

Обзор спектрофлуориметрических исследований кожных покровов

Гарькавенко В. В.¹

к.м.н., заведующий отделением¹

Балашова П. М.^{1,2}

врач-офтальмолог¹; ассистент, кафедры офтальмологии имени профессора М. А. Дмитриева с курсом ПО²

Салмин В. В.^{3,4,5}

д.ф-м.н., профессор, кафедра лазерных микро- нано- и биотехнологий³; профессор, кафедра общей физики⁴; профессор, кафедра физики⁵

1 – КГБУЗ «Красноярская краевая офтальмологическая клиническая больница имени профессора П. Г. Макарова», г. Красноярск, Российская Федерация

2 – ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Российская Федерация

3 – Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ». Москва, Российская Федерация

4 – Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет). г. Долгопрудный, Российская Федерация

5 – Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет), Москва, Российская Федерация

Автор для корреспонденции: Гарькавенко Виктор Валерьевич; **e-mail:** victor-unique@yandex.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Никотинамидадениндинуклеотид (NADN) участвует во многих важных биохимических реакциях метаболизма человека, включая участие в производстве энергии митохондриями. Митохондриальную активность, влияющую на микроциркуляцию кожи и эффективность местного кровоснабжения, можно косвенно оценить по флуоресценции NADH в восстановленной форме. Изменения основных флуорофоров кожи были исследованы как у животных, так и у человека, в состоянии покоя и в различных условиях с помощью спектрофлуориметрии. **Цель работы** – основываясь на данных научной литературы, оценить возможность применения спектрофлуориметрического исследования уровня NADH, а также отношение NADH/FAD и при оценке состояния как свободных кожных лоскутов, так и лоскутов, пересаженных на ножке после проведения реконструктивных операций, в частности в офтальмологии. **Материалы и методы.** Был проведен поиск научных публикаций, в результате которого для итогового научного обзора был отобран 61 источник за период 1957-2022 гг. Для поиска научной литературы использовались базы PubMed, Google Scholar и Elibrary. **Результаты и обсуждение.** Представлена краткая историческая справка о первых спектрофлуориметрических исследованиях. Приведен краткий обзор спектрофлуориметрических методов исследования кожных покровов, как человека, так и животных в эксперименте, а также других органов и систем. Перечислены недостатки и преимущества различных методик исследования. Проведен обзор изменений спектрофлуориметрических параметров кожи у пациентов с различными соматическими заболеваниями органов и систем. **Заключение.** Обзор приведенных методик оценки тканевого метаболизма применим при хирургическом лечении, в пластической хирургии и онкоофтальмологии. Особую ценность для хирургии будут представлять методики исследования, позволяющие прогнозировать вероятность отторжения пересаженных кожных лоскутов и их рубцовые изменения. Представленный литературный обзор подтверждает эффективность спектрофлуориметрии для оценки метаболических нарушений в кожных покровах. Актуальность метода для прогнозирования косметических исходов при проведении пластических операций, в том числе на придаточном аппарате глаза, требует продолжать исследования основных флуорофоров кожи.

Ключевые слова: рубцовые изменения кожи век; NADH; кожа; спектрофлуориметрия, аутофлуоресценция

doi: 10.29234/2308-9113-2024-12-3-69-80

Для цитирования: Гарькавенко В. В., Балашова П. М., Салмин В. В. Обзор спектрофлуориметрических исследований кожных покровов. *Медицина* 2024; 12(3): 69-80

Введение

Нормальная функция митохондрий является критическим фактором в поддержании клеточного гомеостаза в различных органах организма. Из-за имеющейся митохондриальной дисфункции при многих патологических состояниях крайне важен мониторинг состояния метаболизма митохондрий *in vivo* в режиме реального времени. Данный тип мониторинга на животных моделях, а также у пациентов предоставляет в режиме реального времени данные, которые могут помочь интерпретировать результаты экспериментов или оптимизировать проводимое лечение на практике [1].

Хорошо известно, что митохондриальная дисфункция наблюдается при различных патологических состояниях и заболеваниях, таких как тканевая ишемия, гипоксемия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, а также в процессе апоптоза. В связи с этим большое значение имеет возможность мониторинга окислительно-восстановительного состояния никотинамидадениндинуклеотида (NADH) митохондрий.

Мониторинг уровня NADH в ткани дает наиболее важную информацию о метаболическом состоянии митохондрий с точки зрения производства энергии и уровня внутриклеточного кислорода. Хотя сигналы NADH не откалиброваны в абсолютных единицах, мониторинг их тенденций важен для интерпретации физиологических или патологических процессов.

Цель работы

Цель работы – основываясь на данных научной литературы, оценить возможность применения спектрофлуориметрии при оценке состояния как свободных кожных лоскутов, так и лоскутов, пересаженных на ножке при реконструктивных операциях. Показать возможности применения спектрофлуориметрических методов оценки, основанных на исследовании NADH.

Материалы и методы

Был проведен поиск научной литературы в базах PubMed, Google Scholar и Elibrary за период 1957-2022 гг. Поиск научных источников проводился с помощью ключевых слов «Human skin», дополнительные ключевые слова — «NADH», «Spectrofluorimetry», «FLIM». Всего было выявлено и проанализировано 253 источника, большинство из которых – научные статьи высокорейтинговых журналов в области патофизиологии, а также медицины в целом. В результате для данного научного обзора отобраны 35 публикаций.

Результаты и обсуждение

Спектрофлуориметрические исследования берут начало с 50-х годов XX века и отражены в различных публикациях. В своем исследовании Chance сравнил спектры NADH, измеренные в коре почек крыс, со спектрами коры их головного мозга и обнаружил, что основным эффектом аноксического перехода как в почках, так и в мозге явилось значительное увеличение интенсивности флуоресценции без обнаруживаемого изменения в спектрах [2]. В 1975 г. Sundt и Anderson [3] применили флуориметрию *in vivo* для изучения мозга белчьей обезьяны и зафиксировали значительное увеличение интенсивности флуоресценции в мертвом мозге по сравнению с нормальными мозговыми тканями и промежуточными значениями в ишемизированном мозге. В то же время Harbig et al. показали явное увеличение спектра NADH между нормоксическими и аноксическими состояниями в мозге кошек [4].

Cordeiro et al. [5] сравнили спектры возбуждения в кожно-мышечном лоскуте свиньи со спектрами NADH в растворе. Воздействие на лоскут 6-часовой ишемии резко увеличило интенсивность света в диапазоне 450 нм. В 1997 г. срез гиппокампа *in vitro* был измерен Perez-Pinzon et al. [6], ими было зарегистрировано заметное увеличение спектра NADH в условиях аноксии. Подобные эффекты были недавно обнаружены Toth et al. [7] в тестах портняжной мышцы кошки *in vivo*, при этом выявлена достоверная корреляция между изменением сигнала флуоресценции при ишемии и количеством NADH, определенным ферментативно. Shimazaki et al. [8] зафиксировали взаимосвязь между флуоресценцией NADH и его концентрацией в контрольной роговице, а также в роговице, обработанной цианидом. Аналогичным образом сравнивали флуоресценцию NADH и определяемые с помощью ферментивного анализа уровни NADH в мозге, подвергнутом ишемии [9]. Таким образом, количественное определение NADH можно использовать в качестве суррогатного маркера абсолютной (гипоксия) или относительной (повышенный метаболизм) кислородной недостаточности [10].

Существует несколько способов измерения содержания NADH. Преимущественно на практике используются спектрофотометрические, флуорометрические [10,11] и биолюминесцентные ферментные анализы [12,13].

Интересно, что возбуждение NADH ультрафиолетовым (УФ) светом в диапазоне 320-380 нм приводит к автофлуоресцентному излучению в диапазоне 420-480 нм с пиковой интенсивностью при 450-460 нм – эта оптическая особенность широко используется для измерения концентрации содержания NADH в растворах, клетках и тканях [10].

Chance применил метод, основанный на УФ/флуоресценции, для контроля количества NADH в клетках и тканях или его концентрации в жидкостях [2]. Первое устройство, позволяющее проводить такие измерения, было разработано в 1954 г. Theorell и Nygaard [14], с помощью него в 1962 г. Chance et al. изучили содержание NADH в мозге и почках наркотизированных крыс [15]. В 1966 г. Chance показал, что первичным источником УФ-

фотоэмиссии 420-480 нм является восстановленный NADH, а не окисленный NAD⁺, тем самым подтвердив достоверность метода для количественного определения NADH [15]. С тех пор метод флуоресценции широко используется во многих исследованиях *in vivo*. В России Маевским и др. данная методика использовалась для изучения NADH на крысах [16] и людях [17].

Немало работ было проведено по спектрофлуориметрическому исследованию содержания NADH в кожных покровах. Доказано, что спектрофлуориметрия имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, которые широко применяются в медицинской практике. Так, например, магнитно-резонансная томография с ангиографией, также как и компьютерная томография требуют введения контраста, дорогостоящих расходных материалов и обладают низкой разрешающей способностью, что позволяет обследовать только крупные кровеносные сосуды [18]. УЗИ – методика относительно недорогая, однако требует определенных технических навыков исследователя (и плохо позволяет визуализировать сосудистую сеть). Допплеровская перфузионная визуализация позволяет наблюдать за поверхностным кровотоком в коже за счет взаимодействия инфракрасного излучения с клетками кожи. Однако и эти методы не дают информации о состоянии формирующегося микрососудистого русла [19].

Метод оптической когерентной томографии имеет ряд преимуществ (наглядная визуализация всех слоев) за счет хорошего отношения сигнал/шум, он основан на низкокогерентной интерферометрии, но недостаточно чувствителен, ввиду большого рассеяния света в тканях [20]. Однофотонная флуоресцентная микроскопия позволяет визуализировать трехмерное изображение микроциркуляторного русла. Несмотря на хорошее пространственное разрешение, она имеет ограничения по глубине исследования (50-200 мкм при использовании видимого лазерного излучения) [21].

В связи с вышеперечисленным исследование содержания NADH в кожных покровах, в частности при спектрофлуориметрии, является объективным методом оценки состояния витальных кожных покровов и пересаженных лоскутов, как на ножке, так и свободных. Это актуализирует использование данной методики при лечении ожогов, в пластической хирургии, онкологии, в случаях замещения кожных дефектов.

Флуоресцентная визуализация времени жизни (FLIM) метаболических коферментов, то есть NAD(P)H (никотинамидадениндинуклеотид (фосфат)) и FAD (флавинадениндинуклеотид), в настоящее время широко признана одним из наиболее важных методов метаболической визуализации [22]. Эти методы уже широко апробируются в клинической практике, в том числе выпускается оборудование, предназначенное для проведения оптической биопсии кожных покровов MPTflex, разработанное JenLab, GmbH (Германия). Однако в силу малой доступности данной техники, широкого применения метод не получил.

Фаррахова Д. с соавт. [23] разработали методику оценки состояния пересаженного лоскута у лабораторных мышей с помощью спектрофлуориметрии, проводя количественное исследование макрофагов.

Флуоресценция NADH является самым сильным компонентом общей флуоресценции кожи человека [24,25]. Фотофизические свойства основных флуорофоров кожи приведены в таблице 1.

Таблица 1. Фотофизические свойства основных флуорофоров кожи.

Флуорофор	$\lambda_{\text{возб}}$, нм	$\lambda_{\text{исп}}$, нм
Триптофан	275	348
Тирозин	274	303
NADH	340	470
Фенилалан	257	282
FAD	450	530

Важно подчеркнуть, что проникновение возбуждающего света (340 нм) в ткань кожи невысокое (около 0,5 мм). Поэтому значительная часть возбуждающего света поглощается эпидермисом и папиллярной дермой. В этих участках кожи плотность кровеносных микрососудов низкая, и изменения флуоресценции NADH зависят от поступления кислорода, диффундирующего из более глубоких слоев [26].

Рогаткин Д.А. с соавт. выделил при помощи лазерной спектроскопии фазы фибротического изменения кожи при формировании рубцовых изменений. При этом на 21-й день после лечения блеомицином регистрировали повышение интенсивности флуоресценции эндогенного коллагена и снижение удельного потребления кислорода за счет избыточного накопления внеклеточного матрикса [27].

Устиновой А.О. и Артемьевым Д.Н. проведен анализ химического состава слоев кожи и их флуоресцентных свойств. Разработана модель кожи, содержащая три флуорофора, которые возбуждались в УФ диапазоне – тирозин, триптофан и NADH. В работе показано, что молекула NADH отображается на глубине 100 мкм. Полученные результаты моделирования аутофлуоресцентной среды с многократным рассеянием подтверждаются данными реальных оптических систем. В ходе исследования авторам удалось получить априорную информацию для последующей качественной дифференциации здоровых и пораженных тканей при клинических исследованиях [28].

При лабораторных пробах на мышах было показано, что с помощью FLIM-визуализации срезов замороженных тканей в лоскутах эпидермиса наблюдалось общее увеличение времени активности NADH в процессе лечения, что свидетельствует о переходе от гликолитического к окислительному метаболизму. Эти сдвиги в сторону окислительного метаболизма могут быть результатом повышенной неоваскуляризации [29].

Немаловажным фактом является то, что уменьшение флуоресценции в диапазоне 460 нм во время реперфузии отражает восстановление функции митохондрий после предшествующей ишемии, что явно отражается в полученных данных после пластических операций с пересаживанием кожно-мышечного лоскута на ножке [30].

Доказано, что изменение спектров кожных структур, происходящее при компрессии и перерастяжении, специфичны для кожи разной морфологии. Так, после наложения компрессии, отмечается увеличение концентрации гемоглобина в коже шеи, в то время как в коже пальца и предплечья уменьшается. Гемоглобин в коже шеи уменьшается только при достаточно большом давлении – 77 мН/мм² (0,77 10⁵ Па), в отличие от кожи пальца и предплечья, где концентрация гемоглобина уменьшается уже при малом давлении. С увеличением давления содержание гемоглобина продолжает уменьшаться, при этом также уменьшается степень насыщения гемоглобина кислородом, и через 60 секунд гемоглобин в тканях полностью отсутствует. Авторы считают, что такие различия в поведении спектров обусловлены морфологией образцов. Кожа шеи лежит на более мускулистой и эластичной по сравнению с пальцем и предплечьем ткани, в связи с чем эта ткань быстро не сжимается, и требуется большее давление для достижения такого же эффекта, как для пальца или предплечья. Из-за этих же особенностей области шеи сдавленная ткань показывает временное увеличение содержания крови, которое впоследствии уменьшается [31].

В последние годы в различных клинических исследованиях активно начали внедрять определение содержания NADH в кожных покровах. Установлено, что физические тренировки приводят к увеличению уровня флуоресценции NADH в коже в состоянии покоя и после нагрузки у спортсменов [32]. Японскими исследователями была выявлена корреляция между показателями аутофлуоресценции кожи и показателями количества абсолютных скотом при компьютерной периметрии у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой [33].

В работе на мышах при помощи спектрофлуориметрии было доказано, что длительное лечение стероидами приводит к значительному увеличению средней продолжительности флуоресценции NADH, что свидетельствует о более высокой скорости созревания эпидермальных кератиноцитов, а также наблюдаются изменения в организации коллагена. Эти результаты дают представление о структурных и биохимических процессах атрофии кожи, связанных с длительным лечением стероидами [34].

Определенные выводы были сделаны при исследовании кожных покровов у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ). Изменения флуоресценции NADH свидетельствуют о снижении ее восстановления, особенно наблюдаемом при реперфузии, и подтверждают нарушение микроциркуляции кожи на митохондриальном уровне. Регистрируемые данные могут быть связаны с меньшей чувствительностью к гипоксии и, возможно, с дисфункцией эндотелия у пациентов с СКВ [35].

Заклучение

Таким образом, исследование уровня NADH, а также отношения NADH/FAD в кожных покровах является перспективной методикой, в том числе для прогнозирования рубцовых изменений при проведении пластических операций на придаточном аппарате глаза. В офтальмоонкологии, несмотря на развитие других методик (брахитератия, диатермо- и криодеструкция), в 90% случаев предпочтение отдается хирургическим методам лечения. Гистологический тип опухоли требует дифференцированного подхода к выбору тактики лечения, однако даже при необходимости проведения радикального объема оперативного вмешательства, требуется сохранить функцию и эстетику век, в том числе используя различные способы замещения дефекта кожных покровов. В связи с этим поиск методов ранней диагностики рисков отторжения и прогнозирования приживления пересаженных лоскутов (свободных и на ножке) с минимальным уровнем образования рубцовой ткани, сегодня остается актуальным.

Литература

1. Mayevsky A., Chance B. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use. *Mitochondrion* 2007; 7(5): 330-339, doi: 10.1016/j.mito.2007.05.001
2. Chance B., Cohen P., Jobsis F., et al. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 1962; (137): 499-508, doi: 10.1126/science.137.3529.499
3. Sundt T.M., Anderson R.E. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence and cortical blood flow in ischemic and nonischemic squirrel monkey cortex. 1. Animal preparation, instrumentation, and validity of model. *Stroke* 1975; 6(3): 270-278, doi: 10.1161/01.str.6.3.270
4. Harbig K., Chance B, Kovách A.G., et al. In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex. *Journal of applied physiology* 1976; 41(4): 480-488, doi: 10.1152/jappl.1976.41.4.480
5. Cordeiro P.G., Kirschner R.E., Hu Q.Y., et al. Ultraviolet excitation fluorescence spectroscopy: A noninvasive method for the measurement of redox changes in ischemic myocutaneous flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1995; (96): 673-680.
6. Perez-Pinzon M. A., Mumford P. L., Rosenthal M., et al. Antioxidants, mitochondrial hyperoxidation and electrical recovery after anoxia in hippocampal slices. *Brain Research* 1997; 754 (1-2): 163-170, doi: 10.1016/s0006-8993(97)00066-8
7. Toth A., Pal M., Tischler M.E., et al. Are there oxygen-deficient regions in resting skeletal muscle? *The American Journal of Physiology* 1996; 270 (6 Pt 2): H1933-H1939, doi: 10.1152/ajpheart.1996.270.6.H1933
8. Shimazaki J., Tornheim K., Laing R.A. Correlation of redox fluorometry and analytical measurements of pyridine nucleotide. *Investigative Ophthalmology and Vision Science* 1989; 30(10): 2274-2278.
9. Welsh F.A., O'Connor M.J., Langfitt T.W. Regions of cerebral ischemia located by pyridine nucleotide fluorescence (Abstract). 1977; *Science* 198(4320): 951-953, doi: 10.1126/science.201026
10. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function 3. in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007; 292(2):C615-C640, doi: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2006>
11. Marín-García J., Akhmedov A.T., Moe G.W. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Failure Reviews* 2012; 18(4): 439-456, doi: 10.1007/s10741-012-9330-2

12. Vidugiriene J., Leippe D., Sobol M., et al. Bioluminescent Cell-Based NAD(P)/NAD(P)H Assays for Rapid Dinucleotide Measurement and Inhibitor Screening. *Assay and Drug Development Technologies* 2014; 12(9-10): 514-526. doi: 10.1089/adt.2014.605
13. Levy B., Ambrosio G., Pries A., et al. Microcirculation in Hypertension. *Circulation* 2001; 104(6): 735-740, doi: 10.1161/hc3101.091158
14. Theorell H., Nygaard A., Bonnichsen R., et al. Kinetics and equilibria in flavoprotein systems. I. A fluorescence recorder and its application to a study of the dissociation of the old yellow enzyme and its resynthesis from riboflavin phosphate and protein. *Acta Chemica Scandinavica* 1954; (6): 877-888.
15. Chance B. Mitochondrial NADH redox state, monitoring discovery and deployment in tissue. *Methods in Enzymology* 2004; 385: 361-370, doi: 10.1016/S0076-6879(04)85020-1
16. Mayevsky A, Chance B.A. New Long-Term Method for the Measurement of NADH Fluorescence in Intact Rat Brain with Chronically Implanted Cannula. *Advances and Experimental Medicine and Biology* 1973; 37A: 239-244, doi: 10.1007/978-1-4684-3288-6_30 PMID 4378057
17. Mayevsky A., Sonn J., Luger-Hamer M., et al. Real-Time assessment of organ vitality during the transplantation procedure. *Transplantation Reviews* 2003; 17(2): 96-116, doi: 10.1016/s0955-470x(02)00007-1
18. Макаров В.И., Ахлюстина Е.В., Фаррахова Д.С., Поминова Д.В., Рябова А.В., Лощенов В.Б. Методы фотоники для оценки качества приживления кожных трансплантатов (обзор). *Biomedical Photonics* 2016; 5(3): 30-40, doi: 10.24931/2413-9432-2016-5-3-30-40
19. Limbourg A., Korff T., Napp L.C., et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nature Protocols* 2009; 4(12): 1737-1746, doi: 10.1038/nprot.2009.185
20. Mahmud M.S., Cadotte D.W., Vuong B., et al. Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks. *Journal of Biomedical Optics* 2013; 18(5): 050901, doi: 10.1117/1.JBO.18.5.050901
21. Upputuri P.K., Sivasubramanian K., Mark C.S.K., et al. Recent Developments in Vascular Imaging Techniques in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomedical Research International* 2015; 2015: 783983, doi: 10.1155/2015/783983
22. Farrakhova D., Borodkin A., Makarov V. The concept of the portable spectrometer for fast assessment of skin engraftment via exogenous and endogenous fluorophores. *Optical Instrument Science, Technology, and Applications* 2018; 10695OP: 150-155, doi: 10.1117/12.2312519
23. Устинова А.О., Артемьев Д.Н. Моделирование мультиспектральной автофлуоресценции кожи. Сб. науч. тр. ИТНТ-2019. Самара: Новая техника; 2019. С. 196-199.
24. Bugaj O. Kusy K., Kantanista A., et al. The effect of a 7-week training period on changes in skin NADH fluorescence in highly trained athletes. *Applied Sciences* 2020; 10(15): 5133, doi: 10.3390/app10155133
25. Himori N., Kunikata H., Kawasaki R., et al. The association between skin autofluorescence and mean deviation in patients with open-angle glaucoma. *British Journal of Ophthalmology* 2017; 101(2): 233-238, doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-309504
26. McMullen R.L., Chen S., Moore D.J. Spectrofluorescence of skin and hair. *International journal of cosmetic science* 2012; 34(3): 246-256, doi: 10.1111/j.1468-2494.2012.00709.x
27. Cicchi N., Vogler D., Kapsokalyvas B., et al. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. *Journal of Biophotonics* 2013; 6(2): 129-142.
28. Katarzynska J., Lipinski Z., Cholewinski T., et al. Non-invasive evaluation of microcirculation and metabolic regulation using flow mediated skin fluorescence (FMSF): technical aspects and methodology. *Review of Scientific Instruments* 2019; 90(10): 104104, doi: 10.1063/1.5092218
29. Bower A.J. Arp Z., Zhao Y., et al. Longitudinal in vivo tracking of adverse effects following topical steroid treatment. *Experimental dermatology* 2016; 25(5): 362-367.

30. Bogaczewicz J., Tokarska K., Wozniacka A. Changes of NADH fluorescence from the skin of patients with systemic lupus erythematosus. *BioMed Research International* 2019; 2019: 5897487, doi: 10.1155/2019/5897487
31. Kalinina S., Freymueller C., Naskar N., et al. Bioenergetic alterations of metabolic redox coenzymes as NADH, FAD and FMN by means of fluorescence lifetime imaging techniques. *International journal of molecular sciences* 2021; 22(11): 5952. doi: 10.3390/ijms22115952
32. Seyed Jafari S. M. Blank F., Ramser H.E., et al. Efficacy of combined in-vivo electroporation-mediated gene transfer of VEGF, HGF, and IL-10 on skin flap survival, monitored by label-free optical imaging: a feasibility study. *Frontiers in Surgery* 2021; (8): 639661, doi: 10.3389/fsurg.2021.639661
33. Niziński J., Kamieniarz L., Filberek P., et al. Monitoring the skin NADH changes during ischaemia and reperfusion in humans. *Journal of Medical Science* 2020; 89(1): e405-e405, doi: 10.20883/medical.405
34. Chursinova Yu.V., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., et al. Laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry in the diagnosis of skin fibrosis. *Biomedical Photonics* 2019; 8(1): 38-45. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-38-45
35. Нахаева И.А., Мохаммед М.Р., Зюрюкина О.А., Синичкин Ю.П. Влияние внешней механической компрессии на оптические свойства кожной ткани человека in vivo. *Оптика и спектроскопия* 2014; 117(3): 522-528, doi: 10.7868/S0030403414090177

Review of Spectrofluorimetric Studies of Skin

Gar'kavenko V. V.¹

*PhD, Department Head*¹

Balashova P. M.^{1,2}

*Ophthalmologist*¹; *Assistant, Department of Ophthalmology named after Professor M. A. Dmitriev*²

Salmin V. V.^{3,4,5}

*Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Chair for Laser Micro- Nano- and Biotechnologies*³; *Professor, Chair for General Physics*⁴; *Professor, Chair for Physics*⁵

1 – Professor P. G. Makarov Krasnoyarsk Regional Ophthalmological Clinical Hospital. Krasnoyarsk, Russian Federation

2 – Professor V. F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. Krasnoyarsk, Russian Federation.

3 - National Research Nuclear University (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation

4 - Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation

5 – Bauman Moscow State Technical University. Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Gar'kavenko Victor Valerievich; **e-mail:** victor-unique@yandex.ru.

Conflict of interest. None declared.

Funding. The study had no sponsorship.

Abstract

Background. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADN) is involved in many important biochemical reactions in human metabolism, including participation in mitochondrial energy production. Mitochondrial activity, which affects skin microcirculation and the efficiency of local blood supply, can be indirectly assessed by the fluorescence of NADH in its reduced form. Changes in major skin fluorophores have been studied in both animals and humans, at rest and under different conditions, using spectrofluorimetry. **The purpose of the work** is, based on scientific literature data, to evaluate the possibility of using a spectrofluorimetric study of NADH levels, as well as the NADH/FAD ratio when assessing the condition of both free skin flaps and pedicled flaps after reconstructive operations, in particular in ophthalmology. **Materials and methods.** A search of scientific publications in PubMed, Google Scholar and Elibrary was conducted, as a result 61 articles for the period of 1957-2022 were selected for the final scientific review. **Results**

and discussion. A brief historical background of the first spectrofluorimetric studies is presented. A brief overview of spectrofluorimetric methods for studying the skin of both humans and experimental animals, as well as other organs and systems, is given. The disadvantages and advantages of various research methods are listed. A review of changes in spectrofluorimetric parameters of the skin in patients with various somatic diseases of organs and systems was carried out. **Conclusion.** A review of the abovementioned methods for assessing tissue metabolism is applicable in surgical treatment, plastic surgery and onco-ophthalmology. Of particular value for surgery will be research methods that make it possible to predict the likelihood of rejection of transplanted skin flaps and their cicatricial changes. The presented literature review confirms the effectiveness of spectrofluorimetry for assessing metabolic disorders in the skin. The relevance of the method for predicting cosmetic outcomes during plastic surgery, including on the adnexal apparatus of the eye, requires continued research into the main fluorophores of the skin.

Keywords: cicatricial changes of the skin of the eyelids; NADH; skin; spectrofluorimetry, autofluorescence

References

1. Mayevsky A., Chance B. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use. *Mitochondrion* 2007; 7(5): 330-339, doi: 10.1016/j.mito.2007.05.001
2. Chance B., Cohen P., Jobsis F., et al. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 1962; (137): 499-508. doi: 10.1126/science.137.3529.499
3. Sundt T.M., Anderson R.E. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence and cortical blood flow in ischemic and nonischemic squirrel monkey cortex. 1. Animal preparation, instrumentation, and validity of model. *Stroke* 1975; 6(3): 270-278, doi: 10.1161/01.str.6.3.270
4. Harbig K., Chance B, Kovách A.G., et al. In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex. *Journal of applied physiology* 1976; 41(4): 480-488, doi: 10.1152/jappl.1976.41.4.480
5. Cordeiro P.G., Kirschner R.E., Hu Q.Y., et al. Ultraviolet excitation fluorescence spectroscopy: A noninvasive method for the measurement of redox changes in ischemic myocutaneous flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1995; (96): 673-680.
6. Perez-Pinzon M. A., Mumford P. L., Rosenthal M., et al. Antioxidants, mitochondrial hyperoxidation and electrical recovery after anoxia in hippocampal slices. *Brain Research* 1997; 754 (1-2): 163-170, doi: 10.1016/s0006-8993(97)00066-8
7. Toth A., Pal M., Tischler M.E., et al. Are there oxygen-deficient regions in resting skeletal muscle? *The American Journal of Physiology* 1996; 270 (6 Pt 2): H1933-H1939, doi: 10.1152/ajpheart.1996.270.6.H1933
8. Shimazaki J., Tornheim K., Laing R.A. Correlation of redox fluorometry and analytical measurements of pyridine nucleotide. *Investigative Ophthalmology and Vision Science* 1989; 30(10): 2274-2278.
9. Welsh F.A., O'Connor M.J., Langfitt T.W. Regions of cerebral ischemia located by pyridine nucleotide fluorescence (Abstract). 1977; *Science* 198(4320): 951-953, doi: 10.1126/science.201026
10. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function 3. in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007; 292(2):C615-C640, doi: https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2006
11. Marín-García J., Akhmedov A.T., Moe G.W. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Failure Reviews* 2012; 18(4): 439-456, doi: 10.1007/s10741-012-9330-2
12. Vidugiriene J., Leippe D., Sobol M., et al. Bioluminescent Cell-Based NAD(P)/NAD(P)H Assays for Rapid Dinucleotide Measurement and Inhibitor Screening. *Assay and Drug Development Technologies* 2014; 12(9-10): 514-526. doi: 10.1089/adt.2014.605

13. Levy B., Ambrosio G., Pries A., et al. Microcirculation in Hypertension. *Circulation* 2001; 104(6): 735-740, doi: 10.1161/hc3101.091158
14. Theorell H., Nygaard A., Bonnichsen R., et al. Kinetics and equilibria in flavoprotein systems. I. A fluorescence recorder and its application to a study of the dissociation of the old yellow enzyme and its resynthesis from riboflavin phosphate and protein. *Acta Chemica Scandinavica* 1954; (6): 877-888.
15. Chance B. Mitochondrial NADH redox state, monitoring discovery and deployment in tissue. *Methods in Enzymology* 2004; 385: 361-370, doi: 10.1016/S0076-6879(04)85020-1
16. Mayevsky A, Chance B.A. New Long-Term Method for the Measurement of NADH Fluorescence in Intact Rat Brain with Chronically Implanted Cannula. *Advances and Experimental Medicine and Biology* 1973; 37A: 239-244, doi: 10.1007/978-1-4684-3288-6_30 PMID 4378057
17. Mayevsky A., Sonn J., Luger-Hamer M., et al. Real-Time assessment of organ vitality during the transplantation procedure. *Transplantation Reviews* 2003; 17(2): 96-116, doi: 10.1016/s0955-470x(02)00007-1
18. Makarov V.I., Akhlyustina E.V., Farrakhova D.S., Pominova D.V., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Metody fotoniki dlya ocenki kachestva przhivleniya kozhnyh transplantatov (obzor). [Photonic methods for evaluating the quality of engraftment of skin grafts (review).] *Biomedical Photonics* 2016; 5(3): 30-40, doi: 10.24931/2413-9432-2016-5-3-30-40 (In Russ.)
19. Limbourg A., Korff T., Napp L.C., et al. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nature Protocols* 2009; 4(12): 1737-1746, doi: 10.1038/nprot.2009.185
20. Mahmud M.S., Cadotte D.W., Vuong B., et al. Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks. *Journal of Biomedical Optics* 2013; 18(5): 050901, doi: 10.1117/1.JBO.18.5.050901
21. Upputuri P.K., Sivasubramanian K., Mark C.S.K. et al. Recent Developments in Vascular Imaging Techniques in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomedical Research International* 2015; 2015: 783983, doi: 10.1155/2015/783983
22. Farrakhova D., Borodkin A., Makarov V. The concept of the portable spectrometer for fast assessment of skin engraftment via exogenous and endogenous fluorophores. *Optical Instrument Science, Technology, and Applications* 2018; 10695OP: 150-155, doi: 10.1117/12.2312519
23. Ustinova A.O., Artemiev D.N. Modelirovanie mui'tispektral'noj avtofluorescencii kozhi. Sb.nauch.tr. ITNT-2019. [Modeling of multispectral skin autofluorescence. Collected proceedings of ITNT-2019.] Samara: Novaya Technika; 2019. P. 196-199. (in Russ.)
24. Bugaj O. Kusy K., Kantanista A., et al. The effect of a 7-week training period on changes in skin NADH fluorescence in highly trained athletes. *Applied Sciences* 2020; 10(15): 5133, doi: 10.3390/app10155133
25. Himori N., Kunikata H., Kawasaki R., et al. The association between skin autofluorescence and mean deviation in patients with open-angle glaucoma. *British Journal of Ophthalmology* 2017; 101(2): 233-238, doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-309504
26. McMullen R.L., Chen S., Moore D.J. Spectrofluorescence of skin and hair. *International journal of cosmetic science* 2012; 34(3): 246-256, doi: 10.1111/j.1468-2494.2012.00709.x
27. Cicchi N., Vogler D., Kapsokalyvas B., et al. From biomolecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy. *Journal of Biophotonics* 2013; 6(2): 129-142.
28. Katarzynska J., Lipinski Z., Cholewinski T., et al. Non-invasive evaluation of microcirculation and metabolic regulation using flow mediated skin fluorescence (FMSF): technical aspects and methodology. *Review of Scientific Instruments* 2019; 90(10): 104104, doi: 10.1063/1.5092218
29. Bower A.J. Arp Z., Zhao Y. et al. Longitudinal in vivo tracking of adverse effects following topical steroid treatment. *Experimental dermatology* 2016; 25(5): 362-367.
30. Bogaczewicz J., Tokarska K., Wozniacka A. Changes of NADH fluorescence from the skin of patients with systemic lupus erythematosus. *BioMed Research International* 2019; 2019: 5897487, doi: 10.1155/2019/5897487

31. Kalinina S., Freymueller C., Naskar N. et al. Bioenergetic alterations of metabolic redox coenzymes as NADH, FAD and FMN by means of fluorescence lifetime imaging techniques. *International journal of molecular sciences* 2021; 22(11): 5952. doi: 10.3390/ijms22115952
32. Seyed Jafari S. M. Blank F., Ramsler H.E., et al. Efficacy of combined in-vivo electroporation-mediated gene transfer of VEGF, HGF, and IL-10 on skin flap survival, monitored by label-free optical imaging: a feasibility study. *Frontiers in Surgery* 2021; (8): 639661, doi: 10.3389/fsurg.2021.639661
33. Niziński J., Kamieniarz L., Filberek P., et al. Monitoring the skin NADH changes during ischaemia and reperfusion in humans. *Journal of Medical Science* 2020; 89(1): e405-e405, doi: 10.20883/medical.405
34. Chursinova Yu.V., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., et al. Laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry in the diagnosis of skin fibrosis. *Biomedical Photonics* 2019; 8(1): 38-45. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-38-45
35. Nakhaeva I.A., Mohammed M.R., Zyuryukina O.A., Sinichkin Yu.P. Vliyanie vneshnei mekhanicheskoi kompressii na opticheskie svoistva kozhnoi tkani cheloveka in vivo. [Effect of external mechanical compression on the optical properties of human skin tissue in vivo.] *Optika i spektroskopiya [Optics and spectroscopy]* 2014; 117(3): 522-528, doi: 10.7868/S0030403414090177 (In Russ.)