УДК 535.12+577.122+612.79

МУЛЬТИФОТОННАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ДЕТЕКЦИИ В КОЖЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

[1,2]Зобова С.Н., [3]Кирилкин И.В., [3]Топтунов Д.М., [3]Хируг Л.С.

[1]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», Красноярск, e-mail: impn@impn.ru;
[2]ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, e-mail: rector@krasgmu.ru;
[3]Neurotar Ltd, Helsinki, Finland, e-mail: leonard.khiroug@neurotar.com

Конечные продукты гликозилирования (Advanced Glycation Endproducts – AGE) образуются в ходе неферментативного гликирования белков, липидов и нуклеиновых кислот, их количество увеличивается в процессе старения. Большинство конечных продуктов гликозилирования обладают автофлюоресценцией. В данном пилотном исследовании проведён детальный анализ суммарного автофлюоресцентного сигнала (АФ), полученного из эпидермиса и сосочкового слоя дермы небольшого участка предплечья 8 здоровых волонтёров в возрасте 24-67 лет с помощью мультифотонной томографии. Выявлен вклад различных компонентов кожи в общий автофлюоресцентный сигнал, продемонстрировано, что наибольшая корреляция с возрастным показателем наблюдается в шиповатом и базальном слоях эпидермиса, в то время как наименьшая отмечается в сосочковом слое дермы, доступном для мультифотонной микроскопии. Основываясь на полученных данных, мы предлагаем новый неинвазивный метод для чувствительной и селективной оценки конечных продуктов гликозилирования в эпидермисе, основанный на микроскопическом паттерне распределения автофлюоресценции.

Ключевые слова: мультифотонная микроскопия, мультифотонная томография, автофлюоресценция, кожа, конечные продукты гликозилирования

MULTIPHOTON MICROSCOPY FOR NONINVASIVE MEASUREMENT OF ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS IN SKIN

[1,2]Zobova S.N., [3]Kirilkin I.V., [3]Toptunov D.M., [3]Khiroug L.S.

[1]State Scientific Institute for Medical Problems of the North Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, e-mail: impn@impn.ru;
[2]Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, e-mail: rector@krasgmu.ru;
[3]Neurotar Ltd, Helsinki, Finland, e-mail: leonard.khiroug@neurotar.com

Advanced Glycation End -Products (AGE) are formed in a reaction, initiated by non-enzymatic glycation of proteins, lipids and nucleic acids, and its number increases with age. Most of them emit autofluorescence. In this study, the detailed analysis of the total autofluorescence signal (AF), obtained from the epidermis and papillary dermis of small area from 8 healthy volunteers' forearm, aged 24-67 years, has been done by multiphoton tomography. The contribution of distinct components of the skin in general autofluorescence signal was determined, and it was demonstrated that the highest correlation with the age indicator was observed in strata spinosum and basale of the epidermis, while the weakest one was in the papillary dermis, available for multiphoton microscopy. Based on these findings, we propose a new noninvasive method for sensitive and selective evaluation of the advanced glycation end products in the epidermis based on a microscopic pattern of distribution of autofluorescence.

Keywords: multiphoton microscopy, multiphoton tomography, autofluorescence, skin, advanced glycation end-products (AGE)

Конечные продукты гликозилирования формируются в процессе комплексных многоступенчатых реакций, инициированных спонтанным неферментативным гликозилированием внутри- и внеклеточных белков, липидов и нуклеиновых кислот [1, 3, 5]. С возрастом количество конечных продуктов гликозилирования в коже возрастает вследствие аккумуляции внеклеточных продуктов гликозилирования на долгоживущих матриксных белках дермы и снижения активности внутренних детоксикационных механизмов, ответственных за элиминацию внутриклеточных AGE в эпидермальных кератиноцитах и дермальных фибробластах [1, 2, 4, 6]. Аккумуляция AGE в коже способствует развитию ключевых патологических процессов старения [2, 4], что предопределяет огромный потенциал для разработки новых активных препаратов против старения, направленных на снижение образования или элиминацию конечных продуктов гликозилирования. Эффективная разработка препаратов, снижающих количество AGE в коже, нуждается в поиске надёжных биомаркёров, при этом собственная флюоресценция AGE в сине-зелёном спектре применяется в ряде исследований как простой, неинвазивный способ измерения общего

количества AGE в коже человека [2, 3, 5, 7]. Используя *in vivo* мультифотонную томографию, мы установили, какой вклад в общую флюоресценцию кожи волонтёра в спектре, испускаемом AGE, привносит каждый её слой, доступный по глубине детекции выбранным методом, сделав акцент на возрастные изменения в автофлюоресценции кожных слоёв.

Материалы и методы исследования

Трёхмерные пакеты имиджей 500 мкм×500 мкм, количеством 10, охватывающие для каждого волонтёра общую площадь кожи 0,25 мм^2 и выполненные на глубину 150 мкм с шагом 2 мкм, были получены с помощью двухфотонного микроскопа FluoView 1200 MP (Olympus). Возбуждение осуществлялось инфракрасным лазерным излучением длиной волны 800 нм (Ti:Sapphire Mai-Tai DeepSee femtosecond laser, Spectra Physics) через объектив XL Plan N 25X (Olympus). Для исследования были выбраны участки кожи на внутренней стороне предплечья, наименее подверженные экспозиции прямых солнечных лучей. Исследование было проведено на 8 здоровых волонтёрах обоего пола в возрасте от 24 до 67 лет. Эмиссию детектировали одновременно в четырёх спектральных каналах (рис. 1), два из которых использовали для оценки второй гармоники (397-412 нм) и автофлюоресценции (455-490 нм).

Обработка данных была выполнена с помощью специально разработанного в компании Neurotar программного обеспечения. На основании кривых распределения интенсивности сигналов второй гармоники (коллаген) и автофлюоресценции (кератин, NAD(P)H, меланин, эластин, AGE) по глубине производилось автоматическое разделение доступного для двухфотонной микроскопии сегмента кожи на роговой, зернистый, шиповатый и базальный слои эпидермиса и сосочковый слой дермы (рис. 1, А, Б, В). Суммарная интенсивность автофлюоресценции рассчитывалась для каждого слоя кожи отдельно как интеграл под соответствующим участком кривой (рис. 1, В).

Результаты исследования и их обсуждение

В соответствии с литературными данными (5), суммарный автофлюоресцентный сигнал, полученный со всех слоёв кожного сегмента, демонстрировал сильную позитивную корреляцию с возрастом (R = 0,859, p = 0,006) (рис. 2, А).

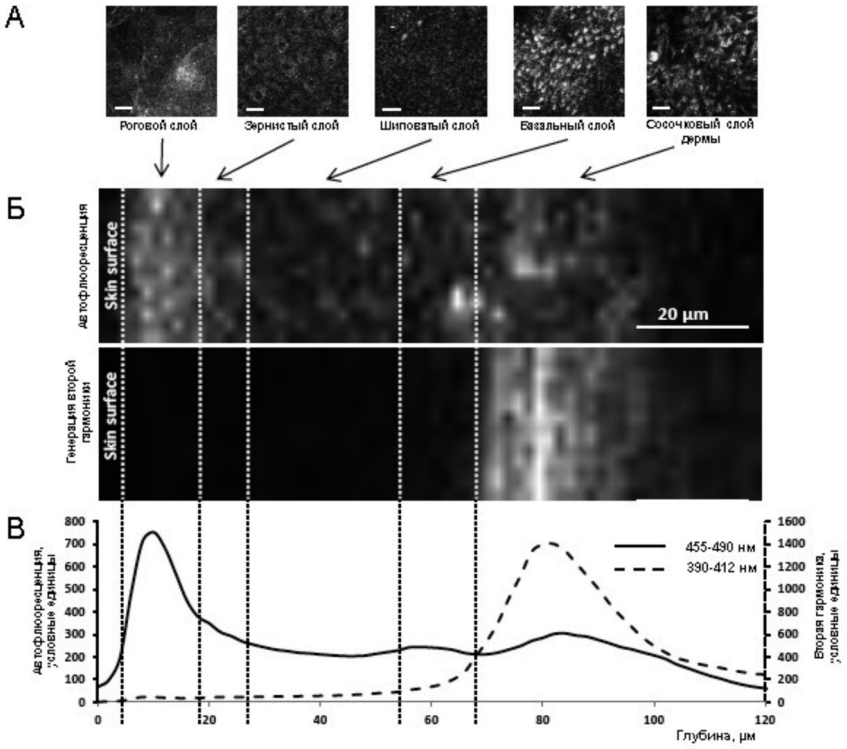

Рис. 1. А, репрезентативные in vivo двухфотонные изображения кожи человека в проекции горизонтальных xy координат, соответствующие различным слоям эпидермиса и дермы. Масштаб 20 мкм. Б, Z-проекция in vivo двухфотонных изображений кожи предплечья 58-летней здоровой женщины: верхняя панель представляет автофлюоресцентный сигнал, нижняя панель – генерацию второй гармоники. В, кривые сигнала второй гармоники (коллаген) по Z-оси (пунктир) и автофлюоресценции (сплошная линия), построенные против соответствующей глубины сканирования кожных слоёв. Вертикальные пунктирные линии отмечают границы анализируемых слоев кожи

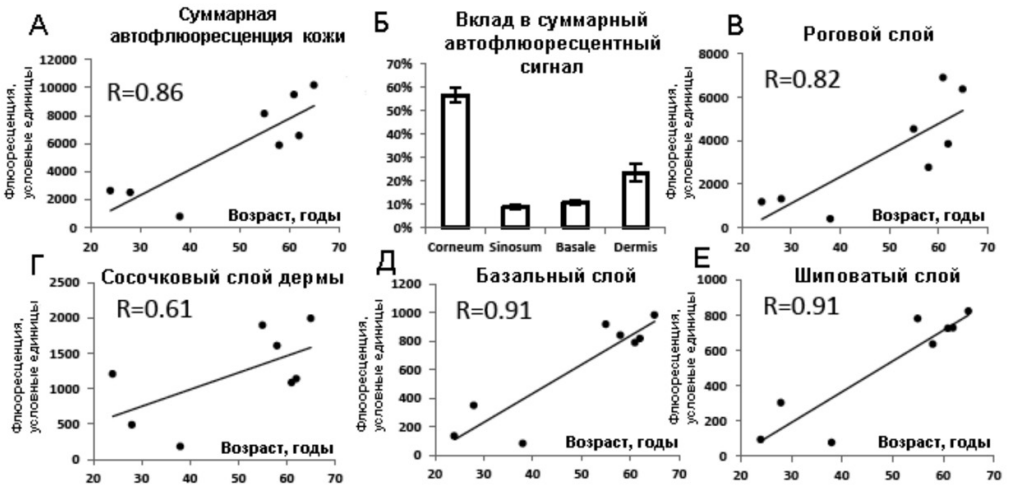

Рис. 2. А, суммарный эмиттированный автофлюоресцентный сигнал в диапазоне 455-490 нм, отнесённый к возрасту волонтёра. Б, процентный клад каждого слоя кожного сегмента в общий испущенный автофлюоресцентный сигнал. В-Е, автофлюоресцентный сигнал в диапазоне 455-490 нм, отнесенный к возрасту волонтера, рассчитанный для рогового, шиповатого, базального слоев эпидермиса и сосочкового слоя дермы, соответственно

Чтобы установить вклад различных компонентов кожи в общую автофлюоресценцию, эмиттированную кожным сегментом, мы воспользовались преимуществами двухфотонной микроскопии, заключающимися в отличном вертикальном разрешении (1-2 мкм), что позволило детектировать автофлюоресценцию каждого слоя кожи отдельно. Как показано на рис. 2, Б, более половины (56,6 ± 3,0%) общей АФ в сине-зелёном спектре (455-490 нм), испущенной из участка кожи глубиной 150 мкм, приходилось на роговой слой. Другим компонентом, вносящим существенный вклад (23,6 ± 3,6%) в общую автофлюоресценцию, оказался сосочковый слой дермы, и только одна пятая суммарного АФ сигнала генерировалась метаболически активными слоями эпидермиса (10,7 ± 1.,1% вносил базальный слой и 9,1 ± 0,9% – шиповатый). Далее мы обратились к вопросу о наличии корреляции АФ отдельных кожных слоёв с возрастом волонтёров. В ходе анализа было показано, что роговой слой, вносящий наиболее весомый вклад в общую АФ кожных покровов, демонстрирует среднюю корреляцию с возрастом волонтёра ($R = 0,823$) с достоверностью $p = 0,012$ (рис. 2, В). Не было обнаружено статистически достоверной корреляции в верхних слоях папиллярного слоя дермы, доступных качественной двухфотонной детекции ($R = 0,609$, $p = 0,109$) (рис. 2, Г). Наиболее сильная корреляция с возрастом была показана для АФ сигнала, полученного из метаболически активного эпидермиса. Высокая степень статистической достоверности отмечалась как для шиповатого ($R = 0,914$, $p = 0,001$), так и для базального слоёв ($R = 0,907$, $p = 0,002$) (рис. 2, Д, Е). Хотя биохимические данные свидетельствуют о том, что с возрастом количество конечных продуктов гликирования увеличивается главным образом в дерме и роговом слое эпидермиса [5, 6], высокая индивидуальная вариабельность эндогенных флюорофоров, таких как эластин и кератин, соответственно, может ставить под сомнение специфичность результатов детекции AGE, основанных на регистрации суммарного автофлюоресцентного сигнала. В этом случае вычитание эмиссии кожных слоёв, содержащих наибольшее количество естественных флюорофоров, может увеличить чистоту и специфичность сигнала, генерируемого конечными продуктами неферментативного гликозилирования. В отличие от дермы и рогового слоя эпидермиса, шиповатый слой характеризуется наименьшим количеством эндогенных флюорофоров, эмиттирующих в сине-зелёном спектре. Основной молекулой метаболически активного эпидермиса, детектируемой в канале 455-490 нм, является NAD(P)H [7].

Заключение

Принимая во внимание, что наименьший флюоресцентный фон, обусловленный присутствием эндогенных флюорофоров и не связанный с аккумуляцией AGE, был зарегистрирован в шиповатом слое эпидермиса, а также наиболее силь-

ные показатели корреляции АФ с возрастом наблюдались именно в этом слое, мы предлагаем метод специфической детекции аккумуляции AGE, основанный на селективном измерении АФ шиповатого слоя. Учитывая интенсивную пролиферацию базальных кератиноцитов и высокую скорость обновления клеток шиповатого слоя эпидермиса, селективное измерение АФ AGE может служить одним из методов неинвазивного скрининга препаратов, направленных на снижение образования или ускоренную элиминацию конечных продуктов гликирования. В настоящее время мультифотонная томография является наилучшим методом для проведения неинвазивного проспективного количественного определения AGE в коже человека.

Список литературы

1. Ahmed N. Advanced glycation endproducts–role in pathology of diabetic complications / N. Ahmed // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2005. – Vol. 67. – P. 3–21.

2. Corstjens H. Glycation associated skin autofluorescence and skin elasticity are related to chronological age and body mass index of healthy subjects / H. Corstjens, D. Dicanio, A. Neven et. al. // Experimental Gerontology. – 2008. – Vol. 43. – P. 663-667.

3. De La Maza M.P. Fluorescent advanced glycation end-products (ages) detected by spectro-photofluorimetry, as a screening tool to detect diabetic microvascular complications / M.P. De La Maza, F. Garrido, N. Escalante et al. // J. Diabetes Mellitus. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 221–226.

4. Gkogklou P., Böhm M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? / P. Gkogklou, M. Böhm // Dermato-Endocrinology. – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 259–270.

5. Mulder D.J. Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation end-products: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations / D.J. Mulder, T. Van De Water, H.L. Lutgers et al. // Diabetes Technology & Therapeutics. – 2006. – Vol. 8, № 5. – P. 523–535.

6. Takeuchi M. Immunological detection of fructose-derived advanced glycation end-products / M. Takeuchi, M. Iwaki, J. Takino et al.// Laboratory Investigation. – 2010. Vol. 90. – P. 1117–1127.

7. Zipfel W.R. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation / W.R. Zipfel et al.// PNAS. – 2003. Vol. 100, № 12. – P. 7075–7080.