathologischen Referenzanwendungen in der realen Einsatzumgebung validiert.

Mit der Lichtblattnikroskopie soll eine schnellere und vollständigere histologische Aufarbeitung und Diagnostik zur Verfügung stehen. Darüber hinaus bietet sie dem Arzt erstmals Zugang zu dreidimensionaler Information in Patienten-Gewebeproben, was neue diagnostische und prognostische 3D-morphologische Parameter für eine genauere Klassifizierung und personalisierte Behandlung von Patienten eröffnet.

Einleitung

1.1 Aufgabenstellung

In der Pathologie werden derzeit routinemäßig zweidimensionale, mikrometerdünne Gewebeschnitte für die mikroskopische Diagnose verwendet. Hierbei entgeht jedoch die mikroskopisch-anatomische Einsicht in drei Dimensionen.

Mit dem Projekt 3Dpatho möchten wir der Pathologie die fehlenden 3D-Einblicke bei größeren Gewebeproben ermöglichen. Hierzu wurde vom Verbund ein auf die pathologische Anwendung ausgerichtetes, einfach anzuwendendes und robustes Gerätesystem für die 3-dimensionale Gewebediagnostik erarbeitet. Dieses System bildet ganze Gewebeblöcke mittels eines mesoskopischen Lichtblatt-Fluoreszenz-Mikroskops vollständig optisch ab. Um die Einführung der LSFM-Technik in der klinischen Praxis direkt im Anschluss an das Projekt erfolgreich umsetzen zu können, wurde ein mit der routinemäßigen pathologischen Gewebediagnostik vereinbares Gesamtkonzept erarbeitet, das sowohl die Hardware-Seite des Gerätes als auch die verfahrens- und anwendungstechnische Seite der Probenpräparation und der Bilddarstellung integriert.

Die Aufgabe dieses Vorhabens war es, die Voraussetzungen für die Einführung der mesoskopischen Lichtblattmikroskopie in der pathologischen Routine zu schaffen, und die klinische Anwendung zu validieren. Die Arbeiten umfassten die Untersuchung und Verbesserung der bildgebenden Qualität sowie die Erstellung von Konzepten für die Erhebung und Darstellung diagnostisch relevanter optische Signale. Weiter wurde die Anwendbarkeit der neuen Technologie in der Pathologie durch die Etablierung optimaler Gewebeaufbereitungsprotokolle und Färbungen eröffnet und in pathologischen Referenzanwendungen erprobt.

Eine vollständige 3D-Untersuchung von Geweben wird eine ganzheitliche und schnellere histologische Diagnostik ermöglichen, sowie neue diagnostische und prognostische 3D-morphologische Parameter für eine präzisere Klassifizierung.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Ausgangspunkt für das Vorhaben waren unsere Vorarbeiten im Labor für Molekulare und Strukturelle Mikroskopie (Prof. Dr. F.S. Wouters) und die Technologieplattform für Klinische Optische Mikroskopie — CLINOMIC — (Dr. G. Bunt) am Institut für Neuropathologie der UMG. Unsere Arbeitsgruppen haben mit einer frühen, selbst erstellten Vorversion eines einfachen Lichtblattmikroskops erste Erfahrungen in der pathologischen Anwendung gesammelt. Weiter wurde ein eigenes, auf die Routinepathologie konzipiertes Clearingverfahren für stark blutbelastetes Gewebematerial in das Vorhaben eingebracht. Beteiligt am Vorhaben waren weiter die klinischen Partner, das Institut für Neuropathologie und das Institut für Pathologie der UMG. Für die Umsetzung der LSFM-Technologie wurden die Firmen Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH, Till-I.D. GmbH, PCO AG, Marienfeld Superior GmbH & Co. KG, und MoBiTec

GmbH in das Projekt eingebunden. Unabhängige Vergleichsuntersuchungen für optimale Gewebeclearing-Konditionen wurden als Unterauftrag an der Technischen Universität Wien durchgeführt. Eine abschließende Validierung und der Einsatz unserer LSFM-Technik in der pathologischen Umgebung erfolgten im Rahmen eines Unterauftrags am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses Karlsruhe (SKK).

1.3 Stand der Technik zu Projektbeginn

Neue tomographische bildgebende Verfahren in der Medizin wie die Sonographie, die Computertomographie und die Kernspintomographie haben die Diagnostik revolutioniert und nehmen eine wichtige therapieweisende Position unter den diagnostischen Werkzeugen des Arztes ein. Sie besitzen jedoch nicht die Auflösung der Dünnschnittmikroskopie in der pathologischen Praxis. Diese verfügt zwar über die notwendige zelluläre Auflösung, beschränkt sich jedoch auf mikrometerdünne 2D-Gewebeschnitte. Die mesoskopische Lichtblatt-Mikroskopie ermöglicht durch die Kombination einer großflächigen Abbildung, spezifischer Färbung und großer Gewebedurchdringung eine einzigartige optische 3D-Diagnostik, die räumlichen Informationen der Gewebearchitektur in höherer Auflösung darzustellen. Sie schließt damit die Lücke in der Auflösung zwischen den makroskopischen Bildgebungsverfahren und der Dünnschnittmikroskopie.

Bei der LSFM wird das Gewebe transparent gemacht (gecleart) und mit einer dünnen Laser-Lichtscheibe 'optisch geschnitten' und in allen drei Dimensionen erfasst. In den Lebenswissenschaften wird Lichtblattmikroskopie bereits für verschiedene Bereiche und Fragestellungen wie die Neurowissenschaften und Embryologie eingesetzt, da sie wichtige strukturelle Informationen liefert. Die hohe Komplexität der kommerziell verfügbaren LSFM-Geräte sowie die nicht ausreichende Kompatibilität der existierenden Clearingverfahren mit dem Routineablauf der pathologischen Diagnostik verhinderten jedoch ihren Einsatz in der klinischen Praxis.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projekts wurde eng mit allen Verbundpartnern, den klinischen Partnern der UMG, der Technischen Universität Wien und dem Pathologischen Institut des SKK zusammengearbeitet. Weitere Parteien waren nicht beteiligt.

2 Hauptteil

Die Ziele des Vorhabens waren es, (1) die optische Qualität in der Beleuchtung und Detektion mesoskopischer Lichtblattmikroskopie (LSFM) in pathologischem Gewebe zu untersuchen und die Bilddarstellung zu verbessern, (2) Konzepte für die Erhebung und digitale Darstellung diagnostisch relevanter optischer Signale zu erstellen, sowie (3) die Anwendbarkeit der Lichtblattmikroskopie in ausgewählten pathologischen Referenzanwendungen, durch maßgeschneiderte Clearingprotokolle und Gewebefärbungen zu ermöglichen.

2.1 Ergebnisse und Arbeiten zu den einzelnen Arbeitspaketen

2.1.1 Erforschung der bildgebenden Qualität in pathologischen Geweben und Konzeptionierung von Strategien für eine maximale Auflösung

Die Bildqualität bei Lichtblattmikroskopie nimmt entlang des Lichtblatts und mit der Gewebetiefe zunehmend ab. Zwei Prozesse spielen hier eine entscheidende Rolle: (i) die abnehmende Lichtblatt-Qualität durch Lichtstreuung und Absorption im Gewebe bei der seitlichen Durchdringung der Probe, und (ii) die Bildgebungsfehler in der Fluoreszenzinformation auf ihrem Weg durch das Gewebe zur Kamera. Die Aufgabe dieses Arbeitspakets (AP) bestand darin, bildgebende Qualitätsparameter der Lichtblattmikroskopie in Gewebe zu bestimmen und Strategien für eine verbesserte Auflösung zu erarbeiten.

Eine Herausforderung hierbei war, dass die LSFM-Bildqualität im Gewebe ortsabhängig ist, d. h. in der Fläche (xy) als auch entlang der Tiefenachse (z) variiert. Daher haben wir ein Vorgehen erarbeitet, um diese Ortsabhängigkeit für Gewebeproben mit unterschiedlichen Geometrien standardisiert zu erfassen. Hierzu wurde für jeden Voxel in einer Probe jeweils die zugehörigen Beleuchtungs- und bildseitigen optischen Weglängen im Gewebe bestimmt. Als Maß für die Bildqualität wurde eine frequenzabhängige Kontrastparameter definiert und eine Kontrasttoleranzgrenze gesetzt. Mit diesem Ansatz konnte, unabhängig von der Probengeometrie, ein 3D-Volumen definiert werden, das sich über viele Proben und verschiedene Gewebesorten mitteln lässt. Dieses zusammengesetzte ‚Nutz‘-Volumen stellt ein objektives und quantitatives Qualitätsmaß für die Durchsichtigkeit der Probe und die abbildende Qualität des Mikroskops dar. Es diente als Bewertungskriterium für Verbesserungsansätze für die Bildqualität und die Qualität der Clearing-Protokolle, die in diesem Vorhaben bearbeitet wurden.

Zur Verbesserung der Bildqualität wurden Software-Routinen erarbeitet, die die lichtblattmikroskopischen Bildgebungsartefakten entgegenwirken. Lichtblattmikroskopie-Bilder sind inhärent von einem Streifenartefakt in der Laufrichtung des Lichtblatts geprägt. Die Streifen entstehen durch unvermeidbare Brechungsunterschiede am Übergang vom Medium zur Probe, die einen dünnen „Schatten“ in der Probe werfen. Dieses Artefakt wurde anhand seiner Bildfrequenzsignatur im Fourier-Amplitudenspektrum isoliert und aus den Bildern entfernt.

Andererseits entsteht eine Bildunschärfe bei größerer Objektiefe, die mittels Bilddekonvolution verbessert werden kann. Bei einer Dekonvolution wird ermittelt, wie das optische System ein Punktobjekt bei der Abbildung in den drei Dimensionen verstreut. Ist diese Unschärfefunktion (die „Point Spread Funktion“ PSF) bekannt, dann kann das Problem invertiert werden, d. h. diese Unschärfe kann zurückgerechnet werden. Da die Bildgebungsfehler bei der mesoskopischen Lichtblattnmikroskopie ortsabhängig sind, und jeder Voxel seinen eigenen PSF besitzt, konnten herkömmliche klassische Dekonvolutionsverfahren auf der Basis eines einheitlichen PSF nicht genutzt werden.

Um dies zu lösen haben wir ein mathematisches Verfahren für die Korrektur der ortsabhängigen Abbildungsunschärfe erarbeitet (Patentanmeldung; DE102019127846A) und hierzu eine Software-Routine geschrieben. Mit diesem Dekonvolutionsverfahren wurde eine beträchtliche 2,4-fache Zunahme des Bildkontrasts erreicht (Abbildung 1).

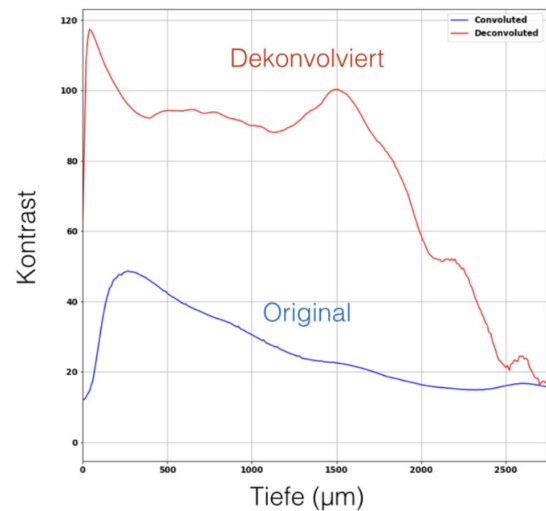
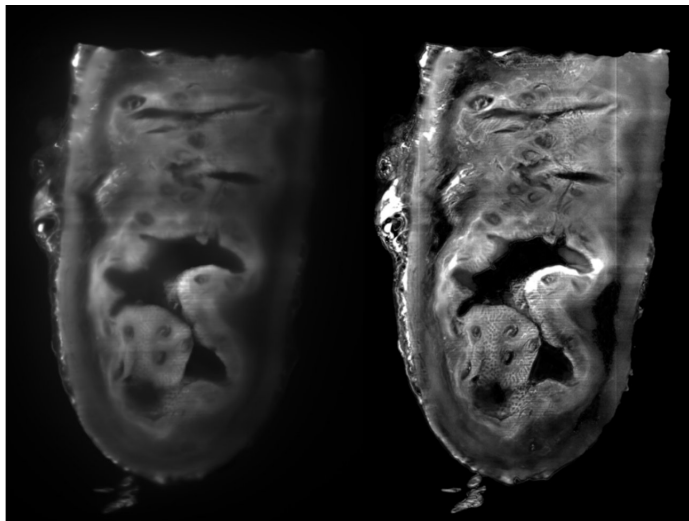


Abbildung 1: Erhöhung des Bildkontrasts der Lichtblattaufnahmen durch ortsabhängige Dekonvolution. Links: LSM-Autofluoreszenzaufnahme eines repräsentativen optischen Schnitts eines geclearten Blinddarms vor und nach der Bilddekonvolution. Rechts: Kontrastanalyse der gesamten 3D-Bildaufnahme des Blinddarms in Abhängigkeit von der Bildtiefe.

2.1.2 Konzipierung von Verfahren für die Identifizierung und Darstellung unterschiedlicher Gewebekomponenten

Dieses AP zielte auf die Erstellung von Bildaufnahme- und Bildbearbeitungsprotokollen für die Darstellung diagnostisch relevanter optischer Gewebesignale. Es wurde untersucht, wie Gewebeintrinsic photonische Information, wie die spektral aufgelöste Autofluoreszenz, Streusignale und Polarisation, verarbeitet werden können, um informative label-freie Kontraste zwischen unterschiedlichen Gewebekomponenten darzustellen. Zudem wurde untersucht, wie durch ihre Kombination („Multidimensionalität“) neue Kontraste erzeugt werden können.

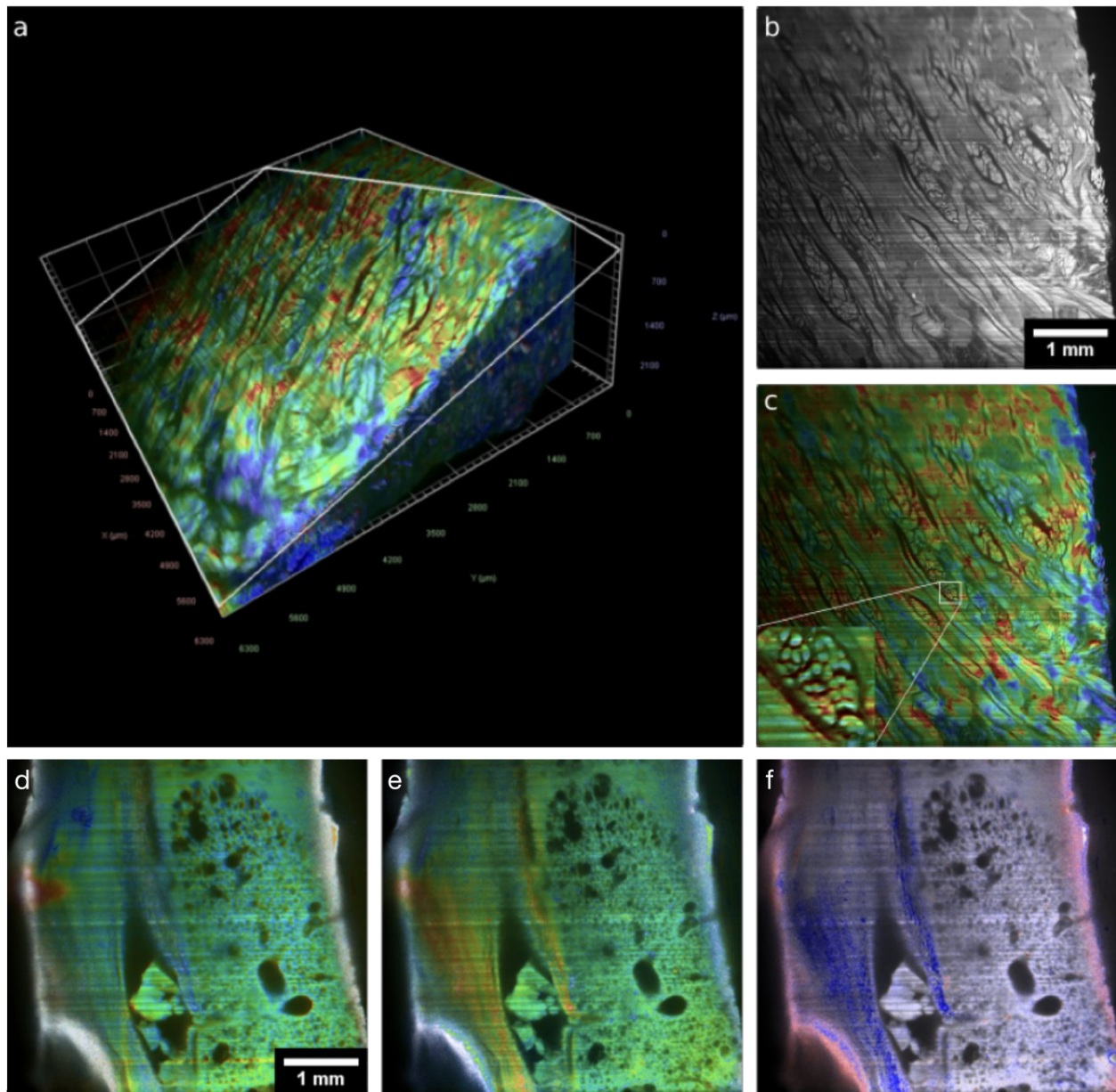


Abbildung 2: Multimodale photonische LSFM 3D-Gewebebildgebung: (a) Polarisierter Streulichtaufnahme eines 3D-Gewebeblocks der menschlichen Zunge, dargestellt mit den Polarisationswinkeln (Farbe), Polarisationsgrad (Farbsättigung) und Signalintensität (Helligkeit). (b) Helligkeit und (c) Polarisation des Streusignals eines Einzelschnittes. Die Polarisationsparameter repräsentieren die verschiedenen Ausrichtungen der Muskelfasern in der Tiefe. (d-f) Spektral aufgelöste Polarisationsaufnahmen von Lungengewebe. Dargestellt ist ein optischer Schnitt in einer Tiefe von 3 mm, aufgenommen mit linear polarisierter Laseranregung bei (a) 488 nm und (e) 638 nm. (f) Das spektrale Differenzpolarisationsbild von d und e: Die Knorpelfasern (blau) heben sich vom Lungengewebe (weiß) ab.

Da verschiedene Gewebekomponenten ähnliche Absorptions-, Streuungs- und Fluoreszenzverhalten aufweisen, ist ihre Segmentierung auf Basis der Intensitäten allein unzureichend. Aus diesem Grund wurde ein Analyseansatz erarbeitet, der die lokale Textur und morphometrischen Eigenschaften im Bild darstellt. Mittels statistischem Clustern wurden die

verschiedenen Merkmale gruppiert und als synthetische Kontrastbilder dargestellt. Das etablierte Segmentierungsverfahren wird anschließend auf alle Ebenen des LSFM-Datensatzes angewendet und ermöglichte es uns, unter anderem Blutgefäße vom intensitätsähnlichen Drüsen-Netzwerk des Brustgewebes in 3D zu differenzieren.

Zusätzlich zu Fluoreszenz-Intensitätssignalen wurde die Nutzung von Streuungs- und Polarisationsinformationen für die Erzeugung informativer Bildkontraste untersucht (Abbildung 2). Für die Durchführung von Polarisationsmessungen wurde das Lichtblatt-Mikroskop in enger Zusammenarbeit mit dem Partner Omicron hardwareseitig für die Aufnahmemöglichkeiten von Fluoreszenz- und Streusignale mit linear polarisiertem Licht angepasst. Dazu wurde ein hauseigenes modulares Software-Konzept für den automatisierten Betrieb des Mikroskops integriert. Die Software-Architektur erlaubt eine einfache Funktionalitätserweiterung und Einbindung von Hardwarekomponenten, die Echtzeitsteuerung des Mikroskops sowie des vom Partner PCO im Projekt bereitgestellten hochauflösenden dedizierten 26 MPx-Kameras. Die Bilddatenspeicherung und Nutzersteuerung bilden dabei getrennte Prozessen.

Die Analyse der Polarisationsdrehung in verschiedenen Gewebestrukturen ermöglichte es uns, einen zusätzlichen Kontrast in den Aufnahmen zu erreichen. Die Detektion der spektralen Abhängigkeit der Polarisationsseigenschaften von Streusignalen führte zu einer weiteren Steigerung der Multidimensionalität der Aufnahmen und verbesserte die Identifizierung unterschiedlicher Gewebekomponenten (Abbildung 2, d-f).

2.1.3 Erforschung von Clearingverfahren für onkologisches Gewebe; Tumorzellen in Lymphknoten und Kolonkarzinom

Im mesoskopischen Lichtblattmikroskop bildet das Gewebe einen fundamentalen Teil des optischen Strahlengangs. Die erreichbare Bildqualität im LSFM wird somit wesentlich durch die Transparenz des Gewebes nach dem Clearing-Prozess bestimmt. Die Aufgabe dieses Arbeitspakets bestand vor allem darin, die optimalen Bedingungen für das Clearing von großen pathologischen Proben, insbesondere von onkologischem Gewebe, zu erforschen.

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde in einem Unterauftrag das vom Prof. Dr. H.-U. Dodt von der Technischen Universität Wien etablierte Clearingverfahren „PathoDISCO“ (Litschauer et al., Sci Rep 10, 17619 (2020)) mit unserem „ROCCIT“-Verfahren (Rapid Optical Clearing for the Clinical Imaging of Tissue, Patent DE102016123458B3) verglichen. Hierzu lieferte das Labor von Prof. Dodt Kolonkarzinomproben, die gemäß dem „PathoDISCO“-Protokoll gecleart wurden, sowie Proben derselben Resektate, die wir mittels unserem „ROCCIT“-Verfahren clearnten.

Das PathoDISCO-Verfahren sieht eine Ansäuerung der Probe vor. Dies wurde einmal mit HCl und einmal mit 5-Sulfosalicylsäure (SSA) durchgeführt. Die Proben wurden zuerst gemäß des PathoDISCO-Protokolls in Dibenzylether (DBE) eingebettet und mittels LSFM analysiert, und anschließend noch einmal in das ROCCIT-Medium eingebettet und erneut mikroskopisch untersucht (Abbildung 3).

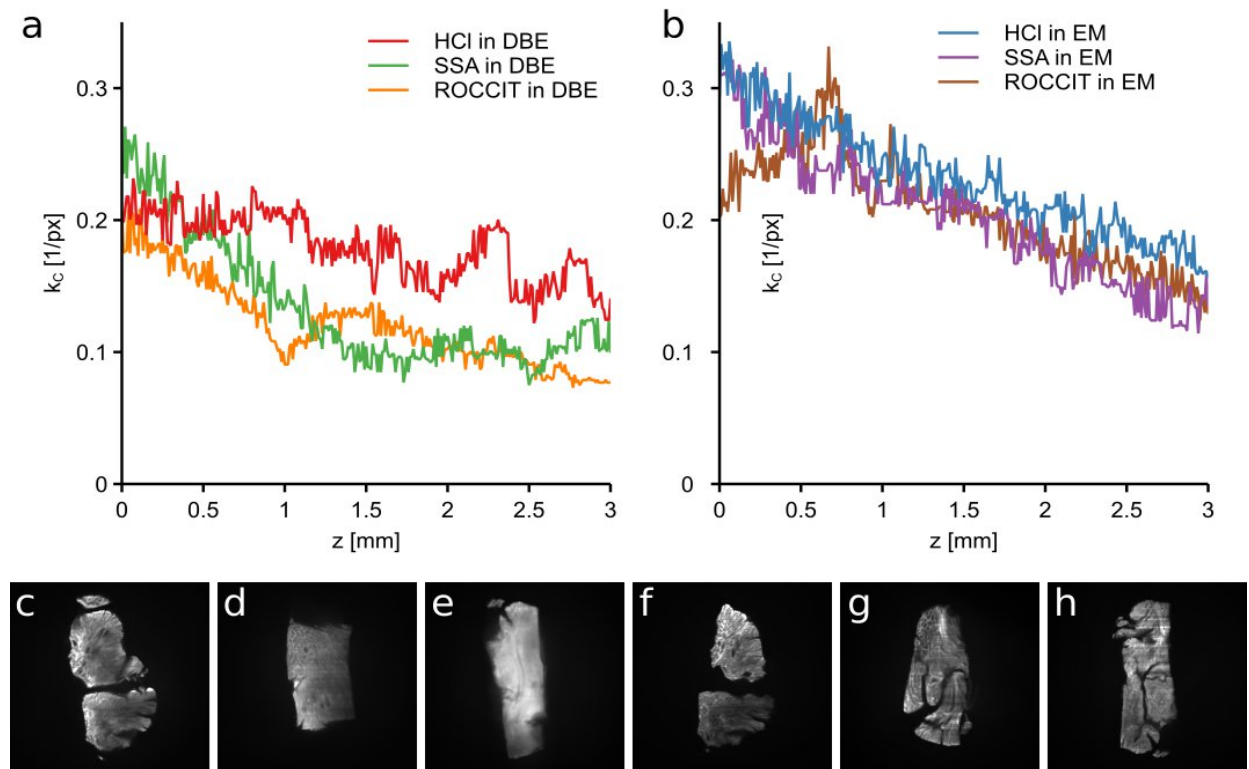


Abbildung 3: Vergleichende LSFM-Untersuchung der Clearingverfahren „PathoDISCO“ und „ROCCIT“ an Kolonkarzinomproben. (a-b) Bildauflösung in Abhängigkeit der Tiefe, gecleart mit PathoDISCO (HCl oder SSA) oder ROCCIT. Höhere Werte für die kritische cut-off-Frequenz entsprechen einer höheren Auflösung. (a) Einbettung der Proben in DBE, und (b) in ROCCIT-Einbettungsmedium (EM). Bilderreihe (c-h) zeigt eine einzelne Schnittebene auf einer Tiefe von 1 mm: HCL (c,f), SSA (d,g), ROCCIT (e,h) in DBE (c-e) oder EM (f-h).

In DBE zeigten die HCl-angesäuerten Proben eine hohe optische Qualität. Die SSA-angesäuerten Proben und die Proben, die mit dem ROCCIT-Protokoll gecleart wurden, erreichten eine untereinander vergleichbare, aber leicht verringerte Qualität. In unserem ROCCIT Einbettungsmedium wurde jedoch, unabhängig von der Probevorbereitung, die höchste optische Qualität erreicht. Dies zeigt, dass das Einbettungsmedium einen entscheidenden Einfluss auf das Clearing-Ergebnis hat. Zudem wurde die Anfärbung von Kernen untersucht und ein Protokoll mit dem grün fluoreszenten DNA-Farbstoff TO-PRO-1 erarbeitet. Insbesondere wurden die Verträglichkeit des Farbstoffs mit den Entwässerungs- und Einbettungsschritten untersucht.

Ein weiteres Ziel dieses Arbeitspakets war es, den Zugang zu pathologisch paraffin-eingebetteten Archivmaterialien zu ermöglichen. Paraffin-eingebettetes Material umfasst wertvolles Archivmaterial und diagnostisch gesicherte Proben. So liegen uns metastasenbefallene Lymphknoten fast ausschließlich als paraffin-eingebettetes Material vor.

Es wurde ein Protokoll für eine effiziente und schonende Entparaffinierung von Paraffinblöcken erarbeitet, das vor dem Clearing-Prozess eingesetzt wird. Hierzu wird das Paraffin größtenteils

abgeschmolzen und ausgewaschen. Nach dem Clearing konnten die entparaffinierten Lymphknoten mit hoher Qualität mikroskopiert werden. Der Tumoranteil wurde dabei mittels der bereits in AP 2 vorgestellten Texture-Analyse der Autofluoreszenz dargestellt (Abbildung 4). Weitere Beispiele für erfolgreich prozessierte paraffin-einbettete Gewebe sind Darm, Lunge, Leber und Tumore. Eine Entparaffinierung ermöglicht es, eine große Auswahl an Archivmaterial für die LSM zu nutzen, und erhöht dessen Relevanz für die pathologische Praxis.

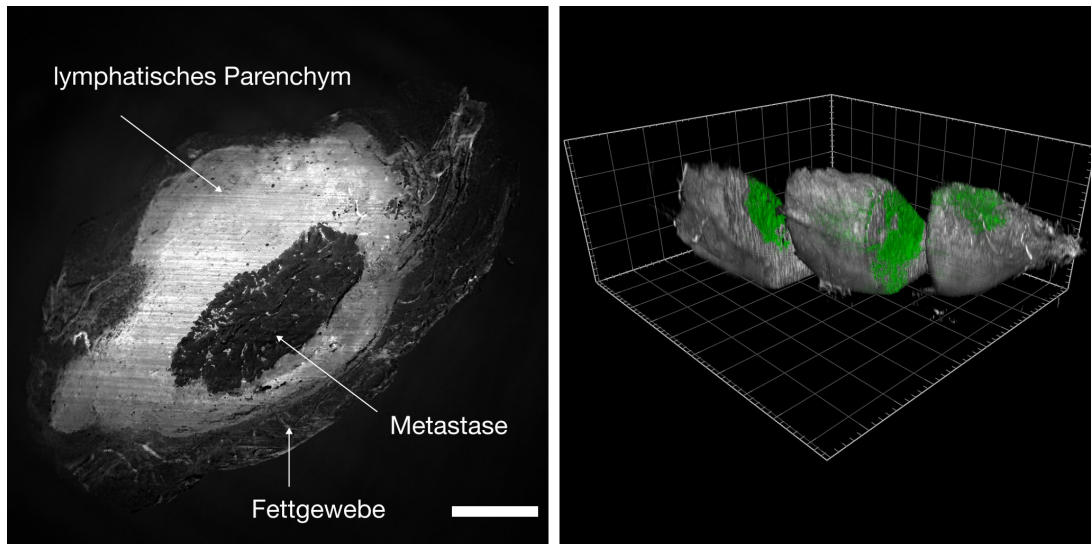


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit Metastasen befallenen Lymphknotens, aufgearbeitet aus einem Paraffinblock und gecleart. Links: Autofluoreszenzaufnahme, Rechts: Segmentiertes Bild auf Basis der Textursignatur mit Metastase in grün. Rastermaß=1 mm.

2.1.4 Erforschung von Clearingverfahren zur Erkennung von Entzündungsereignissen und Entmarkung im menschlichen Gehirn

Gehirngewebe unterscheidet sich grundsätzlich von anderen Gewebearten durch seine einzigartige Zusammensetzung und Struktur. Aufgrund der Myelinscheide der Nervenzellen ist es sehr fettreich, insbesondere liegen hier Lipiden assoziiert in dichten Netzwerken mit Proteinen vor. Zudem fehlen weitestgehend bindegewebige Bestandteile, die dem Organ strukturieren und mechanisch stabilisieren. Die Lipide im Myelin der weißen Substanz lassen sich schwierig entfernen. Zudem stellte sich heraus, dass von allen getesteten Gewebetypen das Gehirngewebe am meisten unter Volumenveränderungen während des Prozesses leidet. Dabei ist menschliches Gehirngewebe besonders schwierig durchsichtig zu machen. Demnach gibt es abweichende Anforderungen beim Clearing von Gehirngewebe.

Die Ziele dieses Arbeitspaketes bestanden in der Erarbeitung von Clearing- und Färbeprotokollen für humanes zentralnervöses Gewebe, um Erkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose und andere

entmarkende Erkrankungen mittels LSFM räumlich untersuchen zu können. Wir haben die Clearingkonditionen so verändert, dass sich Lipide effizient aus dem dichten Myelin entfernen lassen und Volumenänderungen des Gewebes vorgebeugt werden (Patentanmeldung EP4446723A1). Hiermit wurde eine hohe Durchsichtigkeit für menschliches Autopsie-Gehirngewebe bei Beibehaltung einer intakten Mikroanatomie erreicht (Abbildung 5). Zudem konnten wir nachweisen, dass dieses schonende Verfahren auch bei anderen menschlichen Gewebearten erfolgreich eingesetzt werden kann.

Für den Nachweis von entmarkenden Erkrankungen, d.h. von demyelinisierenden Läsionen, ist es essentiell, das Myelin mit hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffen anzufärben, da nur so eine Verringerung sichtbar wird. Da eine Einbettung in organische Lösungsmittel die Verwendung hydrophober Farbstoffe ausschließt, haben wir geeignete wässrige Einbettungsmedien untersucht, die den notwendigen hohen Brechungsindex erreichen können. In diesen Einbettungsmedien war es uns möglich, das Myelin mit dem hydrophoben Farbstoff Nilrot anzufärben und abzubilden.

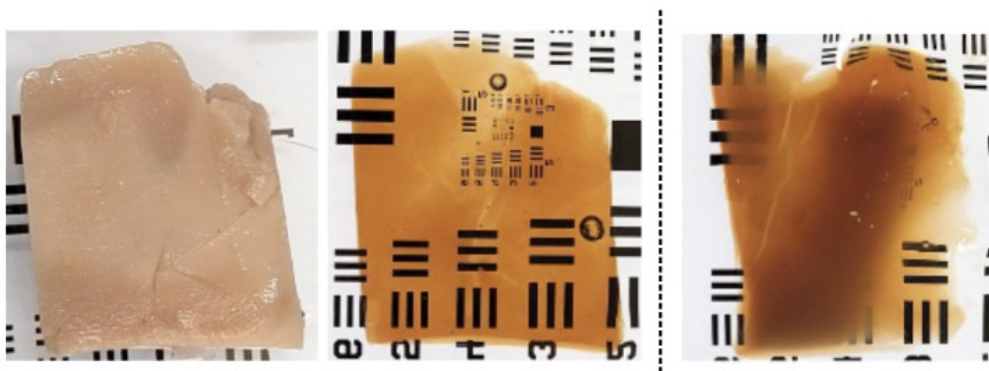


Abbildung 5: Clearing von langzeit-fixiertem menschlichem Gehirngewebe. Links: Formalin-fixierte Gehirnprobe, Mitte: Die gleiche Probe geclart nach dem neuen Verfahren. Rechts: Eine vergleichbare Gehirnprobe geclart nach dem bisherigen ROCCIT-Verfahren. Die weiße Substanz bleibt undurchsichtig.

2.1.5 Erarbeitung der 3D-anatomischen Grundlagen für die Verwendung der LSFM-Technologie in der Routinediagnostik

Hauptanliegen unseres Vorhabens ist der zukünftige Einsatz der erarbeiteten Methoden der LSFM-Mikroskopie und Gewebeclearing in der histopathologischen Diagnostik. Ein wichtiger Schritt in der Akzeptanz des neuen Verfahrens ist dabei, die einfache Interpretation der 3D-Gewebeinformation zu ermöglichen.

In diesem Arbeitspaket lag der Fokus darauf, spezifische anatomische Gewebemerkmale durch LSFM-kompatible histochemische Färbungen sichtbar zu machen. Eosin und Picrosirius-Rot sind bekannte histochemische Farbstoffe für den Nachweis von Elastin bzw. Kollagen, die relevante Gewebestrukturen für eine pathologische Begutachtung darstellen. Beide Farbstoffe sind intrinsisch fluoreszent und damit prinzipiell für die LSFM geeignet.

Die Färbezeit und Konzentration der beiden Farbstoffe wurden systematisch variiert, und es wurden optimale Färbeprotokolle erstellt. Beide Färbungen sind mit organischen Einbettungsmedien kompatibel. Die Bedingungen unterscheiden sich für eine *en bloc* Fluoreszenzanwendung jedoch stark von der klassischen Dünnschnitt-Lichtabsorptionsanwendung. Die Eosinfärbung funktioniert am besten *en bloc* und zeigt eine homogene und durchgängige Färbung. Im Vergleich dazu bleibt die Picosirius-Rot-Färbung oberflächlich. Außerdem konnte die Eosinfärbung auch in das wässrige Einbettungsmedium PROTOSp durchgeführt werden.

Der zeitliche Verlauf der *en bloc* Eindringung von Eosin wurde gemeinsam mit dem Partner MobiTec experimentell im Lichtblattmikroskop bestimmt. Die ermittelte Halbwertszeit der Eosin-Eindringung betrug 23 Minuten. Für einen Gewebeblock von etwa 0,5 x 0,5 cm dauert die Färbezeit damit etwa 1,5 Stunden. Die Eosinfärbung von Lymphknoten (Abbildung 6) entspricht unserem Halbzeitmeilenstein für eine pathologisch relevante Färbung.

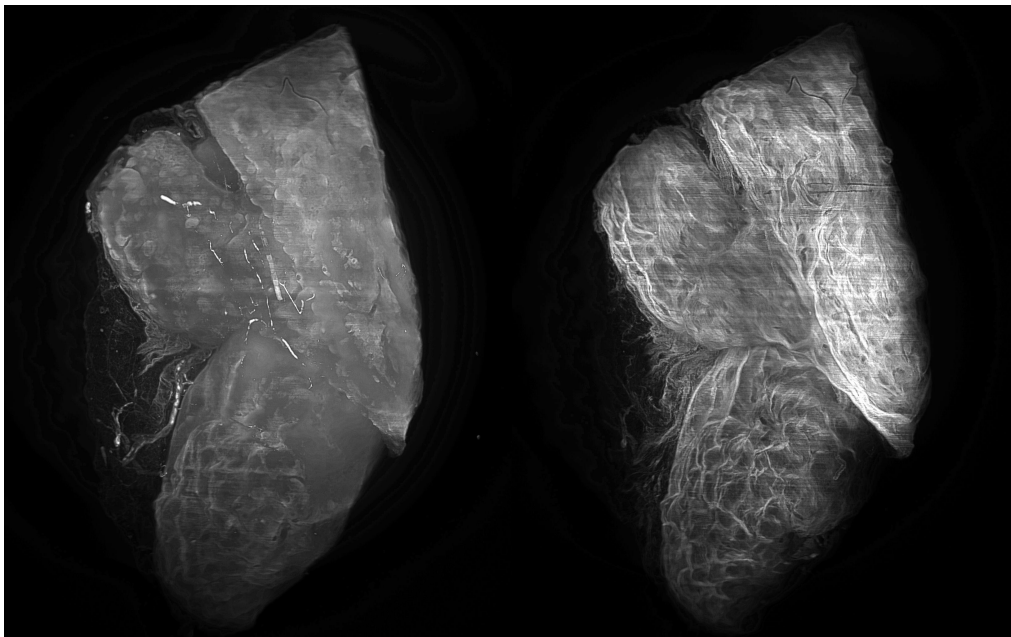


Abbildung 6: LSFM 3D -Aufnahme eines menschlichen Lymphknotens: Maximalprojektion der Autofluoreszenz (links) und der Eosin-vermittelten Fluoreszenz (rechts) .

Die primären Diagnosen in der Pathologie basieren routinemäßig auf Hematoxylin- und Eosin (H&E) Färbungen. Um die 3D-Gewebedarstellung und die diagnostischen Möglichkeiten in LSFM weiter zu stärken, wurde eine H&E-ähnliche fluoreszente *en bloc* Färbung erarbeitet. Dafür wurde das fluoreszente Eosin-Signal mit einer fluoreszenten Kernfärbung, die als Alternative zu Hämatoxylin dient, in einer Doppel-Färbung ergänzt. Obwohl die Darstellung der beiden fluoreszenten Farbkanäle den gleichen Informationsinhalt wie die H&E-Darstellung besitzt, sind die Pathologen mit der fluoreszenten Intensitäts-Darstellung nicht vertraut. Aus diesem Grund

haben wir eine Softwareroutine erarbeitet, mit der diese in die gewohnten H&E-Farben transformiert werden können. Hierfür wurden mittels Machine Learning die Farbvektoren einer typischen H&E-Färbung ermittelt und auf die Fluoreszenzkanäle entsprechend angewendet.

2.1.6 Erarbeitung der Grundlagen für die Kompatibilität des Verfahrens mit nachgeschalteten konventionellen Analysen in der Routinediagnostik

In diesem Arbeitspaket wurde die Kompatibilität des Gewebeclearingverfahrens mit der konventionellen pathologischen Schnittdiagnostik weiter vertieft. Die Aufgabe umfasste die Untersuchung, ob diagnostische Analysemethoden der Pathologie, wie die nachträgliche Paraffinaufbereitung und histologische Färbung des Gewebes sowie genetische Analysen mit unserem Clearingverfahren kompatibel sind. In Absatz 2.1.3. konnten wir bereits die Kompatibilität von paraffin-eingebettetes Gewebe mit unserem Clearingverfahren feststellen.

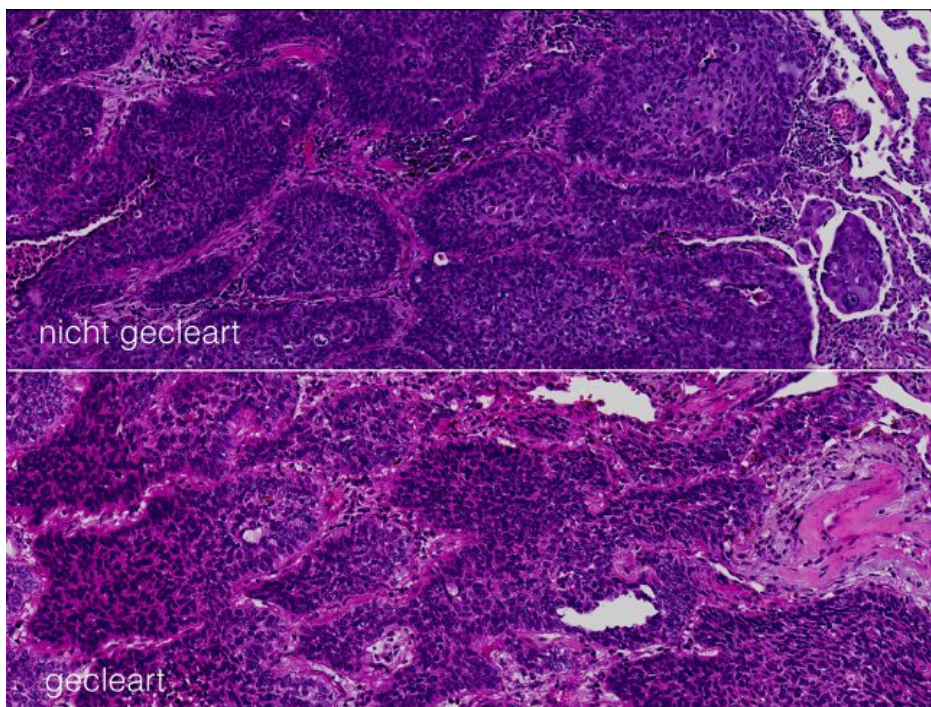


Abbildung 7: H&E-Schnittfärbung einer nicht-geclearten und einer geclearten Tonsillenprobe.

Mit den Arbeiten dieses Arbeitspaketes konnten wir auch die „Vorwärtskompatibilität“ bestätigen. Es wurde gecleartes Gewebe nach der LSFM-Aufnahme direkt in Paraffin eingebettet und 10 µm dünn geschnitten und histologisch gefärbt. Das Schneidverhalten am Mikrotom unterschied sich nicht von klassisch paraffiniertem Gewebe. In der pathologischen Praxis wurde bestätigt, dass die Schnitte sich histochemisch gut und gleichmäßig anfärben und eine gute Gewebequalität aufweisen. Im direkten Vergleich sind

lediglich leichte Farbverschiebungen wahrzunehmen, die innerhalb der Färbevariabilität im Routinelabor liegen. Die Gewebestruktur und zellulären Erkennungsmerkmale unterscheiden sich nicht (Abbildung 7). Auch immunhistochemische Färbungen konnten ohne Problemen durchgeführt werden, und es wurde bestätigt, dass die Qualität des DNAs im geclearten Gewebe nachgeschaltete molekulare Analysen mit Deep Sequencing erlaubt.

2.1.7 Erarbeitung der Grundlagen für den Einsatz immunfluoreszenz-basierter Methoden in der Pathologie

Immunhistochemische Färbungen spielen eine wichtige Rolle bei der Identifizierung und Klassifizierung von Krankheiten. Sie ermöglichen es Pathologen, spezifische Antigene und Proteine in Gewebeproben nachzuweisen, die charakteristisch für bestimmte Krankheiten sind. Dieses AP befasste sich mit der Erarbeitung der Grundlagen für Antikörper-basierte Fluoreszenz-Detektion in geclearten Gewebelöcken mittels LSM. Dazu wurden Protokolle erstellt für die immunfluoreszente *en bloc* Färbung von Geweben. Die Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten der herkömmlichen immunhistochemischen Schnittverfahren sind nicht auf größere Volumina übertragbar und mussten neu erarbeitet werden. Die längeren Diffusionsstrecken erfordern dabei sehr lange Inkubationszeiten von bis zu 2 Tagen.

Neben Inkubationsdauer, Temperatur, Pufferzusammensetzung und Antikörperkonzentrationen wurden insbesondere die Erreichbarkeit und Erkennung von Antigenen im Gewebe optimiert. Die Zugänglichkeit der spezifischen Bindestellen („Epitope“) für die Antikörper wird durch die Formaldehydfixierung und die damit einhergehende hohe Proteinvernetzung beeinträchtigt. In der Schnittdiagnostik wird dazu routinemäßig ein „Epitop-Retrieval“ durchgeführt, bei dem die vernetzenden Bindungen durch Kochen bei hoher oder niedriger pH teilweise wieder aufgebrochen werden. Da das Kochen von Gewebelöcken mit erheblichen anatomischen Veränderungen einhergeht, haben wir die Temperatur abgesenkt und die Prozedur so angepasst, dass das Epitop-Retrieval ohne Beschädigungen durchgeführt werden kann. Zudem konnten wir nachweisen, dass unser Clearingverfahren bereits die Abschirmung verringert und die Labelingprozedur mit einigen Antikörpern sogar begünstigt.

Es wurden verschiedene *en bloc* Antikörperlabelings durchgeführt, mit Schwerpunkt auf die Detektion von Tumorzellen und Immunzellen.

2.1.8 Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der LSM Methode

Am Ende des Vorhabens stand eine Gewebeaufbereitungsarbeitsablauf, der in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern Mobitec und Omicron erarbeitet wurde, und speziell auf die Anforderungen in der pathologischen Routinediagnostik zugeschnitten ist. Diese Lösung umfasste optimale Clearing-Reagenzien und ein SOP-Protokoll für das Clearen mittels des

ROCCIT-Verfahrens für eine breite Palette an Geweben mit konsistenter hoher Qualität, sowie Clearinghardware und eine Software für die Überwachung des Clearingprozesses.

Der gesamte Vorgang wurde im Haus in Zusammenarbeit mit den Pathologen an pathologischen Gewebeproben validiert. Um den Einsatz des Clearingverfahrens im betrieblichen Umfeld der Pathologie unabhängig zu überprüfen und zu demonstrieren, wurden am Pathologischen Institut des SKK, Direktor Prof. Dr. med. T. Rüdiger, verschiedenen Patientenproben mit dem Verfahren gecleart. Hierzu wurde durch unseren Partner Mobitec, ein Clearingkit mit den erforderlichen Mengen und geeigneten Behältern zusammengestellt. Dieses wurde mit der von Omicron etablierte Clearing-Hardware und Software und unserem Standard-Operationsprotokolle Pathologischen Institut des SKK übergeben. Es wurden Mammakarzinome sowie zwei Arten von Hautkrebs gecleart: das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom (Abbildung 8). Diese sind anspruchsvolle Proben aufgrund des hohen Fettgehalts und des dichten Bindegewebes.

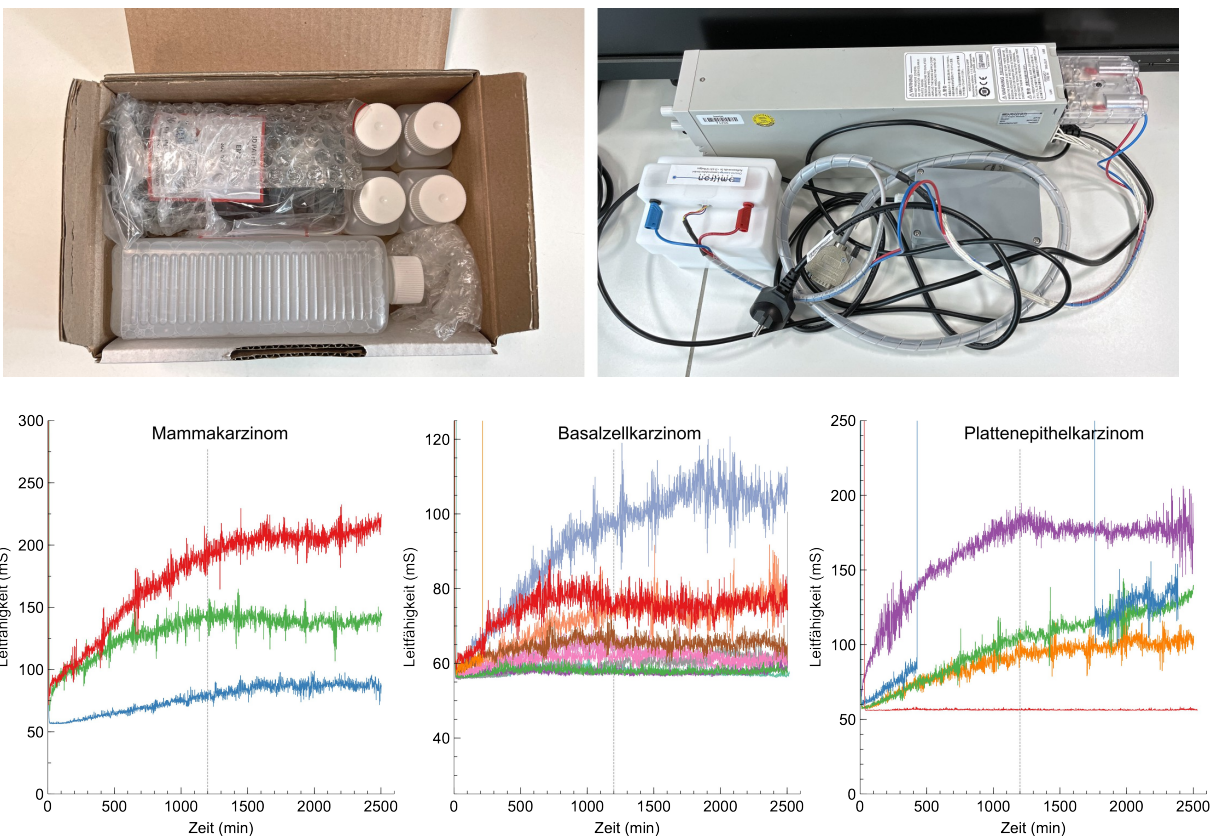


Abbildung 8: Validierung des 3Dpatho-Arbeitsablaufs am Pathologischen Institut des SKK. Oben: Clearing-Reagenzien und Clearing-Hardware, Unten: Überwachung des Clearingprozesses für die verschiedenen onkologischen Gewebeproben.

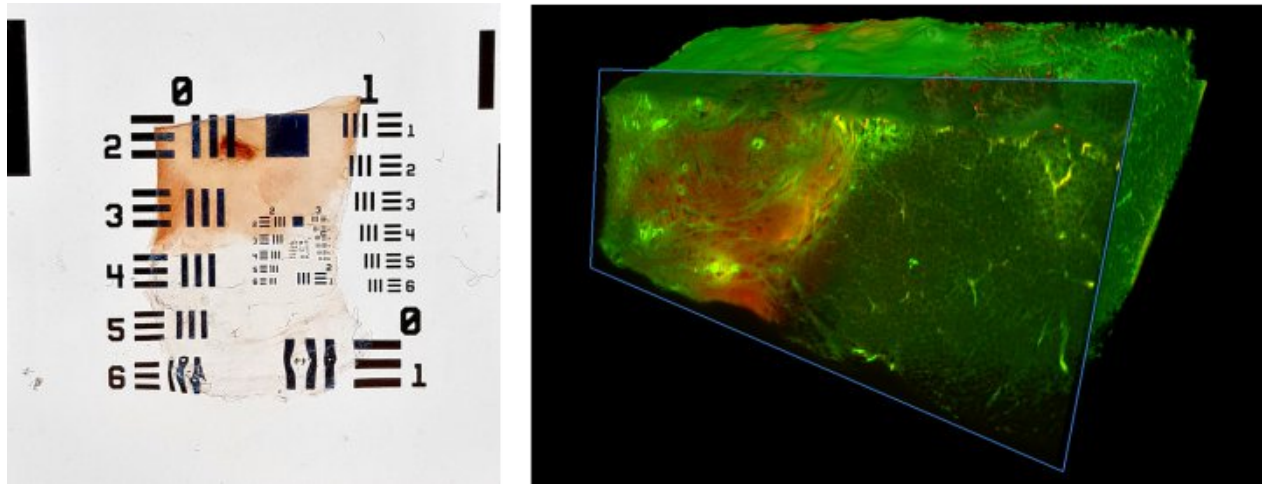


Abbildung 9: Ergebnis einer Mammatumorprobe: Links: Gewebe-Durchsichtigkeit nach dem Clearingprozess, Rechts: LSM 3D-Aufnahme in zwei spektralen Bereichen aufgenommen und in Grün und Rot dargestellt.

Die Proben wurden eigenständig im pathologischen Labor des SKK gecleart. Die Durchführung erwies sich als einfach und effektiv. Der Verlauf des Clearingprozesses wurde aufgezeichnet. Die Proben erreichten dabei eine hohe Durchsichtigkeit und konnten in ihrer Gesamtheit mittels LSM mikroskopiert werden. Die Bilder wurden in zwei spektralen Bändern bei Anregung mit 488 und 638 nm aufgenommen. Der Tumoranteil und das umliegende Gewebe konnten unterschieden werden (Abbildung 9).

2.2 Verwertung

Die Vorhabenergebnisse werden den industriellen Verbundpartnern für die wirtschaftliche Verwertung über Lizenzvergabe zur Verfügung gestellt. Dies erlaubt die Markteinführung der Technologie in der pathologischen Diagnostik. Neben der Medizin sehen wir zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten in der (bio)medizinischen und pharmakologischen Forschung, sowie in der Tierheilkunde, Tierzucht, Expositionsbiologie und Forensik. Insbesondere die Identifizierung von Gewebe- und Organveränderungen bei Krankheiten und die frühzeitige Erkennung von Umweltschäden an Geweben können zu neuen Erkenntnissen führen.

Weiter werden die Vorhabensergebnisse in Forschung und Lehre durch Publikationen verwertet. Darüber hinaus streben wir die Errichtung einer webbasierten 3D-Histoatlanten-Datenbank an, die die 3D-Visualisierung von Gewebe und Mikroanatomie ermöglicht. Diese kann für Bildungszwecke und in der Wissenschaftskommunikation eingesetzt werden.

2.3 Fortschritte und Ergebnisse Dritter

Es zeigt sich eine zunehmende Orientierung hin zur Nutzung von Lichtblattmikroskopie für die „3D- Pathologie“. So wurde menschliches Gehirngewebe mit den Verfahren CLARITY [Morawski, M. et al. Developing 3D microscopy with CLARITY on human brain tissue: Towards a tool for informing and validating MRI-based histology. Neuroimage 182, 417–428 (2018)] und OPTIClear [Lai, H. M. et al. Next generation histology methods for three-dimensional imaging of fresh and archival human brain tissues. Nat. Commun. 9, 1066 (2018)] transparent gemacht. Andere Verfahren, wie CUBIC [Nojima, S. et al. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. Sci. Rep. 7, 9269 (2017)] und SHANEL [Mai, H., et al. Scalable tissue labeling and clearing of intact human organs. Nat Protoc 17, 2188–2215 (2022)], wurden auf mehrere adulte menschliche Gewebearten angewendet. Generell bleibt jedoch die Anwendbarkeit auf eine breite Palette an Gewebearten, die Nutzung an Proben mit cm³ Volumen bzw. cm Tiefe, die Dauer der Verfahren und die Kompatibilität sowie die Einbindung in die Arbeitsabläufe des pathologischen Routinebetriebs herausfordernd, da alle diese Konditionen schwer zu erfüllen sind. Unser Verfahren bietet mit einer Verarbeitungszeit von Fixierung bis zur Mikroskopie von 15 Stunden ein extrem schnelles Clearing für cm-große menschliche Gewebeblöcke. Es ermöglicht, dass dem Pathologen die Ergebnisse innerhalb einer Diagnosezeit von 24 bis 48 Stunden nach Erhalt der Proben vorliegen.

3 Anhang

3.1 Veröffentlichungen

- Kirchhöfer DM, Holst GA, Wouters FS, Hock S, Jähne B. Extended noise equalisation for image compression in microscopical applications. (2019) tm – Technisches Messen 86(7-8): 422–432.

Geplante Veröffentlichungen:

- Rapid, real-time monitoring optical clearing of large tissue samples for clinical light sheet microscopy.
- Three-dimensional mesoscopic deconvolution in light sheet microscopy.

3.2 Schutzrechte

Es wurden folgende Schutzrechte angemeldet:

Erfinder	Thematik
	Gewebeclearing pathologischer Proben
Wouters, Bunt, Ronnenberg, Fräger, Diekmann	DE102020109087A1 Elektrophoresevorrichtung zur Verwendung bei einem Electroclearing-Verfahren
Diekmann, Wouters	EP4016045A1 Verfahren zur optischen Klärung einer Gewebeprobe mit einem Einbettungsmedium
Diekmann, Wouters	EP4016044A1 Verbessertes Verfahren zur optischen Klärung einer Gewebeprobe zur lichtmikroskopischen Untersuchung
Wouters, Bunt	EP4446723A1 Schonendes Verfahren zur Herstellung transparenter biologischer Präparate für eine lichtmikroskopische Untersuchung
	Dekonvolution mesoskopischer Lichtblattaufnahmen
Wouters, Hock	EP4045961A1 Verfahren und Vorrichtung zur Kontrasterhöhung

Kurzbericht

zum Vorhaben: Qualifizierung der Lichtblattmikroskopie sowie Konzepte für eine multimodale Korrelation

des Verbundprojekts: Einfaches und schnelles Lichtscheiben-Fluoreszenz-Mikroskopsystem zur tomographischen Erfassung von biologischen Proben für den klinischen Alltag in der Pathologie (3Dpatho)

Zuwendungsempfänger: Georg-August-Universität Göttingen - Universitätsmedizin

Förderkennzeichen: 13N14371

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2017 – 30.04.2024

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt.

1. Projektziele

Die dreidimensionale Bildgebung ist in der Radiologie mit CT- und MRT-Verfahren bereits gängige Praxis und aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Allerdings reicht die Auflösung dieser 3D-Bildgebungstechniken nicht aus, um einzelne Zellen darzustellen. Daher stützt eine abschließende Diagnose auf eine histopathologische Gewebeuntersuchung, bei der mikrometerdünne Schnitte von einer Biopsie angefertigt und lichtmikroskopisch bei tausendfach höherer Auflösung als in der Radiologie begutachtet werden. Dieser Ansatz geht jedoch mit dem Verlust wichtiger räumlicher Informationen einher, da die Schnitte zweidimensional betrachtet werden.

Mit dem Projekt 3Dpatho möchten wir der Pathologie die fehlenden 3D-Einblicke bei größeren Gewebeproben ermöglichen. Hierzu wurde im Gesamtverbundprojekt ein neuartiges „Lichtblatt“-Mikroskop konzipiert, das auf die spezifische Nutzung im pathologischen Alltag zugeschnitten ist, und zentimetergroße Gewebeblöcke mit zellulärer Auflösung in alle drei Dimensionen abbildet. Es schließt damit die Lücke zwischen den dreidimensionalen radiologischen Verfahren und den herkömmlichen zweidimensionalen histologischen Verfahren. Beteiligt waren die industriellen Partner Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH, PCO AG, Marienfeld Superior GmbH & Co. KG, MoBiTec GmbH und TILL I.D. GmbH, sowie unsere Arbeitsgruppen – Prof. Dr. Wouters und Dr. Bunt – am Institut für Neuropathologie und die klinischen Partner, das Institut für Neuropathologie und das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG).

Um die Lichtblatt-Technik direkt im Anschluss an das Projekt erfolgreich in der klinischen Praxis einführen zu können, wurde im Verbund ein Gesamtkonzept erarbeitet, das sowohl die Hardware-Seite des Mikroskops als auch die verfahrens- und anwendungstechnische Seite der Gewebepräparation und der Bilddarstellung integriert. Aufgabe dieses Teilvorhabens war es, die Voraussetzungen für die Einführung der Lichtblattmikroskopie in der klinischen Pathologie zu schaffen und die klinische Anwendung zu validieren.

2. Projektinhalte und wesentliche Ergebnisse

Bei der mikroskopischen Lichtblatt-Technik wird das Gewebe transparent gemacht, mit einer dünnen Laserlichtscheibe als Schnittbilder aufgenommen und in alle drei Dimensionen dargestellt.

In einer ersten Aufgabe wurde die Bildqualität und Bilddarstellung der Lichtblattaufnahmen verbessert, um eine genaue Analyse und damit eine genauere Diagnose zu ermöglichen. Durch einen innovativen mathematischen Analyseansatz konnte eine Verbesserung der Bildqualität, unabhängig der 3D-Position innerhalb der Probe, erreicht werden. Darüber hinaus wurden Konzepte für eine multimodale Bildgebung entwickelt, die es ermöglichen, verschiedene Gewebekomponenten im Gewebeblock besser zu identifizieren und darzustellen. Hierzu wird die Gewebe-Eigenfluoreszenz eines ungefärbten Gewebeblocks mit verschiedenen

Detektionsmethoden, wie Polarisations- und spektralen Aufnahmen, kombiniert aufgenommen. Diese Arbeiten führten zu neuen Bildanalyse- und Visualisierungsmethoden.

In einer weiteren Aufgabe haben wir untersucht, wie sich die mikroskopische Lichtblatt-Technologie in der Pathologie anwenden lässt. Dazu haben wir optimale Protokolle für das Transparentmachen von Gewebe, bzw. Clearing, sowie Protokolle für die Gewebefärbung mittels fluoreszierender Farbstoffe und Antikörper erarbeitet, um die Gewebeproben bestmöglich für die Mikroskopie vorzubereiten. Diese Protokolle wurden anhand ausgewählter pathologischer Referenzanwendungen, onkologische und neuronale Gewebeproben, etabliert. Zudem konnten wir die volle Kompatibilität der Clearingprotokolle mit dem existierenden pathologischen Arbeitsablauf, einschließlich Paraffinverarbeitung, in der Pathologie nachweisen. In Zusammenarbeit mit Pathologen an der UMG und das Städtische Krankenhaus Karlsruhe wurde der gesamte Arbeitsablauf der Lichtblatt-Technologie in der realen Einsatzumgebung der klinischen Pathologie getestet und validiert.

3. Einschätzung der Ergebnisse

Mit dem etablierten Lichtblattmikroskopische Verfahren wird eine schnellere und vollständige histologische Aufarbeitung und Gewebediagnostik möglich sein. Sie bietet dem pathologischen Arzt, erstmals Zugang zu dreidimensionaler Information in Patienten-Gewebeproben, und zu neuen diagnostischen und prognostischen 3D-morphologischen Parametern für eine genauere diagnostische Klassifizierung und personalisierte Behandlung von Patienten. Dieses eröffnet neue Einsichten in Krankheitsmechanismen und damit die Möglichkeit, die Behandlung von Patienten zu verbessern.