

## АНАЛІЗ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ СУЧАСНОЇ МІКРОСКОПІЇ *IN VIVO* ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Є. А. Крючина, А. А. Крючин<sup>1</sup>

Медичний центр «CONSILIUM MEDICAL»

<sup>1</sup>Інститут проблем реєстрації інформації НАН України

Ендоскопічна оптична мікроскопія *in vivo* надає інструмент для оцінювання архітектури та морфології тканини, що подібні до стандартного гістологічного дослідження, без необхідності видалення тканини. У цій статті автори зосередились на технологіях оптичного зображення *in vivo*, що мають потужний потенціал для суттєвого покращення діагностики та терапії злоякісних пухлин, а саме флуоресцентної конфокальної мікроскопії, оптичної когерентної томографії, мікроскопії світлового листа, двофотонної та високороздільної мікроскопії, атомно-силової мікроскопії, електронної мікроскопії тощо. Досліджено технологічні принципи, доклінічні та клінічні дослідження, що аналізують чутливість та специфічність зазначених методів у діагностиці та лікуванні різних варіантів злоякісних новоутворень, методи комп'ютерного оброблення зображень, обговорено перспективи вдосконалення зазначених технологій, подальші перспективи для розроблення новітніх оптичних пристроїв для діагностики та лікування злоякісних пухлин.

**Ключові слова:** прижиттєва мікроскопія, злоякісні новоутворення, діагностика, лікування.

## ANALYSIS OF THE USE OF MODERN *IN VIVO* MICROSCOPY METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MALIGNANT NEOPLASMS

Ye. A. Kryuchyna, A. A. Kryuchyn<sup>1</sup>

Medical center «CONSILIUM MEDICAL»

<sup>1</sup>Institute for Information Recording, National Academy of Sciences of Ukraine

**Background.** *In vivo* endoscopic optical microscopy provides a tool to assess tissue architecture and morphology similar to standard histological examination without the need for tissue removal. Real-time *in vivo* imaging has become an integral tool for the investigation and understanding of cellular processes in health and disease at single-cell resolution, has revolutionized visualization of tumor-microenvironment interactions in real time. At the same time, there are still many unresolved questions regarding the clear interpretation of the results obtained with the intravital microscopy, indications for the clinical application of each of the technologies, the formation of clinical protocols with the inclusion of appropriate methods for different nosology, modification of surgical instruments with the involvement of optical systems, etc.

**Materials and methods.** Theoretical analysis, generalization, and systematization of research results were carried out in accordance with PRISMA Group recommendations using such leading scientometric databases as PubMed, Medline, PILOTS Ovid EMBASE, Ovid Cochrane Central Register of Controlled Trials, Ovid Cochrane Database of Systematic Reviews, Ovid PsycINFO, Global Health Library CINAHL, and the Web of Science and Scopus, for the period from 2003 to 2023 by keywords: intravital microscopy, intravital multiphoton microscopy, fluorescence confocal microscopy, photodynamic diagnostics, optical coherence tomography, confocal laser endomicroscopy, atomic force microscopy, computer image processing.

**Results.** In this article, we focus on optical imaging technologies *in vivo* that have the powerful potential to significantly improve the diagnosis and therapy of malignant tumors: fluorescence confocal microscopy, optical coherence tomography, light sheet microscopy, two-photon and high-resolution microscopy, atomic force microscopy, electron microscopy, etc. We investigated the technological principles, preclinical and clinical studies analyzing the sensitivity and specificity of the above methods in the diagnosis and treatment of various types of malignant neoplasms, methods of computer image processing, discussed the prospects for improving the above technologies, further prospects for the development of the latest optical devices for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms. We also address the advantages and limitations of this high-resolution technologies.

**Conclusions.** Major technological advances are rapidly expanding the frontiers of intravital microscopy, which is likely to play an increasingly important role in preclinical, clinical cancer research, diagnosis and treatment of malignant neoplasms in the coming years.

**Keywords:** intravital microscopy, malignant neoplasms, diagnosis, treatment.

**Вступ.** Морфологічний метод являється провідним в онкології – морфологічна верифікація є обов'язковою для встановлення діагнозу та проведення спеціального лікування. Відомі такі морфологічні методи дослідження як цитологічний, гістологічний, метод електронної мікроскопії, цитохімічний, гістохімічний, імуногістохімічний. Об'єктом морфологічного дослідження являється зразок тканини, що може бути отриманий шляхом взяття мазка, змиву, зашкрібка, проведення біопсії або хірургічної операції. Завдання морфологічної діагностики: визначення гістологічного діагнозу, ступеню диференціювання пухлини, наявності інвазії стромы та судин пухлиною, некрозів у пухлині, вивчення краю резекції пухлини, опис фону, на якому виник пухлинний процес, вивчення реакції навколишньої тканини (імуноморфологічні аспекти, ангіогенез, дистрофічні зміни стромы тощо), визначення патоморфозу пухлини. У більшості (85–90 %) випадків для визначення характеру пухлини достатньо якісно пофарбованих гематоксилін-еозином тонких парафінових зрізів. В окремих випадках необхідне більше глибоке вивчення пухлинної тканини – наприклад, коли пухлина має низький ступінь диференціації, або коли виявлений метастаз без визначеного первинного вогнища. Для цього застосовуються гістохімічний, імуногістохімічний методи, метод електронної мікроскопії.

Гістохімічне дослідження надає можливість вивчити локалізацію хімічних речовин у клітинних структурах, тканинах, а також проаналізувати їх функціонально-метаболічний стан. В арсеналі цього методу багато реакцій, що дозволяють виявити білки (реакція з динітрофторбензолом), вуглеводи (ШИК-реакція), нуклеїнові кислоти (фарбування метиловим зеленим-піроніном), ліпіди (фарбування Суданом чорним В). Гістохімічний метод допомагає в багатьох випадках вирішити проблему диференційної діагностики. Цей метод дуже чутливий і специфічний, дозволяє виявляти

дрібні фрагменти структури клітин. Імуногістохімічний метод – це застосування моноклональних і поліклональних антитіл на гістологічних зрізах для визначення локалізації різних білків в тканинах та окремих клітинах. Цей метод продемонстрував найбільшу ефективність для визначення первинної пухлини при дослідженні анонімного метастазу, вивчення провісних і прогностичних факторів пухлини, виявлення вірусів та мікроорганізмів.

Проте, електронна мікроскопія не завжди дозволяє виявити морфологічні зміни, специфічні для різних онкологічних процесів, хоча електронний мікроскоп допоміг вивчити ультраструктуру будову пухлинної клітини. Але критерії оцінювання злоякості новоутворення залишилися такими самими, що існували при дослідженні за допомогою світлового мікроскопа: цитологічні зміни (збільшений розмір і неправильна форма ядра, збільшення кількості функціонально активного еухроматину, наявність в ядрі включень тощо), порушення міжклітинної взаємодії, наявність інфільтруючого зростання. Електронна мікроскопія не здатна встановити хімічний склад включень та вакуолей, антигенний склад клітини. Тому на сьогодні електронна мікроскопія не набула розповсюдження в онкологічній практиці [1]. У той же час останні розробки у широкоформатній електронній мікроскопії дозволили створювати зображення, що надають детальну ультраструктурну інформацію про нормальні та патологічні клітини і тканини. Аналіз цих зображень покращує розуміння клітинної організації, взаємодії та змін, пов'язаних із захворюваннями. На сьогодні, хоча 2D електронна мікроскопія все ще є важливим інструментом у багатьох областях діагностики, 3D-зображення ультраструктурних взаємозв'язків як між нормальними, так і пухлинними клітинами в поєднанні з їх позаклітинним матриксом (ЕСМ) дозволяють краще зрозуміти механізми прогресування пухлини та визначити потенційні терапевтичні цілі [2].

Ракова клітина характеризується морфологічними та метаболічними змінами, що являються ключовими ознаками канцерогенезу. Аденозинтрифосфат (АТФ) у ракових клітинах утворюється переважно шляхом аеробного гліколізу, а не окисного фосфорилування. У нормальному клітинному метаболізмі нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH) вважається основним донором електронів, а флавінаденіндинуклеотид (FAD) – акцептором електронів. Під час метаболізму в раковій клітині виявляється збільшення NADH, оскільки шлях перемикається з окисного фосфорилування на аеробний гліколіз. Часто під час ініціації та прогресування раку регуляція розвитку ЕСМ обмежена та стає дезорганізованою. Поведінка пухлинних клітин регулюється ЕСМ у мікросередовищі пухлини. Колаген, що утворює каркас мікрооточення пухлини, також впливає на її поведінку. Передові методи оптичної мікроскопії корисні для визначення метаболічних характеристик як ракових, так і нормальних клітин і тканин. Їх можна використовувати для ідентифікації мікроструктури колагену, функції NADH, FAD та ліпідів у живій системі [3].

За останні два десятиліття прижиттєва мікроскопія (IVM) зарекомендувала себе як потужна техніка, що може значно покращити наше розуміння механізмів розвитку раку шляхом виявлення динамічних взаємодій, які визначають формування пухлини, її прогресування та ефект лікування у живих об'єктів [4, 5, 6].

IVM революціонізувала наше розуміння поведінки клітин у складних тканинних комплексах, дозволивши спостерігати в режимі реального часу молекулярні та клітинні процеси в їх природному середовищі. У доклінічних дослідженнях IVM став стандартним інструментом для механістичних досліджень відповіді на терапію та раціонального проектування нових стратегій лікування. Технологічний розвиток продовжує розширювати глибину та якість зображень, що можна досягти в живій тканині, а вдосконалення модальностей візуалізації, таких як флуоресцентне та фосфоресцентне зображення протягом життя, полегшує спільну реєстрацію динаміки окремих клітин із метаболічним станом тканини. Співвідношення IVM із методами

мезоскопічної та макроскопічної візуалізації додатково сприяє перетворенню механістичних уявлень, отриманих за допомогою IVM, у клінічно значущу інформацію [7].

Дослідження прижиттєвої багатофотонної мікроскопії (IVM-MPM) вже дозволили глибше зрозуміти складні події, що відбуваються при злоякісних новоутвореннях на молекулярному, клітинному та тканинному рівнях. За допомогою IVM визначено, що певні прямі та непрямі антиангіогенні методи лікування можуть «нормалізувати» аномальні пухлинні судини. Це відкриття дає змогу обирати оптимальні дози та схеми комбінованої терапії [8]. IVM та оптична когерентна томографія (ОСТ) є потужними оптичними інструментами візуалізації, що дозволяють візуалізувати динамічну біологічну активність живих суб'єктів із субклітинною роздільною здатністю. Останні досягнення в маркуванні та методах без міток розширюють можливості IVM і ОСТ для широкого спектру доклінічних і клінічних досліджень раку, забезпечуючи глибоке розуміння складної фізіологічної, клітинної та молекулярної поведінки пухлин. Доклінічні IVM і ОСТ з'ясували багато незвизначених аспектів біології злоякісних пухлин, тоді як клінічні застосування IVM і ОСТ революціонізують діагностику та лікування раку [9].

Силова спектроскопія однієї молекули (SMFS) є новим інструментом для дослідження механічних властивостей біомолекул та їх реакції на механічні сили, а одним із найбільш використовуваних методів є атомно-силова мікроскопія (AFM). AFM нещодавно привернула велику увагу завдяки своїй здатності аналізувати біомолекулярні взаємодії та виявляти певні біомолекули, що відіграють вирішальну роль у розвитку (прогресуванні) злоякісного новоутворення. AFM застосовується для вивчення механічних властивостей клітин, тканин, мікроорганізмів, вірусів, білків. Метод знайшов застосування в різних біомедичних напрямках, зокрема біології раку, де його використовують як на етапах діагностики, так і при створенні фармакологічних засобів. AFM дозволила відповісти на питання про механочутливість нейронів і механічних змін у вірусах, поділу клітин тощо [10]. AFM має

низку переваг, що дає можливість застосовувати цей метод у цитології. Так, AFM дозволяє вивчати структуру та різноманітні властивості поверхонь у різних середовищах із високою просторовою роздільною здатністю, близько кількох нанометрів (7-8 нм), за невеликий час (хвилини). AFM отримує тривимірне зображення клітин і макромолекул на їхній поверхні, а також досліджує поведінку макромолекул і живих клітинних систем в умовах, наближених до фізіологічних. Спектральні дослідження, що проводяться за допомогою AFM, дають інформацію про хімічний склад об'єкта, що досліджується. Крім того, можливе детектування фізичних властивостей досліджуваних поверхонь.

У той же час залишається багато невирішених питань стосовно чіткої інтерпретації результатів, отриманих за допомогою різних оптичних методик, показів до клінічного застосування кожної з технологій, формування клінічних протоколів із включенням відповідних методик для кожної нозології, модифікації хірургічного інструментарію з залученням оптичних систем тощо.

**Мета дослідження:** аналіз поточного стану використання новітніх оптичних технологій *in vivo* для діагностики та лікування злоякісних пухлин.

**Матеріал і методи.** Проведено теоретичний аналіз, узагальнення, систематизація результатів досліджень відповідно до рекомендацій PRISMA Group із використанням таких провідних наукометричних баз даних як PubMed, Medline, PILOTS Ovid EMBASE, Ovid Cochrane Central Register of Controlled Trials, Ovid Cochrane Database of Systematic Reviews, Ovid PsycINFO, Global Health Library CINAHL, and the Web of Science and Scopus, за період с 2003 по 2023 рр. за ключовими словами: прижиттєва мікроскопія, прижиттєва багатофотонна мікроскопія, флуоресцентна конфокальна мікроскопія, фотодинамічна діагностика, оптична когерентна томографія, конфокальна лазерна ендомікроскопія, атомно-силова мікроскопія, комп'ютерне оброблення зображень. Досліджено технологічні принципи, доклінічні та клінічні дослідження, що аналізують чутливість і специфічність зазначених методів у діагностиці та лікуванні злоякісних новоутворень.

**Результати та їх обговорення.** Солідна пухлина – це структура, що складається з ракових клітин і стромальних клітин хазяїна, вбудованих у ЕСМ і живлених судинною мережею. ІVM забезпечує безпрецедентне молекулярне, анатомічне та функціональне уявлення про внутрішню роботу цієї структури та надає засіб для перевірки ефективності різних методів лікування. Клітинна візуалізація виявила ключові кроки в поширенні раку (інвазія та метастазування), а також перешкоди для різноманітних клітинних методів лікування (наприклад, імунотерапії та генної терапії). Клітинна візуалізація дозволила виміряти взаємодію між різними субпопуляціями клітин у пухлині. Анатомічне зображення дозволило кількісно визначити морфологічні відхилення в судинах пухлини, а також розмір пор у їхніх стінках. Функціональна візуалізація показала, що кровоток пухлини, проникність судин, інтерстиціальна дифузія, конвекція та зв'язування являються просторово та часово неоднорідними в пухлинах та залежать від взаємодії між організмом та пухлиною і змінюються протягом курсу лікування.

Для діагностики злоякісних пухлин на сьогодні використовуються різні мікроскопічні системи з високою роздільною здатністю, а саме конфокальна мікроскопія, мікроскопія світлового листа, двофотонна/нелінійна мікроскопія, оптична когерентна мікроскопія, мікроскопія зі структурованим освітленням, мікроскопія вимушеного комбінаційного розсіювання (SRS), інфрачервона мікроскопія, мікроскопія з УФ-поверхневим збудженням (MUSE) тощо [11, 12, 13]. Роздільна здатність цих систем обмежена дифракцією світла і становить у діапазоні від ~300 нм до кількох мікрон. Вони або виявляють такі властивості тканин, як зміна показника заломлення, NADH/FAD, подвійне променезаломлення, власне комбінаційне розсіювання або сигнали поглинання макромолекул тощо, або використовують екзогенні мітки для покращення візуалізації загальної архітектури тканини. В світловій мікроскопії оптичний контраст є таким же важливим, як і оптична роздільна здатність, що визначає кінцеву продуктивність системи візуалізації. Існує два типи контрасту, що формує

зображення: власний контраст або зображення без міток, яке виявляє внутрішні оптичні сигнали від взаємодії світла з тканиною, та екзогенний контраст, який покладається на контрастні мітки (наприклад, флуоресцентний або хромогенний барвник) для виділення молекул, що аналізуються. Перевага внутрішнього оптичного сигналу полягає в мінімальній підготовці зразка, оскільки він не використовує жодних хімічних речовин або анти-тіл, таким чином є несприйнятливим до зміни, що внесені зовнішніми реагентами. Внутрішні оптичні сигнали широко використовуються для визначення відмінності нормальної тканини від неопластичної. Однак особливості пухлинної тканини, що лежить в основі виявлених оптичних сигналів, можуть бути неоднозначними. З іншого

боку, екзогенний оптичний контраст стає вигідним, коли є чітко визначена пухлина. Зокрема, певні білки надмірно експресуються в пухлинній тканині, тому позначення хромогенним або флуоресцентним барвником цього специфічного для пухлини білка забезпечить значну діагностичну цінність. Крім того, оскільки більшість функціональних молекул можна позначити контрастною речовиною, молекулярне зображення за допомогою мікроскопії з високою роздільною здатністю може служити важливим діагностичним інструментом і надати цінну інформацію про основну біологію патогенезу раку. В табл. 1 наведено стислу інформацію про методи мікроскопії високої роздільної здатності для оцінювання біологічних об'єктів [11].

Таблиця 1

**Методи оптичної мікроскопії високої роздільної здатності для оцінювання біологічних об'єктів**

№ з/п	Система мікроскопії	Переваги	Обмеження
1	Конфокальна мікроскопія (Confocal microscopy)	Один із найбільш універсальних інструментів. Виявляє як власне розсіяне світло (різниця показників заломлення), так і екзогенні сигнали (наприклад, флуоресценція). Застосовують як для щільної, так і для прозорої тканини (до ~ 200 мкм)	Роздільна здатність обмежена дифракцією. Внутрішній контраст часто не дозволяє чітко розрізнити субклітинні органели
2	Мікроскопія стимульованого комбінаційного розсіювання (Stimulated Raman scattering microscopy)	Виявляє як власне, так і екзогенне комбінаційне розсіювання. Надає унікальну молекулярну інформацію про режим коливаль	Роздільна здатність обмежена дифракцією. Часто потрібна висока потужність лазера для генерації сильних раманівських сигналів
3	Оптична когерентна мікроскопія (Optical coherence microscopy)	Виявляє сигнали внутрішнього розсіювання через невідповідність показників заломлення. Висока швидкість, велике поле зору. Низька вартість. Роздільна здатність обмежена кількома мікронами	Відсутність молекулярної специфічності. Недостатній контраст для розрізнення субклітинних органел
4	Мікроскопія світлового листа (Light-sheet microscopy)	Низький ефект фотознебарвлення та підходить для тривалої (від днів до тижнів) візуалізації живих клітин і органел. Висока швидкість і велике поле зору	Потрібна екзогенна мітка флуорофора. Обмежена глибина проникнення в щільні тканини

Продовж. табл. 1

5	Двофотонна / нелінійна мікроскопія (Two-photon/nonlinear microscopy)	Забезпечує високий молекулярний контраст за допомогою або автофлуоресценції, або сигналів другої гармоніки (без міток) або мічених флуорофорів. Забезпечує більшу глибину проникнення порівняно з конфокальною мікроскопією	Роздільна здатність обмежена дифракцією. Висока вартість
6	Мікроскопія з УФ-поверхневим збудженням (Microscopy with UV- surface excitation)	Забезпечує висококонтрастну візуалізацію тканини. Зображення поверхні з обмеженою роздільною здатністю по глибині ~ 10 мкм	Швидко, просто і дешево. Роздільна здатність обмежена дифракцією
7	Мікроскопія на основі придушення спонтанного випромінювання (STED)	Забезпечує 3D-зображення з надвисокою роздільною здатністю ~ 50 нм. Застосовується до широкого спектру фотостабільних флуорофорів. Досягає більшої глибини зондування порівняно з іншими методами отримання зображень із надвисокою роздільною здатністю	Вимагає високої потужності лазера, що призводить до сильного фотопошкодження. Висока вартість
8	Мікроскопія стохастичної оптичної реконструкції (STORM)	Забезпечує роздільну здатність ~ 10 – 20 нм. Найкращий потенціал для недорогої системи. Потрібний тривалий час збирання (кілька хвилин)	Обмежується невеликою кількістю фотоперемікаючих флуорофорів
9	Розширювальна мікроскопія (Expansion microscopy)	Фізично розширює зразок і може бути зображена за допомогою звичайного конфокального мікроскопа. Застосовується до широкого спектру флуорофорів. Знижена яскравість	Можливість гетерогенного розширення та фізичного пошкодження зразка.
10	Кількісна фазова візуалізація (Quantitative phase imaging)	Вимірює різницю довжин оптичного шляху вздовж глибини зондування з нанорозмірною чутливістю. Немає фотопошкоджень, підходить для тривалої зйомки	Бокова роздільна здатність обмежена дифракцією. Обмежується тонкими зразками (4–5 мкм). Немає молекулярної специфічності
11	Спектроскопія розсіяного світла (Light scattering spectroscopy)	Визначає розмір частинок або оптичну густину в діапазоні від десятків нанометрів до кількох мікрон. Роздільна здатність обмежена дифракцією	Відсутність молекулярної специфічності. Інтерпретація даних базується на спрощених моделях розсіювання, що можуть не повністю відобразити складність властивостей тканин
12	Парціальна хвиля (Partial-wave)	Виявляє флуктуацію показника заломлення в межах зразка з нанорозмірною чутливістю	Бокова роздільна здатність обмежена дифракцією. Немає молекулярної специфічності

Наведені в табл. 1 методи можуть бути розділені на три основні категорії: дифракційно обмежені методи мікроскопії (1-6), мікроскопія з високою роздільною здатністю (7-8) і методи візуалізації без міток (9-12) [11].

**Сучасні методи візуалізації мікроскопічних зображень.** Сучасні методи мікроскопи інтегровані з новітніми методами візуалізації, а саме ОСТ [14, 15], флуоресцентна візуалізація [14, 16, 17], фотоакустична мікроскопія (РАМ) [14], лазерна спектр-контрастна візуалізація та доповнена реальність (AR) [14, 18], IVM-MPM, AFM [5, 10]. Вони використовують системи автоматизації і високоефективні системи оброблення зображень. Здійснюється перехід до роботизованих платформ візуалізації, що представляє систему зі значно більшими функціональними можливостями, ніж звичайний мікроскоп [14].

ОСТ – це безконтактний і мінімально інвазивний метод візуалізації, що вимірює розсіяне світло від тканини. Він здатний забезпечити просторову роздільну здатність субміліметрового масштабу, а також інформацію про поверхню, що є життєво важливою для оцінювання структури та позиціонування інструментів під час хірургічних процедур. Порівняно з іншими методами томографічної візуалізації, такими як МРТ та МСКТ, ОСТ має набагато кращі інтраопераційні характеристики, зокрема вищу роздільну здатність, відсутність небезпеки іонізуючого випромінювання та більшу сумісність із хірургічним обладнанням [14, 15, 19, 20, 21]. ОСТ – безконтактний метод зображення топологічної та внутрішньої мікроструктури зразків у трьох вимірах. ОСТ можна налаштувати як звичайний мікроскоп, як офтальмологічний сканер або використовувати ендоскопи та катетери малого діаметра для доступу до внутрішніх біологічних органів [22]. Хоча ОСТ є недорогим методом візуалізації *in vivo*, що забезпечує унікальні анатомічні зображення високої просторової та часової роздільної здатності, але дає мало молекулярної інформації. Ураховуючи широке застосування ОСТ у дослідженнях і клінічній практиці, його надійні розширення молекулярного зображення дуже бажано поєднувати з анатомічними зображеннями.

На сьогодні широко розробляються та впроваджуються в клінічну практику методи молекулярно-контрастної ОСТ візуалізації, контрастні речовини, зокрема на основі наночастинок [23].

РАМ – один із провідних методів неруйнівного контролю, що забезпечує візуалізацію підповерхневої структури тканини та дозволяє проводити реєстрацію, розпізнавання, класифікацію й оцінювання внутрішніх структурних дефектів і неоднорідностей об'єкту, не руйнуючи його. Тканина, що опромінюється лазерними імпульсами наносекундного діапазону, поглинає світло та локальне підвищення температури. Тепло викликає термодинамічне розширення, а саме фотоакустичний ефект, і генерує акустичну хвилю, яку потім приймає ультразвуковий детектор. За допомогою деяких методів оброблення даних можна отримати розподіл поглинання світла, що відображає розподіл відбивачів. Під час операції РАМ може бути корисним для спостереження за тонкими структурами під поверхнею, зокрема як картування мікросудин [24, 25, 26].

LSCI (лазерний спекл-контрастний аналіз) – метод, що використовується для оцінювання перфузії у реальному часі. Заснований на явищі, коли зворотне розсіяне світло від розсіювального середовища, що освітлюється когерентним світлом, утворює випадкову інтерференційну картину, а саме спекл-картину. Рух розсіювальних частинок усередині середовища викликає коливання спекл-картини, що може призвести до розмиття спекл-зображень. Під час освітлення тканини когерентним лазером і отримання зображень тканини з відповідним часом експозиції рух червоного кольору клітини крові можуть спричинити коливання спекл-патернів, отже, розмиття зображень може бути пов'язане з кровотоком. Це розмиття з малюнка використовується для обчислення спекл-контрасту, що корисний для кількісного аналізу кровотоку. LSCI є неінвазивним, відносно простим і економічно ефективним. Порівняно з одноточковою лазерною доплерівською флоуметрією та лазерним доплерівським зображенням, що відносно повільне, LSCI є швидким і повним полем, забезпечуючи 2D карту перфузії без сканування [14, 27, 28, 29, 30].

Незважаючи на те, що метод LSCI знаходиться на етапі розвитку, він уже знаходить широке застосування в наукових дослідженнях в області фізіології і патофізіології кровообігу. Методика являється доволі перспективною для досягнення високої роздільної здатності *in vivo* (на рівні десятків мікрометрів і мілісекунд) візуалізації змін кровотоку як для дослідницьких цілей, так і для клінічної діагностики найближчим часом, що дозволяє вже сьогодні ставити і вирішувати певні прикладні медичні та медико-технічні завдання. Використання інших методів для дослідження судин хоча і дає змогу лікарям отримувати інформацію про кровоносні структури, має ряд недоліків, що може компенсувати LSCI [31].

Використання методу світової листової флуоресцентної мікроскопії (LSFM) дає змогу швидко отримати зображення тканин із високою роздільною здатністю у великих двовимірних і тривимірних полях зору з однаковим рівнем деталізації. Оскільки LSFM сканує зразки, використовуючи площину світла замість точки (як у конфокальній мікроскопії), він може отримати зображення зі швидкістю в 100–1000 разів вище. На відміну від епіфлуоресцентної мікроскопії лише тонкий зріз (звичайно від кількох сотень нанометрів до кількох мікрометрів) зразка освітлюється перпендикулярно напрямку спостереження [32]. Люмінесцентна мікроскопія світлового листа стала революцією в біологічній візуалізації *in vivo*. Обмежуючи лазер збудження тонким шаром світлових листів поблизу глибини поля цілі мікроскопа, він не тільки зменшує розмиття поза фокусом у мікроскопічній візуалізації, але також зменшує фотозбільшення та фототоксичність, значно покращуючи чіткість зображення та розширюючи біологічні довжини зразків, час спостереження. Тривимірне зображення формується шляхом сканування зразка або світлового аркуша шар за шаром.

**Флуоресцентна мікроскопія.** Флуоресцентна мікроскопія – потужний інструмент ідентифікації наявності як органічних, так і неорганічних молекул у складних системах. Це можна досягти, використовуючи притаманні властивості молекули флуоресценції, процес, що часто назива-

ють автофлуоресценцією, або шляхом введення молекулярної мітки в систему, яка має відомий спектр флуоресценції та спорідненість до цікавої молекули. Ці флуоресцентні мітки, також відомі як флюорофори, можуть бути сконструйовані специфічними смугами поглинання та викиду, що дозволяє використовувати мультиплексування для виявлення найрізноманітніших видів в одному аналіті. Дана методика широко застосовується в багатьох біологічних і біомедичних програмах, включаючи секвенування ДНК, і при використанні в тандемі з конфокальною мікроскопією забезпечує багатоспектральні зображення клітин та інших дрібних предметів. Флуоресцентні протейнові мітки, живі клітинні барвники та інші методи флуоресцентного мічення білків надають ряд інструментів для дослідження практично будь-яких клітинних процесів під мікроскопом. Двома основними експериментальними проблемами при зборі значущих даних мікроскопії живих клітин являється мінімізація фотопшкодження при збереженні корисного співвідношення сигнал/шум і забезпечення відповідного середовища для клітин або тканин для відтворення фізіологічної динаміки клітин [33]. Оскільки різні типи тканин поглинають різну кількість флюорофорів під дією збуджувачого світла, хірургічне поле буде мати певні кольори за допомогою оптичного фільтра для спостереження, а різні тканини можна поділити очима людини завдяки контрасту, що забезпечують екзогенні флуоресцентні барвники [14]. Флуоресцентна візуалізація ґрунтується на освітленні флуоресцентно мічених білків або інших внутрішньоклітинних молекул із визначеною довжиною хвилі світла, ідеально поблизу піку спектра збудження флюорофора, і виявлення світла, випромінюваного на більшій довжині хвилі. Важливим питанням є те, скільки збуджувачого світла насправді необхідно для отримання корисного зображення [33]. Спільний ресурс флуоресцентної мікроскопії та клітинної візуалізації допомагає вирішити такі проблеми як дослідження клітинних і молекулярних механізмів раку, імунологічних, інфекційних, метаболічних, неврологічних і судинних захворювань, оцінити терапевтичну ефективність фармакологічних засо-



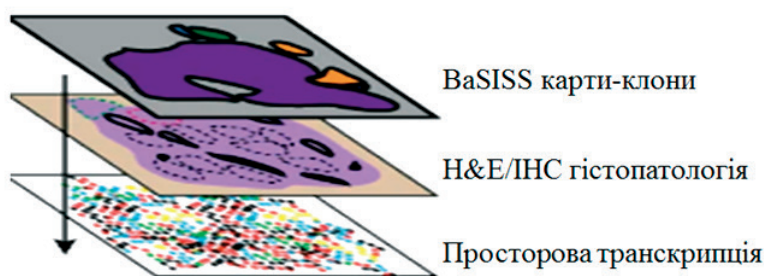


Рис. 1. Експресія генів і взаємодія з навколишнім середовищем [35]

бів, протестувати нові нанотехнології у клітинних аналізах, кількісно виміряти змінення морфології та патології тканин [34]. Найважливішим фактором для успішної візуалізації живих клітин і отримання значущих даних стає максимально обмежене світло збудження. Це вимагає глибокого розуміння використовуваного мікроскопа та оптимізації компонентів, що контролюють експозицію, вибір довжини хвилі та збір випромінюваних фотонів [33]. Флуоресцентна мікроскопія застосовується у новітніх технологіях розшифровки механізмів, що лежать в основі еволюції раку. Просторова геноміка має переваги для розшифровки механізмів, що лежать в основі еволюції раку та екології мікросередовища. Клітини, що оточують пухлину, можуть мати ключ до контролю за розповсюдженням раку. Розроблена техніка дослідження ланцюгів клітинної ДНК і РНК за допомогою флуоресцентної мікроскопії для сканування багато більших ділянок тканини. Нова техніка також включає робочий процес картування генетичних клонів, заснований на технології базово-специфічного секвенування *in situ* (BaSISS), що допомогла створити кількісні карти кількох генетичних клонів у восьми тканинах двох мультифокальних раків молочної залози, що охоплюють основні етапи прогресування раку молочної залози: протокова карцинома *in situ*, інвазивна пухлина та пухлина з метастазами у лімфатичні вузли. BaSISS – це конвеєр, що поєднує високOMUXиплексований протокол на основі флуоресцентної мікроскопії та алгоритми для картографування і фенотипічної характеристики унікального набору субклонів раку. Ці карти стали основою для подальшої молекулярної та гістологічної характеристики кожного клону.

Застосовуючи BaSISS до серії зразків із ключових стадій прогресування раку молочної залози визначено, що практично кожен зразок продемонстрував просторову організацію клонів, що вимагає подальшого дослідження у більших когортах. Дослідники змогли спостерігати та ідентифікувати зміни в експресії генів і те, як вони взаємодіють із навколишнім середовищем (рис. 1).

Новий метод може надати інформацію про провідний статус генів у клітинах. Використання процесу, що називається ампліфікацією по колу, де короткий праймер ДНК або РНК ампліфікується з утворенням довгої одноланцюгової ДНК або РНК за допомогою кільцевої ДНК-матриці та спеціальних ДНК- або РНК-полімераз, дає дослідникам чіткіше та покращене уявлення про зразок. Він виробляє дуже щільно упакований ланцюг ДНК, що має багато копій. Зараз тривають дослідження внутрішніх маркерів і маркерів навколишнього середовища, що відокремлюють небезпечні еволюційні лінії раку від тих, які є більш доброякісними. Вони також можуть розширити дослідження раку на все, що має внутрішню клітинну структуру [35, 36, 37].

**Атомно-силова мікроскопія.** Визначення механічних властивостей живих клітин як індикатора прогресування злоякісної пухлини стало можливим із розвитком локальних методів вимірювання, таких як AFM. Його найважливішою перевагою є наноскопічний характер, що означає можливість кількісного оцінювання дуже локальних змін. Результати, отримані за допомогою AFM-вимірів різних видів злоякісних новоутворень, показують, що для більшості видів злоякісних новоутворень окремі клітини характеризуються нижчим уявним

модулем Юнга, що вказує на вищу деформованість клітин. Виміряне значення залежить від різних факторів, таких як властивості субстратів, що використовуються для росту клітин, швидкість силового навантаження або глибини вдавнення. Незважаючи на це, результати підтвердили здатність AFM розпізнавати механічно змінені клітини. Останнє може суттєво вплинути на розвиток методичних підходів до точної ідентифікації патологічних клітин [38]. Методика AFM була розроблена в 1986 році Г. Біннігом із IBM, К. Ф. Куате та К. Гербером у Стенфордському університеті [39]. Піонерська публікація викликала зацікавленість спеціалістів – цитування роботи становить станом на грудень 2022 – 22850.

AFM дозволяє досліджувати клітини та молекули в нанометровому масштабі. Коли клітини знаходяться в процесі канцерогенезу й активуються зовнішніми стимулами, їхня морфологія, еластичність і властивості адгезії можуть змінюватися. AFM може виконувати зображення поверхні та ультраструктурне спостереження живих клітин із атомною роздільною здатністю в умовах, близьких до фізіологічних, збираючи інформацію силової спектроскопії, що дозволяє вивчати механічні властивості клітин. З цієї причини AFM має потенціал для використання як інструмент для дослідження високої роздільної здатності ультраструктури та механічних властивостей пухлинних клітин. AFM – це інструмент надзвичайно високої роздільної здатності, що можна використовувати для спостереження за морфологією зразка та кількісного вимірювання його механічних властивостей із атомною роздільною здатністю [40]. Після майже 30 років розвитку AFM відіграє все більш важливу роль у візуалізації клітин і вивченні механічних властивостей клітин. Від початкових режимів візуалізації (таких як контактні режими та режими візуалізації при натисканні) та режимів механічних вимірювань на основі силової кривої до сучасних режимів високошвидкісного зображення (таких як режим швидкого сканування) і режимів механічних вимірювань високої роздільної здатності (таких як пік силовий режим) роблять AFM все більш важливим у вивченні фізико-хімічних властивос-

тей клітини [41]. Механічні властивості клітин можна використовувати як новий діагностичний фізичний біомаркер на додаток до традиційного аналізу тканин [42]. Проте ще багато проблем, які необхідно вирішити, перш ніж застосування технології AFM можна буде повністю реалізувати на практиці (наприклад, у діагностиці раку) [40]. У той же час, незважаючи на нещодавні дослідження, що повідомляють про AFM-візуалізацію для аналізу біомолекул, застосування методу виявлення специфічних для раку біомолекул/клітин на основі AFM залишається малодослідженим, особливо для ранньої діагностики раку. На сьогодні активно впроваджуються в клінічну практику дві методики діагностики раку на основі AFM: біомолекулярне та клітинне виявлення на основі AFM-зображень; біомолекулярне зондування та аналіз клітин на основі АСМ-кантилевера. Доведено, що біомолекулярне дослідження на основі AFM застосовується не тільки для ранньої діагностики неоплазм шляхом вимірювання мінімальної кількості специфічних для злоякісної пухлини білків, але й для моніторингу прогресування раку шляхом співвіднесення кількості специфічних для пухлини білків із прогресуванням раку. Крім того, візуалізація та виявлення клітин на основі AFM використовується для діагностики злоякісних пухлин шляхом виявлення атипичних клітин у тканинах, а також для розуміння прогресування раку шляхом характеристики динаміки ракових клітин. Отже, сьогодні наголошується на виявленні біомолекул/клітин на основі AFM, що прокладе шлях для розроблення швидкої діагностичної системи на місці надання медичної допомоги для біомедичних застосувань [43].

**Хірургічні мікроскопи: розвиток технології та медичне застосування. Ендомікроскопія.** Хірургічні мікроскопи забезпечують регульоване збільшення, яскраве освітлення та чітку візуалізацію операційного поля, все частіше використовуються в клінічній практиці. Сучасні хірургічні мікроскопи інтегровані з новітніми методами візуалізації, такими як ОСТ, флуоресцентна візуалізація та AR [42]. Вони інтегровані з системами автоматизації і використовують високоєфективні

системи оброблення зображень, здійснюється перехід до роботизованих платформ візуалізації, що представляє систему зі значно більшими функціональними можливостями, ніж звичайний хірургічний мікроскоп. Існує потреба в мініатюрних мікроскопах, щоб дозволили досліджувати тканини *in vivo* в реальному часі. Такі пристрої можуть мати трансформаційний вплив для ранньої діагностики раку, а також для визначення процедур резекції пухлини [44]. Використовуючи барвники для швидкого фарбування, ендомікроскоп може створювати в режимі реального часу гістологічні зображення мікроархітектури тканини під час операції без необхідності вирізання будь-якої тканини. Інструментом легко керувати крізь тканини, завдяки миттєвому створенню зображення великої площі того, чого торкається кінчик волокна, подібно до функції панорамування на смартфонах. Зображення високої роздільної здатності відображаються в реальному часі на моніторі високої чіткості, з яким працює лікар [45].

**Лазерна конфокальна мікроскопія.** Конфокальна мікроскопія – це неінвазивний метод оптичної візуалізації, що може створювати мікроскопічні зображення необробленої тканини, які майже ідеально відповідають препаратам, пофарбованим гематоксилином та еозином. Доступні дві системи конфокальної візуалізації: відбивна конфокальна мікроскопія, заснована на природних відмінностях показників заломлення субклітинних структур у тканинах і флуоресцентна конфокальна мікроскопія, заснована на використанні флуорохромів, таких як акридиновий оранжевий, для підвищення контрасту епітелій-stroma [46]. Мініатюрні конфокальні мікроскопи розроблено для оптичного розрізу тканин із сильним розсіюванням, що вимагали різноманітних компромісів у розмірі, швидкості, вибірковості глибини, поля зору, роздільній здатності, контрастності зображення та чутливості [44]. В клінічній практиці конфокальна мікроскопія використовується з метою уникнення необхідності ексцизійної біопсії, тим самим зменшуючи потребу в патологістологічному дослідженні. Нарешті, флуоресцентні конфокальні мікроскопічні зображення тканини *in vivo* були такими ж точними, як зобра-

ження стандартного гістологічного дослідження, і були позбавлені артефактів, пов'язаних із замороженими зрізами, що можуть поставити під загрозу інтраопераційне оцінювання. Незважаючи на деякі обмеження, пов'язані в основному з чорно-білими зображеннями, які вимагають навчання інтерпретації зображень, це дослідження підтверджує, що флуоресцентна конфокальна мікроскопія може представляти собою альтернативу замороженим зрізам або коли збереження зразка має вирішальне значення [44, 46]. Розроблено та створено лазерний конфокальний мікроскоп, що для чіткої діагностики демонструє високе співвідношення сигнал/шум. Прилад скорочує час візуалізації із днів до хвилин, роблячи технологію придатною для клінічних досліджень і трансляції. Нарешті, автоматизована візуалізація біоптатів раку молочної залози у людини одержується приблизно за 1 год. (епітеліального компоненту та ЕСМ) і швидкої діагностики без міток. Гістологічне дослідження, засноване на просторових моделях епітеліальних клітин, являється золотим стандартом для клінічної діагностики та дослідження карцином, незважаючи на те, що мікрооточення тканини відомо як важливе, його не використовують через складну та суб'єктивну інтерпретацію за допомогою існуючих інструментів. Пропонується точне виділення субтипів на основі молекулярних властивостей епітеліальних клітин, використовуючи нове спектроскопічне зображення з інфрачервоним перетворенням Фур'є високої чіткості (HD FT-IR) у поєднанні з алгоритмами машинного навчання. На додаток до виявлення чотирьох епітеліальних підтипів пухлини, одночасно розмежовуються три стромальні підтипи, що характеризують пухлини молочної залози. У той час як дані зображення FT-IR дозволяють повністю цифрову патологію з багатим інформаційним умістом, тривалий час спектрального сканування, необхідний для усереднення та оброблення сигналу, робить технологію непрактичною для рутинних досліджень або клінічного використання. Тому була розроблена конструкція, в якій заломлююча ІЧ-оптика забезпечує високу чіткість, швидке просторове сканування та спектральне налаштування за допомогою кван-

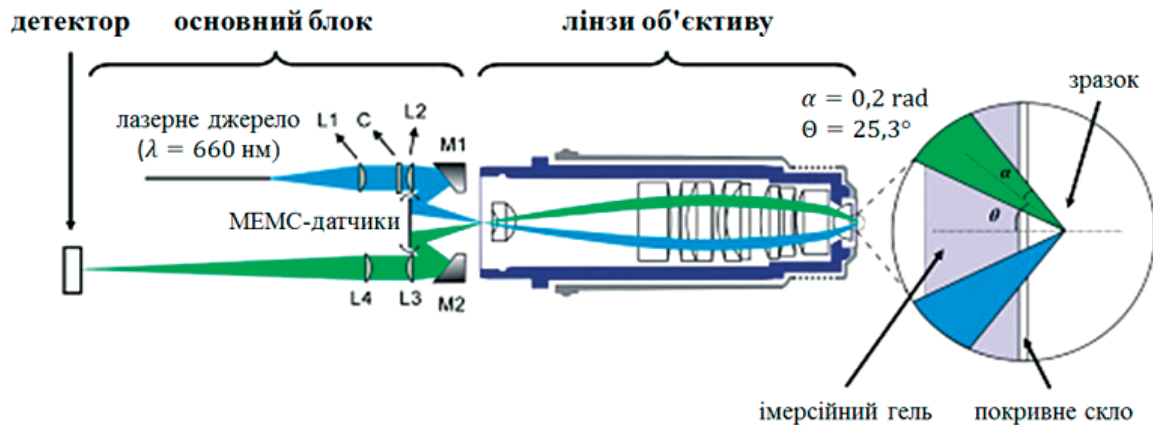


Рис. 2. Оптична схема мініатюрного мікроскопа LS-DAC. Шлях променю освітлення забарвлений у синій колір, тоді як шлях збору променю пофарбований у зелений колір. Основний корпус містить скануюче дзеркало MEMS, дзеркала (M1 і M2), що використовуються для вирівнювання променів таким чином, щоб вони перетиналися в задній фокальній площині лінзи об'єктива, і первинну оптику (L1, L2, L3 і L4), які фокусують двохосові пучки на задній фокальній площині. Мініатюрна система LS-DAC має роздільну здатність 1–2 мкм [44]

тового каскадного лазера (QCL). Цей інструмент одночасно забезпечує високу роздільну здатність (розмір пікселя 2 мкм) і високе відношення сигнал/шум (SNR) (>1300), забезпечуючи збільшення швидкості приблизно в 50 разів для отримання результатів порівняно з існуючими спектральними методами візуалізації. Ця розробка прокладає шлях для всебічного аналізу пухлинного мікрооточення в можливі періоди часу, представляючи важливий крок у практичній молекулярній гістопатології без міток [44, 47]. Розроблено різні архітектури конфокального мікроскопа для візуалізації тканин *in vivo*, включаючи одноосову конфокальну (SAC) і двохосову конфокальну (DAC) конструкцію з використанням як точкового сканування (PS), так і лінійного сканування (LS). На відміну від звичайних одноосових конфокальних (SAC) мікроскопів, що стали стандартним обладнанням у біологічних і клінічних лабораторіях, мініатюрний мікроскоп використовує двохосову конфокальну (DAC) архітектуру. Порівняно з мікроскопом SAC, мікроскоп DAC здатний краще подавляти розфокусоване та багаторазово розсіяне фонове світло, що забезпечує висококонтрастну мікроскопію в тканинах із сильним розсіюванням [44, 47]. Мініатюрний мікроскоп LS-DAC складається з трьох основних модулів (рис. 2): (1) основного корпусу, в якому

міститься оптика для освітлювального променю (синій) і збирального променю (зелений), MEMS скануючі дзеркала та дзеркала вирівнювання; (2) об'єktiv, що забезпечує 3-кратне збільшення від фокальної площини мікроскопа всередині тканини до задньої фокальної площини, яка сканується оптикою основного блоку; і (3) модуль детекторної матриці.

**Клінічне застосування різних видів мікроскопічних технологій у діагностиці та лікуванні злоякісних пухлин.** Сучасні ІVM технології широко впроваджуються в клінічну практику, зокрема застосовуються для діагностики та лікування меланому, раку молочної залози, сечового міхура, кишківника тощо [49, 50]. Так, нещодавно для підвищення точності діагностики неінвазивної меланоми розроблено численні інноваційні методи, засновані на оптичних технологіях, включаючи дерматоскопію, відбивну конфокальну мікроскопію, оптичну когерентну томографію, багатотонну збуджену флуоресценцію та поступову двофотонну збуджену флуоресценцію (дерматофлюороскопію). Деякі з них уже застосовані в реальних клінічних умовах, інші потребують додаткових досліджень і розробок. Ці технології являються перспективними для полегшення діагностики меланоми, оскільки вони неінвазивні, чутливі, об'єktivні та прості

у застосуванні. Діагностична точність, час виявлення, портативність і економічна ефективність пристрою – це всі аспекти, що потребують подальшого дослідження та вдосконалення [51]. Для діагностики та лікування раку молочної залози (до- та клінічні дослідження) застосовують флуоресцентну, конфокальну, генерацію другої гармоніки (SHG), когерентне антистоксове комбінаційне розсіювання (CARS) і флуоресцентну візуалізацію протягом життя (FLIM) [3, 52]. Нові технології оптичного зображення покращують виявлення та характеристики раку сечового міхура, а також якість трансуретральної резекції. Хоча дані про фотодинамічну діагностику є найвагомішими, клінічна ефективність цих технологій поки не доведена. Потрібні проспективні дослідження, зокрема візуалізації вузьких смуг, конфокальної лазерної ендомікроскопії та оптичної когерентної томографії. Оскільки кожна технологія розвивається та з'являються нові, аналіз економічної ефективності необхідно розглядати в контексті різних типів раку сечового міхура [53].

**Використання методів комп'ютерного оброблення зображень.** Багато систем уже розроблено та успішно використовується для клінічних, лабораторних і морфологічних досліджень. Еволюція аналізу зображень стала можливою, коли аналогові зображення оригінальних предметних скелець можна було перенести на цифрові зображення завдяки швидкому розвитку віртуальної мікроскопії, а віртуальні слайди залежали від комп'ютерних технологій. Сьогодні ціле предметне скло можна отримати за допомогою віртуальних мікроскопів. Застосування віртуальної мікроскопії та віртуального предметного скла для навчання, діагностики, телемедицини використовуються ширше, ніж застосування реального мікроскопа та справжнього предметного скла. В традиційній діагностиці раку патоморфологи досліджують біоптати для діагностичного оцінювання, як правило, на основі двовимірної морфології клітин і розподілу тканин. Таке оцінювання є суб'єктивним і часто демонструє значну варіабельність. Однак автоматизована система діагностики раку дозволяє об'єктивно судити за допомогою кількісних вимірювань [54].

Також впровадження автоматизованої системи діагностики раку сприятиме зменшенню дефіциту патоморфологів. Більшість сучасних систем і технологій автоматизованого аналізу медичних мікроскопічних зображень потребує використання методів та алгоритмів подальшого оброблення зображень, їх сегментації, визначення параметрів об'єкта, що, зазвичай, визначаються в ручному режимі та потребують додаткових апріорних знань про зображення, що суттєво ускладнює їх практичне застосування в клінічній медицині внаслідок недостатньої кількості знань у медичного персоналу.

Запропоновано та досліджено структуру для автоматизованого виявлення та класифікації злоякісних новоутворень на основі мікроскопічного зображень біоптатів із використанням клінічно значущих та біологічно інтерпретованих ознак. Різні етапи запропонованої методології включають покращення мікроскопічних зображень, сегментацію фонових клітин, виділення ознак і, нарешті, класифікацію. Відповідний та ефективний метод використовується на кожному етапі проектування запропонованої структури після проведення порівняльного аналізу методу, що зазвичай використовується в кожній категорії. Для виділення деталей тканини та структур використовується підхід адаптивного вирівнювання гістограми з обмеженням контрастом. Для сегментації фонових комірок використовується алгоритм сегментації k-середніх, оскільки він працює краще порівняно з іншими широко використовуваними методами сегментації. На етапі виділення ознак пропонується витягти різні біологічно інтерпретовані та клінічно значущі форми, а також ознаки на основі морфології із сегментованих зображень. До них належать функції текстури рівня сірого, функції на основі кольору, функції текстури рівня сірого кольору, функції на основі енергії текстури Ло, функції Тамури та функції вейвлету. Нарешті, метод K-найближчого сусідства використовується для класифікації зображень на нормальні та злоякісні категорії, оскільки він працює краще порівняно з іншими методами, що зазвичай використовуються для цього додатка. Ефективність запропонованої системи оцінюється за допомогою добре відомих

параметрів для чотирьох основних тканин (сполучної, епітеліальної, м'язової та нервової) випадково обраних 1000 мікроскопічних зображень біоптатів.

Блок-схема запропонованої системи оброблення наведена на рис. 3 [55].

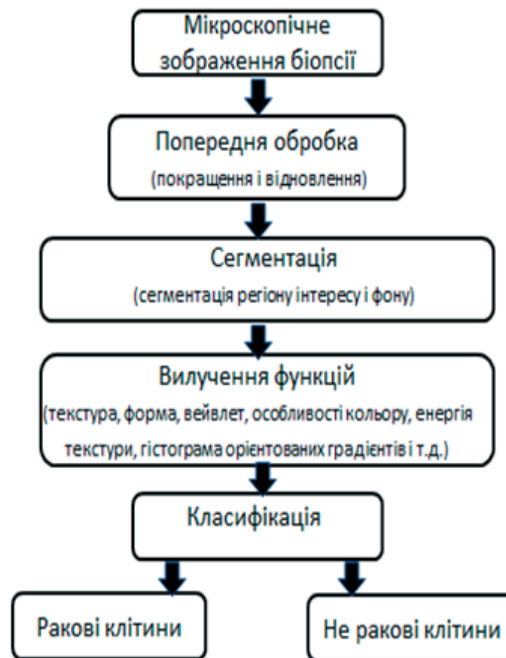


Рис. 3. Блок-схема запропонованої системи оброблення зображень [55]

Основною метою попереднього оброблення зображень є усунення певного погіршення якості, наприклад, зменшення шуму та посилення контрастності області інтересів. Зображення біоптатів, отримані за допомогою мікроскопа, можуть мати поганий контраст і нерівномірне фарбування, тому їх потрібно покращити за допомогою процесу покращення зображення, що збільшує контраст між переднім планом (об'єктами інтересу) та фоном [11, 21]. При верифікації злоякісних новоутворень мікроскопічний аналіз стикається з трьома основними проблемами. Як форма інтерпретації зображення, ці обстеження за своєю суттю є суб'єктивними, виявляючи значну варіабельність між спостерігачами та всередині них. Крім того, клінічні настанови та дослідження почали вимагати кількісного оцінювання як частини зусиль із кращої стратифікації ризику пацієнтів. Однак, незважаючи на те, що кількісне визначення є корисним у плануванні лікування, воно є трудомістким і схильним до помилок. Потенційне

рішення цих проблем – використання досягнень штучного інтелекту, зокрема глибокого навчання, що продемонструвало автоматизований аналіз медичних зображень із продуктивністю, порівнянною з ефективністю експертів-людей. Дослідження також показали потенціал для підвищення діагностичної точності, кількісного визначення та ефективності шляхом застосування алгоритмів глибокого навчання до оцифрованих зображень патологічних змін виявлення та класифікації раку. Однак інтеграція цих досягнень у діагностику раку складна через дві основні проблеми: оцифрування зображення та технічні навички, необхідні для використання алгоритмів глибокого навчання. По-перше, більшість мікроскопічних досліджень виконуються за допомогою аналогових мікроскопів, а оцифрований робочий процес вимагає значних інвестицій в інфраструктуру. По-друге, через відмінності в апаратному забезпеченні, прошивці та програмному забезпеченні використання алгоритмів штучного інтелекту, розроблених іншими,

є складним завданням навіть для експертів. Отже, фактичне використання алгоритмів штучного інтелекту в мікроскопії часто залишається недоступним [32].

**Заключення.** Сьогодні оптика, інформатика та онкологія, у тому числі клітинна біологія розвиваються разом як нова самостійна мультидисциплінарна галузь. Нові системи мікроскопії та алгоритми оброблення зображень дозволяють одночасно ідентифікувати численні взаємодії між пухлинними клітинами та компонентами мікрооточення пухлини. Методи молекулярної біології використовуються для візуалізації субклітинних структур і активності білка в окремих клітинах, що представляють інтерес, і пов'язують їх із даними фенотипу, відкриваючи двері для «клітинної біології *in vivo*». Поєднання IVM із додатковими методами являється перспективним для зв'язування фенотипу клітини з її генотипом, метаболічним станом або локалізацією тканини. Клінічне використання IVM для аналізу ефективності лікування раку постійно зростає, що свідчить про майбутню роль IVM для персоналізованої медицини [4, 50].

### Література.

1. Методики діагностики злоякісних новоутворень / Гривкова Л. В., Зотов О. С. – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/onkologiya/rozdil-nbsp-4-metodi-diagnostiki-zloyakisnih-novoutvoren>.

2. A workflow for visualizing human cancer biopsies using large-format electron microscopy / J. L. Riesterer, C. S. López, E. S. Stempinski, M. Williams et al. // *Methods Cell Biol.* – 2020. – Vol. 158. – P. 163–181.

3. Types of advanced optical microscopy techniques for breast cancer research: a review / A. D. U, N. Mazumder // *Lasers Med Sci.* – 2018. – Vol. 33 (9). – P. 1849–1858.

4. Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer / L. Perrin, B. Bayarmagnai, B. Gligorijevic // *Cancer Rep (Hoboken).* – 2020. – № 3 (1). – P. e1192.

5. Molecular Imaging in Oncology: Advanced Microscopy Techniques / D. Kapsokalyvas, M. A. M. J van Zandvoort // *Recent Results Cancer Res.* – 2020. – Vol. 216. – P. 533–561.

**Висновки.** 1. IVM – потужний метод оптичної візуалізації, що дозволяє безперервно неінвазивно контролювати молекулярні та клітинні процеси в інтактній живій тканині з роздільною здатністю 1–10 мкм. Така роздільна здатність наразі неможлива за допомогою неоптичних методів.

2. IVM має потенціал стати корисним клінічним інструментом для моніторингу інтегративної патофізіології та відповіді оптично доступних пухлин на різні види терапії у пацієнтів на злоякісні новоутворення.

3. Значні можливості для діагностики під час хірургічних операцій надають малогабаритні мікроскопи з високою роздільною здатністю.

4. Додаткові можливості для аналізу мікроскопічних зображень надає використання комп'ютерних методів оброблення, зокрема застосування нейромереж.

5. Конвергенція методів візуалізації, партнерства між академічною галуззю та клініцистами, а також нові обчислювальні можливості мають потенціал для каталізації швидкого прогресу та впровадження IVM у наступні кілька десятиліть.

6. In vivo microscopy as an adjunctive tool to guide detection, diagnosis, and treatment / K. W. Bishop, K. C. Maitland, M. Rajadhyaksha et al. // *J Biomed Opt.* – 2022. – Vol. 27 (4). – P. 040601.

7. Recent advances in intravital microscopy for preclinical research / M. Giampetraglia, B. Weigelin // *Curr Opin Chem Biol.* – 2021. – Vol. 63. – P. 200–208.

8. Intravital Microscopy (IVM) in Human Solid Tumors: Novel Protocol to Examine Tumor-Associated Vessels / Trumbull D. A., Lemini R., Bagaria S. P., Elli E. F., Colibaseanu D. T. et al. // *JMIR Res Protoc.* – 2020. – Vol. 9 (10). – P. e15677.

9. Optical microscopy and coherence tomography of cancer in living subjects / Si P., Honkala A., de la Zerda A., Smith B. R. // *Trends in Cancer.* – 2020. – Vol. 6, Is. 3. – P. 205–222.

10. Applications of atomic force microscopy in modern biology / Nandi T., Ainarapu S. R. K. // *Emerg Top Life Sci.* – 2021. – Vol. 5 (1). – P. 103–111.

11. High-resolution microscopy for imaging cancer pathobiology / Liu Y., Xu J. // *Curr Pathobiol Rep.* – 2019. – Vol. 7 (3). – P. 85–96.
12. Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens / Glaser A., Reder N., Chen Y. et al. // *Nat Biomed Eng.* – 2017. – Vol. 1 (7). – P. 0084.
13. Multi-photon microscopy and optical recording / В. В. Петров, А. А. Крючин, Є. В. Беляк, А. С. Лапчук. – К. : Академперіодика, 2016. – 156 с.
14. Laboratory evaluation of a robotic operative microscope-visualization platform for neurosurgery / Belykh E. G., Zhao X., Cavallo C., Bohl M. A. et al. // *Cureus.* – 2018. – Vol. 10 (7). – P. e3072.
15. Microscope-integrated optical coherence tomography: a new surgical tool in vitreoretinal surgery / Jayadev C., Dabir S., Vinekar A., Shah U. et al. // *Indian Journal of Ophthalmology.* – 2015. – Vol. 63 (5). – P. 399.
16. Microscope-integrated quantitative analysis of intraoperative indocyanine green fluorescence angiography for blood flow assessment: first experience in 30 patients / Kamp M. A., Slotty P., Turowski B., Etminan N. et al. // *Neurosurgery.* – 2012. – Vol. 70 (1 Suppl. Operative). – P. 65–73.
17. Intravital microscopy of tumor vessel morphology and function using a standard fluorescence microscope / Gaustad J. V., Simonsen T. G., Hansem L. M. K., Rofstad E. K. // *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* – 2021. – Vol. 48 (10). – P. 3089–3100.
18. Augmented reality visualization-guided microscopic spine surgery: transvertebral anterior cervical foraminotomy and posterior foraminotomy / D. Umabayashi et al. // *J. Am. Acad. Orthop. Surg. Glob. Res. Rev.* – 2018. – Vol. 2 (4). – P. e008.
19. Clinical utility of intraoperative tympanomastoidectomy assessment using a surgical microscope integrated with an optical coherence tomography / Lee J., Wijesinghe R. E., Jeon D., Kim P. et al. // *Scientific Reports.* – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 1–8.
20. Review of intraoperative optical coherence tomography: technology and applications / Carrasco-Zevallos O. M., Viehland C., Keller B., Draelos M. et al. // *Biomedical Optics Express.* – 2017. – Vol. 8 (3). – P. 1607–1637.
21. Optical coherence tomography: feasibility for basic research and image-guided surgery of breast cancer / Boppart S. A., Luo W., Marks D. L., Singletary K. W. // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2004. – Vol. 84 (2). – P. 85–97.
22. Optical coherence tomography / Bouma B. E., de Boer J. F., Huang D., Jang I. K. et al. // *Nat Rev Methods Primers.* – 2022. – Vol. 2. – P. 79.
23. Molecular contrast optical coherence tomography and its applications in medicine / Wang A., Qi W., Gao T., Tang X. // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23 (6). – P. 3038.
24. Virtual intraoperative surgical photoacoustic microscopy / Lee C., Lee D., Zhou Q., Kim J., Kim C. // *In European Conference on Biomedical Optics 2015, 21–25 June 2015, Munich, Germany.* – Proc. SPIE. – Vol. 9539. – P. 95390E.
25. The potential of photoacoustic microscopy as a tool to characterize the in vivo degradation of surgical sutures / Aguirre J., Morales-Dalmau J., Funk L., Jara F., Turon P., Durduran T. // *Biomedical Optics Express.* – 2014. – Vol. 5(8). – P. 2856–2869.
26. Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature / S. Hu, L. V. Wang // *J. Biomed. Opt.* – 2010. – Vol. 15 (1). – P. 011101.
27. Clinical applications of laser speckle contrast imaging: a review / Heeman W., Steenbergen W., van Dam G. M., Boerma E. C. // *Journal of Biomedical Optics.* – 2019. – Vol. 24, № 8. – P. 080901.
28. Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations / Briers D., Duncan D. D., Hirst E. R., Kirkpatrick S. J. et al. // *Journal of Biomedical Optics.* – 2013. – Vol. 18, № 6. – P. 066018.
29. Laser speckle contrast imaging: theory, instrumentation and applications / Senarathna J., Rege A., Li N., Thakor N. V. // *IEEE Reviews in Biomedical Engineering.* – 2013. – Vol. 6. – P. 99–110.
30. Experiment evaluation of speckle suppression efficiency of 2D quasi-spiral M-sequence-based diffractive optical element / A. Lapchuk, G. A. Pashkevich, O. V. Prygun, V. Yurlov, Y. Borodin, A. Kryuchyn // *Applied Optics.* – 2015. – Vol. 54, № 28. – P. E47–E54.
31. Лазерний спекл-контрастний аналіз для дослідження мікроциркуляції в судинах / Богомо-



лов М. Ф., Пузик М. Ю. // Біомедична інженерія і технологія. – 2020. – № 4. – С. 114–121.

32. An augmented reality microscope with real-time artificial intelligence integration for cancer diagnosis / Chen P. H. C., Gadepalli K., MacDonald R. et al. // *Nat Med.* – 2019. – Vol. 25. – P.1453–1457.

33. Fluorescence live cell imaging / Ettinger A., Wittmann T. // *Methods Cell Biol.* – 2014. – V. 123. – P. 77–94.

34. Fluorescence Microscopy & Cell Imaging. – Режим доступу: <https://unmhealth.org/cancer/research/shared-resources/microscopy.html>.

35. Understanding cancer's genetic makeup could halt its spread / J. Murphy. – Режим доступу: <https://www.laserfocusworld.com/biooptics/article/14286424/understanding-cancers-genetic-makeup-could-halt-its-spread>.

36. Spatial biology of cancer evolution / Seferbekova Z., Lomakin A., Yates L. R., Gerstung M. // *Nat Rev Genet.* – 2023. – Vol. 24 (5). – P. 295–313.

37. Spatial genomics maps the structure, nature and evolution of cancer clones / Lomakin A., Svedlund J., Strell C. et al. // *Nature.* – 2022. – Vol. 611. – P. 594–602.

38. Applicability of atomic force microscopy to determine cancer-related changes in cells / Lekka M. *Philos, Trans A. // Math Phys Eng Sci.* – 2022. – Vol. 380 (2232). – P. 0346.

39. Atomic force microscope / Binnig G., Quate C. F., Gerber C. // *Phys Rev Lett.* – 1986. – Vol. 56 (9). – P. 930–933.

40. Application of atomic force microscopy in cancer research / Deng X., Xiong F., Li X. et al. // *J Nanobiotechnol.* – 2018. – Vol. 16. – Режим доступу: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0428-0>.

41. Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak-Force Modulation Atomic Force Microscopy / Calzado-Martín A., Encinar M., Tamayo J., Calleja M., San Paulo A. // *ACS Nano.* – 2016. – Vol. 10 (3). – P. 3365–3374.

42. Are cancer cells really softer than normal cells? / Alibert C., Goud B., Manneville J. B. // *Biol Cell.* – 2017. – Vol. 109 (5). – P. 167–189.

43. Atomic force microscopy-based cancer diagnosis by detecting cancer-specific biomolecules and cells / Kwon T., Gunasekaran S., Eom K. // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2019. – Vol. 1871 (2). – P. 367–378.

44. Miniature in vivo MEMS-based line-scanned dual-axis confocal microscope for point-of-care pathology / Yin A. K., Glaser S. Y., Leigh Y., Chen L. et al. // *Biomed. Opt. Express.* – 2016. – Vol. 7 (2). – P. 251–263.

45. Researchers trial tiny new microscope to detect breast cancer / C. Brogan. – 2022. – Режим доступу: <https://www.imperial.ac.uk/news/241095/researchers-trial-tiny-microscope-detect-breast>.

46. Fluorescence confocal microscopy for pathologists / Ragazzi M., Piana S., Longo C., Castagnetti F. et al. // *Mod Pathol.* – 2014. – Vol. 27 (3). – P. 460–471.

47. Simultaneous cancer and tumor microenvironment subtyping using confocal infrared microscopy for all-digital molecular histopathology / Mittal S., Yeh K., Leslie L. S., Kenkel S. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2018. – Vol. 115 (25). – P. E5651–E5660.

48. Comprehensive review of surgical microscopes: technology development and medical applications / Ma L., Fei B. // *J Biomed Opt.* – 2021. – Vol. 26 (1). – P. 010901.

49. Intravital microscopy of the metastatic pulmonary environment / L. Babes, B. G. Yipp, D. L. Senger // *Methods Mol Biol.* – 2023. – Vol. 2614. – P. 383–396.

50. Intravital imaging to study cancer progression and metastasis / D. Entenberg, M. H. Oktay, J. S. Condeelis // *Nat Rev Cancer.* – 2023. – Vol. 23 (1). – P. 25–42.

51. Non-invasive optical methods for melanoma diagnosis / Meng X., Chen J., Zhang Z., Li K. et al. // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2021. – Vol. 34. – P. 102266.

52. Measuring mechanical properties of breast cancer cells with atomic force microscopy / Zbiral B., Weber A., Toca-Herrera J. L. // *Methods Mol Biol.* – 2022. – Vol. 2471. – P. 323–343.

53. New optical imaging technologies for bladder cancer: considerations and perspectives / Liu J. J., Droller M. J., Liao J. C. // *J Urol.* – 2012. – Vol. 188 (2). – P. 361–368.

54. Progression in diagnostic pathology development of virtual microscopy

and its applications / Sato T., Miura T., Nozaka H., Katayama Y. // *Rinsho Byori.* – 2007. – Vol. 55 (4). – P. 344–350.

### References.

1. Gryvkova, L. V., Zotov, O. S. *Metodyky diahnozyky zloyakisykh novoutvoren'*. [Methods of diagnosis of malignant neoplasms]. – Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/onkologiya/rozdil-nbsp-4-metodi-diaagnostiki-zloyakisnih-novoutvoren>. [In Ukrainian].

2. Riesterer, J. L., López, C. S., Stempinski, E. S., Williams, M. et al. (2020). A workflow for visualizing human cancer biopsies using large-format electron microscopy. *Methods Cell Biol*, 158, 163–181.

3. U, A. D., Mazumder, N. (2018). Types of advanced optical microscopy techniques for breast cancer research: a review. *Lasers Med Sci.*, 33 (9), 1849–1858.

4. Perrin, L., Bayarmagnai, B., Gligorijevic, B. (2020). Frontiers in intravital multiphoton microscopy of cancer. *Cancer Rep (Hoboken)*, 3 (1), e1192.

5. Kapsokalyvas, D., J van Zandvoort, M. A. M. (2020). Molecular Imaging in Oncology: Advanced Microscopy Techniques. *Recent Results Cancer Res.*, 216, 533–561.

6. Bishop, K. W., Maitland, K. C., Rajadhyaksha, M. et al. (2022). In vivo microscopy as an adjunctive tool to guide detection, diagnosis, and treatment. *J Biomed Opt.*, 27 (4), 040601.

7. Giampetraglia, M., Weigelin, B. (2021). Recent advances in intravital microscopy for preclinical research. *Curr Opin Chem Biol.*, 63, 200–208.

8. Trumbull D. A., Lemini R., Bagaria S. P., Elli E. F., Colibaseanu D. T. et al. (2020). Intravital Microscopy (IVM) in Human Solid Tumors: Novel Protocol to Examine Tumor-Associated Vessels. *JMIR Res Protoc.*, 9 (10), e15677.

55. Detection and classification of cancer from microscopic biopsy images using clinically significant and biologically-interpretable features / Kumar R., Srivastava R., Srivastava S. // *J Med Eng.* – 2015. – P. 457906. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782618/>.

9. Si P., Honkala A., de la Zerda A., Smith B. R. (2020). Optical microscopy and coherence tomography of cancer in living subjects. *Trends in Cancer*, 6 (3), 205–222.

10. Nandi T., Ainarvarapu S. R. K. (2021). Applications of atomic force microscopy in modern biology. *Emerg Top Life Sci.*, 5 (1), 103–111.

11. Liu Y., Xu J. (2019). High-resolution microscopy for imaging cancer pathobiology. *Curr Pathobiol Rep.*, 7 (3), 85–96.

12. Glaser A., Reder N., Chen Y. et al. (2017). Light-sheet microscopy for slide-free non-destructive pathology of large clinical specimens. *Nat Biomed Eng.*, 1 (7), 0084.

13. Petrov, V. V., Kryuchyn, A. A., Belyak, E. V., Lapchuk, A. S. (2016). Multi-photon microscopy and optical recording. *Akadempriodika*. [In Ukrainian].

14. Belykh E. G., Zhao X., Cavallo C., Bohl M. A. et al. (2018). Laboratory evaluation of a robotic operative microscope-visualization platform for neurosurgery. *Cureus*, 10 (7), e3072.

15. Jayadev C., Dabir S., Vinekar A., Shah U. et al. (2015). Microscope-integrated optical coherence tomography: a new surgical tool in vitreoretinal surgery. *Indian Journal of Ophthalmology*, 63 (5), 399.

16. Kamp, M. A., Sloty, P., Turowski, B., Ertman, N. et al. (2012). Microscope-integrated quantitative analysis of intraoperative indocyanine green fluorescence angiography for blood flow assessment: first experience in 30 patients. *Neurosurgery*, 70 (1), 65–73.

17. Gaustad, J. V., Simonsen, T. G., Hansem, L. M. K., Rofstad, E. K. (2021). Intravital microscopy

of tumor vessel morphology and function using a standard fluorescence microscope. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 48 (10), 3089–3100.

18. Umehayashi, D. et al. (2018). Augmented reality visualization–guided microscopic spine surgery: transvertebral anterior cervical foraminotomy and posterior foraminotomy. *J. Am. Acad. Orthop. Surg. Glob. Res. Rev.*, 2 (4), e008.

19. Lee, J., Wijesinghe, R. E., Jeon, D., Kim, P. et al. (2018). Clinical utility of intraoperative tympanomastoidectomy assessment using a surgical microscope integrated with an optical coherence tomography. *Scientific Reports*, 8 (1), 1–8.

20. Carrasco–Zevallos, O. M., Viehland, C., Keller, B., Draelos, M. et al. (2017). Review of intraoperative optical coherence tomography: technology and applications. *Biomedical Optics Express*, 8 (3), 1607–1637.

21. Boppart, S. A., Luo, W., Marks, D. L., Singletary, K. W. (2004). Optical coherence tomography: feasibility for basic research and image–guided surgery of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84 (2), 85–97.

22. Bouma B. E., de Boer J. F., Huang D., Jang I. K. et al. (2022). Optical coherence tomography. *Nat Rev Methods Primers*, 2, 79.

23. Wang, A., Qi, W., Gao, T., Tang, X. (2022). Molecular contrast optical coherence tomography and its applications in medicine. *Int J Mol Sci.*, 23 (6), 3038.

24. Lee, C., Lee, D., Zhou, Q., Kim, J., Kim, C. (2015). Virtual intraoperative surgical photoacoustic microscopy. In *European Conference on Biomedical Optics 2015*, 21–25 June 2015, Munich, Germany. *Proc. SPIE*, 9539, 95390E.

25. Aguirre J., Morales–Dalmau J., Funk L., Jara F., Turon P., Durduran T. (2014). The potential of photoacoustic microscopy as a tool to characterize the in vivo degradation of surgical sutures. *Biomedical Optics Express*, 5 (8), 2856–2869.

26. Hu, S., Wang, L. V. (2010). Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature. *J. Biomed. Opt.*, 15 (1), 011101.

27. Heeman, W., Steenbergen, W., van Dam, G. M., Boerma, E. C. (2019). Clinical applications

of laser speckle contrast imaging: a review. *Journal of Biomedical Optics.*, 24 (8), 080901.

28. Briers, D., Duncan, D. D., Hirst, E. R., Kirkpatrick, S. J. et al. (2013). Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations. *Journal of Biomedical Optics*, 18 (6), 066018.

29. Senarathna, J., Rege, A., Li, N., Thakor, N. V. (2013). Laser speckle contrast imaging: theory, instrumentation and applications. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 6, 99–110.

30. Lapchuk, A., Pashkevich, G. A., Prygun, O. V., Yurlov, V., Borodin, Y., Kryuchyn, A. (2015). Experiment evaluation of speckle suppression efficiency of 2D quasi–spiral M–sequence–based diffractive optical element. *Applied Optics*, 54 (28), E47–E54.

31. Bogomolov, M. F., Puzyk, M. Yu. (2020). Lazernyy spekl-kontrastnyy analiz dlya doslidszhennya mikrotsyrkulyatsiyi v sudynakh. [Laser speckle-contrast analysis for the study of microcirculation in vessels]. *Biomedychna inzheneriya i tekhnolohiya. [Biomedical engineering and technology]*, 4, 114–121.

32. Chen, P. H. C., Gadepalli, K., MacDonald, R. et al. (2019). An augmented reality microscope with real–time artificial intelligence integration for cancer diagnosis. *Nat Med.*, 25, 1453–1457.

33. Ettinger, A., Wittmann, T. (2014). Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol.*, 123, 77–94.

34. Fluorescence Microscopy & Cell Imaging. URL: <https://unmhealth.org/cancer/research/shared-resources/microscopy.html>.

35. Murphy, J. Understanding cancer’s genetic makeup could halt its spread. URL: <https://www.laserfocusworld.com/biooptics/article/14286424/understanding-cancers-genetic-makeup-could-halt-its-spread>.

36. Seferbekova, Z., Lomakin, A., Yates, L. R., Gerstung, M. (2023). Spatial biology of cancer evolution. *Nat Rev Genet*, 24 (5), 295–313.

37. Lomakin, A., Svedlund, J., Strell, C. et al. (2022). Spatial genomics maps the structure, nature and evolution of cancer clones. *Nature*, 611, 594–602.

38. Lekka, M. *Philos, Trans, A.* (2022). Applicability of atomic force microscopy to determine cancer–

related changes in cells. *Math Phys Eng Sci.*, 380 (2232), 0346.

39. Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.*, 56 (9), 930–933.

40. Deng, X., Xiong, F., Li, X. et al. (2018). Application of atomic force microscopy in cancer research. *J Nanobiotechnol.*, 16. URL: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0428-0>.

41. Calzado–Martín, A., Encinar, M., Tamayo, J., Calleja, M., San Paulo, A. (2016). Effect of Actin Organization on the Stiffness of Living Breast Cancer Cells Revealed by Peak–Force Modulation Atomic Force Microscopy. *ACS Nano*, 10 (3), 3365–3374.

42. Alibert, C., Goud, B., Manneville, J. B. (2017). Are cancer cells really softer than normal cells? *Biol Cell.*, 109 (5), 167–189.

43. Kwon, T., Gunasekaran, S., Eom, K. (2019). Atomic force microscopy–based cancer diagnosis by detecting cancer–specific biomolecules and cells. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871 (2), 367–378.

44. Yin, A. K., Glaser, S. Y., Leigh, Y., Chen, L. et al. (2016). Miniature in vivo MEMS–based line–scanned dual–axis confocal microscope for point–of–care pathology. *Biomed. Opt. Express*, 7 (2), 251–263.

45. Brogan, C. (2022). Researchers trial tiny new microscope to detect breast cancer. URL: <https://www.imperial.ac.uk/news/241095/researchers-trial-tiny-microscope-detect-breast>.

46. Ragazzi, M., Piana, S., Longo, C., Castagnetti, F. et al. (2014). Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Mod Pathol.*, 27 (3), 460–471.

47. Mittal, S., Yeh, K., Leslie, L. S., Kenkel, S. et al. (2018). Simultaneous cancer and tumor microenvironment subtyping using confocal infrared microscopy for all–digital molecular histopathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (25), E5651–E5660.

48. Ma, L., Fei, B. (2021). Comprehensive review of surgical microscopes: technology development and medical applications. *J Biomed Opt.*, 26 (1), 010901.

49. Babes, L., Yipp, B. G., Senger, D. L. (2023). Intravital microscopy of the metastatic pulmonary environment. *Methods Mol Biol.*, 2614, 383–396.

50. Entenberg, D., Oktay, M. H., Condeelis, J. S. (2023). Intravital imaging to study cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 23 (1), 25–42.

51. Meng, X., Chen, J., Zhang, Z., Li, K. et al. (2021). Non–invasive optical methods for melanoma diagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.*, 34, 3102266.

52. Zbiral, B., Weber, A., Toca–Herrera, J. L. (2022). Measuring mechanical properties of breast cancer cells with atomic force microscopy. *Methods Mol Biol.*, 2471, 323–343.

53. Liu, J. J., Droller, M. J., Liao, J. C. (2012). New optical imaging technologies for bladder cancer: considerations and perspectives. *J Urol.*, 188 (2), 361–368.

54. Sato, T., Miura, T., Nozaka, H., Katayama, Y. (2007). Progression in diagnostic pathology development of virtual microscopy and its applications. *Rinsho Byori*, 55 (4), 344–350.

55. Kumar, R., Srivastava, R., Srivastava, S. (2015). Detection and classification of cancer from microscopic biopsy images using clinically significant and biologically–interpretable features. *J Med Eng.*, 457906. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782618/>.

#### ORCID:

Andriy A. Kryuchyn: 0000-0002-5063-4146