dermatologie_5_06 3.10.2006 9:29 Str. 277
proLékaře.cz | 13.2.2026

Čes.-slov. Derm. 81, 2006, No. 5, p. 277–281

Fluorescenčné spektrá ako možný marker procesu hojenia rany *in vivo* – Experimentálna štúdia

Mokrý M.[1], Gál P.[1], Novotný M.[1], Kušnír J.[2], Dubayová K.[2], Sabo J.[1]

[1]Ústav lekárskej biofyziky, Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
prednosta doc. RNDr. Ján Sabo, CSc.
[2]Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie,
Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
prednosta prof. Ing. Juraj Guzy, CSc.

Súhrn

Fluorescenčné spektrá ako možný marker procesu hojenia rany *in vivo* – Experimentálna štúdia

Koža, podobne ako každé tkanivo v organizme, má pevný set fluorofórov. Zmena metabolizmu, ku ktorej počas procesu hojenia dochádza, je zákonite sprevádzaná zmenou zostavy fluorofórov a tým aj zmenou vo fluorescenčných spektrách. Cieľom práce bolo zistiť, či fluorescenčná spektroskopia môže byť využitá na monitorovanie procesu hojenia kožných rán.

V experimente boli použité samice potkana Sprague-Dawley (n = 14). V aseptických podmienkach boli na chrbtoch laboratórnych zvierat prevedené 2 rovnobežné symetrické kožné incízie, ktoré boli následne zošité. Merania synchrónnych fluorescenčných spektier z rán boli uskutočňované pomocou luminiscenčného spektrofluorimetra LS 55 (Perkin-Elmer) v 24hodinových intervaloch počas prvých troch dní hojenia.

U synchrónnych fluorescenčných spektier pre $\Delta\lambda_1$ = 30 nm, $\Delta\lambda_2$ = 60 nm a $\Delta\lambda_3$ = 90 nm bol zaznamenaný štatisticky relevantný nárast intenzity fluorescencie pri excitačných vrcholoch 350 nm, 365 nm, 390 nm a 450 nm.

Práca predstavuje dôkaz možnosti popísať zápalovú fázu procesu hojenia akútnej experimentálnej kožnej rany pomocou fluorescenčnej spektroskopie *in vivo*. Pre jej možné praktické použitie bude však potrebné uskutočniť podrobnú klinickú štúdiu.

Kľúčové slová: **spektrálna fluorescencia – hojenie rany – synchrónne fluorescenčné spektrá – intenzita fluorescencie – diagnostika**

Summary

Fluorescence Spectra as a Possible Marker of the Wound Healing *in vivo* – Experimental Study

Each tissue in organism, including the skin, has a specific set of fluorophores. Metabolic changes during the healing process are related to changes in the configuration of fluorophores as well as fluorescent spectra. The aim of this study was to find out if the fluorescence spectroscopy could be used for wound healing monitoring.

Female Sprague-Dawley rats (n = 14) were used in this experiment. Two parallel full thicknes skin incisions were done on the back of each experimental animal and immediately sutured under aseptic conditions. Synchronous fluorescent spectra of skin wounds were measured using the luminiscent spectrometer LS 55 (Perkin-Elmer) in 24 hour intervals during the first three days of healing.

In synchronous fluorescent spectra for $\Delta\lambda_1$ = 30 nm, $\Delta\lambda_2$ = 60 nm a $\Delta\lambda_3$ = 90 nm in excitation maxima 350 nm, 365 nm and 450 nm the statistically significant increase of fluorescence intesity was registered.

This study proves the possibility how to describe the inflammatory phase of acute skin wound healing using the fluorescence spectroscopy *in vivo*. However, further detailed experimental and clinical studies are needed before we can apply these results into the clinical practice.

Key words: **spectral fluorescence – wound healing – synchronous fluorescence spectra – diagnosis**

proLékaře.cz | 13.2.2026

ÚVOD

Fluorescenčná spektroskopia je rýchla a neinvazívna optická metóda, pomocou ktorej je možné sledovať biochemické a morfologické vlastnosti tkanív. V súčasnosti je možné pomocou tejto metódy diagnostikovať mnohé kožné choroby, prípadne prekancerózne stavy niektorých orgánov (napr. krčka maternice, hrubého čreva, mliečnej žľazy alebo bronchov) (14, 16, 19, 24). Táto diagnostika je často presnejšia a citlivejšia ako štandardné metódy, pričom záťaž na pacienta je vzhľadom na neinvazívnosť a rýchlosť merania minimálna (7). V každom tkanive sa nachádzajú molekuly, ktoré dokážu pohltiť svetlo určitej vlnovej dĺžky a emitovať svetlo s vyššou vlnovou dĺžkou a nižšou energiu – prirodzené fluoroféry. Tieto látky sú v tkanive zodpovedné za vznik fluorescencie. Medzi najbežnejšie fluoroféry nachádzajúce sa v živých systémoch patria: tryptofán, tyrozín, kolagén, elastín, FAD, NADH, fosfolipidy, lipofuscín, vitamíny B_6, B_{12}, A, D, K, a mnoho iných (15, 22). Hojenie rany je v prvých dňoch nesmierne dynamický proces, počas ktorého sa v rane mení zostava fluorofórov (5, 13, 23, 25). Taktiež sa mení prostredie, v ktorom sa nachádzajú a mení sa aj tvar rany (4), čo má zákonite vplyv na výsledné fluorescenčné spektrá (15). Hiss a kol. uvádzajú, že intenzita fluorescencie histologických rezov rán stúpa úmerne s časom, ktorý uplynul od okamihu, kedy bola incízia vykonaná (6). Túto metódu je možné používať v klinickej praxi iba obmedzene a samotná diagnostika je spojená so závažným zásahom do integrity organizmu.

Vývoj rýchlej, exaktnej a neinvazívnej metódy, nezávislej na skúsenostiach lekára hodnotiaceho proces hojenia rany, schopnej odhaliť už prvé náznaky patologického hojenia ešte predtým, ako nastanú viditeľné zmeny zaznamenateľné ľudským okom, by bol prínosom najmä pre rizikových pacientov, medzi ktorých patria pacienti s diabetes mellitus, ikterickí, uremickí a onkologickí pacienti, stavy spojené s malnutríciou, imunosuprimovaní jedinci a mnoho iných (1, 2, 3, 9, 10, 11). Z našich autorov použil podobnú metodiku (namiesto fluorescenčnej spektroskopie však bola použitá remitenčná spektroskopia) Resl a kol. pri hodnotení hojenia chronických vredov predkolenia (17, 18, 19, 20). Cieľom našej práce bolo aplikovať metódu spektrálneho fluorescenčného skenovania povrchov na objektívne posúdenie hojenia povrchových rán a hľadať parametre fluorescenčných spektier, ktoré sa v závislosti od fázy hojenia menia a pokúsiť sa túto zmenu kvantifikovať. Na úspešné splnenie tohto cieľa bolo potrebné upraviť optosondu luminiscenčného spektrofluorimetra tak, aby bolo možné presne nastaviť vzdialenosť zakončenia svetlovodných vlákien od povrchu rany, nájsť vhodné druhy fluorescenčných spektier a štandardizovať postupy meraní.

METÓDY

Do súboru boli zaradené samice potkanov Sprague-Dawley (n=14) vo veku 8–9 mesiacov, s hmotnosťou 270–310 g. Anestézia pred operáciou pozostávala z kombinácie ketamínu (Calypsol, Gedeon Richter Ltd., Hungary) v dávke 30 mg/kg, xylazínu (Rometar a.u.v., Spofa ČR) v dávke 10 mg/kg a tramadolu (Tramadol-K, Krka, d.d. Novo mesto, Slovenia) v dávke 5 mg/kg, ako premedikácia bol podávaný atropín (Atropin, Biotika SR) v dávke 0,05 mg/kg i.m.. Počas merania boli zvieratá sedované pomocou xylazínu (Rometar a.u.v., Spofa ČR) v dávke 10 mg/kg.

Chrbty zvierat boli 24 hodín pred operačným výkonom depilované pomocou sulfidu bárnatého. Po uvedení zvierat do celkovej anestézie, dezinfekcii operačného poľa a zarúškovaní, boli na chrbte každého zvieraťa uskutočnené dve 2 centimetrové rovnobežné symetrické kožné incízie, jedna vpravo a jedna vľavo od chrbtice. Incízie boli následne zošité každá dvomi intradermálnymi sutúrami. Ako šijací materiál bol použitý Chiraflon 5/0 (Chirmax a.s., ČR).

Prvé meranie bolo uskutočnené 24 hodín po výkone. Ďalšie boli vykonaná v 24 hodinových intervaloch počas prvých troch dní hojenia. Na meranie fluorescenčných spektier z povrchu rany medzi dvomi stehmi bol použitý luminiscenčný spektrofluorimeter LS 55 (Perkin-Elmer) vybavený optickými vláknami prepúšťajúcimi vlnové dĺžky od 260 nm vyššie, ktoré boli špeciálne upravené na meranie fluorescenčných spektier z povrchov tkanív. Zakončenie optických vlákien bolo vybavené modifikovanou sondou, umožňujúcou pohodlnú manipuláciu. Polohovacie zariadenie vedenia sondy, ktoré umožnilo presné nasmerovanie sondy kolmo nad incíziu a taktiež presné nastavenie vzdialenosti sondy od incízie (sonda sa rany nedotýkala), bolo skonštruované špeciálne pre uvedený účel (8). Tieto faktory zabezpečovali opakovateľnosť meraní. Výstupom meraní na uvedenom zariadení bol graf synchrónneho fluorescenčného spektra (intenzita fluorescencie bola uvádzaná v relatívnych bezrozmerných číslach). V experimente boli vyhodnocované tri synchrónne spektrá, $\Delta\lambda_1$ = 30 nm, $\Delta\lambda_2$ = 60 nm a $\Delta\lambda_3$ = 90 nm. Tieto druhy spektier boli zvolené preto, lebo rozdiel medzi excitačnou a emisnou vlnovou dĺžkou väčšiny významných fluorofórov nachádzajúcich sa v koži leží práve v tejto oblasti.

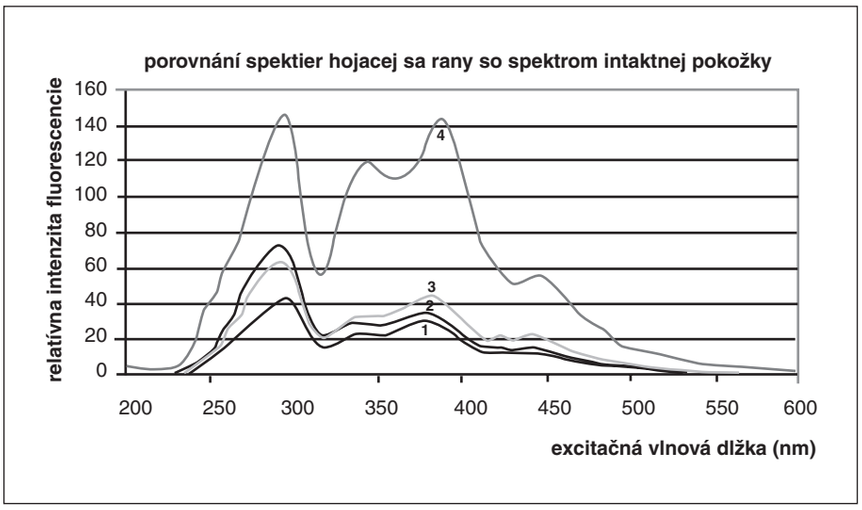
Vyhodnocovaná bola zmena intenzity fluorescencie píkov (výška píkov) počas hojenia pri excitačnej vlnovej dĺžke 350 nm, 390 nm, 450 nm (pre $\Delta\lambda_1$ = 30 nm, $\Delta\lambda_2$ = 60 nm) a 395 nm (pre $\Delta\lambda_3$ = 90 nm). Údaje boli štatisticky vyhodnocované Studentovým t-testom pomocou programu Statistica Cz 6.1 (Statsoft USA, Inc.). Za štatisticky významné boli považované hodnoty pre $p < 0,05$.

dermatologie_5_06 3.10.2006 9:29 Str. 279
proLékaře.cz | 13.2.2026

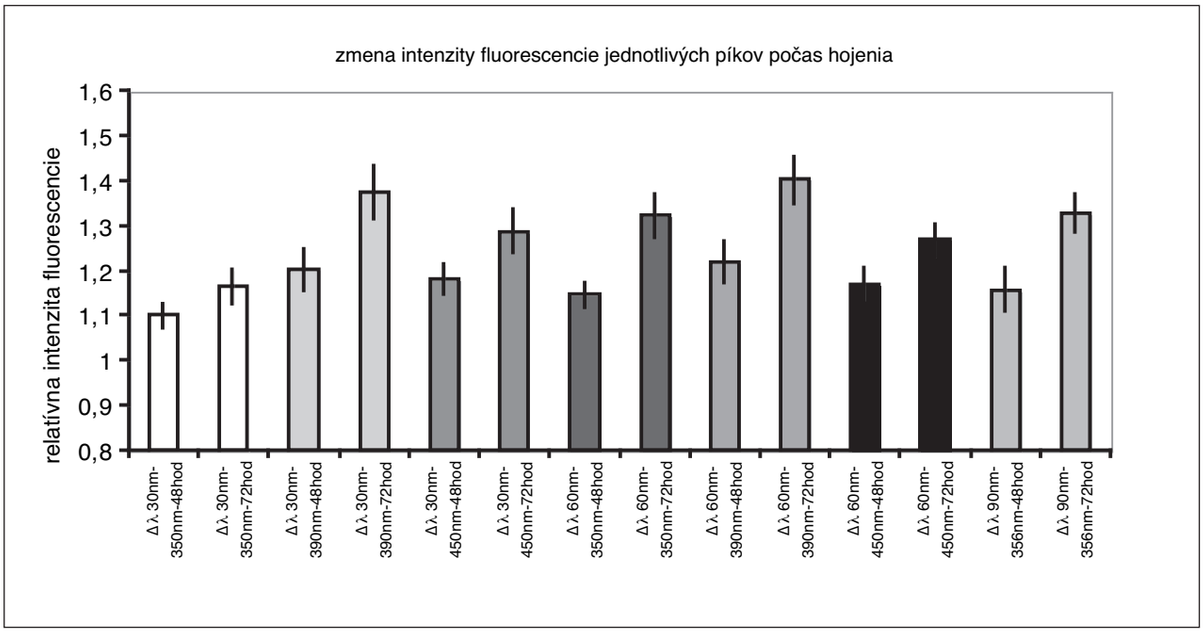
VÝSLEDKY

Intenzita fluorescencie v synchrónnych spektrách nameraných počas experimentu bola výrazne nižšia, ako intenzita fluorescencie intaktnej pokožky. Predpokladáme preto, že úmerne s časom bude narastať aj intenzita fluorescencie kožných incízií, pretože počas procesu hojenia sa organizmus snaží dostať do východiskového stavu, a preto aj intenzita fluorescenčných spektier bude počas procesu hojenia stúpať (obr. 1). Pri porovnaní synchrónnych spektier rán a zdravej pokožky neboli zistené žiadne nové excitačné vrcholy. V rane sa teda pravdepodobne nachádza ten istý set fluorofórov, ako v intaktnej pokožke, menia sa len ich vzájomné pomery. Taktiež dochádza ku zmene optických vlastností meraného materiálu.

Pri vyhodnocovaní zmeny relatívnych intenzít fluorescencie jednotlivých vrcholov bolo zistené, v súlade s naším predpokladom, že v niektorých časových intervaloch dochádza k štatisticky signifikantnému nárastu intenzity fluorescencie u vybraných píkov (obr. 2, tab. 1).



Obr. 1. Tri synchrónne fluorescenčné spektrá rany merané v 24-hodinových intervaloch v porovnaní so synchrónnym fluorescenčným spektrom intaktnej pokožky. Merané pre Δλ = 60 nm (1 – 24 hodín po operácii; 2 – 48 hodín po operácii; 3 – 72 hodín po operácii; 4 – intaktná pokožka. Podobne sa správajú aj parametre spektier merané pri Δλ = 30 nm a Δλ = 90 nm.



Obr. 2. Jednotlivé hodnoty sú kvôli značnej variabilite normalizované na hodnotu nameranú po 24 hodinách (intenzita fluorescencie po 24 hodinách = 1). Vo všetkých prípadoch bol zaznamenaný nárast intenzity fluorescencie počas prvých 72 hodín od začiatku hojenia.

proLékaře.cz | 13.2.2026

Tab. 1. Nárast relatívnej intenzity fluorescencie vo vybraných vrcholoch

Vrchol		Štatistická významnosť nárastu medzi 1 a 2 meraním	Štatistická významnosť nárastu medzi 2 a 3 meraním	Hlavný zdroj fluorescencie
$\Delta\lambda_1$ = 30 nm	350 nm	p<0,01	p<0,01	NAD(P)H, kolagén
	390 nm	p<0,05	p<0,001	NAD(P)H, kolagén
	450 nm	p<0,01	p<0,01	FAD, fosfolipidy
$\Delta\lambda_2$ = 60 nm	350 nm	p<0,001	p<0,01	NAD(P)H, kolagén
	390 nm	p<0,001	p<0,01	NAD(P)H ,kolagén
	450 nm	p<0,001	p<0,01	FAD, fosfolipidy
$\Delta\lambda_3$ = 90 nm	365 nm	p<0,05	p<0,01	NAD(P)H, kolagén

DISKUSIA

Zistili sme, že počas prvých 72 hodín hojenia dochádza k postupnému nárastu intenzity fluorescencie pri charakteristických vlnových dĺžkach. Túto fázu hojenia rany možno považovať za najdynamickejšiu a najdôležitejšiu z hľadiska prognózy. V tejto fáze dochádza k najvýraznejším morfologickým a biochemickým zmenám (5, 25). Intenzita fluorescencie synchrónnych spektier nameraných počas experimentu bola nižšia, ako intenzita fluorescencie intaktnej pokožky. Počas procesu hojenia sa intenzita fluorescenčných spektier kožnej incízie približuje k intenzite fluorescenčných spektier intaktnej pokožky. Dá sa predpokladať, že po hypotetickom zhojení rany *ad integrum* by intenzita fluorescencie dosiahla, spolu s ostatnými parametrami fluorescenčných spektier, hodnoty veľmi blízke fluorescenčným spektrám intaktnej pokožky. Otvorenou otázkou ostáva, do akej miery sa budú kvôli vzniknutým jazvám spektrá zahojenej rany a intaktnej pokožky zhodovať, keďže dermis sa hojí reparáciou (regeneráciou sa hojí len epidermis).

Podarilo sa potvrdiť, že fluorescenčná spektroskopia je metóda, pomocou ktorej je možné neinvazívne monitorovať proces hojenia *in vivo*, podobne ako je už v súčasnosti možné pomocou fluorescencie monitorovať nádorový rast alebo starnutie (12, 16, 24). Výsledky uvedenej práce sú analogické s výsledkami štúdie, ktorú publikoval Hiss a kol., s tým rozdielom, že naša metóda získavania fluorescenčných spektier je neinvazívna a rýchla (6).

Práca predstavuje dôkaz možnosti popísať zápalovú fázu procesu hojenia akútnej experimentálnej kožnej rany pomocou zvolených parametrov fluorescenčných spektier in vivo. Na uplatnenie spektrofluorimetrických metód v klinickej praxi bude potrebné exaktne interpretovať zmeny v spektrách a uskutočniť podrobnú klinickú štúdiu, v ktorej sa porovná presnosť a spoľahlivosť metódy s inými spôsobmi vyhodnocovania hojenia rán. Taktiež bude nevyhnutné zhodnotiť vplyv anestetík, síranu bárnatého a betadínu na výsledné fluorescenčné spektrá.

LITERATÚRA

1. ARMSTRONG, CP., DIXON, JM., DUFFY, SW., ELTON, RA., DAVIES, GC. Wound healing in obstructive jaundice. *Br J Surg*, 1984, 71(2), p. 267–270.
2. DEGRAAF, PW., ZWAVELING, A. The influence of intravenous hyperalimentation (IVH) on wound healing in tumor-bearing rats. *J Surg Oncol*, 1982, 24(4), p. 332–337.
3. GOODSON, WH., LINDENFELD, SM., OMACHI, RS., HUNT, TK. Chronic uremia causes poor healing. *Surg Forum*, 1982, 33(1), p. 54–56.
4. GABBIANI, G., HIRSCHEL, BJ., RYAN, GB., STATKOV, PR., MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ; a study of structure and function. *J Exp Med*, 1972, 135(4), p. 719–734.
5. HEPPENSTALL, RB., HUNT, TK. PINES, E., ROVEE, D. *Soft and hard tissue repair: biological and clinical aspects*. New York: Praeger, 1984. 865 p.
6. HISS, J., HIRSHBERG, A., DAYAN, DF., BUBIS, JJ., WOLMAN, M. Aging of wound healing in an experimental model in mice. *Am J Forensic Med Pathol*, 1988, 9(4), p. 310–312.
7. MITCHELL, MF., CANTOR, SB., RAMANUJAM, N., TORTOLERO-LUNA, G., RICHARDS-KORTUM, R. Fluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol*, 1999, 93(3), p. 462–470.
8. MOKRÝ, M., KUŠNÍR, J., GÁL, P., DUBAYOVA, K., SYNEK, M., SABO, J. Modification of the optical probe of the luminiscent spectrometer Perkin-Elmer LS 55 for skin surfaces fluorescence spectra measurement. *Chem Listy*, 2005, 99(9), s. 653–656.
9. MOUSLEY, M. Diabetes and its effect on wound healing and patient care. *Nurs Times*, 2003, 99(42), p. 73–74.
10. MOWAT, A., BAUM, J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1971, 284(12), p. 621–627.
11. MULLEN, JL., GERTNER, MH., BUZBY, GP., GOODHART, GL., ROSATO EF. Implications of malnutrition in the surgical patient. *Arch Surg*, 1979, 114(2), p. 121–125.
12. Na, R., Stender, IM., Henriksen, M., Wulf, HC. Autofluorescence of human skin is age-related after correction for skin pigmentation and redness. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(4), p. 536–540.
13. ORDMAN, LJ., GILLMAN, T. Studies in the healing of cutaneous wounds. I. The healing of incisions through the skin of pigs. *Arch Surg*, 1966, 93(6), p. 857–882.
14. PALMER, GM., KEELY, PJ., BRESLIN, TM., RAMANU-

dermatologie_5_06 3.10.2006 9:29 Str. 281
proLékaře.cz | 13.2.2026

JAM, N. Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines. *Photochem Photobiol*, 2003, 78(5), p. 462–469.
15. RAMANUJAM, N. *Fluorescence spectroscopy in vivo*. In MAYERS, R.A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chinester: John Wiley, 2000, p. 20–56.
16. RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, 2000, 2(1), p. 89–117.
17. RESL, V. Remitent spectrophotometry in diagnostic and valuation of healing. *Australas J Dermatol*, 1997, 38, Suppl 2., p. 257.
18. RESL, V. Spectrophotometrical evaluation of the progress in leg ulcer healing .Wound Healing Forum, Vienna, 1996, p. 26–27.
19. RESL, V., CETKOVSKÁ, P., FIRKLE, T. Fluorescence a biolominiscence kůže. *Čes-Slov Derm*, 2002, 77(5), p. 221–226.
20. RESL, V., PRŮCHA, J., CETKOVSKA, P., FIRKLE, T. Kožní spektrofotometr s kontinuálním spektrem. *Čes-Slov Derm*, 2002, 77(3), p. 125–130.
21. RESL, V., TOMANOVÁ, J., PRŮCHA, J. Objektivizace hojení vředů remitenční spektrofotometrií. *Plzeň Lék Sborn*, 1996, Suppl. 70, s. 151–154.
22. RICHARDS-KORTUM, R., SEVICK-MURACA, E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem*, 1999, 47(1), p. 555–605.
23. ROSS, R., BENDITT, EP. Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 11(3), p. 677–700.
24. SOKOLOV, K., FOLLEN, M., RICHARDS-KORTUM, R. Optical spectroscopy for detection of neoplasia. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6(5), p. 651–658.
25. VIDINSKÝ, B., GÁL, P., LAKYOVÁ, L., TOPORCER, T., ŠPAKOVÁ, T., RYBÁR, D., KILÍK, R., SABO, J., LONGAUER, F. Histomorphological study of the rat skin wound healing. Lojda Symposium on Progress in Basic Applied and Diagnostic Histochemistry, Košice, Programme and Abstracts, 2004, 41, p. 9.

Došlo do redakce 7. 9. 2005

Doc. RNDr. Jan Sabo, CSc.
Ústav lekárskej biofyziky
Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika
Trieda SNP 1
040 11 Košice, SR
e-mail: mmokry@upjs.sk

Vyhlášení vítězů nejlepších publikací Česko-slovenské dermatologie v roce 2005

Na slavnostním zahájení II. kongresu slovenských a českých dermatovenerologů v Bratislavě byli dne 15. 6. 2006 vyhlášeni vítězové nejlepších publikací roku 2005. Poradní sbor České akademie dermatovenerologie, složený z přednostů a školských zástupců přednostů všech dermatologických klinik v ČR a SR, vybral nejlepší práce ve třech kategoriích. Jejich první autoři byli odměněni díky sponzorské podpoře firmy Hermal, a to částkou 20 000,- Kč pro každou kategorii. Vítězi se staly kolegyně:

Přehledné články – Prim. MUDr. Ivana Krajsová, MBA (1. LF UK Praha)
Původní práce – Doc. MUDr. Eliška Dastychová, CSc. (MU Brno)
Kazuistická sdělení – As. MUDr. Denisa Kacerovská (LF Plzeň)

Dále prezident kongresu pan docent MUDr. Danilla, CSc., vylosoval výherce, který obdržel, opět od firmy Hermal, odměnu ve výši 3000, Kč, za odeslání vyplněného dotazníku s vědomostním testem v průběhu roku 2005. Vítězkou se stala paní MUDr. Helena Němečková ze Žatce.

Všem výhercům blahopřejeme a těšíme se na nové vítěze 81. ročníku!

Děkujeme firmě Hermal za sponzorství těchto cen.

Vaši šéfredaktoři