

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2328.

KISS NORBERT FERENC

Bőrgyógyászat és venerológia

című program

Programvezető: Dr. Sárdy Miklós, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Wikonkál Norbert, egyetemi tanár

Konzulens: Dr. Szipőcs Róbert, tudományos főmunkatárs

Nemlineáris mikroszkópiai technikák alkalmazása bőrtumorok és örökletes bőrgyógyászati kórképek vizsgálatára

Doktori értekezés

Dr. Kiss Norbert Ferenc

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Wikonkál Norbert, DSc, egyetemi tanár

Konzulens: Dr. Szipőcs Róbert, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Gáspár Krisztián PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Schay Gusztáv, PhD, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Prof. Dr. Somogyi Anikó, DSc, egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Prof. Dr. Szalai Zsuzsanna, PhD, egyetemi tanár

Dr. Krenács Tibor, DSc, tudományos főmunkatárs

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
1.1 Képképző módszerek a bőrgyógyászatban.....	8
1.1.1 Dermatoszkópia.....	8
1.1.2 Magas frekvenciájú ultrahang.....	9
1.1.3 Optikai koherencia tomográfia.....	10
1.1.4 Terahertzes képképzés.....	11
1.1.5 Fotoakusztikus képképzés.....	12
1.1.6 Konfokális mikroszkópia.....	13
1.1.7 Nemlineáris optikai mikroszkópia.....	15
1.1.7.1 Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia.....	16
1.1.7.2 Másodharmonikus keltés.....	18
1.1.7.3 Harmadharmonikus keltés.....	20
1.1.7.4 Koherens anti-Stokes Raman szórás.....	21
1.1.7.6 Multimodális nemlineáris mikroszkópia.....	22
1.2 A bazálszövetes karcinóma.....	25
1.2.1 Epidemiológia.....	25
1.2.2 Etiológia.....	25
1.2.3 Klinikai típusok.....	26
1.2.4 Diagnózis.....	27
1.2.5 Terápia.....	29
1.3 Ehlers-Danlos szindróma.....	32
2. Célkitűzések.....	41
2.1. I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képképzés során BCC azonosítására.....	41
2.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával.....	41
2.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére.....	42
3. Módszerek.....	43
3.1 Vizsgált bőrminták és előkészítésük.....	43
3.1.1 I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képképzés során BCC azonosítására.....	43
3.1.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával.....	43
3.1.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére.....	44
3.2 Ex vivo nemlineáris mikroszkópia elrendezés.....	48
3.2.1 I. és III. kísérlet.....	48
3.2.2 II. kísérlet.....	48
3.3 Képfeldolgozás és képanalízis módszerek.....	53
3.3.1 I. Kísérlet.....	53
3.3.2 II. Kísérlet.....	55
3.3.3 III. Kísérlet.....	56

4.	Eredmények.....	57
4.1	I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képalkotás során BCC azonosítására.....	57
4.2	II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával.....	61
5.	Megbeszélés.....	71
6.	Következtetések.....	80
6.1	I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képalkotás során BCC azonosítására.....	80
6.2	II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával.....	81
6.3	III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére.....	81
7.	Összefoglalás.....	83
8.	Summary.....	84
9.	Irodalomjegyzék.....	85
10.	Saját publikációk jegyzéke.....	104
11.	Köszönetnyilvánítás.....	108

Rövidítések jegyzéke

μm	mikrométer
AD	autoszomális domináns
aEDS	arthrocalasia Ehlers–Danlos szindróma
ALA	aminolevulinic acid (aminolevulinsav)
AR	autoszomális recesszív
BCC	basal cell carcinoma (bazálsejtes karcinóma, basalioma)
BCS	brittle cornea syndrome (törékeny cornea szindróma)
CARS	coherent anti-Stokes Raman scattering (koherens anti-Stokes Raman szórás)
CBP	collagen bundle packing (kollagén rost tömötség)
cEDS	klasszikus Ehlers–Danlos szindróma
clED	klasszikus-szerű Ehlers–Danlos szindróma
COI	collagen orientation index (kollagén orientációs index)
CPD	ciklobután pirimidin dimer
CT	curvelet transzformáció
cvEDS	kardioalvuláris Ehlers–Danlos szindróma
dEDS	dermatosparaxis Ehlers–Danlos szindróma
DVRF	duális vibrációs rezonancia frekvencia
EDS	Ehlers–Danlos szindróma
EMA	European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)
FCM	fluoreszcens konfokális mikroszkópia
FDA	Food and Drug Administration (Amerikai Egyesült Államok Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala)
FFT	fast Fourier transformation (gyors Fourier transzformáció)
FIRE	fiber extraction (rostkivonás)
FLIM	fluorescence-lifetime imaging microscopy (fluoreszcencia élettartam képképzés mikroszkópiával)
fs	femtosekundum
FWHM	full width at half maximum (félértékszélesség)
H&E	hematoxilin-eozin

HD-OCT	high definition optical coherence tomography (magas felbontású optikai koherencia tomográfia)
hEDS	hipermobilis Ehlers–Danlos szindróma
HFUS	high frequency ultrasound (magas frekvenciájú ultrahang)
HSD	hypermobility spectrum disorder (hipermobilitás spektrum zavar)
IF-CARS	interferometric coherent anti-Stokes Raman scattering (interferometrikus koherens anti-Stokes Raman szórás)
IL-12	interleukin 12
IOD	integrált optikai denzitás
kEDS	kifoszkoliotikus Ehlers–Danlos szindróma
mcEDS	muszkulokontraktúrás Ehlers–Danlos szindróma
mEDS	miopátiás Ehlers–Danlos szindróma
MMS	Mohs micrographic surgery (Mohs-féle mikroszkóposan ellenőrzött sebészetet)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide hydride (nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrid)
NBCCS	nevoid basal cell carcinoma syndrome (naevoid bazálselijtes karcinóma szindróma, Gorlin-Goltz szindróma)
NGS	next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)
OCT	optical coherence tomography (optikai koherencia tomográfia)
PBS	phosphate buffered saline (foszfát pufferes sóoldat)
PDT	photodynamic therapy (fotodinámiás terápia)
pEDS	periodontális Ehlers–Danlos szindróma
PTCH1	patched 1
RCM	reflektancia konfokális mikroszkópia
SCC	squamous cell cancer (spinocelluláris karcinóma, spinalioma)
sdEDS	spondilodiszpláziás Ehlers–Danlos szindróma
SHG	second harmonic generation (másodharmonikus keltés)
SHH	sonic hedgehog
Smo	Smoothened
THG	third harmonic generation (harmadharmonikus keltés)
THz	terahertz

Ti:S	titán-zafír
TPF	two-photon absorption fluorescence (kétfoton-abszorpciós fluoreszcencia)
vEDS	vaszkuláris Ehlers–Danlos szindróma

1. Bevezetés

A különböző modern képalkotó technikák az orvostudomány számos területén jelentős fejlődést hoztak és beépültek a mindennapi klinikai gyakorlatba. Ezek a technikák forradalmasították az orvosi diagnosztikát, a terápiás hatás követéséhez és klinikai kutatások végzéséhez egyaránt nélkülözhetetlenné váltak. Az új képalkotó technikák kifejlesztésétől azok klinikai alkalmazásáig általában igen rögzös út vezet, melynek a klinikai vizsgálatok lefolytatása csak az egyik részét képezi. A módszerek biztonságos klinikai alkalmazhatóságának bizonyítása is igen szigorúan szabályozott és számos vizsgálatot igényel (1). A különböző új képalkotó technikák klinikai alkalmazásának megvalósítása általában igen szoros együttműködést igényel kutatók, mérnökök és klinikusok között. Optimális esetben ez a közös munka már az eszközök kifejlesztésétől kezdve létrejön annak érdekében, hogy ezek valós és jelentős klinikai problémákra adjanak megoldást (2). Az új diagnosztikai eszközöknek nem elég, hogy hatékonyak kell lenniük, az is fontos, hogy jól beilleszthetők legyenek a mindennapi klinikai gyakorlatba. Az új technikák előnyeinek meggyőzőknek kell lenniük a klinikusok számára, akik alapvetően általában bizalmatlanok az olyan új módszerekkel szemben, melyek hátterét és alkalmazását nem ismerik. Mindemellert arra is szükség van, hogy az új képalkotó eszközök általában igen magas költségét az egészségügyi rendszerek és intézmények finanszírozzák. Ehhez szükséges, hogy egészség-gazdaságtani szempontból is jelentős előnnyel járjon az új eszköz beszerzése és üzemeltetése (1).

A bőr vizsgálatára számos különféle képalkotó eszköz alkalmazható, ezek többsége azonban még széles körben nem terjedt el a klinikumban. A bőrgyógyászat kifejezetten vizuális jellegű orvosi szakterület, ahol a különböző morfológiai eltéréseknek nagy jelentősége van az egyes kórképek elkülönítésében. Emellett a bőr a leginkább hozzáférhető szervünk, így nem meglepő, hogy vizsgálatára számos speciális, csak bőrgyógyászatban alkalmazható technikát fejlesztettek ki. Több olyan ígéretes módszer is van, amelyek csak az utóbbi időben váltak elérhetővé. Számos kutatás foglalkozik azzal, hogy miként lehetne alkalmazni ezeket a bőrgyógyászat területén. Ezek az eszközök jelentős előnnyel járhatnak a bőrgyógyászati diagnosztikában és számos különböző bőrgyógyászati betegség esetén lehetnek alkalmazhatók. Mivel egyes technikák igen magas szöveti felbontásra és funkcionális képalkotásra képesek, ezekkel

a jövőben akár kiváltható lehet a bőrbopszia végzése, mely jelenleg számos betegség esetén a diagnózis arany standardja (3).

Nincs olyan képalkotó technika, amely minden bőrbetegség vizsgálatára alkalmas lenne. Ugyanakkor a jövőben az egyes képalkotó módszereket egymással kombinálni lehet, és az ún. multimodális képalkotás számos nehezen diagnosztizálható kórképben is sikerrel alkalmazhatóvá válhat (2). Ezekkel a módszerekkel a hatékonyabb diagnosztika mellett elkerülhető lenne a különféle jóindulatú bőrelváltozások felesleges kimetszése is. Ezáltal megkímélhetnénk a betegeket a beavatkozástól és csökkenne az egészségügyi ellátórendszerter erőterhelés is (3).

1.1 Képalkotó módszerek a bőrgyógyászatban

1.1.1 Dermatoszkópia

Johan Christophorus Kolhaus volt az első, aki a bőrfelszínt mikroszkóppal vizsgálta 1663-ban (4). A dermatoszkópia korszerű alkalmazását az 1950-es években Leon Goldman amerikai bőrgyógyász vezette be, akit a dermatoszkópia atyjának is tekintenek. A dermatoszkópok epilumineszcens kézi mikroszkópok, melyekkel általában tízszeres nagyítás érhető el (5, 6). Az utóbbi évtizedekben a dermatoszkóp nélkülözhetetlen eszközzé vált a bőrgyógyászatban, úgyszólván a dermatoszkóp a bőrgyógyász „fonendoszkópja” (7). A bőrdaganatok mellett a dermatoszkóp alkalmazható számos különböző eredetű bőrelváltozás vizsgálatára, továbbá a haj és a köröm is vizsgálható ezzel az eszközzel. Ugyanakkor számos bőrbetegség esetén dermatoszkóppal csak nem specifikus jellegzetességek azonosíthatók, amelyek csak a klinikai képpel és az anamnesztikus adatokkal összevetve segítenek a helyes diagnózis felállításában (8).

A dermatoszkóppal észlelhető struktúrák megnevezésére számtalan különböző fogalmat írtak le, melyek között több kétértelmű vagy redundáns kifejezés is szerepel. Az utóbbi években jelentős erőfeszítések történtek annak érdekében, hogy ezt a dermatoszkópos nevezéktant egységesítsék. Megjegyzendő, hogy a nemzetközi irodalomban még a módszer nevével kapcsolatban sincs egyetértés, a dermatoszkópia a hagyományos, míg a dermoszkópia a rövidebb és népszerűbb elnevezés (9).

Dermatoszkópia során polarizált és nem-polarizált fény is használható, egyes eszközökben mindkettő rendelkezésre áll. A hagyományos nem-polarizált kontakt dermatoszkópiával egyes felületes struktúrák, mint a comedo-szerű nyílások jobban megítélhetők. Ugyanakkor a polarizált dermatoszkópiával az érstruktúrák értékelhetők ki jobban (8).

Videodermatoszkópia alkalmazásával nagyobb nagyítás érhető el amellet, hogy a korábban felvett képek előhívhatóak. Az irodalomban leírtak egyes olyan dermatoszkópos struktúrákat, amelyek csak ötvenszeres nagyításnál azonosíthatók. A módszer további előnye, hogy az egyes elváltozások a dermatoszkópos felvételek készítésével időben követhetőek (10). A dermatoszkópia oktatása szempontjából is kedvező a videodermatoszkópia használata, mert a vizsgálat során az oktatók be tudják mutatni az egyes képleteket és így könnyebbé válik a módszer elsajátítása (11). Ez azért is különösen fontos, mert az ismeretek hiánya a leggyakoribb oka annak, hogy egy bőrgyógyász nem használ dermatoszkópiát. A videodermatoszkópia hátránya, hogy ugyan egyes rendszerek a hagyományos dermatoszkópokhoz hasonló árban is elérhetőek, általában ezeknél lényegesen költségesebbek (10).

Elmondható, hogy a dermatoszkópia egy költséghatékony nem-invazív diagnosztikai módszer, amely 5-30%-al növeli a diagnosztikus pontosságot pigmentált bőrléziók vizsgálatakor (12). Az arcon található bőrelváltozások vizsgálata azonban jelentős nehézséget okozhat, mivel eltérő eredetű elváltozások (melanoma in situ, aktinikus keratózis, lentigo solaris) némely esetben hasonló dermatoszkópos jellegzetességeket mutathatnak (13).

1.1.2 Magas frekvenciájú ultrahang

Az ultrahang technika alapjait Jacques és Pierre Curie fektette le 1881-ben, amikor felfedezték egyes kristályok piezoelektromos tulajdonságát. Az ultrahang készülék vizsgálófejében található „transzducer”-ben (átalakítóban) lévő piezoelektromos kristályok elektromos feszültség hatására hanghullámokat keltenek. A vizsgálat során a hanghullámok visszaverődnek a különböző szövetekben és a transzducerrel detektálhatók, amely ezeket elektromos jellé alakítja. Az egyes szövetek eltérő reflexiós tulajdonságai alapján állítható elő a monitoron megjeleníthető ultrahang kép, melyen

minden képpont eltérő intenzitás értéket mutat a visszavert „echo” (visszhang) amplitúdója szerint. A magas intenzitású képet adó struktúrákat hyperechogénnek, az alacsony intenzitást adókat pedig hypoechogénnek nevezzük (14).

A magas frekvenciájú ultrahangot (high frequency ultrasound, HFUS) a bőr vizsgálatára elsőként 1979-ben Alexander és Miller alkalmazta, akik 15 MHz frekvenciával végeztek képképzést. Vizsgálatuk során a bőr vastagságát mérték ún. „A” módú megjelenítéssel, ahol egy vonalban történik a vizsgálat (15). Az 1980-as évektől kezdve egyre kiterjedtebben használták a HFUS-t a bőrgyógyászatban, ekkor már ún. „B” módban, mely kétdimenziós képet generál és alkalmas a bőr szerkezetének áttekintésére. A HFUS képen az epidermisz hypoechogén vonalként jelenik meg, a dermisz kollagéntartalmának köszönhetően hyperechogén, míg a bőralatti zsírszövet ismét hypoechogén (14).

A HFUS-al elérhető felbontása azonban alacsony, ráadásul a felbontás növelésével az elérhető behatolási mélység jelentősen csökken (16). A széleskörben használt 20 MHz frekvenciájú HFUS behatolási mélysége 6–7 mm (17). Ennél alacsonyabb, 7 MHz körüli frekvencia alkalmazása esetén jól vizsgálható a bőralatti szövet és a mélyebb struktúrák is, mint az izmok, az ínák és a nyirokcsomók. 50-100 MHz frekvencia között csak limitált penetráció érhető el, mely kizárólag az epidermisz vizsgálatát teszi lehetővé (14). 100 MHz frekvencia esetén kísérleti elrendezésben működőképes HFUS rendszerekben akár 10 µm-es axiális (sugárirányú) és 84 µm-es laterális felbontás érhető el (18).

A HFUS volt az első olyan képképző modalitás, amely lehetővé tette különböző bőrdaganatok mélységi kiterjedésének vizsgálatát (16). Ugyanakkor a HFUS a tumor típusának meghatározásához általában nem nyújt segítséget. Emellett, mivel a bőrtumorok többnyire hypoechogének, ezért a bőralatti szövet infiltrációja sokszor kevésbé megítélhető. A bőr megvastagodásával járó betegségek, mint a scleroderma hatékonyan monitorozhatók HFUS-el (18). A HFUS Doppler vizsgálattal is kombinálható, mely bőrtumorok és gyulladással járó bőrbetegségek esetén egyaránt jelentős előnnyel járhat (14).

1.1.3 Optikai koherencia tomográfia

Az optikai koherencia tomográfia (optical coherence tomography, OCT) orvosi alkalmazását először 1986-ban a szemészetben írták le a szem hosszának és pulzációjának

mérésére. Az OCT képalkotás optikai alapja az alacsony koherenciájú interferometria, mellyel a szövetekből visszavert infravörös fény detektálható az optikai úthossz mérésével. A hagyományos szövettani vizsgálatához hasonló vertikális, valamint horizontális síkban egyaránt végezhető OCT vizsgálat. Az OCT képalkotással akár 7,5 μm laterális és 5 μm axiális felbontás érhető el. A módszer maximális behatolási mélysége kb. 2 mm (19).

Az OCT az új diagnosztikai technikák terén egy kifejezett sikertörténetnek tekinthető, amelynek háttérében több tényező áll. Egyrészt a viszonylag kis méretű és relatív kedvező árfekvésű OCT eszközöket már a telekommunikációs ipar számára korábban kifejlesztették. Másrészt az OCT számos hasonlóságot mutat az ultrahang alapú diagnosztikai eszközökkel, melyek széles körben elérhetők. Így a klinikusok az OCT-től kevésbé idegenkednek és miután elsajátítják a használatát általában könnyen alkalmazhatónak találják (1). Az OCT használható bőrtumorok, gyulladással járó bőrbetegségek és parazita fertőzések vizsgálatára egyaránt. A technikával a köröm eltérései is hatékonyan vizsgálhatók (20).

Az utóbbi években magas felbontású OCT (high-definition OCT, HD-OCT) készülék is elérhetővé vált kereskedelmi forgalomban. HD-OCT alkalmazásával 3 μm -es laterális és axiális felbontás érhető el. A HD-OCT hátránya, hogy alkalmazásakor csak kb. 750 μm penetrációs mélység érhető el, mely a hagyományos OCT 2 mm-es behatolási mélységénél jelentősen kisebb. Egy újabb technikai fejlesztés a dinamikus OCT, mely a bőr mikroerezettségének és a véráramlásnak a megjelenítésére alkalmas. Mivel az angiogenezis a tumorok növekedése szempontjából is kulcsfontosságú, ez a funkció a bőrtumorok vizsgálatokor is alkalmazható (19).

1.1.4 Terahertzes képalkotás

A terahertzes (THz) sugárzás az elektromágneses sugárzások infravörös és rádióhullámok közé eső tartományába tartozó sugárzás. Frekvencia tartománya 0,1-10 THz (1 THz = 10^{12} Hz), míg hullámhossz tartománya 3 mm és 30 μm közötti (21). A THz impulzusok előállításához és detektálásához 10 - 200 femtoszekundumos (fs) lézertimpulzusok szükségesek (22). A THz sugárzás fotonjainak energiája alacsony, így nem-ionizáló sugárzás, hőhatást csak kis mértékben vált ki (21).

A THz képalkotást jelenleg főként repülőgépek szerkezeti hibáinak felderítésére és robbanászerkek azonosítására használják (22). Emellett több biztonságtechnikai vizsgálat igazolta, hogy a THz *in-vivo* képalkotásra biztonságosan alkalmazható (22).

A víz abszorpciós spektruma egy magas és széles csúcsot mutat a THz tartományban magas dielektromos állandójának köszönhetően (23). Ez a THz képalkotást rendkívül érzékennyé teszi az élő szövetek vízkoncentrációjának meghatározására (24). A generált kép felbontását a THz hullámhossz tartománya nagymértékben korlátozza. Emellett élő szövetekben a magas víztartalom miatt csak néhány száz mikron behatolási mélység érhető el vele (22). A THz képalkotás alkalmas a bőr nem-kontakt módon történő 3D képalkotására (25). Számos közlés foglalkozik a THz képalkotás alkalmazhatóságával különböző daganatok, mint emlőrák, méhnyakrák, vastagbélrák, valamint bőrtumorok esetében (22).

1.1.5 Fotoakusztikus képalkotás

A fotoakusztikus hatást Alexander Graham Bell írta le először 1880-ban. Bell kísérletes úton bizonyította, hogy megvilágítás mellett, ha a fény elnyelődik egy anyagban és az tágulni kezd, hallható tartományba eső vibrációs hullámokat kelthet (26). Azt is kimutatta, hogy ha a fehér fényt egy prizmával szétválasztjuk, az egyes színek kombinációk adott anyagban elnyelődve hangosabb hangot generáltak. A napjainkban alkalmazott fotoakusztikus képalkotás azonos elven alapszik, a hatást kiváltó fény hullámhosszát változtatjuk aszerint, hogy az adott anyag abszorpciós spektrumához igazodva a fotoakusztikus válasz amplitúdója magasabb legyen. Összefoglalva, a fotoakusztikus képalkotás során az anyagok fényt nyelnek el, melyet hővé alakítanak nem-radiatív relaxáció révén. A hő hatására az anyagok tágulnak termoelasztikus tulajdonságaik szerint, mely nyomáshullámokat kelt, melyek a vizsgált közeg felszínén ultrahang „transzducer” (átalakító, pl. mikrofon) révén detektálhatók (27, 28). A korszerű fotoakusztikus képalkotó rendszerekben nanoszekundumos impulzusüzemű lézereket alkalmaznak (28).

A fotoakusztikus effektus modern felhasználása az orvosi képalkotás. Alkalmazási lehetőségeit biológiai képalkotásra az 1990-es évek közepétől vizsgálják, a 2000-es évek közepétől pedig kiterjedt *in vivo* vizsgálatok is történtek (26). Az ultrahanghoz képest a

fotoakusztikus képalkotás magasabb szintű funkcionális és molekuláris vizsgálatokra alkalmas, mint a vér oxigénszaturációjának meghatározása. Emellett a szövetek jellemző természetes kromofórijai, mint a hemoglobin, különböző lipidek és a melanin is vizsgálhatók. Fotoakusztikus képalkotás során nano-méretű kontrasztanyagok is alkalmazhatók, melyek révén kivitelezhető a valódi molekuláris *in vivo* képalkotás (27). A multimodális rendszerek kombinálják a fotoakusztikus és az ultrahang képalkotást (26).

Az *in vivo* fotoakusztikus képalkotás alkalmazhatóságát daganatos betegségek, az agy és a kardiovaszkuláris rendszer képalkotására is vizsgálták (27, 28). Számos *in vivo* vizsgálat történt melanoma esetében is, melyhez kézi fotoakusztikus képalkotó rendszert is kifejlesztettek (29-31).

A fotoakusztikus képalkotás térbeli felbontása az UH-hoz hasonló (26). Ennek növelése különböző optikai UH detektáló módszerekkel kutatások tárgyát képezi (32). A képalkotás mélysége azonban elmarad az UH-tól, mivel a vizsgált anyagok erős abszorpciót mutatnak. Így míg UH vizsgálat akár 10 cm mélységben is történhet a lágyszövetekben, néhány cm-nél mélyebben a fotoakusztikus képalkotás nem használható (26). A technika további korlátja az időbeli felbontása, amely abból adódik, hogy a magas laterális felbontás eléréséhez keskeny lézersugárra van szükség. Így 3D szkennelést kell végezni, melyhez néhány perc időtartamra van szükség (27). Jelenleg preklinikai vizsgálatok céljára elérhető fotoakusztikus képalkotó rendszerek vannak kereskedelmi forgalomban, azonban a közeljövőben várható a technika megjelenése a klinikumban is (28).

1.1.6 Konfokális mikroszkópia

Az első konfokális mikroszkópot Marvin Minsky fejlesztette ki a Harvard Egyetemen 1955-ben (33). A konfokális mikroszkópok az 1980-as évek elején váltak elérhetővé kereskedelmi forgalomban, innentől fogva a technikát kiterjedten alkalmazzák különböző biológiai kutatások során (34).

A reflektancia konfokális mikroszkópia (RCM) képalkotás során a fókuszált majd rekollimált gerjesztő lézertény egy kis átmérőjű blendén halad keresztül, ami azt biztosítja, hogy a lézer fénye csak egy pontba fókuszálódjon, vagyis a blende

magasfrekvenciájú térszűrést valósít meg. A mikroszkóp objektív által fókuszált, térszűrt, rekollimált nyaláb fókuszált foltmérete közel akkora, mint a fény hullámhossza, kb. 0,5 μm (35). A detektálás során a visszaszórt fényt ugyanaz az objektív gyűjti össze, ami a lézernyalábot fókuszálta. A visszaszórt fény egy megfelelően kis méretű, megfelelően elhelyezett tülyukon keresztül jut egy nagy érzékenyséű detektorba. A RCM során a minta leképezése pontról pontra történik, a kapott jelet a detektorhoz kötött számítógép dolgozza fel, mely az egyes pontokhoz pixeleket rendel és összeállítja a képet. A kifejezetten bőrgyógyászati *in vivo* vizsgálatok céljára kifejlesztett RCM készülékben (VivaScope®) egy közeli-infravörös tartományba eső, 830 nm hullámhosszú, 15 mW-nál alacsonyabb teljesítményű lézerfényel történik a megvilágítás (36). A lézer a bőrben lévő természetes fluorofórokat nem gerjeszti, ezért a felvehető képek csak szürkeárnyalatosak, horizontális dimenziójúak, azaz a bőr felszínével párhuzamosak (37). Az RCM az epidermisz és a papilláris dermisz képalkotását teszi lehetővé, 100-200 μm mélységben. A technikával igen magas, 0,5–1,0 μm laterális felbontás és 2–5 μm vastagságú optikai szeletelés érhető el. A képek kis méretű, általában 0,5x 0,5 mm² nagyságú látóterenként vehetők fel, majd mozaik képekké összeilleszthetők, hogy nagyobb, akár 8 x 8 mm² nagyságú bőrterület váljon áttekinthetővé (38). A kontrasztot az adja, hogy a különböző sejtstruktúrák szórási és abszorpciós jellemzői eltérnek. A bőrben erős RCM jelet és kontrasztot ad a melanin, a keratin, valamint a kollagén (39). A véráramlás és az immunsejtek egyaránt jól elkülöníthetők RCM képalkotás során (35). A RCM alkalmas a bőr különböző szövettani elváltozásainak, mint hiperkeratózis, parakeratózis, akantózis, papillomák, spongiózis, pustulák, vakuoláris degeneráció, hiperpigmentáció és érelváltozások megjelenítésére. Jelentős hiperkeratózis esetén azonban a limitált penetrációs mélység miatt a bőr szerkezete RCM-mel nem vizsgálható, és sok esetben az érstruktúrák nem jeleníthetők meg, mivel túl mélyen fekszenek (40). Jelenleg kereskedelmi forgalomban több RCM eszköz is elérhető. Az RCM-hez a bőrrel közvetlen kontaktus szükséges, az arcon és más nehezen hozzáférhető testtájakon, ahol konkáv és konvex testfelszínek váltakoznak. Ezeknek a testtájaknak az RCM vizsgálatához kisebb méretű vizsgálófej is elérhető (13).

A konfokális mikroszkópia másik módszere a fluoreszcens konfokális mikroszkópia (FCM), mely során különféle fluoróforokkal, leggyakrabban akridin narancssal festik meg a szöveteket. Ezt a technikát frissen kimetszett szövetminták *ex vivo*, vagy

orvosbiológiai kutatások során különböző minták *in vitro* vizsgálatára lehet alkalmazni (39). A képalkotás hasonló módon történik, mint RCM esetében, viszont a lézer hullámhossza a gerjeszteni kívánt fluorofórnak megfelelően van beállítva, és a detektorba egy ún. dikroikus tükrön át csak a fluoreszcens fény jut, a gerjesztő lézer fénye nem. Egyszerre több különféle fluorofór is vizsgálható a gerjesztő fény hullámhosszának és az ún. emissziós szűrők színének megfelelő változtatásával. Fluorofórok alkalmazásával elkülöníthetők a sejtek különböző részei, mint a citoplazma, a sejtmag és a mitokondriumok (35).

Az RCM 2017. január 1-től az Amerikai Egyesült Államokban a Centers for Medicare and Medicaid Services (CMS) által finanszírozott vizsgálatok közé került, így az amerikai bőrgyógyászok kiszámlázhatják a biztosítótársaságok felé a vizsgálat költségét. A vizsgálat elszámolásához megkövetelik a mozaik RCM képek készítését több mélységben, valamint azok kiértékelését (38). Az RCM alkalmazhatóságát korlátozza, hogy a technikával 200 μm -nál mélyebben nem végezhető képalkotás, és a dermatoszkóphoz képest a mikroszkóp költsége igen magas (35). Emellett az RCM képalkotás hátránya, hogy jelentős időt vesz igénybe, és a felvett képek kiértékelése speciális szakmai jártasságot igényel. Az RCM képeket a klinikai képpel és a dermatoszkópos képpel együtt érdemes értékelni, különben a téves diagnózis esélye nagyobb (13).

1.1.7 Nemlineáris optikai mikroszkópia

Az elmúlt évtizedekben a nemlineáris optika jelentős fejlődésen ment keresztül, ami új, nem-invazív, igen magas szöveti felbontással bíró képalkotó technikák kialakulásához vezetett. A nemlineáris optika az optika egy speciális területe, ami olyan közegben vizsgálja a fény viselkedését, ahol a polarizáció (P) nemlineáris függést mutat a fény elektromos téreréjétől (E) (41).

A hagyományos optikai mikroszkópiás technikák, mint pl. „bright field”, „dark field” (sötét teres), fáziskontraszt, fluoreszcencia vagy konfokális mikroszkópia fény és anyag közötti kölcsönhatások révén generálnak jelet, mely kölcsönhatásokban egy-egy különálló foton vesz részt (szóródik, elnyelődik, emittálódik). Ezek (az esetleg kombinált) technikák legfeljebb 100-200 μm mélységű képalkotásra képesek a

szövetekben, mert tipikusan látható fényt használnak, ami jelentős szórással és abszorpcióval jár a szövetekben (38). A nemlineáris mikroszkópia ezektől a technikáktól alapjaiban különbözik, mivel magasabb rendű fény-anyag kölcsönhatásokon alapszik, melyekben egyszerre több (de kisebb energiájú, hosszabb hullámhosszú, tipikusan infravörös (IR)) foton vesz részt a kontraszt előállításában (42).

A nemlineáris optikai folyamatok szokványos, mikroszkópos megvilágításhoz használt fényintenzitások mellett rendkívül alacsony, nullához közeli valószínűséggel jönnek létre. Előállításukhoz az szükséges, hogy a gerjesztő fény térben és időben koncentrálni legyen. Ez a magas térbeli fény denzitás egy ultrarövid impulzusú (ps-os vagy fs-os) lézernyalábjának fókuszálásán keresztül állítható elő, magas numerikus apertúrájú (NA) objektívet alkalmazva. A magas numerikus apertúrájú objektív a lézert fényt egy közel diffrakció limitált, $\sim 1 \mu\text{m}^3$ méretű térfogatra fókuszálja, amelyben rendkívül magas fotonsűrűség jöhet létre (42). Az időben való koncentrációhoz ultrarövid impulzusüzemű lézerekre van szükség, amelyek esetében a lézerek működésének alapja is lehet nemlineáris jelenség (ld. pl.: Kerr-lencsés módusszinkronizálás, vagy telítődő abszorbens tükrök (SAM)) (43).

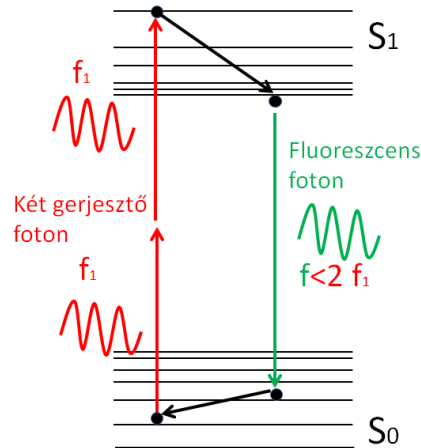
A nemlineáris optikai mikroszkópiai modalitások feloszthatók aszerint, hogy a kívánt jel előállításához hány lézernyalábra van szükség. Egy lézernyalábot igényel a kétfoton-abszorpciós fluoreszcencia (two-photon absorption fluorescence, TPF), a másodharmonikus keltés (second-harmonic generation, SHG), és a harmadharmonikus keltés (third-harmonic generation, THG). Két lézernyalábra van szükség a koherens anti-Stokes Raman szórás (Coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) és a stimulált Raman szórás (stimulated Raman scattering, SRS) modalitásokhoz (44).

A különböző nemlineáris technikákon alapuló módszerek képesek bőrről készült háromdimenziós optikai metszetek előállítására magas térbeli és időbeli felbontás mellett. Emellett a nemlineáris mikroszkópia képes a bőr jelölésmentes vizsgálatára *in vivo* körülmények között. A számos létező nemlineáris optikai módszerrel különböző szöveti alkotók szelektív megjelenítésére nyílik lehetőség (44).

1.1.7.1 Kétfoton abszorpciós fluoreszcencia

A TPF az élő szervezetekről történő képalkotásban leggyakrabban használt nemlineáris optikai módszer. TPF jel akkor jön létre, amikor egy molekula két foton szimultán (~ 0.5

fs-en belüli) elnyelésével kerül gerjesztett állapotba (1. ábra). Ezeknek a fotonoknak az energiája a molekula gerjesztéséhez szükséges energiának a (legalább) fele. Ezt követően a molekula egy olyan fotont emittál, melynek energiája kisebb, mint az elnyelt fotonok energiájának az összege (42).



1. ábra. Az energiaszintek változásának sematikus ábrája kétfoton abszorpciós fluoreszcencia esetén.

Elsőként Maria Göppert-Mayer írta le 1931-ben a TPF elméleti alapjait, de ekkor a TPF előállításához szükséges lézerek még nem álltak rendelkezésre (42). A TPF jelenség kísérletes bizonyítását Kaiser és Garrett 30 évvel később, 1961-ben publikálta (34). TPF mikroszkópia alkalmazását elsőként 1990-ban Denk és mtsai. közölték a Science folyóiratban (45).

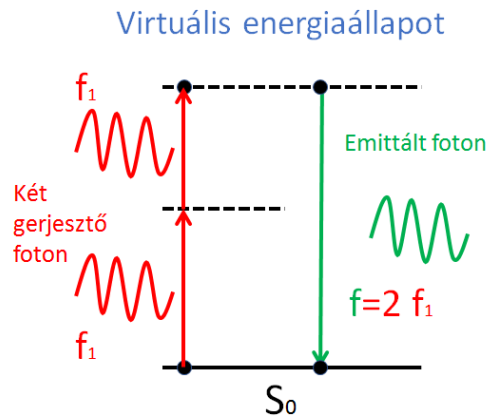
A TPF szélesebb körű gyakorlati alkalmazása 1992-től vált lehetővé, amikor először alkalmaztak ún. módusszinkronizált titánium-zafír (Ti:S) kristály lézereket a TPF előállításához. A módusszinkronizált kifejezés arra utal, hogy a lézer fényimpulzusait periodikusan, egyenlő időközönként adja, ahol a lézerrezonátorban fénysebességgel körbeszaladó lézerimpulzus egyes frekvenciakomponensei közel megegyező, a frekvencia függvényében lassan változó fázissal rendelkeznek (46). A TPF előállításához használt lézerek általában 100 fs hosszúságú impulzusokat generálnak, frekvenciájuk 100 MHz körüli (43). Az első kereskedelmi forgalomban elérhető kétfoton mikroszkópot a BioRad Microscience (Hemel Hampstead, Egyesült Királyság) vezette be a piacra 1996-ban (47).

A hagyományos (egyfotonos) fluoreszcencia mikroszkópiához képest a TPF háromdimenziós képalkotást és pontosabban fókuszált gerjesztést tesz lehetővé. Míg konfokális mikroszkópia esetében a teljes fókuszált fénykúp gerjesztődik, TPF esetén a fókuszponton kívül nem történik gerjesztés, így a fotokárosodás mértéke nagyságrendekkel alacsonyabb és így sokkal biztonságosabb a képalkotás. Emellett a módszer fototoxicitását az is csökkenti, hogy a TPF során használt hullámhossz tartományban kevés jelentős egyfoton-elnyelő molekula van a szövetekben (43).

A közeli infravörös tartományba eső fény használatával a TPF az élő szövetekben a konfokális mikroszkópiához képest jelentősen mélyebb behatolásra képes, az agy neocortexe esetében ez 1 mm mélység is lehet (48, 43). A bőr vizsgálata TPF módszerrel kézenfekvő lehetőség, mivel a bőr különböző rétegei számos TPF-el gerjeszthető endogén kromofórt tartalmaznak, többek között nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidridet (nicotinamide adenine dinucleotide hydride, NADH) elasztint, melanint és keratint (49). Ezeknek a kromofóroknak a többsége 720 és 760 nm közötti lézer hullámhosszal gerjeszthető. A hullámhossz hangolásával ebben a tartományban növelhető a különböző kromofórokból kapott TPF jel intenzitása (50). A megfelelő kromofórok kiválasztásával számos különböző bőrbetegség tanulmányozható. Különböző hullámhosszúságú lézersugár használatával TPF képalkotás során fluoreszcens festékek és jelölt proteinek is detektálhatók a bőrben, amelyek a bőrgyógyászati kutatások során sok lehetőséget rejtenek (51).

1.1.7.2 Másodharmonikus keltés

Az SHG egy olyan nemlineáris optikai folyamat, ami akkor jön létre, amikor két gerjesztő foton egy nagyfokú térbeli rendezettséget mutató nem centroszimmetrikus molekulával lép kölcsönhatásba (43). Ezt követően egy olyan foton jön létre, melynek energiája a két gerjesztő foton energiájának összege és így fele akkora a hullámhossza (2. ábra) (44).



2 ábra. Az energiaszintek változásának sematikus ábrája másodharmonikus keltés esetén.

Az SHG-t először 1961-ben Franken és mtsai. írták le a Michigani Egyetemről, nem sokkal az első lézer megépítését követően (52). Az SHG nem centroszimmetrikus struktúrákban jön létre, melyek elsősorban fémekben és kristályokban fordulnak elő (53). Biológiai mintán végzett SHG vizsgálatról 1986-ban jelent meg az első közlés, melyben Freund és mtsai. patkányfarkok inában vizsgálták a kollagén rostok polaritását (54). Ezt követően több élő szervezetekben előforduló molekuláról írták le, hogy ad SHG jelet, ezek között a kollagén, valamint a miozin a legjelentősebbek. Ugyanakkor a szabálytalan szerkezetű molekulák, mint az elasztin nem adnak SHG jelet.

Az SHG-nak több olyan tulajdonsága van, amely ideálissá teszi szöveti képalkotásra. Ezek közé tartozik, hogy az SHG jelet adó endogén molekulák igen nagy kontrasztot adnak, így nincs szükség jelölésre. Emellett, mivel az SHG jel indukált polarizáció révén jön létre és nem történik foton elnyelés, a fluoreszcens módszerekkel összehasonlítva az SHG fototoxicitása igen alacsony (55). Mivel az SHG előállításához szükséges lézer hullámhossz az infravörös spektrális tartományba tartozik, magas felbontás érhető el, és a penetráció mélyebb ($<1000 \mu\text{m}$), mint a látható és az UV tartományba eső fényé ($<50 \mu\text{m}$) [5].

A nagy intenzitású SHG jelet adó kollagén rost (más néven enyvadó rost) a leggyakrabban előforduló fehérje az emberi szervezetben, mely igen nagy mennyiségben található az extracelluláris térben. Az írha kollagén tartalma strukturális és mechanikai stabilitást biztosít a bőrnek (56). Eddig összesen 29 különböző kollagén izoformát azonosítottak és írták le szerkezetüket. A fibrilláris típusú kollagének közé az I., II., III., V., XI., XXIV.,

és XXVII. kollagén típusok tartoznak. A fibrillumokhoz asszociált kollagének a IX., XII. és XIV. típusok, míg a hálózatképző kollagének közé a IV. (lamina basalis), VI., VII. (hemidesmosomák), VIII., X. típusok tartoznak (57). A bőr kötőszövetét főképp az I. és a III. típusú kollagén alkotja. A kollagén rostok fibrillumokból állnak, melyek fontos tulajdonsága a periodikus rendezettség, mely elektronmikroszkóppal észlelhető. A fibrillumokat felépítő tropokollagén molekulák helikális szerkezettel bírnak, két megegyező $\alpha 1$ polipeptid láncból, valamint egy ezekhez képest eltérő kémia szerkezetű $\alpha 2$ láncból állnak. A polipeptid láncok hidroxilált aminosavai közötti hidrogén-kötések révén jön létre a tripla helix (58). A kollagén rostok az itt ismertetett nagy szerkezeti szabályosságuk révén keltik az említett erős SHG jelet. Így az SHG rendkívül érzékeny technika a rendellenes struktúrájú kollagén rostok és a kollagén fragmentáció kimutatására (59, 60). Az SHG képalkotással a bőr öregedése során az irha kollagéntartalmának csökkenése *in vivo* vizsgálható (61). SHG módszer alkalmazásával különböző készítmények, mint helyi szteroidkezelés bőrre gyakorolt mellékhatásai ugyancsak *in vivo* vizsgálhatóvá váltak (62).

1.1.7.3 Harmadharmonikus keltés

A THG keletkezése során három fotonra van szükség egy háromszoros energiájú és harmadakkora hullámhosszú foton létrehozásához (41). A THG az SHG-től eltérően nem kizárólag nem-centroszimmetrikus molekulákban jön létre, ilyen szempontból sokoldalúbb az alkalmazhatósága. A THG strukturális határfelületeken keltődik, ahol a törésmutató nagymértékben változik. Ilyen határfelületet képeznek az interszticiális folyadék és lipidekben gazdag struktúrák, mint a sejtmembrán. Hasonlóan viselkedik a kollagén, az izomrostok, a fogzománc és a csontszövet is, így ezek is adnak THG jelet. Homogén közegben ugyanakkor nem jön létre THG jel.

A THG jel intenzitása nagyban függ a vizsgált struktúra méretétől és a határfelület orientációjától. A legnagyobb jel akkor keletkezik, amikor a határfelület orientációja párhuzamos a gerjesztő lézerrel. Mivel THG keletkezése során az emittált foton energiája megegyezik a három gerjesztő foton energiájának összegével, a jelet kibocsátó molekulák nem nyelnek el energiát, nem melegednek fel. Így reaktív oxigén gyökök sem szabadulnak fel, viszont a THG előállításához szükséges magas lézer teljesítmény

előidézhet egyéb szöveti károsodást. Ez a hatás magasabb lézer hullámhossz (általában 1200 nm, vagy e fölötti hullámhossz) alkalmazása esetén jelentősen mérsékelhető (53).

1.1.7.4 Koherens anti-Stokes Raman szórás

CARS során a pumpa lézer (ω_p) és a Stokes lézer (ω_s) egyszerre gerjeszti a mintát, melynek hatására nemlineáris polarizáció jön létre, és anti-Stokes jel (ω_{as}) keletkezik, melynek frekvenciája $\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$ (44). A CARS a TPF-hez és az SHG-hoz hasonló mikroszkóp és detektor rendszert igényel. Ugyanakkor, a CARS jel előállításához és detektálásához két különböző hullámhosszú lézere van szükség (50). A hangolható pumpa lézer és a Stokes lézer hullámhosszának különbségét ($\omega_p - \omega_s$) a gerjeszteni kívánt kémiai kötés vibrációs frekvenciájának (Ω) megfelelően kell beállítani (50, 53). A lézerek hullámhossz tartománya CARS esetén az infravörös tartományba esik (47). A detektált jelben jelen van a nemrezonáns háttérből származó jel is, amely független a $\omega_p - \omega_s$ frekvenciától. Az SHG-val és a THG-val szemben, amelyek csak strukturális információt adnak, a CARS a TPF-hez hasonlóan molekuláris/kémiai információt is nyújt (44).

1.1.7.5 Pszeudo hematoxilin-eozin kép előállítása CARS módszerrel

A hematoxilin-eozin (H&E) a leggyakrabban használt szövettani festés a különböző, biopsziával vagy sebészeti úton eltávolított szövetminták vizsgálata során. A H&E festést először Busch és mtsai. vezették be 1878-ban, és mint a legelterjedtebb szövettani leletezéshez használt festés már közel másfél évszázada állja az idő próbáját (63).

A hematoxilin az egyik egyetlen ma is széles körben használt természetes festékanyag, mely a borsövényfa (*Haematoxylum campechianum*) éterrel kezelt, tisztított kivonata (63). Az aktív festék nem maga a hematoxilin, hanem az oxidált származéka, a hematein, amelyet timsóban pácolnak. Ez egy pozitívan töltött (kationos), bázikus festék, így azokat a struktúrákat, melyek a hematoxilinhez mutatnak affinitást, bazofilnek nevezik (64). A sejtmag, a durva felszínű endoplazmatikus retikulum, valamint a riboszómák DNS és RNS tartalmuk miatt hematoxilinnel kékeslilára festődő, azaz bazofil sejtkomponensek (65).

Az eozin egy szintetikus festék, melyet fluoreszcein brómozása révén állítanak elő. Mivel ez egy negatívan töltött (anionos), savas kémhatású vegyület, az eozinnal festődő struktúrákat acidofilnek nevezzük (64). Az eozin a sejtplazma bázikus fehérjéihez köt,

valamint különböző intenzitással nonspecifikusan kötődik a legtöbb sejtorganelumhoz és az extracelluláris mátrix komponenseihez, a vörös és a rózsaszín különböző árnyalataira festve ezeket (66).

A lipidek a szövettani metszetek készítése során a festést megelőzően kioldódnak, így nem festődnek (64). Összefoglalva, a H&E festett metszeten a hematoxin festi a sejtmagokat, míg az eozin a citoplazmát és az extracelluláris mátrixot, így lehetővé téve a szöveti morfológia értékelését.

A CARS a különböző szöveti alkotókat, mint a lipideket és fehérjéket eltérő kémiai szerkezetük alapján képes elkülöníteni (53). Ez azon alapszik, hogy a lipidekben a metilencsoportok (-CH₂) nagyobb arányban fordulnak elő, míg a fehérjékben több a metilcsoport (-CH₃). A -CH₂ és -CH₃ csoportok CARS technikával szelektíven gerjeszthetők. A lipidek nagyobb koncentrációban fordulnak elő a sejtplazmában, míg a sejtmag lipidszegény, ezért az utóbbi -CH₂ gerjesztés mellett alacsony jelintenzitást mutat CARS mikroszkópia során. Ugyanakkor a -CH₃ gerjesztéssel megjelenített proteinek a sejtmagban és a citoplazmában is jelen vannak, ezekből kivonva a lipidek -CH₂ jelét a sejtmag kiemelhető. Így CARS technika segítségével előállítható a H&E festéshez hasonló kép, pszeudo H&E „festett” kép. Itt a „lipid” jel adja az eozinnak megfelelő képet, míg a „protein” jel a hematoxinnek megfelelő képet imitálja. Így a sejtmag és a citoplazma jól elkülöníthető, jóllehet a hagyományos H&E festéstől teljesen eltérő elv alapján, mivel itt nem az eltérő savas vagy bázikus kémhatás, hanem a különböző molekuláris rezgésekhez tartozó gerjesztési spektrum adja a kontrasztot. Ilyen pszeudo H&E képeket korábban leginkább idegszövet mintákról állítottak elő, illetve egérben több különböző egészséges szöveten is végeztek ilyen képalkotást. A sejtmag finom struktúrája és a nukleoluszok is megjeleníthetők voltak CARS módszerrel (67).

1.1.7.6 Multimodális nemlineáris mikroszkópia

A különböző nemlineáris optikai módszerek egymással kombinálva is alkalmazhatók, így multimodális képalkotásra nyílik lehetőség, mely során különböző szöveti alkotók egyidejűleg szelektíven megjeleníthetők. TPF és SHG együttes alkalmazásával a különböző kötőszöveti rostok egymáshoz való viszonya elemezhető, melyet az alap kutatásban is felhasználnak (68). A bőrben lévő kollagén és elasztin egyaránt jelölésmentesen gerjeszthető, morfológiájuk együtt vizsgálható, így értékes

információkat kaphatunk a bőr kötőszövetének állapotáról (69). Az epidermális lipidek CARS, a keratin pedig TPF technika segítségével jeleníthetők meg. Utóbbi lehetővé teszi az epidermális barrier integritásának és funkciójának vizsgálatát is (70). A CARS technika a bőr vizsgálata során szubkután zsírszövet megjelenítésére is kiválóan alkalmas (71).

1.1.7.7 Munkacsoportunk korábbi nemlineáris mikroszkópiai kutatásai

Konzorciális (MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont, R&D Ultrafast Lasers Kft., Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika) munkacsoportunk korábbi munkájának eredményeképpen egy új, nemlineáris mikroszkópiai technikákon alapuló, a jelenleg elérhető rendszereknél kisebb és költséghatékonyabb diagnosztikai eszköz prototípust fejlesztett ki. Ez a kézi nemlineáris mikroszkóp rendszer alkalmas lehet *in vivo* klinikai alkalmazásra. A rendszer jelenleg további biztonságtechnikai vizsgálatokra vár, melyekben különböző állatmodellekben tesztelnénk a biztonságos *in vivo* alkalmazhatóságát. Ezt követően tervezzük biztonságtechnikai adatok és a megfelelő engedélyek birtokában az *in vivo* humán vizsgálatokat, melyekhez jelenlegi, a dolgozat későbbi részében tárgyalt *ex vivo* humán méréseink alapot szolgáltatnak (72).

Kutatócsoportunk előkísérleteket végzett a TPF mikroszkópia potenciális biztonságossági problémáinak felmérésére. [73]. Ezekben a vizsgálatokban a nemlineáris optikai mikroszkópia potenciális DNS károsító hatásainak felmérése történt. A 280-315 nm hullámhossz tartományba eső UVB fotonok abszorpciója hatására kialakuló DNS károsodások jellemző markerei a ciklobután pirimidin dimerek (CPD). UV hatásra létrejövőhöz hasonló DNS károsodás nemlineáris optikai képalkotás során használt lézer besugárzás esetén is kialakulhat, bizonyos magasabb lézer teljesítmény értékek felett. A kísérletek során Alexa 514 fluoreszcens festéssel történt a DNS károsodást jelző CPD-k jelölése majd kimutatása. Ezekben a kísérletekben a vizsgált egerek bőrének 750 nm hullámhosszú, viszonylag magas, 60 mW teljesítményű lézer besugárzása történt. Ezeknek az előkísérleteknek az eredményei azt mutatták, hogy a lézer által besugárzott egerbőrben ezen a 750 nm-es (illetve rövidebb) hullámhosszon, 50 mW feletti átlagteljesítmények esetén, bizonyos kísérleti körülmények között kismértékű DNS károsodás kimutatható volt. Ezzel szemben 800 nm feletti, illetve kisebb teljesítményű lézerforrással történő besugárzás esetén egyáltalán nem voltak az egerek bőrében

kimutathatók CPD pozitív sejtek (73, 74), ami a 1030 nm-en 5 mW átlagteljesítménnyel működő kézi mikroszkóp biztonságosságát mutatja (72).

A biztonságtechnikai előkísérletek mellett korábbi munkáinkban újabb célkitűzésként szerepelt az *in vivo* képképzés a bőr metabolikus eredetű károsodásainak vizsgálatára állatkísérletekben. Ezekben a kísérletekben a bőr állapotának változását vizsgáltuk magas zsírtartalmú és/vagy fruktóztartalmú diéta hatására elhízott egerekben. A bőr kollagéntartalmának károsodása *in vivo* detektálható volt az SHG intenzitás csökkenése által. CARS technikával az elhízott egerekben a zsírsejtek méretének növekedését is ki tudtuk mutatni *ex vivo* bőrmintákon (75).

Újabb kísérleteinkben azt találtuk, hogy elhízott egerek károsodott bőrének SHG technikával *in vivo* követett kollagén struktúrája a testsúlyuk csökkenésével párhuzamosan jelentősen javult, miután az egerek 8 héten keresztül napi 40 perc önkéntes testmozgást végeztek taposómalomban (76).

1.2 A bazálsejtes karcinóma

1.2.1 Epidemiológia

A basalioma (bazálsejtes karcinóma, basal cell carcinoma, BCC) a leggyakrabban előforduló nem-melanoma típusú bőrtumor, és egyben a leggyakoribb malignus tumor a fehér bőrű lakosság körében (77, 78). A BCC incidenciája nagy változékonyságot mutat a világon, legmagasabb Ausztráliában ($>1000/100\ 000$ személy-év), legalacsonyabb pedig Afrika egyes régióiban ($<1/100\ 000$ személy-év). Csak az Amerikai Egyesült Államokban több mint egymillió BCC-t diagnosztizálnak évente (79).

1.2.2 Etiológia

A BCC egy lassan növekvő tumor, mely az epidermisz bazális sejtrétegéből, valószínűsíthetően a szőrtüsző külső gyökérhüvely pluripotens epiheliális sejtjeiből ered (80). Első leírója Krompecher Ödön volt 1903-ban, aki szövettani vizsgálattal jutott el ahhoz a felismeréshez, hogy egy korábban nem leírt típusú daganatról van szó, majd eredményeit „Der Basalzellenkrebs” címmel publikálta (81). A BCC kialakulásának hátterében álló legfontosabb etiológiai tényező a bőrfelszínre érő túlzott mértékű UV sugárzás. A BCC kialakulása és a világos bőrtípus, valamint az élet során elszenvedett súlyos napégések közötti erős összefüggésre nézve számos bizonyíték áll rendelkezésre. Ugyanakkor BCC kialakulása szempontjából a kumulatív nagyfény expozíciónak kisebb jelentősége van, mint a napégések gyakoriságának (82, 83). Ebből adódóan a napfénykárosodásnak leginkább kitett bőrterületeken, köztük a nyakon és a fejen alakul ki a BCC-k túlnyomó többsége, legtöbbször magasabb életkorban. Emellett kialakulhatnak BCC-k egyéb testtájakon is, így a törzs ruhával fedett részein, valamint az alsó és felső végtagokon. Tenyéren, talpon nem fordul elő BCC, ez is alátámasztja a szőrtüsző eredetet. Jóllehet, a BCC incidenciája az életkorral arányosan nő, irodalmi adatok szerint megfigyelhető egy eltolódás a fiatalabb életkorú betegek irányába, valamint napjainkban gyakrabban jelentkeznek agresszívebb BCC formák. Mivel a BCC-t sokszor nem jelentik a nemzeti rákregiszterekben, így minden bizonnyal incidenciája jelentős mértékben alulbecsült (84, 85).

Multiplex BCC-k kialakulhatnak ritka örökletes rendellenességek, mint Gorlin-Goltz szindróma (nevroid basal cell carcinoma syndrome, NBCCS), xeroderma pigmentosum vagy Bazex-Dupré-Christol szindróma részeként is (86). Az NBCCS egy ritka autoszomális domináns (AD) öröklődésű betegség, melyben számos BCC jelenik meg a betegeken, emellett jellemzők az állkapocs odontogén keratocisztái, a falx cerebri meszesedése, és még számos további rendellenesség (87). A legtöbb genetikai vizsgálat a sonic hedgehog (SHH) útvonal mutációit írja le a BCC hátterében. Ennek az útvonalnak a rendellenes aktivációját a *patched 1 (PTCH1)* gén vagy ritkábban a *Smoothed (Smo)* gén funkcióvesztő mutációi is kiválthatják (88). A *PTCH1* gén terméke tumorszuppresszor funkciót tölt be és fontos szerepe van a sejtosztódás szabályozásában. A Patched fehérje a hedgehog ligandok transzmembrán receptora, mely az Smo-t gátolja. Az Smo úgyszintén egy transzmembrán receptor, mely onkogénként a BCC mellett a medulloblastoma és a prosztata karcinóma kialakulásában is szerepet játszik (89, 90). A hedgehog ligandok kötődése hatására a Patched fehérje Smo gátló hatása megszűnik, így aktiválódik az Smo szignál transzdukció. NBCCS esetén a *PTCH1* mutáció hatására hibás protein termelődik, így ez az útvonal kikerül a szabályozás alól (91).

1.2.3 Klinikai típusok

A BCC főbb klinikai altípusai közé a noduláris, infiltratív, szuperficiális és a morpheiform, valamint kevert formák tartoznak. A noduláris BCC a leggyakoribb típus, az összes BCC több mint felét teszi ki. Jól körülírt, gyöngyház fényű, áttetsző, teleangiektáziákkal tarkított tumorként jelentkeznek. A tumor közepe gyakran besüpped, a nagyobb méretű léziók sokszor ulcerálódnak és pörkkel fedettek. A noduláris BCC egy agresszívebb altípusa a mikronoduláris típus, mely gyakran a szem környékén jelentkezik. A mikronoduláris BCC általában szürkés színű, mely a bőr megfeszítésére sárgásfehérre vált. Legtöbbször kemény tapintatú, kifekélyesedésre kevésbé hajlamos. A szuperficiális BCC általában lassan növekvő, eritémás, jól körülhatárolt, lapos, kissé hámló képletként jellemezhető. Az infiltratív típusú BCC egy gyakran kifekélyesedő, rosszul körülhatárolt tumor, sokszor a klinikailag épnek tűnő környező bőrben is kimutatható szövettani vizsgálattal. Az infiltratív BCC klinikai diagnózisa gyakorta nehézséget jelent, mivel hegszövettel összetéveszthető. A morpheiform típus besüppedt,

hegszerű, bőrszínű plakként jelentkeznek. Ebben a típusban vérzés, kifekélyesedés nem jellemző (92).

Egyes BCC-k, legtöbbször a noduláris típus nagyobb mennyiségű melanin pigmentet is tartalmazhatnak, melyeket ilyenkor pigmentált BCC-nek nevezünk (93). A pigmentált BCC-k színe barna, vagy kékesfekete is lehet (92). A pigmentált BCC melanomától való elkülönítése a nagymértékben eltérő prognózis és kezelés miatt igen nagy jelentőségű és esetenként nehéz feladat (93).

1.2.4 Diagnózis

A BCC korai felismerése rendkívül fontos, mivel előrehaladott esetben a kezelése sok nehézséget okoz (94). A BCC diagnózisa legtöbbször karakterisztikus morfológiájának köszönhetően a bőrgyógyászati vizsgálat során szabad szemmel is megszületik. Klinikailag nehezebben megítélhető, kevésbé típusos bőrlézió esetén a dermatoszkópos vizsgálat a legtöbb esetben segít felállítani a BCC diagnózisát (95).

A BCC dermatoszkópos kritériumait már több alkalommal frissítették és bővítették az utóbbi évtizedekben. Egyes kritériumok jellegzetes szövettani jellemzőknek is megfeleltethetők. A dermatoszkópos képből a BCC szövettani típusára is lehet következtetni (95). Ezzel szemben, a szuperficiális BCC esetén nem áll rendelkezésre dermatoszkópos kritériumrendszer, és a dermatoszkóp adta nagyítás elégtelen lehet a tumorszélek precíz meghatározásához (96).

A hagyományos szövettani feldolgozást követő, patológus által végzett szövettani leletezés az egyetlen jelenlegi módszer, amellyel a BCC végleges diagnózisa felállítható. Ez megvalósulhat a BCC eltávolítását követően, vagy a tumorból történő biopszia vételével. Utóbbit az Egyesült Államokban igen gyakorta alkalmazzák. A kiemelkedő BCC-ekből, mint a noduláris típus shave biopszia vehető, míg az infiltratív és morpheiform léziókból punch biopsziát vesznek. Az európai gyakorlatban biopszia ritkábban történik BCC-ből. A tumor eltávolítását követő szövettani vizsgálattal igazolható, hogy tumormentes volt-e a reszekciós szél (97).

A noduláris BCC szövettanára jellemző, hogy a nagy, ovális magvú bazaloid sejtek egy vagy több, a dermiszbe terjedő sejtívesekbe rendeződnek. Jellegzetes a bazális membrán alatt létrejövő résképződés. A sejt ívesek perifériáján a tumorsejtek kerítéslécyszerű, ún.

paliszád eloszlásban található. Az atípiá szerény, a mitotikus aktivitás általában alacsony (80). Jellemző lehet a mucinképződés és a cisztikus megjelenés is, valamint kalcifikáció vagy centrális nekrozis is jelen lehet (98). A mikronoduláris típus megjelenése ehhez hasonló, de több sejtfészkek van jelen, melyek mérete kisebb, és a paliszád állás kevésbé jellemző. A szuperficiális típusra felszínes, a hámból kiinduló, élesen körülhatárolt sejt fészkek jellemzők, melyek között ép szövet található. A paliszád jelleg kifejezett. Az infiltratív típusban a hámból, az irhárra és a szubkutiszra terjedő, elmosott szélű, kis méretű, szabálytalan alakú sejt fészkek jellemzők (80). A sejt fészkekben különböző méretű, atípiát mutató tumorsejtek találhatóak, a paliszád állás helyenként jelen lehet (98). A mitotikus aktivitás ebben a típusban kifejezett lehet. A morpheiform típusban vékony, akár csak egy sejtréteg vastagságú sejt fészkek helyezkednek el a dermiszben, vagy akár a szubkutiszba terjedően. A sejt fészkek között vastag, hegszerű kollagén rost kötegek találhatóak. A paliszád jelleg hiányzik. Ezt a típust időnként nehéz elkülöníteni a hegszövetben rekuráló BCC szövettani képétől (80).

Az egyes szövettani típusok között átmenet is jelen lehet, egyedül a valódi morpheiform típus, ami csak önmagában jelentkezik. Pigment minden szövettani típusban jelen lehet, de infiltratív és morpheiform típusok esetén csak igen ritka esetben. Maga a pigment melanin, mely a tumorsejt fészkekben és a környező dermiszben egyaránt megjelenhet. Laphámsejtes differenciáció, így laphámrákkal kevert szövettani típus némely esetben ugyancsak megjelenhet a BCC szövettani képén, ez a kezelésben is nagy jelentőségű (98). A BCC kiterjedésének megítélését HFUS vizsgálat is segítheti. A HFUS alkalmas lehet a különböző BCC típusok megkülönböztetésére, valamint a BCC határainak és mélységi terjedésének feltérképezésére. A HFUS felbontóképessége azonban túl alacsony, így nem teszi lehetővé a műtét előtti nagy precizitású sebészi tervezést (99).

Az utóbbi évtizedben az OCT-t is bevezették, mint új képalkotó technikát a BCC vizsgálatára (100, 101). A legtöbb ilyen témájú közlés azonban csak az elmúlt néhány évben jelent meg. Egy 2015-ös német vizsgálat szerint az OCT a dermatoszkópiához képest jelentősen javítja a BCC diagnózisának specificitását, azonban a diagnosztikus szenzitivitást nem növeli (102). Egy friss, 2018-as vizsgálat szerint igen nagy jelentősége van a generált OCT képnek abban, hogy pontos diagnózis szülessen. Arra is törekedtek, hogy OCT-vel a BCC szövettani típusát meghatározzák, egyelőre mérsékelt sikerrel

(103). Emellett az OCT BCC sebészi szélek vizsgálatára való alkalmazásáról is 2018-ban jelent meg közlés (104).

A BCC RCM vizsgálata amellett, hogy növeli a BCC diagnózisának szenzitivitását, nagy pontossággal segíthet meghatározni a tumor kiterjedését és az optimális sebészi szélt (36). Alkalmazásával azonban a HFUS-hez és OCT-hez képest csak csekély behatolási mélység érhető el, így a mélységi terjedés megítéléséhez a RCM nem ad támpontot (105). Több BCC-re specifikus, RCM képen azonosítható morfológiai jellemzőt is leírtak, melyek segítenek a BCC diagnózisának felállításában. RCM vizsgálattal a BCC egyes szövettani jegyei is sikerrel azonosíthatók (36). Egyelőre azonban standardizált kritériumrendszer nem áll rendelkezésre a BCC RCM diagnosztikájában. Az RCM alkalmazásával nyert kísérletes adatok a BCC diagnosztikájában sok esetben nehezen reprodukálhatók a valós, klinikai körülmények között. Egy 2015-ben megjelent meta-analízis szerint az eddigi RCM-el foglalkozó klinikai vizsgálatok alapján még nem áll rendelkezésre erős evidencia és több korábbi vizsgálatot potenciálisan elfogultnak találtak (106).

1.2.5 Terápia

A BCC általában a jól kezelhető tumorok közé sorolható. Ez abból adódik, hogy áttétet csak rendkívül ritka esetben ad és halált csak igen ritkán, nagyon előrehaladott esetekben okoz. A lokálisan szöveteket destruáló terjedéséből adódóan a nagy méretű, kiújult, vagy elhanyagolt BCC-k sok esetben kiterjedt szövetpusztuláshoz vezethetnek (107-109). Számos terápiás lehetőség áll rendelkezésre a BCC kezelésében. Az általában elsőként választandó, ún. arany standard terápia BCC esetén a sebészi kimetszés. Ugyanakkor a kiújulás esélye egyes irodalmi adatok szerint a sebészi eltávolítást követően meghaladhatja a 10%-ot. Jelentős terhet ró az egészségügyre a BCC egyre gyakoribb előfordulása és a műtéti kezelést követően a kiújulás relatíve magas kockázata (110).

A Mohs-féle mikroszkóposan ellenőrzött sebészetet (Mohs micrographic surgery, MMS) Frederic Edward Mohs amerikai sebész fejlesztette ki az 1930-as években. A MMS egy olyan speciális sebészi technika, amely során a tumor szakaszos reszekciója történik lokális anesztéziában, és a műtét alatt fagyasztott metszetek vizsgálatával történik a sebészi szélek értékelése. A jelenleg alkalmazott kezelési módok közül ez az eljárás

biztosítja a BCC legalacsonyabb kiújulási kockázatát az ép szövetek legnagyobb mértékű megőrzése mellett (111). A MMS alkalmazása nagyméretű tumor és agresszív szövettani típus esetén különösen indikált. Ugyanakkor a MMS számos hátránnyal bír. A MMS során a műtét sok időt vesz igénybe, költsége magas, és feltétele az egészségügyi személyzet speciális képzése, valamint alkalmazásához különleges felszerelésre is szükség van (112). Ezek, valamint a finanszírozás hiánya állhatnak annak a háttérben, hogy hazánkban nem alkalmazzák kiterjedten a MMS-t.

A BCC kezelésében alkalmazhatók különböző lokális kezelések is, mint a kürettázs, krioterápia, a diatermia és a lézerkezelés (113, 114). Utóbbi végezhető pulzáló festéklézerrel és szén-dioxid lézerrel egyaránt. Kis méretű, szuperficiális BCC esetén a dióda lézerek sikeres alkalmazására is vannak adatok (115). Ezek a módszerek leginkább az alacsony kockázatú, felületesen terjedő BCC-k kezelésekor választandók. Emellett szövettani verifikáció a tumor roncsolással történő eltávolítása előtt kötelezően végzendő. Irreszekábilis tumor esetén, vagy ha a sebészi eltávolítás esetén jelentős funkcióvesztés (mint a szem, vagy az orr elvesztése) következne be, egyéb terápiás lehetőségek is rendelkezésre állnak (113). Ezek egyike a fotodinámiás terápia (photodynamic therapy, PDT), mely során egy fényérzékenyítő vegyület, mint aminolevulinsav (aminolevulinic acid, ALA) alkalmazását követően nagy intenzitású látható fényel történik a kezelés. A PDT különösen hatékony szuperficiális BCC esetén, és kitűnő esztétikai eredményhez vezethet, azonban magasabb kiújulási arány jellemzi, legfőképpen nem elég körültekintő alkalmazása esetén (116). A radioterápiát a BCC kezelésében leginkább kiterjedt tumorok esetén alkalmazzák, amikor a sebészi kimetszés nem kivitelezhető (112). Ezzel szemben, NBCCS-ben nem ajánlott a sugárterápia, mert elősegíti a további tumorok kialakulását (117). Az indikáción túli („off label”) kezelési módok közül az intralézionális interferon kezelés, valamint a lokális imiquimod, retinoidok és az 5-fluorouracil is hatásosak lehetnek, a PDT-hez hasonlóképpen leginkább a szuperficiális BCC terápiájában (118). Egy újabb kezelési lehetőség a vismodegib (Erivedge®, Genentech), mely egy Smo gátló gyógyszer. A vismodegibet az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (Food and Drug Administration, FDA) 2012-ben, míg az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) 2013-ban fogadta be. A második Smo inhibitor molekula, a sonidegib (Odomzo®, Novartis) 2015-ben került egyaránt FDA és EMA befogadásra, terápiás hatékonysága felülmúlja a

vismodegibét. Az Smo inhibitor gyógyszerek azokban az esetekben adhatók, amikor a BCC olyannyira előrehaladott, hogy sebészileg nem kezelhető, vagy a sebészi kezelés jelentős funkcióvesztéssel, vagy deformitással járhat, valamint a sugárkezelés sem jön szóba. Emellett áttétet adó BCC esetén is alkalmazhatók (119, 120). Az Smo gátló kezelés hatására zsugorodó tumorok sebészi kimetszése is megvalósítható lehet (121). Az Smo inhibitorok NBCCS-ben is jól alkalmazhatók, ahol a folyamatosan növekvő számú tumorok igen nagyszámú sebészi beavatkozást tennének szükségessé (119, 120).

Hazánkban jelenleg a két Smo-gátló szer közül a vismodegib alkalmazásával van már tapasztalat. Elterjedését gátolja a gyógyszer magas ára, mely így egyelőre csak egyedi méltányosság szerint adható. Leggyakoribb mellékhatásai az izomgörcsök, az ízérezszavarok, a fáradékonyság, a súlyvesztés, valamint a hajhullás, melyek csökkent életminőséghez és a terápia felfüggesztéséhez vezethetnek (119, 120). Felnőttekben a hedgehog útvonal a legtöbb szervben nem aktív, viszont a haj növekedésében, az izomműködésben, az ízérésben jelentős szerepet játszik. Így a felsorolt mellékhatások a hedgehog útvonal fiziológiás aktivitásával mutatnak összefüggést (122). Az útvonal az embrionális fejlődésben is kulcsfontosságú szerepet látszik, tehát nem meglepő, hogy az Smo gátló szerek teratogének és embriotoxikusak (123, 122). A mellékhatásaik mellett az Smo gátlók alkalmazását más célzott daganatterápiákhoz hasonlóan a rezisztencia kialakulása is korlátozza. Primer rezisztencia esetén nem érhető el terápiás válasz, míg, ha a kezdeti jó hatékonyság után progrediál a tumor, akkor szekunder rezisztenciáról beszélünk. Mind a sporadikus BCC, mind az NBCCS mutathat egyaránt primer vagy szekunder rezisztenciát Smo gátló terápiára (124-126).

Mivel látható, hogy a BCC kezelésében a legjobb terápiás megoldást az ébén történő sebészi kimetszés adja, jelentős igény mutatkozik új, gyorsan alkalmazható, nem-invazív diagnosztikai módszerekre, amelyek pontos útmutatást adnak a BCC diagnózisához és a tumor eltávolítása során a megfelelő metszési vonal meghatározásához.

1.3 Ehlers-Danlos szindróma

Az Ehlers–Danlos szindróma (EDS) elnevezés ritka örökletes kötőszöveti rendellenességek egy heterogén csoportját jelöli, melyek együttes incidenciája 1:5000 (127). Az EDS első leírója Edvard Lauritz Ehlers dán orvos volt 1901-ben, aki egy ízületi hipermobilitással, valamint sérülékeny és hiperextenzibilis bőrrel bíró beteg esetét közölte. 1908-ban Henri-Alexandre Danlos francia bőrgyógyász egy további hasonló esetet közölt. 1949-ben Falls és Johnson arra a következtetésre jutottak, hogy az EDS AD öröklődésmenetet követ. Az első molekuláris eltérés, amelyet EDS okaként leírtak a lizil-hidroxiláz deficiencia volt, melyet egy autoszomális recesszív (AR) EDS forma háttérében azonosítottak 1972-ben (128). Több különböző EDS klasszikációt vezettek be az 1960-as évek óta. A „Berlin Nozológia” 1988-ban jelent meg, mely 11 EDS altípust különít el az öröklődésmenetük és a klinikai megjelenések alapján (129). A „Villefranche-i Nozológia” már azt követően készült 1997-ben, hogy számos EDS altípusnak leírták a genetikai és molekuláris háttérét. Frissített és egyszerűsített nevezéktant tartalmaz, amelyet az elmúlt 20 évben széles körben használtak világszerte. Ebben a klasszifikációban 6 EDS altípust különítettek el, és az egyes altípusokhoz minor és major kritériumokat definiáltak. A „Villefranche-i Nozológia” megjelenése óta az újgenerációs szekvenálás (next-generation sequencing, NGS) technikákkal különböző, eddig ismeretlen mutációkat azonosítottak és új EDS altípusokról jelentek meg közlések (127). A jelenlegi nemzetközi EDS klasszifikáció nemrégiben, 2017-ben látott napvilágot. Ez az új nozológia 13 klinikai EDS altípust különít el, és leírja ezek genetikai háttérét, valamint öröklődésmenetét (1. Táblázat). Az EDS etiológiai háttere igen komplex és heterogén. A klasszikus EDS (cEDS, OMIM 130000) altípus genetikai háttérében kb. 90%-ban a *COL5A1* vagy a *COL5A2*, 10%-ban pedig a *COL1A1* gének mutációinak van szerepe, melyek hatására hibás V. vagy I. típusú kollagén termelődik (130). Az I. és a V. típusú kollagén fiziológiásan jelentős interakcióban vannak egymással, egyik típus hibás szintézise igen jelentősen kihat a másikra, annak ellenére is, hogy a V. típus lényegesen alacsonyabb mennyiségben szintetizálódik (57). Az ínak és a szalagok 90%-ban I. típusú kollagénből épülnek fel, így nem meglepő, hogy a cEDS gyakran generalizált ízületi lazasággal járhat (57). A cEDS-t az esetek felében *de novo*

mutáció okozza, és egyik szülő sem érintett. A cEDS kísérletes vizsgálatára rendelkezésre áll egérmodell is (131).

A vaszkuláris EDS (vEDS, OMIM 130050) okaként leggyakrabban a *COL3A1* mutáció szerepel, mely hibás III. típusú prokollagén képződéssel jár, azonban ennek hátterében is lehet *COL1A1* mutáció (130). A vEDS kutatásában egérmodell a cEDS-hez hasonlóan ugyancsak rendelkezésre áll (132).

1. táblázat. A különböző Ehlers-Danlos szindróma (EDS) típusok klinikai öröklődésmentete és molekuláris alapja a 2017-es Nemzetközi Klasszifikáció alapján (130). AD: autoszomális domináns, AR: autoszomális recesszív.

Klinikai EDS altípus	Öröklődés- menet	Genetikai háttér	Érintett fehérje
1. Klasszikus EDS (cEDS)	AD	Major: <i>COL5A1</i> , <i>COL5A2</i> Ritka: <i>COL1A1</i>	V. típusú kollagén I. típusú kollagén
2. Klasszikus-szerű EDS (clEDS)	AR	<i>TNX-B</i>	tenascin XB
3. Kardiovalvuláris EDS (cvEDS)	AR	<i>COL1A2</i>	I. típusú kollagén
4. Vaszkuláris EDS (vEDS)	AD	Major: <i>COL3A1</i> Ritka: <i>COL1A1</i>	III. típusú kollagén I. típusú kollagén
5. Hiper mobilis EDS (hEDS)	AD	ismeretlen	ismeretlen
6. Arthrochalasia EDS (aEDS)	AD	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	I. típusú kollagén
7. Dermatosparaxis EDS (dEDS)	AR	<i>ADAMTS-2</i>	prokollagén-N-proteináz
8. Kifoszkoliotikus EDS (kEDS)	AR	<i>PLOD1</i> <i>FKBP14</i>	lizil-hidroxiláz 1 FKBP22
9. Törékeny cornea szindróma (BCS)	AR	<i>ZNF469</i> <i>PRDM5</i>	ZNF469 PRDM5

10. Spondilodiszpláziás EDS (sdEDS)	AR	<i>B4GALT7</i> <i>B3GALT6</i> <i>SLC39A13</i>	β 4GalT4 β 3GalT6 ZIP13
11. Muszkuokkontraktúrás EDS (mcEDS)	AR	<i>CHST14</i> <i>DSE</i>	D4ST1 DSE
12. Miopátiás EDS (mEDS)	AD vagy AR	<i>COL12A1</i>	XII. típusú kollagén
13. Periodontális EDS (pEDS)	AD	<i>C1R</i>	C1r

A „Villefranche-i Nozológia”-hoz hasonlóan az új nozológia mindegyik altípushoz minor és major kritériumokat is rendel (2. táblázat). Mivel az új nozológia is a klinikai képen alapszik, a vizsgáló orvosoktól nagyfokú tapasztalatot és jártasságot igényel az EDS altípus meghatározása, és több ponton szubjektív elemeket is tartalmazhat. Sok esetben a vEDS klinikai diagnózisa is igen nehéz. Ugyanakkor az EDS altípus pontos meghatározása igen nagy jelentőségű a betegellátás során, mivel csak ennek birtokában végezhető genetikai tanácsadás az öröklődésmentre, a prognózisra és a terápiás lehetőségekre vonatkozóan (130).

2. táblázat. A különböző Ehlers-Danlos szindróma (EDS) típusok minor és major kritériumai a 2017-es Nemzetközi Klasszifikáció alapján (130). cEDS: klasszikus EDS, clEDS: klasszikus-szerű EDS, cvEDS: kardiovalvuláris EDS, vEDS: vaszkuláris EDS, hEDS: hipermobilis EDS, aEDS: arthrocalasia EDS, dEDS: dermatosparaxis EDS, kEDS: kifoszkoliotikus, BCS: brittle cornea syndrome, törékeny cornea szindróma, sdEDS: spondilodiszpláziás EDS, mcEDS: muszkuokkontraktúrás EDS, mEDS: miopátiás EDS, pEDS: periodontális EDS.

EDS altípus	Klinikai kritériumok	
	Minor kritériumok	Major kritériumok
cEDS	1. hiperextenzibilis bőr, atrófiás hegek 2. generalizált ízületi lazaság (hipermobilitás)	1. könnyen felhorzsolható bőr 2. puha, tészta tapintatú bőr 3. bőr fragilitás 4. molluszkoid pszeudotumorok 5. szubkután szferoidok 6. sérvek kialakulása 7. epicanthus redő 8. ízületi lazaság szövődményei

		9. pozitív családi anamnézis egy elsőfokú rokon esetében
cEDS	<p>1. hiperextenzibilis bőr bársonyos textúrával, atrófiás hegek nélkül</p> <p>2. generalizált ízületi lazaság, (hipermobilitás) rekuráló ízületi diszlokációval vagy anélkül</p> <p>3. sérülékeny bőr, spontán kialakuló ecchymosisok</p>	<p>1. lábak deformitása: széles, vastag lábfej, brachydactylia bőrredővel, pes planus, hallux valgus, piezogén papulák</p> <p>2. alsó végtagi ödéma szívelégtelenség hiányában</p> <p>3. enyhe proximalis és distalis izomgyengeség</p> <p>4. axonális polineuropátia</p> <p>5. izom atrófia a kézen és a lábfejen</p> <p>6. acrogeria a kézen, kalapácsujj, clinodactylia, brachydactylia</p> <p>7. hüvely, méh vagy végbél prolapszus</p>
cvEDS	<p>1. súlyos és progresszív szívbillentyű eltérések (aorta-, vagy mitrális billentyű betegsége)</p> <p>2. bőr érintettség: hiperextenzibilitás, atrófiás hegek, vékony és sérülékeny bőr</p> <p>3. ízületi hipermobilitás (generalizált vagy kizárólag a kis ízületekre korlátozódó)</p>	<p>1. inguinalis sérv</p> <p>2. mellkas deformitás (kifejezetten jellemző a pectus excavatum)</p> <p>3. ízületi ficam</p> <p>4. lábfej deformitások: pes planus, pes planovalgus, hallux valgus</p>
vEDS	<p>1. pozitív családi anamnézis: kimutatott <i>COL3A1</i> mutáció</p> <p>2. artéria ruptúra korai életkorban</p> <p>3. spontán colon sigmoideum perforáció, diverticulosis vagy más bélbetegség hiányában</p> <p>4. méh ruptúra a harmadik trimeszterben előzmények (császármetszés és/vagy súlyos gátszakadás) nélkül</p> <p>5. carotideo-cavernosus fistula kialakulása trauma nélkül</p>	<p>1. zúzódások traumás behatás nélkül és/vagy szokatlan helyeken (orca, hát)</p> <p>2. vékony, áttetsző bőr, áttűnő vénákkal</p> <p>3. karakterisztikus arci megjelenés</p> <p>4. spontán pneumothorax</p> <p>5. acrogeria</p> <p>6. pes equinovarus</p> <p>7. veleszületett csípőficam</p> <p>8. kisízületi hipermobilitás</p> <p>9. ín- és izomruptúra</p> <p>10. keratoconus</p> <p>11. gingiva sorvadás</p> <p>12. korai életkorban kialakuló visszértágulatok</p>
hEDS	1. generalizált ízületi lazaság (hipermobilitás)	<p>„A” kritériumok: generalizált kötőszöveti rendellenesség szisztémás tünetei közül legalább ötnek kell teljesülnie az alábbiak közül: - bársonyos, puha bőr</p>

	<p>2. két vagy több kritériumnak teljesülnie kell (A és B, A és C vagy B és C)</p> <p>3. kizáró diagnózis: mely esetében valamennyi alábbi tényezőnek teljesülnie kell</p> <ul style="list-style-type: none"> - más altípusú EBS fennállására utaló szokatlan bőr fragilitás hiánya - egyéb alternatív diagnózisok kizárása, melyek esetében az ízületi hipermobilitás hipotoniára és/vagy kötőszöveti laxicitásra vezethető vissza 	<ul style="list-style-type: none"> - enyhe mértékű bőr hiperextenzibilitás - indokolatlan striák megjelenése a hát, has, ágyék, combok, mellék területén szignifikáns fogyás és hízás nélkül - piezogén papulák mindkét láb sarkán - rekuráló vagy többszörös hasi sérv - atrófiás hegek legalább két testtájon - minden előzmény és súlyos elhízás nélkül kialakuló medencefenék, végbél, és/vagy méh prolapszus gyerekeknél, férfiaknál és nulliparáknál - fogszuvasodás és magas vagy keskeny szájpád - arachnodactylia - karok fesztávolságának és a testmagasságnak az aránya $\geq 1,05$ - mitrális billentyű prolapszus (echocardiographiával igazolva) - aortagyök dilatáció és Z-score $> +2$ <p>„B” kritérium: pozitív családi anamnézis során igazolt hEDS egy vagy több elsőfokú rokon esetében</p> <p>„C” kritériumok: muszkuloszkeletális komplikációk közül legalább egynek kell teljesülnie az alábbiak közül:</p> <ul style="list-style-type: none"> - muszkuloszkeletális fájdalom két vagy több végtagban legalább 3 hónapon át napi rendszerességgel - több mint 3 hónapon át tartó krónikus, kiterjedt területet érintő fájdalom -traumás behatás nélkül kialakuló visszatérő ízületi ficamok vagy nyílt ízületi instabilitás
aEDS	<ol style="list-style-type: none"> 1. kongenitális bilaterális csípőficam 2. generalizált ízületi hipermobilitás, többszörös teljes vagy részleges ficammal 3. bőr hiperextenzibilitás 	<ol style="list-style-type: none"> 1. izomhipotónia 2. kifoszkoliózis 3. enyhe osteopenia 4. kötőszöveti fragilitás, atrófiás hegek 5. ok nélküli zúzódások a bőrön
dEDS	<ol style="list-style-type: none"> 1. súlyos bőr fragilitás veleszületett/posztnatális bőr szakadásokkal 	<ol style="list-style-type: none"> 1. lágy, tészta tapintatú bőr 2. bőr hiperextenzibilitás 3. atrófiás hegek

	<p>2. karakterisztikus kraniofaciális diszmorfia jegyek</p> <p>3. megereszkedett bőr, bőrfelesleg és bőrredők a csukló és boka körül</p> <p>4. fokozott tenyéri bőrlécrajzolat és ráncképződés</p> <p>5. a bőr súlyos fokú sérülékenysége, akár szubkután vérzés, hematómák kialakulása</p> <p>6. köldöksérv</p> <p>7. posztnatális növekedési retardáció</p> <p>8. rövid végtagok, rövid kezek és lábfejek</p> <p>9. veleszületett kötőszöveti fragilitás következtében kialakuló perinatális komplikációk</p>	<p>4. generalizált ízületi hipermobilitás</p> <p>5. zsigeri fragilitás következtében kialakuló komplikációk: hólyag ruptúra, rekesz ruptúra, végbél prolapszus</p> <p>6. megkésett motoros fejlődés</p> <p>7. osteopenia</p> <p>8. hirsutizmus</p> <p>9. fogak rendellenességei</p> <p>10. fénytörési rendellenességek (myopia, astigmia)</p> <p>11. strabizmus</p>
kEDS	<p>1. veleszületett izomhipotónia</p> <p>2. veleszületett vagy korán kialakuló progresszív, vagy nem progresszív szkoliózis</p> <p>3. generalizált ízületi hipermobilitás ficammal vagy részleges ficammal</p>	<p>1. bőr hiperextenzibilitás</p> <p>2. sérülékeny bőr</p> <p>3. közepes méretű artériát érintő ruptúra vagy aneurysma</p> <p>4. osteopenia/osteoporosis</p> <p>5. kék sclera</p> <p>6. köldöksérv vagy lágyéksérv</p> <p>7. mellkas deformitás</p> <p>8. marfanoid habitus</p> <p>9. pes equinovarus</p> <p>10. fénytörési rendellenességek (myopia, hypermetropia)</p>
BCS	<p>1. vékony cornea ruptúrával vagy anélkül</p> <p>2. korán kialakuló progresszív keratoconus</p> <p>3. korán kialakuló progresszív keratoglobus</p> <p>4. kék sclera</p>	<p>1. enucleatio vagy cornea hegesedés korábbi ruptúra eredményeképpen</p> <p>2. cornea stróma (főképp a centrális cornea) vastagságának progresszív csökkenése</p> <p>3. súlyos myopia</p> <p>4. retinaleválás</p> <p>5. sükettség, gyakran kevert vezetéses és sensorineurális halláskieséssel</p> <p>6. fokozott dobhártya rugalmasság</p> <p>7. csípőficam</p> <p>8. enyhe hipotónia újszülöttkorban</p> <p>9. szkoliózis</p> <p>10. arachnodactylia</p>

		<ul style="list-style-type: none"> 11. disztális ízületek hipermobilitása 12. pes planus, hallux valgus 13. kézujjak enyhe ízületi kontraktúrája 14. sima, bársonyos, áttetsző bőr
sdEDS	<ul style="list-style-type: none"> 1. alacsony testalkat 2. izom hipotónia 3. hajlott végtagok 	<ul style="list-style-type: none"> 1. hiperextenzibilis, tészta tapintatú, vékony, áttetsző bőr 2. pes planus 3. megkésett motoros fejlődés 4. osteopenia 5. megkésett kognitív fejlődés
mcEDS	<ul style="list-style-type: none"> 1. veleszületett többszörös ízületi kontraktúrák és/vagy pes equinovarus 2. karakterisztikus kraniofaciális diszmorfia jegyek 3. hiperextenzibilis bőr, bőr fragilitás, atrófiás hegek, fokozott tenyéri ráncképződés 	<ul style="list-style-type: none"> 1. rekuráló, krónikus ficamok 2. mellkas deformitások (lapos, excavált) 2. gerinc deformitások (szkoliózis, kifoszkoliózis) 3. hosszú, vékony, henger formájú ujjak 4. progresszív pes equinovarus 5. nagy kiterjedésű szubkután hematómák 6. krónikus székrekedés 7. vastagbél divertikulumok 8. pnemumothorax, pneumohaemothorax 9. nephrolithiasis, cystolithiasis 10. hydronephrosis 11. cryptorchismus 12. strabismus 13. fénytörési rendellenességek (myopia, astigmia) 14. glaucoma
mEDS	<ul style="list-style-type: none"> 1. veleszületett izom hipotónia és/vagy izomatrófia mely a kor előrehaladtával enyhül 2. proximális ízületi kontraktúrák 3. disztális ízületi ficamok 	<ul style="list-style-type: none"> 1. tészta tapintatú bőr 2. atrófiás hegek 3. megkésett motoros fejlődés 4. izombiopsziával igazolt miopátia
pEDS	<ul style="list-style-type: none"> 1. korai életkorban kialakuló súlyos és nehezen szanálható periodontitis 2. fogágy hiánya 3. pretibialis plakkok 4. pozitív családi anamnézis: elsőfokú rokon, akinél 	<ul style="list-style-type: none"> 1. sérülékeny bőr 2. ízületi hipermobilitás, főképp disztálisan 3. bőr hiperextensibilitás, fragilitás, abnormális, széles és atrófiás hegek 4. fertőzések fokozott kockázata 5. sérvek kialakulása

	teljesülnek a klinikai kritériumok	6. Marfanoid arcvonások 7. acrogeria 8. feltűnő érrajzolat
--	------------------------------------	------------------------------------------------------------------

A bőr extenzibilitását a bőr összecsiszolásával lehet megítélni, ha az alkar voláris felszínének közepén a bőr 1,5 cm-nél hosszabban nyújtható, akkor hiperextenzibilis. Atrófiás hegek a legtöbb cEDS betegnél több testtájon is megjelennek, és igen kiterjedtek lehetnek. A generalizált ízületi lazaság megléte a Beighton pontrendszer alapján állapítható meg. A molluszkoid pszeudotumorok vadhússzerű, gyakran hegesedéssel társuló bőrléziók a nyomáspontok, mint a könyök felett. A szubkután szferoidok kemény tapintatú, gyakran mobilis gömbszerű csomók az alkaron és a lábszáron, melyekben kalcifikáció is jelen lehet. Epicanthus redő cEDS-ben gyakrabban jelenik meg gyermekkorban, felnőtteknél ritkább esetben (130). A cEDS betegek egy részénél komplex regionális fájdalom szindróma is felléphet (133).

A cEDS betegeknek javasolható napi 2 gramm C-vitamin szedése, mely mérsékelheti a bőrtüneteket. Emellett ajánlott a fényvédelem a korai bőröregezés elkerülésére. Az ízületi hipermobilitás provokálása, az ízületek túlnyújtása kerülendő. Rendszeres, könnyű testmozgás, valamint gyógytorna javasolt. Rendszeres szív UH vizsgálat is szerepel az ajánlásokban. A sebészi beavatkozások cEDS betegeken nehézséget jelenthetnek a szövetek nagymértékű fragilitása miatt. Sérvműtéteket követően a hernia gyakran kiújul. A cEDS beteget sebeit különös gonddal, feszülésmentesen kell zárni. A szokottnál több öltést kell behelyezni, és azokat kétszer annyi ideig javasolt bent hagyni. Terhesség esetén különösen szoros követés szükséges (134).

A vEDS egy ritka EDS típus, becsült incidenciája 1: 100,000-hez, azonban igen magas morbiditással és mortalitással jár (132). A vEDS-ben szenvedő betegek 80%-nál 40 éves korig jelentkezik legalább egy szövödmény, leggyakoribb halálozuk pedig az artériás ruptúra. Utóbbi megelőzésére javasolt képalkotó vizsgálatokat végezni, viszont az arteriográfia kerülendő az érsérülés veszélye miatt. Az anamnézis felvételénél ki kell térni a családban előforduló hirtelen elhalálozásokra (135). A bélruptúra gyakori szövödmény, de ritkábban vezet halálhoz. Sebészi úton kezelhető, bár műtéti megoldása gyakran kolosztóma képzésével jár (136). Jelenleg a vEDS betegek átlagos várható élettartama 51 év (137). A vEDS-ben érintett nőknél 15% a mortalitási ráta a terhesség során fellépő szövödmények miatt (135). A vEDS betegek jellegzetes arcformájára a nagynak tűnő

szemek, az előugró járomcsont, a kihegyezett orr, a keskeny ajkak valamint a beesett orca jellemzők (127). A gyakori gyermekkori tünetek között a pes equinovarus, a spontán pneumothorax és a rekurrens ízületi szubluxáció, diszlokáció szerepelnek (138).

A vEDS betegek életmódjában több korlátozás javasolt, köztük a kontakt sportok és hirtelen mozdulatokat igénylő mozgásformák kerülése. Ugyanakkor a szobakerékpározás, futópadon való futás kifejezetten javasolt (137). A gyógyszeres kezelés célja vEDS-ben a vérnyomás normál tartományban tartása és a kiugró vérnyomásértékek megelőzése, hogy csökkentsük az artéria ruptúra esélyét. A β 1-antagonista és β 2-agonista celiprolol ilyen célú alkalmazásáról már vannak biztató adatok (137, 139).

A klinikai képen alapuló diagnózis mellett a hEDS kivételével (mely a leggyakoribb EDS típus, azonban genetikai háttere egyelőre nem ismert) az összes EDS formában javasolják a genetikai vizsgálat elvégzését. A molekuláris diagnosztikát NGS-el javasolják végezni, mely számos gén párhuzamos szekvenálását teszi lehetővé. Ha NGS-el nem azonosítható az EDS-t okozó mutáció (vagy AR forma esetén csak egy allélon van mutáció), akkor gén kópiaszám változatosságok (copy number variation, CNV) detektálása végezhető nagyobb deléciók vagy duplikációk azonosítására. Ennek alternatívájaként, vagy következő lépésként teljes exom, vagy teljes genom szekvenálás lehet célravezető. Ugyanakkor az EDS betegek egy részében nem azonosítható mutáció ismert EDS-asszociált génekben, így a klinikai képen alapuló diagnózis nem erősíthető meg (130). A kollagenopátiával járó EDS altípusokban célra vezető objektív vizsgálatok, mint a kollagén elektroforézis vagy a diagnosztikus célú elektronmikroszkópia is a diagnosztikus tárház részét képezik (134). Ezek azonban nem terjedtek el a mindennapi klinikai gyakorlatban annak ellenére, hogy a helyes diagnózis felállításában jelentős segítséget adhatnak. Ennek oka az lehet, hogy ezek egyrészt meglehetősen drága technikák, másrészt alkalmazásuk speciális képzettséget és felszerelést igényel, valamint a betegektől bőrbíopszia vételére is szükség van (140, 141).

2. Célkitűzések

2.1. I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képalkotás során BCC azonosítására

Célkitűzésünk, hogy a jövőben a nemlineáris mikroszkópia a rendelkezésre álló képalkotó módszereknél nagyobb diagnosztikus pontosságot adó technikaként legyen alkalmazható BCC vizsgálatára. Az utóbbi években számos erőfeszítés történt annak érdekében, hogy különböző rendellenességekről készített nemlineáris optikai képalkotás során objektív, számszerűsíthető eredményekhez lehessen jutni. A kvantitatív analízis módszereket nemlineáris optikai képeken több eltérő daganattípus, valamint a bőröregedés vizsgálatára is alkalmazták (142-145). Ilyen technikákat nemlineáris optikai mikroszkópiai képen BCC azonosítására azonban korábban nem használtak. Ennek következtében első kísérletünkben célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk, mely olyan jól számszerűsíthető paraméterek azonosíthatók különböző kvantitatív analízis technikákkal, melyek alkalmasak lehetnek nemlineáris optikai képalkotás során BCC diagnosztikájára. Ennek érdekében TPF és SHG mikroszkópiai méréseket végeztünk *ex vivo* BCC mintákon, valamint egészséges kontroll bőrön. Ezt követően különféle képfeldolgozás és képanalízis módszerekkel mértünk olyan paramétereket, melyekben jelentős eltérések lehetnek azonosíthatók BCC minták esetében az ép bőrhöz képest. Ezek a paraméterek a jövőben alapot szolgáltathatnak a BCC kimetszése előtt a sebészi szélek tervezéséhez.

2.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pseudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával

A tumorszélek meghatározása mellett nagy klinikai igény mutatkozik a bőrtumorok pontos típusának nem-invazív szövettani azonosítására is. Ennélfogva második kísérletünkben célkitűzésünk volt, hogy meglévő, saját fejlesztésű CARS rendszerünk (146) továbbfejlesztésével azt alkalmassá tegyük BCC festés nélküli hisztopatológiai vizsgálatára. További célként azt tűztük ki, hogy az előállított képeken magas kontraszttal különítsük el a különböző szöveti alkotókat, a konvencionális H&E festett szövettani

képekhez hasonló módon, azok morfológiai vizsgálatát lehetővé téve. Ezt egy új, saját képfeldolgozó algoritmus kifejlesztésével kívántuk elérni, mellyel növelhető lehet a technika kémiai szelektivitása.

2.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére

A korábbiakban már több különböző örökletes kötőszöveti rendellenességről, mint osteogenesis imperfecta-ról és a pseudoxanthoma elasticum-ról más kutatócsoportok végeztek nemlineáris optikai képalkotást (147-149). Ugyanakkor az EDS nemlineáris mikroszkópiával azonosítható morfológiai jellemzőinek leírása még az eddigiekben nem történt meg. Mivel EDS esetén hiány van a megfelelő objektív diagnosztikus módszerekből, így egy új, ebben a rendellenességben alkalmazható diagnosztikus eszköznek nagy klinikai haszna volna. Így harmadik kísérletünkben célkitűzésünk, hogy *ex vivo* nemlineáris mikroszkópiás képalkotás során a klasszikus és vaszkuláris típusú EDS-ben szenvedő betegek bőrének rendellenes kollagén rost szerkezetét elkülönítsük a kontroll, egészséges bőrmintákétól. Ennek alapján a jövőben további kutatások iránya lehetne, hogy a nemlineáris optikai technikák alkalmasak-e EDS betegek bőrstátuszának nem-invazív követésére és a bőrstátusz alapján a klinikai kimenetel megbecslésére.

3. Módszerek

3.1 Vizsgált bőrminták és előkészítésük

3.1.1 I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képkalkotás során BCC azonosítására

A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán sebészi kimetszéssel 10 noduláris típusú BCC-t és egészséges bőrmintát gyűjtöttünk. A mintákat foszfát pufferes sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS) tartottuk, és jégen hűtöttük. A szövetek degradálódását elkerülendő a nemlineáris mikroszkópiai mérések előtt maximum 1-3 óra időtartamig tároltuk és szállítottuk a mintákat. A MTA Wigner FK Nemlineáris mikroszkópia laboratóriumában elvégzett méréseket megelőzően a fixálatlan bőrmintákat kiemeltük a PBS oldatból, tárgylemezre helyeztük és tárgylemezzel fedtük le őket. A méréseket követően a mintákat formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk, és a klinika Szövettani Laboratóriumában konvencionális szövettani feldolgozás történt. A BCC szövettani diagnózisának patológus szakorvos általi igazolására minden BCC minta metszetén sor került. Az I. és II. kísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedélyünk száma SE TUKEB 114/2017.

3.1.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pseudo H&E „festett” szövettani képek előállítására BCC mintákról CARS technikával

A Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Központ Állatházában két egészséges, nyolchetes korú, BALB/c egeret (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, Massachusetts, Egyesült Államok) 5 mg/ttkg ketamin és 1 mg/ttkg xilazin PBS-ben oldott elegyének intraperitoneális beadásával elaltattunk. Ezt követően az egerek hátbőrének szőrzetét szőrtelenítő krém alkalmazásával eltávolítottuk, majd hátbőrük felső részéről két, 2x2 cm átmérőjű bőrmintát nyertünk szikével történő kimetszéssel. Az egereken a bőrminták kimetszése után, altatásban cervikális diszlokációval eutanáziát hajtottunk végre. Emellett a Semmelweis Egyetem Bőr-,

Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán két infiltratív típusú BCC és egészséges bőrminta sebészi excíziója történt.

Az egér és a humán bőrmintákat egyaránt PBS-be helyeztük, és 1-3 óra időtartamon belül mikroszkópiai vizsgálatokat végeztünk rajtuk az MTA Wigner FK Nemlineáris mikroszkópia laboratóriumában. A mérésekhez az egér bőrmintákat és az egyik BCC mintát tárgylemezre helyeztük és fedőlemezzel fedtük. A másik BCC mintát egy speciális, saját készítésű „szövetsatuba” fogtuk, amellyel vertikális pozícióban rögzítettük a mintát az objektív alá. A mérések után a BCC mintákat formalinban fixáltuk, majd a szokott módon szövettani feldolgozás történt.

3.1.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére

3.1.3.1 Vizsgált betegek

Három EDS-ben szenvedő, Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Genetikai Szakrendelésén gondozott nőbeteget (átlagos életkoruk: 45 ± 7 év) vizsgáltunk harmadik kísérletünkben. A betegek klinikai tünetei az EDS 2017-es Nemzetközi Klasszifikációja major és minor kritériumai szerint a 3. Táblázatban olvashatók.

1. beteg

Az 53 éves nőbeteg generalizált ízületi lazasággal, hiperextenzibilis bőrrel, azon ok nélkül megjelenő zúzódásokkal, szubkután hematómákkal, lipómákkal, piezogén papulákkal, szkoliózissal és kék sclerával jelentkezett klinikánkon. A beteg anamnézisében hipotireózis, hosszabb idő óta fennálló hematuria, és gyermekkor óta ismétlődő gingiva vérzések szerepelnek. Családi anamnézisében az elsőfokú rokonai körében bőr hiperextenzibilitás, ízületi hipermobilitás szövődményei (luxáció, szubluxáció, fájdalom) és különböző herniák szerepelnek.

NGS szekvenálás történt a *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *ADAMTS2*, *PLOD1*, *FLNA*, *ATP7A*, *CHST14*, *FKBP14* és a *SLC39A13* génekről (PentaCore Laboratórium, Budapest, Magyarország). A *CHST14* és a *PLOD1* gének vad típusúaknak bizonyultak, míg a *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *ADAMTS2*, *FLNA*, *ATP7A*,

FKBP14 és a *SLC39A13* gének fenotípusbéli relevancia nélküli polimorfizmusokat mutattak. A 12 génnek, amely szerepelt az NGS panelen 98.4%-a, átlagosan 40,9 leolvasás/nukelotid mélységgel volt lefedve. A szekvencia leolvasás a hg19/GRCh37-hoz volt igazítva. A referencia szekvenciával való összevetést követően 130 eltérő variáns volt azonosítható. Ezek közül a *COL5A1* gén heterozigóta variánsa (c.G1588A, p.G530S) volt azonosítható, mely cEDS-el hozható összefüggésbe, amely a betegünk fenotípusának is megfeleltethető volt. Sanger szekvenálás igazolta ennek a variánsnak a jelenlétét. A beteg lánya ugyanezt a heterozigóta p.G530S mutációt hordozza, melyet Sanger szekvenálás igazolt. A mutáció ko-szegregált a beteg lányának hasonló cEDS fenotípusával.

2. beteg

A 42 éves nőbeteget referálták klinikánkra, klinikai tünetként alacsony testmagasság, súlyos szkoliózis, pes planus, kék sclera, az arc diszmorfiaja (jellegzetes megjelenésű arc, csökkent mennyiségű szubkután zsírszövettel, kis állal, vékony orral és ajkakkal), kisizületi hiper mobilitás, arcogeria és vékony, hiperextenzibilis bőr látható szubkután erezettséggel volt észlelhető. Anamnézisében artéria ruptúrák, haemopneumothorax, spontaneous colon sigmoideum perforáció szerepeltek.

Mivel a klinikai kép alapján vEDS fenotípusa volt valószínűsíthető, *COL3A1* (OMIM: 120180) teljes gén szekvencia analízis (Centogene AG, Rostock, Németország) történt. A szekvenálás egy korábban nem publikált heterozigóta variánst, a c.3124_3141dup (p.Ala1042_Gly1047dup) mutációt detektálta. 18 bázispár duplikációja volt jelen, amely a predikált fehérjében hat aminosav duplikációját okozza a tripla helikális régióban, melyből kettő glicin (Ala-Pro-Gly-Ala-Pro-Gly). A legtöbb korábban közölt *COL3A1* gén patogén variáns háttérében egy Gly-X-Y ismétlődő szekvenciában szereplő glicin aminosav szubsztitúció volt azonosítható a III. típusú prokollagén tripla helikális régiójában. Emellett egy Gly-X-Y ismétlődő szekvenciát érintő kereteltolással nem járó inzerciót is leírtak (150). Mivel a betegünkönél detektált variáns prediktálhatóan a Gly-X-Y ismétlődést érinti, ezért valószínűsíthetően patogén. A beteg fenotípusa és a *COL3A1* gén analízis alapján felállítottuk a vEDS diagnózisát a betegnél. Így a beteg az elsődleges eset (index case) a családjában.

3. beteg

A 40 éves nőbeteg, a 2. beteg testvére vékony és áttetsző bőrrel, a 2. beteghez hasonló arci diszmorfiával, kék sclerával, kisízületi hipermobilitással, alacsony testmagassággal, pes planus-al és szkolizózissal jelentkezett klinikánkon. Amamnézisében perinatális spontán nyelőcsőruptúra, szülés alatt bekövetkezett méhruptúra, valamint hidronefrózissal járó ureterszűkület szerepelnek. Emellett a beteg krónikus plakk típusú pikkelysömörben szenved.

A Sanger szekvenálással történt családi szűrés *COL3A1* gén 43. exonján leírta ugyanazt a heterozigóta c.3124_3141dup (p.Ala1042_Gly1047dup) variánst, amely a 2. betegnél is detektálható volt. Ez az új duplikációs mutáció ko-szegregált hasonló vEDS fenotípussal a beteg családjának három generációjában, beleértve a beteg édesanyját, a testvérét (2. beteg) és az unokaöccsét (a 2. beteg fiát). A beteg édesanyja és unokaöccse is hasonló karakterisztikus klinikai jellegzetességeket mutatott és teljesítették a vEDS klinikai diagnosztikus kritériumait. Náluk azonban egyelőre nem jelentkezett vaszkuláris ruptúra vagy más belszervi manifesztáció. Ez a vertikális öröklésmenet összhangban van a vEDS klasszikus autoszomális domináns öröklődésével. Így ezek az adatok méginkább alátámasztják a vEDS diagnózisát.

3. Táblázat. A III. kísérletünkben vizsgált Ehlers-Danlos szindrómában (EDS) szenvedő betegek klinikai tünetei az EDS 2017-es Nemzetközi Klasszifikáció major és minor kritériumai alapján

Klasszikus EDS (cEDS)	1. beteg	Vaszkuláris EDS (vEDS)	2. beteg	3. beteg
Major kritériumok		Major kritériumok		
1. hiperextenzibilis bőr, atrófiás hegek	+	1. pozitív családi anamnézis: kimutatott COL3A1 mutáció	+	+
2. generalizált ízületi lazaság	+	2. artéria ruptúra korai életkorban	+	-
Minor kritériumok		3. spontán colon sigmoideum perforáció diverticulosis vagy más bélbetegség hiányában	+	-
1. ok nélküli zúzódások a bőrön	+	4. méh ruptúra a harmadik trimeszterben előzmények (császármetszés és/vagy súlyos gátszakadás) nélkül	-	+

2. tészta tapintatú bőr	+	5. carotideo-cavernosus fistula kialakulása trauma nélkül	-	-
3. bőr fragilitás	+	Minor kritériumok		
4. molluszkoid pszeudotumorok	-	1. zúzódások traumás behatás nélkül és/vagy szokatlan helyeken (orca, hát)	+	+
5. szubkután szferoidok	+	2. vékony, áttetsző bőr, áttűnő vénákkal	+	+
6. sérvek kialakulása	-	3. jellegzetes arcforma	+	+
7. epicanthus redő	-	4. spontán pneumothorax	+	-
8. ízületi lazaság szövődményei	+	5. acrogeria	+	+
9. pozitív családi anamnézis egy elsőfokú rokon esetében	+	6. pes equinovarus	-	-
		7. veleszületett csípőficam	+	-
		8. kisízületi hipermobilitás	+	+
		9. ín- és izomruptúra	-	-
		10. keratoconus	-	-
		11. gingivasorvadás	+	+
		12. korai életkorban kialakuló visszértágulatok	-	-

3.1.3.2 Bőrminták a III. kísérlethez

Mindhárom vizsgált betegből, valamint két hozzájuk hasonló korú egészséges önkéntes nőtől (akik kontrollként szolgálnak) bőrbopsziát vettünk klinikánkon 4.0 milliméteres punch késsel. A betegek és az egyik kontroll bőrmintát formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk, majd szövettani feldolgozás történt. A nemlineáris mikroszkópai képalkotáshoz a blokkok deparaffinált, natív metszeteit használtuk. A szövettani vizsgálatokhoz H&E, Van Gieson- (VG), és Weigert féle elastica (WE) festéseket készítettünk szövettani laboratóriumunkban. További fixálatlan bőrbopsziás mintákat a 2. betegtől és a második egészséges önkéntestől PBS-ben hűtve tartottunk és szállítottuk. A mérésekhez tárgylemezre helyeztük a mintákat és fedőlemezzel fedtük őket. Utóbbi minták nemlineáris mikroszkópai vizsgálatát 1-3 órán belül az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontban elvégeztük. A III. kísérlethez etikai engedélyünk száma SE TUKEB 266/2015.

3.2 Ex vivo nemlineáris mikroszkópia elrendezés

3.2.1 I. és III. kísérlet

Az ex vivo nemlineáris mikroszkópiás méréseket az MTA Wigner FK Nemlineáris mikroszkópia laboratóriumában végeztük. Az TPF és SHG mérésekhez alkalmazott optikai elrendezésben egy széles hullámhossz tartományban hangolható, femtoszekundumos impulzusüzemű Ti-zafír lézert (*FemtoRose 100TUN NoTouch*, R&D Ultrafast Lasers Ltd, Budapest, Magyarország) ~ 796 nm centrális gerjesztési hullámhosszal használtunk. A Ti:S lézer közel transzformáció-limitált, ~190 fs hosszúságú impulzusokat generált ~76 MHz ismétlési frekvenciával. A mintára eső lézersugarak átlagos teljesítménye a minta felszínén ~10-20 mW volt. 460/50 nm sáv szélességű emissziós szűrőt alkalmaztunk a TPF jel, míg 405/20 nm sáv szélességű szűrőt az SHG jel elkülönítésére.

A leképezést egy kereskedelmi forgalomban elérhető Axio Examiner LSM 7 MP lézer pásztázó multifoton mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Germany) TPF, SHG és CARS detektálása céljából egyedileg módosított optikájú változatával végeztük. A lézersugarak fókuszálására 20x-os nagyítású vízimmerziós objektívet alkalmaztunk (W-Plan – APOCHROMAT 20x/1,0 DIC (UV) VIS-IR, Carl Zeiss AG, Jéna, Németország). A maximális képalkotási terület 0,6 x 0,6 mm², míg a térbeli felbontás a x-y tengelyen ~0,5 µm, a z tengelyen pedig ~1,5 µm volt. Az egyes látóttereket kettes átlagolással 512 x 512 pixel felbontással képeztük le, míg a megfelelő látótterek kiválasztására 128 x 128 pixel felbontású pásztázást használtunk. Számítógép vezérléssel pozicionáltuk az objektívet a z-tengely mentén. Így különböző szöveti mélységekről készítettünk sorozatfelvételeket, ún. z-stack képeket, melyekhez precíz pozicionálás volt szükséges. Az első kísérletben minden BCC és kontroll mintáról három SHG és TPF z-stack sorozatfelvételt készítettünk, látóterenként 0.42 x 0.42 mm² területről. A harmadik kísérletben egy kontroll, valamint egy vEDS bőrmintáról történtek z-stack mérések, lévén, hogy ezeket csak a PBS-ben tartott mintákon lehetett kivitelezni. Ebben a kísérletben a többi minta négy-négy, 0.6 x 0.6 mm² méretű látóteréről készült képalkotás.

3.2.2 II. kísérlet

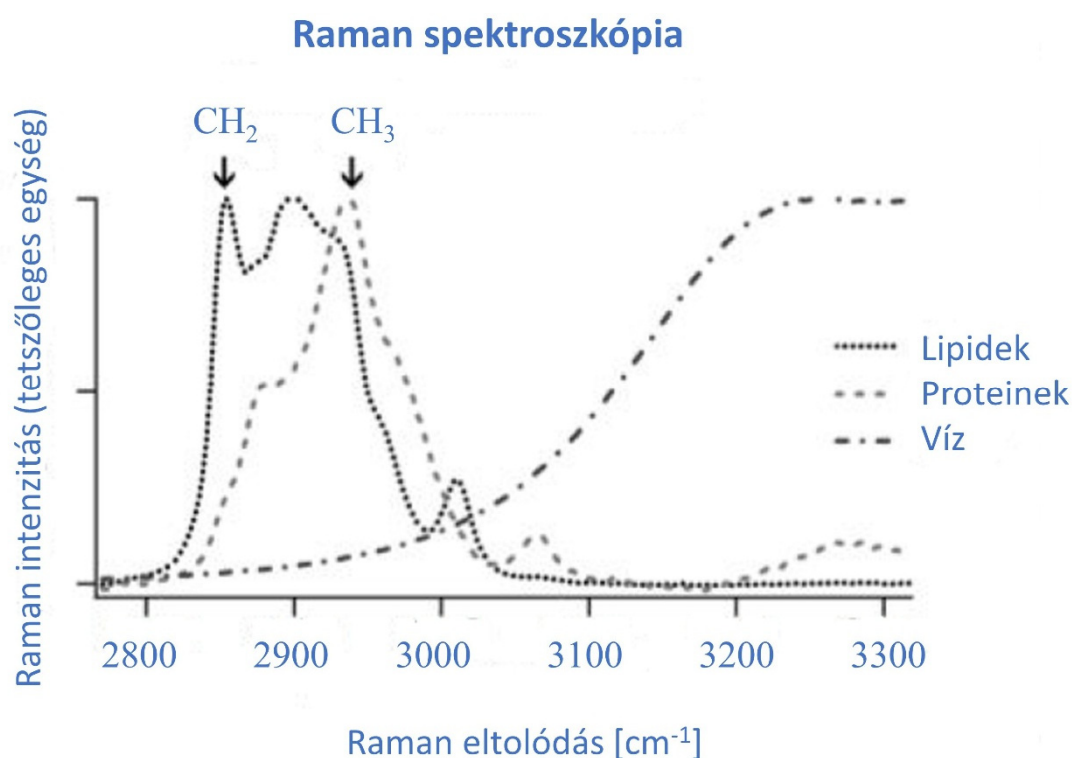
Az MTA Wigner FK és az R&D Ultrafast Lasers Kft. által korábban kifejlesztett optikai elrendezés (75, 151) blokkvázlata, melyet a CARS képalkotáshoz használtunk, a 3. ábrán látható. A CARS mérésekhez az I. és III. kísérlettel megegyező Ti-zafir lézert (*FemtoRose 100TUN NoTouch*) használtuk, mint pumpalézert (ω_p). A CARS jel előállításához egy további impulzusüzemű lézert, egy 1030 nm-en működő Yb szálerősítőt, mint „Stokes lézer”-t (ω_s , *CARS Stokes Unit*, R&D Ultrafast Lasers Ltd, Budapest, Magyarország), valamint egy – az egyes lézerek teljesítményét, polarizációját, impulzushosszát, időbeli késleltetését és térbeli átfedését szabályozó – *FemtoCARS Laser Unit*-ot (R&D Ultrafast Lasers Ltd, Budapest, Magyarország) alkalmaztunk (3. ábra). Amennyiben a két lézer impulzusai időben és térben átfednek, és a két lézer frekvenciájának különbsége megegyezik a gerjesztendő molekula megfelelő rezgési állapotának rezonancia frekvenciájával ($\Omega = \omega_p - \omega_s$), akkor a mikroszkóp objektív fókuszfoltjában létrejöhöz az adott molekuláris kötéstől származó anti-Stokes jel, melynek frekvenciája:

$$\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$$

CARS méréseink során is a testreszabott Axio Examiner LSM 7 MP lézer pásztázó multifoton mikroszkópunkat használtuk a „piros” optikai tartományba eső anti-Stokes jelek detektálására. Ez a „lipid” jelek esetében ~ 650 nm-es, míg a „fehérjék/DNS” esetében ~641 nm-es hullámhosszat jelentett. Az egér bőrmintákról horizontális síkban készítettünk képeket, míg az egészséges humán és BCC mintákból mind horizontális, mint vertikális síkban történt képalkotás több különböző nagyítás alkalmazásával.

A II. kísérlet során festés nélküli hisztopatológia vizsgálatokhoz optimalizáltuk a CARS képalkotó rendszerünket, mely fejlesztéshez kiindulási alapot a Harvard Egyetemről Freudiger és mtsi által közölt képalkotó rendszer nyújtotta (67). Eszerint a szöveti alkotókban található CH_2 valamint CH_3 csoportok eltérő vibrációs spektruma alapján generálhatók pszeudo H&E „festett” nem-lineáris mikroszkópos képek (3. ábra). Az ő képalkotó elrendezésükben az SRS mikroszkópiával generált CH_2 csoportok valamint a CH_3 és CH_2 csoportok különbségi képét ($[\text{CH}_3] - [\text{CH}_2]$) fuzionálták. Ez a munkacsoport az SRS mikroszkópiához pikoszekundumos impulzushosszal üzemelő duális hullámhosszú lézerrendszert alkalmazott, melynek spektrális sáv szélessége közel megegyezett a gerjesztetni kívánt CH_2 és a CH_3 csoportok vibrációs rezonancia

sávszélességével. Ugyanakkor a saját fejlesztésű CARS képalkotó rendszerünkben a pumpalézer és a Stokes lézer jellemző impulzushossza a 150 – 180-as fs tartományban van [7] - mivel eredetileg kétfoton képalkotó rendszerhez készültek. Ennek következtében a mérések során alkalmazott lézereink spektrális sávszélessége, félértékszélessége (full width at half maximum, FWHM) a 5 - 6 nm tartományban mozog. Így a CARS képalkotó rendszerünk spektrális felbontása megközelítőleg ötöd akkora, mint a hivatkozott SRS rendszeré, ugyanakkor rövidebb impulzusainak köszönhetően jelszintje kb. ötszöröse az említett ps-os rendszerének.

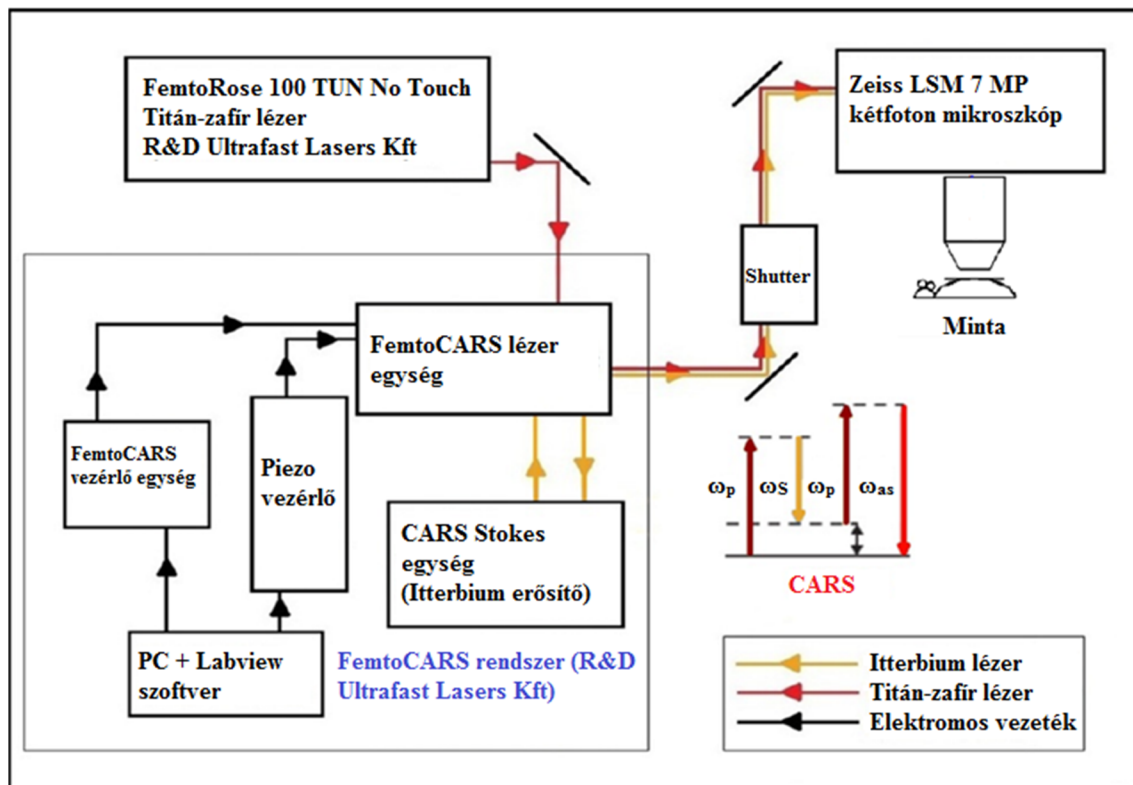


3. ábra. A lipidek, a proteinek és a víz Raman spektruma (67).

Egy keskeny (~ 1-2 nm) sávszélességű elrendezésben, ha a Stokes impulzusokat 1030 nm hullámhosszal generáljuk az Yb szálerősítőben, a pumpa lézer (esetünkben Ti:S lézer) centrális hullámhosszait 791 nm-re és 796 nm-re célszerű állítani, hogy a CH₃ és a CH₂ csoportok optimális gerjesztését érjük el. A gerjesztési spektrumok részleges átfedéséből, valamint a mi lézereink 5-6 nm tipikus spektrális sávszélességéből adódóan kísérletünk során 790 nm („proteinek”) és 800 nm („lipidek”) hullámhossz értékeket állítottunk be a duális vibrációs rezonancia frekvencia (DVRF) CARS mérésekhez. A proteinek és a

fehérjét részlegesen átfedő gerjesztési spektrumán felül egy további faktor, a nemrezonáns háttér tovább csökkenti a mérések kémiai szelektivitását. Utóbbi leginkább a vízmolekulák nem-rezonáns gerjesztéséből származik. A 790 nm és 800 nm hullámhosszakon felvett DVRF CARS képeink ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Egyesült Államok) szoftverrel történő feldolgozása során a kémiai szelektivitás nagymértékben növelhető volt, ha a két hullámhossz képeit kivontuk egymásból. Így a hullámhossztól független nemrezonáns háttér eltüntethető és a „protein” és „lipid” képek kontrasztja jelentősen emelhető. Ennek eredményeképpen két képet állítottunk elő: egy „lipid” és egy „protein” képet. A két kép előállításánál a képkivonások elvégzését megelőzően beállítottunk egy, az adott képhez optimális, legtöbbször 0,9-1,1 közötti tartomány eső szorzófaktort annak érdekében, hogy minimalizáljuk a nem specifikus CARS (és autofluoreszcencia) háttérét. Ezzel a szorzófaktorral kompenzáltuk, hogy a lézerek impulzushossza, a lézer teljesítmény, valamint a pumpa és a Stokes lézerek időbeli szinkronizációjának mértéke nem volt teljesen azonos a két kép felvételekor. Itt fontos megjegyezni, hogy a képalkotás során a két kép felvétele között eltelt időt magas minőségű képek előállítása érdekében minimalizálnunk kellett. Ha több idő telt el, a fenti, szorzófaktorral kompenzált paraméterek változása mellett a vizsgált minta pozíciója is elmozdulhatott, akár a vertikális, akár a horizontális síkban. A minták elmozdulása a képfeldolgozást követően életlen, homályos képekhez vezetett. Korábbi kísérleteink során tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel fedett *ex vivo* humán bőrminták víz-immersziós mikroszkópiáját végeztük. A bőrfelszínnel párhuzamos síkok nemlineáris mikroszkópiai képalkotása során ez a módszer megfelelő eredménnyel járt. Ugyanakkor a vizsgált bőrmintán a bőrfelszínre vertikális síkban történő képalkotásra ez a módszer nem alkalmas, mivel így a fedőlemez és a minta túl kis felületen érintkezne. A vertikális síkban történő képalkotás azért lenne fontos, mert a konvencionális szövettani metszet vizsgálatakor ebben a síkban történik a szövettani értékelés. Utóbbi a vertikális síkban történő képalkotás során több látótér képeinek képalkotásával és ezekből történő mozaik kép készítésével valósulhat meg. Legújabb, konzulensem és az Szegedi Tudományegyetem kutatói által közösen, agyszeleteken végzett mérések szerint interferometrikus CARS (IF-CARS) technikákkal minimalizálható a „protein” és „lipid” beállítással történő expozíciók között eltelt idő (152). Ezt az IF-CARS fejlesztést a Szegedi Egyetemen az R&D Ultrafast Lasers Kft.

munkatársai végezték el, az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontéhoz nagyon hasonló CARS rendszeren. Ez a módszer nem csak az elmozdulásból fakadó képesség csökkenést előzi meg, hanem arra is lehetőséget ad, hogy folyamatos, videó képben lehessen pszeudo H&E festett szövettani képeket előállítani a jövőben. További előnye az IF-CARS rendszernek, hogy a pumpa-lézer spektrális sávszélességét is kb. harmadára, ~2-3 nm-re csökkenti, aminek következtében a CARS mérőrendszer spektrális felbontása is hasonló mértékben javul (152).



3. ábra. A koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS) képalkotáshoz használt kísérleti elrendezésünk. ω_p : pumpa lézer jele, ω_S : Stokes lézer jele, ω_{as} : anti-Stokes jel.

3.3 Képfeldolgozás és képanalízis módszerek

3.3.1 I. Kísérlet

3.3.1.1 Integrált optikai denzitás mérése

A NADH és az elasztin által keltett TPF jel, valamint a kollagén SHG jel intenzitásának méréséhez a felvett látóterek intenzitás értékeit integrált optikai denzitássá (IOD) konvertáltuk ImageJ szoftverrel (76). Az IOD-nak nincs mértékegysége, mivel pixel intenzitás értékekből számítható, így tetszőleges egység szerint (ún. arbitrary unit) értékeltük, melynek nagysága korrelál a kollagén mennyiségével.

3.3.1.2 Gyors Fourier transzformáció

A gyors Fourier transzformációt (fast Fourier transformation, FFT) a jelfeldolgozásban és mérési eredmények értékelésében számos területen használják. Az FFT-t a kollagén rostok rendezettségi fokának és szimmetriájának vizsgálata során is széles körben használják (153, 154, 144). Az SHG képeken FFT algoritmust használtunk, hogy az eredeti képek információtartalmát a matematikailag definiálható frekvenciatérbe konvertáljuk. A kapott kimeneti képen a pixelek eloszlási mintázata kifejezi a rostok együttállásának mértékét az eredeti képen (155). A pontos analízis érdekében a kimeneti képeket ún. power plot alakba konvertáltuk (156). A power plot-okra ellipszist illesztünk, melynek excentricitását kiszámolva megkaptuk a kollagén orientációs indexet (collagen orientation index, COI) a $COI = [1 - (kistengely/főtengely)]$ képlet alapján. Az ellipszis főtengelye az ellipszis leghosszabb húrja, míg a kistengely az annak felezőpontján állított merőleges húr. A COI a kollagén rostok elrendeződését írja le. Egy kör alakú power plot 0 közeli COI értékkel az egészséges bőr kollagén szerkezetét jellemzi, mely izotropikus, azaz térbeli iránytól független elrendeződést mutat. Egy hosszúkás alakú, magas excentricitású power plot-ra illesztett ellipszis, 1-hez közelítő COI értékkel parallel módon rendezett kollagén rostokra utal (144, 145). A kollagén rost tömörség (collagen bundle packing, CBP) a kollagén rostok periodicitását, az egyes rostok távolságát jelzi. A CBP-t a $CBP = 512 \cdot (1/h)$ képlet alapján számíthatjuk ki, ahol a h a FFT kép hisztogramján a két elsőrendű csúcs súlypontjai között mérhető távolság. (145). Az FFT képfeldolgozást és képanalízist ImageJ szoftver alkalmazásával végeztük.

3.3.1.3 Kollagén rost elemző algoritmusok alkalmazása

A Curvelet transzformáció és rostkivonás (curvelet transform and fiber extraction, CT-FIRE), valamint a CurveAlign algoritmusok (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, Wisconsin-Madison Egyetem, Madison, Wisconsin, Amerikai Egyesült Államok) Curvelet-alapú ún. framework-ök (szoftver keretrendszerek), amelyeket arra terveztek, hogy a kollagén szerkezetről lehessen velük információt gyűjteni. Mindkét szoftver a nyílt forráskódú MATLAB (MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) szoftverkörnyezetben fut (143). A CT-FIRE a filter alapú és a rostkeresési módszerek előnyeit ötvözi, hogy kivonja és analizálja a kollagén rostok tulajdonságait SHG képeken. A CT egy gyors diszkrét előfeldolgozó program, ami zajtalanítja a vizsgált SHG képet. A CT egy küszöbértéket alkalmaz ahhoz, hogy bináris képet állítson elő, majd ún. távolsági transzformációt végez. Miután ún. nukleációs pontokat képez a feldolgozott képeken, a kollagén rostokat azonosítja és a felismert kollagén rost hálózatot kirajzolja a képen (142). A FIRE ezt követően a CT kimeneti képén az egyes különálló rostokat azonosítja. A CT-FIRE így a beépített küszöbértéket képző, elő- és utófeldolgozó eszközei révén képes arra, hogy a különálló kollagén rostok mérhető tulajdonságait egyesével meghatározza (143).

A CurveAlign szoftvert arra a célra fejlesztették, hogy a kollagén rostok szerkezetét és tulajdonságait egy adott régióban egyben értékelje. Nem különálló rostokat vizsgál, hanem a rostok elrendeződését és egymáshoz való viszonyukat összességében vizsgálja (157).

A CT-FIRE (v1.3) és a CurveAlign (v4.0) algoritmusokat testreszabtuk és optimalizáltuk a vizsgált paramétereiket a BCC és az ép bőrminták vizsgálatára. Ezt olyan módon végeztük el, hogy a kimeneti képeken ellenőriztük, hogy mely beállítások mellett ismerik fel leginkább az algoritmusok a kollagén rostokat, míg eljutottunk az optimális rostfelismeréshez. A CT-FIRE beállítások az alábbiak voltak: a felismert kollagén rostok hosszának és szélességének minimális pixelszámát 100-ra, illetve 15-re állítottuk. A beállított hisztogram bin szám 10, míg a kirajzolt kollagén szálak vastagságának, mely 0-2 között módosítható, 1-et választottunk. Engedélyeztük az egymáson áthaladó (ún. overlaid) kollagén szálak felismerését. A CurveAlign algoritmushoz az együtthatók arányát az alapértelmezett 0,001-ről 0,005-re módosítottuk. Ezt követően lefuttattuk a

nyers SHG képeken az algoritmusokat. Az utóbbi változókat határoztuk meg: a kollagén rostok hossza, bezárt szöge, szélessége, egyenessége (CT-FIRE); a rostok orientációja és együttállása (CurveAlign). A CT-FIRE a rosthosszat euklideszi távolság szerint számította pixeleken a kollagén rost teljes hosszában. A bezárt szöget a szoftver úgy számította, hogy azt az abszolút szöget vette, melyet a rost a két végpontját összekötő egyenessel bezárt. A kollagén rost szélesség kalkulációjakor a rost teljes hosszúságában a rostszélesség pixelszámának átlagát számította ki a szoftver. A kollagén rostok egyenességének számszerűsítéséhez az egyes rostok két végpontjának távolságát a szoftver elosztotta a rosthosszal (158). A CurveAlign a rostok orientációját az egyes rostok a horizontális sikkal bezárt szöge szerint számítja, mely így 0 és 180° között lehet. A rostok együttállásának számításához a CurveAlign a rostok egymással bezárt szögét kettővel megszorozza, hogy az orientáció $[0-2\pi]$ tartományához igazodjon, majd az együttállási koefficiens az orientációs vektorok normalizált összegeként számítja ki. Az együttállási koefficiens értéke 1 lenne, ha minden rost párhuzamosan helyezkedne el egymással. Az alacsonyabb, 0-hoz közelítő értékek véletlenszerűen elrendeződő rostokat jelölnek. Más szóval az együttállási koefficiens a kollagén rostok orientációjának diszperzitását fejezi ki (159).

3.3.1.4 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) szoftverrel végeztük. A BCC és az egészséges minták adatait Student-féle t-tesztel hasonlították össze, miután a normal eloszlást F-tesztel igazoltuk. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték $< 0,05$ volt.

3.3.2 II. Kísérlet

A II. kísérlet során nem történt kvantitatív képanalízis, itt az előállított képeket morfológiai szempontok szerint értékeltük.

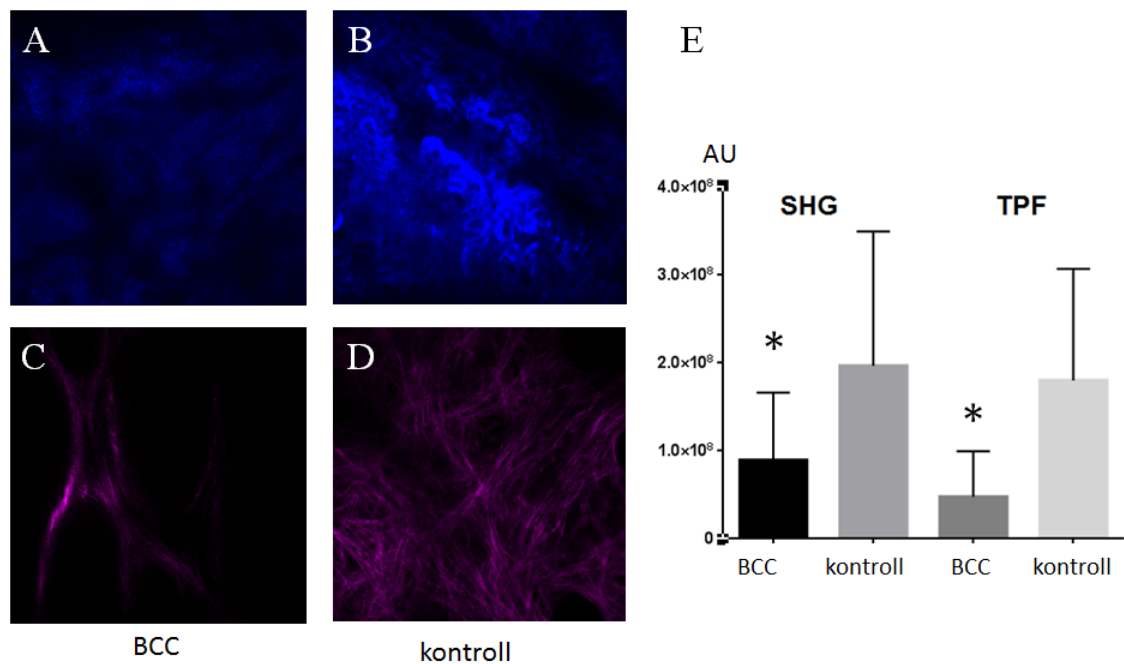
3.3.3 III. Kísérlet

A kollagén és az elasztin mennyiségét az SHG, illetve a TPF jelek alapján történő IOD számítással számszerűsítettük, melyhez ImageJ szoftvert használtunk. A 3D SHG képeket ZEN szoftverrel (Carl Zeiss AG, Jéna, Németország) állítottuk elő.

4. Eredmények

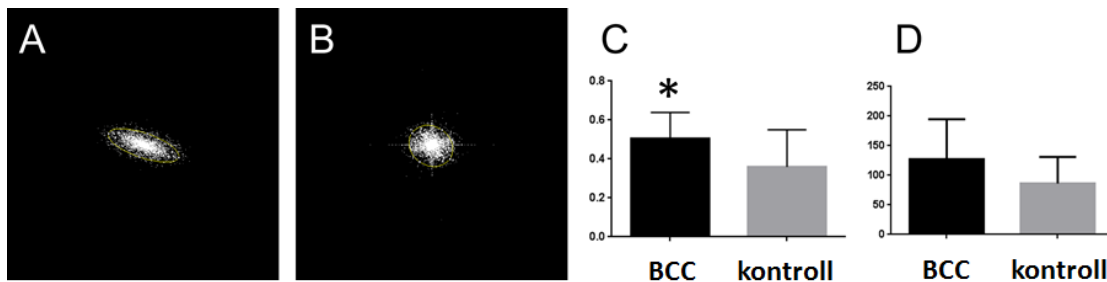
4.1 I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képalkotás során BCC azonosítására

Az első kísérletben a BCC képeken mért SHG és a TPF jelek IOD értékei egyaránt szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a vizsgált egészséges bőrmintákéi. Itt megfigyelhető volt, hogy ahol a tumorsejtek vannak jelen a dermiszben, ott nem keletkezik SHG jel, csak a tumorsejteket körülvevő kötőszövetben és a környező ép dermiszben. A tumorsejtek által adott NADH jel is lényegesen alacsonyabb intenzitású, mint az ép dermiszben az elasztin rostok TPF jele (4. ábra).



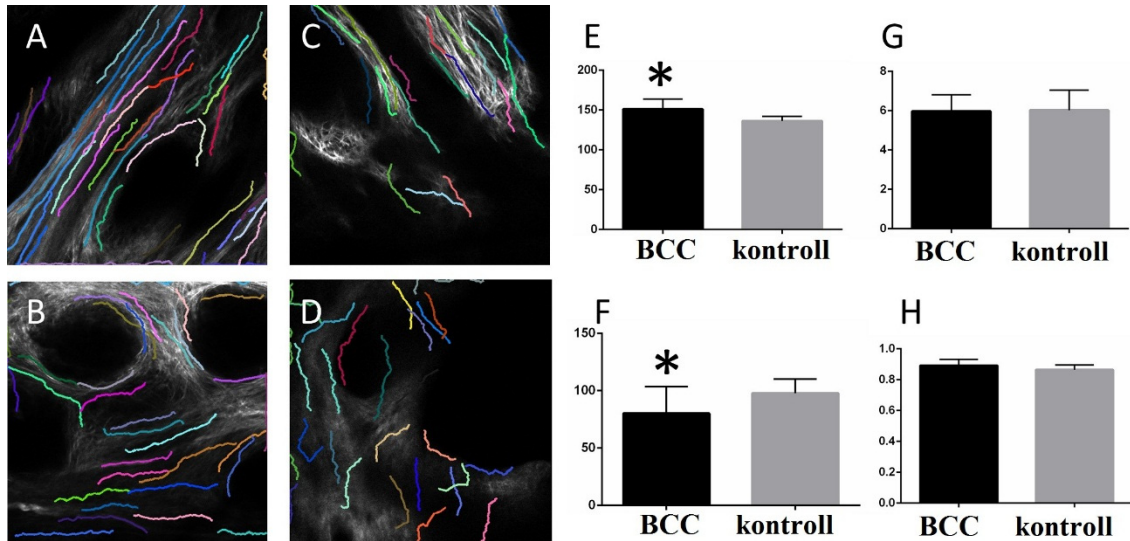
4. ábra. Bazálsejtes karcinóma (BCC) és egészséges bőrminták (kontroll) kétfoton-abszorpciós fluoreszcencia (two-photon absorption fluorescence, TPF) és másodharmonikus keltés (second harmonic generation, SHG) képei. A, B: TPF; C, D: SHG; A, C: BCC; B, D: kontroll; E: A BCC és a kontroll bőrminták ImageJ szoftver által számolt integrált optikai denzitása. A hibasávok standard deviációt jelölnek, * $p < 0.05$. A képek mérete $420 \times 420 \mu\text{m}^2$.

Az FFT transzformált SHG képek vizsgálatakor a BCC mintákban szignifikánsan magasabb COI értékeket találtunk, mint a kontroll mintákban. Ez arra utal, hogy a BCC mintákban a kollagén rostok kevésbé véletlenszerű elrendeződésűek, mint az egészséges bőrben. Ugyanakkor a CPB értékekben nem találtunk szignifikáns különbséget, tehát a kollagén rostok tömörségben nem, csak az elrendeződésben mutat a BCC eltérést (5. ábra).



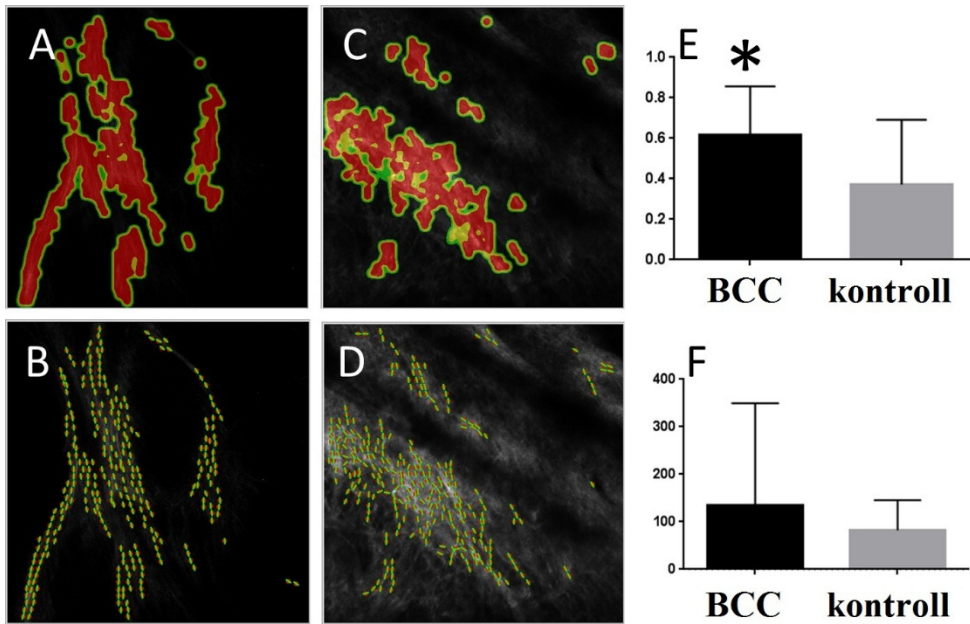
5. ábra Bazásejtes karcinóma (BCC) és egészséges bőrminták (kontroll) másodharmonikus keltés (second harmonic generation, SHG) képeinek gyors Fourier transzformált power plot képei és azok analízise. A: BCC, B: kontroll C: kollagén orientációs index; D: kollagén rost tömörség. A hibasávok standard deviációt jelölnek, * $p < 0.05$.

A CT-FIRE algoritmussal végzett különálló kollagén rost analízis során hosszabb kollagén rostokat és az egyes kollagén rostok által bezárt kisebb szögeket találtunk a BCC mintákban a kontroll bőrhöz képest (6. ábra). A kollagén rostok szélességében és egyenességében a CT-FIRE nem azonosított jelentős különbségeket a BCC és a normál bőr között.



6. ábra. Bazálsejtes karcinóma (BCC) és egészséges bőrminták (kontroll) másodharmonikus keltés képeinek CT-FIRE algoritmussal végzett kollagén rost azonosítás kimeneti képei és azok kiértékelt paraméterei. **A, B:** BCC; **C, D:** kontroll; **E-H:** A CT-FIRE algoritmussal végzett értékelés eredményei, a kollagén rostok különböző paraméterei: **E:** rosthossz, **F:** rostok bezárt szöge, **G:** rostok szélessége, **H:** rostok egyenessége. A hibasávok standard deviációt jelölnek, * $p < 0.05$. A képek mérete $420 \times 420 \mu\text{m}^2$.

A CurveAlign szoftver szignifikánsan magasabb kollagén rost együttállási coefficientet detektált a BCC mintákban az egészséges bőrhöz képest (7. ábra). A kollagén rost orientáció értékeknek a BCC mintákban igen nagy volt a standard deviációja. Ebben a paraméterben nem volt szignifikáns különbség észlelhető a BCC minták és a normál bőr között.

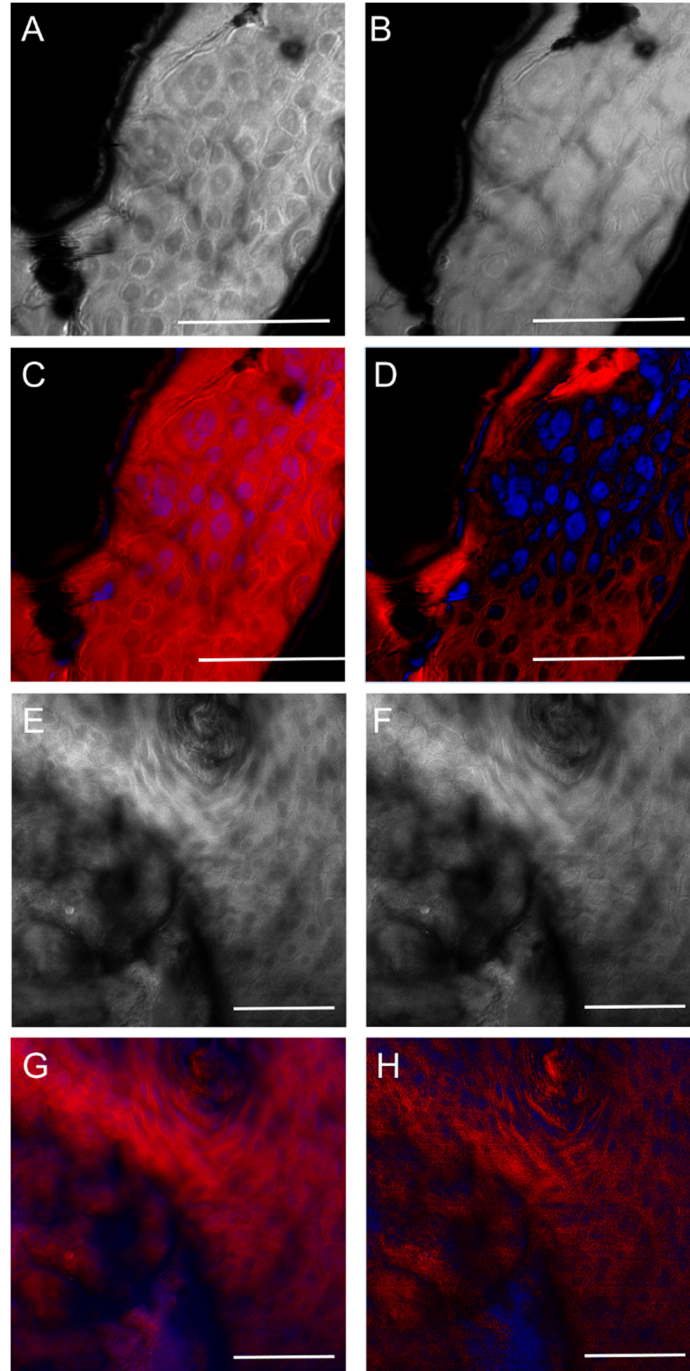


7. ábra. Bazásejtes karcinóma (BCC) és egészséges bőrminták (kontroll) másodharmonikus keltés képeinek CurveAlign algoritmussal feldolgozott kimeneti képei és analízise. A, C: kollagén rost együttállás hőterképe; B, D: kollagén rost orientáció azonosítása; E: kollagén rost együttállási koefficiens F: kollagén rost orientáció. A hibasávok standard deviációt jelölnek, $*p < 0.05$. A képek mérete $420 \times 420 \mu\text{m}^2$.

4.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával

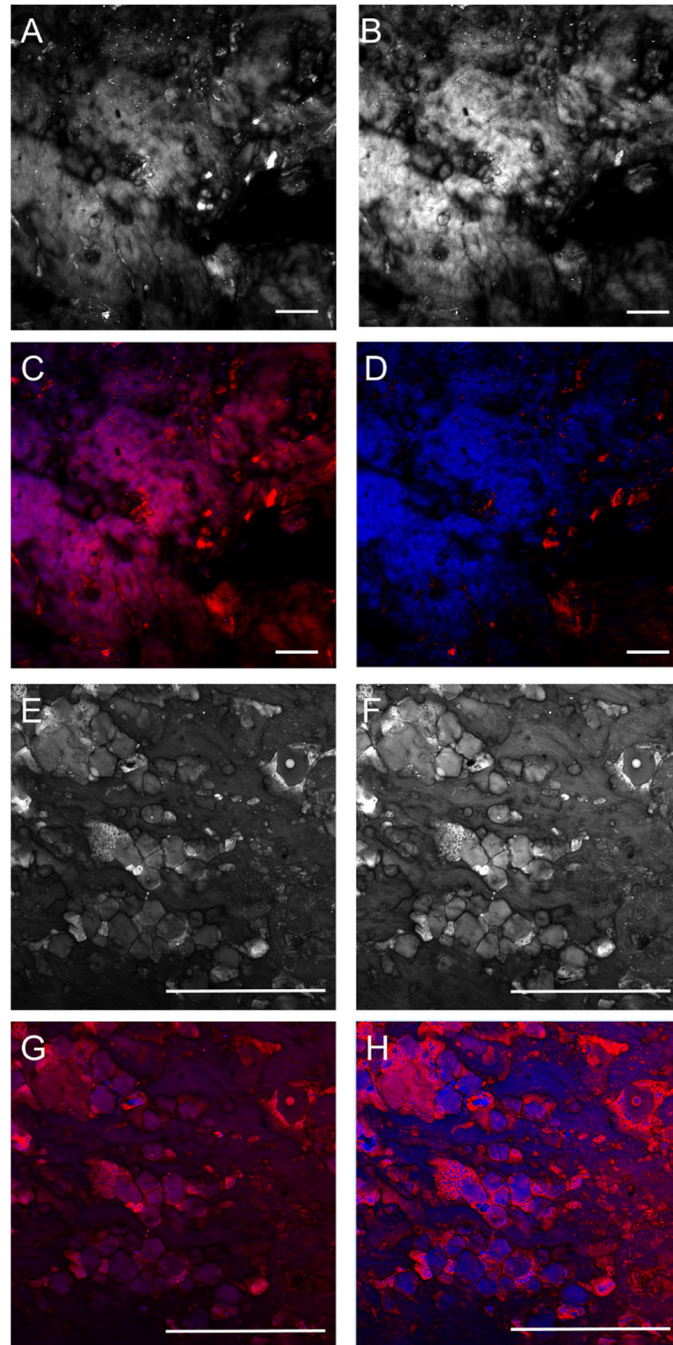
Nagyszámú *ex-vivo* DVRF CARS felvételt készítettük mind az ép egérbőrrel és mind a humán egészséges bőr és BCC mintákról. Az ezekről készített „lipid”, „protein”, valamint kétféle képfeldolgozási mechanizmussal készített pszeudo H&E „festett” képeket az 8. és a 9. ábrán mutatjuk be. A képeken megfigyelhető a jelentős különbség a CH₃ (8-9. ábra A, E panelek) és a CH₂ hullámhossz beállításokkal felvett képek között (8-9. ábra B, F panelek). Az ábrákon egyúttal bemutatjuk a Freudiger és mtsai. által korábban bevezetett képfeldolgozási algoritmussal (8-9. ábra C, G panelek), és az új, saját fejlesztésű utófeldolgozási algoritmusunkkal készített képek közötti különbséget is (8-9. ábra D, H panelek). Az utóbbi két képfeldolgozási módszerrel előállított képeken az áttekinthetőség és összehasonlíthatóság kedvéért megegyező színezést alkalmaztunk, az adott módszer „lipid” csatornáját piros színnel, míg a „protein” csatornát kék színnel jelöltük.

Az 8. ábrán egér (A-D) és human epidermisz (E-H) DVRF CARS képei láthatók. A D panelen a keratinociták kék színnel látszódnak magjai jól kivehetők, míg a citoplazmáik piros színnel mutatkoznak. Megjegyzendő, hogy egyes sejteknek a sejtmagjai nem jelennek meg a képen, habár a „lipid”, és „protein” képeken még láthatók voltak. Az E-H paneleken vertikális emberi epidermisz képei láthatók. Ezekben a képeken a sejtmagok kevésbé kivehetők és az egyes sejtek határai nehezen elkülöníthetők. A H panel képe valamelyest életlen, amelynek háttérében a minta a 790 nm és 800 nm pumpalézer paraméterekkel felvett képek készítése közötti kismértékű elmozdulása állhat. Ez a Módszerek fejezetben ismertetett okból a vertikális képalkotás velejárója lehet.



8. ábra Egér (A-D) és human (E-H) epidermisz horizontális (A-D) és vertikális (E-H) síkban készített CARS képei. A, E: CH₂ csatorna képei; B, F: CH₃ csatornai képei; C, G: Freudiger és mtsai. szerinti képfeldolgozással készített kétcsatornás kép (vörös: CH₂, kék: [CH₃] - [CH₂]); D, H: kétcsatornás kép a saját képfeldolgozási módszerünkkel (vörös: [CH₂] - [CH₃], kék: [CH₃] - [CH₂]). A skála (scale bar) 50 μm-t jelöl.

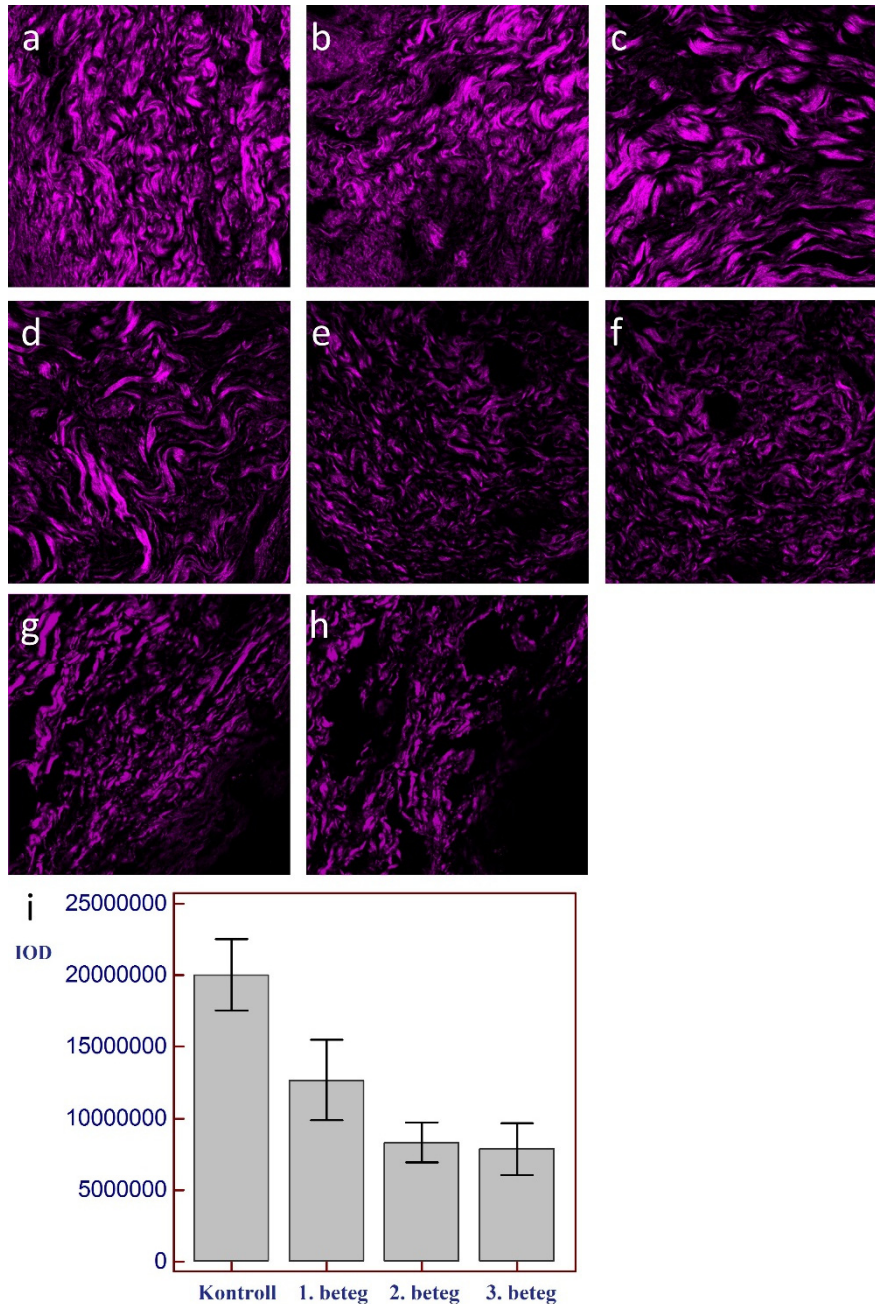
A 9. ábrán egészséges emberi dermisz (A-D) és BCC (E-H) CARS képei szerepelnek a 8. ábrával megegyező panel elrendezésben. A D panel bemutatja, hogy az irha nagyrészt kollagénben gazdag kötőszövetből áll, mely protein természetéből adódóan kék színnel mutatkozik a DVRF CARS képalkotáskor. A H panelen szabálytalan alakú és méretű tumorsejt fészkek figyelhetők meg, melyeket a tumor strómájának kollagén rostjai veszik körül, amik kék színnel jelölődnek. Ez a morfológia az infiltratív típusú BCC-re jellegetes, melyet a képalkotás után a konvencionális szövettani feldolgozást követően a szövettani leletezés is igazolt.



9. ábra. Egészséges humán dermisz (A-D) és bazálsjtes karcinóma (E-H) horizontális síkban készített CARS képei. A, E: CH_2 csatorna képei; B, F: CH_3 csatornai képei; C, G: Freudiger és mtsai. szerinti képfeldolgozással készített kétcsatornás kép (vörös: CH_2 , kék: $[\text{CH}_3] - [\text{CH}_2]$); D, H: kétcsatornás kép a saját képfeldolgozási módszerünkkel (vörös: $[\text{CH}_2] - [\text{CH}_3]$, kék: $[\text{CH}_3] - [\text{CH}_2]$). A skála (scale bar) $50 \mu\text{m}$ -t jelöl.

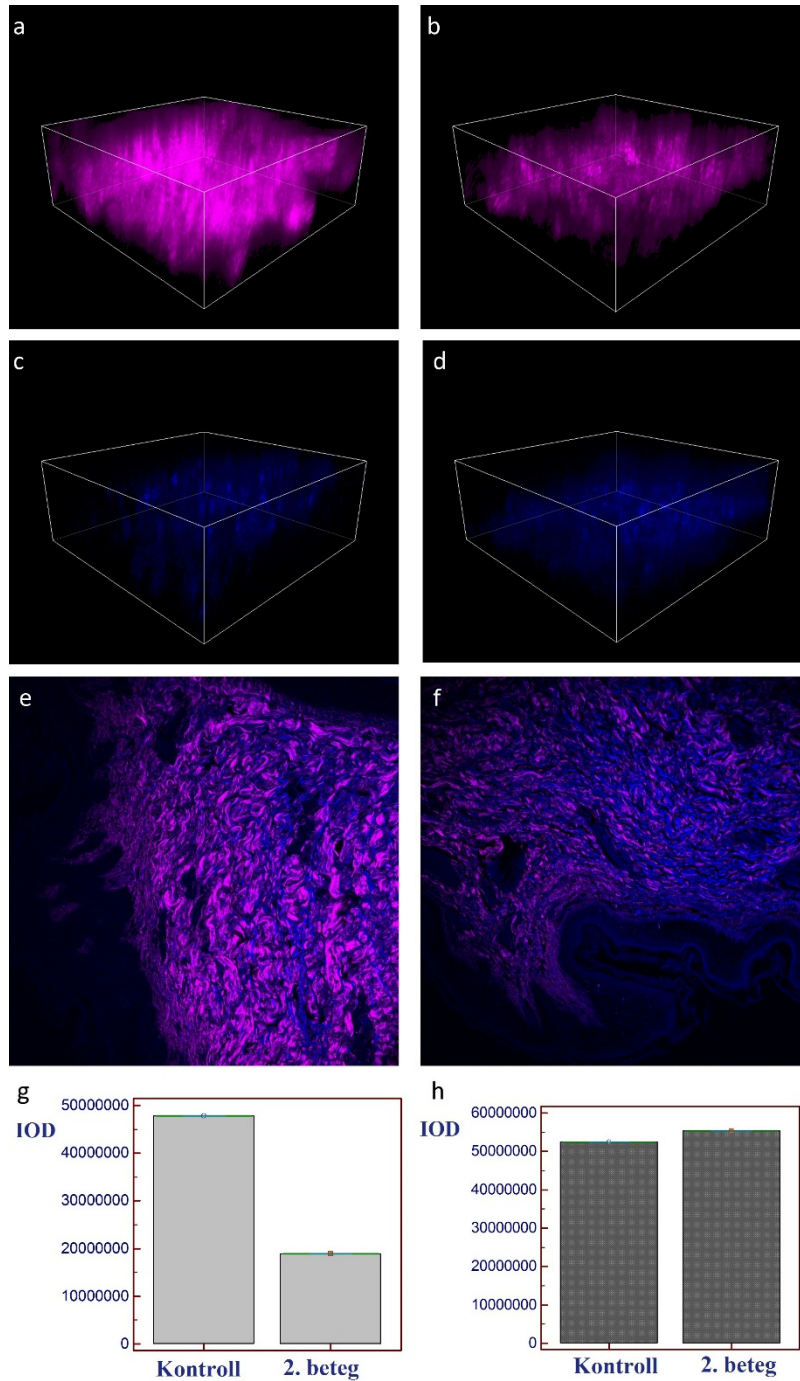
4.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére

Az cEDS-ben és vEDS-ben szenvedő betegek és egészséges kontroll személyek retikuláris dermisz kollagén szerkezetének összehasonlítása horizontális síkban készült SHG képeken a 10. ábrán látható. Az A és B paneleken láthatók az egészséges retikuláris dermisz jellegzetes SHG képei, mely kollagén rostokkal igen dúsán átszótt. Ezzel szemben az EDS betegek bőrmintáin irreguláris szerkezetű, helyenként töredezett, laza kollagén rost hálózat figyelhető meg (C-H panelek). Különösen a vEDS betegekben rendkívül laza szerkezetű, különböző méretű és alakú kollagén rostok láthatók, melyek rendezetlen szerkezetet mutatnak (E-H panelek). A cEDS-ben érintett beteg dermiszében az ép bőrre emlékeztető, vastagabb kollagén rostok is jelen vannak. Ezeket a rostokat azonban vékony, töredezett kollagén rostok veszik körül (C, D panelek), melyek a vEDS betegek bőrének kollagén rostjaihoz hasonlítanak. Az IOD értékek, melyek az ép kollagén mennyiségével korrelálnak jelentősen nagyobbak az egészséges bőrben, mint az EDS betegek bőrmintáiban. A két vEDS beteg mintáinak IOD-je hasonló értékeket mutat és még valamelyest alacsonyabb, mint a cEDS bőrmintáé. Ugyanakkor statisztikai analízis ebben a kísérletben nem volt végezhető, mivel a vizsgált betegek száma túl alacsony volt.



10. ábra. *Ex vivo* egészséges humán bőr és klasszikus, valamint vaszkuláris Ehlers-Danlos szindrómában (EDS) szenvedő betegek bőrének horizontális síkban készült másodharmonikus keltés (second harmonic generation, SHG) képei a retikuláris dermisz kollagén tartalmának megjelenítésére. A, B: egészséges humán bőr; C, D: 1. beteg, klasszikus EDS; E, F: 2. beteg, vaszkuláris EDS; G, H: 3. beteg, vaszkuláris EDS. A képek mérete $150 \times 150 \mu\text{m}^2$. I: az SHG képek ImageJ szoftverrel meghatározott integrált optikai denzitás (IOD) értékei, mely az ép kollagén mennyiségével korrelál.

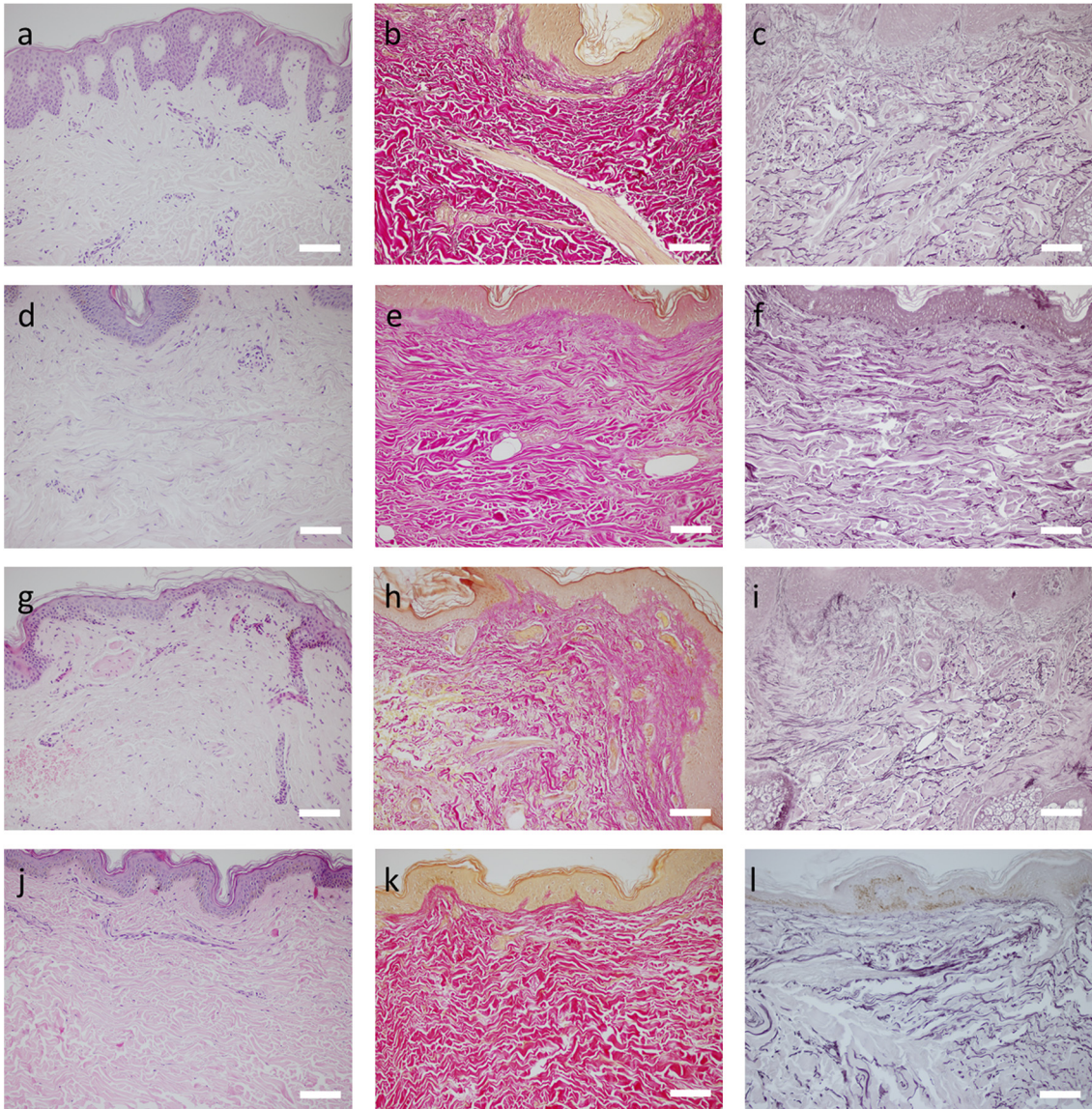
A 11. ábra A és B paneleken z-stack képeken 3D-ben látható, hogy a normál bőrhöz képest a vEDS-ben érintett 2. beteg bőrének kollagén denzitása jelentősen csökkent. IOD értéke kevesebb, mint fele a kontroll bőr IOD értékének (G panel). Ezzel szemben, az elasztin tartalom hasonló a kontroll bőrben (C panel) és a vEDS beteg bőrében (D panel). Ezt a közel megegyező IOD értékek is alátámasztják (H panel) és az E-F panelek is szemléltetik, melyeken a kontrollal összevetve vEDS-ben jól látható a laza kollagén szerkezet a megtartott elasztin tartalom mellett.



11. ábra. Egészséges bőr és vaszkuláris EDS-ben (vEDS) érintett beteg bőrnek elasztin-, és kollagén szerkezetének kétfoton-abszorpciós fluoreszcencia (two-photon absorption fluorescence, TPF), valamint másodharmonikus keltés (second harmonic generation, SHG) képei. a-d panelek: z-stack képek háromdimenziós képekké konvertált változata. Az SHG jel (magenta színnel) a dermisz kollagén tartalmát mutatja, míg a TPF jel (kék színnel) az elasztin tartalmát. e, f panelek:

SHG és TPF módszerekkel készült felvételek egyesített képei. a, c, e panelek: egészséges human bőr. b, d, f panelek: a 2. beteg (vEDS) bőre. A képek mérete a következő: a-d panelek: $600 \times 600 \mu\text{m}^2$; e, f panelek: $424 \times 424 \times 160 \mu\text{m}^3$. g, h panelek: ImageJ szoftverrel mért integrált optikai denzitás (IOD) értékek, g: kollagén; h: elasztin.

A 12. ábrán bemutatjuk az egészséges bőr és mindhárom beteg különböző hagyományos festéssel készült szövettani képeit, hogy a nemlineáris mikroszkópiai képekkel összevethetővé tegyük a szövettani elváltozásokat. A H&E festett szövettani képek az A, D, G, J paneleken, a VG festéssel készített képek, melyek a kollagén szerkezetet mutatják a B, E, H, K paneleken látszanak, míg az elasztin szerkezetet mutató WE festés a C, F, I, L paneleken látható. A H&E festett képeken nem különíthetők el az egyes kötőszöveti alkotók, és a rostszerkezet eltérései nem szembetűnők. A VG festett metszeteken látható a megváltozott kollagén struktúra az EDS betegek bőrében a kontroll bőrhöz képest, különösen a vEDS betegek esetében. Végül, a WE festés hasonló elasztin szerkezetet mutat mind az az egészséges bőrben, mind az EDS betegek bőrében.



12. ábra. Egészséges emberi bőr és Ehlers-Danlos szindrómában (EDS) szenvedő betegek bőrének különböző festésekkel készült szövettani képei. a-c panelek: egészséges bőr; d-f panelek: 1. beteg, klasszikus EDS; g-i panelek: 2. beteg, vaszkuláris EDS; j-k panelek: 3. beteg, vaszkuláris EDS. a, d, g, j panelek: hematoxinilín és eozin festés. b, e, h, k panelek: Van Gieson festés. c, g, i, l panelek Weigert féle elastica festés. A bemutatott reprezentatív látóterek 200x-os nagyításúak. A skála (scale bar) 100 μm -t jelöl.

5. Megbeszélés

A BCC sebészi kezelése során a daganat egészének eltávolítása rendkívül fontos a későbbi kiújulás elkerülése céljából. Egyes esetekben ez igen jelentős kihívást okozhat a műtétet végző orvos számára, különösen, ha nehezen ítéltető meg a daganat és az ép szövetek határa [169]. Ugyanakkor a BCC rendkívül alacsony átétképző hajlamát figyelembe véve, a tumor eltávolításánál az is lényeges szempont, hogy egészséges bőrt ne távolítsunk el feleslegesen. Ennek az arc esztétikailag kiemelt szerepű területein – mint a nazális, periorbitális és periaurikuláris régiókban – kiemelt jelentősége van.

A jelen dolgozat bevezető részében bemutatott különböző, a bőrgyógyászati gyakorlatban alkalmazható képalkotó modalitások a BCC vizsgálata során egymást jól kiegészíthetik. Ezek közül egyre több módszernél áll rendelkezésre hatékonyan alkalmazható kvantitatív értékelés is. Dermatoszkópia alkalmazásával könnyedén és gyorsan áttekinthető számos bőrképlet. A digitális dermatoszkópiával készített képek automatizált kvantitatív értékelésére rendelkezésre állnak különböző módszerek, mind BCC, mind pigmentált képletek azonosítására (160-162). A relatív nagy behatolási mélységgel rendelkező HFUS esetén is azonosítottak olyan kvantitatív paramétereket, melyek BCC-re jellemzők. Ezzel a technikával a tumor mélységi terjedése is jól megítélhető (163). 2016-ban jelent meg közlés egy olyan automatizált módszerről, mely OCT képek különböző jellegzetességeit gépi tanulás technika alapján elemzi ki BCC detektálása érdekében. Ennek a technikának jelentős hátránya az igen hosszú, sok órás számítási időtartam (164). Az utóbbi évtizedben a klinikumban az RCM-et is alkalmazni kezdték a BCC diagnosztikus eszköztára részeként. Ugyanakkor, egyelőre standardizált diagnosztikus kritériumok nem állnak rendelkezésre, és valós klinikai környezetben az RCM hatékonyságát alátámasztó vizsgálatok eredményei nem mindig voltak reprodukálhatók (106). Míg az utóbbi években számos közlemény jelent meg kvantitatív analízis módszerek alkalmazásáról BCC vizsgálatára különféle nem-invazív diagnosztikus modalitások esetén, beleértve a digitális dermatoszkópiát, a HFUS-t és az OCT-t, hasonló analízisek nemlineáris mikroszkópia esetén ez idáig nem történtek.

Egyes kutatócsoportok már jelentős erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy különböző daganatos betegségek diagnosztikájára adaptáljanak nemlineáris optikai képalkotó módszereket. Ezek között kiemelt jelentőségű a technika dermatoonkológiai alkalmazhatóságának a fejlesztése is. A bőrdaganatok, így a BCC terjedésének egyik

kulcsfontosságú lépése a bőr kötőszövetének degradációja, amely legnagyobb mértékben az I. típusú kollagént érinti és SHG módszerrel szelektíven láthatóvá tehető. Több kutatás bizonyította, hogy az SHG és a TPF mikroszkópia kombinált alkalmazása a BCC vizsgálata terén is számos lehetőséget rejt. Ezek a lehetőségek abból adódnak, hogy míg a TPF módszerrel megjeleníthetők a tumorsejtek, addig az SHG képen láthatóvá válik a tumor körüli kötőszövetet és ennek az átépülése (165).

Lin és mtsai. BCC szövettani metszetek vizsgálata során kimutatták, hogy a kollagénből származó SHG jel jelentősen alacsonyabb intenzitást mutat a daganatsejt-fészkekben és a daganat strómában, mint az ép dermiszben (165). Mivel az SHG csak a szabályos szerkezetű kollagén rostokból származik, ez az eredmény összeeseng azokkal a Raman spektroszkópiával kapott adatokkal, melyek alapján a BCC strómájában található kollagén rostok biokémiai szerkezete eltér az ép kollagénétől (166).

Paoli és mtsai. TPF technikával öt spinocelluláris karcinóma (squamous cell carcinoma, SCC), valamint hat szuperficiális BCC és három noduláris BCC morfológiai jellemzőit vetették össze *ex vivo*, frissen kimetszett tumormintákon. A rutin szövettani vizsgálat során a szövettani diagnózis alapjául szolgáló jellegzetességeket sikerrel azonosították SCC és szuperficiális BCC esetén egyaránt. Azonban noduláris BCC esetén a három vizsgált, szövettanilag igazolt tumormintából csak egyben tudták a tumorsejteket detektálni (167).

Cicchi és mtsai. amellet, hogy *ex vivo* noduláris BCC, szuperficiális BCC és morfeiform BCC mintákat vizsgáltak TPF, SHG, valamint fluoreszcencia élettartam képalkotás mikroszkópiával (fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM). Vizsgálatukban azt találták, hogy a BCC mintákra a rövidebb hullámhosszok irányába eltolódott kétfoton emissziós spektrum jellemző. Emellet a kísérletek során négy noduláris BCC esetében a tumorok kimetszése előtt három-négy órával lokálisan ALA-t is alkalmaztak. A képalkotás során megfigyelhető volt, hogy mind a TPF, mind a FLIM esetében az ALA a tumorsejtekben növelte a jel intenzitását. Ez abból adódik, hogy az ALA hatására protoporfirin IX akkumulálódik a tumorsejtekben, mely kontrasztanyagként szolgál (168). Ez a kutatócsoport egy további vizsgálatban BCC mellett melanoma TPF és FLIM spektrumát is összevetették az ép bőr spektrumával *ex vivo* mintákon. Ebben a kísérletben a TPF-et előnyösebb találták BCC elkülönítésére, míg a melanoma azonosítására a FLIM bizonyult alkalmasabbnak (169).

Egy újabb vizsgálatban Seidenari és mtsai. szuperficiális BCC, noduláris BCC, valamint naevus és melanoma mintákat *ex vivo* TPF és SHG technikával vizsgálták. A BCC mintákon hat különböző karakterisztikus nemlineáris mikroszkópai jellemvonást azonosítottak. Ezek közé tartoznak az összerendezett, hosszúkás alakú tumorsejtek, a paliszád jelleg, az egymás mellett elhelyezkedően két különböző irányba rendezett tumorsejtek, a kötőszöveti rostokkal körbevett és a rostokkal körbeszótt, ellapult tumorsejtek, valamint az ún. „fantom szigetek”, ahol a kollagén rostok üres, TPF jel nélküli tereket vesznek körül. Utóbbi jelenséget csak a BCC minták 31%-ában észlelték, azonban rendkívül specifikusnak találták. Ezt a jelenséget saját kísérleteink során ennél gyakrabban figyeltük meg. Összességében ebben a vizsgálatban a leírt jellegzetességek alapján a BCC-t 85%-os szenzitivitással és 100%-os specificitással tudták elkülöníteni az ép bőrtől és az egyéb mintáktól (96).

Ezek a korábbi vizsgálatok mutatják, hogy a TPF és SHG mikroszkópia a magas felbontású szöveti képalkotás biztosítása mellett igen ígéretes módszernek bizonyul a BCC vizsgálatában. Ugyanakkor ezekben a vizsgálatokban leginkább a tumorsejtfészek karakterisztikus jellemvonásait értékelték és a tumor körüli kötőszövet jellemzőinek részletes vizsgálata eddig nem történt meg.

Annak ellenére, hogy I. kísérletünkben szignifikánsan alacsonyabb IOD értékeket mértünk mind a főként a NADH-tól és az elasztintól származó TPF jel, mind a kollagén SHG jele esetén, az IOD-t kevésbé megbízható paraméternek tekintjük a BCC diagnosztikájában. Ennek oka, hogy az IOD értéke sok külső tényezőtől függ, mint az alkalmazott lézer gerjesztési intenzitása, a képalkotás mélysége és az epidermisz vastagsága. Mivel a kollagén szerkezet morfológiáját nem érintik ezek a külső tényezők, ennek értékelése a BCC kvantitatív vizsgálatában objektívebb módszer lehet. Emellett a tumor kötőszövetes strómájának analízise további adatokat szolgáltat a megfelelő biztonsági zóna meghatározásához.

Az SHG mikroszkópiával történő kollagén szerkezet képalkotás kvantitatív értékelésére különböző metódusokat írtak le az irodalomban, használták gyulladásoz bőrbetegségek és daganatos betegségek esetén is. (165). Az egyik ilyen, általunk is alkalmazott módszer a FFT transzformált képek analízise. Ezt a módszert különböző állatkísérletes modellekben már alkalmazták a kollagén szerkezet analízisére bőroregedés, sebgyógyulás és scleroderma vizsgálata esetén (170, 156, 145). Ezzel a módszerrel

vizsgálták egérmodellen Li és mtsai az interleukin-12 (IL-12) sebgyógyulásra gyakorolt hatását. A felvett SHG képeken öt darab, $108 \times 108 \mu\text{m}^2$ méretű, a sebszélektől legalább $500 \mu\text{m}$ -re elhelyezkedő képrészletet választottak ki. A vizsgált területek kiválasztást manuálisan végezték annak érdekében, hogy elkerüljék a szórtüszők területeit, ahol az SHG jel hiányzik. A kiválasztott képrészleteken FFT-t végeztek, majd meghatározták a COI értéket. A 0-hoz közeli érték mellett a kollagén rostok a seb körül kosárszerűen helyezkedtek el, mely az ép viszonyokhoz volt hasonló. 1-hez közelítő COI érték esetén viszont az adott területen a sebzés hatására a rostok egy bizonyos irányba rendeződtek, mely drasztikus változást jelent a kollagén szerkezetben. Vizsgálatuk során azt találták, hogy utóbbi hatás IL-12 adását követően kevésbé volt kifejezet (170). Ez az analízis egy másik kutatás során alkalmas volt a kronologikus és fény-indukálta bőröregedés hatásainak kimutatására és a két hatás elkülönítésére egérmodellben. Ebben a kísérletben a CBP-t, mint egy újabb paramétert is bevezették. A CBP alapján következtettek arra, hogy az egyes kollagén szálak milyen szorosán rendeződnek egymás mellé, a bőröregedés hatására jellemzően fellazul (145). A módszer lehetővé tette a morpheás, azaz rendellenes kollagén felszaporodást mutató bőrminták elkülönítését az egészséges bőrtől (171).

A saját vizsgálatunkban a COI BCC azonosítására is alkalmazható paraméternek bizonyult. A magasabb COI a BCC lokális progressziójának velejárója is lehet, mivel mellrák lokális inváziójának folyamatában is leírták a magasabb fokú kollagén rost orientáció jelentős szerepét (172). Így a kollagén rost orientáció értékelése akár egy jövőbeli módszer is lehet különböző tumorok lokális inváziós képességének vizsgálatára. A CPB érték viszont nem mutatott különbséget BCC-ben az ép bőrmintákhoz képest.

A további kvantitatív képanalízis módszerek közül a CT-FIRE algoritmus korábbi vizsgálatokban képes volt elkülöníteni mell- és hasnyálmirigyrákos szöveteket az egészséges szövetektől különböző paraméterek alapján. Testreszabást követően a CT-FIRE algoritmust BCC azonosítására is alkalmaztuk (142, 143). Drifka és mtsai. a mi eredményeinkhez hasonlóan szintén szignifikánsan magasabb kollagén rost hosszúságot és csökkent bezárt szöveget találtak, *ex vivo* hasnyálmirigyrák mintákat egészséges hasnyálmirigy szövetrel összevetve. Ugyanakkor, ők hasnyálmirigyrák esetén egyúttal megnövekedett kollagén rost szélességet és egyenességet is észleltek, ami a BCC minták esetén nem volt mérhető (143). Összefoglalva, eredményeink összhangban vannak

azokkal a korábbi adatokkal, melyek a kollagén rostok elrendeződésének jelentős átalakulását írják le BCC-ben (49, 165, 173).

A jövőben nyílt forráskódú gépi tanulás alapú szoftverkönyezeteket, mint a Weka (University of Waikato, Új-Zéland) és a PRTools (Delft University of Technology, Hollandia) lehetne alkalmazni annak érdekében, hogy az általunk alkalmazott algoritmusokat kifejezetten BCC detektálására fejlesszük tovább.

Multimodális képalkotás TPF, SHG és DVRF CARS együttes alkalmazásával is megvalósítható lehet. A tumorszélek meghatározása SHG mikroszkópia által is történhet, FFT, CT-FIRE CurveAlign és további kollagén rost elemző módszerek együttes alkalmazásával, akár automatizált módon. Ugyanakkor, CARS és TPF segítségével felmérhető az elváltozás típusa. A technikák alkalmazásával a megfelelő terápiás döntést követően jelölést alkalmazva célzottan történhet a sebészi kimetszés. Mivel a jelenlegi klinikai gyakorlatban hisztopatológiai leletezés világszerte H&E festett szövettani metszeteken történik, pszeudo H&E „festett” kép előállítására már önmagában is igen előnyös lehet a szövettani diagnózis alkotáshoz és a tumorszélek megítéléséhez. Ezt a feltevést jövőbeli klinikai vizsgálatok validálhatnák. Ilyen vizsgálatok elvégzése érdekében az alacsony ismétlésszámú, Yb-szállézer alapú kézi nemlineáris mikroszkópiai rendszerünk továbbfejleszhető DVRF CARS mérésekhez, és így pszeudo H&E kép előállítására BCC *in vivo*, valós idejű diagnosztikája céljából a jövőben (72). Ennek a mikroszkópos rendszernek a jelenleg elérhető rendszerek mellett további előnyei is lehetnek. A korábbi vizsgálatokban alkalmazott *in vivo* képalkotó eszközök esetén meglehetősen nehézkes a gerjesztő lézernyaláb bőrmintára irányítása, valamint a keletkező optikai jel detektálása. A használt eszközök nagyméretű vizsgálófeje problémát okoz a bőr nehezen hozzáférhető területeinek vizsgálata során. Jelenleg ezeknek az eszközöknek túl magas az ára és túl nagy a helyigényük ahhoz, hogy széles körben a bőrgyógyászati praxis részét képezzék (96). Saját fejlesztésű kézi *in vivo* nemlineáris optikai képalkotó eszközünk flexibilis, kisebb méretű vizsgálófejjel rendelkezik, költsége az eltérő technológiából adódóan alacsonyabb, valamint helyigénye kisebb (72). Jövőbeli célunk, hogy *in vivo* értékeljük ennek az eszköznek a hasznosságát és hatékonyságát a BCC diagnosztikájában és a sebészi tervezésében.

A disszertációban bemutatott vizsgálataink egyik korlátja volt, hogy mozaik képeket nem hoztunk létre az egyes látóterek képeinek összeillesztésével, nagyobb szöveti területek

áttekintése érdekében. Ennek oka egyrészt az volt, hogy a kísérletek idején nem állt rendelkezésre olyan léptetőasztal, mely a mozaik képek előállításához szükséges. Másrészt a DVRF CARS vizsgálatok esetén magas minőségű mozaik képek előállításához a képalkotó rendszerünk továbbfejlesztésére is szükség volna, olyan módon, hogy a két különböző hullámhossz beállítás között gyorsan, néhány másodperc alatt váltani lehessen. Így elkerülhető volna a képalkotás során a minta elmozdulása valamint a képalkotás időtartamának megnyúlása. Ez tulajdonképpen a korábban említett IF-CARS módszer megfelelő adaptációját jelenti az MTA Wigner FK Nemlineáris mikroszkópia laboratóriumában lévő CARS képalkotó rendszerünkön.

Összefoglalva, a nemlineáris mikroszkópia hatékony módszernek bizonyulhat a tumorszélek meghatározására a sebészi eltávolítás során. Így egyrészt hozzájárulhat a tumor kiújulás esélyének csökkentéséhez, másrészt lehetővé teszi a BCC kisebb biztonsági zóna mellett történő eltávolítását, kiváltképp az esztétikai szempontból fontos régiókban. A kapott képek automatizálható, digitális képanalízissel végzett értékelésének kidolgozása és gyakorlati szoftveres megvalósítása lehetőséget adna egy olyan diagnosztikus eszköz kifejlesztéséhez, ami könnyen értékelhető paramétereket adna a klinikusok számára. Míg az SHG a sebészi szélek automatizált meghatározásában játszhat szerepet, a jövőben DVRF CARS technika segítségével lehetőség adódhat olyan *in vivo* képalkotásra is, ahol a vizsgáló át tudja tekinteni a vizsgálni kívánt bőrterületet szöveti szinten, amely segíthet a különböző bőrtumorok elkülönítésében. A két technika fúziója segítségével a tumor elkülönítése az ép szövegtől még nagyobb hatékonyságú lehet. Jövőbeli vizsgálatok felmérhetik ezeknek a módszereknek a szenzitivitását és specificitását a BCC diagnosztikájában más nem-invazív képalkotó módszerekkel összevetve. A távolabbi jövőben a mesterséges intelligencia fejlődésével elképzelhető, hogy a képalkotó vizsgálat során egy értékelő szoftver képes lesz javaslatot tenni az optimális sebészi szél megválasztására. Így nem volnaszükséges az operációt végző orvosnak képalkotók felvételeinek elemzésében jártnak lennie.

Nemlineáris mikroszkópiai vizsgálataink másik irányát a ritka, örökletes bőrbetegségek, köztük az EDS vizsgálata képezi. Az EDS szövettani jellegzetességeit már részletesen publikálták az 1970-es évek második felében és az 1980-as évek elején (174-176). Voltaképpen az ezekben a közleményekben leírt különböző EDS altípusokra jellemző

kollagén morfológiai leírások kiállták az idő próbáját. Kísérletünkben az ezekben a publikációkban leírtakhoz hasonló szövettani jellegzetességeket észleltünk EDS-ben, így irreguláris, töredezett, igen laza kollagén rost szerkezetet találtunk az EDS betegek dermiszében. Ugyanakkor eredményeink alapján a nemlineáris mikroszkópai technikák az EDS betegek bőrének kötőszöveti rost szerkezetének jóval részletesebb analizésére alkalmasak, mint a hagyományos szövettani feldolgozás. A vizsgálatunk során készített SHG csatorna képeken az egészséges és az EDS-ben érintett bőr kollagén szerkezetét összevetve a különbség igen szembetűnő. Ezzel szemben, az ugyanezen betegeink bőrmintáiból H&E és a VG festéssel készült szövettani metszetek képein csak a vizsgálatunkban résztvevő, tapasztalt bőrpatólogus szakorvosok tudták biztosan elkülöníteni az EDS betegek bőrének kollagén szerkezetbeli eltéréseit az ép bőrtől. Csakugyan, ahogy kísérleteink is alátámasztják, az SHG mikroszkópia képes a kollagén rost struktúra igen magas minőségű, háttér nélküli képeinek megjelenítésére feldolgozás és festés nélküli *ex vivo* bőrmintákon (59). Mivel az SHG jel keletkezése koherens folyamat, rendkívül érzékeny az igen erős SHG jelet adó kollagén rostok szerkezetének finom változásaira (177). Ezenfelül, a készített SHG képek alkalmasak azonnali digitális képanalízisre és így a kollagén szerkezet kvantitatív értékelésére (178). Az SHG és a TPF technikák kombinációjával a bőr kötőszövetének különböző komponensei, így a kollagén és az elasztin jól elkülöníthetők egymástól (68). Jelent meg közlés egy olyan további új módszerről is, ahol SHG és FLIM technikák együttes alkalmazásával az egyes kollagén altípusok elkülöníthetők egymástól. Ilyen módszerek alkalmazása a jövőben az EDS nem-invazív diagnosztikájában jelentős előrelépést jelenthet és az egyes EDS altípusok elkülönítése is megvalósulhat (179).

Az egészséges humán retikuláris dermiszben a kollagén rostok aránya háromszor akkora, mint az elasztin rostoké (180). Ezekkel az ismeretekkel összhangban, a kollagén rostok SHG és az elasztin TPF jel intenzitás értékei az egészséges mintákban ehhez hasonló eloszlást mutatnak. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a két modalitás gerjesztési intenzitás értékei eltérnek, így az IOD értékek közvetlenül nem hasonlíthatók össze. Azonban, ha az SHG és a TPF intenzitás értékeket a kontroll bőréhez viszonyítjuk, elmondható, hogy az SHG csatorna IOD értékei EDS esetén jelentősen alacsonyabbak, míg a TPF csatorna esetén nem észlelhető ilyen különbség. Ezek az eredmények a vártnak megfelelőek, mivel az EDS betegek bőrében csak a kollagén mutat eltéréseket, az elasztin

rostok az egészséges bőréhez hasonlóak. Így az SHG és a TPF technikák kombinálásával a bőr kötőszöveti struktúrájának részletes elemzése volt kivitelezhető vizsgálatunkban. Jövőbeli vizsgálatok tárgyát képezheti olyan számszerűsíthető paraméterek meghatározása, melyek alkalmazhatók lehetnek különböző kollagenopátiák diagnosztikájában.

Vizsgálataink során kizárólag *ex vivo* mintákon végeztünk nemlineáris mikroszkópiai képalkotást. Jelenlegi kísérleti elrendezésünk alkalmas *in vivo* mérések végzésére is, melyet korábbi *in vivo* állatkísérleteink során is alkalmaztunk a bőr vizsgálatára (146, 60, 76). A jelenlegi mikroszkóp rendszerünk azonban egyelőre nincs engedélyeztetve *in vivo* klinikai vizsgálatokra, így jelen vizsgálatainkat *ex vivo* mintákon végeztük. Kísérletünk további limitációja volt, hogy csak relatív kis betegszámot tudtunk a vizsgálatba bevonni. Ez egyrészt az EDS ritkaságából adódott, másrészt abból, hogy egyes betegek elzárkóztak a bőrbioopszia vételétől. Utóbbi probléma azonban megoldódna, ha további biztonságtechnikai vizsgálatokat követően nemlineáris mikroszkóp rendszerünk engedélyeztetése megtörténne *in vivo* humán vizsgálatok végzésére.

További vitatható adat, hogy annak ellenére, hogy III. kísérletünkben az 1. beteg teljesíti a cEDS klinikai kritériumait, a heterozigóta p.G530S *COL5A1* mutáció oki szerepéről ellentmondásos információk találhatók az irodalomban. A p.G530S *COL5A1* mutáció heterozigóta formáját először Giunta és mtsai. közölték 2000-ben, mint egy betegség módosító variánst, ami súlyosbította a p.G1489E mutáció által okozott cEDS fenotípust (181). Egy további esetet is publikáltak, melyben a homozigóta p.G530S mutáció enyhe formájú cEDS fenotípust váltott ki egy betegben (182). 2005-ben Malfait és mtsai. közleményében négy cEDS betegben a heterozigóta p.G530S mutáció megléte esetén enyhe bőrtünetekkel járó fenotípust találtak (183). Továbbá, frissebb tanulmányok a cEDS betegek 5-8%-ában igazoltak heterozigóta p.G530S mutációt, viszont ez a mutáció 5%-ban egészséges kontrollok esetében is jelen volt (184, 185). Arról is jelent meg további közlés, hogy ez a mutáció enyhébb fenotípust okoz más cEDS-t okozó *COL5A1* mutációkhoz képest (185). Az 1. beteg esetében NGS technikával más mutációt nem tudtunk azonosítani a heterozigóta p.G530S *COL5A1* mutáción kívül a beteg cEDS klinikai kritériumainak megfelelő fenotípusa háttérében, így elfogadtuk a cEDS diagnózist.

Jövőbeli nemlineáris mikroszkópiai vizsgálatok tárgyát képezhetné nagyobb elemszámú EDS betegcsoporton az egyes EDS altípusokban a dermisz kötőszövetes szerkezetének összehasonlítása, valamint a betegek bőrstátuszának hosszútávú monitorozása egyaránt. Az egyes EDS altípusok közül a hEDS vizsgálata különösen lényeges volna, mivel a hEDS genetikai háttere nem ismert, így a genetikai vizsgálatról nem várható diagnózis (130). Így az objektív diagnosztikus vizsgálatokból hEDS esetén különösen nagy hiány van, mivel a HFUS csak alacsony felbontást biztosít, míg az elektronmikroszkópia kevés helyen elérhető és bőrbioptiát igényel (186, 187). A mindennapi gyakorlatban a klinikai kritériumok alapján a hEDS-t nehéz elkülöníteni a hipermobilitás spektrum zavartól (hypermobility spectrum disorder, HSD), ami a prognosis megítélése szempontjából igen lényeges volna (188). A HSD fenotípusos jegyei csak a muszkuloszkeletális rendszert érintik, a hEDS-ben jelentkező bőrtünetek hiányoznak, (188, 189). Így az is további kutatások tárgya lehet, hogy képes-e az *in vivo* nemlineáris mikroszkópia a hEDS és a HSD elkülönítésére.

6. Következtetések

6.1. I. kísérlet: Kvantitatív analízis alkalmazása SHG és TPF képalkotás során BCC azonosítására

- Kísérletünkben a BCC mintákban mind a TPF, mind az SHG jel szignifikánsan alacsonyabb IOD értékeit detektáltuk a kontroll mintákhoz képest. Ugyanakkor az IOD mérést a BCC vizsgálatában kevésbé standardizálható paraméternek tartjuk, mivel értéke több külső faktortól függ. Ezek között a gerjesztési intenzitás nagysága, a képalkotás mélysége és az epidermisz vastagsága is szerepelnek. Az SHG módszerrel azonosított kollagén morfológia értékelése azonban független ezektől a faktoroktól.
- FFT analízissel a kollagén szerkezet SHG képein szignifikánsan magasabb COI értékeket találtunk a BCC mintákban az egészséges bőrhöz képest, míg a CPB értékben nem volt eltérés. Ebből arra következtethetünk, hogy BCC-ben a kollagén szerkezet magasabb fokú rendezettséget mutat az ép bőrhöz képest. Azonban abban, hogy az egyes kollagén szálak milyen szorosan rendeződnek egymás mellé, nem találtunk különbséget.
- A CT-FIRE és CurveAlign algoritmusokkal elemezve a kollagén rostok SHG képeit, BCC-ben az ép bőrhöz képest szignifikánsan hosszabb kollagén rostokat találtunk, melyeknek bezárt szöge kisebb volt. Emellett szignifikánsan nagyobbak találtuk BCC-ben a kollagén rost együttállási koefficientet. A kollagén rostok vastagságában és egyenességében viszont nem detektáltunk jelentős különbséget. A kollagén rost orientáció értékekben sem volt jelentős eltérés, mely paraméterben a BCC mintákban magas standard deviáció mutatkozott. Az COI mérése révén a kollagén rostok orientációjának értékelésére a FFT analízis érzékenyebb módszer lehet a CurveAlign szoftvernél.
- Kísérleteink megerősítik azokat a korábbi tanulmányokat, amelyek leírják a kollagén rost mintázat jelentős átalakulását BCC-ben. Eredményeink alapján a

jövőben *in vivo* SHG képalkotás során a BCC és határainak azonosítása válhat lehetővé. A kollagén szerkezet változásának különböző kvantitatív paraméterei alapján a BCC műtéti eltávolítása előtt és közben a sebészi szélek tervezésében a jövőben gépi tanulás alapú automatizált algoritmusok is alkalmazhatók lehetnek.

6.2 II. kísérlet: Magas kontrasztú pszeudo H&E „festett” szövettani képek előállítása BCC mintákról CARS technikával

- Kísérleteink során *ex vivo* DVRF CARS képalkotást valósítottunk meg saját fejlesztésű CARS rendszerünkön. Ez a rendszer jelenlegi formájában *ex vivo* vizsgálatokra alkalmas, azonban további fejlesztéseket követően a DVRF CARS technika megvalósítható lehet kézi, nemlineáris mikroszkópokban is.
- Kísérleteink alapján igazoltuk, hogy a DVRF CARS képalkotó módszer alkalmas lehet egérbőr mellett humán bőr és BCC nagy szöveti felbontású, festés nélküli pszeudo H&E „festett” képalkotás során történő hisztopatológiai vizsgálatára.
- A DVRF CARS módszer során alkalmazott képfeldolgozási algoritmusunkkal növelni tudtuk a képalkotás során a technika kémiai szelektivitását, valamint csökkenteni a vízmolekulából származó nemrezonáns háttérét.

6.3 III. kísérlet: SHG és TPF technikák alkalmazása EDS betegek bőrének vizsgálatára és egészséges bőrtől történő elkülönítésére

- Legjobb tudomásunk szerint kísérletünkben a világon elsőként alkalmaztunk nemlineáris mikroszkópiai módszereket EDS-ben szenvedő betegek bőrének kötőszöveti rost morfológiájának megjelenítésére. SHG módszerrel az EDS betegekben az egészséges bőrral összevetve irreguláris szerkezetű, töredezett, laza kollagén rost hálózatot találtunk. Ezek az elváltozások a vEDS betegekben

kifejezettebbek voltak, mint cEDS-ben. Ennek megfelelően az SHG jel IOD értékei is alacsonyabbak voltak EDS-ben az ép bőrhöz képest, kiváltképp a vEDS betegek bőrében. TPF módszerrel az elasztin szerkezetben a hipotézisünknek megfelelően nem találtunk eltérést az EDS betegek és a kontroll bőr között, ahogy az IOD értékeik is hasonlóak voltak. Eredményeinket hagyományos szövettani festésekkel, köztük H&E, VG és VE festésekkel is összevetettük és igazoltuk. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a nemlineáris mikroszkópiai technikák alkalmasak az EDS-ben jelen lévő kötőszöveti eltérések érzékeny detektálására.

- A vEDS háttérében azonosítottunk egy korábban nem publikált heterozigóta *COL3A1* gén variánst, a c.3124_3141dup (p.Ala1042_Gly1047dup) mutációt, mely mivel prediktálhatóan a Gly-X-Y ismétlődést érinti, valószínűsíthetően patogén.
- Kísérleteink alapján a jövőben az *in vivo* nemlineáris mikroszkópiai képalkotás alkalmas lehet EDS-ben szenvedő betegek bőrstátuszának vizsgálatára. Emellett, mivel az EDS diagnosztikájában jelenleg hiányoznak a széles körben alkalmazható, objektív, nem-invazív technikák, így a nemlineáris mikroszkópia a jövőben a diagnosztikus eszköztár részévé válhat. További kutatások tárgyát képezheti, hogy a EDS betegek bőrstátuszának nemlineáris mikroszkópiai követésével megjósolható-e a betegség klinikai kimenetele.

7. Összefoglalás

Az utóbbi években a bőrgyógyászat területén több új nem-invazív képalkotó technika jelent meg, melyek egyre szélesebb körben váltak alkalmazhatóvá a klinikumban. A nemlineáris mikroszkópiai technikák ígéretes új módszereket képeznek, melyek bőrdaganatok és örökletes bőrgyógyászati kórképek vizsgálatára egyaránt alkalmazhatók lehetnek.

A bazálsejtes karcinóma (BCC) a leggyakoribb nem-melanoma típusú bőrtumor, és egyben a leggyakrabban előforduló tumor a világon a fehér bőrű lakosság körében. A különböző kezelési módok közül a sebészi kimetszést tartjuk arany standardnak. A tumor inkomplett reszekciója kiújuláshoz vezet, így a tumorszélek pontos meghatározása szükséges. Kísérleteink során különböző nemlineáris mikroszkópiai technikákkal hasonlítottunk össze *ex vivo* BCC mintákat ép bőrmintákkal. A kétfoton abszorpciós fluoreszcencia (TPF) és másodharmonikus keltés (SHG) módszerekkel készült képeken különböző kvantitatív analíziseket, mint integrált optikai denzitás mérést, Fourier-transzformációt végeztünk és kollagén rost elemző algoritmusokat alkalmaztunk. Több olyan paramétert találtunk, mint a kollagén rostok hossza és orientációja, amelyben a BCC szignifikáns különbséget mutatott az ép bőrhöz képest. Második kísérletünkben egy új technikát, duális vibrációs rezonancia frekvencia koherens anti-Stokes Raman szórás mikroszkópiát alkalmaztunk BCC vizsgálatára. Egy saját képfeldolgozó algoritmust alkalmaztunk, mellyel hematoxilin-eozin festett hagyományos szövettani metszetekhez hasonló képeket állítottunk elő, mely a BCC morfológiai értékelését teszi lehetővé.

Az Ehlers–Danlos szindróma (EDS) ritka, heterogén, örökletes kötőszöveti rendellenességek csoportja, melynek incidenciája 1:5000. TPF és SHG módszerekkel értékeltük klasszikus és vaszkuláris típusú EDS-ben szenvedő betegek bőrének kollagén és elasztin tartalmát *ex vivo*. Az EDS bőrmintákban irreguláris szerkezetű, laza kollagén rost hálózatot találtunk, az elasztikus rostok aránya megnövekedett az ép bőrhöz képest. Kísérleteink alapján a jövőben valós idejű vizsgálatokra alkalmas kézi nemlineáris mikroszkópiai rendszerek használhatók lehetnek BCC tumorok vizsgálatára, valamint EDS-ben szenvedő betegek bőrstátuszának nem-invazív értékelésére. A jövőben gépi tanulás alapú algoritmusoktól a kiértékelés pontosságának és sebességének a növekedését várjuk, melyhez a kvantitatív analíziseink alapul szolgálhatnak.

8. Summary

In recent years, several novel noninvasive imaging techniques emerged in the field of dermatology, which have been increasingly used in the clinical practice. Nonlinear optical techniques are promising novel methods which can be applied for the assessment of skin tumors, as well as hereditary skin conditions.

Basal cell cancer (BCC) is the most common type of skin cancer and also the most common malignancy in the fair skinned population. There are several therapeutic options for BCC, but surgical removal is considered gold standard. It is of great importance to properly estimate the tumor borders before surgery as incomplete resection will result in recurrence. During our experiments, we compared *ex vivo* BCC samples to healthy skin utilizing nonlinear microscopic techniques. Two-photon absorption fluorescence (TPF) and second harmonic generation (SHG) methods were used to acquire images for quantitative analyses. We carried out integrated optical density measurements, fast Fourier transformation and we applied different collagen fiber assessment algorithms. We have identified several parameters including the length and orientation of collagen fibers which showed significant difference in the BCC samples when compared to normal skin. In our second experiment, we applied dual vibration resonance frequency coherent anti-Stokes raman scattering microscopy as a novel technique for the assessment of BCC. We utilized our image processing algorithm to generate pseudo hematoxylin and eosin stained images which allows the noninvasive morphological assessment of BCC.

Ehlers–Danlos syndrome (EDS) is the name for a heterogenous group of rare genetic connective tissue disorders with an overall incidence of 1 in 5000. In the third experiment, we utilized *ex vivo* TPF and SHG techniques to assess the collagen and elastin content of the skin of classic type and vascular type EDS patients. We detected irregular, loosely dispersed collagen fibers in a non-parallel arrangement and higher ratio of elastin fibers in the dermis and of the EDS patients. We also validated our result by standard histology. Based on our experiments, handheld nonlinear microscopy systems could be utilized for the *in vivo* detection of BCC and the assessment of the skin status of EDS patients. In the future, machine learning algorithms could be applied to improve the accuracy and the speed of the assessments, for which quantitative analysis studies could serve as a basis.

9. Irodalomjegyzék

1. Popp J, Matthews D, Martinez-Coll A, Mayerhofer T, Wilson BC. (2017) Challenges in translation: models to promote translation. *J Biomed Opt*, 23: 1-4.
2. Marcu L, Boppart SA, Hutchinson MR, Popp J, Wilson BC. (2017) Biophotonics: the big picture. *J Biomed Opt*, 23: 1-7.
3. Tkaczyk E. (2017) Innovations and Developments in Dermatologic Non-invasive Optical Imaging and Potential Clinical Applications. *Acta Derm Venereol*.
4. Gilje O, O'Leary PA, Aldes EJ. (1953) Capillary microscopic examination in skin diseases. *AMA Arch Dermatol*, 68: 136-147.
5. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosa G, Ferrara G. (2003) Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol*, 48: 679-693.
6. Goldman L. (1958) A simple portable skin microscope for surface microscopy. *AMA Arch Dermatol*, 78: 246-247.
7. Zalaudek I, Lallas A, Moscarella E, Longo C, Soyer HP, Argenziano G. (2013) The dermatologist's stethoscope-traditional and new applications of dermoscopy. *Dermatol Pract Concept*, 3: 67-71.
8. Errichetti E, Stinco G. (2016) Dermoscopy in General Dermatology: A Practical Overview. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 6: 471-507.
9. Kittler H, Marghoob AA, Argenziano G, Carrera C, Curiel-Lewandrowski C, Hofmann-Wellenhof R, Malvehy J, Menzies S, Puig S, Rabinovitz H, Stolz W, Saida T, Soyer HP, Siegel E, Stoecker WV, Scope A, Tanaka M, Thomas L, Tschandl P, Zalaudek I, Halpern A. (2016) Standardization of terminology in dermoscopy/dermatoscopy: Results of the third consensus conference of the International Society of Dermoscopy. *J Am Acad Dermatol*, 74: 1093-1106.
10. Sheu SL, Cho HG, Nord KM. (2017) Videodermoscopy as a novel tool for dermatologic education. *Cutis*, 100: E25-e27.
11. Cho HG, Sheu SL, Chiang A, Nord KM. (2018) Standard dermoscopy and videodermoscopy as tools for medical student dermatologic education. *Dermatol Pract Concept*, 8: 39-42.

12. Braun RP, Rabinovitz HS, Oliviero M, Kopf AW, Saurat J-H. (2005) Dermoscopy of pigmented skin lesions. *J Am Acad of Dermat*, 52: 109-121.
13. Wurm E, Pellacani G, Longo C, Soyer HP, Gonzalez S, Hofmann-Wellenhof R, Ahlgrimm-Siess V, Guitera P, Sinz C, Kittler H. (2017) The value of reflectance confocal microscopy in diagnosis of flat pigmented facial lesions: a prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 31: 1349-1354.
14. Barcaui EdO, Carvalho ACP, Lopes FPPL, Piñeiro-Maceira J, Barcaui CB. (2016) High frequency ultrasound with color Doppler in dermatology. *Anais Brasil de Dermatol*, 91: 262-273.
15. Alexander H, Miller DL. (1979) Determining skin thickness with pulsed ultrasound. *J Invest Dermatol*, 72: 17-19.
16. Lockwood G, Turnbull D, Christopher D, Foster FS. (1996) Beyond 30 MHz [applications of high-frequency ultrasound imaging]. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 15: 60-71.
17. Bobadilla F, Wortsman X, Muñoz C, Segovia L, Espinoza M, Jemec GB. (2008) Pre-surgical high resolution ultrasound of facial basal cell carcinoma: correlation with histology. *Cancer Imaging*, 8: 163.
18. Polańska A, Dańczak-Pazdrowska A, Jałowska M, Żaba R, Adamski Z. (2017) Current applications of high-frequency ultrasonography in dermatology. *Adv Dermatol Allergol*, 34: 535-542.
19. Levine A, Wang K, Markowitz O. (2017) Optical Coherence Tomography in the Diagnosis of Skin Cancer. *Dermatol Clin*, 35: 465-488.
20. Sattler E, Kastle R, Welzel J. (2013) Optical coherence tomography in dermatology. *J Biomed Opt*, 18: 061224.
21. Woodward RM, Cole BE, Wallace VP, Pye RJ, Arnone DD, Linfield EH, Pepper M. (2002) Terahertz pulse imaging in reflection geometry of human skin cancer and skin tissue. *Phys Med Biol*, 47: 3853-3863.
22. Yu C, Fan S, Sun Y, Pickwell-Macpherson E. (2012) The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: A review of investigations to date. *Quant Imaging Med Surg*, 2: 33-45.

23. Wallace VP, Fitzgerald AJ, Pickwell E, Pye RJ, Taday PF, Flanagan N, Ha T. (2006) Terahertz pulsed spectroscopy of human Basal cell carcinoma. *Appl Spectrosc*, 60: 1127-1133.
24. Dutta M, Bhalla AS, Guo R. (2016) THz Imaging of Skin Burn: Seeing the Unseen-An Overview. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5: 338-348.
25. Rahman A, Rahman AK, Rao B. (2016) Early detection of skin cancer via terahertz spectral profiling and 3D imaging. *Biosens Bioelectron*, 82: 64-70.
26. Beard P. (2011) Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus*, 1: 602-631.
27. Bayer CL, Luke GP, Emelianov SY. (2012) Photoacoustic Imaging for Medical Diagnosis. *Acoust Today*, 8: 15-23.
28. Valluru KS, Wilson KE, Willmann JK. (2016) Photoacoustic Imaging in Oncology: Translational Preclinical and Early Clinical Experience. *Radiology*, 280: 332-349.
29. Langhout GC, Grootendorst DJ, Nieweg OE, Wouters M, van der Hage JA, Jose J, van Boven H, Steenbergen W, Manohar S, Ruers TJM. (2014) Detection of Melanoma Metastases in Resected Human Lymph Nodes by Noninvasive Multispectral Photoacoustic Imaging. *Int J Biomed Imaging*, 2014.
30. Wang Y, Xu D, Yang S, Xing D. (2016) Toward in vivo biopsy of melanoma based on photoacoustic and ultrasound dual imaging with an integrated detector. *Biomed Opt Express*, 7: 279-286.
31. Zhou Y, Xing W, Maslov KI, Cornelius LA, Wang LV. (2014) Handheld photoacoustic microscopy to detect melanoma depth in vivo. *Opt Lett*, 39: 4731-4734.
32. Dong B, Sun C, Zhang HF. (2017) Optical Detection of Ultrasound in Photoacoustic Imaging. *IEEE Trans Biomed Eng*, 64: 4-15.
33. Minsky M. (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10: 128-138.
34. Allocca G, Kusumbe AP, Ramasamy SK, Wang N. (2016) Confocal/two-photon microscopy in studying colonisation of cancer cells in bone using xenograft mouse models. *Bonekey Rep*, 5.

35. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. (2012) Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*, 132: e3.
36. Haroon A, Shafi S, Rao BK. (2017) Using Reflectance Confocal Microscopy in Skin Cancer Diagnosis. *Dermatol Clin*, 35: 457-464.
37. Que SK, Grant-Kels JM, Longo C, Pellacani G. (2016) Basics of Confocal Microscopy and the Complexity of Diagnosing Skin Tumors: New Imaging Tools in Clinical Practice, Diagnostic Workflows, Cost-Estimate, and New Trends. *Dermatol Clin*, 34: 367-375.
38. Rajadhyaksha M, Marghoob A, Rossi A, Halpern AC, Nehal KS. (2017) Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: From bench to bedside. *Lasers Surg Med*, 49: 7-19.
39. Longo C, Ragazzi M, Rajadhyaksha M, Nehal K, Bennisar A, Pellacani G, Malvehy Guilera J. (2016) In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy for Dermatologic and Mohs Surgeons. *Dermatol Clin*, 34: 497-504.
40. Pan ZY, Dong DK, Chen SJ, Lu LY, Hu TT, Ju Q. (2018) In vivo reflectance confocal microscopy in daily practice: Image features correlated to histopathology. *Skin Res Technol*, 24: 223-228.
41. Tong L, Cheng J-X. (2011) Label-free imaging through nonlinear optical signals. *Materials Today*, 14: 264-273.
42. Ustione A, Piston DW. (2011) A simple introduction to multiphoton microscopy. *J Microsc*, 243: 221-226.
43. Helmchen F, Denk W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods*, 2: 932-940.
44. Yue S, Slipchenko MN, Cheng JX. (2011) Multimodal Nonlinear Optical Microscopy. *Laser Photon Rev*, 5.
45. Denk W, Strickler JH, Webb WW. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248: 73-76.
46. Curley PF, Ferguson AI, White JG, Amos WB. (1992) Application of a femtosecond self-sustaining mode-locked Ti:sapphire laser to the field of laser scanning confocal microscopy. *Optical and Quantum Electronics*, 24: 851-859.

47. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, 21: 1369-1377.
48. de Grauw CJ, Vroom JM, van der Voort HT, Gerritsen HC. (1999) Imaging properties in two-photon excitation microscopy and effects of refractive-index mismatch in thick specimens. *Appl Opt*, 38: 5995-6003.
49. Balu M, Zachary CB, Harris RM, Krasieva TB, Konig K, Tromberg BJ, Kelly KM. (2015) In Vivo Multiphoton Microscopy of Basal Cell Carcinoma. *JAMA Dermatol*, 151: 1068-1074.
50. Hanson KM, Bardeen CJ. (2009) Application of nonlinear optical microscopy for imaging skin. *Photochem Photobiol*, 85: 33-44.
51. Kolonics A, Csiszovszki Z, Toke ER, Lorincz O, Haluszka D, Szipocs R. (2014) In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. *Exp Dermatol*, 23: 596-605.
52. Franken PA, Hill AE, Peters CW, Weinreich G. (1961) Generation of Optical Harmonics. *Phys Rev Lett*, 7: 118-119.
53. Weigelin B, Bakker GJ, Friedl P. (2016) Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. *J Cell Sci*, 129: 245-255.
54. 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.
55. Campagnola P. (2011) Second Harmonic Generation Imaging Microscopy: Applications to Diseases Diagnostics. *Anal Chem*, 83: 3224-3231.
56. Shoulders MD, Raines RT. (2009) Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78: 929-958.
57. Mienaltowski MJ, Birk DE. Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. In: J Halper (szerk.), *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*. Springer Netherlands, Dordrecht, 2014: 5-29.
58. Ricard-Blum S. (2011) The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
59. Chen X, Nadiarynkh O, Plotnikov S, Campagnola PJ. (2012) Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc*, 7: 654-669.

60. Haluszka D, Lorincz K, Molnar G, Tamas G, Kolonics A, Szipocs R, Karpati S, Wikonkal NM. (2015) In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-stokes raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit. *Microsc Res Tech*, 78: 823-830.
61. Koehler MJ, Hahn S, Preller A, Elsner P, Ziemer M, Bauer A, Konig K, Buckle R, Fluhr JW, Kaatz M. (2008) Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network. *Exp Dermatol*, 17: 519-523.
62. El Madani HA, Tancrede-Bohin E, Bensussan A, Colonna A, Dupuy A, Bagot M, Pena AM. (2012) In vivo multiphoton imaging of human skin: assessment of topical corticosteroid-induced epidermis atrophy and depigmentation. *J Biomed Opt*, 17: 026009.
63. King DF, King LA. (1986) A brief historical note on staining by hematoxylin and eosin. *Am J Dermatopathol*, 8: 168.
64. Chan JK. (2014) The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*, 22: 12-32.
65. Day CE. *Histopathology : methods and protocols*. In. Humana Press, New York, 2014: 36-37.
66. Otali D, Fredenburgh J, Oelschlagel D, Grizzle W. (2016) A standard tissue as a control for histochemical and immunohistochemical staining. *Biotech Histochem*, 91: 309-326.
67. Freudiger CW, Pfannl R, Orringer DA, Saar BG, Ji M, Zeng Q, Ottoboni L, Wei Y, Waeber C, Sims JR, De Jager PL, Sagher O, Philbert MA, Xu X, Kesari S, Xie XS, Young GS. (2012) Multicolored stain-free histopathology with coherent Raman imaging. *Lab Invest*, 92: 1492-1502.
68. Mansfield J, Yu J, Attenburrow D, Moger J, Tirlapur U, Urban J, Cui Z, Winlove P. (2009) The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy. *J Anat*, 215: 682-691.
69. Sugata K, Osanai O, Sano T, Takema Y. (2011) Evaluation of photoaging in facial skin by multiphoton laser scanning microscopy. *Skin Res Technol*, 17: 1-3.

70. K. König HGB, R. Bückle, M. Kellner-Höfer, M. Weinigel, E. Büttner, W. Sterry and J. Lademann. (2011) Optical skin biopsies by clinical CARS and multiphoton fluorescence/SHG tomography. *Laser Phys Lett*, 8: 465-468.
71. Hellerer T, Axang C, Brackmann C, Hillertz P, Pilon M, Enejder A. (2007) Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 14658-14663.
72. Krolopp A, Csakanyi A, Haluszka D, Csati D, Vass L, Kolonics A, Wikonkal N, Szipocs R. (2016) Handheld nonlinear microscope system comprising a 2 MHz repetition rate, mode-locked Yb-fiber laser for in vivo biomedical imaging. *Biomed Opt Express*, 7: 3531-3542.
73. Haluszka D, Lorincz K, Banvolgyi A, Gyongyosi N, Kolonics A, Szipocs R, Karpati S, Wikonkal N. (2013) The effect of repair mechanisms on risk of DNA damage during in vivo two-photon skin imaging. *J Invest Dermatol*, 133: S219-S219.
74. Haluszka D, Lorincz K, Szipocs R, Gyongyosi N, Banvalgyi A, Keszeg A, Karpati S, Wikonkal NM. (2014) In vivo assessment of potential carcinogenicity of multiphoton microscopy as the function of wavelength in the near-infrared range. *J Invest Dermatol*, 134: S86-S86.
75. Haluszka D, Lórinč K, Kiss N, Szipócs R, Kuroli E, Gyöngyösi N, Wikonkál NM. (2016) Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy. *Biomed Op Ex*, 7: 4480-4489.
76. Lorincz K, Haluszka D, Kiss N, Gyongyosi N, Banvolgyi A, Szipocs R, Wikonkal NM. (2017) Voluntary exercise improves murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity. *Arch Dermatol Res*, 309: 209-215.
77. Diepgen TL, Mahler V. (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*, 146 Suppl 61: 1-6.
78. Goldenberg G, Karagiannis T, Palmer JB, Lotya J, O'Neill C, Kisa R, Herrera V, Siegel DM. (2016) Incidence and prevalence of basal cell carcinoma (BCC) and locally advanced BCC (LABCC) in a large commercially insured population in the United States: A retrospective cohort study. *J Am Acad Dermatol*, 75: 957-966 e952.

79. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. (2012) A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 166: 1069-1080.
80. Paolino G, Donati M, Didona D, Mercuri SR, Cantisani C. (2017) Histology of Non-Melanoma Skin Cancers: An Update. *Biomedicines*, 5.
81. Krompecher E. (1903) *Der Basalzellenkrebs*. Jena, Germany
82. Krickler A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. (1995) Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? a case-control study in Western Australia. *Int J Cancer*, 60: 489-494.
83. Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Nieto A, Miranda A, Mercier M, Loria DI, Osterlind A, Greinert R, Navarro C, Fabbrocini G, Barbera C, Sancho-Garnier H, Gafa L, Chiarugi A, Mossotti R. (2006) Comparison of risk patterns in carcinoma and melanoma of the skin in men: a multi-centre case-case-control study. *Br J Cancer*, 94: 743-751.
84. Lear W, Dahlke E, Murray CA. (2007) Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg*, 11: 19-30.
85. Reinau D, Surber C, Jick SS, Meier CR. (2014) Epidemiology of basal cell carcinoma in the United Kingdom: incidence, lifestyle factors, and comorbidities. *Br J Cancer*, 111: 203-206.
86. Nikolaou V, Stratigos AJ, Tsao H. (2012) Hereditary Nonmelanoma Skin Cancer. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 31: 204-210.
87. Lam C, Ou JC, Billingsley EM. (2013) "PTCH"-ing it together: a basal cell nevus syndrome review. *Dermatol Surg*, 39: 1557-1572.
88. Pellegrini C, Maturo MG, Di Nardo L, Ciciarelli V, Gutiérrez García-Rodrigo C, Fargnoli MC. (2017) Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*, 18: 2485.
89. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. (2016) Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)*, 8.
90. Suzman DL, Antonarakis ES. (2015) Clinical Implications of Hedgehog Pathway Signaling in Prostate Cancer. *Cancers*, 7: 1983-1993.

91. Lo Muzio L. (2008) Nevroid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*, 3: 32.
92. Mackiewicz-Wysocka M, Bowszyc-Dmochowska M, Strzelecka-Węklar D, Dańczak-Pazdrowska A, Adamski Z. (2013) Basal cell carcinoma – diagnosis. *Contemp Oncol (Pozn)*, 17: 337-342.
93. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. (2002) Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol*, 147: 41-47.
94. Crowson A. (2006) Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathol*, 19: S127-147.
95. Lallas A, Apalla Z, Argenziano G, Longo C, Moscarella E, Specchio F, Rauti M, Zalaudek I. (2014) The dermatoscopic universe of basal cell carcinoma. *Dermatol Pract Concept*, 4: 11-24.
96. Seidenari S, Arginelli F, Bassoli S, Cautela J, Cesinaro AM, Guanti M, Guardoli D, Magnoni C, Manfredini M, Ponti G, König K. (2013) Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol*, 19: e297-304.
97. Lewin JM, Carucci JA. (2015) Advances in the management of basal cell carcinoma. *F1000Prime Rep*, 7.
98. Maloney ME. (1995) Histology of basal cell carcinoma. *Clin Dermatol*, 13: 545-549.
99. Barcaui Ede O, Carvalho AC, Valiante PM, Barcaui CB. (2014) High-frequency ultrasound associated with dermoscopy in pre-operative evaluation of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol*, 89: 828-831.
100. Cheng HM, Guitera P. (2015) Systematic review of optical coherence tomography usage in the diagnosis and management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 173: 1371-1380.
101. Gambichler T, Orlikov A, Vasa R, Moussa G, Hoffmann K, Stücker M, Altmeyer P, Bechara FG. (2007) In vivo optical coherence tomography of basal cell carcinoma. *J Derm Sci*, 45: 167-173.
102. Ulrich M, von Braunmühl T, Kurzen H, Dirschka T, Kellner C, Sattler E, Berking C, Welzel J, Reinhold U. (2015) The sensitivity and specificity of optical

- coherence tomography for the assisted diagnosis of nonpigmented basal cell carcinoma: an observational study. *Br J Dermatol*, 173: 428-435.
103. Holmes J, von Braunmuhl T, Berking C, Sattler E. (2018) Optical coherence tomography of basal cell carcinoma: influence of location, subtype, observer variability and image quality on diagnostic performance. *178: 1102-1110.*
 104. De Carvalho N, Schuh S, Kindermann N, Kastle R, Holmes J, Welzel J. (2018) Optical coherence tomography for margin definition of basal cell carcinoma before micrographic surgery-recommendations regarding the marking and scanning technique. *Skin Res Technol*, 24: 145-151.
 105. Gambichler T, Jaedicke V, Terras S. (2011) Optical coherence tomography in dermatology: technical and clinical aspects. *Arch Dermatol Res*, 303.
 106. Kadouch DJ, Schram ME, Leeftang MM, Limpens J, Spuls PI, de Rie MA. (2015) In vivo confocal microscopy of basal cell carcinoma: a systematic review of diagnostic accuracy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29: 1890-1897.
 107. Altamura D, Menzies SW, Argenziano G, Zalaudek I, Soyer HP, Sera F, Avramidis M, DeAmbrosis K, Fargnoli MC, Peris K. (2010) Dermatoscopy of basal cell carcinoma: morphologic variability of global and local features and accuracy of diagnosis. *J Am Acad Dermatol*, 62: 67-75.
 108. Russell EB, Carrington PR, Smoller BR. (1999) Basal cell carcinoma: a comparison of shave biopsy versus punch biopsy techniques in subtype diagnosis. *J Am Acad Dermatol*, 41: 69-71.
 109. Zalaudek I, Kreusch J, Giacomel J, Ferrara G, Catricala C, Argenziano G. (2010) How to diagnose nonpigmented skin tumors: a review of vascular structures seen with dermoscopy: part II. Nonmelanocytic skin tumors. *J Am Acad Dermatol*, 63: 377-386; quiz 387-378.
 110. van Loo E, Mosterd K, Krekels GA, Roozeboom MH, Ostertag JU, Dirksen CD, Steijlen PM, Neumann HA, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. (2014) Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma of the face: A randomised clinical trial with 10 year follow-up. *Eur J Cancer*, 50: 3011-3020.
 111. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. (2005) Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol*, 53: 452-457.

112. Telfer NR, Colver GB, Morton CA. (2008) Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 159: 35-48.
113. Cakir BO, Adamson P, Cingi C. (2012) Epidemiology and economic burden of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 20: 419-422.
114. Gandhi SA, Kampp J. (2015) Skin cancer epidemiology, detection, and management. *Medical Clinics*, 99: 1323-1335.
115. Fahradyan A, Howell AC, Wolfswinkel EM, Tsuha M, Sheth P, Wong AK. (2017) Updates on the Management of Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC). *Healthcare (Basel)*, 5.
116. Matei C, Tampa M, Poteca T, Panea-Paunica G, Georgescu SR, Ion RM, Popescu SM, Giurcaneanu C. (2013) Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma. *J Med Life*, 6: 50-54.
117. Baker S, Joseph K, Tai P. (2016) Radiotherapy in Gorlin Syndrome: Can It Be Safe and Effective in Adult Patients? *J Cutan Med Surg*, 20: 159-162.
118. Amini S, Viera MH, Valins W, Berman B. (2010) Nonsurgical Innovations in the Treatment of Nonmelanoma Skin Cancer. *Journal Clin Aesth Dermatol*, 3: 20-34.
119. Sekulic A, Migden MR, Basset-Seguin N, Garbe C, Gesierich A, Lao CD, Miller C, Mortier L, Murrell DF, Hamid O, Quevedo JF, Hou J, McKenna E, Dimier N, Williams S, Schadendorf D, Hauschild A. (2017) Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer*, 17: 332.
120. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, Friedlander PA, Marmur E, Rudin CM, Chang ALS, Low JA, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Reddy JC, Hauschild A. (2012) Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *New Engl J Med*, 366: 2171-2179.
121. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsague X. (2017) Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 7: 5-19.
122. Lacouture ME, Dreno B, Ascierto PA, Dummer R, Basset-Seguin N, Fife K, Ernst S, Licitra L, Neves RI, Peris K, Puig S, Sokolof J, Sekulic A, Hauschild A, Kunstfeld R. (2016) Characterization and Management of Hedgehog Pathway

- Inhibitor-Related Adverse Events in Patients With Advanced Basal Cell Carcinoma. *Oncologist*, 21: 1218-1229.
123. Fellner C. (2012) Vismodegib (Erivedge) For Advanced Basal Cell Carcinoma. *Pharm Ther*, 37: 670-682.
 124. Chang AL, Oro AE. (2012) Initial assessment of tumor regrowth after vismodegib in advanced Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*, 148: 1324-1325.
 125. Priel S, Cortelazzi B, Dal Col V, Marson D, Laurini E, Fermeglia M, Licitra L, Pilotti S, Bossi P, Perrone F. (2015) Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Mol Oncol*, 9: 389-397.
 126. Zhu GA, Li AS, Chang AL. (2014) Patient with Gorlin syndrome and metastatic basal cell carcinoma refractory to smoothened inhibitors. *JAMA Dermatol*, 150: 877-879.
 127. Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. (1998) Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet*, 77: 31-37.
 128. Parapia LA, Jackson C. (2008) Ehlers-Danlos syndrome--a historical review. *Br J Haematol*, 141: 32-35.
 129. Beighton P, de Paepe A, Danks D, Finidori G, Gedde-Dahl T, Goodman R, Hall JG, Hollister DW, Horton W, McKusick VA, et al. (1988) International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue, Berlin, 1986. *Am J Med Genet*, 29: 581-594.
 130. Malfait F, Francomano C, Byers P, Belmont J, Berglund B, Black J, Bloom L, Bowen JM, Brady AF, Burrows NP, Castori M, Cohen H, Colombi M, Demirdas S, De Backer J, De Paepe A, Fournel-Gigleux S, Frank M, Ghali N, Giunta C, Grahame R, Hakim A, Jeunemaitre X, Johnson D, Juul-Kristensen B, Kapferer-Seebacher I, Kazkaz H, Kosho T, Lavalley ME, Levy H, Mendoza-Londono R, Pepin M, Pope FM, Reinstein E, Robert L, Rohrbach M, Sanders L, Sobey GJ, Van Damme T, Vandersteen A, van Mourik C, Voermans N, Wheeldon N, Zschocke J, Tinkle B. (2017) The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 175: 8-26.

131. Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, Chervoneva I, Birk DE. (2006) Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J Biol Chem*, 281: 12888-12895.
132. Cooper TK, Zhong Q, Krawczyk M, Tae H, Müller GA, Schubert R, Myers LA, Dietz HC, Talan MI, Briest W. (2010) The Haploinsufficient Col3a1 Mouse as a Model for Vascular Ehlers-Danlos Syndrome. *Vet Pathol*, 47: 1028-1039.
133. Stoler JM, Oaklander AL. (2006) Patients with Ehlers Danlos syndrome and CRPS: a possible association? *Pain*, 123: 204-209.
134. Bowen JM, Sobey GJ, Burrows NP, Colombi M, Lavallee ME, Malfait F, Francomano CA. (2017) Ehlers-Danlos syndrome, classical type. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 175: 27-39.
135. Watanabe A, Shimada T. (2008) Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *J Nippon Med Sch*, 75: 254-261.
136. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. (2000) Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med*, 342: 673-680.
137. Byers PH. (2017) Diagnosis, natural history, and management in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *175*: 40-47.
138. Carter J, Fenves AZ. (2017) Understanding vascular-type Ehlers-Danlos syndrome and avoiding vascular complications. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 30: 52-53.
139. Ong KT, Perdu J, De Backer J, Bozec E, Collignon P, Emmerich J, Fauret AL, Fiessinger JN, Germain DP, Georgesco G, Hulot JS, De Paepe A, Plauchu H, Jeunemaitre X, Laurent S, Boutouyrie P. (2010) Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet*, 376: 1476-1484.
140. Hermanns-Lê T, Reginster M-A, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Ehlers-Danlos Syndrome. In: (szerk.), *Diagnostic Electron Microscopy – A Practical Guide to Interpretation and Technique*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012: 309-321.

141. Mayer K, Kennerknecht I, Steinmann B. (2013) Clinical utility gene card for: Ehlers–Danlos syndrome types I–VII and variants - update 2012. *Eur J Hum Genet*, 21.
142. Bredfeldt JS, Liu Y, Pehlke CA, Conklin MW, Szulczewski JM, Inman DR, Keely PJ, Nowak RD, Mackie TR, Eliceiri KW. (2014) Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer. *J Biomed Opt*, 19.
143. Drifka CR, Loeffler AG, Mathewson K, Mehta G, Keikhosravi A, Liu Y, Lemancik S, Ricke WA, Weber SM, Kao WJ. (2016) Comparison of picrosirius red staining with second harmonic generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen fiber features in histopathology samples. *J Histochem Cytochem*, 64: 519-529.
144. Li J, Bower AJ, Vainstein V, Gluzman-Poltorak Z, Chaney EJ, Marjanovic M, Basile LA, Boppart SA. (2015) Effect of recombinant interleukin-12 on murine skin regeneration and cell dynamics using in vivo multimodal microscopy. *Biomed Opt Exp*, 6: 4277-4287.
145. 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. *J Biomed Opt*, 16: 040502-040502-040503.
146. Haluszka D, Lorincz K, Kiss N, Szipocs R, Kuroli E, Gyongyosi N, Wikonkal NM. (2016) Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy. *Biomed Opt Express*, 7: 4480-4489.
147. Cui JZ, Tehrani AY, Jett KA, Bernatchez P, van Breemen C, Esfandiarei M. (2014) Quantification of aortic and cutaneous elastin and collagen morphology in Marfan syndrome by multiphoton microscopy. *J Struct Biol*, 187: 242-253.
148. Lacombe R, Nadiarnykh O, Campagnola PJ. (2008) Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta: experiment and simulation. *Biophys J*, 94: 4504-4514.
149. Murata T, Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. Morphological character of pseudoxanthoma elasticum observed by multiphoton microscopy. *Journal of Dermatological Science*, 72: 199-201.

150. Yang JH, Lee ST, Kim JA, Kim SH, Jang SY, Ki CS, Kim DK. (2007) Genetic analysis of three Korean patients with clinical features of Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Korean Med Sci*, 22: 698-705.
151. Kolonics A, Csáti D, Antal P, Szipócs R, editors. A simple, cost efficient fiber amplifier wavelength extension unit for broadly tunable, femtosecond pulse Ti-sapphire lasers for CARS microscopy. *Biomedical Optics and 3-D Imaging*; 2012 2012/04/28; Miami, Florida: Optical Society of America.
152. Molnár G, Krolopp Á, Kiss N, Tamás G, Szipócs R, editors. Interferometric Spectral Modulation of sub-100-fs Pump Pulses for High Chemical Contrast, Background Free, Real Time CARS Imaging. *Biophotonics Congress: Biomedical Optics Congress 2018 (Microscopy/Translational/Brain/OTS)*; 2018 2018/04/03; Hollywood, Florida: Optical Society of America.
153. Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, Lotti T, Pavone FS. (2010) Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophoton*, 3: 34-43.
154. James W, Cooley P, Peter DW. (1967) Historical Notes on the Fast Fourier Transform. *Proc IEEE*, 55: 1675.
155. Ayres C, Bowlin GL, Henderson SC, Taylor L, Shultz J, Alexander J, Telemeco TA, Simpson DG. (2006) Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform. *Biomater*, 27: 5524-5534.
156. Lu K, Chen J, Zhuo S, Zheng L, Jiang X, Zhu X, Zhao J. (2009) Multiphoton laser scanning microscopy of localized scleroderma. *Skin Res Technol*, 15: 489-495.
157. Walsh AJ, Cook RS, Lee JH, Arteaga CL, Skala MC. (2015) Collagen density and alignment in responsive and resistant trastuzumab-treated breast cancer xenografts. *J Biomed Opt*, 20.
158. Bredfeldt JS, Liu Y, Conklin MW, Keely PJ, Mackie TR, Eliceiri KW. (2014) Automated quantification of aligned collagen for human breast carcinoma prognosis. *J Pathol Inform*, 5.
159. Liu Y, Keikhosravi A, Mehta GS, Drifka CR, Eliceiri KW. (2017) Methods for Quantifying Fibrillar Collagen Alignment. *Methods Mol Biol*, 1627: 429-451.

160. Anagnostopoulos CN, Vergados DD, Anagnostopoulos I, Mintzias P. (2014) Total dermoscopy score calculation using quantitative measurements in digital dermoscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014: 6744-6747.
161. Cheng B, Erdos D, Stanley RJ, Stoecker WV, Calcara DA, Gomez DD. (2011) Automatic detection of basal cell carcinoma using telangiectasia analysis in dermoscopy skin lesion images. *Skin Res Technol*, 17: 278-287.
162. Kharazmi P, AlJasser MI, Lui H, Wang ZJ, Lee TK. (2017) Automated Detection and Segmentation of Vascular Structures of Skin Lesions Seen in Dermoscopy, With an Application to Basal Cell Carcinoma Classification. *IEEE J Biomed Health Inform*, 21: 1675-1684.
163. Piotrkowska-Wroblewska H, Litniewski J, Szymanska E, Nowicki A. (2015) Quantitative sonography of basal cell carcinoma. *Ultrasound Med Biol*, 41: 748-759.
164. Marvdashti T, Duan L, Aasi SZ, Tang JY, Ellerbee Bowden AK. (2016) Classification of basal cell carcinoma in human skin using machine learning and quantitative features captured by polarization sensitive optical coherence tomography. *Biomed Opt Express*, 7: 3721-3735.
165. Lin SJ, Jee SH, Kuo CJ, Wu RJ, Lin WC, Chen JS, Liao YH, Hsu CJ, Tsai TF, Chen YF, Dong CY. (2006) Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging. *Opt Lett*, 31: 2756-2758.
166. Nijssen A, Bakker Schut TC, Heule F, Caspers PJ, Hayes DP, Neumann MH, Puppels GJ. (2002) Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy. *J Invest Dermatol*, 119: 64-69.
167. Paoli J, Smedh M, Wennberg AM, Ericson MB. (2008) Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics. *J Invest Dermatol*, 128: 1248-1255.
168. Cicchi R, Massi D, Sestini S, Carli P, De Giorgi V, Lotti T, Pavone FS. (2007) Multidimensional non-linear laser imaging of Basal Cell Carcinoma. *Opt Express*, 15: 10135-10148.
169. De Giorgi V, Massi D, Sestini S, Cicchi R, Pavone FS, Lotti T. (2009) Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton

- microscopy) in cutaneous tumours: first experiences. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23: 314-316.
170. Li J, Bower AJ, Vainstein V, Gluzman-Poltorak Z, Chaney EJ, Marjanovic M, Basile LA, Boppart SA. (2015) Effect of recombinant interleukin-12 on murine skin regeneration and cell dynamics using in vivo multimodal microscopy. *Biomed Opt Express*, 6: 4277-4287.
 171. de Vries HJ, Enomoto DN, van Marle J, van Zuijlen PP, Mekkes JR, Bos JD. (2000) Dermal organization in scleroderma: the fast Fourier transform and the laser scatter method objectify fibrosis in nonlesional as well as lesional skin. *Lab Invest*, 80: 1281-1289.
 172. Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. (2006) Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med*, 4: 38.
 173. Short MA, Lui H, McLean D, Zeng H, Alajlan A, Chen XK. (2006) Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy. *J Biomed Opt*, 11: 34004.
 174. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Lapiere CM. (1983) Histopathological aid at the diagnosis of the Ehlers-Danlos syndrome, gravis and mitis types. *Int J Dermatol*, 22: 300-304.
 175. Pope FM, Martin GR, Lichtenstein JR, Penttinen R, Gerson B, Rowe DW, McKusick VA. (1975) Patients with Ehlers-Danlos syndrome type IV lack type III collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 1314-1316.
 176. Sulica VI, Cooper PH, Pope FM, Hambrick GW, Jr., Gerson BM, McKusick VA. (1979) Cutaneous histologic features in Ehlers-Danlos syndrome: study of 21 patients. *Arch Dermatol*, 115: 40-42.
 177. Cicchi R. (2014) The new digital pathology: just say NLO. *Dig Dis Sci*, 59: 1347-1348.
 178. Tzeng SY, Kuo TY, Hu SB, Chen YW, Lin YL, Chu KY, Tseng SH. (2017) Skin collagen can be accurately quantified through noninvasive optical method: Validation on a swine study. *Skin Res Technol*.

179. Ranjit S, Dvornikov A, Stakic M, Hong SH, Levi M, Evans RM, Gratton E. (2015) Imaging Fibrosis and Separating Collagens using Second Harmonic Generation and Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging. *Sci Rep*, 5.
180. Wang Y, Xu R, He W, Yao Z, Li H, Zhou J, Tan J, Yang S, Zhan R, Luo G, Wu J. (2015) Three-Dimensional Histological Structures of the Human Dermis. *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 932-944.
181. Giunta C, Steinmann B. (2000) Compound heterozygosity for a disease-causing G1489E [corrected] and disease-modifying G530S substitution in COL5A1 of a patient with the classical type of Ehlers-Danlos syndrome: an explanation of intrafamilial variability? *Am J Med Genet*, 90: 72-79.
182. Giunta C, Nuytinck L, Raghunath M, Hausser I, De Paepe A, Steinmann B. (2002) Homozygous Gly530Ser substitution in COL5A1 causes mild classical Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Med Genet*, 109: 284-290.
183. Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, De Paepe A. (2005) The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Hum Mutat*, 25: 28-37.
184. Mitchell AL, Schwarze U, Jennings JF, Byers PH. (2009) Molecular mechanisms of classical Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *Hum Mutat*, 30: 995-1002.
185. Symoens S, Syx D, Malfait F, Callewaert B, De Backer J, Vanakker O, Coucke P, De Paepe A. (2012) Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Hum Mutat*, 33: 1485-1493.
186. Carlesimo M, Cortesi G, Gamba A, Narcisi A, Turturro F, Raffa S, Torrisi MR, Camplone G. (2012) Ehlers-Danlos syndrome: case report and an electron microscopy study. *Rheumatol Int*, 32: 1507-1510.
187. Iurassich S, Rocco D, Aurilia A. (2001) Type III Ehlers-Danlos syndrome: correlations among clinical signs, ultrasound, and histologic findings in a study of 35 cases. *Int J Dermatol*, 40: 175-178.
188. Castori M, Tinkle B, Levy H, Grahame R, Malfait F, Hakim A. (2017) A framework for the classification of joint hypermobility and related conditions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 175: 148-157.

189. Tinkle B, Castori M, Berglund B, Cohen H, Grahame R, Kazkaz H, Levy H. (2017) Hypermobile Ehlers-Danlos syndrome (a.k.a. Ehlers-Danlos syndrome Type III and Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type): Clinical description and natural history. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 175: 48-69.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Kiss N, Haluszka D, Lőrincz K, Gyöngyösi N, Bozsányi Sz, Bánvölgyi A, Szipőcs R, Wikonkál N.

Quantitative Analysis on Ex Vivo Nonlinear Microscopy Images of Basal Cell Carcinoma Samples in Comparison to Healthy Skin

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH doi.org/10.1007/s12253-018-0445-1 (2018)

IF: 1,935

Kiss N, Krolopp Á, Lőrincz K, Bánvölgyi A, Szipőcs R, Wikonkál N.

Stain-free Histopathology of Basal Cell Carcinoma by Dual Vibration Resonance Frequency CARS Microscopy

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 24(4):927-930 (2018)

IF: 1,935

Kiss N, Haluszka D, Lőrincz K, Kuroli E, Hársing J, Mayer B, Kárpáti S, Fekete G, Szipőcs R, Wikonkál N, Medvecz M.

Ex vivo nonlinear microscopy imaging of Ehlers–Danlos syndrome-affected skin

ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH 310(5):463-473. (2018)

IF: 2,148

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

Bánvölgyi A, Lőrincz K, Kiss N, Avci P, Fésűs L, Szipőcs R, Krenács T, Gyöngyösi N, Wikonkál N, Kárpáti S, Németh K.

Efficiency of long-term high-dose intravenous ascorbic acid therapy in locally advanced basal cell carcinoma – a pilot study

POSTEPTY DERMATOLOGII I ALERGOLOGII

doi.org/10.5114/ada.2019.83027. (2019)

IF: 1,471

Kiss N, Avci P, Bánvölgyi A, Lőrincz K, Szakonyi J, Gyöngyösi N, Fésűs L, Lee G, Wikonkál N.

Intralesional therapy for the treatment of keratoacanthoma.

DERMATOLOGIC THERAPY. 13:12872. (2019)

Kiss N*, Anker P*, Fésűs L, Lőrincz K, Bánvölgyi A, Bozsányi Sz, Wikonkál N.

A rosszindulatú hámeredetű bőrdaganatok kialakulásának genetikai háttere, új ismeretek a karcinogenezis folyamatában

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 94(5):220-226. (2018)

*megosztott első szerzők

Lőrincz K, Medvecz M, Kiss N, Glász-Bóna, Hársing J, Lepesi-Benkő R, Hatvani Z, Mazán, Kárpáti, Wikonkál N.

Confirmation of the role of a KRT5 mutation and successful management of skin lesions in a patient with Galli-Galli disease

CLINICAL AND EXPERIMENTAL DERMATOLOGY 2018: 43(8):972-974. (2018)

IF: 1,484

Kiss N, Plázár D, Lőrincz K, Bánvölgyi A, Valent S, Wikonkál N.

A hidradenitis suppurativa nőgyógyászati vonatkozásai

ORVOSI HETILAP 160(8):291-299. (2019)

Oláh J, Varga A, Csányi I, Emri G, Kiss N, Varga E, Németh IB, Lengyel Zs, Holló P.

A rosszindulatú hámeredetű bőrdaganatok klinikai jellemzői és diagnosztikája 2018-ban

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 94(5):227-236. (2018)

Lorincz K, Haluszka D, Kiss N, Gyongyosi N, Banvolgyi A, Szipocs R, Wikonkal NM.

Voluntary exercise improves murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity.

ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH 309(3):209-215 (2017)

IF: 2,148

Haluszka D, Lőrincz K, Kiss N, Szipőcs R, Kuroli E, Gyöngyösi N, Wikonkál NM.

Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy **BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS** 7(11):4480-4489. (2016)

IF: 3,337

Kiss N, Wikonkál NM.

A rosacea szisztémás kezelése

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 92(4):183-186. (2016)

Lőrincz K, Kiss N, Gyöngyösi N, Wikonkál NM.

Hidradenitis suppurativa, az újra felfedezett betegség

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 92(5):209-213. (2016)

Kiss N, Hamar P.

Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models

BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL 2016:3763250. (2016)

Kaucsar T, Godo M, Revesz C, Kovacs M, Mocsai A, Kiss N, Albert M, Krenacs T, Szenasi G, Hamar P.

Urine/Plasma Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Ratio Is a Sensitive and Specific Marker of Subclinical Acute Kidney Injury in Mice

PLOS ONE 11(1):0148043. (2016)

IF: 2,806

Szalay CI, Erdelyi K, Kokeny G, Lajtar E, Godo M, Revesz C, Kaucsar T, Kiss N, Sarkozy M, Csont T, Krenacs T, Szenasi G, Pacher P, Hamar P.

Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain

PLOS ONE 10(6):0127090. (2015)

IF: 3,057

11. Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem végére érve szeretnék köszönetet mondani és nagyrabecsülésemet kifejezni mindazoknak, akik nélkül tudományos munkám nem valósulhatott volna meg. Köszönet illeti témavezetőmet, Prof. Dr. Wikonkál Norbertet. Nagyon szerencsés vagyok, hogy negyedéves orvostanhallgatóként bőrgyógyászat gyakorlatvezetőm volt és bevezetett ebbe a rendkívül komplex és gyorsan fejlődő szakterületbe. Köszönöm belém vetett folytonos bizalmát, hogy bekapcsolódhattam a Fotobiológiai és Fotokarcinogenezis Laboratórium munkájába először mint TDK, majd mint PhD hallgató, és hogy az évek során minden kutatómunkámhoz szükséges támogatást, útmutatást és szakmai segítséget megkaptam. Wikonkál Professor Úr tanácsai, értékes hozzászólásai mindvégig vezérfonalként szolgáltak munkám során és szakmai fejlődésemet rendkívüli mértékben segítették. A tudomány magas fokon való művelését tanulhattam tőle.

Őszinte köszönettel tartozom konzulensemnek, Dr. Szipőcs Róbertnek, hogy éppen elérhető pályázati forrásainak (pl. Nemzeti Agykutatási Program), szerződéses árbevételének, továbbá saját céges (R&D Ultrafast Lasers Kft.) erőforrásainak felhasználásával lehetővé tette, hogy a MTA Wigner FK Szilárdtestfizikai és Optikai Intézet „Femtosekundumos lézerek a nemlineáris mikroszkópiában” kutatócsoportjában tudományos segédmunkatársaként dolgozhassak több éven keresztül úgy, hogy kutatási munkánkhoz sem hazai, sem EU-s finanszírozású támogatási szerződéssel nem rendelkezünk. Köszönöm javaslatait a kidolgozandó témák (pl. DVRF-CARS, BCC SHG képeinek numerikus analízise) vonatkozásában, személyes közreműködését mikroszkópiás mérési elképzeléseim, feladataim kísérleti megvalósításában, valamint az optika és a lézerfizika területén nyújtott szakmai segítséget, az átadott tudást és szakértelmet, mely nélkülözhetetlen volt a bemutatott kutatómunka elvégzéséhez.

Köszönet Dr. Medvecz Mártának az örökletes bőrgyógyászati betegségek vizsgálatában nyújtott iránymutatásáért, precizitásáért, hogy rengeteg segítséget nyújtott és magas szintű szakmai tudásával hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönet Prof. Dr. Sárdy Miklósnak, hogy kutatómunkámat intézetvezetőként és programvezetőként végig támogatta, figyelemmel kísérte és lehetővé tette, hogy azt a tengerentúlon is bemutassam. Köszönöm, hogy támogatta doktori képzésemet követően

a klinikán bőrgyógyászat szakképzésem megkezdését, és hogy kutatásaimat a szakképzés alatt tovább folytathatom.

Hálával tartozom munka-és szerzőtársaimnak és egyben barátaimnak, akik a kutatással töltött napokat feldobták lelkesedésükkel és tehetségükkel. Köszönöm Dr. Lőrincz Kendének, aki mindvégig áldozatos munkával segítette kutatásomat és bármikor bizalommal fordulhattam hozzá. Köszönöm Dr. Bánvölgyi Andrásnak kimeríthetetlen önzetlen támogatását és a számtalan értékes konzultációt. Köszönöm Dr. Gyöngyösi Nórának, hogy a kezdetektől fogva mindig biztatott, támogatott és hasznos tanácsokkal látott el. Köszönöm Dr. Haluszka Dórának, hogy az általa megkezdett kísérleteket folytathattam, melyekhez sok útmutatást kaptam tőle. Köszönöm Dr. Fésűs Lucának, hogy kísérleteim folytatásában nagy segítségemre van. Köszönöm Dr. Márton Dalmának, hogy sokszor fordulhattam hozzá ügyes-bajos dolgaimmel.

Köszönet Prof. Dr. Kárpáti Saroltának, hogy intézetvezetése alatt tudományos munkámat megkezdhettem és hogy a bőrgyógyászati genetika területén Dr. Mayer Balázssal egyetemben igen értékes munkával jártunk hozzá kutatásaimhoz. Egyúttal köszönöm Mazán Mercédesz technikai segítségét.

Köszönet illeti Dr. Hársing Juditot és Dr. Kuroli Enikőt, akik a szövettani értékelésekben és leletezésben nélkülözhetetlen munkát végeztek és szakmai útmutatásaik és hozzáértésük nagyban segítették kutatómunkámat. Valamint köszönöm a szövettani laboratórium munkatársainak segítségét a szövettani minták feldolgozásában. Külön köszönet Szigetvári Csillának, aki a fagyasztott metszetek készítésében adott segítséget. Köszönöm Prof. Dr. Fekete Györgynek az örökletes bőrgyógyászati kórképek területén nyújtott fontos segítségét.

Köszönöm tudományos diákköröseinknek, köztük Bozsányi Szabolcsnak, Anker Pálmának, Zakariás Sárának és Plázár Dórának, hogy egyetemi szabad óráikat, napjaikat nem kímélve kutatómunkámban segítségemre voltak és hogy őket tanítva én is sokat tanulhattam.

Köszönöm az R&D Ultrafast Lasers Kft. munkatársainak, Krolopp Ádámnak és Vass Lajosnak a munkáját a nemlineáris mikroszkópiai mérések gépész-, és villamosmérnöki, valamint szoftveres technikai háttérének biztosításában.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika minden dolgozójának a lehetőséget, hogy a klinikán kutatómunkámat végezhettem.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy doktori tanulmányaim évei alatt türelemmel és megértéssel támogattak.

Támogatás: Szipócs Róbert vezetésével a „Több hullámhosszon szinkron működő ultragyors szállézeres festékkjelölés mentes kórszöveti vizsgálatokhoz” című, K 129047 számú kutatási szerződés (2018-2022).