Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 181–218

ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ И СОСТОЯНИЯ КОЛЛАГЕНА ПО СИГНАЛУ ГЕНЕРАЦИИ ВТОРОЙ ГАРМОНИКИ

©2019 г.
В. В. ДУДЕНКОВА[1], М. В. ШИРМАНОВА[1], М. М. ЛУКИНА[1], Ф. И. ФЕЛЬДШТЕЙН[1], А. ВИТКИН[2], Е. В. ЗАГАЙНОВА[1]

[1] НИИ БМТ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

[2] Ontario Cancer Institute, University Health Network, Торонто

I.Введение. II. Текстурный анализ. III. Фурье преобразование. IV. Сегментация. V. Комбинированный анализ коллагена и автофлуоресценции тканей. VI Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день визуализация коллагена тканей может быть выполнена при помощи целого ряда методов. Рутинные методы, такие как гистология (окраска гематоксилином и эозином), гистохимия (окраска по Ван Гизону, пикросириусом красным и др.), иммуногистохимия и электронная микроскопия, с одной стороны, наиболее доступны и могут быть реализованы практически в каждой биологической лаборатории. С другой стороны, они требуют нескольких этапов предварительной подготовки тканей и могут вызывать нежелательные морфологические изменения во внеклеточном матриксе, где коллаген часто является доминирующим компонентом. Однако самым существенным их ограничением является то, что они выполняются на образцах ткани *ex vivo*. Некоторые методы, например рассеяние на малые углы рентгеновского излучения [1, 2] и магнитно-резонансная томография (МРТ) [3, 4], позволяют визуализировать структуру коллагена в реальном времени без необходимости обра-

Принятые сокращения: ГВГ – генерации второй гармоники; FOS – First Order Statistics, статистические методы первого порядка; GLCM – Gray Level Co-Occurrence Matrix, матрица совпадения уровней серого; ROI – region of interest, область интереса; FFT – Fast Fourier Transform, быстрое Фурье преобразование.

Адрес для корреспонденции: orannge@mail.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 17-00-00193 КОМФИ.

ботки тканей и потенциально могут использоваться *in vivo*, хотя для их реализации требуется технически сложное, дорогостоящее оборудование. Еще один метод, которому сейчас уделяется большое внимание – нелинейная микроскопия на основе генерации второй гармоники (ГВГ). ГВГ микроскопия представляет собой оптический высокоспецифичный метод прямой визуализации внеклеточного фибриллярного коллагена, который реализуется на базе большинства двухфотонных флуоресцентных микроскопов [5, 6]. ГВГ микроскопия неинвазивна (т.е. не обладает фототоксическими или фотообесцвечивающими эффектами) и не требует дополнительных контрастных агентов для наблюдения коллагена, поэтому вполне может использоваться как дополнение, а в случае прижизненных исследований и как альтернатива, традиционным методам, упомянутым выше. Хотя большинство исследований коллагена с помощью ГВГ микроскопии до сих пор проводилось на образцах тканей *ex vivo*, данный метод имеет огромный потенциал для применения *in vivo,* в том числе в клинике [7–9].

Очевидно, что для объективного анализа соединительной ткани по ГВГ изображениям требуется их количественная обработка, которая позволит минимизировать ошибки интерпретации, реализует возможность объективного сравнения данных. Существующие подходы к количественному анализу ГВГ изображений коллагена можно подразделить на 3 основные группы: текстурный анализ, Фурье анализ и сегментация отдельных волокон. Аналогичные подходы к количественной оценке широко используются при обработке изображений, полученных с помощью других методов визуализации, например МРТ [10–12], рентгеновской компьютерной томографии [13, 14], УЗИ [15].

В данном обзоре обсуждаются подходы к количественному анализу изображений структуры коллагена, полученных методом ГВГ микроскопии, приводятся многочисленные примеры биомедицинских исследований, где использованы различные методы анализа ГВГ сигнала, в том числе в комбинации с анализом сигнала автофлуоресценции тканей.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЛЛАГЕНА

Коллаген – наиболее распространенный белок в организме животных, который является основой внеклеточного матрикса и соединительной ткани и обеспечивает механическую прочность тканей. Коллаген составляет около 6% от массы тела и 25–30% от всех белков в организме и в основном является компонентом костей, хрящей, костей, кожи, сухожилий, связок и базальной мембраны.

Коллаген в составе экстрацеллюлярного матрикса обеспечивает структурное и биохимическое взаимодействие клеток паренхимы [16], а его жесткость и эластичность имеют важное значение для миграции и дифференцировки клеток и экспрессии генов [17, 18]. У позвоночных существует по меньшей мере 28 типов коллагена, отдельно закодированных в геноме [19].

В зависимости от надмолекулярной структуры, выделяют несколько суперсемейств коллагена: фибриллярный, сетеобразующий, фибрилл-ассоциированный (FACIT), мембран-ассоциированный (MACITs), коллаген в виде множественных доменов и разрывов (MULTIPLEXINs) [20].

Наиболее представлен в организме фибриллярный коллаген. Коллагены I, II и III типов составляют не менее 80–90% от всего коллагена организма [21]. Фундаментальная субъединица коллагеновой фибриллы называется тропоколлаген. Это белковая молекула диаметром 1.5 нм и длиной 300 нм, состоящая из трех полипептидных α-цепей, организованных в тройную спираль [22]. Тройная спираль молекул коллагена I типа (наиболее распространенный тип) состоит из полипептидных цепочек, каждая из которых содержит повторяющуюся последовательность G-X-Y, где G – глицин, а X и Y обычно соответствуют пролину или гидроксипролину. Диаметр фибрилл коллагена колеблется от 50 до 200 нм. Расположенные вместе фибриллы образуют волокнистые пучки диаметром от 500 до 3000 нм [17, 23].

Трехмерная структура коллагеновой сети существенно различается в зависимости от ее локализации в организме и биологического назначения. Например, коллагеновые волокна в стенке артерии имеют плотное расположение и ориентированы по длине сосуда [24]. Напротив, сеть коллагеновых волокон кожи не имеет преимущественного направления [25].

Типы, состав и локализация коллагена в организме суммированы в таблице.

Принимая во внимание огромную роль коллагена в структуре и функциях тканей, исследование особенностей его организации имеет широчайшую фундаментальную и клиническую значимость.

ЭФФЕКТ ГЕНЕРАЦИИ СИГНАЛА ВТОРОЙ ГАРМОНИКИ ОТ КОЛЛАГЕНА

Генерация второй гармоники (ГВГ, s*econd harmonic generation,* SHG) представляет собой нелинейный когерентный процесс генерации вторичных электромагнитных волн удвоенной частоты (вдвое меньшей длины волны) в результате нелинейного взаимодействия электромагнитной волны с веществом (рис. 1). Необходимым условием

Таблица. **Коллагены позвоночных**.

Тип	Класс	Состав	Локализация
I	Фибриллярный	$\alpha1[I]_2\alpha2[I]$	Широко распространенный: дерма кожи, кости, сухожилия, связки
II	Фибриллярный	$\alpha1[II]_3$	Хрящ, стекловидное тело
III	Фибриллярный	$\alpha1[III]_3$	Кожа, кровеносные сосуды, тонкий кишечник
IV	Сетеобразующий	$\alpha1[IV]_2\alpha2[IV]$ $\alpha3[IV]\alpha4[IV]$ $\alpha5[IV]$ $\alpha5[IV]_2\alpha6[IV]$	Базальная мембрана
V	Фибриллярный	$\alpha1[V]_3$ $\alpha1[V]_2\alpha2[V]$ $\alpha1[V]\alpha2[V]\alpha3[V]$	Широко распространенный: кости, дерма кожи, роговица, плацента
VI	Сетеобразующий	$\alpha1[VI]\alpha2[VI]$ $\alpha3[VI]$ $\alpha1[VI]\alpha2[VI]$ $\alpha4[VI]$	Широко распространенный: кости, хрящ, роговица, дерма кожи
VII	Якорные фибриллы	$\alpha1[VII]_2\alpha2[VII]$	Дерма кожи, мочевой пузырь
VIII	Сетеобразующий	$\alpha1[VIII]_3$ $\alpha2[VIII]_3$ $\alpha1[VIII]_2\alpha2[VIII]$	Широко распространенный: дерма кожи, мозг, сердце, почки
IX	FACIT[e]	$\alpha1[26]\alpha2[26]$ $\alpha3[26]$	Хрящ, роговица, стекловидное тело
X	Сетеобразующий	$\alpha1[X]_3$	Хрящ
XI	Фибриллярный	$\alpha1[XI]\alpha2[XI]$ $\alpha3[XI]$	Хрящ, межпозвоночные диски
XII	FACIT	$\alpha1[XII]_3$	Дерма кожи, сухожилия
XIII	MACIT	–	Эндотелиальные клетки, дерма, глаза, сердце
XIV	FACIT	$\alpha1[XIV]_3$	Широко распространенный: кости, дерма, хрящ
XV	MULTIPLEXIN	–	Капилляры, семенники, почки, сердце
XVI	FACIT	–	Дерма, почки
XVII	MACIT	$\alpha1[XVII]_3$	Полудесмосомы эпителия
XVIII	MULTIPLEXIN	–	Базальная мембрана, печень
XIX	FACIT	–	Базальная мембрана
XX	FACIT	–	Cornea (chick)
XXI	FACIT	–	Желудок, почки
XXII	FACIT	–	Тканевые контакты
XXIII	MACIT	–	Сердце, сетчатка
XXIV	Фибриллярный	–	Кости, роговица
XXV	MACIT	–	Мозг, сердце, семенники
XXVI	FACIT	–	Семенники, яичники
XXVII	Фибриллярный	–	Хрящ
XXVIII	–	–	Дерма, седалищный нерв

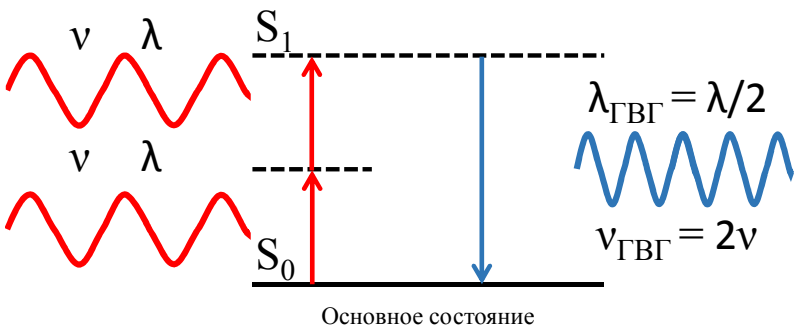

Рис. 1. Принцип генерации второй гармоники в нелинейной оптической среде.

ν – частота падающей волны, λ – длина падающей волны, $\nu_{ГВГ}$–частота сформированной волны ГВГ , $\lambda_{ГВГ}$ – длина волны ГВГ.

для возможности образования ГВГ сигнала является квадратичная нелинейная поляризуемость исследуемого вещества. Так нецентросимметричная молекула коллагена способна генерировать сильный сигнал второй гармоники [26, 27]. Среди коллагенов, коллаген I типа обладает наиболее упорядоченной структурой, а значит, дает наиболее интенсивный ГВГ сигнал [28].

Впервые биологическая визуализация ГВГ коллагена была осуществлена Фрэундом в 1986 году с использованием сухожилия крысиного хвоста; пространственное разрешение в том эксперименте составило порядка 50 мкм [29]. Через 15 лет Мохлер и Кампаньола реализовали практический подход к визуализации коллагена биоткани с помощью ГВГ с более высоким пространственным разрешением (порядка 1 мкм) и быстрым сбором данных [30].

На сегодняшний день нелинейная ГВГ микроскопия является перспективной методикой исследования состояния коллагена, не требующей никаких дополнительных окрашиваний (label-free), и рассматривается как альтернатива для стандартных диагностических методик, таких как рутинная гистология, гистохимия, иммуногистохимия. Основные технические требования для реализации ГВГ микроскопии по сути аналогичны для другого вида нелинейной микроскопии – много- или двухфотонно возбуждаемой флуоресцентной микроскопии: микроскоп высокого разрешения с оптическими элементами, подходящими для инфракрасного диапазона, оснащенный импульсным инфракрасным лазером. В качестве источника возбуждения, как правило, служат импульсные Ti : Sa или Nd : YAG лазеры с длительностью импульса от 100 до 200 фс, однако, используются и наносекундные диапазоны [31]. Реже применяют пико-

секундные лазеры с продолжительностью импульсов от 1 до 2 пс. Поскольку интенсивность сигнала ГВГ пропорциональна квадрату плотности потока возбуждающего лазера, применение более коротких импульсов приводит к существенному уменьшению требуемой средней мощности зондирующего излучения, что снижает инвазивность исследования. Сигнал ГВГ в значительной степени зависит и от длины волны, выбираемой, как правило, из инфракрасной области для увеличения эффективной глубины проникновения излучения в ткань [31, 32]. Длина волны, используемая для ГВГ микроскопии, зависит от конкретного приложения, но традиционно находится в диапазоне от 740 до 810 нм [33]. Сигнал ГВГ позволяет визуализировать коллаген с пространственным разрешением, ограниченным дифракционным пределом (менее 300 нм) [32, 34]. При этом ГВГ микроскопия обеспечивает более высокое пространственное разрешение по сравнению с конфокальной микроскопией при одинаковых диаметрах пучка.

Заметим, что ГВГ сигнал можно детектировать как в полуплоскости, находящейся по пути распространения зондирующего луча (прямой сигнал ГВГ), так и в обратном направлении (обратный сигнал ГВГ). Как правило, сигнал обратной ГВГ намного слабее, однако для исследования толстых образцов, это единственно возможный вариант детекции. В случаях, когда возможна регистрация обоих сигналов, измеряется коэффициент пропорциональности между прямой и обратной ГВГ волной, связанный с регулярностью и плотностью укладки фибрилл и волокон коллагена [35–39]. Так, например, в работе [40] данный подход позволил выявить ранние изменения в структуре коллагена при развитии остеоартрита [40].

Для получения дополнительной информации некоторые исследователи при наличии технической возможности детектируют поляризацию падающего (1f) и/или обнаруженного света (2f) и ее изменение. Например, комбинации линейных поляризаторов и/или полуволновой ($\lambda/2$) и четвертьволновой ($\lambda/4$) пластин могут управлять поляризацией света в фокальной плоскости микроскопа. Этот подход потенциально позволяет точно определить изменения структурных свойств фибрилл/волокон коллагена [29, 35, 41–47].

Важно отметить, что эффект ГВГ является частным случаем нелинейного когерентного процесса, и наряду со второй гармоникой существуют гармоники высших порядков, например, генерация третьей гармоники (ГТГ, third *harmonic generation* THG), также наблюдаемые при взаимодействии электромагнитных волн с коллагеном [48–52]. Однако по сравнению с ГВГ микроскопией, микроскопия третьей гармоники на сегодняшний день технически сложна, т.к. требует использования более специфических длинноволновых источников

(>1200 нм) и/или УФ (<300 нм) детекторов, а генерируемый сигнал значительно слабее. Поэтому для визуализации коллагена ГВГ микроскопия является наиболее популярным подходом.

Многочисленные работы указывают на важную роль сигнала ГВГ в качестве инструмента для изучения коллагена. К настоящему моменту ГВГ микроскопия используется для исследования ориентации коллагеновых волокон и их структурных изменений в различных объектах и при различных физиологических и патологических процессах. Ценность подобных исследований возрастает, если к чисто описательной характеристике коллагена добавляется количественный анализ получаемых изображений ГВГ и выявляются наиболее значимые объективные показатели, характеризующие его состояние.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГВГ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Как правило, количественный анализ ГВГ изображений оперирует небольшим числом параметров (числовыми метриками), которые способны классифицировать исходные данные и сделать их удобными для дальнейших сопоставлений и сравнений в группах.

Подходы к количественному анализу изображений ГВГ коллагена можно разделить на 3 основные группы: текстурный анализ (включая статистические методы первого и второго порядка), Фурье преобразование и сегментацию отдельных волокон (рис. 2).

Среди них текстурный анализ является наиболее универсальным и широко применяемым методом количественной оценки структуры коллагена по ГВГ сигналу. Это в первую очередь связано с тем, что данный метод подходит для анализа коллагена, не имеющего ярко выраженной укладки. Фурье анализ является более специфическим подходом и применяется для коллагена с ярко выраженной ориентацией или с ее полным отсутствием. Сегментация отдельных волокон коллагена имеет наиболее узкое приложение и применяется для случаев, когда коллаген содержит четкие тонкие отдельно расположенные волокна. Рассмотрим подробнее каждый из этих подходов и примеры их применения в анализе коллагена.

II. ТЕКСТУРНЫЙ АНАЛИЗ

При текстурном анализе на изображениях выделяют их текстуру, определяемую как характерную структуру, заданную размером области изображения, формой, расположением и пропорциями его частей. Хотя не существует общепринятого определения термина «текстура», часто внешний вид изображения описывается как тонкий или грубый, плавный или резкий, однородный или неоднородный и т.д.

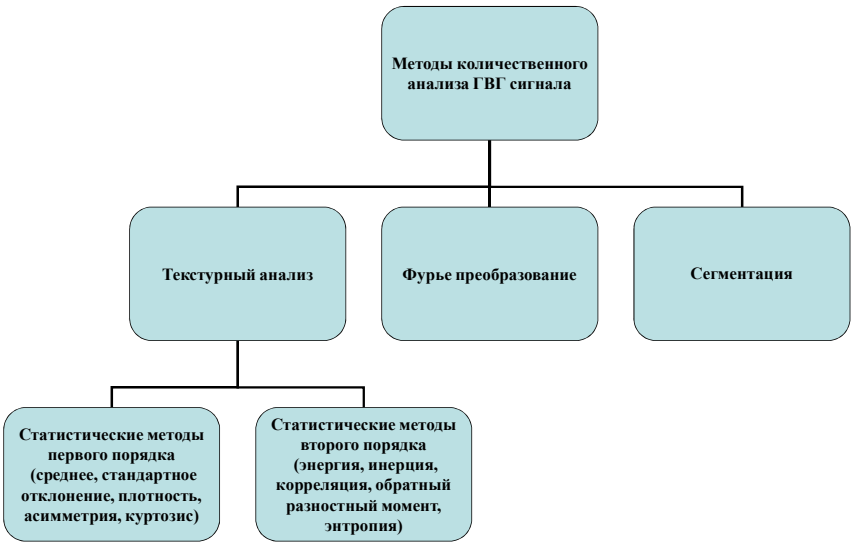

Рис. 2. Классификация методов количественной оценки ГВГ сигнала коллагена.

Текстурный анализ с помощью соответствующей обработки может различать области изображения и выявлять свойства более высокого порядка, которые нелегко обнаружить визуально. По существу, анализ текстур имеет дело с областями двухмерного изображения, обычно называемыми областями интереса (regions of interest, ROIs). Текстура может быть важным критерием в определении квази-однородных областей изображений. Первоначально, анализ текстуры эффективно использовался, например, при обработке аэрофотоснимков [53] и в дальнейшем область его применения расширилась до разнообразных биомедицинских приложений [54].

В статистическом текстурном анализе, особые характеристики текстур вычисляются на основе статистического распределения интенсивностей изображения в пределах ROI. Статистические методы подразделяются на статистические методы первого порядка (First Order Statistics, FOS), второго порядка (Second Order Statistics, SOS), или матрицы совпадения уровней серого (Gray Level Co-Occurrence Matrix, GLCM), и статистики более высокого порядка [55, 56]. Параметры на основе статистических методов первого порядка извлекаются непосредственно из статистики исходного изображения, а статистика второго порядка – из матрицы, построенной на межпиксельной корреляции исходного изображения [56].

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРВОГО ПОРЯДКА

Для обработки изображений распределения ГВГ сигнала от коллагена наиболее распространенными и простыми для вычисления подходами являются статистические методы первого порядка, связанные только с интенсивностью.

Текстуры FOS связаны со статистическим распределением интенсивности пикселей и игнорируют пространственные межпиксельные корреляции. Такое распределение показывает вероятность наблюдения определенной яркости пикселя в любом месте изображения (и/или в пределах выбранного ROI). Обычно FOS включает несколько статистических моментов, таких как среднее, стандартное отклонение, плотность, асимметрия и куртозис гистограммы распределения интенсивности.

Нормированное *среднее* арифметическое интенсивностей уровня серого исследуемого изображения вычисляется по формуле:

$$\mu_{AM} = \frac{1}{N^2}\sum_{i=0}^{N-1}\sum_{j=0}^{N-1} I(i,j), \quad (1)$$

где N – горизонтальный или вертикальный размер изображения, I – интенсивность пиксела. Применение нормированных коэффициентов применяется для анализа ROI разных размеров.

Среднее значение вероятностного распределения интенсивности уровня серого на изображении вычисляется по формуле [56]:

$$\mu = \sum_{i=0}^{N-1} i \sum_{j=0}^{N-1} P(i), \quad (2)$$

где P – вероятность (гистограммы) текущей интенсивности пикселя i.

Среднее значение является наиболее простым и информативным параметром статистики первого порядка, используемым для оценки сигнала ГВГ от коллагена, и фактически указывает на количество коллагена в поле зрения. Этот параметр часто используется для грубого дифференцирования образцов без наличия типичной четкой структуры коллагена, например, с целью выявления корреляционных связей между средним сигналом и механическими свойствами объемной ткани.

Рауб и др., используя в качестве модели коллагеновые гели, засеянные фибробластами, обнаружил корреляцию средней интенсивности ГВГ сигнала с концентрацией коллагена [57]. Этот факт позволил предположить, что значение среднего сигнала ГВГ чувствительно к изменениям объемной доли фибриллярного коллагена. Таким образом, низкие значения среднего сигнала ГВГ могут свидетельствовать о наличии тонких и редко расположенных волокон коллагена в тканях [58].

Существует множество примеров дифференциации патологических состояний тканей по среднему значению сигнала ГВГ. Например, Ванг и др. на моделях аденокарциномы молочной железы крыс показали, что метастазирующие опухоли MTln3 имеют более низкий средний сигнал ГВГ по сравнению с неметастазирующими опухолями MTC. Это согласуется с общими наблюдениями, что MTC опухоли более фиброзные и слабо некротизированые, а скопления опухолевых клеток в них разделены массивными пучками коллагена [59]. В то же время, MTln3 опухоли содержали большое количество протяженных коллагеновых волокон вблизи наружной границы, к которым были прикреплены раковые клетки.

Пирхонен и др. разработали метод количественной оценки раннего фиброза печени с использованием автоматизированного анализа средних значений сигнала ГВГ [60]. На биопсийных образцах печени авторы показали корреляцию среднего сигнала ГВГ со стадией фиброза и подтвердили расположение фибриллярных коллагенов I и III типов иммуногистохимическим исследованием.

Сан и др. использовали оценку интенсивности ГВГ сигнала по среднему значению для исследования механизмов тепловой денатурации коллагена [61]. Было выявлено уменьшение сигнала ГВГ при нагреве, что вероятно связано с изменениями в молекулярной структуре коллагена или сшивках внутри отдельных фибрилл.

Стандартное отклонение значений интенсивности уровня серого является моментом второго порядка относительно среднего и может быть вычислено с помощью формулы (3) для среднего арифметического и формулы (4) для распределения вероятностей (гистограммы):

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum_{i=0}^{N-1}\sum_{j=0}^{N-1}(I(i,j)-\mu_{AM})^2}}{N}, \tag{3}$$

$$\sigma_{\text{p}} = \sum_{i=0}^{N-1}(i-\mu)^2 P(i). \tag{4}$$

Дисперсия является квадратом стандартного отклонения.

Плотность является продуктом выбранного ROI изображения и имеет фактически тот же смысл, что и среднее значение уровня серого:

$$I = \sum_{i=0}^{N=1} n(Ni). \tag{5}$$

Плотность и среднее значение интенсивности сигнала имеют очень близкий физический смысл, и оптимальный выбор параметра часто зависит от характеристик изображения. Заметим, что адекватное

использование параметра плотности возможно только в том случае, если на изображении отсутствует фон и/или его можно легко и точно учесть при обработке. Проиллюстрировать использование этой метрики можно на примере работы Чжу и др., в которой плотность анализировалась при изучении краевой области кожного келоида и его сравнении с атрофическим рубцом [62]. Результаты этой работы показывают возможность различать типы рубцов по уровню выработки коллагена на основе вычисления плотности сигнала ГВГ.

Асимметрия гистограммы (skewness) – момент третьего порядка, определяющий, насколько симметрично (вокруг среднего) распределение гистограммы интенсивности уровня серого. Асимметрия гистограммы значений интенсивности пикселей фактически характеризует наклон гистограммы относительно центральной линии:

$$\mu_3 = \sigma^{-3} \sum_{i=0}^{N-1} (i - \mu)^3 P(i). \quad (6)$$

Асимметрия указывает на дисбаланс между областями с интенсивностями выше и ниже среднего значения, а значит, ГВГ изображения, содержащие более тонкие волокна коллагена и имеющие более асимметричный рисунок, будут иметь более высокий коэффициент асимметрии.

Куртозис – это момент четвертого порядка, определяющий разницу между наблюдаемым распределением и Гауссовым распределением:

$$\mu_4 = -3 + \sigma^{-4} \sum_{i=0}^{N-1} (i - \mu)^4 P(i). \quad (7)$$

Куртозис описывает, является ли статистическое распределение интенсивности более распределенным (плоским) или более концентрированным вокруг среднего (пиковым). Более сильные сигналы ГВГ (например, толстые коллагеновые сети, покрывающие большие области изображения) обычно приводят к более широкому распределению яркости пикселей, тем самым снижая значения куртозиса. Повышение асимметрии изображений часто сопровождается более широким распределением интенсивностей пикселей, что приводит и к более высоким значениям куртозиса.

Стоит отметить, что терминология и номенклатура, используемые в описании статистических методов первого порядка, несколько отличаются от стандартной статистической и физической терминологии, а некоторые термины могут иметь различные значения в зависимости от областей применения. Например, статистические параметры более высоких порядков, упоминаемые выше, – момент второго порядка (дисперсия), третьего порядка (асимметрия) и четвертого порядка (куртозис) – применительно к анализу изображений по-прежнему рассматриваются как «статистические методы первого порядка».

Кроме того, существуют расхождения в терминологии статистических методов второго порядка (см. ниже), в которой, например, термин «энергия» используются в несколько ином смысле, чем в других областях науки.

Для комплексного и более полного описания статистического распределения сигнала ГВГ, как правило, используются комбинации из 2–5 параметров FOS в виде независимых метрик или неких обобщающих коэффициентов. Так, например, Балу и др. предложен параметр неоднородности сигнала ГВГ коллагена S как отношение стандартного отклонения к плотности сигнала:

$$S = \sigma/\rho, \tag{8}$$

где σ – стандартное отклонение, ρ – плотность ярких пикселей [63]. Задачей их исследования была дифференциальная диагностика меланомы у пациентов на основе сигнала ГВГ. Авторы идентифицировали вариации значений параметра неоднородности по z-стеку для трех состояний – невус, диспластический невус и меланома, и ассоциировали их с изменениями в содержании коллагена в зоне дермо-эпидермального соединения. Большее значение параметра неоднородности отражало быстрое увеличение количества коллагена от верха кожных сосочков до более глубоких слоёв в папиллярной дерме. Небольшое значение параметра неоднородности отражало более медленное увеличение содержания коллагена, обусловленное наличием клеток невуса или меланомы в папиллярной дерме [63].

Применение статистических методов первого порядка с анализом пяти параметров (среднее, стандартное отклонение, плотность, асимметрия и куртозис) наглядно проиллюстрировано при исследовании организации коллагена в динамике образования атеросклеротической бляшки на артерии кролика в работе [64].

В нашем недавнем исследовании оценивалось состояние коллагена в колоректальных опухолях мышей *in vivo* при химиотерапии на основе вычисления среднего сигнала ГВГ, когерентности, куртозиса, асимметрии и неоднородности [65]. Было обнаружено увеличение содержания коллагена и степени его ориентации (когерентности сигнала) при лечении цисплатином и паклитакселом и снижение количества коллагена в случае применения иринотекана. Другие параметры также продемонстрировали изменения при терапии. Важно отметить, что индуцированные терапией нарушения в содержании и структуре коллагена проявлялись достаточно рано – до выраженных морфологических нарушений и уменьшения опухолей в размерах, что позволяет рассматривать ГВГ микроскопию как перспективный метод оценки раннего ответа на лечение.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ВТОРОГО ПОРЯДКА

В общем случае, статистические методы второго порядка (Second Order Statistics, SOS) для оценки текстуры связывают топологию одной области изображения с топологией других областей. Самая простая форма анализа текстуры – это вычисление матрицы совпадений уровней серого GLCM, впервые разработанная Хараликом и др. в 1973 году [66]. С тех пор анализ GLCM стал мощным инструментом анализа ГВГ изображений коллагена [55, 56, 64, 66, 67]. GLCM подход представляет собой вычисление вероятности появления пары пикселей с заданной разницей уровней серого, разделенных предопределенным расстоянием, определяемым в заданном направлении. Описание смысла метода можно свести к оценке совместных условных функций плотности вероятности второго порядка, а значения элементов матрицы совпадений уровней серого – это вероятность перехода от серого уровня i к серому уровню j в заданном направлении h при заданном интервале между выборками d. Соответственно, GLCM – это квадратная матрица размерности, равной количеству уровней серого в изображении. Ее вывод из исходных изображений ГВГ описан в работах [68–71].

На основе матрицы сосуществования можно рассчитать ряд текстурных признаков и описать текстуру изображения с помощью ряда математических метрик, наиболее широко используемые из которых приведены ниже.

Энергия (energy) (или второй угловой момент или *однородность*) GLCM вычисляется по формуле:

$$energy = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} P(i,j), \tag{9}$$

где P – значение элемента матрицы GLCM, N – размер данной матрицы *(N*x*N)*.

Значения параметра энергии могут лежать в диапазоне от 0 до 1. Наименьшее значение энергии достигается, когда нет доминирующих уровней серого, т.е. изображение однородно.

Параметр энергии GLCM успешно использовался, например, для исследования организации коллагена дермы. Авторы показали *ex vivo*, что в келоидном рубце энергия выше по сравнению со здоровой дермой, что подтверждает тот факт, что соединительная ткань келоида более однородна [69].

Обратный разностный момент IDM (inverse different moment), также называемый *гомогенностью*, вычисляется по формуле:

$$IDM = \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} \frac{P^2(i,j)}{1+(i-j)^2} \tag{10}$$

и является мерой количества локальной однородности, присутствующей в изображении. Т.е. IDM представляет собой взвешенную сумму значений пикселей в пределах выбранного ROI и обеспечивает метрику сходства пикселя с соседями. Этот параметр количественно определяет степень однородности ROI. Более высокое значение IDM связано с более плотной или более толстой структурой коллагеновой сетки на ГВГ изображении.

Инерция (inertia) (или второй разностный момент), фактически представляет собой меру идентичности пикселей их соседям по уровню интенсивности сигнала:

$$Interia = \sum_{i=0}^{N-1}\sum_{j=0}^{N-1}(i-j)^2 P(i,j). \quad (11)$$

Эта функция очень чувствительна к сильным различиям, возникающим внутри матрицы совпадения. Области изображения с высоким контрастом будут иметь высокую инерцию, тогда как более однородные области будут иметь низкую инерцию.

Корреляция (correlation) определяет зависимость уровней серого между двумя пикселями, разделенными заданным расстоянием d. Это линейная зависимость уровней серого от значений соседних пикселей:

$$Correlation = -\sum_{i=0}^{N-1}\sum_{j=0}^{N-1} P(i,j)\left(\frac{(i-\mu)(j-\mu)}{\sigma^2}\right). \quad (12)$$

Параметр корреляции направлен на определение структурных характеристик пучков коллагеновых волокон. Средний размер волокна, а также среднее расстояние между волокнами можно оценить, проанализировав поведение индекса корреляции GLCM. Длина корреляции является мерой среднего размера пучка коллагеновых волокон в ROI, тогда как среднее расстояние между волокнами может быть измерено с учетом периодичности корреляции. Вычисление корреляции подходит для определения закономерности конкретной структуры, например, упорядоченности расположения волокон коллагена друг относительно друга. Низкая корреляция означает, что уровни серого вообще не зависят друг от друга, т.е. в изображении нет регулярной (периодической) структуры. Если корреляция высока, существует высокая вероятность того, что один или несколько участков сетки повторяются внутри ROI.

Применение корреляции целесообразно для случаев с ярко выраженной коллагеновой структурой. Так, использование этого параметра позволило в ряде работ выявить различия в среднем размере пучка волокон в нормальных артериальных стенках и в атеросклеротических бляшках [25, 69, 72].

В ряде исследований в области онкологии было показано, что показатель корреляции GLCM отличается в нормальных и неопластических тканях, что может объясняться менее развитой коллагеновой структурой в нормальных тканях по сравнению с патологически измененными [68, 73-75]. Показано, что применение параметра корреляции GLCM способно обеспечить количественную идентификацию предрака на разных стадиях. Значение корреляции в предраковом эпителии было ниже, чем в нормальной ткани, и эта величина существенно уменьшалась по мере прогрессирования злокачественности новообразования [76]. Этот результат согласуется с качественными изменениями, описанными с помощью гистологии, в котором показано, что «диффузная» коллагеновая структура в нормальной ткани заменяется на более организованные пучки волокон в предраковых тканях и сформировавшихся опухолях.

Энтропия (entropy) описывает случайность областей относительно их соседей:

$$Entropy = -\sum_{i=0}^{N-1}\sum_{j=0}^{N-1} P(i,j)\log\big(P(i,j)\big). \quad (13)$$

Низкое значение параметра энтропии указывает на однородность изображения. В случае оценки состояния коллагена по ГВГ сигналу это может означать отсутствие четких волокон в поле зрения, вызванное, например, набуханием волокон при воспалении. Высокая энтропия свидетельствует о том, что на общем гомогенном фоне присуствуют яркие элементы, т.е. волокна коллагена или их фагменты, но не обязательно упорядоченные.

Матрицы GLCM изображений распределения ГВГ сигнала могут быть рассчитаны с использованием программного обеспечения Matlab или отлаженных программных приложений и специальных плагинов для обработки изображений, например OrientationJ [77–79] или GLCM-Texture [80] для ImageJ.

Еще один параметр *текстон* (texton), относящийся к статистическим методам второго порядка, является мощным инструментом анализа ГВГ изображений на основе их морфологии [81]. Текстоны определяются внутри изображения как повторяющиеся шаблоны с медленно меняющимися локальными статистическими свойствами. Текстон вычисляется путем нахождения свертки между группой пикселей с набором фильтров различных форм и размеров для идентификации повторяющихся признаков [82]. Вэнь и др. использовали алгоритм машинного обучения, включающий в себя нахождение текстонов, для классификации между раком яичника и нормальной тканью на основе отличий в морфологии фибриллярного коллагена и достигли точности 97% [81].

Как и в случае статистических методов первого порядка, при анализе структуры коллагена параметры статистики второго порядка часто используются комплексно, с вычислением сразу нескольких метрик. Так применение параметров энергии, инерции, энтропии, корреляции и обратного разностного момента наглядно проиллюстрировано при исследовании организации коллагена в динамике образования атеросклеротической бляшки на артерии кролика в работе [64].

Иногда применения лишь одного из подходов текстурного анализа недостаточно для выявления отличий в морфологии волокон коллагена, и целесообразно использование их комбинации.

Например, с помощью классификатора нелинейных опорных векторов (SVM) было показано, что точность дифференцирования близких патологических состояний ткани может быть улучшена с помощью комбинированных текстурных переменных FOS и GLCM по сравнению со случаем, когда используется любая из них в отдельности [83].

Комбинация статистических параметров первого порядка (среднее, стандартное отклонение, плотность, асимметрия и куртозис) и параметров текстуры GLCM (энергия, инерция, корреляция, обратный разностный момент и энтропия) была применена для оценки коллагена в условиях экспериментального инфаркта миокарда, описанных ранее [64]. При комбинировании всех вышеперечисленных параметров, авторам удалось добиться надежной классификации изображений коллагена ГВГ, полученных из атеросклеротических артерий, с точностью 90%, чувствительностью 91% и специфичностью 92%, где точность – это доля правильных результатов теста, чувствительность отражает долю положительных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые, а специфичность отражает долю отрицательных результатов, которые правильно идентифицированы как таковые.

Другое схожее исследование этих авторов было проведено на предрасположенных к инфаркту миокарда кроликах [84]. После выполнения теста для выбора признаков на основе оценки Фишера, авторы применили комбинацию из пяти признаков FOS и пяти признаков GLCM для поиска достоверного различия между состоянием сосудов молодых и старых кроликов. FOS и GLCM параметры показали различия в структуре сосуда в местах, испытывающих турбулентный кровоток (например, артериальная дуга) и ламинарный кровоток (например, внешняя подвздошная артерия) вдоль аорты. Так же было показано, что структура коллагена значительно толще в фиброзной крышке атеросклеротических бляшек у старых животных по сравнению с молодыми. В работе [56] авторы показали, что крышка атеро-

склеротической бляшки содержит коллаген, образующий хаотично расположенные более толстые пучки.

В работе [85] мы изучали состояние коллагена стенки мочевого пузыря в постоперационных образцах. Применение оценки среднего значения сигнала ГВГ, как показателя содержания коллагена, и когерентности, как показателя упорядоченности, совместно с данными оптической когерентной томографии и атомно-силовой микроскопии позволило дифференцировать воспалительные процессы в мочевом пузыре от низко- и высоко-дифференцированной карциномы.

В другом исследовании мы использовали комбинацию параметров среднего значения сигнала ГВГ, энергии и когерентности для оценки состояния коллагена при опухоль-стромальных взаимодействиях. На модели коллагеновых гелей, содержащих опухолевые клетки, фибробласты или их ко-культуры был показан многократный рост содержания коллагеновых волокон в гелях с ко-культурами и увеличение их упорядоченности [86, 87].

В работе Волш с соавт. с помощью вычисления средней плотности и интенсивности сигнала ГВГ было продемонстрировано *in vivo* повышение плотности коллагена в опухолевых ксенографтах молочной железы после лечения таргетным препаратом Трастузумаб (Герцептин) независимо от реакции опухолевых клеток на лечение. При этом наблюдалось значительное уменьшение организованности коллагена в опухолях, чувствительных к лечению [88].

III. ФУРЬЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ

Ориентацию пучков коллагеновых волокон можно оценить с помощью быстрого преобразования Фурье (Fast Fourier Transform, FFT). Изображение FFT, представляя собой карту пространственных частот исходного изображения, способно количественно охарактеризовать ориентацию пучков коллагеновых волокон. Например, FFT из случайно ориентированных волокон будет иметь круговой вид, тогда как волокна с предпочтительной ориентацией будут иметь эллиптический вид. Фурье анализ является более специфическим подходом по сравнению с текстурным анализом и применяется для коллагена с ярко выраженной ориентацией, либо с ее полным отсутствием.

Это можно наглядно проиллюстрировать на примере двух различных состояний интимы атеросклеротического сосуда человека (рис. 3). Более упорядоченная организация коллагена тонкого поперечного сечения атеросклеротической бляшки соответствует более вытянутой (эллиптической) форме распределения профиля FFT. Напротив, гомогенное распределение отдельных фрагментов коллагеновых волокон соответствует круговой форме профиля FFT.

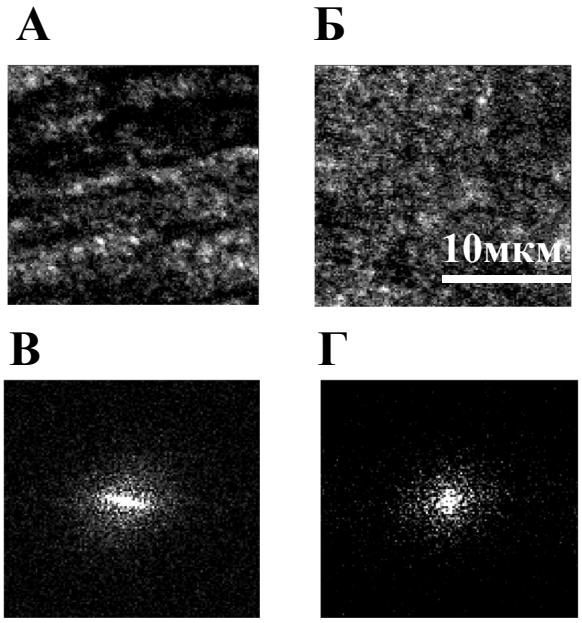

Рис. 3. Анализ организации коллагена атеросклеротической бляшки с помощью быстрого Фурье преобразования (FFT) ГВГ изображений.

А – ГВГ изображение тонкого поперечного сечения стабильной атеросклеротической бляшки человека.

Б – ГВГ изображение организации коллагена тонкого поперечного сечения нестабильной атеросклеротической бляшки.

В и Г – Соответствующие распределения быстрого Фурье преобразования ГВГ изображений.

FFT может выполняться с использованием различных программных средств, включая MatLab или ImageJ [89, 90].

Быстрое Фурье преобразование было использовано для выявления отличий в форме коллагеновых волокон между нормальной тканью, доброкачественными и злокачественными образованиями. Этот подход позволил классифицировать нормальную строму от гиперплазии, дисплазии и рака молочной железы, где последняя патология имела самую упорядоченную ориентацию коллагеновых волокон [91]. FFT помог выявить отличия между нормальной стромой и стромой в раке яичников. Однако попытки дифференцировать типы рака яичников между собой с помощью данного анализа оказались неудачными [68, 73, 74]. Работа [67] на примере раков молочной железы и яичников также демонстрирует, что FFT позволяет различить норму и

патологию, где коллаген имеет более организованную фибриллярную структуру, но не способен обнаружить отличия между различными типами рака [67].

Сивагуру с соавт. применяли FFT для количественной оценки организации коллагеновых волокон в сухожилиях при воспалении. Результаты анализа FFT показали, что в поврежденных сухожилиях коллагеновые волокна организованы случайным образом в отличие от нормальных сухожилий, где наблюдается их правильная ориентация, что является следствием потери третичной структуры и латерального сжатия [92].

Для выявления тонких отличий в степени организованности укладки коллагеновых волокон необходимо использовать более сложный количественный анализ результатов быстрого Фурье преобразования. Одним из эффективных коэффициентов является *соотношение сторон* профиля FFT, рассчитываемое с учетом соотношения двух собственных значений ковариационной матрицы [69]. Ковариационная матрица между строками и столбцами изображения FFT вычисляется для оценки длины двух осей распределения интенсивности получаемого эллипса, даже если они не выровнены по координатам x, y. Тогда собственные векторы ковариационной матрицы, вычисляемые как мера соотношения сторон, определяются отношением квадратных корней из этих двух собственных значений. Таким образом, два собственных значения ковариационной матрицы представляют собой дисперсию распределения интенсивности FFT вдоль двух главных осей эллипса.

Данный подход применялся к описанию содержания и состояния коллагена в нормальной стенке артерии и в атеросклеротических бляшках [24, 72]. Показано, что, в отличие от атеросклеротической бляшки, коллагеновые волокна нормальной стенки имеют регулярную организацию, пучки равноотстоят друг от друга и ориентированы перпендикулярно кровотоку.

С помощью вычисления соотношение сторон профиля FFT были найдены достоверные различия в состоянии коллагена, расположенном на разных глубинах роговицы глаза [93]. В клиническом исследовании Воленсак и др. показали, что в результате образования сшивок после лечения кератоконуса рибофлавином/ультрафиолетом А, значительно увеличивается соотношение сторон профиля FFT, что коррелировало с увеличением жесткости коллагена.

С помощью вычисления соотношения сторон профиля FFT можно оценить степень изотропии или анизотропии выбранного участка коллагеновой структуры [24, 72, 94]. Для это изображения FFT предварительно бинаризуются, проводится аппроксимация эллипсом

распределения FFT и рассчитывается отношение меньшей к большей полуосей/осей эллипса. Это отношение называется *средним индексом изотропии* и характеризует степень взаимной ориентированности волокон. Меньший индекс изотропии, приближающийся к «0», указывает на наличие ярко выраженного выделенного направления волокон коллагена. Более высокое значение, приближающееся к «1», показывает изотропное распределения волокон.

Мы использовали данный параметр для классификации стадий атеросклеротических бляшек у человека [94]. Было обнаружено, что стабильные стадии атеросклеротических бляшек (I, II/III, IV и Vб) характеризуются более низким значением индекса изотропии по сравнению с нестабильными бляшками (Va), что соответствует увеличению степени организации коллагена в крышке бляшки по мере увеличения ее размера.

Некоторые группы авторов использует другой вариант этого параметра, который называется *индексом ориентации* коллагена (OI) [95, 96]:

$$OI = [1 - (\text{short}/\text{long_ratio})]. \quad (14)$$

Значение OI ткани равно 0 в случае абсолютно изотропной структуры коллагена, когда изображение FFT имеет форму круга.

Этот параметр использовался, например, для количественного анализа морфологии коллагена кожи при естественном и фотоиндуцированном старении [96]. На мышах было показано, что индекс ориентации увеличился с возрастом более, чем в два раза, что свидетельствует о росте взаимной ориентированности пучков коллагена.

Количественный анализ изображений FFT с фильтром Габора также способен получить индекс ориентации коллагена OI [97]. Осман и др. выявили тонкие изменения ориентации коллагеновых волокон с прогрессирующей потерей структуры коллагенового матрикса кожи в мышиных моделях старения и сахарного диабета 2-го типа.

Еще один коэффициент для анализа FFT распределения – *коэффициент упаковки пучков* характеризует степень плотности упаковки волокон коллагена в пучки. Это параметр вычисляется как:

$$BP = 512 \times (1/h), \quad (15)$$

где h –среднее расстояние в пикселях между центрами масс двух максимумов первого порядка в изображениях FFT [95, 96]. Некоторые научные группы для лучшей визуализации положения максимумов используют псевдо-трехмерное построение FFT [96].

Данный подход был применен для оценки изменения коллагена в выбухающей дерматофибросаркоме [95]. Значение коэффициента

плотности упаковки пучков ВР в патологически измененной коже было на 30% выше, чем в норме. При этом авторы отмечают, что значение индекса ориентации OI существенно не отличалось. [95].

Т.к. статистические методы второго порядка GLCM и FFT наиболее чувствительны именно к повторяющимся комбинациям пикселей на изображении, их комбинированное использование способно увеличить чувствительность и специфичность анализа ГВГ сигнала коллагена, имеющего четкую укладку.

Успешная комбинация GLCM и FFT для описания ремоделирования тканей в модели рака яичников мыши, показала чувствительность и специфичность порядка 80% [98, 99].

Комбинация GLCM и FFT применялась для *ex vivo* исследования тонких поперечных и продольных участков нормальной артериальной стенки и бляшки на модели кролика [72]. Применение FFT анализа с оценкой отношения полуосей аппроксимирующего эллипса показало, что в нормальной ткани отношение имеет меньшее значение по сравнению с результатом для бляшки, и это означает большую степень организованности коллагена. Вычисление параметра корреляции GLCM матрицы показало, что в нормальной артериальной стенке среднее значение было равно 2.1 мкм, а в бляшке обнаружено два различных максимума на 1.7 мкм и 3.1 мкм.

IV. СЕГМЕНТАЦИЯ

Сегментация волокон подразумевает оценку геометрических параметров волокна, таких как длина, ширина, наклон, степень извитости и некоторых других. Сегментация отдельных волокон коллагена является наиболее специфическим подходом и применяется для случаев, когда коллаген имеет четкие, тонкие, отдельно расположенные волокна. Другое ограничение применимости сегментирования состоит в том, что параметры волокон оцениваются для некоторого тонкого оптического слоя, в который попадает лишь часть волокна, тогда как волокна коллагена в большинстве тканей обычно имеют сложную трехмерную структуру.

В работе [100] оценивали структурные свойства коллагеновых пластин в нормальной строме роговицы глаза и при кератоконусе путем измерения их ширины и угла относительно выбранного направления – слоя Боумена. Угол ламелей коллагена по отношению к слою Боумена вычисляли по формуле:

$$\theta = \frac{1}{\sin(a/b)}, \tag{16}$$

где a – расстояние по оси z между двумя соседними плоскостями, b – расстояние между двумя представляющими интерес точками, θ – угол коллагеновых пластин относительно слоя Боумена.

Было обнаружено, что в кератоконической роговице ширина коллагеновых пластин значительно больше, а угол меньше, чем в нормальной роговице.

Для извлечения параметров коллагенового волокна в работе [101] был предложен автоматизированный алгоритм отслеживания FIRE (fiber extraction) на основе курвлет преобразования [101]. Курвлет преобразование анализирует частотные составляющие в изображении по локальной корреляции с предопределенным фильтром, описанным Кандес и др. [102]. Курвлет преобразование похоже на более распространенное вейвлет-преобразование, но по сути содержит информацию об ориентации, которая не включена в вейвлет.

Бредфелд и др. показали эффективность алгоритма FIRE для оценки длины, кривизны, угла и положения волокон по сравнению с данными, полученными при ручной аппроксимации ГВГ изображений рака молочной железы [103, 104]. Авторы также оценили эффективность применения различных фильтров, предшествующих работе алгоритма FIRE. Использовались фильтр Гаусса (Gaussian filter, GF), SPIRAL-TV [105], tubeness [106], CT (curvelet-denoising) [107, 108]. Алгоритм с предшествующим обработке фильтром CT от шумов, называемый CT-FIRE, смог обнаружить изменения в кривизне волокон коллагена в модели рака молочной железы на мышах *in vivo*.

Важно, что автоматизированный курвлет анализ, реализованный в подходе CT-FIRE, обеспечивает уровень анализа ГВГ изображений, подходящий для клинической среды. Для расширения диагностических возможностей, этот алгоритм был применен к образцам молочной железы и яичников человека [103]. Было показано, что нормальные ткани яичников имеют более длинные, прямые и параллельные между собой волокна, в сравнении со злокачественными новообразованиями [74].

V. КОМБИНИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ КОЛЛАГЕНА И АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ

Поскольку ГВГ микроскопия реализуется на базе многофотонных флуоресцентных микроскопов, очень часто ГВГ сигнал коллагена регистрируют одновременно с сигналом собственной (авто-) флуоресценции компонентов ткани при условии, что на микроскопе реализованы два спектрально различных канала детектирования. Основными источниками автофлуоресценции тканей животных,

помимо коллагена, являются восстановленный никотинамиддинуклеотид НАДН и его фосфорилированная форма НАДФН, флавины, липопигменты, порфирины эластин, кератин. Изменения, которые происходят в тканях при физиологических и патологических процессах, неизбежно приводят к изменениям пространственного распределения или содержания тех или иных эндогенных флуорофоров или физико-химических свойств их микроокружения. Поэтому анализ автофлуоресценции наряду с ГВГ коллагена может обеспечить более полную информацию о структурно-функциональном состоянии тканей.

Стоит заметить, что комбинированная микроскопическая визуализация ГВГ и автофлуоресценции довольно часто используется в современных биомедицинских исследованиях исключительно для идентификации тканевой структуры, без какой-либо численной обработки изображений [109–111], либо без количественного анализа ГВГ сигнала [112]. В данном разделе рассматриваются некоторые примеры сочетания микроскопии ГВГ и автофлуоресценции, где проводилась численная обработка изображений.

ОТНОШЕНИЕ СИГНАЛОВ ГВГ И АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Отношение сигналов ГВГ и автофлуоресценции рассчитывается либо путем простого деления одного на другое, либо с использованием более сложного коэффициента, например, SAAID (Second Harmonic to Autofluorescence Aging Index of Dermis).

В работе Ву с соавт. отношение сигнала ГВГ к сигналу двухфотонно-возбуждаемой автофлуоресценции (АФ) клеток отражало изменения в содержании коллагена и эндогенных флуорофоров (преимущественно НАДН и ФАД) и использовалось в качестве «маркера» опухолевой прогрессии и ответа опухоли на терапию. В результате увеличения вклада клеточной и снижения вклада стромальной компоненты ткани, было выявлено снижение отношения ГВГ/АФ в образцах карциномы молочной железы пациентов по сравнению с нормальной стромой и рост показателя после химиотерапии [113].

Некоторые научные группы используют обратный коэффициент, т.е. вычисляют отношение автофлуоресцентного сигнала к сигналу ГВГ. Это может быть удобно в том случае, если такой вид представления данных лучше укладывается в динамический диапазон. Зенг с соавт. рассчитывали отношение автофлуоресценции коллагена к сигналу ГВГ для in vivo мониторинга предраковых состояний в модели канцерогенеза слизистой защечного мешка хомяка. Авторы предположили, что поскольку механизмы генерации флуоресценции и ГВГ различны, ремоделирование стромы в процессе развития рака может иметь

разные эффекты на эти сигналы. Было показано увеличение АФ/ГВГ отношения с увеличением степени злокачественности, что авторы связывают с деградацией коллагеновых волокон до фибрилл под действием металлопротеиназ, повышенная активация которых имеет место в предраковой строме. Было продемонстрировано, что высокая точность обнаружения ранних злокачественных изменений в эпителии может быть достигнута с помощью комбинации трех характеристик: вычисления отношения *АФ/ГВГ*, корреляции и вычисления пространственного распределения частот GLCM [76].

Во многих работах используется более сложный коэффициент, связывающий между собой уровни ГВГ и автофлуоресцентного сигнала – SAAID, который вычисляется по формуле:

$$SAAID = \frac{ГВГ - АФ}{ГВГ + АФ}. \quad (17)$$

Главное отличие данного коэффициента в том, что он имеет свою внутреннюю нормировку и за счет изменения динамического диапазона представления данных является более чувствительным к небольшим изменениям перераспределения ГВГ и автофлуоресцентного сигналов.

Индекс SAAID впервые был предложен в 2005 г. Лин и соавт. для оценки степени фотоповреждения кожи с возрастом [114]. При проведении измерений в дерме кожи в канале автофлуоресценции регистрируется, в основном, эмиссия от эластина, хотя вклад кератина не исключается. Преобладание коллагена в исследуемой области дает положительные значения SAAID, преобладание эластина – отрицательные. За счет снижения сигнала ГВГ коллагена и повышения сигнала автофлуоресценции эластина, наблюдалось уменьшение SAAID у пожилых людей, что согласуется с гистологическими данными о замещении коллагена эластическими волокнами [114]. В дальнейших дерматологических исследованиях показана высокая корреляция индекса SAAID с возрастом добровольцев и более выраженные изменения SAAID с возрастом у женщин по сравнению с мужчинами [115].

Типичные профили изменения сигналов автофлуоресценции и ГВГ с глубиной в коже уха крысы и соответствующие профиль индекса SAAID представлены на рис. 4. Кривые ГВГ и автофлуоресценции, приведенные на графиках, отражают известные гистологические и биохимические особенности кожи. Характерно, что сигнал в канале приема ГВГ в глубоких слоях эпидермиса может быть также результатом ГВГ мочевины (мочевой кислоты) [116], тогда как пик ГВГ в верхней части дермы связан исключительно с высоким содержанием фибриллярного коллагена, главным образом, I и III типов.

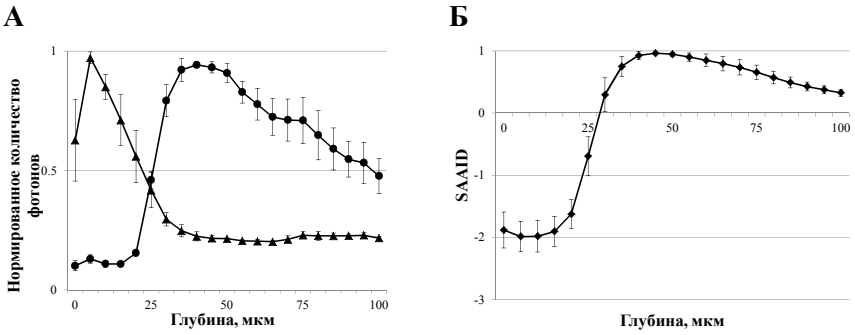

Рис. 4 Оценка состояния кожи уха крысы с помощью распределения среднего сигнала автофлуоресценции, ГВГ и SAAID.

А – Профили распределения средних сигналов автофлуоресценции (▲) и ГВГ (●) с глубиной в коже.

Б – Профиль распределения индекса SAAID.

Среднее ± стандартная ошибка среднего.

Релевантность SAAID в качестве объективного количественного показателя состава дермального матрикса для оценки возрастных изменений кожи демонстрируется, например в работе Сугата и соавт. [117].

Также SAAID применялся для мониторинга ремоделирования коллагена после абляционной лазерной шлифовки кожи. Сравнение индекса до и после воздействия в трех возрастных группах показало наибольшее увеличение SAAID в группе пожилых (>60 лет) пациентов, что отражало наибольшую эффективность проведенной процедуры [25].

В работе Спрингер с соавт. SAAID был апробирован при наблюдении заживления ран у пациентов [118]. Выявленные различия в профилях SAAID в динамике позволяют рассматривать этот показатель как эффективный неинвазивный инструмент для оценки течения раневого процесса *in vivo*.

Чиччи и др. продемонстрировали применение SAAID для дифференцирования нормальных и келоидных рубцов от здоровой дермы [69]. За счет высокого содержания эластина нормальный рубец характеризовался отрицательными значениями SAAID, типичная кожа имела низкие положительные значения за счет некоего соотношения коллагена и эластина, а келоид – высокие положительные значения индекса в результате повышенного содержания коллагена и низкой концентрации эластина.

Оценка индекса SAAID представляет интерес не только при анализе *соотношения эластина* и *коллагена* в соединительнотканных структурах, но и для охарактеризования морфологических особенностей ткани по соотношению стромы и паренхимы. В этом случае для визуализации клеточной компоненты ткани используется автофлуоресценция флавинадениндинуклеотида (ФАД), как например в [119], или НАДН, как например в [120]. Так, с помощью SAAID были обнаружены различия между здоровой слизистой оболочкой мочевого пузыря и карциномой *in situ* в свежих биопсийных образцах пациентов [114]. В результате высокой клеточной пролиферации и пониженного вклада сигнала ГВГ коллагена в тканях карциномы отмечалось снижение индекса SAAID.

В нашей недавней работе SAAID был использован для *in vivo* выявления раннего ответа колоректальных опухолей мышей на химиотерапию. В опухолях, леченых препаратами цисплатин и паклитаксел, мы обнаружили повышение индекса SAAID по сравнению с нелеченым контролем на ранних этапах лечения, что вероятно было обусловлено замещением клеточной компоненты стромой (рис. 5А.) [65].

КОМБИНАЦИЯ ГВГ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА

Известно, что стромальное микроокружение – один из важнейших регуляторов функциональной активности тканей. Многофотонная флуоресцентная микроскопия с регистрацией ГВГ дает возможность параллельного исследования состояния коллагена и метаболического статуса клеток, входящих в состав ткани. Кофакторы НАД/НАДН и ФАД/ФАДН2 вовлечены в энергетический метаболизм клетки в качестве переносчиков электронов. НАД восстанавливается до НАДН при гликолизе, а ФАДН2 окисляется до ФАД при митохондриальном окислительном фосфорилировании. Восстановленный НАДН и окисленный ФАД обладают флуоресценцией, интенсивность которой зависит, в первую очередь, от концентрации флуорофора. Поэтому соотношение интенсивностей флуоресценции НАДН и ФАД служит мерой редокс-статуса и, соответственно, метаболической активности. Данный подход был предложен Б. Чансом и соавт. в 1970-х гг. [121] и с тех пор широко применяется в различных вариациях, касательно формулы расчета. В общем случае, высокое редокс-отношение НАДН/ФАД указывает на высокую метаболическую (гликолитическую) активность, что характерно для клеток с интенсивной пролиферацией, например, опухолевых или эпителиальных [122].

Измерение редокс-отношения НАДН/ФАД, наряду с количественным анализом коллагена и отношения ГВГ/АФ в биопсийных образцах, было реализовано в работе Ву с соавт. при химиотерапии

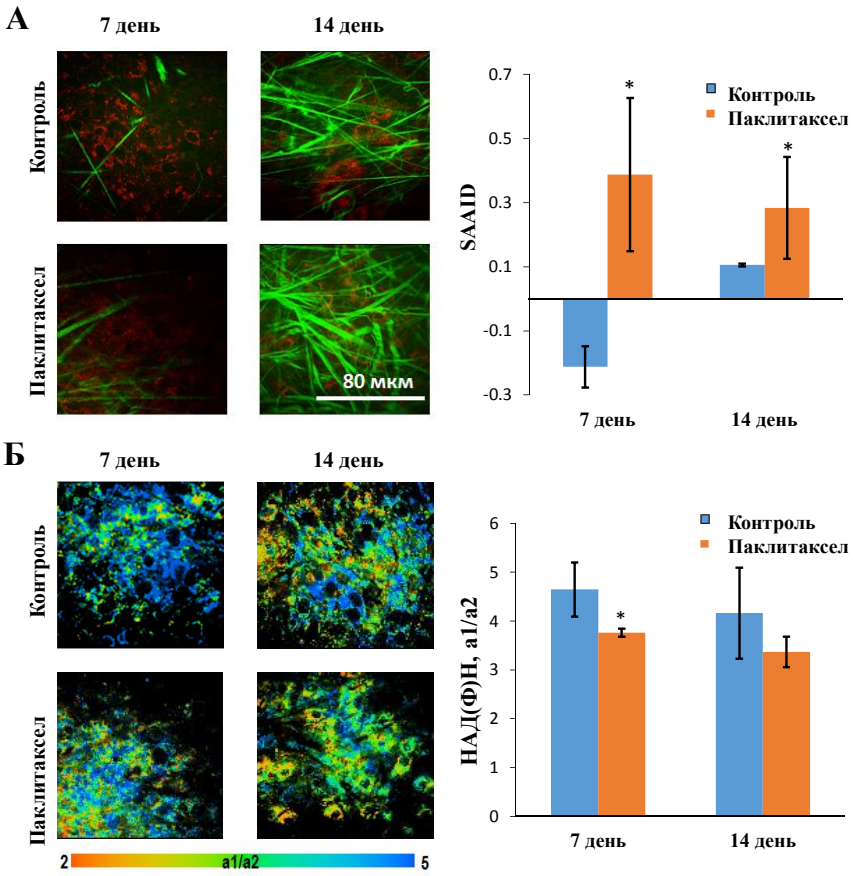

Рис. 5. *In vivo* визуализация ГВГ коллагена и клеточной автофлуоресценции в мышиных опухолях CT26.

А – Репрезентативные изображения структуры опухоли. Красный цвет – флуоресценция НАДН в клетках, зеленый цвет – ГВГ коллагена. Количественная оценка SAAID.

Б – Двухфотонная FLIM микроскопия. Псевдоцветовая шкала отношения свободной к связанной форме НАДН (a1/a2).

Масштаб 80 мкм применим ко всем изображениям. Среднее ± стандартная ошибка среднего. * – статистически значимая разница между контрольными и леченными опухолями, $p \leq 0.05$.

рака молочной железы [113]. Авторы наблюдали увеличение редокс-отношения в опухолевой ткани по сравнению с нормой и его снижение в результате лечения.

Комбинирование оценки ГВГ сигнала с нахождением редокс-отношения НАДН/ФАД в работе было использовано для оценки функционального состояния тканеинженерных конструкций, предназначенных для восстановления скелетных мышц. Было констатировано увеличение метаболической активности клеток и упорядоченности коллагена в образцах, стимулированных стероидами [123].

Анализ метаболического статуса по времени жизни флуоресценции кофакторов основан на том, что время жизни флуоресценции восстановленного НАДН и окисленного ФАД существенно зависит от их взаимодействия с белками. Свободная форма НАДН имеет характерное время жизни флуоресценции порядка 0.3 нс, ассоциирована с гликолизом и локализована в основном в цитоплазме, тогда как связанная с белками форма имеет время жизни около 2 нс и ассоциирована с митохондриальной электрон-транспортной цепью [124]. В отличие от НАДН, ФАД связан с белком постоянно, а время жизни его флуоресценции определяется его конформацией и составляет 0.3 и 2.7 нс для «закрытой» и «открытой» конформации, соответственно[125]. Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением (FLIM, fluorescence lifetime imaging) дает возможность исследовать состояние кофакторов путем измерения среднего времени нахождения молекулы в возбужденном состоянии [126].

В работе, посвященной разработке подходов к оценке структуры и качества дермальных эквивалентов на основе коллагена и клеточных компонентов (фибробластов или клеток дермальной папиллы), метаболизм клеток анализировался по времени жизни флуоресценции НАДН параллельно со структурными показателями коллагена – плотностью, когерентностью, энергией, в процессе культивирования. Мы наблюдали сдвиг на более окислительный метаболизм в клетках эквивалента, что коррелировало с их способностью контрагировать коллаген. Ремоделирование структуры коллагена подтверждалось количественными показателями ГВГ сигнала [127].

С помощью FLIM нами были зарегистрированы *in vivo* ранние метаболические изменения в опухолях мышей в процессе химиотерапии (рис. 5Б). Независимо от механизма действия химиопрепарата, отмечалось снижение вклада свободной формы НАДН в опухолях, подверженных лечению, что вероятно связано со сдвигом энергетического метаболизма с гликолитического на окислительный в связи с ингибированием клеточной пролиферации. При этом, как отмечалось выше, разные препараты оказывали разное влияние на содержание и структуру коллагена [65].

Таким образом, комбинированная оценка сигналов ГВГ коллагена и эндогенной флуоресценции от соединительнотканных компонентов или клеток может служить эффективным показателем морфологического и функционального состояния изучаемой ткани.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Характеристика содержания фибриллярного коллагена, структуры волокон и их организации представляет важность для описания морфологических особенностей тканей при самых различных физиологических состояниях и патологиях.

Очевидно, что объективный анализ коллагена требует использования методов количественной обработки ГВГ-изображений. В представленном обзоре мы систематизировали имеющиеся подходы к количественной оценке коллагена, привели примеры применения различных методов и алгоритмов. Каждый из методов представляет собой перспективный инструмент анализа состояния соединительной ткани, однако выбор метода и параметра для анализа во многом определяется спецификой исследуемой ткани и зависит от конкретной задачи. Так, GLCM анализ будет эффективным при исследовании организации волокон коллагена в пучке, FFT анализ дает более объективную информацию о взаимной организации пучков коллагеновых волокон на большем пространственном масштабе, метод сегментации подходит только для коллагена с разреженными, хорошо идентифицируемыми волокнами. Во многих случаях, анализ состояния коллагена будет наиболее полным при комбинировании нескольких подходов к количественной оценке, т.к. это дает информацию на разных пространственных уровнях.

Тем не менее, как показал анализ литературы, универсального метода оценки ГВГ сигнала или комбинации методов, подходящих для любой структуры коллагена, не существует. С учетом того, что коллаген имеет сложную комплексную структуру, а варианты его пространственной организации в ткани разнообразны, некий универсальный метод вряд ли вообще может быть найден. Именно поэтому во многих работах, наряду с результативными методиками, приведены результаты количественного анализа, которые не показали статистически значимых различий.

Для получения более полной информации о структурно-функциональном состоянии ткани целесообразно анализировать коллаген вместе с другими компонентами соединительной ткани или клеток. Чувствительность современных двухфотонных микроскопов позволяет эффективно детектировать некоторые из них по эндогенной

флуоресценции. Одновременная визуализация наряду с коллагеном, например, эластина, флавинов, НАД(Ф)Н дополняет сведения о структуре и составе тканей, а использование временного разрешения расширяет спектр данных до регистрации более тонких биохимических изменений.

В целом, нелинейная оптическая ГВГ-микроскопия имеет большие перспективы в биологии и медицине, поскольку обеспечивает неинвазивную визуализацию неокрашенных волокон коллагена с более высоким пространственным разрешением и информативностью, чем стандартные гистопатологические подходы. Важно, что анализ состояния коллагена по сигналу ГВГ можно проводить независимо от того, получены ли данные от объекта *in vivo* или *ex vivo*, от фиксированных или свежих образцов ткани. Этот метод находит применение в самых разных областях – дерматологии, онкологии, кардиологии, регенеративной медицине и др. Особый интерес представляет использование ГВГ-микроскопии в сочетании с представленными в обзоре методами количественного анализа изображений для диагностических целей в клинике. Недавние технологические достижения уже подтолкнули разработчиков к реализации ГВГ-микроскопии в клинически-адаптированных приборах (например, многофотонные томографы компании JenLab, Германия) и созданию экспериментальных систем для эндоскопической визуализации сигнала ГВГ [9, 128].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ooi, G.J., Fox, J., Siu, K., Lewis, R., Bambery, K.R., McNaughton, D.,Wood, B.R. (2008) Fourier transform infrared imaging and small angle x-ray scattering as a combined biomolecular approach to diagnosis of breast cancer, *Medical Physics*, **35**, 2151–2161.
2. Heikki, S., Manuel, F., Ritva, S.,Pekka, S. (2005) Simulation of small-angle x-ray scattering from collagen fibrils and comparison with experimental patterns, *Physics in Medicine and Biology*, **50**, 5401.
3. Nissi, M.J., Töyräs, J., Laasanen, M.S., Rieppo, J., Saarakkala, S., Lappalainen, R., Jurvelin, J.S., Nieminen, M.T. (2004) Proteoglycan and collagen sensitive MRI evaluation of normal and degenerated articular cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, **22**, 557–564.
4. Chen, J., Song, S.-K., Liu, W., McLean, M., Allen, J.S., Tan, J., Wickline, S.A., Yu, X. (2003) Remodeling of cardiac fiber structure after infarction in rats quantified with diffusion tensor MRI, *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, **285**, H946–H954.
5. Gailhouste, L., Grand, Y.L., Odin, C., Guyader, D., Turlin, B., Ezan, F., Désille, Y., Guilbert, T., Bessard, A., Frémin, C., Theret, N., Baffet, G. (2010) Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: A new tool in the assessment of liver fibrosis, *Journal of Hepatology*, **52**, 398–406.
6. Williams, R.M., Zipfel, W.R., Webb, W.W. (2005) Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils, *Biophysical Journal*, **88**, 1377–1386.

7. Liu, J., Lim, K.C., Li, H., Seck, H.L., Yu, X., Kok, S.W., Zhang, Y. (2015) Low cost and compact nonlinear (SHG/TPE) laser scanning endoscope for bio-medical application, *SPIE BiOS. proceedings*, **9304**, 93041K–93041K–93046.
8. König, K. (2016) Two-photon autofluorescence/FLIM/SHG endoscopy to study the oral cavity and wound healing in humans, *Conference Presentation*, **9691**, 96910E–96910E–96911.
9. Ducourthial, G., Leclerc, P., Mansuryan, T., Fabert, M., Brevier, J., Habert, R., Braud, F., Batrin, R., Vever-Bizet, C., Bourg-Heckly, G., Thiberville, L., Druilhe, A., Kudlinski, A., Louradour, F. (2015) Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal, *Scientific Reports*, **5**, 18303.
10. Yazdani, S., Yusof, R., Riazi, A., Karimian, A. (2014) Magnetic resonance image tissue classification using an automatic method, *Diagnostic Pathology*, **9**, 1–16.
11. Zacharaki, E.I., Wang, S., Chawla, S., Yoo, D.S., Wolf, R., Melhem, E.R., Davatzikos, C. (2009) Classification of brain tumor type and grade using MRI texture and shape in a machine learning scheme, *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **62**, 1609–1618.
12. Yang, X., Tridandapani, S., Beitler, J.J., Yu, D.S., Yoshida, E.J., Curran, W.J., Liu, T. (2012) Ultrasound GLCM texture analysis of radiation-induced parotid-gland injury in head-and-neck cancer radiotherapy: An in vivo study of late toxicity, *Medical Physics*, **39**, 5732–5739.
13. Ciurte, A., Nedevschi, S. (2009) Texture analysis within contrast enhanced abdominal CT images, *Intelligent Computer Communication and Processing, 2009. ICCP 2009. IEEE 5th International Conference on*, 73–78.
14. Padma Nanthagopal, A., Sukanesh Rajamony, R. (2012) Automatic classification of brain computed tomography images using wavelet-based statistical texture features, *Journal of Visualization*, **15**, 363–372.
15. Alvarenga, A.V., Pereira, W.C.A., Infantosi, A.F.C., Azevedo, C.M. (2007) Complexity curve and grey level co-occurrence matrix in the texture evaluation of breast tumor on ultrasound images, *Medical Physics*, **34**, 379–387.
16. Abedin, M., King, N. (2010) Diverse evolutionary paths to cell adhesion, *Trends in cell biology*, **20**, 734–742.
17. Rocha-Mendoza, I., Yankelevich, D.R., Wang, M., Reiser, K.M., Frank, C.W., Knoesen, A. (2007) Sum frequency vibrational spectroscopy: the molecular origins of the optical second-order nonlinearity of collagen, *Biophys J*, **93**, 4433–4444.
18. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*, **126**, 677–689.
19. Ricard-Blum, S. (2011) The Collagen Family, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, a004978.
20. Shoulders, M.D.,Raines, R.T. (2009) Collagen Structure and Stability, *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 929–958.
21. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) Molecular Cell Biology, 4th edn., 979–985.
22. Buehler, M.J. (2006) Nature designs tough collagen: Explaining the nanostructure of collagen fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 12285–12290.
23. Igarashi, T., Nishino, K., Nayar, S.K. (2007) The Appearance of Human Skin: A Survey, *Foundations and Trends in Computer Graphics and Vision*, **3(1)**, 1–95.
24. Cicchi, R., Matthaus, C., Meyer, T., Lattermann, A., Dietzek, B., Brehm, B.R., Popp, J., Pavone, F.S. (2014) Characterization of collagen and cholesterol deposition in atherosclerotic arterial tissue using non-linear microscopy, *J. Biophotonics*, **7**, 135–143.
25. Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., Pavone, F.S. (2014) Clinical Nonlinear Laser

Imaging of Human Skin: A Review, *BioMed Research International*, **2014**, 14.

26. Mertz, J., Moreaux, L. (2001) Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers, *Optics Communications*, **196**, 325–330.
27. Cox, G.C., Xu, P., Sheppard, C.J.R., Ramshaw, J.A. (2003), Characterization of the second harmonic signal from collagen, *SPIE*, **4963**, 32–40.
28. Roth, S., Freund, I. (1981) Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon, *Biopolymers*, **20**, 1271–1290.
29. Freund, I., Deutsch, M., Sprecher, A. (1986) Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon, *Biophys. J.*, **50**, 693–712.
30. Campagnola, P.J., Millard, A.C., Terasaki, M., Hoppe, P.E., Malone, C.J., Mohler, W.A. (2002) Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues, *Biophys J*, **82**, 493–508.
31. Georgiou, E., Theodossiou, T., Hovhannisyan, V., Politopoulos, K., Rapti, G.S., Yova, D. (2000) Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region, *Optics Communications*, **176**, 253–260.
32. Cox, G.C., Manconi, F., Kable, E. (2002) Second harmonic imaging of collagen in mammalian tissue, *Proc. SPIE*, **4620**, 148–156.
33. Hall, G., Tilbury, K.B., Campbell, K.R., Eliceiri, K.W., Campagnola, P.J. (2014) Experimental and simulation study of the wavelength dependent second harmonic generation of collagen in scattering tissues, *Opt. Lett.*, **39**, 1897–1900.
34. Cox, G., Kable, E., Jones, A., Fraser, I., Manconi, F., Gorrell, M.D. (2003) 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation, *J. Struct. Biol.*, **141**, 53–62.
35. Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., Campagnola, P.J. (2012) Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure, *Nat. Protocols*, **7**, 654–669.
36. LaComb, R., Nadiarnykh, O., Campagnola, P.J. Quantitative Second Harmonic Generation Imaging of the Diseased State Osteogenesis Imperfecta: Experiment and Simulation, *Biophysical Journal*, **94**, 4504–4514.
37. Rao, R.A.R., Mehta, M.R., Leithem, S., Toussaint, J.K.C. (2009) Quantitative analysis of forward and backward second-harmonic images of collagen fibers using Fourier transform second-harmonic-generation microscopy, *Opt. Lett.*, **34**, 3779–3781.
38. Ambekar Ramachandra Rao, R., Mehta, M.R., Leithem, S., Toussaint, J.K.C. (2010) Comparison of Forward and Backward SHG Images Using Fourier Transform-Second-Harmonic Generation Imaging, *Conference on Lasers and Electro-Optics 2010*, **JWA67**, 1.
39. Kottmann, R.M., Sharp, J., Owens, K., Salzman, P., Xiao, G.-Q., Phipps, R.P., Sime, P.J., Brown, E.B., Perry, S.W. (2015) Second harmonic generation microscopy reveals altered collagen microstructure in usual interstitial pneumonia versus healthy lung, *Respiratory Research*, **16**, 1–13.
40. Hui Mingalone, C., Liu, Z., Hollander, J., Garvey, K., Gibson, A., Banks, R., Zhang, M., McAlindon, T., Nielsen, H., Georgakoudi, I., Zeng, L. (2018) Second harmonic generation imaging reveals alterations of collagen fibers that correlate with synovitis and cartilage damage in early experimental osteoarthritis, *Osteoarthritis and Cartilage*, **26**, S469–S470.
41. Campagnola, P. (2011) Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics, *Analytical chemistry*, **83**, 3224–3231.
42. Amat-Roldan, I., Psilodimitrakopoulos, S., Loza-Alvarez, P., Artigas, D. (2010) Fast image analysis in polarization SHG microscopy, *Opt. Express*, **18**, 17209–17219.
43. Alali, S., Vitkin, A. (2015) Polarized light imaging in biomedicine: emerging Mueller matrix methodologies for bulk

tissue assessment, *BIOMEDO*, **20**, 061104–061104.

44. Tuer, A.E., Krouglov, S., Prent, N., Cisek, R., Sandkuijl, D., Yasufuku, K., Wilson, B.C., Barzda, V. (2011) Nonlinear Optical Properties of Type I Collagen Fibers Studied by Polarization Dependent Second Harmonic Generation Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry B*, **115**, 12759–12769.
45. Tokarz, D., Cisek, R., Golaraei, A., Asa, S.L., Barzda, V., Wilson, B.C. (2015) Ultrastructural features of collagen in thyroid carcinoma tissue observed by polarization second harmonic generation microscopy, *Biomed. Opt. Express*, **6**, 3475–3481.
46. Akilbekova, D., Bratlie, K.M. (2015) Quantitative Characterization of Collagen in the Fibrotic Capsule Surrounding Implanted Polymeric Microparticles through Second Harmonic Generation Imaging, *Plos One*, **10**, e0130386.
47. Chen, Y., Jiang, G., Zhou, Y., Xia, X. (2018) Second harmonic generation in two different arrangement of type I collagen on nonlinear microscopy, *Results in Physics*, **10**, 391–394.
48. Wu, P.-C., Hsieh, T.-Y., Tsai, Z.-U., Liu, T.-M. (2015) In vivo Quantification of the Structural Changes of Collagens in a Melanoma Microenvironment with Second and Third Harmonic Generation Microscopy, *Scientific Reports*, **5**, 8879.
49. Weigelin, B., Bakker, G.-J., Friedl, P. (2012) Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion, *IntraVital*, **1**, 32–43.
50. Witte, S., Kuzmin, N.V., Negrean, A., Lodder, J.C., Silva, G.T., de Kock, C.P., Mansvelder, H.D., Groot, M.L. (2012) Third-Harmonic Generation Microscopy For Label-Free Brain Imaging, *Biomedical Optics and 3-D Imaging*, **BSu4B.4**, 1.
51. Shcheslavskiy, Vladislav I., Saltiel, Solomon M., Faustov, A., Petrov, Georgi I.,Yakovlev, Vladislav V. (2005) Third-harmonic Rayleigh scattering: theory and experiment, *J. Opt. Soc. Am. B*, **22**, 2402–2408.
52. Shcheslavskiy, V.I., Saltiel, S.M., Faustov, A.R., Petrov, G.I., Yakovlev, V.V. (2006) How to measure chi(3) of a nanoparticle, *Opt. Lett.*, **31**, 1486–1488.
53. Haralick, R.M. (1979) Statistical and structural approaches to texture, *Proceedings of the IEEE*, **67**, 786–804.
54. Lerski, R.A., de Certaines, J.D., Duda, D., Klonowski, W., Yang, G., Coatrieux, J.L., Azzabou, N., Eliat, P.-A. (2015) Application of texture analysis to muscle MRI: 2 – technical recommendations, *EPJ Nonlinear Biomedical Physics*, **3**, 1–20.
55. Bevk, M., Kononenko, I. (2002) A statistical approach to texture description of medical images: a preliminary study. In: Computer-Based Medical Systems, *Proceedings of the 15th IEEE Symposium on 64*, **CBMS 2002**, 239–244.
56. Leila, B.M.-G., Alex, C.T.K., Dan, P.P., Michael, S.D.S., Elicia, K.K., Masashi, S., Arkady, M., Michael, G.S. (2011) Evaluation of texture parameters for the quantitative description of multimodal nonlinear optical images from atherosclerotic rabbit arteries, *Physics in Medicine and Biology*, **56**, 5319.
57. Raub, C.B., Kim, P.D., Putnam, A.J., Lowengrub, J.S., Tromberg, B.J., George, S.C. (2008) Correlations between second harmonic signal, microstructure, and mechanics of contracting collagen gels, *Optics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine II, edited by Sean J. Kirkpatrick, Ruikang K. Wang, Proc. of SPIE*, **6858**, 11.
58. Brown, E., McKee, T., diTomaso, E., Pluen, A., Seed, B., Boucher, Y., Jain, R.K. (2003) Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation, *Nat Med*, **9**, 796–800.
59. Wang, W., Wyckoff, J.B., Frohlich, V.C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E.P., Singer, R.H., White, J.G., Segall, J.E., Condeelis, J.S. (2002) Single Cell Behavior in Metastatic Primary Mammary Tumors Correlated with Gene Expression Patterns Revealed by Molecular Profiling, *Cancer Research*, **62**, 6278–6288.

60. Pirhonen, J., Arola, J., Sädevirta, S., Luukkonen, P., Karppinen, S.-M., Pihlajaniemi, T., Isomäki, A., Hukkanen, M., Yki-Järvinen, H., Ikonen, E. (2016) Continuous Grading of Early Fibrosis in NAFLD Using Label-Free Imaging: A Proof-of-Concept Study, *Plos One*, **11**, e0147804.
61. Sun, Y., Chen, W.L., Lin, S.J., Jee, S.H., Chen, Y.F., Lin, L.C., So, P.T.C., Dong, C.Y. (2006) Investigating mechanisms of collagen thermal denaturation by high resolution second-harmonic generation imaging, *Biophys. J*, **91**, 2620–2625.
62. Zhu, X., Zhuo, S., Zheng, L., Jiang, X., Chen, J., Lin, B. (2011) Quantification of scar margin in keloid different from atrophic scar by multiphoton microscopic imaging, *Scanning*, **33**, 195–200.
63. Mihaela Balu, Kristen M. Kelly, Christopher B. Zachary, Ronald M. Harris, Tatiana B. Krasieva, Karsten Konig, Anthony J. Durkin, Tromberg, B.J. (2014) Distinguishing between Benign and Malignant Melanocytic Nevi by In Vivo Multiphoton Microscopy, *Cancer Res.*, **74(10)**, 2688–2697.
64. Mostaço-Guidolin, L.B., Ko, A.C.T., Wang, F., Xiang, B., Hewko, M., Tian, G., Major, A., Shiomi, M., Sowa, M.G. (2013) Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification, *Scientific Reports*, **3**, 2190.
65. Maria M. Lukina, V.V.D., Lyubov' E. Shimolina, Ludmila B. Snopova, Elena V. Zagaynova, Marina V. Shirmanova. (2019) In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy, *Cytometry partA*, in press.
66. Haralick, R., Shanmugam, K., Dinstein, I. (1973) Textural features for image classification, *IEEE Trans Systems Man Cybernetics*, **SMC-3**, 610–621.
67. Tilbury, K., Campagnola, P.J. (2015) Applications of Second-Harmonic Generation Imaging Microscopy in Ovarian and Breast Cancer, *Perspectives in Medicinal Chemistry*, **7**, 21–32.
68. Adur, J., Pelegati, V.B., de Thomaz, A.A., Baratti, M.O., Andrade, L.A., Carvalho, H.F., Bottcher-Luiz, F., Cesar, C.L. (2014) Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer, *J. Biophotonics*, **7**, 37–48.
69. Cicchi, R., Kapsokalyvas, D., De Giorgi, V., Maio, V., Van Wiechen, A., Massi, D., Lotti, T., Pavone, F.S. (2010) Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy, *J. Biophotonics*, **3**, 34–43.
70. Watson, J.M., Rice, P.F., Marion, S.L., Brewer, M.A., Davis, J.R., Rodriguez, J.J., Utzinger, U., Hoyer, P.B., Barton, J.K. (2012) Analysis of second-harmonic-generation microscopy in a mouse model of ovarian carcinoma, *J. Biomed. Opt.*, **17**, 076002.
71. Hu, W., Li, H., Fu, L., Wang, C., Gou, S. (2012) Characterization of collagen fibers by means of texture analysis of second harmonic generation images using orientation-dependent gray level co-occurrence matrix method, *SPIE*, **17**, 9.
72. Cicchi, R., Baria, E., Matthäus, C., Lange, M., Lattermann, A., Brehm, B.R., Popp, J., Pavone, F.S. (2015) Nonlinear imaging and characterization of atherosclerotic arterial tissue using combined SHG and FLIM microscopy, *Journal of Biophotonics*, **8**, 347–356.
73. Adur, J., Pelegati, V.B., Costa, L.F., Pietro, L., de Thomaz, A.A., Almeida, D.B., Bottcher-Luiz, F., Andrade, L.A., Cesar, C.L. (2011) Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy, *J. Biomed. Opt.*, **16**, 3626575.
74. Adur, J., Pelegati, V.B., de Thomaz, A.A., Baratti, M.O., Almeida, D.B., Andrade, L.A., Bottcher-Luiz, F., Carvalho, H.F., Cesar, C.L. (2012) Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies, *Plos One*, **7**, 8.
75. Kirkpatrick, N.D., Brewer, M.A., Utzinger, U. (2007) Endogenous optical biomarkers of ovarian cancer evaluated with multiphoton microscopy, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **16**, 2048–2057.
76. Zheng, W., Li, D., Li, S., Zeng, Y., Yang, Y., Qu, J.Y. (2011) Diagnostic value of

nonlinear optical signals from collagen matrix in the detection of epithelial precancer, *Opt. Lett.*, **36**, 3620–3622.

77. Boyd, N.F., Lockwood, G.A., Byng, J.W., Tritchler, D.L., Yaffe, M.J. (1998) Mammographic densities and breast cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **7**, 1133–1144.
78. McCormack, V.A., dos Santos Silva, I. (2006) Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **15**, 1159–1169.
79. Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G.,Keely, P.J. (2008) Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression, *BMC Medicine*, **6**, 1–15.
80. Walker, R.F., Jackway, P.T., Longstaff, D. (2003) Genetic algorithm optimization of adaptive multi-scale glcm features, *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, **17**, 17–39.
81. Wen, B.L., Brewer, M.A., Nadiarnykh, O., Hocker, J., Singh, V., Mackie, T.R., Campagnola, P.J. (2014) Texture analysis applied to second harmonic generation image data for ovarian cancer classification, *J. Biomed. Opt.*, **19**, 096007.
82. Varma, M., Zisserman, A. (2004) Unifying statistical texture classification frameworks, *Image Vision Comput.*, **22**, 1175–1183.
83. Isabelle Guyon, Elisseeff, A. (2003) An introduction to variable and feature selection, *J. Mach. Learn. Res.*, **3**, 1157–1182.
84. Mostaço-Guidolin, L.B., Ko, A.C.-T., Popescu, D.P., Smith, M.S.D., Kohlenberg, E.K., Shiomi, M., Major, A., Sowa, M.G. (2011) Evaluation of texture parameters for the quantitative description of multimodal nonlinear optical images from atherosclerotic rabbit arteries, *Phys. Med. Biol.*, **56**, 5319–5334.
85. Kiseleva, E.B., Gubarkova, E., Dudenkova, V.V., Timashev, P., Kotova, S., Timofeeva, L.B., Kirillin, M., Belkova, G., Solov'eva, A.B., Strel'tsova, O.S., Gladkova, N. (2017) Complementary Study of Collagen State in Bladder Diseases Using Cross-Polarization Optical Coherence Tomography, Nonlinear and Atomic Force Microscopy, **9**, 7.
86. Dudenkova, V.V., Druzkhova I. N., Lukina M.M., Shirmanova M. V., Zagaynova E. V. (2018) Characterization of collagen structure by SHG in tumor models in-vitro, *Biophotonics Congress: Biomedical Optics Congress 2018 (Microscopy/Translational/Brain/OTS)*, **JTu3A.14**, 1.
87. Druzhkova, I.N., Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Shimolina, L.E., Snopova, L.B., Zagaynova, E.V., Shirmanova, M.V. (2018) Insight into microenvironment of tumor on the microscopic level with a focus on cancer-associated fibroblasts, *SPIE Photonics Europe*, **10685**, 9.
88. Walsh, A.J., Cook, R.S., Lee, J.H., Arteaga, C.L., Skala, M.C. (2015) Collagen density and alignment in responsive and resistant trastuzumab-treated breast cancer xenografts, *BIOMEDO*, **20**, 026004.
89. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K.W., Tomancak, P., Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat Meth*, **9**, 676–682.
90. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*, **9**, 671–675.
91. Falzon, G., Pearson, S., Murison, R. (2008) Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer, *Phys. Med. Biol.*, **53**, 6641–6652.
92. Sivaguru, M., Durgam, S., Ambekar, R., Luedtke, D., Fried, G., Stewart, A., Toussaint, K.C. (2010) Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging, *Opt. Express*, **18**, 24983–24993.
93. Germann, J.A., Martinez-Enriquez, E., Marcos, S. (2018) Quantization of

collagen organization in the stroma with a new order coefficient, *Biomed. Opt. Express*, **9**, 173–189.

94. Gubarkova, E., Kirillin, M.Y., Dudenkova, V.V., Kiseleva, E.B., Moiseev, A.A., Gelikonov, G.V., Timofeeva, L.B., Fiks, I.I., Feldchtein, F.I., Gladkova, N.D. (2016) Quantitative analysis of the polarization characteristics of atherosclerotic plaques, *SPIE proceedings*, **9887**, 988736.
95. Wu, S., Huang, Y., Li, H., Wang, Y., Zhang, X. (2015) Quantitative analysis on collagen of dermatofibrosarcoma protuberans skin by second harmonic generation microscopy, *Scanning*, **37**, 1–5.
96. Wu, S., Li, H., Yang, H., Zhang, X., Li, Z.,Xu, S. (2011) Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy, *BIOMEDO*, **16**, 040502.
97. Osman, O.S., Selway, J.L., Harikumar, P.E., Stocker, C.J., Wargent, E.T., Cawthorne, M.A., Jassim, S., Langlands, K. (2013) A novel method to assess collagen architecture in skin, *BMC Bioinformatics*, **14**, 1–10.
98. Watson, J.M., Marion, S.L., Rice, P.F., Bentley, D.L., Besselsen, D.G., Utzinger, U., Hoyer, P.B., Barton, J.K. (2014) In vivo time-serial multimodality optical imaging in a mouse model of ovarian tumorigenesis, *Cancer Biol. Ther.*, **15**, 42–60.
99. Watson, J.M., Rice, P.F., Marion, S.L., Brewer, M.A., Davis, J.R., Rodriguez, J.J., Utzinger, U., Hoyer, P.B., Barton, J.K. (2012) Analysis of second-harmonic-generation microscopy in a mouse model of ovarian carcinoma, *Journal of Biomedical Optics*, **17**, 0760021–0760029.
100. Morishige, N., Shin-Gyou-Uchi, R., Azumi, H., Ohta, H., Morita, Y., Yamada, N., Kimura, K., Takahara, A., Sonoda, K.H. (2014) Quantitative analysis of collagen lamellae in the normal and keratoconic human cornea by second harmonic generation imaging microscopy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55**, 8377–8385.
101. Stein, A.M., Vader, D.A., Jawerth, L.M., Weitz, D.A., Sander, L.M. (2008) An algorithm for extracting the network geometry of three-dimensional collagen gels, *J. Microsc.*, **232**, 463–475.
102. Candès, E.J., Demanet, L., Donoho, D., Ying, L.X. (2006) Fast discrete curvelet transforms, *SIAM Multiscale Model. Simul.*, **5**, 861–899.
103. Bredfeldt, J.S., Liu, Y., Pehlke, C.A., Conklin, M.W., Szulczewski, J.M., Inman, D.R., Keely, P.J., Nowak, R.D., Mackie, T.R., Eliceiri, K.W. (2014) Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer, *BIOMEDO*, **19**, 016007.
104. Bredfeldt, J.S., Liu, Y., Conklin, M.W., Keely, P.J., Mackie, T.R., Eliceiri, K.W. (2014) Automated quantification of aligned collagen for human breast carcinoma prognosis, *Journal of Pathology Informatics*, **5**, 28.
105. Harmany, Z.T., Marcia, R.F., Willett, R.M. (2012) This is SPIRAL-TAP: Sparse Poisson Intensity Reconstruction ALgorithms—Theory and Practice, *IEEE Transactions on Image Processing*, **21**, 1084–1096.
106. Sato, Y., Nakajima, S., Shiraga, N., Atsumi, H., Yoshida, S., Koller, T., Gerig, G., Kikinis, R. (1998) Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images, *Medical Image Analysis*, **2**, 143–168.
107. Candès, E., Demanet, L., Donoho, D., Ying, L. (2006) Fast Discrete Curvelet Transforms, *Multiscale Modeling & Simulation*, **5**, 861–899.
108. Jean-Luc, S., Candes, E.J., Donoho, D.L. (2002) The curvelet transform for image denoising, *IEEE Transactions on Image Processing*, **11**, 670–684.
109. Kuznetsov, S.S., Dudenkova, V.V., Kochueva, M.V., Kiseleva, E.B., Ignatieva, N.Y., Zakharkina, O.L., Sergeeva, E.A., Babak, K.V., Maslennikova, A.V. (2016) Multiphoton Microscopy in the Study of Morphological

Characteristics of Radiation-Induced Injuries of the Bladder, *Sovremennye tehnologii v medicine [Modern Technologies in Medicine]*, **8**, 31–39.

110. Shavkuta, B.S., Gerasimov, M.Y., Minaev, N.V., Kuznetsova, D.S., Dudenkova, V.V., Mushkova, I.A., Malyugin, B.E., Kotova, S.L., Timashev, P.S., Kostenev, S.V., Chichkov, B.N., Bagratashvili, V.N. (2018) Highly effective 525 nm femtosecond laser crosslinking of collagen and strengthening of a human donor cornea, *Laser Physics Letters*, **15**, 015602.
111. He, B., Wu, J., Kirk, T., Carrino, J., Xiang, C., Xu, J. (2014) High-resolution measurements of the multilayer ultra-structure of articular cartilage and their translational potential, *Arthritis Research & Therapy*, **16**, 205.
112. Stringari, C., Wang, H., Geyfman, M., Crosignani, V., Kumar, V., Takahashi, Joseph S., Andersen, B., Gratton, E. (2015) In Vivo Single-Cell Detection of Metabolic Oscillations in Stem Cells, *Cell Reports*, **10**, 1–7.
113. Wu, S., Huang, Y., Tang, Q., Li, Z., Horng, H., Li, J., Wu, Z., Chen, Y., Li, H. (2018) Quantitative evaluation of redox ratio and collagen characteristics during breast cancer chemotherapy using two-photon intrinsic imaging, *Biomed. Opt. Express*, **9**, 1375–1388.
114. Lin, S.J., Wu, R., Jr., Tan, H.Y., Lo, W., Lin, W.C., Young, T.H., Hsu, C.J., Chen, J.S., Jee, S.H., Dong, C.Y. (2005) Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy, *Opt Lett*, **30**, 2275–2277.
115. Koehler, M.J., König, K., Elsner, P., Bückle, R., Kaatz, M. (2006) In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography, *Opt. Lett.*, **31**, 2879–2881.
116. Tabachnick, J., LaBadie, J.H. (1970) Studies on the biochemistry of epidermis. IV. The free amino acids, ammonia, urea, and pyrrolidone carboxylic acid content of conventional and germ-free albino guina pig epidermia, *J. Invest. Dermatol.*, **54**, 24–31.
117. Sugata, K., Osanai, O.,Sano, T., Takema, Y. (2011) Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy, *Skin Research and Technology*, **17**, 1–3.
118. Springer, S., Zieger, M., Böttcher, A., Lademann, J.,Kaatz, M. (2017) Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo, *Skin Research and Technology*, **23**, 452–458.
119. Cicchi, R., Crisci, A., Cosci, A., Nesi, G., Kapsokalyvas, D., Saverio, G., Carini, M., Pavone, F.S. (2010) Time- and Spectral-resolved two-photon imaging of healthy bladder mucosa and carcinoma in situ, *Opt. Express*, **18**, 3840–3849.
120. Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Ignatova, N.I., Druzhkova, I.N., Shimolina, L.E., Zagaynova, E.V., Shirmanova, M.V. (2018) Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **1862**, 1693–1700.
121. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews*, **59**, 527–605.
122. Lukina, M.M., Shirmanova, M.V., Sergeeva, T.F., Zagaynova, E.V. (2016) Metabolic Imaging in the Study of Oncological Processes (Review), *CTM*, **8**, 113–126.
123. Syverud, B.C., Mycek, M.A., Larkin, L.M., (2017) Quantitative, Label-Free Evaluation of Tissue-Engineered Skeletal Muscle Through Multiphoton Microscopy, *Tissue Engineering Part C: Methods*, **23**, 616–626.
124. Lakowicz, J.R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., Johnson, M.L. (1992) Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 1271–1275.
125. van den Berg, P.A.W., Feenstra, K.A., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C., Visser, A.J.W.G. (2002) Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular

Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics, *The Journal of Physical Chemistry B*, **106**, 8858–8869.

126. Becker, W., Bergmann, A., Hink, M.A., König, K., Benndorf, K., Biskup, C. (2003) Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting, *Microscopy Research and Technique*, **63**, 58–66.
127. Meleshina, A.V., Rogovaya, O.S., Dudenkova, V.V., Sirotkina, M.A., Lukina, M.M., Bystrova, A.S., Krut, V.G., Kuznetsova, D.S., Kalabusheva, E.P., Vasiliev, A.V., Vorotelyak, E.A., Zagaynova, E.V. (2018) Multimodal label-free imaging of living dermal equivalents including dermal papilla cells, *Stem. Cell Research & Therapy*, **9**, 84.
128. Zhang, Y., Akins, M. L., Murari, K., Xi, J. Li, M., Luby-Phelps, K., Mahendroo, M., Li, X. (2012) A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 12878–12883.