

МЕТОДЫ ФОТОНИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПРИЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

В.И. Макаров¹, Е.В. Ахлюстина², Д.С. Фаррахова², Д.В. Поминова¹, А.В. Рябова^{1,2},
В.Б. Лощенов^{1,2}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Настоящий обзор, основанный более чем на 70 проанализированных статьях российских и зарубежных авторов, посвящен методам мониторинга состояния трансплантируемых участков кожи. В обзоре рассмотрены основные процессы, происходящие в коже на клеточном и субклеточном уровнях на разных этапах приживления трансплантата. Описаны оптические методы, позволяющие проводить неинвазивный анализ состояния кровеносных сосудов, концентрации коллагена, типа клеточного дыхания (по флуоресценции NADH). Приведена сравнительная таблица ядерных и оптических методов мониторинга состояния приживления трансплантата, наиболее широко развитых и использующихся на сегодняшний день. Отмечено, что преимущество оптических методов заключается в многофункциональности, простоте использования и интерпретации результатов, безопасности, низкой стоимости, а также в возможности использования в режиме мониторинга, в отличие от рентгено-компьютерной томографии, МРТ и УЗИ.

Подробно рассмотрено одно из перспективных направлений, используемых для улучшения качества приживления трансплантатов преимущественно за счет антимикробного эффекта – фотодинамическая терапия. Отмечено, что перспективным является использование для фотодинамической терапии кристаллических наночастиц органических фотосенсибилизаторов, в частности фталоцианина алюминия. Основная отличительная особенность их использования заключается в том, что наночастицы, введенные в область раневой поверхности или в контактную область приживляемой ткани или трансплантата, не проявляют фотоактивности до момента начала воспаления.

Сделан вывод, что актуальной является задача по разработке метода оценки состояния кожного покрова по спектроскопическим свойствам компонентов тканей (с использованием флуоресцентных красителей и фотосенсибилизаторов в молекулярной и наноформах), который позволит анализировать физиологическое состояние кожного покрова (степень и скорость приживления или отторжения), а также контролировать некоторые биохимические и физиологические параметры трансплантата или всей области поражения кожи.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, спектроскопия обратного рассеяния, флуоресцентный видеоимаджинг, кожные трансплантаты, степень оксигенации, уровень кровенаполненности, спектрально чувствительные к воспалительным реакциям наночастицы.

Для цитирования: 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. – Т. 5, № 3. – С. 30–40.

Контакты: Макаров В.И., e-mail: vi.makarov@physics.msu.ru

PHOTONIC METHODS FOR QUALITY EVALUATION OF SKIN ENGRAFTMENT

Makarov V.I.¹, Akhlyustina E.V.², Farrakhova D.S.², Pominova D.V.², Ryabova A.V.^{1,2},
Loschenov V.B.^{1,2}

¹General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute),
Moscow, Russia

In this review, based on more than 70 articles of Russian and foreign authors, methods of skin engraftment monitoring are discussed. Main processes occurring in skin on cellular and subcellular levels at different stages of engraftment are considered. Optical methods which allow performing non-invasive analysis of blood vessels, collagen concentration and form of cellular respiration (by NADH fluorescence) are described. Comparative analysis of nuclear and optical methods for engraftment monitoring highly developed and widespread nowadays is presented. The advantages of optical methods includes multifunctionality, usability and clarity of results, safety and low cost. In contrast to X-ray CT, MRI and ultrasound, optical methods can be used in monitoring mode.

One of the promising directions for improving quality of engraftment due to antibacterial effect, photodynamic therapy, is described in details. The use of crystalline organic nanophotosensitizers (particularly aluminum phthalocyanine) is shown to be the most promising. The main distinctive feature of its application is that nanoparticles injected into wound surface or contact area of tissue graft are not photoactive until the moment the inflammation starts.

The development of method for assessing skin condition by spectroscopic properties of tissue components (using fluorescent dyes and photosensitizers in molecular and nanoforms), which allows analyzing physiological state of skin (degree and rate of engraftment or rejection) and controlling certain biochemical and physiological parameters of a tissue graft or an entire area of affected skin is shown to be crucial.

Keywords: fluorescent diagnosis, backscattering spectroscopy, fluorescence video-imaging, skin grafts, degree of oxygenation, level of blood supply, nanoparticles spectrally sensitive to inflammatory reactions.

For citations: Makarov V.I., Akhlyustina E.V., Farrakhova D.S., Pominova D.V., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Photonic methods for quality evaluation of skin engraftment (review), Biomedical Photonics, 2016, T. 5, No. 3, pp.30–40 (in Russian).

Contacts: Makarov V.I., e-mail: vi.makarov@physics.msu.ru

Введение

Трансплантационная медицина является одной из самых сложных областей современного здравоохранения. За последние 20 лет результаты приживления после трансплантации органов и тканей значительно улучшились в связи с использованием мощных иммуносупрессивных препаратов для предотвращения острого отторжения [1]. Однако диагностика отторжения до сих пор остается нерешенной проблемой.

Независимо от типа пересаженного органа острое отторжение является одной из основных причин функционального отказа при трансплантации, а также основным фактором риска и сокращения срока службы трансплантата. В настоящее время существуют неинвазивные методы оценки качества приживления трансплантата: по уровню сывороточных белков, содержанию креатинина (в случае пересадки почки) [2] и субъективным визуальным признакам, однако они являются недостаточно точными и информативными [1,3-4].

Единственным, на сегодняшний день, точным методом определения типа и фактора отторжения является биопсия. Однако постановка диагноза таким методом требует временных затрат, представляет опасность для пациента, а также может быть недостаточно точной в связи с ошибкой выборки места биопсии из-за очагового характера отторжения [1,2,4,5]. Повторные биопсии кожи также могут привести к образованию рубцов, что является значительной эстетической проблемой в случае открытых участков кожи. Таким образом, быстрый и неинвазивный количественный мониторинг приживления трансплантата остается актуальной задачей [1,7-9]. В данном обзоре рассмотрены подходы к решению проблемы диагностики отторжения трансплантатов при помощи оптических методов исследования.

Методы фотоники в исследованиях механизма приживления трансплантата

Для разработки методики оценки качества заживления раны важно понимание особенностей процес-

сов, происходящих в коже на разных интервалах времени после повреждения на клеточном и субклеточном уровнях [10]. Состояние различных компонентов и структур, составляющих кожный покров и принимающих непосредственное участие в восстановлении повреждения, может быть оценено с помощью следующих методов фотоники:

- метод гиперспектральных изображений с введением контрастных агентов (позволяет оценить скорость кровотока и лимфотока);
- метод регистрации обратно рассеянного излучения (позволяет оценить степень оксигенации гемоглобина, скорость утилизации O_2 , кровенаполненность тканей и скорость роста сосудов);
- метод регистрации генерации второй гармоники (позволяет оценить внутритканевую концентрацию коллагеновых волокон).

Процесс заживления кожных ран традиционно делат на три фазы: (I) воспалительная фаза, начинается сразу после повреждения ткани, (II) фаза пролиферации, которая длится 2-10 дней после повреждения, и (III) фаза восстановления, начинается через 2-3 нед после травмы и длится до года и более [10]. Поскольку процесс заживления достаточно длительный, необходимо иметь портативные, быстрые, неинвазивные методы, позволяющие проводить мониторинг состояния кожного трансплантата в любой момент времени.

В воспалительной фазе важную роль играют клетки крови. При повреждении происходит локальная активация врожденной иммунной системы, что приводит к притоку нейтрофилов с последующим притоком моноцитов, которые дифференцируются в тканевые макрофаги. Они отвечают за захват и переваривание бактерий, остатков погибших клеток и других чужеродных или токсичных для организма частиц. С помощью введения специальных флуоресцентных меток или наночастиц, которые воспринимаются организмом как чужеродные и захватываются макрофагами, можно проводить анализ концентрации макрофагов на разных этапах заживления повреждений. Одним из примеров является взаимодействие

наночастиц фталоцианина алюминия с макрофагами, при котором возникает интенсивная флуоресценция и наблюдается изменение кинетики затухания флуоресценции. При этом, анализируя флуоресценцию, можно количественно оценить концентрацию внутритканевых макрофагов [11].

Макрофаги высвобождают инсулиноподобный (IGF-I), гепаринсвязывающий эпидермальный (HB-EGF), тромбоцитарный (PDGF) факторы роста, а также факторы роста фибробластов (FGF) и эндотелия сосудов (VEGF). В фазе пролиферации происходят формирование грануляционной ткани, реэпителизация и уменьшение размеров раны. В этот период начинается образование новых сосудов (ангиогенез и неоваскуляризация). Новые капилляры вместе с фибробластами и макрофагами заменяют фибриновый матрикс на грануляционную ткань. Существует актуальное направление фотоники по ускорению ангиогенеза в тканях при воздействии лазерным излучением [12-14].

Фибробласты, мигрировавшие от края раны или из костного мозга, стимулируются макрофагами, а некоторые дифференцируются в миофибробласты. Миофибробласты являются сократительными клетками, которые с течением времени сшивают края раны вместе. Фибробласты и миофибробласты взаимодействуют и производят внеклеточный матрикс, главным образом, в форме коллагена, который, в конечном счете, образует основную часть зрелого рубца. Возможность количественной оценки коллагена в тканях оптическими методами будет описана далее. Функция макрофагов на стадии восстановления заключается в стабилизации сосудистых структур и переходе грануляционной ткани в рубцовую ткань [15]. Вследствие миграции кератиноцитов и их пролиферации происходит повторная эпителизация.

В фазе восстановления или ремоделирования миофибробластические и избыточные сосудистые клетки претерпевают апоптоз [16]. Апоптоз миофибробластов и сосудистых клеток является переходной фазой от грануляционной ткани к рубцу. В этот период за счет активации коллагеназы вновь происходит расщепление и переработка избыточного скопления коллагеновых волокон. Снижение концентрации макрофагов во время стадии восстановления не вызывает существенных морфологических изменений, что указывает на незначительную роль макрофагов во время созревания ткани и образовании рубца [15]. Оптические методы позволяют определять стадию перехода одного процесса в другой (от фазы пролиферации к фазе восстановления), что, например, может помочь более точно определить оптимальный период для проведения фотодинамической терапии [17-19], чтобы обеспечить положительный косметический эффект при деградации рубца.

Спектроскопические методы определения типов клеточного дыхания

NADH (никотинамидадениндинуклеотид), NADPH-оксидаза (никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза) и флавины (отвечающие за метаболические процессы в клетке) имеют индивидуальные спектры поглощения и флуоресценции, которые позволяют отличить их от других биологических соединений.

Кофермент NADH необходим для окислительно-восстановительных реакций и энергетического метаболизма в живых клетках [20-22]. Существует большой потенциал для клеточного NADH, как природного флуоресцентного биомаркера для ряда процессов, таких как апоптоз [23], окислительно-восстановительные реакции [23,24], митохондриальные аномалии, связанные с развитием рака [20,25-27], и нейродегенеративные заболевания [28]. Это связано с тем, что концентрация и распределение NADH в живых клетках чувствительны к физиологии [29,30] и патологии [31] клетки.

Первые исследования типа клеточного дыхания были основаны на использовании флуоресцентного излучения восстановленной формы NADH [32-34]. При ускоренном метаболизме увеличивается скорость дыхания, что приводит к уменьшению соотношения $NADH/NAD^+$ и снижению интенсивности флуоресценции NADH. При ограничении скорости доставки кислорода, например, в области ишемии сердечной мышцы или головного мозга, интенсивность дыхания снижается, а интенсивность флуоресценции NADH возрастает. Следовательно, флуоресценция NADH может использоваться для мониторинга клеточного дыхания [35]. Однако, несмотря на быстроту и простоту получения результатов, некоторые исследователи придерживаются мнения, что переход от нормоксии к кислородной недостаточности (аноксии) проявляется не только в увеличении отношения $NADH/NAD^+$ (с прекращением митохондриального дыхания), но и в изменении количества энзим-связанных молекул NADH. Так как средняя интенсивность флуоресценции определяется произведением концентрации и времени жизни флуоресценции для каждого конформационного состояния флуорофора, изменение его состояния также приводит к изменению интенсивности флуоресценции при постоянной концентрации NADH и непрерывном режиме лазерного возбуждения. Вышеприведенные исследования показывают, что метод визуализации времени жизни флуоресценции может быть более надежным показателем клеточного метаболизма, чем метод, основанный на анализе интенсивности.

В клетке NADH может находиться в двух состояниях: свободном (в цитозоле) и связанном (внутри

митохондрии, за счет связывания кофермента с лактатдегидрогеназой и малатдегидрогеназой). В работе [36] оценка типа дыхания клеток (аэробное или анаэробное) на разных этапах заживления проводилась путем мониторинга соотношения времен жизни флуоресценции свободного и связанного NADH. При переходе от свободной к связанной форме NADH время жизни флуоресценции увеличивается от 0,4 до 2,5 нс [37]. Рассчитав время затухания флуоресценции по двойной экспоненциальной модели, можно определить соотношение концентраций этих форм.

В. Chance в своих работах [38-40] использовал клеточную аутофлуоресценцию в качестве биомаркера дыхательной функции и митохондриальной деятельности, используя лазерное возбуждение ($\lambda=360$ нм). Так как внутриклеточный уровень NADH (флуоресцирующая форма) и NAD^+ (не флуоресцирующая форма) со временем уравниваются, можно предположить, что наблюдаемое увеличение концентрации NADH при физиологической манипуляции той же клетки будет соответствовать уменьшению NAD^+ на эту же величину. На основании анализа [24,41] в нормальных клетках молочной железы (Hs578Bst) доля внутриклеточного свободного NADH составляет $F_{\text{свободный}} = 0,18 \pm 0,08$, что значительно меньше, чем доля энзим-связанной фракции ($F_{\text{связанный}} = 0,82 \pm 0,08$). В раковых клетках молочной железы (HS578T), значения составляют: $F_{\text{свободный}} = 0,25 \pm 0,08$ и $F_{\text{связанный}} = 0,75 \pm 0,07$. Несмотря на то, что результаты достаточно близки по значениям, тем не менее нормальные и раковые клетки являются статистически различимыми (критерий Стьюдента, $p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты позволяют неинвазивно оценивать тип дыхания клеток *in vitro*.

В работе [42] был предложен неинвазивный способ определения типа дыхания клеток и состояния заживления раны кожи крысы, при помощи контроля отношения свободного NADH к связанному с использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии.

Стоит учитывать, что полоса поглощения NADH находится в УФ-диапазоне, а максимум флуоресценции – в синей области спектра (460 ± 30 нм), что ограничивает глубину проникновения излучения (длины волн менее 300 нм проникают на несколько клеточных слоев, 320-400 нм – проникает на глубину несколько сотен мкм, 400-600 нм – на глубину 0,5-2,5 мм, 600-1500 нм – на глубину 0,8-1,0 мм [43]). Однако, существует метод двухфотонного возбуждения NADH, который позволяет проникать глубже в ткань, поскольку длина волны возбуждения находится в ближнем ИК диапазоне [44,45]. Метод однофотонного возбуждения для оценки клеточного дыхания

может быть применен для исследовательских работ на клеточных культурах и на хорошо очищенных поверхностях биотканей.

Количественное определение коллагена в ткани при заживлении

Коллаген — фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма (сухожилие, кость, хрящ, дерма и т.п.) и обеспечивающий её прочность и эластичность. Коллагеновые волокна являются нелинейным оптическим материалом, поэтому при их взаимодействии с фемтосекундным лазерным излучением ($\lambda=740$ нм) происходит генерация второй гармоники (ГВГ), в результате которой длина волны уменьшается в два раза [37,42]. Чем выше интенсивность регистрируемого излучения на длине волны 370 нм, тем, соответственно, выше концентрация коллагена в ткани, что является благоприятным фактором для заживления раны.

В работе [42] после формирования раны наиболее интенсивный сигнал ГВГ отмечался на краю, в отличие от центральной области повреждения, что объясняется наличием непосредственной связи края раны с неповрежденными тканями, за счет которой обеспечивается активный приток новых клеток и необходимых для жизни и роста элементов. Разница между интенсивностями сигнала на краю и в центре повреждения начала уменьшаться после пятнадцатого дня, т.к. рана вступила в фазу восстановления [46].

Методы фотоники для мониторинга эффективности терапии при приживлении трансплантата кожи

За последние десятилетия были разработаны методы для визуализации тканевой перфузии [47-51]. Большинство из этих методов используют диффузно рассеянный от кожи свет. Оценка состояния микроциркуляторного русла кожи позволяет определять патологии, вызванные сосудистой дисфункцией, в том числе гипертонию [52], диабет [53] и некоторые другие периферийные сосудистые заболевания [54]. На сегодняшний день наиболее широко развиты и используются следующие методы визуализации (табл.).

Преимущество оптических методов заключается в многофункциональности, простоте, безопасности и низкой стоимости. В отличие от рентгено-компьютерной томографии, МРТ и УЗИ [72,73], они также могут быть использованы в режиме мониторинга. Кроме мягких тканей, оптические методы могут применяться и для твердых тканей, таких как костная ткань, зубная эмаль, дентин и цемент, а также для хрящей, сухожилий и связок.

Таблица

Современные методы визуализации состояния органов и ткани

Table

Current methods of imaging for tissues and organs

Метод Method	Описание Definition (basic principles)	Преимущества Advantages	Ограничения Disadvantages
Рентгеновские и ядерные X-ray and nuclear			
КТ-ангиография [53] CT-angiography [53]	Томография КТ в поперечном сечении, обеспечивает реконструкцию сосудистой сети на 360 градусов. Cross-sectional CT provides the reconstruction of vasculature by 360 degrees.	Быстрый, неинвазивный метод, более дешевый, чем традиционная ангиография. Fast, non-invasive, cheaper than traditional angiography.	Нефротоксичность йодированного контраста, низкое разрешение (3 мм) [55] и изменение визуализации при кальцификации сосудов. Nephrotoxicity of iodinated contrast, low resolution (3 mm) [55] and artifacts if vascular calcification is present.
Однофотонная эмиссионная томография (ОФЭКТ) [53] Single-photon emission computed tomography (SPECT) [53]	Небольшое количество радиоактивных веществ, вводящееся внутривенно, используются со специальными камерами для получения изображений сосудистой системы нижних конечностей и кровеносных сосудов. Low dose of radioactive substances introduced intravenously is used with special cameras for imaging the vascular system of the lower limbs and the blood vessels.	Неинвазивный, может использоваться для имаджинга после процедуры реваскуляции [55]. Non-invasive, can be used for imaging after revascularization [55].	Низкое разрешение (объемное разрешение 5,8 мл) [55]. Low resolution (volumetric resolution is 5.8 ml) [55].
Магнитно-резонансная ангиография [53] Magnetic resonance angiography (MRA) [53]	MPT в поперечном сечении, обеспечивает реконструкцию сосудистой сети на 360 градусов. Cross-sectional MRI imaging, provides the reconstruction of vasculature by 360 degrees.	Неинвазивный, не затемняется при кальцификации сосудов. Non-invasive, not obscured by vascular calcification.	Долгое время и высокая стоимость обучения. Низкая разрешающая способность (3 мм) [55]. Нефротоксичность некоторых контрастных агентов, высокая стоимость, венозные артефакты. Long and expensive training, low resolution (3 mm) [55]. Nephrotoxicity of some contrast agents, high cost, venous artifacts.
Акустические и фотоакустические Acoustic and photoacoustic			
Ультразвуковая диагностика [53] Ultrasound [53]	Сонография для визуализации диаметра сосудов, преград, потока крови. Метод основан на регистрации отраженных УЗ сигналов. Ultrasound imaging for visualization of vascular diameter, obstructions and blood flow. The method is based on the registration of the reflected ultrasound signals.	Быстрый, неинвазивный, дешевый. Fast, non-invasive, low-cost.	Применение ограничено пользовательскими навыками, разрешающая способность (1-5 мм) [55], сложность оценки перфузии в дистальных и мелких сосудов в голени и стопе. Limited by user skills, resolution (1-5 mm) [55], the difficulty of the assessment of perfusion in the distal and small blood vessels in the lower leg and foot.
Сверхбыстрая фотоакустическая проточная цитометрия [54, 56] Ultra-fast photoacoustic flow cytometry [54, 56]	Исследования количества и качества клеток в ходе их перемещения через очень узкий капилляр диаметром 50-150 мкм при помощи лазера [57]. Quantitative and qualitative study of cells during their movement through a very narrow capillary of 50-150 microns in diameter using laser [57].	Высокая чувствительность и разрешающая способность на глубине от 0,5 мм [57]. High sensitivity and resolution at the depth of 0.5 mm [57].	Чувствительность ограничена потенциальной токсичностью доступных флуоресцентных меток. The sensitivity is limited by the potential toxicity of the available fluorescent labels.
Оптические Optical			
Допплеровская флоуметрия (физиологический) [52-54] Laser doppler flowmetry (LDF) (physiological) [52-54]	Регистрация частотного сдвига излучения при отражении от движущихся объектов, например, эритроцитов. Предназначен для оценки скорости кровотока в сосудах и используется в качестве индекса микроциркуляции кожи. Registration of radiation frequency shift after reflection by moving objects, such as red blood cells. Designed for assessing blood flow speed in vessels and used as an index of the skin microcirculation.	Быстрый, неинвазивный, дешевый. Fast, non-invasive, low-cost.	Применение ограничено пользовательскими навыками и телосложением пациента, не может обеспечить абсолютные величины перфузии. Разрешение 1 мм ³ [58]. The appreciation is limited by user skills and body habitus of the patient, does not provide absolute values of perfusion. Resolution is 1 mm ³ [58].

Метод Method	Описание Definition (basic principles)	Преимущества Advantages	Ограничения Disadvantages
Лазерная спекловая визуализация (LSCI) [52] Laser speckle contrast imaging (LSCI)[52]	Флуктуации интенсивности размытия спекла, вызванные движением частиц в освещенной среде, формируют изображение. Уменьшая контрастность, подбирают необходимый уровень для определения скорости перемещения эритроцитов. Fluctuations of the speckle blur intensity caused by movement of particles in illuminated medium form an image. By decreasing the contrast the necessary level for measuring velocity of red blood cells is selected.	LSCI изображение кожной микроциркуляции с высоким разрешением и контрастностью. High resolution and contrast for skin microcirculation.	Непрозрачность кожи скрывает динамическую информацию о кровотоке и снижает разрешение и контрастность изображения. Opacity of skin hides the dynamic information about blood flow and reduces the resolution and contrast of the image.
Метод гиперспектральных изображений (HSI) [53] Hyperspectral imaging (HSI) [53]	Сканирующая спектроскопия для визуализации тканевой перфузии на уровне микрососудов. Оценка концентрации оксигемоглобина и дезоксигемоглобина. Также существует метод гиперспектральных изображений с введением внутривенно контрастных агентов для визуализации сосудистой и области тканевой перфузии. Scanning spectroscopy for tissue perfusion visualization on microvascular level. Concentration of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin evaluation. There is also a method of hyperspectral imaging with intravenous injection of contrast agents for visualization of vascular and tissue perfusion.	Неинвазивный, может использоваться для имаджинга после процедуры реваскуляции. Non-invasive, can be used for imaging after revascularization.	Нефротоксичность некоторых контрастных агентов. Nephrotoxicity of some contrast agents.
Оптическая когерентная томография (ОКТ) [59,60] Optical coherence tomography (OCT) [59,60]	Позволяет отображать тонкие слои кожи и слизистые оболочки. Allows displaying thin layers of the skin and mucous membranes.	Бесконтактный, неинвазивный, большая глубина изображения [61-63]. Non-contact, non-invasive, large probing depth [61-63].	Низкое разрешение и дефицит эндогенного контраста без использования контрастных агентов. Low resolution and a lack of endogenous contrast without using the contrast agents.
Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия с двухфотонным возбуждением флуоресценции (TPEF) [64] Two-photon excitation microscopy (TPEF) [64]	Исследование тканей на глубине более 1 мм, с помощью двухфотонного возбуждения флуоресценции [64]. Investigation of tissues at depth more than 1 mm using a two-photon fluorescence excitation [64].	Обеспечивает клеточное разрешение и уникальные контрастные возможности. Provides cellular resolution and unique contrast possibilities.	Небольшая глубина проникновения и ограниченный контраст. Некоторая энергия теряется в процессе релаксации возбужденного состояния [65]. Small depth of penetration and limited contrast. Some energy is lost in the process of relaxation of the excited state [65].
Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия с возможностью генерации второй и третьей гармоник [66] Reflection confocal microscopy (RCM) [66]	Визуализация клеточной и тканевой структуры и функции. Visualization of cell and tissue structure and function.	Обеспечивает клеточное разрешение и уникальные контрастные возможности, нет фототоксичности и фотобликинга. Provides cellular resolution and unique contrast possibilities, no phototoxicity and photobleaching.	Небольшая глубина проникновения и ограниченный контраст. Small depth of penetration and limited contrast.
Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (FLIM) [67-70] Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) [67-70]	Формирования изображения на основе изменений жизни флуоресценции специфических флуорофоров. Visualization based on fluorescence lifetime changes of specific fluorophores.	Неинвазивный, позволяет различать флуоресценцию, исходящую от различных флуорохромов [71]. Разрешение ограничено разрешением микроскопа. Non-invasive, allows distinguishing between fluorescence emitted by different fluorophores [71]. Resolution is limited by the resolution of the microscope.	Высокая стоимость, длительное время сканирования. High cost, long scanning time.

Использование фотосенсибилизаторов в молекулярной и наноформе при трансплантации

Существует несколько достаточно эффективных лекарственных и физиотерапевтических методов, ускоряющих приживление кожи. Тем не менее, в ряде случаев, особенно это касается обширных участков поражения, приживление протекает медленно или происходит отторжение тканей с отягощающими процессами септического характера. Антибиотики, применяемые для борьбы с септическим воспалением, оказываются неэффективными в связи возрастающей резистентностью микрофлоры [45,74,75]. Поэтому в настоящее время во многих странах ведутся активные поиски лекарственных средств, к которым не возникает устойчивость патогенной микрофлоры. Одним из перспективных направлений является применение фотосенсибилизаторов, действие которых основано на разрушении молекулярных связей за счет производства активных форм кислорода в результате взаимодействия трех компонентов: фотосенсибилизатора, света и молекулярного кислорода, растворенного в биоткани. При этом не вырабатывается резистентность микрофлоры к их действию. Было обнаружено, что фотосенсибилизаторы могут быть использованы не только при внутривенном, но и при местном применении, что очень важно для ослабленного организма при значительных ожоговых поражениях кожи.

Одним из многообещающих и уже сейчас демонстрирующих перспективные результаты методов является использование кристаллических наночастиц органических фотосенсибилизаторов [76]. Основная отличительная особенность их использования заключается в том, что наночастицы, введенные в область раневой поверхности или в контактную область приживляемой ткани или трансплантата, не проявляют фотоактивности до момента начала воспаления, что выражается в отсутствии флуоресценции и отсутствии фотодинамического эффекта. При попадании инфекции в контактную область под воздействием микрофлоры, наночастицы начинают флуоресцировать. При облучении светом определенной длины волны возникает фотодинамический эффект, приводящий к гибели патогенной микрофлоры. Также стоит отметить перспективность применения кристаллических наночастиц фталоцианина алюминия и для подавления асептического воспаления [11].

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что в настоящее время актуальной является задача по разработке метода оценки состояния кожного покрова по спектроскопическим свойствам компонентов тканей (с использованием флуоресцентных красителей и фотосенсибилизаторов в молекулярной и наноформах), которая позволит оценивать физиологическое состояние кожного покрова (степень и скорость приживления или отторжения), а также контролировать несколько биохимических и физиологических параметров трансплантата или всей области поражения кожи:

1) степень оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле ткани с помощью анализа спектров обратного диффузного рассеянного излучения;

2) уровень кровенаполненности, с помощью расчета доли поглощенного гемоглобином излучения по сравнению с другими структурными компонентами кожи;

3) скорость кровотока методом гиперспектральных изображений с введением контрастных агентов, например, индоцианина зеленого, в динамике при помощи регистрации и анализа мультиспектральных изображений;

4) внутриклеточный метаболизм и клеточное дыхание (аэробное/анаэробное), с помощью регистрации интенсивности флуоресценции NADH по сравнению с нормой (количественная концентрация NADH в клетках может быть рассчитана путем сравнения с концентрациями известных оптических фантомов).

Существует принципиальная возможность определять в режиме мониторинга все эти параметры. Разработаны методы и приборы, позволяющие по отдельности измерять и анализировать соответствующие спектральные данные. В связи с этим, важной задачей является разработка методики и создание устройства, позволяющего определять эти параметры одновременно в виде мультиспектральных видеоизображений, включая флуоресцентные изображения и изображения в ближнем инфракрасном диапазоне.

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ №15-29-04869 офи_м "Разработка спектроскопического метода оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением наночастиц спектрально чувствительных к воспалительным реакциям".

ЛИТЕРАТУРА

1. Butler K.S., Lovato D.M., Adolphi N.L., et al. Development of Antibody-Tagged Nanoparticles for Detection of Transplant Rejection Using Biomagnetic Sensors // *Cell Transplantation*. – 2013. – Vol. 22, No. 10. – P. 1943-54.
2. Li C., Yang C.W. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2009. – Vol. 5, No. 9. – P. 513-19.
3. Durrbach A., Francois H., Beaudreuil S., et al. Advances in immunosuppression for renal transplantation // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2010. – Vol. 6, No. 3. – P. 160-7.
4. Galante N. Z., Tedesco H.S., Machado P. G., et al. Acute rejection is a risk factor for long-term survival in a single-center analysis of 1544 renal transplants // *Transplant. Proc.* – 2002. – Vol. 34, No. 2. – P. 508-13.
5. Zdichavsky M., Jones J.W., Ustuner E.T., et al. Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model // *J Surg Res.* – 1999. – Vol. 85, No. 1. – P. 1-8.
6. Patil D.T., Yerian L.M. Pancreas transplant: Recent advances and spectrum of features in pancreas allograft pathology // *Adv. Anat. Pathol.* – 2010. – Vol. 17, No. 3. – P. 202-8.
7. Dillman J.R., Elsayes K. M., Bude R.O., et al. Imaging of pancreas transplants: Postoperative findings with clinical correlation // *J. Comput. Assist. Tomogr.* – 2009. – Vol. 33, No. 4. – P. 609-17.
8. Gwinner W. Renal transplant rejection markers // *World J. Urol.* – 2007. – Vol. 25, No. 5. – P. 445-55.
9. Schwarz A., Gwinner W., Hiss M., et al. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies // *Am. J. Transplant.* – 2005. – Vol. 5, No. 8. – P. 1992-6.
10. Yamaguchi Y., Yoshikawa K. Cutaneous Wound Healing: An Update // *Journal of dermatology.* – 2001. – Vol. 28, No. 10. – P. 521-34.
11. Быстров Ф.Г., Макаров В.Г., Поминова Д.В., и др. Исследование кинетики затухания фотолюминесценции молекулярных нанокристаллов фталоцианина алюминия при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками // *Biomedical photonics.* – 2016. – Т. 5, № 1. – С. 3-8.
12. Salate A.C.B., Barbosa G., Gaspar P., et al. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats // *Photomedicine and laser surgery.* – 2005. – Vol. 23, No. 5. – P. 470-5.
13. Garavello I., Baranauskas V., da Cruz-Hofling M.A. Effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae // *Histol histopathol.* – 2004. – Vol. 19, No. 1. – P. 43-8.
14. Loschenov V.B., Stratonnikov A.A., Vasilchenko S.Yu., et al. Development of the myocardial photodynamic revascularization method // *SPIE Proceedings.* – 2004. – No. 5486. – P. 347-51.
15. Lucas T., Waisman A., Ranjan R., et al. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair // *The Journal of Immunology.* – 2010. – Vol. 184, No. 7. – P. 3964-77.
16. Desmouliere A., Redard M., Darby I., Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar // *Am J Pathol.* – 1995. – Vol. 146, No. 1. – P. 56-66.
17. Carniol P., Sadick N.S. Clinical Procedures in Laser Skin Rejuvenation. – Informa healthcare, 2007. – P. 59-62.
18. Campos de Menezes P.F., Requena M.B., Rosa R.G.T., et al. Modification of collagen fiber after PDT in porcine skin models by two photons microscopy analysis // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2015. – Vol. 12, No. 3. – P. 335.
19. Li T., Huang Z.F., Wang H.W., et al. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy – in vivo study in a mouse model // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2012. – Vol. 9, No. 2. – P. 164-9.

REFERENCES

1. Butler K.S., Lovato D.M., Adolphi N.L., Belfon R., Fegan D.L., Monson T.C., Hathaway H.J., Huber D.L., Tessier T.E., Bryant H.C., Flynn E.R., Larson R.S. Development of Antibody-Tagged Nanoparticles for Detection of Transplant Rejection Using Biomagnetic Sensors, *Cell Transplantation*, 2013, Vol. 22, No. 10, pp. 1943-54.
2. Li C., Yang C.W. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy, *Nat. Rev. Nephrol.*, 2009, Vol. 5, No. 9, pp. 513-19.
3. Durrbach A., Francois H., Beaudreuil S., Jacquet A., Charpentier B. Advances in immunosuppression for renal transplantation, *Nat. Rev. Nephrol.*, 2010, Vol. 6, No. 3, pp. 160-7.
4. Galante N.Z., Tedesco H.S., Machado P.G., Pacheco-Silva A., Medina-Pestana J.O. Acute rejection is a risk factor for long-term survival in a single-center analysis of 1544 renal transplants, *Transplant. Proc.*, 2002, Vol. 34, No. 2, pp. 508-13.
5. Zdichavsky M., Jones J.W., Ustuner E.T., Ren X., Edelstein J., Maldonado C., Breidenbach W., Gruber S.A., Ray M., Barker J. H. Scoring of skin rejection in a swine composite tissue allograft model, *J Surg Res.*, 1999, Vol. 85, No. 1, pp. 1-8.
6. Patil D. T., Yerian L. M. Pancreas transplant: Recent advances and spectrum of features in pancreas allograft pathology, *Adv. Anat. Pathol.*, 2010, Vol. 17, No. 3, pp. 202-8.
7. Dillman J.R., Elsayes K.M., Bude R.O., Platt J.F., Francis I.R. Imaging of pancreas transplants: Postoperative findings with clinical correlation, *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 2009, Vol. 33, No. 4, pp. 609-17.
8. Gwinner W. Renal transplant rejection markers, *World J. Urol.*, 2007, Vol. 25, No. 5, pp. 445-55.
9. Schwarz A., Gwinner W., Hiss M., Radermacher J., Mengel M., Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies, *Am. J. Transplant.*, 2005, Vol. 5, No. 8, pp. 1992-6.
10. Yamaguchi Y., Yoshikawa K. Cutaneous Wound Healing: An Update, *Journal of dermatology*, 2001, Vol. 28, No. 10, pp. 521-34.
11. Bystrov F.G., Makarov V.G., Pominova D.V., Ryabova A.V., Loshchenov V.B. Analysis of photoluminescence decay kinetics of aluminum phthalocyanine nanoparticles interacting with immune cells, *Biomedical photonics*, 2016, Vol. 5, No. 1, pp. 3-8. (in Russian).
12. Salate A.C.B., Barbosa G., Gaspar P., Koeke P.U., Parizotto N.A., Benze B.G., Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats, *Photomedicine and laser surgery*, 2005, Vol. 23, No. 5, pp. 470-5.
13. Garavello I., Baranauskas V., da Cruz-Hofling M.A. Effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae, *Histol histopathol*, 2004, Vol. 19, No. 1, pp. 43-8.
14. Loschenov V.B., Stratonnikov A.A., Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Kharnas S.S., Sheptak E.A. Development of the myocardial photodynamic revascularization method, *SPIE Proceedings*, 2004, No. 5486, pp. 347-51.
15. Lucas T., Waisman A., Ranjan R., Roes J., Krieg T., Muller W., Roers A, Eming S.A. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair, *The Journal of Immunology*, 2010, Vol. 184, No. 7, pp. 3964-77.
16. Desmouliere A., Redard M., Darby I., Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar, *Am J Pathol*, 1995, Vol. 146, No. 1, pp. 56-66.
17. Carniol P., Sadick N.S. *Clinical Procedures in Laser Skin Rejuvenation*. Informa healthcare Publ., 2007, pp. 59-62.
18. Campos de Menezes P.F., Requena M.B., Rosa R.G.T., Prativaieira S., Fujita A.K. L., Kurachi C., Escobar A., Wendler da Rocha R., Barboza de Nardi A., Bagnato V.S. Modification of collagen fiber after PDT in porcine skin models by two photons microscopy analysis, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015, Vol. 12, No. 3, p. 335.

20. Modica-Napolitano J.S., Singh K.K. Mitochondrial dysfunction in cancer // *Mitochondrion*. – 2004. – Vol. 4, No. 5-6. – P. 755-62.
21. Scheffler I.E. *Mitochondria*. – New York: Wiley-Liss, 1999.
22. Stryer L. *Biochemistry*. – New York: W. H. Freeman and Company, 1999.
23. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences // *Antioxid Redox Signal*. – 2008. – Vol. 10, No. 2. – P. 179-206.
24. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., et al. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2007. – Vol. 104, No. 49. – P. 19494-9.
25. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science*. – 1956. – Vol. 123, No. 3191. – P. 309-14.
26. Carew J.S., Huang P. Mitochondrial defects in cancer // *Mol Cancer*. – 2002. – Vol. 1, No. 9. – P. 9.
27. Modica-Naplitano J.S., Singh K.K. Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. – 2002. – Vol. 4, No. 9. – P. 1-18.
28. Cassarion D.S., Bennett J.P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutation and oxidative pathology, protective nuclear response, and cell death in neurodegeneration // *Brain Research Reviews*. – 1999. – Vol. 29, No. 1. – P. 1-25.
29. Vishwasrao H.D., Heikal A.A., Kasischke K.A., Webb W.W. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy // *J Biol Chem*. – 2005. – Vol. 280, No. 26. – P. 25119-26.
30. Bird D.K., Yan L., Vrotsos K.M., et al. Metabolic mapping of MCF 10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, No. 19. – P. 8766-73.
31. Uppal A., Gupta P.K. Measurements of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity // *Biotechnol Appl Biochem*. – 2003. – Vol. 37, Pt. 1. – P. 45-50.
32. Chance B., Baltscheffsky H.J. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VII. Binding of intramitochondrial reduced pyridine nucleotide // *Biol Chem*. – 1958. – Vol. 233, No. 3. – P. 736-9.
33. Change B., Oshino N., Sugano T., Mayevsky A.A. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals // *Adv Exp Med Biol*. – 1973. – No. 37A. – P. 277-92.
34. Chance B., Lieberman M. Intrinsic fluorescence emission from the cornea at low temperatures: evidence of mitochondrial signals and their differing redox states in epithelial and endothelial sides // *Exp Eye Res*. – 1978. – Vol. 26, No. 1. – P. 111-7.
35. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies // *J Physiol Cell Physiol*. – 2007. – Vol. 292, No. 2. – P. 615-40.
36. Visser A.J.W.G., Hoek A.V. The fluorescence decay of reduced nicotinamide in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked laser // *J Photochem. Photobiol.* – 1980. – Vol. 33, No. 1. – P. 35-41.
37. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. – Garland Science, 2015. – 1465 p.
38. Chance B. Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of Mitochondria // *Circ Res*. – 1976. – Vol. 38, No. 5, Suppl. 1. – P. 131-8.
39. Chance B., Jamieson D., Coles H. Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro and in vivo // *Nature*. – 1965. – Vol. 206, No. 981. – P. 257-63.
40. Chance B., Legallais V., Schoener B. Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland // *Nature*. – 1962. – No. 195. – P. 1073-5.
19. Li T., Huang Z.F., Wang H.W., Lin J.Q., Chen G.N., Chen X.W., Chen R., Huang Z., Wang X.L. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy – in vivo study in a mouse model, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2012, Vol. 9, No. 2, pp. 164-9.
20. Modica-Napolitano J.S., Singh K.K. Mitochondrial dysfunction in cancer, *Mitochondrion*, 2004, Vol. 4, No. 5-6, pp. 755-62.
21. Scheffler I.E. *Mitochondria*. New York, Wiley-Liss Publ., 1999.
22. Stryer L. *Biochemistry*. New York, W. H. Freeman and Company Publ., 1999.
23. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences, *Antioxid Redox Signal*, 2008, Vol. 10, No. 2, pp. 179-206.
24. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, Vol. 104, No. 49, pp. 19494-9.
25. Warburg O. On the origin of cancer cells, *Science*, 1956, Vol. 123, No. 3191, pp. 309-14.
26. Carew J.S., Huang P. Mitochondrial defects in cancer, *Mol Cancer*, 2002, Vol. 1, No. 9, pp. 9.
27. Modica-Naplitano J.S., Singh K.K. Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002, Vol. 4, No. 9, pp. 1-18.
28. Cassarion D.S., Bennett J.P. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutation and oxidative pathology, protective nuclear response, and cell death in neurodegeneration, *Brain Research Reviews*, 1999, Vol. 29, No. 1, pp. 1-25.
29. Vishwasrao H.D., Heikal A.A., Kasischke K.A., Webb W.W. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy, *J Biol Chem*, 2005, Vol. 280, No. 26, pp. 25119-26.
30. Bird D.K., Yan L., Vrotsos K.M., Eliceiri K.W., Vaughan E.M., Keely P.J., White J.G., Ramanujam N. Metabolic mapping of MCF 10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH, *Cancer Res*, 2005, Vol. 65, No. 19, pp. 8766-73.
31. Uppal A., Gupta P.K. Measurements of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity, *Biotechnol Appl Biochem*, 2003, Vol. 37, Pt. 1, pp. 45-50.
32. Chance B., Baltscheffsky H.J. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VII. Binding of intramitochondrial reduced pyridine nucleotide, *Biol Chem*, 1958, Vol. 233, No. 3, pp. 736-9.
33. Change B., Oshino N., Sugano T., Mayevsky A.A. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals, *Adv Exp Med Biol*, 1973, No. 37A, pp. 277-92.
34. Chance B., Lieberman M. Intrinsic fluorescence emission from the cornea at low temperatures: evidence of mitochondrial signals and their differing redox states in epithelial and endothelial sides, *Exp Eye Res*, 1978, Vol. 26, No. 1, pp. 111-7.
35. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies, *J Physiol Cell Physiol*, 2007, Vol. 292, No. 2, pp. 615-40.
36. Visser A.J.W.G., Hoek A.V. The fluorescence decay of reduced nicotinamide in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked laser, *J Photochem. Photobiol.*, 1980, Vol. 33, No. 1, pp. 35-41.
37. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science Publ., 2015. 1465 p.
38. Chance B. Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of Mitochondria, *Circ Res*, 1976, Vol. 38, No. 5, Suppl. 1, pp. 131-8.
39. Chance B., Jamieson D., Coles H. Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro and in vivo, *Nature*, 1965, Vol. 206, No. 981, pp. 257-63.

41. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. – Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. – 698 p.
42. Deka G., Wu W.W., Kao F.J. In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging // *Journal of biomedical optics*. – 2013. – Vol. 18, No. 6. – P. 1-8.
43. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. – М.: ФИЗМАЛИТ, 2007. – С. 81-82.
44. Baraghis E., Devor A., Fang Q., et al. Two-photon microscopy of cortical NADH fluorescence intensity changes: correcting contamination from the hemodynamic response // *J Biomed Opt.* – 2011. – Vol. 16, No. 10. – 106003.
45. Rice W.L., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Two-Photon Microscopy for Non-Invasive, Quantitative Monitoring of Stem Cell Differentiation // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5, No. 4. – e10075.
46. Longo C., Galimberti M., De Pace B., et al. Laser skin rejuvenation: epidermal changes and collagen remodeling evaluated by in vivo confocal microscopy // *Lasers Med Sci*. – 2013. – Vol. 28. – P. 769-76.
47. Boulaftali Y., Lamrani L., Rouzaud M. C., et al. The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy // *Thromb. Haemost.* – 2012. – Vol. 107, No. 5. – P. 962-71.
48. Laschke M.W., Vollmar B., Menger M.D. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue // *Eur. Cell. Mater.* – 2011. – Vol. 22. – P. 147-64.
49. Wang H., Shi L., Qin J., et al. Multimodal optical imaging can reveal changes in microcirculation and tissue oxygenation during skin wound healing // *Lasers Surg. Med.* – 2014. – Vol. 46, No. 6. – P. 470-8.
50. An L., Qin J., Wang R.K. Ultrahigh sensitive optical microangiography for in vivo imaging of microcirculations within human skin tissue beds // *Opt. Express*. – 2010. – Vol. 18, No. 8. – P. 8220-8.
51. Struijker-Boudier H.A., Rosei A.E., Bruneval P., et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease // *Eur. Heart J.* – 2007. – Vol. 28. – P. 2834-40.
52. Quondamatteo F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? // *Cell Tissue Res*. – 2014. – Vol. 355, No. 1. – P. 1-21.
53. Rossi M., Carpi A., Galetta F., et al. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? // *Biomed. Pharmacother.* – 2006. – Vol. 60, No. 8. – P. 437-42.
54. Rui S., Cnen M., Tuchin V.V., Zhu D. Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing // *Biomedical Optics Express*. – 2015. – Vol. 6, No. 6. – P. 1977-89.
55. Galanzha E.I., Zharov V.P. Photoacoustic and photothermal cytometry for monitoring multiple blood rheology parameters in vivo // *Cytometry A*. – 2011. – Vol. 79, No. 10. – P. 746-57.
56. Khaksari K., Kirkpatrick S.J. Combined effects of scattering and adsorbion on laser speckle contrast imaging // *Journal of Biomedical optics*. – 2016. – Vol. 21, No. 7.
57. Tatsuo T., Toshiyo T., Ake Oberg P. Biomedical TRANSDUCERS and INSTRUMENTS. – CRC Press LLC, 1997. – P. 137.
58. Benitez E., Sumpio B.J., Chin J., Sumpio B.E. Contemporary assessment of foot perfusion in patients with critical limb ischemia // *Seminars in vascular surgery*. – 2014. – Vol. 27, No. 1. – P. 3-15.
59. Galanzha E.I., Zharov V.P. Circulation Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo // *Cancers (Basel)*. – 2013. – Vol. 5, No. 4. – P. 1691-1738.
60. Erdi Y.E. Limits of Tumor Detectability in Nuclear Medicine and PET // *Mol Imaging Radionucl Ther.* – 2012. – Vol. 21, No. 1. – P. 23-28.
61. Huang D., Swanson E., Lin C., et al. Optical coherence tomography // *Science*. – 1991. – Vol. 254, No. 5035. – P.1178-81.
40. Chance B., Legallais V., Schoener B. Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland, *Nature*, 1962, No. 195, pp. 1073-5.
41. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers Publ., 1999. 698 p.
42. Deka G., Wu W.W., Kao F.J. In vivo wound healing diagnosis with second harmonic and fluorescence lifetime imaging, *Journal of biomedical optics*, 2013, Vol. 18, No. 6, pp. 1-8.
43. Tuchin V.V. *Opticheskaya biomeditsinskaya diagnostika* (Optical biomedical diagnostics). Moscow, FIZMALIT Publ., 2007. pp. 81-82.
44. Baraghis E., Devor A., Fang Q., Srinivasan V.J., Wu W., Lesage F., Ayata C., Kasischke K. A., Boas D.A., Sakadzic S. Two-photon microscopy of cortical NADH fluorescence intensity changes: correcting contamination from the hemodynamic response, *J Biomed Opt*, 2011, Vol. 16, No. 10, 106003.
45. Rice W.L., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Two-Photon Microscopy for Non-Invasive, Quantitative Monitoring of Stem Cell Differentiation, *PLoS One*, 2010, Vol. 5, No. 4, e10075.
46. Longo C., Galimberti M., De Pace B., Pellacani G., Bencini P. L. Laser skin rejuvenation: epidermal changes and collagen remodeling evaluated by in vivo confocal microscopy, *Lasers Med Sci*, 2013, Vol. 28, pp. 769-76.
47. Boulaftali Y., Lamrani L., Rouzaud M. C., Loyau S., Jandrot-Perrus M., Bouton M. C., Ho-Tin-Noé B. The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy, *Thromb. Haemost.*, 2012, Vol. 107, No. 5, pp. 962-71.
48. Laschke M.W., Vollmar B., Menger M.D. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue, *Eur. Cell. Mater.*, 2011, Vol. 22, pp. 147-64.
49. Wang H., Shi L., Qin J., Yousefi S., Li Y., Wang R.K. Multimodal optical imaging can reveal changes in microcirculation and tissue oxygenation during skin wound healing, *Lasers Surg. Med.*, 2014, Vol. 46, No. 6, pp. 470-8.
50. An L., Qin J., Wang R.K. Ultrahigh sensitive optical microangiography for in vivo imaging of microcirculations within human skin tissue beds, *Opt. Express.*, 2010, Vol. 18, No. 8, pp. 8220-8.
51. Struijker-Boudier H.A., Rosei A.E., Bruneval P., Camici P.G., Christ F., Henrion D., Lévy B.I., Pries A., Vanoverschelde J.L. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease, *Eur. Heart J.*, 2007, Vol. 28, pp. 2834-40.
52. Quondamatteo F. Skin and diabetes mellitus: what do we know? *Cell Tissue Res*, 2014, Vol. 355, No. 1, pp. 1-21.
53. Rossi M., Carpi A., Galetta F., Franzoni F., Santoro G. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed. Pharmacother.*, 2006, Vol. 60, No. 8, pp. 437-42.
54. Rui S., Cnen M., Tuchin V.V., Zhu D. Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing, *Biomedical Optics Express*, 2015, Vol. 6, No. 6, pp. 1977-89.
55. Galanzha E.I., Zharov V.P. Photoacoustic and photothermal cytometry for monitoring multiple blood rheology parameters in vivo, *Cytometry A*, 2011, Vol. 79, No. 10, pp. 746-57.
56. Khaksari K., Kirkpatrick S.J. Combined effects of scattering and adsorbion on laser speckle contrast imaging, *Journal of Biomedical optics*, 2016, Vol. 21, No. 7.
57. Tatsuo T., Toshiyo T., Ake Oberg P. *Biomedical TRANSDUCERS and INSTRUMENTS*. CRC Press LLC Publ., 1997. p. 137.
58. Benitez E., Sumpio B.J., Chin J., Sumpio B.E. Contemporary assessment of foot perfusion in patients with critical limb ischemia, *Seminars in vascular surgery*, 2014, Vol. 27, No. 1, pp. 3-15.
59. Galanzha E.I., Zharov V.P. Circulation Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo, *Cancers (Basel)*, 2013, Vol. 5, No. 4, pp. 1691-1738.
60. Erdi Y.E. Limits of Tumor Detectability in Nuclear Medicine and PET, *Mol Imaging Radionucl Ther*, 2012, Vol. 21, No. 1, pp. 23-28.

62. Tan W., Vinegoni C., Norman J.J., et al. Imaging cellular responses to mechanical stimuli within three-dimensional tissue constructs // *Microsc Res Tech.* – 2007. – Vol. 70, No. 4. – P. 361-71.
63. Liang X., Graf B.W., Boppart S.A. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography // *J Biophotonics.* – 2009. – Vol. 2, No. 11. – P. 643-55.
64. Tan W., Oldenburg A.L., Norman J.J., et al. Optical coherence tomography of cell dynamics in three-dimensional tissue models // *Opt Express.* – 2006. – Vol. 14, No. 16. – P. 7159-71.
65. Denk W., Strickler J., Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy // *Science.* – 1990. – Vol. 248, No. 4951. – P. 73-6.
66. Ulrich M., Lange-Asschenfeldt S. In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application // *Journal of Biomedical Optics.* – 2013. – Vol. 18, No. 6. – 061212.
67. Campagnola P.J., Loew L.M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms // *Nat Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, No. 11. – P. 1356-60.
68. Cheng J.X., Jia Y.K., Zheng G.F., Xie X.S. Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology // *Biophys J.* – 2002. – Vol. 83, No. 1. – P. 502-9.
69. Benati E., Bellini V., Borsari S., et al. Quantitative evaluation of healthy epidermis by means of multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy // *Skin Res Technol.* – 2011. – Vol. 17, No. 3. – P. 295-303.
70. van Munster E.B., Gadella T.W.J. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) // *Microscopy Techniques.* – 2005. – Vol. 95. – P. 143-75.
71. Breunig H.G., Studier H., Konig K. Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo // *Opt Express.* – 2010. – Vol. 18, No. 8. – P. 7857-71.
72. Ivanov A.P., Lojko V.A., Dik V.P. Light Transportation in Densely Packed Dispersive Media // *Nauka i Technika.* – 1988.
73. Chance B., Liu H., Kitai T., Zhang Y. Effects of soluteson optical properties of biological materials: models, cells and tissues // *Anal Biochem.* – 1995. – Vol. 227, No. 2. – P. 351-62.
74. Perera G., Hay R. A guide to antibiotic resistance in bacterial skin infections // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2005. – Vol. 19, No. 5. – P. 531-45.
75. Dever L.A., Dermody T.S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics // *Arch Intern Med.* – 1991. – Vol. 151, No. 5. – P. 886-95.
76. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation // *Journal of Biophotonics.* – 2010. – Vol. 3, No. 5-6. – P. 336-46.
61. Huang D., Swanson E., Lin C., Schuman J., Stinson W., Chang W., Hee M., Flotte T., Gregory K., Puliafito C., Fujimoto J.G. Optical coherence tomography, *Science*, 1991, Vol. 254, No. 5035, pp.1178-81.
62. Tan W., Vinegoni C., Norman J.J., Desai T.A., Boppart S.A. Imaging cellular responses to mechanical stimuli within three-dimensional tissue constructs, *Microsc Res Tech*, 2007, Vol. 70, No. 4, pp. 361-71.
63. Liang X., Graf B.W., Boppart S.A. Imaging engineered tissues using structural and functional optical coherence tomography, *J Biophotonics*, 2009, Vol. 2, No. 11, pp. 643-55.
64. Tan W., Oldenburg A.L., Norman J.J., Desai T.A., Boppart S.A. Optical coherence tomography of cell dynamics in three-dimensional tissue models, *Opt Express*, 2006, Vol. 14, No. 16, pp. 7159-71.
65. Denk W., Strickler J., Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science*, 1990, Vol. 248, No. 4951, pp. 73-6.
66. Ulrich M., Lange-Asschenfeldt S. In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application, *Journal of Biomedical Optics*, 2013, Vol. 18, No. 6, 061212.
67. Campagnola P.J., Loew L.M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms, *Nat Biotechnol*, 2003, Vol. 21, No. 11, pp. 1356-60.
68. Cheng J.X., Jia Y.K., Zheng G.F., Xie X.S. Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology, *Biophys J*, 2002, Vol. 83, No. 1, pp. 502-9.
69. Benati E., Bellini V., Borsari S., Dunsby C., Ferrari C., French P., Guanti M., Guardoli D., Koenig K., Pellacani G., Ponti G., Schianchi S., Talbot C., Seidenari S. Quantitative evaluation of healthy epidermis by means of multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy, *Skin Res Technol*, 2011, Vol. 17, No. 3, pp. 295-303.
70. van Munster E.B., Gadella T.W.J. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Microscopy Techniques*, 2005, Vol. 95, pp. 143-75.
71. Breunig H.G., Studier H., Konig K. Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo, *Opt Express*, 2010, Vol. 18, No. 8, pp. 7857-71.
72. Ivanov A.P., Lojko V.A., Dik V.P. Light Transportation in Densely Packed Dispersive Media, *Nauka i Technika*, 1988.
73. Chance B., Liu H., Kitai T., Zhang Y. Effects of soluteson optical properties of biological materials: models, cells and tissues, *Anal Biochem*, 1995, Vol. 227, No. 2, pp. 351-62.
74. Perera G., Hay R. A guide to antibiotic resistance in bacterial skin infections, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2005, Vol. 19, No. 5, pp. 531-45.
75. Dever L.A., Dermody T.S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics, *Arch Intern Med*, 1991, Vol. 151, No. 5, pp. 886-95.
76. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Konov V.I., Mamedov A.A., Kuzmin S.G., Lukyanets E.A. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation, *Journal of Biophotonics*, 2010, Vol. 3, No. 5-6, pp. 336-46.