

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИМФЕДЕМЫ МЕТОДОМ МНОГОФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ**

В.В. Николаев, А.С. Курочкина, Д.А. Вражнов

Научный руководитель: д.ф.-м.н. Ю.В. Кистенев

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

Институт микрохирургии, Томск, Россия, г. Томск, ул Ивана Черных, 96, 634063

Сибирский государственный медицинский университет, Россия, г.Томск, Московский тракт, 2, 634050

E-mail: vik-nikol@bk.ru

**RESEARCH ON LYMPHEDEMA BY METHOD OF HIGH-RESOLUTION MULTIPHOTON
MICROSCOPY**

V.V. Nikolaev, A.S. Kurochkina, A.I. Knyazkova, D.A. Vrazhnov

Scientific Supervisor: Yu.V. Kistenev

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenina Str. 36, 634050

The institute of microsurgery, Russia, Tomsk, I. Chernykh st., 96, 634063

Siberian state medical university, Russia, Tomsk, Moscovsky Trakt St., 2, 634050

E-mail: vik-nikol@bk.ru

***Abstract.** In this paper results of iv-vivo measurements for healthy volunteers and people, with verified diagnosis of lymphedema, obtained with two-photon tomography with FLIM mode on MPTflex equipment (JenLab GmbH) are presented. In the study, eight healthy people and eight people with lymphedema disease participated. The papillary layer of the skin was analyzed at a depth of about 100 μm . In the course of the study, a small redistribution of autofluorescence lifetimes was observed for healthy volunteers and people with lymphedema disease. However, the main component composition in similar parts of the papillary dermis don't not change significantly. This allows to make assumption that as a result of the development of the disease, structural changes occur that do not significantly affect the component composition of the tissue.*

Введение. Заболевание лимфедема связано с нарушениями в работе лимфатической системы. Данное заболевание может быть как врожденным, так и полученным в результате хирургических вмешательств. Прогрессирование заболевания, вызванное аномальным накоплением тканевой жидкости с высоким содержанием белка, приводит к разрастанию волокнистой соединительной ткани, гипертрофии жировой ткани и воспалению [1]. На данный момент лечение данного заболевания осложнено множеством факторов, в том числе и сложностью достоверной клинической оценки заболевания [2]. С появлением современных многофотонных лазеров появилась возможность проводить измерения подкожно-жировой клетчатки in-vivo без оказания негативного воздействия на объект исследования. [3,4]. Более того, при помощи технологии определения времени жизни автофлуоресценции, появилась возможность разделять объекты по времени жизни. Так, в работе [5] показаны вещества, которые могут быть проанализированы при определенных настройках лазера, в работе [6] была показана возможность выделить капилляры в папиллярном слое кожи. Таким образом,

многофотонная микроскопия, на основе двухфотонной флуоресценции или генерации второй гармоники, обладает большим потенциалом для неинвазивной оценки и мониторинга морфологических структур и функциональных состояний живых тканей [4, 7].

Материалы и методы. В данной работе рассматривались две группы пациентов: здоровые добровольцы и пациенты с заболеванием лимфедема, проходящие лечение в АНО «НИИ Микрохирургии ТНЦ СО РАМН». Протокол исследования был одобрен институциональным комитетом НИИ Микрохирургии, а каждым участником было подписано «Информационное согласие» на участие в исследовании. В исследовании участвовала группа пациентов с II стадией лимфедемы конечностей (целевая группа) в возрасте от 23 до 68 лет ($n = 8$) и группы здоровых добровольцев в возрасте от 19 до 65 лет ($n = 8$). В первую группу вошли 2 пациента с первичной лимфедемой нижних конечностей, 2 пациента со вторичной лимфедемой верхних конечностей (после подмышечной лимфаденэктомии, вызванной раком молочной железы) и 4 пациенты со вторичной лимфедой нижних конечностей, вызванные различными причинами, а именно обширные ожоги кожи (1 случай), после травмы (1 случай) и после хирургического лечения рака шейки матки в сочетании с рентгенотерапией (2 случая).

Изображений подкожножировой клетчатки были получены на двухфотонном микроскопе MPTflex (Jenlab GmbH, Германия). Рабочая длина волны лазера накачки составляла 760 нм. Были изучены папиллярный слой кожи на глубине порядка 100 мкм. В качестве начальной глубины положения лазера был выбран роговой слой кожи. Каждое измерение проводилось с использованием FLIM режима и специального программного пакета «Becker & Hickl». Исходные данные представляли собой матрицу размером $128 \times 128 \times 256$ пикселей, размер изображения составлял 75×75 мкм с боковым разрешением около 1 мкм и с продольным разрешением ниже 2 мкм. Полученные данные анализировались при помощи приложения SPCImage (Becker & Hickl) и Python.

В данной работе были проанализировано время жизни автофлуоресценции (АФ). Сигнал АФ обычно оценивается с использованием двух экспоненциального приближения следующим образом

$$F(t) = a_1 e^{-t/t_1} + a_2 e^{-t/t_2},$$

где a_1 , a_2 , t_1 , t_2 - амплитуды и времена жизни сигнала АФ. Среднее время жизни t_m выглядит следующим образом

$$t_m = \frac{t_1 a_1 + t_2 a_2}{a_1 + a_2},$$

и данная величина часто используется для анализа данных FLIM. Пространственное распределение t_m значения для здоровой ткани и ткани лимфедемы представлено на рисунке 1.

Результаты. Всего было проанализировано более 20 изображений для каждого класса. Отмечается небольшое изменение величины t_m , но в целом распределение для здоровой ткани и ткани с диагнозом лимфедема очень близко. Таким образом, показано, что содержание флуоресцентных веществ, включая эластин, для исследуемых групп практически не изменяется, основное различие между группами связано с пространственными изменениями структуры коллагена.

Заключение. В ходе проведения исследований отмечено перераспределение времен жизни автофлуоресценции для здоровых добровольцев и людей с заболеванием лимфедема, однако основной компонентный состав в похожих участках папиллярного дермиса значительно не изменялся. Это

позволяет сделать предположение, что в результате развития заболевания происходят структурные изменения, которые значительным образом не влияют на компонентный состав ткани.

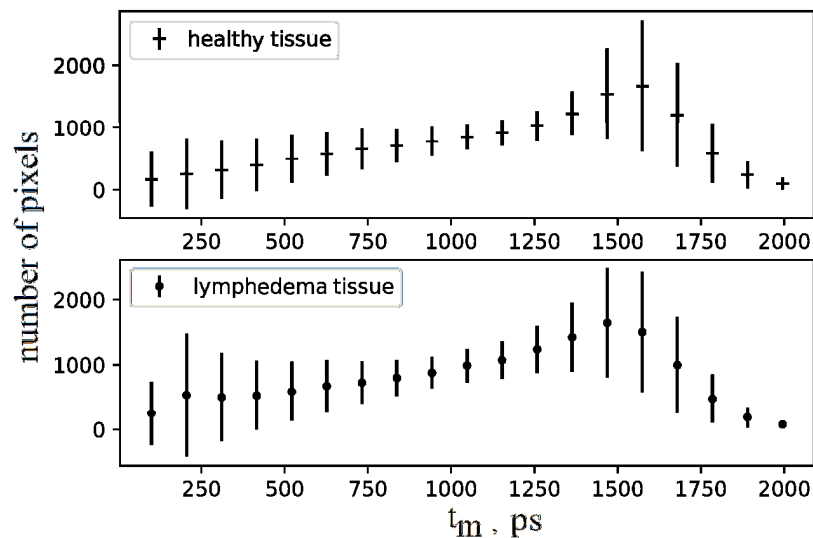


Рис. 1. Среднее значение и стандартное отклонение для среднего времени жизни автофлуоресценции t_m .

Выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-42-703012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rockson S.G. (2001). Lymphedema. Am J Med. no. 110, pp. 288–295.
2. Becker C., Assouad J., Riquet M., Hidden G. (2006). Postmastectomy lymphedema: long-term results following microsurgical lymph node transplantation. Ann Surg., no. 243, pp. 313–315.
3. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. Nat Biotechnol., no. 21, pp. 1369–1377,
4. Koehler M.J., König K., Elsner P. (2006). In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. Opt Lett., no. 19. pp. 2879–2881
5. Dancik Yu., Favre A. et al. (2013) Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation in-vivo. Journal of Biomedical Optics., no. 18(2), pp. 026022.
6. Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezzhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E. (2017). Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. Sci Rep., no. 7(1), pp. 1171.
7. Zoumi A., Yeh A., Tromberg B.J. (2002). Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. Proc Natl Acad Sci USA, no. 99. pp. 11014–11019.