

Лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия в диагностике тканевой гипоксии (обзор)

А. С. Бабкина^{1,2}

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Российский университет дружбы народов,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy in the Diagnosis of Tissue Hypoxia (Review)

Anastasiya S. Babkina^{1,2}

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia,
6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

Цель обзора — анализ опыта диагностики тканевой гипоксии методом лазер-индуцированной спектроскопии, а также выявление перспективных направлений и потенциальных возможностей данного метода для дальнейшего его применения в экспериментальной и клинической медицине.

В обзоре представили данные исследований интенсивности флуоресценции эндогенных молекул-флуорофоров (никотинадениндинуклеотида восстановленного, флавинадениндинуклеотида окисленного) как маркеров ишемического повреждения внутренних органов (мозга, сердца, печени, почек и др.). Рассмотрели принципы метода флуоресцентной лазер-индуцированной спектроскопии *in vivo*. Уделили внимание историческим аспектам темы. Показали результаты применения метода в экспериментальных и клинических исследованиях тканевой гипоксии и ишемии. Выявили трудности в интерпретации значений интенсивности аутофлуоресцентного сигнала исследуемых молекул. Отметили, что неизвестным остается период сохранения способности ткани к аутофлуоресценции в условиях длительной аноксии, отсутствуют систематизированные представления о влиянии экзогенных и эндогенных факторов на интенсивность аутофлуоресценции.

Сделали вывод, что применение метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии с целью диагностики тканевой ишемии является перспективным направлением в экспериментальной и клинической медицине, не исчерпавшим себя, и оставляющим ряд нерешенных вопросов, несмотря на большое количество исследований в данной области.

Ключевые слова: лазер-индуцированная флуоресценция; НАДН; ФАД; гипоксия; эндогенные флуорофоры; тканевая гипоксия; ишемия головного мозга

The aim of review is to discuss the results of studies on diagnosis of tissue hypoxia by laser-induced spectroscopy, as well as to identify promising trends and prospects of this technique for its further application in experimental and clinical medicine.

The review presents the findings of studies of the fluorescence intensity of endogenous fluorophore molecules (reduced nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized flavin adenine dinucleotide) as markers of ischemic injury of internal organs (brain, heart, liver, kidneys, etc.). The principles of fluorescence laser-induced spectroscopy *in vivo* are discussed. The historical aspects of the subject are also covered. The results of the use of the technique in experimental and clinical studies of tissue hypoxia and ischemia are shown. Difficulties in interpreting the intensity values of autofluorescent signal of the studied molecules are revealed. It was noted that the tissue autofluorescence in a long-term anoxia remains unknown, and there are no structured ideas about the impact of exogenous and endogenous factors on autofluorescence intensity.

In conclusion, the use of laser-induced fluorescence spectroscopy to diagnose tissue ischemia is a promising area of experimental and clinical medicine, which still has various unresolved issues, despite a large number of studies in this domain.

Keywords: laser-induced fluorescence; NADH; FAD; hypoxia; endogenous fluorophores; tissue hypoxia; brain ischemia

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-50-61

Адресс для корреспонденции:

Анастасия С. Бабкина
E-mail: asbabkina@gmail.com

Correspondence to:

Anastasiya S. Babkina
E-mail: asbabkina@gmail.com

Введение

Вопрос устойчивости ткани к гипоксии и аноксии является фундаментальной темой в медицине, имеющей мультидисциплинарное значение. Кислородное голодание является причиной нарушения тканевого метаболизма при кровопотере, нарушениях кровообращения, травматических повреждениях, острых отравлениях и при других критических состояниях [1–3]. Изучение механизмов гипоксии/аноксии как патологического процесса и современных способов ее диагностики представляет интерес для врачей любой специальности. Преимущества диагностики тканевой гипоксии *in situ* в экспериментальных моделях, а также в клинической медицине, заключающиеся в возможности интраоперационного мониторинга состояния органов и тканей, определения жизнеспособности ткани при нарушении кровообращения, а также трансплантируемой ткани обуславливает необходимость уделить большее внимание методам, позволяющим в реальном времени, *in situ* диагностировать тканевую гипоксию. Одним из таких методов является лазер-индуцированная аутофлуоресцентная спектроскопия.

Цель обзора литературы — анализ опыта диагностики тканевой гипоксии методом лазер-индуцированной спектроскопии, а также выявление перспективных направлений и потенциальных возможностей данного метода для дальнейшего его применения в экспериментальной и клинической медицине.

Теоретические основы метода аутофлуоресцентной спектроскопии. Метод аутофлуоресцентной спектроскопии основан на регистрации интенсивности флуоресценции эндогенных молекул-флуорофоров. Явление аутофлуоресценции заключается в испускании квантов света возбужденными в результате воздействия излучения с определенной длиной волны молекулами при переходе из метастабильного состояния, с более высокого энергетического уровня, в основное состояние, с наименьшей энергией [4, 5].

Наиболее важными для диагностики эндогенными тканевыми флуорофорами являются триптофан, коллаген, эластин, восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), а также его фосфат (НАДФН), флавины и флавопротенины (ФАД, ФМН), порфирины, бета-каротин. Пиримидиновые и флавиновые нуклеотиды, локализуемые в большей степени в митохондриях и в меньшей — в цитоплазме, являются одним из основных источников клеточной флуоресценции [6]. Участие данных соединений в широком спектре внутриклеточных процессов, таких как гликолиз, пентозный цикл, цикл Кребса, окисление жирных кислот, работа дыха-

Introduction

Tissue resistance to hypoxia and anoxia is a fundamental topic in medicine of a multidisciplinary significance. Oxygen starvation is the cause of tissue metabolism disorders in case of blood loss, blood circulation disorders, traumatic injuries, acute poisoning and other critical conditions [1–3]. Studying the mechanisms of hypoxia/anoxia as a pathological process and modern methods of its diagnosis attracts the attention of clinicians of any specialty. *In-situ* diagnosis of tissue hypoxia in experimental models, as well as in clinical medicine, offers a possibility of intraoperative monitoring of organs and tissues, tissue viability determination in circulatory failure after transplantation. Therefore, it is necessary to place more emphasis on methods that allow to diagnose tissue hypoxia *in situ* in real time. One of such methods is laser-induced autofluorescence spectroscopy.

The aim of this literature review is to examine the available data on diagnosing the tissue hypoxia by laser-induced spectroscopy, as well as to identify the promising directions and prospects of this technique for its further application in experimental and clinical medicine.

Fundamentals of autofluorescence spectroscopy. Autofluorescence spectroscopy is based on the detection of fluorescence intensity of endogenous fluorophore molecules. The phenomenon of autofluorescence consists in emitting quanta of light by molecules excited due to the effects of radiation with a specific long wavelength, when changing from a metastable state with a higher energy level to the basic state with the lowest energy [4, 5].

The most important diagnostic endogenous tissue fluorophores are tryptophan, collagen, elastin, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), as well as its phosphate (NADPH), flavins and flavoproteins (FAD, FMN), porphyrins, beta-carotene. Pyridine and flavin nucleotides, which are located to a greater extent in mitochondria and to a lesser extent in cytoplasm, are one of the main sources of cellular fluorescence [6]. They participate in a wide range of intracellular processes, such as glycolysis, pentose cycle, Krebs cycle, fatty acid oxidation, mitochondrial respiratory chain, and biosynthetic processes, and can be used as markers of cellular metabolism in normal and pathological processes [7–10]. The NADH coenzyme fluoresces only in the reduced form and the maximum excitation is registered on exposure to radiation with a wavelength of 340 nm, while the quantum fluorescence yield is greater if NADH is bound to the protein. Flavin nucleotides are only capable of fluorescence in oxidized form. The maximum excitation is registered on exposure to radiation with a wavelength of 450 nm [5, 7]. Based on

тельной цепи митохондрий, биосинтетические процессы, обуславливает возможность использования их в качестве маркеров клеточного метаболизма в норме и при патологических процессах [7–10]. Кофермент НАДН флуоресцирует только в восстановленной форме и максимум возбуждения регистрируется при воздействии излучения с длиной волны 340 нм, при этом квантовый выход флуоресценции больше, если НАДН связан с белком. Флавиновые нуклеотиды способны к флуоресценции только в окисленной форме. Максимум возбуждения регистрируется при воздействии излучения с длиной волны 450 нм. [5, 7] На основании различного квантового выхода этих коферментов в их окисленной и восстановленной формах может быть осуществлен мониторинг клеточно- и тканевого метаболизма [10–18].

История метода. С момента открытия оптических свойств восстановленного никотинамидадениндинуклеотида в 1950 году началось интенсивное исследование его как маркера митохондриальных функций. Основоположник данного направления Бриттон Чанс в результате своих многочисленных исследований как *in vitro*, так и *in vivo* доказал, что митохондриальная функция может быть оценена по редокс-состоянию НАДН. Основной вехой в истории исследования коферментов стало создание в 1954 году Б. Чансом двухлучевого спектрофотометра [19]. Спектрофотометрическим методом были впервые изучены метаболические состояния изолированных митохондрий в зависимости от субстрата, кислорода и уровня АДФ. В 1959 году Chance и Legallais разработали дифференциальный микрофлуориметр, что позволило исследовать коферменты не только в клеточных суспензиях, ультратонких образцах тканей, но и в тканях животных *in vivo*. В 1962 года появляются первые работы Chance et al., в которых мониторинг НАДН проводился в органах анестезированных крыс.

В 1971 году Jobsis и соавт. впервые применил данный метод на мозге нейрохирургических пациентов с фокальной эпилепсией *in vivo*. Была выявлена корреляция показателей НАДН с данными электрокортикографии при прямой кортикальной стимуляции контролируемой области. Полученные результаты оказались схожими с результатами предшествующего аналогичного экспериментального исследования [20].

Из-за трудностей интерпретации аутофлуоресценции ткани использование метода флуоресцентной спектроскопии получило широкое распространение в медицине только с использованием экзогенных флуорофоров. Однако, интерес к аутофлуоресцентной спектроскопии тканей *in vivo* доказан множеством работ, начиная с исследований Б. Чанса и соавт.

the different quantum yield of these coenzymes in oxidized and reduced forms, cellular and tissue metabolism can be monitored [10–18].

History of the method. Since the discovery of the optical properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide in 1950, it has been intensively studied as a marker of mitochondrial function. The founder of this area of research, Britton Chance, has proven through his numerous studies, both *in vitro* and *in vivo*, that mitochondrial function can be evaluated by the redox state of NADH. A major milestone in the history of coenzyme research was the creation of a two-beam spectrophotometer by B. Chance in 1954 [19]. Metabolic characteristics of isolated mitochondria as a function of substrate, oxygen and ADP level were studied for the first time by a spectrophotometry. In 1959, Chance and Legallais developed a differential microfluorimeter for studying coenzymes not only in cell suspensions and ultra-thin tissue samples, but also in animal tissues *in vivo*. In 1962, the first works by Chance et al. appeared, where monitoring of NADH was done on anesthetized rat organs.

In 1971, Jobsis et al. pioneered this method in the brain of neurosurgical patients with focal epilepsy *in vivo*. A correlation between NADH and electrocorticography data was found in direct cortical stimulation of the controlled areas. The obtained results were consistent with those of a previous similar experimental study [20].

Due to difficulties in interpreting the tissue autofluorescence, the use of fluorescence spectroscopy has become widespread in medicine only with the introduction of exogenous fluorophores. However, the interest in autofluorescence spectroscopy of tissues *in vivo* has been demonstrated by a number of studies ranging from the works of B. Chance et al. to modern Russian and foreign research dealing with the role of tissue autofluorescence in malignant neoplasms, neurodegenerative diseases, ischemia and reperfusion [21].

Diagnosing the ischaemic injury of internal organs by laser-induced fluorescence spectroscopy. The cells switch to anaerobic respiration as a result of hypoxia. Changes in the respiratory enzyme chain are initialized at the NADH-dependent site with a short-term increase in functioning, followed by suppression of this mitochondrial complex site. Lack of oxygen leads to the accumulation of reduced nicotinamide coenzyme (NADH), fluorescing in ultraviolet light, which makes it possible to use NADH as a marker of mitochondrial dysfunction caused by hypoxia/anoxia. Autofluorescence fading is observed with continued anoxia [22–24].

Since the problem of tissue viability assessment in the context of ischemia has remained to this day, it is still relevant to use techniques to determine the condition of cells in the ischemic area without special preparation of the tissue sample

и, заканчивая современными отечественными и зарубежными публикациями, посвященными изучению тканевой ауофлуоресценции в злокачественных новообразованиях, при нейродегенеративных заболеваниях, при ишемии и реперфузии [21].

Диагностика ишемического повреждения внутренних органов методом лазериндуцированной флуоресцентной спектроскопии. Следствием гипоксии является переход клеток на анаэробное дыхание. Изменение в цепи дыхательных ферментов инициализируется на НАДН-зависимом участке, что выражается в кратковременном усилении, а затем подавлением работы этого участка митохондриального комплекса. Отсутствие кислорода приводит к накоплению восстановленного никотинамидного кофермента (НАДН), флуоресцирующего в ультрафиолетовом свете, что позволяет использовать НАДН в качестве маркера митохондриальных дисфункций, вызванных гипоксией/аноксией. В условиях продолжающейся аноксии наблюдается угасание ауофлуоресценции [22–24].

Так как проблема оценки жизнеспособности тканей на фоне ишемии существует по сей день, сохраняется актуальность применения методов, позволяющих определить состояние клеток ишемизированного участка без специальной подготовки образца ткани и в режиме реального времени. К настоящему времени проведен ряд экспериментальных и клинических исследований по использованию лазериндуцированной флуоресцентной спектроскопии в нейро- и кардиохирургии, онкологии, гастроэнтерологии [25–30].

В самом начале внедрения метода в экспериментальную медицину С. Н. Barlow (1977) были проведены исследования флуоресценции НАДН в миокарде при коронарной окклюзии, в результате которых были выявлены изменения уже через 15 секунд от момента наложения лигатуры на коронарную артерию. В исследовании Ф. Н. Tomlinson было обнаружено, что ишемия мозга сопровождается увеличением флуоресценции НАДН на 150% через 15 минут после окклюзии сонной артерии [31].

Fitzgerald J. T. и соавт. показали в эксперименте эффективность лазерной ауофлуоресцентной визуализации в диагностике ишемического и реперфузионного повреждения почек *in vivo* и оценке их жизнеспособности после периода окклюзии почечных артерий [32]. Tirapelli L. F. и соавт. успешно использовали метод ауофлуоресцентной спектроскопии для исследования их реакции на длительную ишемию и реперфузию в эксперименте, а также выявили связь между интенсивностью флуоресценции почек при ишемическом и

and in real time. To date, a number of experimental and clinical studies on the use of laser-induced fluorescence spectroscopy in neuro- and cardiac surgery, oncology, gastroenterology has been carried out [25–30].

In the early days of the method implementation in experimental medicine, C. H. Barlow (1977) studied the fluorescence of NADH in myocardium during coronary occlusion and identified its changes after 15 seconds from the moment of coronary artery ligation. In the study by F. H. Tomlinson, brain ischemia was associated with a 150% increase in NADH fluorescence 15 minutes after carotid occlusion [31].

Fitzgerald J. T. et al. showed in their experiment the efficacy of laser autofluorescent imaging in the diagnosis of ischemic and reperfusion damage of the kidneys *in vivo* and assessment of their viability after a period of renal artery occlusion [32]. Tirapelli L. F. et al. successfully used autofluorescence spectroscopy to study the response to long-term ischemia and reperfusion in the experiment, and also found a correlation between the intensity of renal fluorescence in ischemic and reperfusion damage and histological signs of renal, as well as mitochondrial damage [33, 34]. Raman R. N. et al. suggested using multimodal autofluorescence spectroscopy to predict the post-transplantation kidney function [35].

The study of NAD(F)H and FAD as autofluorescent biomarkers of metabolic disturbances and liver and hepatocyte damage began in the 1950s. The purpose of later studies was to monitor the liver response to ischemia/reperfusion. Subsequently, fluorescent fatty acids, lipopigments, and collagen were characterized as optical biomarkers of liver steatosis and fibrosis [36, 37].

M. F. Lacour et al. demonstrated a correlation between the redox ratio (NADH/FAD) and other markers of hepatic injury on a 60-minute and 90-minute liver ischemia model with and without reperfusion [38].

Croce A. C. et al. studied the autofluorescence properties of bile and concluded that autofluorescence bile spectroscopy can provide additional information to assess changes in the liver metabolic activity balance [39].

Arutyunyan A. V. et al. demonstrated in an experiment the high efficacy of intraoperative use of the laser-induced fluorescence spectroscopy method for diagnostics of pancreas tissue necrosis *in situ* at acute pancreatitis [40].

Smelt M. J. et al. suggested using fluorescence of NADH and FAD coenzymes of pancreatic beta cells to determine their viability before transplantation [41].

M. V. Shinkin et al. have shown a high diagnostic significance of the laser-induced spectroscopy method in combination with laser doppler fluom-

реперфузионном повреждении с морфологическими признаками повреждения почки, а также с повреждением митохондрий [33, 34]. Raman R. N. и соавт. предложили использовать мультимодальную аутофлуоресцентную спектроскопию для прогнозирования посттрансплацционной функции почек [35].

Изучение НАД(Ф)Н и ФАД в качестве аутофлуоресцентных биомаркеров нарушения метаболизма и повреждений печени и гепатоцитов началось с 1950-х годов. Целью более поздних исследований стал мониторинг реакции печени на ишемию/реперфузию. Впоследствии, флуоресцентные жирные кислоты, липо пигменты и коллаген были охарактеризованы как оптические биомаркеры стеатоза печени, фиброза [36, 37].

М. F. La soug и соавт. на модели печеночной ишемии продолжительностью 60 и 90 минут с реперфузией и без нее выявили корреляцию редокс-отношения (НАДН/ФАД) с другими маркерами печеночного повреждения [38].

Сгосе А. С. и соавт. провели исследование аутофлуоресцентных свойств желчи и пришли к выводу, что аутофлуоресцентная спектроскопия желчи может предоставить дополнительную информацию для оценки изменений баланса метаболической активности печени [39].

Арутюнян А. В. и соавт. в эксперименте была продемонстрирована высокая эффективность интраоперационного использования метода лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии для диагностики некроза ткани поджелудочной железы *in situ* при остром панкреатите [40].

Smelt M. J. и соавт. предложили использовать флуоресценцию коферментов НАДН и ФАД бета-клеток поджелудочной железы для определения их жизнеспособности перед трансплантацией [41].

Шинкин М. В. и соавт. показали высокую диагностическую значимость метода лазерно-индуцированной спектроскопии в сочетании с ЛДФ в отношении раннего выявления нарушений тканевого метаболизма и оценки риска развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом второго типа [42].

Staniszewski K. и соавт. было проведено исследование интенсивности флуоресценции НАДН и ФАД изолированных перфузированных легких крыс при добавлении в перфузат ингибитора митохондриального комплекса I (НАДН-убихинон-оксидоредуктазы) — ротенона, ингибитора комплекса IV (цитохром С-оксидазы) — цианида калия и разобщителя тканевого дыхания — пентахлорфенола. Изменения метаболического состояния митохондрий в легких отражались на показателях интенсивности флуоресценции коферментов.

etry for the early detection of tissue metabolic disorders and the assessment of the risk of diabetic foot syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus [42].

Staniszewski K. et al. studied the intensity of NADH and FAD fluorescence of isolated perfused rat lungs after adding rotenon, mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone-oxidoreductase) inhibitor; potassium cyanide, complex IV inhibitor (C-oxidase cytochrome), and pentachlorophenol, tissue respiration inhibitor, into the perfusate. Changes in the metabolic state of mitochondria in the lungs affected the intensity of coenzyme fluorescence. The autofluorescence signal decreased after adding blood to the perfusate, but the redox ratio remained unchanged. This study demonstrated the sensitivity of coenzyme fluorescence intensity and redox ratio to changes in redox processes in mitochondria [43].

Diagnosis of cerebral ischemia. The diagnostic significance of brain autofluorescence became apparent from the findings of B. Chance's early studies. The first use of laser-induced fluorescence spectroscopy *in vivo* in the clinic was carried out on neurosurgical patients for a reason [20]. A number of studies have shown a correlation between changes in the fluorescence signals of the reduced NADH and the oxidized FAD and the functional activity of neuronal and glial mitochondria, intracellular concentration of calcium and its transmembrane transport of calcium in mitochondria [44–47].

Despite the experimentally and clinically proven applicability of the fluorescence intensity indexes of NADH and FAD coenzymes as biomarkers of ischemic brain damage [48–55], the method has some limitations associated with the difficulty of data interpretation. In the *in vitro* study, Kahraman S. et al. demonstrated differences in the fluorescence mechanisms of pyridine nucleotides in neural and glial cells. Persisting anoxia after the initial increase in NADH fluorescence in neurons was accompanied by its gradual decrease, which was not observed in astrocytes. There is also a need to differentiate the changes in the autofluorescence of NAD(P)H caused by metabolic disorders from the changes induced by the stimulation of local blood flow by the increased lactate production during ischemia [56].

Polesskaya O. et al. developed a technique based on the relationship between the intensity of endogenous fluorescence of NADH and partial oxygen pressure in the tissue, allowing to diagnose the microregional hypoxia of the murine cerebral cortex [57].

In the light of several studies, the NADH and FAD autofluorescence intensity indices serve as markers not only for hypoxic brain damage, but also for neoplastic and neurodegenerative processes. In 2017, Shi L. et al. in experimental studies showed the possibility of using NADH, FAD and

При добавлении крови в перфузат аутофлуоресцентный сигнал снижался, но редокс-отношение оставалось неизменным. Это исследование продемонстрировало чувствительность показателей интенсивности флуоресценции коферментов и редокс-отношения к изменениям окислительно-восстановительных процессов в митохондриях [43].

Диагностика ишемии головного мозга.

Диагностическая значимость аутофлуоресценции головного мозга стала очевидной из результатов первых работ Б. Чанса. Не случайно первое применение метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* в клинике было осуществлено на нейрохирургических пациентах [20]. В ряде исследований была показана взаимосвязь динамических изменений флуоресцентных сигналов восстановленной формы НАДН и окисленной формы ФАД с функциональной активностью митохондрий нейронов и глии, внутриклеточной концентрацией и процессами трансмембранного транспорта кальция в митохондриях [44–47].

Несмотря на доказанную экспериментальными и клиническими исследованиями возможность использования показателей интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД в качестве биомаркеров ишемического повреждения головного мозга [48–55], существуют ограничения метода, связанные с трудностью интерпретации данных. Kahraman S. и соавт. в исследовании *in vitro* были показаны различия механизмов флуоресценции пиридинового нуклеотида в нейрональных и глиальных клетках. При продолжающейся аноксии после увеличения флуоресценции НАДН в нейронах наблюдалось ее постепенное снижение, чего не было отмечено в астроцитах. А также возникает необходимость дифференцировать изменения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, вызванные нарушением метаболизма, с изменениями, спровоцированными стимуляцией локального кровотока увеличением продукции лактата при ишемии [56].

Polesskaya O. и соавт. был разработан метод, основанный на взаимосвязи между интенсивностью эндогенной флуоресценции НАДН и парциальным давлением кислорода в ткани, который позволил диагностировать микрорегиональную гипоксию коры головного мозга мыши [57].

Исходя из ряда исследований показатели интенсивности аутофлуоресценции НАДН и ФАД являются маркерами не только гипоксического повреждения головного мозга, но и опухолевых, а также нейродегенеративных процессов. В 2017 г Shi L. и соавт. в экспериментальном исследовании показали возможность использования аутофлуоресценции НАДН,

tryptophan autofluorescence for early diagnosis of Alzheimer's disease [58].

Pascu A. et al. have demonstrated that the comparative assessment of autofluorescence ranges of normal and neoplastic tissue helps to identify them.

The results of the experimental *in vitro* study led the authors to suggest using the fluorescence spectroscopy for the real-time assessment of neoplastic and adjacent normal tissue autofluorescence during surgery *in vivo* [59]. Zhu M. B. et al. supplemented the autofluorescence spectroscopy with optical coherence tomography, which increased the sensitivity of the tumor tissue identification from 86.1 to 95.9% [60].

Ibrahim B. A. et al. showed the effect of temperature on the fluorescence of NADH and FAD coenzymes in the rat cortex. An association between an increase in temperature and a decrease in FAD fluorescence was found [61].

A study by Reinert K. C. et al. showed that autofluorescence of cerebellar flavoproteins is related to inhibition and excitation processes [62].

The study of NADH and FAD coenzymes in ischemic brain damage not only proved the possibility of their use as damage and regeneration markers, but also gave rise to the development of drugs containing pyridine nucleotides which reduce the area of necrosis in the brain, improve the functional recovery, and reduce mortality in experimental animals after ischemic stroke [63].

Diagnosis of myocardial ischemia. Since autofluorescence spectroscopy of NADH and FAD coenzymes helps to evaluate tissue metabolism in real time, the use of this method for intraoperative cardiac monitoring is a promising aspect of clinical and experimental medicine.

Papayan G. et al. based on the results of studies of NADH and FAD coenzymes in ischemia-reperfusion of an isolated rat heart recommended this technique for intraoperative monitoring of myocardial metabolism during episodes of anoxia in patients who underwent cardiac surgery under cardiopulmonary bypass [64].

Lagarto J. L. et al. on the Langedorff isolated heart model revealed changes in FAD and NAD(P)H fluorescence associated with the glucose and oxygen depletion. Meanwhile, the coenzyme fluorescence intensity was more sensitive to changes in oxygen content in the perfusate than to changes in glucose level. The potential for using autofluorescence spectroscopy to estimate the content of type I collagen in the post-infarct period was demonstrated [65–67].

Despite the hypothetical background and the correlation between autofluorescence and rejection of the cardiac allograft found in experimental studies with rats, study on the use of laser-induced autofluorescence spectroscopy to assess the risk of

ФАД и триптофана для ранней диагностики болезни Альцгеймера [58].

Pascu A. и соавт. было продемонстрировано, что сравнение спектров аутофлуоресценции нормальной и опухолевой ткани головного мозга позволяет их идентифицировать. Результаты экспериментального исследования, проведенного *in vitro*, дало основание авторам высказать пожелание в дальнейшем использовать метод флуоресцентной спектроскопии для измерения аутофлуоресценции опухоли и прилегающей нормальной ткани *in vivo* в интраоперационных условиях в реальном времени [59]. Zhu M. B. соавт. дополнили аутофлуоресцентную спектроскопию оптической когерентной томографией, что увеличило чувствительность метода идентификации опухолевой ткани с 86,1 до 95,9% [60].

Ibrahim B. A. и соавт. было показано воздействие температуры на флуоресценцию коферментов НАДН и ФАД в коре головного мозга крыс. Была выявлена связь повышением температуры и снижением флуоресценции ФАД [61].

Исследование Reinert K.C. и соавт. показало взаимосвязь аутофлуоресценции флавопротеинов коры мозжечка с процессами торможения и возбуждения [62].

Изучение коферментов НАДН и ФАД при ишемическом повреждении головного мозга позволило не только доказать возможность их использования в качестве маркеров повреждения и регенерации, но и дать начало разработке препаратов, содержащих пиридиновые нуклеотиды, введение которых экспериментальным животным после ишемического инсульта снижает площадь некроза в головном мозге, улучшает функциональное восстановление и снижает смертность [63].

Диагностика ишемии миокарда. Так как аутофлуоресцентная спектроскопия коферментов НАДН и ФАД позволяет оценить тканевой метаболизм в режиме реального времени, использование данного метода с целью интраоперационного кардиомониторинга является перспективным направлением в клинической и экспериментальной медицине.

Papayan G. и соавт. в результате исследования коферментов НАДН, ФАД при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы рекомендовали данный метод для интраоперационного мониторинга метаболизма миокарда во время эпизодов аноксии у пациентов, перенесших кардиохирургическое вмешательство при искусственном кровообращении [64].

Lagarto J. L. и соавт. на модели изолированного сердца по Лангедорфу были выявлены изменения показателей флуоресценции ФАД и НАД(Ф)Н на фоне истощения глюкозы и кис-

cardiac transplant rejection done by Yamani M. et al. has not yielded positive results [68].

A number of papers deal with the use of this technique to control the condition of the myocardium in ischemia in cardioprotection. The study of NADH fluorescence changes in relation to the reperfusion period duration and type of cardioplegia conducted by T. Nishioka (1984) was among the earliest in this area. The incomplete recovery of coenzyme fluorescence level was explained by irreversible changes in myocardium [31]. Horvath et al. studied the changes of laser-induced NADH fluorescence in the myocardium during sequential occlusion and cold cardioprotection. Immediately after the occlusion, a rapid increase in the fluorescence of NADH was recorded over a period of less than 5 min, followed by a decline over the entire period of ischemia, which lasted for 2 hours. The FAD fluorescence patterns shown in this study was different: within 5 minutes after occlusion, there was a rapid decrease in fluorescence, followed by a slow decrease during 30 minutes, a steady level during 1 hour and a slow rise until the end of the study [69]. In a study by Aldakkak et al. (2009), the changes in NADH and FAD levels in myocardial ischemia induced by cardioplegia with hyperkalemic solution and lidocaine were evaluated. Different patterns of NADH changes with and without cardioplegia were demonstrated [70].

Camara A. K. and colleagues studied the cardioprotective effects of sevoflurane, warm reperfusion and hypothermia on the cold ischemia model in isolated guinea pig hearts, measuring metabolism using NADH and FAD levels. Ischemia caused a rapid increase in NADH and a decrease in FAD, which declined in 2 hours. Warm reperfusion resulted in a decrease in NADH and an increase in FAD. Sevoflurane attenuated changes in NADH and FAD and reduced the size of infarction [71].

Changes in the intensity of NADH and FAD autofluorescence in the myocardium during ischemia, reperfusion, in cardiomyopathy and cardioprotection found in a number of studies have made it possible to consider them as markers of myocardial ischemic injury [72–80].

Conclusion

The literature review shows that despite extensive research on this topic the interpretation of the auto-fluorescent signal intensity and the determination of the hypoxia/anoxia period are still open issues. Tissue autofluorescence has been studied quite well and explained theoretically only in the case of short-term ischemia. Studies on ischemia continuing for 60–90 minutes are rare, and they have provided no indication of tissue autofluorescence changes in complete lack of oxygen over the period of tissue death. Little attention has been

лорода. При этом интенсивность флуоресценции коферментов была более чувствительна к изменению содержания кислорода в перфузате, чем к изменению уровня глюкозы. Была показана возможность использования метода аутофлуоресцентной спектроскопии для оценки содержания коллагена I типа в постинфарктном периоде [65–67].

Несмотря на теоретические предпосылки и выявленную при проведении экспериментальных исследований на крысах корреляцию между аутофлуоресцентными показателями и отторжением аллотрансплантата сердца, использование лазер-индуцированной аутофлуоресцентной спектроскопии для оценки риска отторжения трансплантата сердца Yamani M. и соавт. не дало положительных результатов [68].

Ряд работ посвящен использованию рассматриваемого метода с целью контроля состояния миокарда при ишемии в условиях кардиопротекции. Исследование динамики флуоресценции НАДН в зависимости от длительности реперфузионного периода и типа кардиоплегии, проведенное T. Nishioka (1984), явилось одним из первых в данном направлении. Неполное восстановление уровня флуоресценции коферментов было объяснено наличием необратимых изменений в миокарде [31]. Horvath и соавт. была изучена динамика лазер-индуцированной флуоресценции НАДН в тканях миокарда при последовательной окклюзии и холодовой кардиопротекции. Сразу после окклюзии был зарегистрирован быстрый рост флуоресценции НАДН за время менее 5 мин с последующим спадом в течение всего периода ишемии, составившего 2 часа. Динамика флуоресценции ФАД, приведенная в данной работе, имела другой характер: в течение 5 минут после окклюзии наблюдался быстрый спад флуоресценции, затем медленный спад в течение 30 мин, стационарный уровень в течение 1 ч и медленный подъем до окончания исследования [69]. Aldakkak et al. В 2009 оценили динамику изменения уровней НАДН и ФАД при ишемии миокарда при использовании кардиоплегии гиперкалемическим раствором и лидокаином. В результате были показаны отличия в динамике НАДН при использовании кардиоплегии и без таковой [70].

Samara A. K. и соавт. провели исследование кардиопротективного действия севофлюрана, теплой реперфузии и гипотермии на модели холодовой ишемии изолированных сердец морских свинок, контролируя метаболизм по показателям НАДН и ФАД. Ишемия вызвала быстрое увеличение НАДН и уменьшение ФАД, которое уменьшилось за 2 часа. Теплая реперфузия привела к снижению НАДН

paid to the impact of cytotoxic hypoxia on tissue autofluorescence. Studies in these areas could reveal in detail the mechanisms of autofluorescence and identify the patterns of its changes in the attenuated tissue metabolic processes after biological death, which is essential for intensive care, transplantation and forensic medicine.

Acknowledgments

The author would like to express her sincere gratitude to professor A. M. Golubev, MD, PhD, DSci (V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology) for his help in writing this review and for his valuable comments.

и увеличению ФАД. Севофлюран ослаблял изменения НАДН и ФАД и уменьшал размер инфаркта [71].

Выявленные в исследованиях изменения показателей интенсивности аутофлуоресценции НАДН и ФАД в миокарде при ишемии, реперфузии, кардиомиопатиях, в условиях кардиопротекции позволяют рассматривать их в качестве маркеров ишемического повреждения миокарда [72–80].

Заключение

В результате проведенного обзора литературы можно утверждать, что несмотря на большое количество работ по данной теме, остаются открытыми вопросы интерпретации значений интенсивности аутофлуоресцентного сигнала, возможности определения периода гипоксии/аноксии. Аутофлуоресценция тканей достаточно хорошо изучена и объяснена теоретически только при кратковременной ишемии. Редко встречаются работы, в которых период ишемии достигал максимум 60–90 минут, но это не дает представления о том, как меняются аутофлуоресцентные свойства ткани при полном отсутствии кислорода с течением времени в процессе умирания ткани. Недостаточное внимание уделено изучению влияния цитотоксической гипоксии на аутофлуоресценцию тканей. Исследования по данным направлениям позволили бы не только подробно раскрыть механизмы явления аутофлуоресценции, но и выявить закономерности ее изменения при угасании метаболических процессов в тканях после биологической смерти, что имеет большое значение для реаниматологии, трансплантологии, судебной медицины.

Благодарность.

Автор искренне признателен д. м. н., профессору А. М. Голубеву (НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР) за помощь в написании обзора и сделанные ценные замечания.

Литература

1. *Абрамова Е.А., Военнов О.В., Бояринов Г.А., Трофимов А.О.* Церебральная циркуляция и метаболизм у пострадавших с черепно-мозговой травмой. *Общая реаниматология*. 2018; 14 (1): 4–11. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-4-11
2. *Рыжков И.А., Зарзешский Ю.В., Новодержкина И.С.* Сравнительные аспекты регуляции кожной и мозговой микроциркуляции при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (6): 18–27. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
3. *Бабкина А.С., Голубев А.М., Сундуков Д.В., Баширова А.Р., Голубев М.А.* Клозапин: механизмы токсичности и побочных эффектов. *Общая реаниматология*. 2018; 14 (2): 35–45. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. *Рогаткин Д.А.* Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии *in vivo*. *Медицинская физика* 2014; 4 (64): 78–96.
5. *Векшин Н.Л.* Флуоресцентная спектроскопия полимеров. Пути: Фотон-век; 2008. ISBN: 978-5-903789-07-8
6. *Monici M.* Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005; 11: 227–256. PMID: 16216779 DOI: 10.1016/S1387-2656 (05)11007-2
7. *Лукина М.М., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В.* Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор). *Современные технологии в медицине* 2016; 8 (4): 113–128. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16
8. *Danylyovych H.V.* Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
9. *Сясин Н.И., Борисова О.Н.* Аутофлуоресценция, клеточное дыхание и современные возможности его неинвазивного исследования (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал* 2014; 1. DOI 10.12737/3438
10. *Bartolomé F., Abramov A.Y.* Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. *Methods. Mol. Biol.* 2015; 1264: 263–720. PMID: 25631020 DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
11. *Blacker T.S., Duchon M.R.* Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100: 53–65. PMID: 27519271 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010
12. *Danylyovych H.V.* Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
13. *Croce A.C., Bottiroli G.* Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1560: 15–43. PMID: 28155143 DOI: 10.1007/978-1-4939-6788-9_2
14. *Kolenc O.I., Quinn K.P.* Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD (P)H and FAD. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (6): 875–889. PMID: 29268621 DOI: 10.1089/ars.2017.7451
15. *Plettenberg H.K., Hoffmann M.* Applications of autofluorescence for characterisation of biological systems (biomonitoring). *Biomed. Tech. (Berl)*. 2002; 47 (2): 596–597. PMID: 12465247 DOI: 10.1515/bmte.2002.47.s1b.596
16. *Chacko J.V., Eliceiri K.W.* Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
17. *Schaefer P.M., Kalinina S., Rueck A., von Arnim C.A.F., von Einem B.* NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 34–46. PMID: 30211978 DOI: 10.1002/cyto.a.23597
18. *Raghushaker C.R., Chandra S., Chakrabarty S., Kabekkodu S.P., Satyamoorthy K., Mahato K.K.* Detection of mitochondrial dysfunction *in vitro* by laser-induced autofluorescence. *J. Biophotonics.* 2019; 28: e201900056. PMID: 31251452 DOI: 10.1002/jbio.201900056
19. *Mayevsky A., Barbiro-Michaely E.* Shedding light on mitochondrial function by real time monitoring of NADH fluorescence: I. Basic methodology and animal studies. *J. Clin. Monit. Comput.* 2013; 27 (1): 1–34. PMID: 23203204 DOI: 10.1007/s10877-012-9414-5
20. *Mayevsky A., Rogatsky G.G.* Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239 DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
21. *Heikal A.A.* Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010; 4 (2): 241–263. DOI: 10.2217/bmm.10.1
22. *Shehada R.E., Marmarelis V.Z., Mansour H.N., Grundfest W.S.* Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000; 47 (3): 301–312. PMID: 10743771 DOI: 10.1109/10.827290
23. *Lu H.H., Wu Y.M., Chang W.T., Luo T., Yang Y.C., Cho H.D., Liao I.* Molecular imaging of ischemia and reperfusion *in vivo* with mitochondrial autofluorescence. *Anal. Chem.* 2014; 86 (10): 5024–5031. PMID: 24720791 DOI: 10.1021/ac5006469
24. *Hosseini L., Vafae M.S., Mahmoudi J., Badalzadeh R.* Nicotinamide adenine dinucleotide emerges as a therapeutic target in aging and ischemic conditions. *Biogerontology.* 2019; 20 (4): 381–395. PMID: 30838484 DOI: 10.1007/s10522-019-09805-6
25. *Aboumarzouk O., Valentine R., Buist R., Ahmad S., Nabi G., Eljamel S., Moseley H., Kata S.G.* Laser-induced autofluorescence spec-

References

1. *Abramova E.A., Voennov O.V., Boyarinov G.A., Trofimov A.O.* Cerebral Circulation and Metabolism of Patients with Cerebral Injury. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (1): 4–11. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-1-4-11
2. *Ryzhkov I.A., Zarzhetsky Y.V., Novodержкина I.S.* Comparative Aspects of the Regulation of Cutaneous and Cerebral Microcirculation During Acute Blood Loss. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology.* 2017; 13 (6): 18–27. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2017-6-18-27
3. *Babkina A.S., Golubev A.M., Sundukov D.V., Bashirova A.R., Golubev M.A.* Clozapine: Mechanisms of Toxicity and Side Effects. *Obshchaya reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (2): 35–45. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-2-35-45
4. *Rogatkin D.A.* Physical fundamentals of *in vivo* laser clinical fluorescence spectroscopy. *Meditinskaya fizika.* 2014; 4 (64): 78–96 [In Russ.]
5. *Vekshin N. L.* fluorescence spectroscopy of polymers. Pushchino: Photon-vek; 2008. [In Russ.] ISBN: 978-5-903789-07-8
6. *Monici M.* Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005; 11: 227–256. PMID: 16216779 DOI: 10.1016/S1387-2656 (05)11007-2
7. *Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagajnova E.V.* Metabolic imaging in the study of cancer processes (review). *Sovremennye tekhnologii v medicine* 2016; 8 (4): 113–128. [In Russ.] DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16
8. *Danylyovych H.V.* Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
9. *Syasin N.I., Borisova O.N.* Autofluorescence, cellular respiration and the modern possibilities of its non-invasive research (literature review). *Vestnik novyh medicinskih tekhnologij. Elektronnyj zhurnal* 2014; 1. [In Russ.] DOI 10.12737/3438
10. *Bartolomé F., Abramov A.Y.* Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. *Methods. Mol. Biol.* 2015; 1264: 263–720. PMID: 25631020 DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
11. *Blacker T.S., Duchon M.R.* Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 100: 53–65. PMID: 27519271 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010
12. *Danylyovych H.V.* Evaluation of functioning of mitochondrial electron transport chain with NADH and FAD autofluorescence. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 31–43. PMID: 29227076 DOI: 10.15407/ubj88.01.031
13. *Croce A.C., Bottiroli G.* Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1560: 15–43. PMID: 28155143 DOI: 10.1007/978-1-4939-6788-9_2
14. *Kolenc O.I., Quinn K.P.* Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD (P)H and FAD. *Antioxid. Redox Signal.* 2019; 30 (6): 875–889. PMID: 29268621 DOI: 10.1089/ars.2017.7451
15. *Plettenberg H.K., Hoffmann M.* Applications of autofluorescence for characterisation of biological systems (biomonitoring). *Biomed. Tech. (Berl)*. 2002; 47 (2): 596–597. PMID: 12465247 DOI: 10.1515/bmte.2002.47.s1b.596
16. *Chacko J.V., Eliceiri K.W.* Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
17. *Schaefer P.M., Kalinina S., Rueck A., von Arnim C.A.F., von Einem B.* NADH Autofluorescence-A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 34–46. PMID: 30211978 DOI: 10.1002/cyto.a.23597
18. *Raghushaker C.R., Chandra S., Chakrabarty S., Kabekkodu S.P., Satyamoorthy K., Mahato K.K.* Detection of mitochondrial dysfunction *in vitro* by laser-induced autofluorescence. *J. Biophotonics.* 2019; 28: e201900056. PMID: 31251452 DOI: 10.1002/jbio.201900056
19. *Mayevsky A., Barbiro-Michaely E.* Shedding light on mitochondrial function by real time monitoring of NADH fluorescence: I. Basic methodology and animal studies. *J. Clin. Monit. Comput.* 2013; 27 (1): 1–34. PMID: 23203204 DOI: 10.1007/s10877-012-9414-5
20. *Mayevsky A., Rogatsky G.G.* Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292 (2): 615–640. PMID: 16943239 DOI: 10.1152/ajpcell.00249.2006
21. *Heikal A.A.* Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark. Med.* 2010; 4 (2): 241–263. DOI: 10.2217/bmm.10.1
22. *Shehada R.E., Marmarelis V.Z., Mansour H.N., Grundfest W.S.* Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000; 47 (3): 301–312. PMID: 10743771 DOI: 10.1109/10.827290
23. *Lu H.H., Wu Y.M., Chang W.T., Luo T., Yang Y.C., Cho H.D., Liao I.* Molecular imaging of ischemia and reperfusion *in vivo* with mitochondrial autofluorescence. *Anal. Chem.* 2014; 86 (10): 5024–5031. PMID: 24720791 DOI: 10.1021/ac5006469
24. *Hosseini L., Vafae M.S., Mahmoudi J., Badalzadeh R.* Nicotinamide adenine dinucleotide emerges as a therapeutic target in aging and ischemic conditions. *Biogerontology.* 2019; 20 (4): 381–395. PMID: 30838484 DOI: 10.1007/s10522-019-09805-6
25. *Aboumarzouk O., Valentine R., Buist R., Ahmad S., Nabi G., Eljamel S., Moseley H., Kata S.G.* Laser-induced autofluorescence spectroscopy

- troscopy: can it be of importance in detection of bladder lesions? *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 2015; 12 (1): 76–83. PMID: 25560417 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.003
26. Iga N., Oto T., Okada M., Harada M., Nishikawa H., Miyoshi K., Otani S., Sugimoto S., Yamane M., Toyooka S., Miyoshi S. Detection of airway ischaemic damage after lung transplantation by using autofluorescence imaging bronchoscopy. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 45 (3): 509–513. PMID: 23999558 DOI: 10.1093/ejcts/ezt437
 27. Kretschmer S., Pieper M., Hüttmann G., Bölke T., Wollenberg B., Marsh L.M., Garn H., König P. Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways. *Lab. Invest.* 2016; 96 (8): 918–931. PMID: 27400364 PMID: PMC4972900 DOI: 10.1038/labinvest.2016.69
 28. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
 29. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 10451. PMID: 28874842 DOI: 10.1038/s41598-017-10856-3
 30. Li B.H., Xie S.S. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (25): 3931–3934. PMID: 15991296 DOI: 10.3748/wjg.v11.i25.3931
 31. Салмин В.В., Салмина А.Б., Фурсов А.А., Фролова О.В., Лалетин Д.И., Фурсов М.А., Юдин Г.В., Малиновская Н.А., Зыкова Л.Д., Проворова А.С. Использование флуоресцентной спектроскопии для оценки ишемического повреждения миокарда. *Journal of Siberian Federal University* 2011; 2 (4): 142–157
 32. Fitzgerald J.T., Michalopoulou A., Pivetti C.D., Raman R.N., Troppmann C., Demos S.G. Real-time assessment of in vivo renal ischemia using laser autofluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* 2005; 10 (4): 44018. PMID: 16178651 DOI: 10.1117/1.1993327
 33. Tirapelli L.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., Barione D.F., Tucci S. Jr., Suaid H.J., Cologna A.J., Martins A.C. Renal ischemia in rats: mitochondria function and laser autofluorescence. *Transplant. Proc.* 2008; 40 (5): 1679–1684. PMID: 18589172 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.081
 34. Tirapelli L.F., Trazzi B.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., da Costa M.M., Tucci S. Jr., Cologna A.J., Martins A.C. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24 (3): 397–404. PMID: 18581159 DOI: 10.1007/s10103-008-0578-74
 35. Raman R.N., Pivetti C.D., Ramsamooj R., Troppmann C., Demos S.G. Predictive assessment of kidney functional recovery following ischemic injury using optical spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2017; 22 (5): 56001. PMID: 28467536 DOI: 10.1117/1.JBO.22.5.056001
 36. Croce A.C., Ferrigno A., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology. *Liver Int.* 2018; 38 (7): 1160–1174. PMID: 29624848 DOI: 10.1111/liv.13753
 37. Nazeer S.S., Saraswathy A., Shenoy S.J., Jayasree R.S. Fluorescence spectroscopy as an efficient tool for staging the degree of liver fibrosis: an in vivo comparison with MRI. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 10967. PMID: 30030510 DOI: 10.1038/s41598-018-29370-1
 38. La Cour M.F., Mehrvar S., Kim J., Martin A., Zimmerman M.A., Hong J.C., Ranji M. Optical imaging for the assessment of hepatocyte metabolic state in ischemia and reperfusion injuries. *Biomed. Opt. Express.* 2017; 8 (10): 4419–4426. PMID: 29082074 DOI: 10.1364/BOE.8.004419
 39. Croce A.C., Ferrigno A., Santin G., Piccolini V.M., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation. *Lasers Surg. Med.* 2014; 46 (5): 412–421. PMID: 24619664 DOI: 10.1002/lsm.22241
 40. Арутюнян А.В., Черданцев Д.В., Салмин В.В., Скоморуха Д.П., Салмина А.Б. Интраоперационная лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия при экспериментальном панкреатите. *Сибирское медицинское обозрение* 2012; 77 (5): 20–24.
 41. Smelt M.J., Faas M.M., de Haan B.J., de Vos P. Pancreatic beta-cell purification by altering FAD and NAD (P)H metabolism. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 2008: 165360. PMID: 18670618 DOI: 10.1155/2008/165360
 42. Шинкин М.В., Звенигородская Л.А., Мкртумян А.М. Лазерная доплеровская флоуметрия и флуоресцентная спектроскопия как методы оценки доклинических проявлений синдрома диабетической стопы. *Эффективная фармакотерапия* 2018; 18: 6–12.
 43. Staniszeuski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann Biomed Eng.* 2013 Apr; 41 (4): 827–836. PMID: 23238793 PMID: PMC3606690 DOI: 10.1007/s10439-012-0716-z
 44. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M., Obaid A.L., Salzberg B.M. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208 (2): 113–124. PMID: 16645741 DOI: 10.1007/s00232-005-0824-x
 45. Reinert K.C., Dunbar R.L., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *J. Neurophysiol.* 2004; 92 (1): 199–211. PMID: 14985415 DOI: 10.1152/jn.01275.2003
 46. Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorimetry. *Brain Res.* 1984; 319 (1): 49–68. PMID: 6370376 DOI: 10.1016/0165-0173 (84)90029-8
 - copy: can it be of importance in detection of bladder lesions? *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 2015; 12 (1): 76–83. PMID: 25560417 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.003
 26. Iga N., Oto T., Okada M., Harada M., Nishikawa H., Miyoshi K., Otani S., Sugimoto S., Yamane M., Toyooka S., Miyoshi S. Detection of airway ischaemic damage after lung transplantation by using autofluorescence imaging bronchoscopy. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2014; 45 (3): 509–513. PMID: 23999558 DOI: 10.1093/ejcts/ezt437
 27. Kretschmer S., Pieper M., Hüttmann G., Bölke T., Wollenberg B., Marsh L.M., Garn H., König P. Autofluorescence multiphoton microscopy for visualization of tissue morphology and cellular dynamics in murine and human airways. *Lab. Invest.* 2016; 96 (8): 918–931. PMID: 27400364 PMID: PMC4972900 DOI: 10.1038/labinvest.2016.69
 28. Chacko J.V., Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. *Cytometry A.* 2019; 95 (1): 56–69. PMID: 30296355 DOI: 10.1002/cyto.a.23603
 29. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 10451. PMID: 28874842 DOI: 10.1038/s41598-017-10856-3
 30. Li B.H., Xie S.S. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (25): 3931–3934. PMID: 15991296 DOI: 10.3748/wjg.v11.i25.3931
 31. Salmin V.V., Salmina A.B., Fursov A.A., Frolova O.V., Laletin D.I., Fursov M.A., Yudin G.V., Malinovskaya N.A., Zykova L.D., Provorova A.S. The use of fluorescence spectroscopy to assess ischemic myocardial damage. *Journal of Siberian Federal University* 2011; 2 (4): 142–157 [In Russ.]
 32. Fitzgerald J.T., Michalopoulou A., Pivetti C.D., Raman R.N., Troppmann C., Demos S.G. Real-time assessment of in vivo renal ischemia using laser autofluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* 2005; 10 (4): 44018. PMID: 16178651 DOI: 10.1117/1.1993327
 33. Tirapelli L.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., Barione D.F., Tucci S. Jr., Suaid H.J., Cologna A.J., Martins A.C. Renal ischemia in rats: mitochondria function and laser autofluorescence. *Transplant. Proc.* 2008; 40 (5): 1679–1684. PMID: 18589172 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.02.081
 34. Tirapelli L.F., Trazzi B.F., Bagnato V.S., Tirapelli D.P., Kurachi C., da Costa M.M., Tucci S. Jr., Cologna A.J., Martins A.C. Histopathology and laser autofluorescence of ischemic kidneys of rats. *Lasers Med. Sci.* 2009; 24 (3): 397–404. PMID: 18581159 DOI: 10.1007/s10103-008-0578-74
 35. Raman R.N., Pivetti C.D., Ramsamooj R., Troppmann C., Demos S.G. Predictive assessment of kidney functional recovery following ischemic injury using optical spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 2017; 22 (5): 56001. PMID: 28467536 DOI: 10.1117/1.JBO.22.5.056001
 36. Croce A.C., Ferrigno A., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology. *Liver Int.* 2018; 38 (7): 1160–1174. PMID: 29624848 DOI: 10.1111/liv.13753
 37. Nazeer S.S., Saraswathy A., Shenoy S.J., Jayasree R.S. Fluorescence spectroscopy as an efficient tool for staging the degree of liver fibrosis: an in vivo comparison with MRI. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 10967. PMID: 30030510 DOI: 10.1038/s41598-018-29370-1
 38. La Cour M.F., Mehrvar S., Kim J., Martin A., Zimmerman M.A., Hong J.C., Ranji M. Optical imaging for the assessment of hepatocyte metabolic state in ischemia and reperfusion injuries. *Biomed. Opt. Express.* 2017; 8 (10): 4419–4426. PMID: 29082074 DOI: 10.1364/BOE.8.004419
 39. Croce A.C., Ferrigno A., Santin G., Piccolini V.M., Bottirollo G., Vairetti M. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation. *Lasers Surg. Med.* 2014; 46 (5): 412–421. PMID: 24619664 DOI: 10.1002/lsm.22241
 40. Арутюнян А.В., Черданцев Д.В., Салмин В.В., Скоморуха Д.П., Салмина А.Б. Интраоперационная лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия при экспериментальном панкреатите. *Сибирское медицинское обозрение* 2012; 77 (5): 20–24 [In Russ.]
 41. Smelt M.J., Faas M.M., de Haan B.J., de Vos P. Pancreatic beta-cell purification by altering FAD and NAD (P)H metabolism. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 2008: 165360. PMID: 18670618 DOI: 10.1155/2008/165360
 42. Shinkin M.V., Zvenigorodskaya L.A., Mkrtyumyan A.M. Laser Doppler flowmetry and fluorescence spectroscopy as methods for assessing the preclinical manifestations of diabetic foot syndrome. *Effektivnaya farmakoterapiya* 2018; 18: 6–12 [In Russ.]
 43. Staniszeuski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann Biomed Eng.* 2013 Apr; 41 (4): 827–836. PMID: 23238793 PMID: PMC3606690 DOI: 10.1007/s10439-012-0716-z
 44. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M., Obaid A.L., Salzberg B.M. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208 (2): 113–124. PMID: 16645741 DOI: 10.1007/s00232-005-0824-x
 45. Reinert K.C., Dunbar R.L., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *J. Neurophysiol.* 2004; 92 (1): 199–211. PMID: 14985415 DOI: 10.1152/jn.01275.2003
 46. Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorimetry. *Brain Res.* 1984; 319 (1): 49–68. PMID: 6370376 DOI: 10.1016/0165-0173 (84)90029-8

47. Салмина А.Б., Салмин В.В., Фролова О.В., Лалетин Д.И., Фурсов М.А., Скоморуха Д.П., Фурсов А.А., Кондрашов М.А., Медведева Н.Н., Малиновская Н.А., Манторова Н.С. Лазер-индуцированная аутофлуоресценция для оценки метаболизма и гемодинамики головного мозга. *Клиническая неврология* 2011; 5 (3): 32–38.
48. Yaseen M.A., Srinivasan V.J., Gorczynska I., Fujimoto J.G., Boas D.A., Sakadžić S. Multimodal optical imaging system for in vivo investigation of cerebral oxygen delivery and energy metabolism. *Biomed Opt. Express*. 2015; 6 (12): 4994–5007. PMID: 26713212 DOI: 10.1364/BOE.6.004994
49. Ivanov A., Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics*. 2011; 3: 9. PMID: 22232599 DOI: 10.3389/fnene.2011.00009
50. Yaseen M.A., Sakadžić S., Wu W., Becker W., Kasischke K.A., Boas D.A. In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH. *Biomed Opt. Express*. 2013; 4 (2): 307–321. PMID: 23412419 DOI: 10.1364/BOE.4.000307
51. Ten V., Galkin A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. *Mol. Cell Neurosci*. 2019; 100: 103408. PMID: 31494262 DOI: 10.1016/j.mcn.2019.103408
52. Sahni P.V., Zhang J., Sosunov S., Galkin A., Niatsetsckaya Z., Starkov A., Brookes P.S., Ten V.S. Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Pediatr. Res*. 2018; 83 (2): 491–497. PMID: 29211056 DOI: 10.1038/pr.2017.277
53. Stuntz E., Gong Y., Sood D., Liaudanskaya V., Pouli D., Quinn K.P., Alonzo C., Liu Z., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Endogenous Two-Photon Excited Fluorescence Imaging Characterizes Neuron and Astrocyte Metabolic Responses to Manganese. *Toxicity. Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 1041. PMID: 28432298 DOI: 10.1038/s41598-017-01015-9
54. Yanagawa Y., Osanai H., Tateno T. Transcranial flavoprotein-autofluorescence imaging of sound-evoked responses in the mouse auditory cortex under three types of anesthesia. *Neurosci. Lett*. 2016; 633: 189–195. PMID: 27641319 DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.021
55. Yaseen M.A., Sutin J., Wu W., Fu B., Uhlirova H., Devor A., Boas D.A., Sakadžić S. Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism *in vivo*. *Biomed. Opt. Express*. 2017; 8 (5): 2368–2385. PMID: 28663879 DOI: 10.1364/BOE.8.002368
56. Kahraman S., Fiskum G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. *Neurochem. Res*. 2007; 32 (4–5): 799–806. PMID: 17191134 DOI: 10.1007/s11064-006-9206-8
57. Polesskaya O., Sun A., Salahura G., Silva J.N., Dewhurst S., Kasischke K. Detection of microregional hypoxia in mouse cerebral cortex by two-photon imaging of endogenous NADH fluorescence. *J. Vis. Exp*. 2012; (60), pii: 3466. DOI: 10.3791/3466
58. Shi L., Lu L., Harvey G., Harvey T., Rodríguez-Contreras A., Alfano R.R. Label-free fluorescence spectroscopy for detecting key biomolecules in brain tissue from a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 2599. DOI: 10.1038/s41598-017-02673-5
59. Pascu A., Romanitan M.O., Delgado J.M., Danaila L., Pascu M.L. Laser-induced autofluorescence measurements on brain tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2009; 292 (12): 2013–2022. PMID: 19943354 DOI: 10.1002/ar.21034
60. Zhu M., Chang W., Jing L., Fan Y., Liang P., Zhang X., Wang G., Liao H. Dual-modality optical diagnosis for precise in vivo identification of tumors in neurosurgery. *Theranostics*. 2019; 9 (10): 2827–2842. PMID: 31244926 DOI: 10.7150/thno.33823
61. Ibrahim B.A., Wang H., Lesicko A.M.H., Buccì B., Paul K., Llano D.A. Effect of temperature on FAD and NADH-derived signals and neuro-metabolic coupling in the mouse auditory and motor cortex. *Pflugers. Arch*. 2017 Dec.; 469 (12): 1631–1649. PMID: 28785802 DOI: 10.1007/s00424-017-2037-4
62. Reinert K.C., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex *in vivo*. *J. Neurosci Res*. 2007; 85 (15): 3221–3232. PMID: 17520745 DOI: 10.1002/jnr.21348
63. Huang Q., Sun M., Li M., Zhang D., Han F., Wu J.C., Fukunaga K., Chen Z., Qin Z.H. Combination of NAD+ and NADPH Offers Greater Neuroprotection in Ischemic Stroke Models by Relieving Metabolic Stress. *Mol. Neurobiol*. 2018; 55 (7): 6063–6075. PMID: 29164394 DOI: 10.1007/s12035-017-0809-7
64. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2014; 11 (3): 400–408. PMID: 24854770 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
65. Lagarto J.L., Dyer B.T., Peters N.S., French P.M.W., Dunsby C., Lyon A.R. In vivo label-free optical monitoring of structural and metabolic remodeling of myocardium following infarction. *Biomed. Opt. Express*. 2019; 10 (7): 3506–3521. DOI: 10.1364/BOE.10.003506
66. Lagarto J.L., Dyer B.T., Talbot C.B., Peters N.S., French P.M.W., Lyon A.R., Dunsby C. Characterization of NAD (P)H and FAD autofluorescence signatures in a Langendorff isolated-perfused rat heart model. *Biomed Opt. Express*. 2018; 9 (10): 4961–4978. DOI: 10.1364/BOE.9.004961
67. Lagarto J., Dyer B.T., Talbot C., Sikkil M.B., Peters N.S., French P.M., Lyon A.R., Dunsby C. Application of time-resolved autofluorescence to label-free *in vivo* optical mapping of changes in tissue matrix and
47. Salmina A.B., Salmin V.V., Frolova O.V., Laletin D.I., Fursov M.A., Skomoroha D.P., Fursov A.A., Kondrashov M.A., Medvedeva N.N., Malinovskaya N.A., Mantorova N.S. Laser-induced autofluorescence to evaluate brain metabolism and hemodynamics. *Klinicheskaya neurologiya* 2011; 5 (3): 32–38 [In Russ.]
48. Yaseen M.A., Srinivasan V.J., Gorczynska I., Fujimoto J.G., Boas D.A., Sakadžić S. Multimodal optical imaging system for in vivo investigation of cerebral oxygen delivery and energy metabolism. *Biomed Opt. Express*. 2015; 6 (12): 4994–5007. PMID: 26713212 DOI: 10.1364/BOE.6.004994
49. Ivanov A., Zilberter Y. Critical state of energy metabolism in brain slices: the principal role of oxygen delivery and energy substrates in shaping neuronal activity. *Front Neuroenergetics*. 2011; 3: 9. PMID: 22232599 DOI: 10.3389/fnene.2011.00009
50. Yaseen M.A., Sakadžić S., Wu W., Becker W., Kasischke K.A., Boas D.A. In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH. *Biomed Opt. Express*. 2013; 4 (2): 307–321. PMID: 23412419 DOI: 10.1364/BOE.4.000307
51. Ten V., Galkin A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. *Mol. Cell Neurosci*. 2019; 100: 103408. PMID: 31494262 DOI: 10.1016/j.mcn.2019.103408
52. Sahni P.V., Zhang J., Sosunov S., Galkin A., Niatsetsckaya Z., Starkov A., Brookes P.S., Ten V.S. Krebs cycle metabolites and preferential succinate oxidation following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *Pediatr. Res*. 2018; 83 (2): 491–497. PMID: 29211056 DOI: 10.1038/pr.2017.277
53. Stuntz E., Gong Y., Sood D., Liaudanskaya V., Pouli D., Quinn K.P., Alonzo C., Liu Z., Kaplan D.L., Georgakoudi I. Endogenous Two-Photon Excited Fluorescence Imaging Characterizes Neuron and Astrocyte Metabolic Responses to Manganese. *Toxicity. Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 1041. PMID: 28432298 DOI: 10.1038/s41598-017-01015-9
54. Yanagawa Y., Osanai H., Tateno T. Transcranial flavoprotein-autofluorescence imaging of sound-evoked responses in the mouse auditory cortex under three types of anesthesia. *Neurosci. Lett*. 2016; 633: 189–195. PMID: 27641319 DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.021
55. Yaseen M.A., Sutin J., Wu W., Fu B., Uhlirova H., Devor A., Boas D.A., Sakadžić S. Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism *in vivo*. *Biomed. Opt. Express*. 2017; 8 (5): 2368–2385. PMID: 28663879 DOI: 10.1364/BOE.8.002368
56. Kahraman S., Fiskum G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. *Neurochem. Res*. 2007; 32 (4–5): 799–806. PMID: 17191134 DOI: 10.1007/s11064-006-9206-8
57. Polesskaya O., Sun A., Salahura G., Silva J.N., Dewhurst S., Kasischke K. Detection of microregional hypoxia in mouse cerebral cortex by two-photon imaging of endogenous NADH fluorescence. *J. Vis. Exp*. 2012; (60), pii: 3466. DOI: 10.3791/3466
58. Shi L., Lu L., Harvey G., Harvey T., Rodríguez-Contreras A., Alfano R.R. Label-free fluorescence spectroscopy for detecting key biomolecules in brain tissue from a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep*. 2017; 7 (1): 2599. DOI: 10.1038/s41598-017-02673-5
59. Pascu A., Romanitan M.O., Delgado J.M., Danaila L., Pascu M.L. Laser-induced autofluorescence measurements on brain tissues. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2009; 292 (12): 2013–2022. PMID: 19943354 DOI: 10.1002/ar.21034
60. Zhu M., Chang W., Jing L., Fan Y., Liang P., Zhang X., Wang G., Liao H. Dual-modality optical diagnosis for precise in vivo identification of tumors in neurosurgery. *Theranostics*. 2019; 9 (10): 2827–2842. PMID: 31244926 DOI: 10.7150/thno.33823
61. Ibrahim B.A., Wang H., Lesicko A.M.H., Buccì B., Paul K., Llano D.A. Effect of temperature on FAD and NADH-derived signals and neuro-metabolic coupling in the mouse auditory and motor cortex. *Pflugers. Arch*. 2017 Dec.; 469 (12): 1631–1649. PMID: 28785802 DOI: 10.1007/s00424-017-2037-4
62. Reinert K.C., Gao W., Chen G., Ebner T.J. Flavoprotein autofluorescence imaging in the cerebellar cortex *in vivo*. *J. Neurosci Res*. 2007; 85 (15): 3221–3232. PMID: 17520745 DOI: 10.1002/jnr.21348
63. Huang Q., Sun M., Li M., Zhang D., Han F., Wu J.C., Fukunaga K., Chen Z., Qin Z.H. Combination of NAD+ and NADPH Offers Greater Neuroprotection in Ischemic Stroke Models by Relieving Metabolic Stress. *Mol. Neurobiol*. 2018; 55 (7): 6063–6075. PMID: 29164394 DOI: 10.1007/s12035-017-0809-7
64. Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M. Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2014; 11 (3): 400–408. PMID: 24854770 DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
65. Lagarto J.L., Dyer B.T., Peters N.S., French P.M.W., Dunsby C., Lyon A.R. In vivo label-free optical monitoring of structural and metabolic remodeling of myocardium following infarction. *Biomed. Opt. Express*. 2019; 10 (7): 3506–3521. DOI: 10.1364/BOE.10.003506
66. Lagarto J.L., Dyer B.T., Talbot C.B., Peters N.S., French P.M.W., Lyon A.R., Dunsby C. Characterization of NAD (P)H and FAD autofluorescence signatures in a Langendorff isolated-perfused rat heart model. *Biomed Opt. Express*. 2018; 9 (10): 4961–4978. DOI: 10.1364/BOE.9.004961
67. Lagarto J., Dyer B.T., Talbot C., Sikkil M.B., Peters N.S., French P.M., Lyon A.R., Dunsby C. Application of time-resolved autofluorescence to label-free *in vivo* optical mapping of changes in tissue matrix and

- metabolism associated with myocardial infarction and heart failure. *Biomed. Opt. Express*. 2015; 6 (2): 324–346. PMID: 25780727 DOI: 10.1364/BOE.6.000324
68. Yamani M.H., van de Poll S.W., Ratliff N.B., Kuban B.E., Starling R.C., McCarthy P.M., Young J.B. Fluorescence spectroscopy of endomyocardial tissue post-human heart transplantation: does it correlate with histopathology? *J. Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (11): 1077–1080. DOI: 10.1016/s1053-2498 (00)00161-3
 69. Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1994; 107 (1): 220–225. PMID: 8283889
 70. Aldakkak M., Stowe D.F., Lesnefsky E.J., Heisner J.S., Chen Q., Camara A.K. Modulation of mitochondrial bioenergetics in the isolated Guinea pig beating heart by potassium and lidocaine cardioplegia: implications for cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2009; 54 (4): 298–309. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181b2b842
 71. Ranji M., Motlagh M.M., Salehpour F., Sepehr R., Heisner J.S., Dash R.K., Camara A.K. Optical Cryoimaging Reveals a Heterogeneous Distribution of Mitochondrial Redox State in *ex vivo* Guinea Pig Hearts and Its Alteration During Ischemia and Reperfusion. *IEEE J. Transl. Eng. Health Med*. 2016; 4: 1800210. PMID: 27574574 DOI: 10.1109/JTEHM.2016.2570219
 72. Wengrowski A.M., Kuzmiak-Glancy S., Jaimes R., Kay M.W. NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2014; 306 (4): H529–537. PMID: 24337462 DOI: 10.1152/ajpheart.00696.2013
 73. Taylor D., Bhandari S., Seymour A.M. Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2015; 308 (6): F579–587. DOI: 10.1152/ajprenal.00442.2014
 74. La Cour M.F., Mehrvar S., Heisner J.S., Motlagh M.M., Medhora M., Ranji M., Camara A.K. Optical metabolic imaging of irradiated rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Opt*. 2018; 23 (1): 1–9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.1.016011
 75. Stowe D.F., Gadicherla A.K., Zhou Y., Aldakkak M., Cheng Q., Kwok W.M., Jiang M.T., Heisner J.S., Yang M., Camara A.K. Protection against cardiac injury by small Ca (2+)-sensitive K (+) channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828 (2): 427–442. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.031
 76. Wüst R.C., Helmes M., Stienen G.J. Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity. *J. Physiol*. 2015; 593 (8): 1829–1840. PMID: 25640645 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.286153
 77. Xu Z.H., Zhang Z.X., Wang J., Li Z., Liu X.L. Research on the autofluorescence spectroscopy of heart tissues. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2009; 29 (6): 1651–1655. PMID: 19810552
 78. Murphy T.H. Two-Photon Imaging of Neuronal Structural Plasticity in Mice during and after Ischemia. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2015; 2015 (6): 548–557. PMID: 26034310 DOI: 10.1101/pdb.prot087486
 79. Hershberger K.A., Martin A.S., Hirschey M.D. Role of NAD+ and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol*. 2017; 13 (4): 213–225. PMID: 28163307 DOI: 10.1038/nrneph.2017.5
 80. Akbar N., Sokolovski S., Dunaev A., Belch J.J., Rafailov E., Khan F. In vivo noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice. *J. Microsc*. 2014; 255 (1): 42–48. PMID: 24811729 DOI: 10.1111/jmi.12135
 - metabolism associated with myocardial infarction and heart failure. *Biomed. Opt. Express*. 2015; 6 (2): 324–346. PMID: 25780727 DOI: 10.1364/BOE.6.000324
 68. Yamani M.H., van de Poll S.W., Ratliff N.B., Kuban B.E., Starling R.C., McCarthy P.M., Young J.B. Fluorescence spectroscopy of endomyocardial tissue post-human heart transplantation: does it correlate with histopathology? *J. Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (11): 1077–1080. DOI: 10.1016/s1053-2498 (00)00161-3
 69. Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1994; 107 (1): 220–225. PMID: 8283889
 70. Aldakkak M., Stowe D.F., Lesnefsky E.J., Heisner J.S., Chen Q., Camara A.K. Modulation of mitochondrial bioenergetics in the isolated Guinea pig beating heart by potassium and lidocaine cardioplegia: implications for cardioprotection. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2009; 54 (4): 298–309. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181b2b842
 71. Ranji M., Motlagh M.M., Salehpour F., Sepehr R., Heisner J.S., Dash R.K., Camara A.K. Optical Cryoimaging Reveals a Heterogeneous Distribution of Mitochondrial Redox State in *ex vivo* Guinea Pig Hearts and Its Alteration During Ischemia and Reperfusion. *IEEE J. Transl. Eng. Health Med*. 2016; 4: 1800210. PMID: 27574574 DOI: 10.1109/JTEHM.2016.2570219
 72. Wengrowski A.M., Kuzmiak-Glancy S., Jaimes R., Kay M.W. NADH changes during hypoxia, ischemia, and increased work differ between isolated heart preparations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2014; 306 (4): H529–537. PMID: 24337462 DOI: 10.1152/ajpheart.00696.2013
 73. Taylor D., Bhandari S., Seymour A.M. Mitochondrial dysfunction in uremic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2015; 308 (6): F579–587. DOI: 10.1152/ajprenal.00442.2014
 74. La Cour M.F., Mehrvar S., Heisner J.S., Motlagh M.M., Medhora M., Ranji M., Camara A.K. Optical metabolic imaging of irradiated rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury. *J. Biomed. Opt*. 2018; 23 (1): 1–9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.1.016011
 75. Stowe D.F., Gadicherla A.K., Zhou Y., Aldakkak M., Cheng Q., Kwok W.M., Jiang M.T., Heisner J.S., Yang M., Camara A.K. Protection against cardiac injury by small Ca (2+)-sensitive K (+) channels identified in guinea pig cardiac inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1828 (2): 427–442. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.031
 76. Wüst R.C., Helmes M., Stienen G.J. Rapid changes in NADH and flavin autofluorescence in rat cardiac trabeculae reveal large mitochondrial complex II reserve capacity. *J. Physiol*. 2015; 593 (8): 1829–1840. PMID: 25640645 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.286153
 77. Xu Z.H., Zhang Z.X., Wang J., Li Z., Liu X.L. Research on the autofluorescence spectroscopy of heart tissues. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2009; 29 (6): 1651–1655. PMID: 19810552
 78. Murphy T.H. Two-Photon Imaging of Neuronal Structural Plasticity in Mice during and after Ischemia. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2015; 2015 (6): 548–557. PMID: 26034310 DOI: 10.1101/pdb.prot087486
 79. Hershberger K.A., Martin A.S., Hirschey M.D. Role of NAD+ and mitochondrial sirtuins in cardiac and renal diseases. *Nat. Rev. Nephrol*. 2017; 13 (4): 213–225. PMID: 28163307 DOI: 10.1038/nrneph.2017.5
 80. Akbar N., Sokolovski S., Dunaev A., Belch J.J., Rafailov E., Khan F. In vivo noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice. *J. Microsc*. 2014; 255 (1): 42–48. PMID: 24811729 DOI: 10.1111/jmi.12135

Поступила 10.09.19

Received 10.09.19