

ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ШКІРИ ЛЮДИНИ БЕЗ МІТОК З ПОКРАЩЕНИМ МОЛЕКУЛЯРНИМ КОНТРАСТОМ ЗАВДЯКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Манічева Наталя Віталіївна

к.т.н., доцент

Ступко Єкатеріна Ігорівна

бакалавр

Національний університет «Одеська політехніка»

Сучасна клінічна візуалізація шкіри за допомогою багатофотонної мікроскопії без міток (МФМ) стикається з труднощами через обмежену молекулярну специфічність, що перешкоджає точній характеристиці тканин шкіри через перекриття флуоресцентних сигналів від кількох молекулярних компонентів.

У цьому дослідженні представлено новий підхід до підвищення молекулярного контрасту в клінічній візуалізації шкіри за допомогою МФМ, використовуючи передові стратегії для ефективного роз'єднання різних ендогенних флуорофорів, присутніх у шкірі, з можливостями нещодавно розробленої платформи візуалізації для флуоресцентної візуалізації шкіри людини з роздільною здатністю в часі *in vivo*.

Визначаючи фазорні положення ключових ендогенних флуорофорів шкіри, таких як кератин, меланін, вільний NADH та зв'язаний з білком NADH, можливо ефективно виконувати багатокомпонентне роз'єднання в різних типах та станах шкіри, включаючи шкіру з різним рівнем пігментації та метаболічними станами.

Фазорний аналіз дозволяє картувати та кількісно визначати окремі види флуоресценції та надає всебічне розуміння динамічних змін молекулярних компонентів, пов'язаних з різними клінічними станами. Це дослідження підкреслює ефективне використання передових методів візуалізації та фазорного аналізу для покращення молекулярного контрасту без міток у клінічній візуалізації шкіри, що призводить до прогресу в майбутніх дослідженнях, зосереджених на точній та своєчасній оцінці стану шкіри та моніторингу терапевтичних ефектів.

Сучасні методи візуалізації дерматологічних клітин без використання міток, такі як відбивна конфокальна мікроскопія (RCM) та оптична когерентна томографія (ОСТ), надають структурну інформацію з високою роздільною здатністю, але їм бракує молекулярної специфічності. RCM можна поєднувати з машинним навчанням [1] для покращення діагностичної ефективності, а флуоресцентні конфокальні підходи часто вимагають екзогенних барвників [2]. Ці обмеження спонукають до розробки методів візуалізації, що поєднують

високу роздільну здатність, молекулярний контраст та детектування без використання міток, таких як багатофотонна мікроскопія (MPM).

МПМ – це широко використовуваний метод візуалізації в дослідницьких лабораторіях, який цінується за свою здатність створювати тривимірні карти біологічних тканин з високою роздільною здатністю, що робить його важливим для біологічних досліджень. Дослідження, що поєднують МПМ з моделями флуоресцентних репортерних мишей та методами мічення *in vivo*, дали критичне розуміння таких галузей досліджень, як імунологія [3], нейронаука [4] та біологія раку [5].

Однак, притаманні обмеження моделей на тваринах у вивченні тканин людини на клітинному рівні, зокрема шкіри, спонукали до зусиль щодо розробки МПМ як неінвазивного інструменту візуалізації для клінічної діагностики та моніторингу лікування, особливо в дерматології [6], [7], [8], [9]. Клінічне застосування МПМ залежить від ендогенної флуоресценції та сигналів генерації гармонік без міток, придатних для неінвазивної візуалізації *in vivo*. Незважаючи на цю перевагу, візуалізація без міток часто обмежена недостатньою молекулярною специфічністю, що створює проблеми з розрізненням різних популяцій клітин у тканинах.

Флуоресцентне детектування з роздільною здатністю в часі досліджувалося для покращення молекулярного контрасту [8], що є перспективним, зокрема, для селективного виявлення меланіну, використовуючи відносно короткий час життя флуоресценції меланіну порівняно з іншими ендогенними флуорофорами шкіри. Цей метод продемонстрував корисність для кількісного визначення меланіну *in vivo* в шкірі людини [4], [5], [8] та має потенціал для неінвазивної діагностики меланоми [2].

Незважаючи на ці досягнення, кілька обмежень раніше опублікованих досліджень перешкоджають ефективності клінічної флуоресцентної візуалізації протягом життя (FLIM) шкіри та обмежують її масштабованість для ширшої валідації та використання. Ці обмеження включають низьку швидкість сканування, необхідну для точного виявлення флуоресцентної візуалізації протягом життя, що перешкоджає швидкій візуалізації, необхідній для клінічних робочих процесів.

Обмежене поле зору сучасних клінічних систем FLIM перешкоджає можливості отримання адекватної кількості зразків зображень уражень, що є важливим для точної оцінки в дерматологічних дослідженнях. Бракує надійних методологій для розкладання та аналізу кількох молекулярних сигналів, що спостерігаються *in vivo* в контексті без міток, що ускладнює точну характеристику тканин.

У шкірі людини кілька молекулярних компонентів сприяють сигналам автофлуоресценції, що виявляються за допомогою візуалізації *in vivo* з використанням безміченої МПМ, включаючи нікотинамідаденіндинуклеотидгідрид (NADH), флавінаденіндинуклеотид (FAD), кератин та меланін в епідермісі, а також колаген та еластин у дермі. Більшість цих молекулярних компонентів мають перекриваючі спектри флуоресценції та сигнатури флуоресценції протягом життя, що робить аналіз сигналів та розуміння внеску окремих молекулярних компонентів надзвичайно складним.

У цьому дослідженні продемонстровано значне покращення молекулярного контрасту без міток для візуалізації шкіри *in vivo* MPM у клінічних умовах, застосовуючи детектування флуоресценції з роздільною здатністю в часі в поєднанні з розширеним фазорним аналізом.

Цей аналіз інтегровано в програмну платформу з відкритим кодом GSLab, нещодавно розроблену в нашій лабораторії. Цей підхід дозволяє нам аналізувати складні сигнатури автофлуоресценції шкіри та ефективно виконувати багатокомпонентне розщеплення ключових ендогенних флуорофорів шкіри, включаючи кератин, меланін, вільний та зв'язаний з білком NADH. Ці останні досягнення в багатокомпонентному розщепленні, що включають розрахунки фазорів вищих гармонік [6], [7], [8] дозволяють нам картувати окремі види флуоресценції на зображеннях. Розподіл дробової інтенсивності можна обчислити, відносячи внески фотонів від кожного виду до загальної флуоресценції на кожному пікселі [5]. Ця можливість дозволяє оцінювати зміни в певних молекулярних компонентах, пов'язаних з різними клінічними станами, надаючи цінну інформацію про здоров'я шкіри, хворобливі стани та метаболічні зміни.

FLAME дозволяє швидко отримувати зображення високої роздільної здатності та глибини на площі в кілька квадратних міліметрів, зберігаючи при цьому субклітинну роздільну здатність (0,5–1 мкм) менш ніж за хвилину. Таке поєднання ефективних можливостей візуалізації та надійного молекулярного аналізу позиціонує FLAME як потужний інструмент для клінічної візуалізації шкіри, що обіцяє значний прогрес у неінвазивній дерматологічній діагностиці та моніторингу терапевтичних ефектів.

Список використаних джерел

1. Li, J. et al. Biopsy-free *in vivo* virtual histology of skin using deep learning. *Light Sci. Appl.* 10, 233 (2021).
2. Pérez-Anker, J. et al. Basal cell carcinoma characterization using fusion *ex vivo* confocal microscopy: a promising change in conventional skin histopathology. *Br. J. Dermatol* 182, 468–476 (2020).
3. Okada, T., Takahashi, S., Ishida, A. & Ishigame, H. *In vivo* multiphoton imaging of immune cell dynamics. *Pflug. Arch.* 468, 1793–1801 (2016).
4. Xu, C., Nedergaard, M., Fowell, D. J., Friedl, P. & Ji, N. Multiphoton fluorescence microscopy for *in vivo* imaging. *Cell* 187, 4458–4487 (2024).
5. Entenberg, D., Oktay, M. H. & Condeelis, J. S. Intravital imaging to study cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 23, 25–42 (2023).
6. Konig, K. & Riemann, I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J. Biomed. Opt.* 8, 432–439 (2003).
7. Balu, M., Mikami, H., Hou, J., Potma, E. O. & Tromberg, B. J. Rapid mesoscale multiphoton microscopy of human skin. *Biomed. Opt. Express* 7, 4375–4387 (2016).
8. Fast, A. et al. Fast, large area multiphoton exoscope (FLAME) for macroscopic imaging with microscopic resolution of human skin. *Sci. Rep.* 10, 18093 (2020).