

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ  
«МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
КЛИНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. М.Ф. ВЛАДИМИРСКОГО»**

*На правах рукописи*

**ЧУРСИНОВА**

**Юлия Владимировна**

**ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЕ РУБЦЫ КОЖИ: РОЛЬ МАРКЕРОВ  
ВОСПАЛЕНИЯ И ГИПОКСИИ  
(клинико - экспериментальное исследование)**

**14.01.17 - хирургия**

**Диссертация**

**на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Зулькарнаев Алексей Батыргараевич**

**Научный консультант:  
кандидат медицинских наук, доцент  
Куликов Дмитрий Александрович**

**Москва – 2020 г.**

**Оглавление**

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ И ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА (обзор литературы)	13
1.1. Фиброз как актуальная медицинская проблема	13
1.2. Послеоперационные рубцы как фибропролиферативные заболевания кожи	16
1.3. Патофизиологический континуум фиброза, воспаления и гипоксии	25
1.4. Методы дифференциальной диагностики преобладающего патологического процесса при заживлении кожных ран	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА И КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Схема эксперимента	39
2.2. Лабораторные животные	42
2.3. Пациенты	43
2.4. Методы исследования	43
2.4.1. Оптические измерения	44
2.4.2. Гистологические и иммунофлюоресцентные исследования	48
2.4.3 Иммунохимические исследования	51
2.5. Методы статистического анализа полученных данных	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА БЛЕОМИЦИН- ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА КОЖИ	53
3.1 Результаты гистологических исследований	53
3.2. Результаты иммунофлюоресцентных исследований	64
3.3. Результаты иммунохимических исследований	68
3.4. Особенности макроскопической картины фиброза кожи	69
ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЖИ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ФАЗ ТЕЧЕНИЯ	

ФИБРОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА КОЖИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЕГО ИСХОДА В ЭКСПЕРИМЕНТА И КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	73
4.1. Результаты применения лазерной флюоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии в эксперименте	73
4.2. Оценка информативности показателей флюоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии	83
4.3. Применение результатов исследования в клинической практике для прогнозирования исхода фибропролиферативного процесса кожи	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	112

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Системный и органнй фиброз в совокупности представляют собой одну из серьезных медицинских проблем, затрагивая значительную долю населения земного шара [147]. До 45% всех случаев смерти в развитых странах мира связаны с фиброзом органов [13]. Патологические рубцы представляют собой не просто итог регенерации раны, а являются фибропролиферативными заболеваниями кожи, механизмы развития и регуляции которых подчинены общим законам фиброгенеза. Длительная и чрезмерная воспалительная реакция на любом из этапов заживления раны приводит к увеличению количества и активности фибробластов, деятельность которых, особенно в условиях гипоксии, завершается чрезмерным накоплением экстрацеллюлярного матрикса и формированием патологических рубцов [16; 154]. Каждый год в развитых странах мира приблизительно 100 млн. человек страдают от проблем, связанных с рубцами, а частота послеоперационных патологических рубцов составляет от 39 до 68 % среди прооперированных пациентов [4; 151]. Патологические рубцы могут приводить не только к косметическим проблемам, но и вызывать функциональные изменения, такие как контрактуры и различные симптомы у пациентов, включая зуд и боль. Все это драматически влияет на качество жизни пациентов, их физическое состояние и психологическое здоровье [7; 10; 11; 44].

На настоящий день несколько тысяч клинических исследований с ключевым словом «фиброз» можно найти на [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), сайте, регистрирующим все международные клинические исследования. Однако, несмотря на эти значительные усилия, самым эффективным способом лечения фиброза до настоящего времени остается трансплантация органов. Множество этиологических факторов способны вызвать сложный каскад клеточных и молекулярных ответов, завершающихся фиброзом тканей. Фиброгенная реакция при краткосрочном воздействии является адаптивной, но прогрессирование процесса в течение длительного периода времени приводит к клеточной дисфункции и полиорганной недостаточности [132].

В современной клинической практике нет эффективных мер борьбы с фиброзом. Причины этого кроются прежде всего в:

– надежной программе восстановления тканей после повреждения различной этиологии, которая должна приводить к выздоровлению организма, но зачастую неконтролируемо меняет свой сценарий развития событий, приводя к избыточному росту соединительной ткани, и стандартные терапевтические пути решения в этом случае не помогают;

– отсутствию клинических биомаркеров и эффективных методов не инвазивного обнаружения фиброза, который часто диагностируется слишком поздно, при развитии необратимых изменениях органов и выраженной, стойкой органной дисфункции.

Основным потенциальным диагностическим биомаркером фиброза тканей признается межклеточное вещество, чрезмерное его накопление является признаком фиброза и ключевым фактором прогрессирования заболевания [106].

Именно поэтому актуальным является поиск не инвазивных или мини инвазивных методов диагностики. Решением данной проблемы могут стать оптические методы, позволяющие быстро получить количественную информацию о состоянии тканей. Эти методы отличаются безопасностью, неинвазивностью и информативностью, а также имеют невысокую себестоимость. Комплексное применение разных оптических способов диагностики может дать информацию не только о структурной, но и о функциональной характеристике тканей, что достигается путем количественного анализа таких параметров как кровоток, уровень оксигенации, измерение флуоресценции белков соединительной ткани и порфиринов. Таким образом, в современной медицине вопрос разработки метода быстрой, не инвазивной, количественной оценки фиброзированных тканей крайне актуален [1; 21], а оптические технологии обладают достаточным диагностическим потенциалом, чтобы стать основой принципиально нового подхода к комплексной оценке фиброза.

Существующие в клинической практике не инвазивные методы диагностики фиброза не позволяют в полной мере оценить клиническую картину заболеваний, требуя применения дополнительных диагностических процедур. Современные исследователи сходятся во мнении, что текущие разработки в этой области должны быть сосредоточены на открытии биомаркеров, отражающих текущие воспалительные и фиброзные процессы в коже и внутренних органах, а также, позволяющие прогнозировать дальнейшее течение болезни [21].

До настоящего времени существует проблема того, что оценка клинической картины фиброза кожи опирается на субъективные, неколичественные методы или требует инвазивных процедур. Маркеров, способных с высокой информативностью определить прогноз течения заболевания или ответ на терапию, не хватает.

Перспективным является метод флюоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии. Его неинвазивность, независимость от клинического опыта специалиста, проводящего исследование, делают крайне актуальным определение диагностических критериев, получаемых на основе применения данного метода. Тем не менее, такие критерии в настоящее время отсутствуют.

Существующая неудовлетворенная потребность в контроле и надежной оценке степени тяжести заболевания и параметров количественной оценки воспалительных, гипоксических характеристик при развитии фиброза кожи делает планируемое исследование актуальным и своевременным. Развитие инструментов оптической диагностики позволит в будущем определять оптимальные схемы лечения, снизить заболеваемость и смертность.

С точки зрения современной патофизиологии фиброз кожи — это сложный процесс, включающий гипоксию и воспаление [71], а закономерности репаративного роста соединительной ткани, остающиеся общими для всех патологических процессов, ведущих к фиброзу [14], позволяют изучать пораженную кожу, как наиболее доступный орган, а полученные данные проецировать на другие ткани. Животные модели в этом случае имеют большое

значение для изучения и понимания патофизиологии фиброза кожи, а полученные результаты могут быть транслированы на клинические исследования, либо предоставить новые интересные данные для понимания патологического процесса [52].

### **Степень разработанности темы диссертации**

Доказано, что фиброз играет важную роль в развитии многих заболеваний. Своевременная диагностика процессов, сопровождающихся фиброзом различных тканей, может значительно улучшить прогноз течения заболеваний различных органов и систем.

В настоящее время хорошо изучен патогенез фиброза кожи. Это позволяет определить потенциальные маркеры, которые могут облегчить дифференциальную диагностику происходящих в тканях патологических процессов. Тем не менее, большинство методик, позволяющих это сделать, инвазивны, а не инвазивные методы обладают недостаточной информативностью и не нашли широкого применения в клинической практике, что связано как с ограничениями этих методов, так и с отсутствием четких информативных критериев, характеризующих и позволяющих дифференцировать процессы воспаления, гипоксии и фиброза тканей.

Использование оптических методов диагностики в медицине остается сложной научной проблемой. До настоящего времени практически не разработаны методы анализа и обработки результатов диагностики, дающие необходимую значимую именно медико-биологическую, а не физико-техническую информацию. В настоящее время в мире отсутствуют фундаментальные исследования, позволяющие на экспериментальных моделях оценить возможности комплексного применения оптических методов диагностики для инструментального измерения процессов воспаления и гипоксии.

Одним из таких перспективных методов является флюоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия. Тем не менее, возможность ее применения в клинической практике ограничена отсутствием диагностических критериев. Этой проблеме и посвящено настоящее исследование.

**Цель исследования:** изучить особенности патогенеза формирования рубцовой ткани с помощью оптических технологий при повреждениях мягких тканей.

**Задачи исследования:**

1. Изучить оптические параметры кожи при развитии фиброза в эксперименте.
2. Определить маркеры воспаления, гипоксии и фиброза на основе анализа корреляции оптических и морфологических параметров.
3. Разработать прогностические критерии исходов фибропролиферативного процесса.
4. Обосновать индивидуальный подход к лечению послеоперационных ран на основе разработанных критериев.

**Связь исследования с планом научных исследований,  
проводимых в институте**

Исследование проводилось в рамках направления №7 тем НИР государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» «Создание научно обоснованных подходов в трансплантологии и регенеративной медицине».

Исследования по теме диссертационной работы проведены на базе отдела экспериментальных и клинических исследований государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (лаборатория медико-физических исследований, руководитель д.т.н. Рогаткин Д.А.).

Дополнительные исследования были проведены на базе других подразделений института. Морфологические исследования выполнены и описаны сотрудниками патологоанатомического отделения (руководитель к.м.н. Федоров



Д.Н.). В научно-исследовательской лаборатории института (руководитель д.м.н., профессор Василенко И.А.) выполнялись исследования методом иммуноферментного анализа. В работе также принимала участие лаборатория конфокальной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова (руководитель к.м.н. Мосейнович М.М.), где выполнялись иммунофлюоресцентные исследования.

### **Научная новизна исследования**

Впервые проведено сравнительное исследование, направленное на изучение оптических параметров кожи в рамках экспериментальной модели фиброза на разных стадиях этого процесса.

Изучение оптических параметров кожи в рамках обрабатываемой модели в сопоставлении с результатами гистологического исследования, иммунофлюоресцентных и иммунохимических показателей позволило разработать маркеры для не инвазивной дифференциальной диагностики воспаления, гипоксии и фиброза.

Была оценена ценность выбранных оптических маркеров не инвазивной диагностики с применением флюоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии для прогнозирования исхода процесса заживления кожных ран.

Проведенные исследования позволили обосновать индивидуальный подход к лечению послеоперационных ран с учетом преобладающего патологического процесса и прогнозированию исхода заживления раны.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Оценка оптических параметров кожи с применением метода флюоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии на животной модели блеомицин-индуцированного фиброза кожи позволила выявить корреляции с гистологической картиной. Изучение фиброза в динамике позволило получить новые фундаментальные данные о развитии этого патологического процесса на разных стадиях.

В результате сопоставления гистологических, иммунохимических и данных флюоресцентной микроскопии были разработаны маркеры дифференциальной

диагностики преобладающих процессов при заживлении ран кожи, которые с одной стороны, могут быть использованы в клинической практике, а с другой стороны, позволили обосновать информативность применения флюоресцентной спектрометрии и тканевой оптической оксиметрии в диагностических целях.

Проведенные исследования позволили подтвердить высокую прогностическую информативность выбранных критериев в модели на животных, а также в клинической практике.

Разработка критериев диагностики воспаления, гипоксии и фиброза в эксперименте на мышцах открывает возможность изучения дифференцированного подхода к лечению заболеваний кожи у людей, так как позволяет оценить на разных сроках болезни преобладающий патологический процесс.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Флюоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия позволяют зафиксировать специфические оптические маркеры воспаления и гипоксии при развитии фиброза.

2. Одновременное измерение флюоресценции коллагена, порфиринов и удельного потребления кислорода позволяет судить о метаболической активности тканей, о преобладающем патологическом процессе и его стадии.

3. Флюоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия могут быть использованы в клинической практике для прогнозирования исхода заживления кожных ран.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством материала, сравнительным характером исследования. Помимо этого, результаты исследования были доложены на профильных конференциях и опубликованы в рецензируемых научных изданиях, что подтверждает объективность выводов.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Полученные результаты внедрены в практическую работу отделения челюстно-лицевой хирургии, отдела клинических и экспериментальных

исследований, а также в учебный процесс кафедры челюстно-лицевой хирургии и госпитальной хирургической стоматологии факультета усовершенствования врачей государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского».

### **Личный вклад соискателя**

Определение цели и задач исследования, разработка его дизайна, проведены соискателем совместно с научным руководителем – доктором медицинских наук, доцентом А.Б. Зулькарнаевым и кандидатом медицинских наук, доцентом Д.А. Куликовым.

Текст диссертационной работы написан соискателем, а печатные работы – при его ключевом участии. Выносимые на защиту научные положения, выводы диссертации и практические рекомендации являются результатом самостоятельных исследований соискателя.

Соискатель непосредственно принимала участие в создании экспериментальной модели (в том числе при заборе биологических образцов) в условиях вивария лаборатории медико-физических исследований института, проводила измерения на оптическом оборудовании лаборатории. Также, имея сертификат врача клинической лабораторной диагностики, выполняла иммунохимические исследования в научно-исследовательской лаборатории института.

### **Апробация диссертации**

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на: 11-й Международной совместной конференции по биомедицинским инженерным системам и технологиям (BIODEVICES), Фунчал, Португалия, 2018 г.; на XXIX Международной конференции «Лазеры в науке, технике, медицине» г. Москва, 2018 г.; на Уральском симпозиуме биомедицинской инженерии, радиоэлектроники и информационных технологий (USBEREIT), г. Екатеринбург, 2019 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 4 в журналах и сборниках, индексируемых в международной базе цитирования Scopus, из них 1 статья в том числе в рецензируемом журнале, рекомендованном для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в сборнике, индексируемом РИНЦ. Получен 1 патент РФ на изобретение и подана 1 заявка на патент. Также, в 2017 году был получен Грант РФФИ 18-02-00564 А по теме «Разработка критериев для диагностики фиброза кожи на основе оптических методов».

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 128 страницах печатного текста, состоит из: введения, обзора литературы, характеристик экспериментальных животных и пациентов, описания методов исследования, а также 2-х глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, содержащего 175 источников, из них 17 отечественных и 158 иностранных, иллюстрирована 46 рисунками, содержит 2 таблицы;

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ОБ ЭТИОЛОГИИ, ПАТОГЕНЕЗЕ И ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА (обзор литературы)

## 1.1. Фиброз как актуальная медицинская проблема

В физиологии процесс, обладающий определенной последовательностью явлений, называется типовым. Он сохраняет такой порядок в рамках различных нозологических единиц. Одну нозологическую единицу могут составлять несколько типов патологических процессов [17]. Воспаление - это универсальный и наиболее распространённый типовой патологический процесс, лежащий в основе большинства заболеваний человека. Знание общих закономерностей его развития позволяет понять патогенез широкого спектра воспалительных заболеваний [6]. Гипоксия также является типовым патологическим процессом, сопровождающимся снижением поступления кислорода в ткани или уменьшением его потребления. Гипоксия осложняет течение различных заболеваний, исход которых, в конечном итоге, определяется особенностями вторичных неспецифических метаболических расстройств, степенью дестабилизации клеточных мембран, а также возможностями реактивации структурных и ферментных белков в условиях гипоксии.

Длительность и активность воспаления определяет выраженность фиброза [129]. Воспаление, как и любая защитная реакция организма, может быть избыточно относительно стимулов, его вызвавших, и поэтому часто патологический процесс завершается фиброзом [104]. Локально это проявляется избыточным повреждением нормальных клеточных элементов. В условиях и воспаления, и гипоксии происходит активизация фибробластов биологически активными веществами. Появляются недифференцированные, патологические, функционально активные клетки с высоким уровнем синтеза коллагена. Воспаление приводит к развитию относительной тканевой гипоксии в результате увеличения потребления кислорода высоко метаболически активными клетками.

Универсальность течения типовых патологических процессов позволяет изучать развитие фиброза с позиции воспаления и гипоксии.

Патогенез фиброза имеет в своей основе большую группу гетерогенных нарушений, проявляющихся структурно-функциональными изменениями соединительной ткани, и является конечной стадией при многочисленных заболеваниях, многие из которых смертельны. Фибротическим изменениям могут быть подвержены все органы и ткани. Миллионы людей во всем мире страдают заболеваниями, в основе которых лежит фиброзное поражение различных тканей [166].

На сегодняшний день изучению фиброза посвящено множество научных работ. Появился новый взгляд на патогенез фиброзирования тканей как на динамически протекающий и обратимый процесс. Выявлены достоверные гистологические и лабораторные маркеры фиброза. Однако референтным методом диагностики этого процесса до настоящего времени остается гистологическое исследование, основным недостатком которого признается его инвазивность, ухудшающая состояние исследуемой ткани.

Чаще всего фиброз возникает на фоне хронического воспаления и тканевой гипоксии, в условиях которых процессы репарации и ремоделирования в тканях происходят одновременно. Хотя первоначально любой процесс восстановления тканей носит защитно-приспособительный характер [104], его дисрегуляция делает его патогенным и в результате нормальная ткань заменяется фиброзной [132]. Это и является критической точкой, когда дисрегуляция миофибробластов приводит к замене функциональной тканевой архитектуры неорганизованными волокнами межклеточного вещества. Накопление жесткого и неорганизованного межклеточного матрикса прогрессивно препятствует нормальному функционированию ткани и может в конечном счете привести к отказу в работе органов. Кроме того, во всех фиброзных состояниях межклеточная соединительная ткань препятствует эффективной доставке терапевтических средств, представляя механическое препятствие.

Современные работы акцентируют внимание на важности изучения накопления межклеточного матрикса, как центрального фактора прогрессирования заболевания. Есть мнения, что компоненты межклеточного матрикса могут быть рассмотрены как терапевтические мишени при лечении фиброза. Для восстановления органа важно не только остановить прогрессирование заболевания, но и попытаться вернуть уже фибротически измененную ткань к выполнению функций. Здесь прежде всего рассматриваются воздействия на различные сигнальные пути, целевой апоптоз миофибробластов, а также воздействие на биосинтез самого межклеточного матрикса [106].

Фиброз является ведущим патологическим процессом при различных заболеваниях. Так, вирусные гепатиты и алкогольное поражение лидируют среди причин фиброза печени. Ведущим патологическим процессом фиброз бывает при интерстициальной болезни легких, саркоидозе, а также таких иммунопатологических заболеваниях, как ревматоидный артрит, неспецифический язвенный колит и болезнь Крона. Фибротические изменения в почках являются осложнениями сахарного диабета и артериальной гипертензии. Атеросклероз и артериальная гипертензия являются ведущими причинами фибротических изменений в сердечно-сосудистой системе. Одними из причин потери зрения являются макулярная дегенерация, витриальная и ретинальная ретинопатия, в основе которых также лежат также фибротические процессы. Аутоиммунные и наследственные причины вызывают фиброз поджелудочной железы. Болезнь Альцгеймера и вирус иммунодефицита человека вызывают фибротические изменения в центральной и периферической нервной системе. Фиброз костного мозга наблюдается при онкологических заболеваниях и старении организма. Существует и полиорганный фиброз, причины которого разнообразны: из-за хирургических осложнений может образовываться рубцовая ткань между внутренними органами, вызывая контрактуры, боли и, в некоторых случаях, бесплодие; химиотерапевтические препараты вызывают индуцированный фиброз различных органов; в результате терапии рака или случайного воздействия возникают радиационно-индуцированный фиброз; также различные механические

повреждения тканей и органов приводят к формированию фиброза [23; 28; 30; 53; 90; 160; 164; 165, ], в том числе почек [60] и сердца [42; 92; 127].

Новый взгляд на патогенез фиброзирования тканей представляет его как динамически протекающий и обратимый процесс. Так, выделяют 4 фазы фиброгенного ответа [132]: первая фаза - ответ, обусловленный первичным повреждением органа или ткани; вторая фаза - активация эффекторных клеток; третья фаза - выработка внеклеточного матрикса и четвертая фаза - динамическое осаждение (или недостаточная резорбция) внеклеточного матрикса и прогрессирование фиброза.

Актуальными в связи с этим являются исследования, посвященные вопросам обратного развития фиброза. Фиброз начинается и часто медленно прогрессирует задолго до появления клинических симптомов у пациентов. Именно поэтому перспективной неинвазивной стратегией выявления фиброза на ранних стадиях является использование накопления неорганизованного межклеточного вещества в качестве диагностического маркера [19; 31; 88]. Вопрос остается дискуссионным, однако ряд исследователей сходится во мнении, что процесс оказывается необратимым, если фиброзная ткань становится малоклеточной, соответственно она бедна биологически активными молекулами в том числе металлопротеиназами, которые необходимы для деградации внеклеточного вещества соединительной ткани [82].

## **1.2. Послеоперационные рубцы как фибропролиферативные заболевания кожи**

С фиброзом кожи связано множество различных заболеваний, клинические симптомы которых могут значительно варьировать от поражения изолированных областей к вовлеченности в патологический процесс всего кожного покрова [106]. Фиброзирующие заболевания кожи характеризуются фиброзом дермы, подлежащих тканей и представлены широким спектром дерматозов. Данная группа заболеваний может развиваться как идиопатически, так и под воздействием



внешних факторов. В клинической практике врачу приходится сталкиваться прежде всего с рубцовыми изменениями кожи (гипертрофические и келоидные рубцы), а также склеродермией, системным склерозом, нефрогенным системным фиброзом.

Рубцы вызываются повреждением кожи (травмы, ожоги, операции) и различными ее раздражениями, включая укусы насекомых, угревую болезнь. Большинство поверхностных травм не оставляют значительных рубцов, напротив, глубокие кожные повреждения зачастую приводят к серьезным проблемам, таким как гипертрофические рубцы и келоиды [123]. Ежегодно во всем мире выполняется более 230 млн. хирургических операций. Среди причин развития послеоперационных патологических рубцов выделяют долгое заживление раны более чем 21 сутки (повышает риск на 70% и более) и воздействие локальных механических сил, что определяется направлением движения кожи [77]. С точки зрения системных факторов риска, подростковый возраст и беременность, по-видимому, связаны с большой вероятностью развития патологических рубцов. Некоторые пациенты с келоидными и гипертрофическими рубцами имеют семейный анамнез патологического рубцевания, что говорит о том, что этот процесс генетически детерминирован. Кроме того, имеются клинические доказательства того, что пациенты с более темной кожей в 15 раз чаще, чем пациенты с более светлой кожей, развивают патологические рубцы (преимущественно келоидные) [108], кроме того, эти рубцы отсутствуют у альбиносов [27].

Классическая модель заживления ран включает в себя три различных, но перекрывающихся фазы: воспалительная фаза, пролиферативная фаза и фаза ремоделирования. Первая фаза заживления раны начинается сразу после повреждения тканей и продолжается примерно 2-3 суток после травмы. Коагуляционные каскады, активация комплемента и тромбоцитов дегрануляция предотвращают дальнейшую потерю жидкости и крови путем создания тромбоцитарных пробок и фибринового матрикса. Иммунная система и воспалительные реакции активируются для предотвращения инфекции и удаления

клеточного детрита [80]. Нейтрофилы привлекаются в рану хемотаксическими факторами, продуцируемыми тромбоцитами и бактериальными продуктами [69], а моноциты рекрутируются и дифференцируются в макрофаги через 2-3 суток после травмы.

Вторая фаза заживления ран - пролиферативная фаза. Это фаза формирования новой ткани происходит примерно через 2-3 суток после повреждения и может длиться в течение 3-6 недель. В этот период кератиноциты мигрируют в поврежденную дерму; новые кровеносные сосуды растут внутрь в пределах поврежденной ткани; и новые капилляры заменяют фибриновый матрикс грануляционной тканью за счет действия макрофагов и фибробластов. Грануляционная ткань образует новый субстрат для миграции кератиноцитов. Кератиноциты размножаются и созревают в грануляционную ткань по краю раны, восстанавливая защитную функцию эпителия. В поздней пролиферативной фазе часть фибробластов дифференцируется в миофибробласты. Фибробласты и миофибробласты производят внеклеточный матрикс, главным образом, в форме коллагена [87; 159]. По современным представлениям, независимо от инициирующих событий, объектом, общим для всех фиброзных заболеваний является фибробласт соединительной ткани, производящий межклеточный матрикс [64]. Однако, в последнее время все больше говорится о вкладе в регенерацию и фиброзирование мезенхимальных стволовых клеток, являющихся источниками фибробластов [109]. Количество мигрирующих мезенхимальных клеток, привлеченных в патологический очаг, зависит от степени повреждения ткани. Этот механизм в большей степени признается в качестве неотъемлемой части фиброгенеза, когда необходим приток большого количества клеток для ремоделирования тканей, но в то же время он играет ограниченную роль в процессе нормальной регенерации, где нет необходимости в дополнительной миграции клеток, в дальнейшем пролиферирующих в фибробласты [51].

Еще в начале 2000 -х г. при изучении заживления кожных ран были обнаружены миофибробласты, отвечающие за феномен сокращения раны (раневого контракции) [68]. С тех пор аналогичные клетки были описаны во многих тканях,

где их длительное присутствие в настоящее время расценивается как маркер фиброза [22, 51]. Основным источником этих клеток являются местные фибробласты соединительной ткани [72]. Морфология миофибробластов имеет отличительные особенности от строения фибробластов, что и обуславливает их функциональные особенности. Ультраструктура с микрофиламентными пучками в цитоплазме, фибронектические соединения между клетками и окружающей внеклеточной матрицей отличает их от «нормальных» фибробластов и придает некоторые характеристики, присущие гладкомышечным клеткам [61; 172]. Миофибробласты были описаны при патологии многих тканей, в том числе при фиброзе, гипертрофических и келоидных рубцах кожи, фиброзе и циррозе печени, почек и идиопатическом легочном фиброзе [50]. Миофибробласты не только имеют фибронектические связи с другими клетками, но и образуют комплексы с межклеточным матриксом. Эти большие фокальные адгезии позволяют им успешно производить контракцию и реконструкцию межклеточного матрикса [23]. Расположены миофибробласты в тканях, подобно гладкомышечным клеткам и имеют соединительные комплексы и соединения (включая щелевые контакты), которые позволяют распространению сжатия через реализацию определенных сигналов. Наиболее важным из которых является  $Ca^{2+}$ -зависимый механизм [62]. В настоящее время принято, что миофибробластическая популяция клеток начинается с появления промиофибробластов, чьи волокна содержат только бета и гамма-цитоплазматический актин. Далее, промиофибробласты созревают в дифференцированные миофибробласты, содержащие  $\alpha$  волокна. Миофибробласты могут, в зависимости от экспериментальной или клинической ситуации, нести в себе и другие гладкомышечные сократительные белки, такие как миозин тяжелых цепей или десмин. Однако, присутствие  $\alpha$ -актина представляет собой самый надежный маркер миофибробластического фенотипа, что и реализуется в современных иммуногистохимических методах. В физиологических условиях, при восстановлении целостности ткани, миофибробласты, выполнив свою роль, исчезают путем апоптоза [86, 173]. Другие компоненты экстрацеллюлярного матрикса включают эластин, гиалуроновую кислоту и протеогликаны.

Миофибробласты, которые содержат актиновые нити, обладают сократительными свойствами и помогают свести края раны [174].

После закрытия раны начинается заключительная фаза ремоделирования. Эта фаза характеризуется деградацией избыточных тканей, трансформацией незрелых продуктов заживления в зрелую форму, заменой коллагена III типа I типом. Известно, что синтез коллагена в 7 раз выше в гипертрофических рубцах и до 20 раз выше в келоидных, по сравнению с нормальной кожей [167]. В зрелых гипертрофических рубцах, соотношение между коллагеном I и коллагеном III типов ниже (6:1), чем в келоидах (17:1), в то время как в нормальной оно составляет 5:1. В келоидах количество коллагеновых поперечных связей увеличивается в два раза, по сравнению с гипертрофическими рубцами, что приводит к образованию толстых коллагеновых пучков [25; 99; 144], что является одной из наиболее главных характеристик межклеточного вещества при фиброзе [93]. Роли других видов коллагена все больше уделяется внимания в контексте развития фиброза [89]. Кроме того, современный подход к разработке антифиброзной терапии сосредоточен в том числе и на подавлении различных сшивок коллагена. Так, например, гипертрофические рубцы содержат определенные поперечные связи сшитого коллагена, которые отсутствуют в нормальной коже [97; 149; 161; 171]. В фиброзной ткани также присутствует фиброз-специфический фибронектин, представленный типом III (FNIII) [175]. Фибронектин в фиброзной ткани можно представить в виде депо для хранения, в том числе латентного TGF- $\beta$ 1 [49]. Также межклеточное вещество содержит матриклеточные белки, обладающие преимущественно сигнальной функцией, что позволяет их рассматривать в контексте фиброза [91; 136]. Несколько видов протеогликанов связаны с развитием фиброза тканей, в том числе протеогликаны [67]. Механическое и топографическое строение межклеточного вещества фиброзной ткани имеет свои особенности, выражающееся в меньшем размере волокон и измененной архитектуре по сравнению с нормальной тканью [83]. Так, по сравнению с нормальной кожей, в гипертрофических рубцах коллагеновые волокна тоньше и имеют «узелковую» организацию [167]. Если фиброзная ткань кожи испытывает механическую силу и

натяжение, то волокна имеют линейный характер [20, 41, 151]. Вообще любое увеличенное давления приводит к нарастанию миграции фибробластов и усилению фиброза кожи [41], а увеличение содержания коллагена в ткани делает ее более жесткой [20; 82].

Многие классические руководства рассматривают келоиды и гипертрофические рубцы как различные типы рубцов. Клиницисты определяют гипертрофические рубцы как ткани, которые не выходят за пределы первичной раны, а келоиды в виде рубцов, которые распространяются на окружающую нормальную кожу. Патоморфологи проводят гистологическое различие между келоидами и гипертрофическими рубцами на основании толстых (гиалинизирующих) пучков коллагена в келоидах. Такой коллаген присутствует в келоидах, но может встречаться и в гипертрофических рубцах. Есть много случаев, когда рубец несет в себе гистологические особенности как гипертрофических рубцов, так и келоидов. Ряд исследователей предполагает, что гипертрофические рубцы и келоид можно рассматривать как последовательные стадии одного и того же фибропролиферативного заболевания кожи, с различной степенью воспаления, на которое влияет генетическая предрасположенность [75].

В последние годы появилось новое понимание патогенетических механизмов, приводящих к келоидным и гипертрофическим рубцам. Вариант развития того или иного вида рубца зависит от влияния местных, системных и генетических факторов риска. Однако, патологические рубцы являются по существу результатом хронического воспаления поврежденной ретикулярной дермы. Известно, что поверхностные травмы, которые не достигают ретикулярной дермы никогда не вызывают развития келоидных и гипертрофических рубцов. Обязательным условием для развития патологических рубцов является повреждение ретикулярного слоя дермы и последующее aberrантное заживление раны в нем. Оно характеризуется непрерывным, гистологически локализованным в дерме воспалением. Причем чаще всего в гипертрофических рубцах воспалительная реакция все же слабее, чем в келоидах. Известно, что в келоидах фибробласты более чувствительны к TGF- $\beta$ , чем в нормальной коже, и их

плотность и пролиферация высока, тогда как апоптоз более низок. Ошибочно полагать, что ткани раны, в момент снятия швов, уже метаболически не активны. Действительно, в это время (т. е. через 7-14 суток после операции) произошла регенерация эпидермиса и рана закрылась и подсохла. Однако, на этом этапе дермальная матрица все еще зреет, и воспаление в ретикулярной дерме продолжается. Это очень важный период времени, и если в этот момент ретикулярный слой дермы подвергается внешнему воздействию или внутреннему стимулированию, то воспаление не уменьшится, а будет только прогрессировать, и в конечном итоге через несколько месяцев это приведет к развитию патологических рубцов [121]. Не стоит забывать о гипоксии, давно известно, что кислород является важным фактором заживления ран [119, 140]. Ряд авторов предполагает, что гипоксическая среда создает условия для образования келоидов, а келоидные ткани являются сами по себе относительно гипоксическими [142; 148].

Конечно, клиницисты не могут контролировать системные и генетические факторы риска развития келоидных и гипертрофических рубцов. Однако, они могут использовать ряд методов лечения, воздействие которых уменьшает воспаление и проявления гипоксии. Терапевтической мишенью в этом случае должны быть предпочтительно кровеносные сосуды, эндотелий или периваскулярные клетки, а не фибробласты [3; 117].

Действительно, принимая во внимание патофизиологию процесса рубцевания ткани, стратегию лечения рубцов нужно направлять на предотвращение или ослабление воспаления и гипоксии. Если мы рассмотрим современные терапевтические и хирургические тактики, то можно этот вектор проследить:

– быстрое первичное закрытие раны с использованием методов без натяжения кожи является важной хирургической тактикой. Эпителизация раны, которая происходит позже 10-14 суток, увеличивает риск гипертрофических рубцов [34]. Важность закрытия раны без натяжения нельзя переоценить. Раны,

которые подвержены растяжению, как правило, развиваются в патологические рубцы [118];

– терапия сдавлением приводит к окклюзии кровеносных сосудов, индуцирует апоптоз, конечно, при соблюдении определенных физических характеристик воздействия. Так, давление должно быть от 15 до 40 мм.рт.ст., длительность лечения больше чем 23 часа в сутки более 6 месяцев [130];

– использование флаваноидов, которые индуцируют металлопротеиназы. Применять их начинают через 2 недели после операции, применяют дважды в сутки в течение 4-6 месяцев [45];

– применение силиконовых лент или пленок уменьшает воспаление и гидратирует кожу. Начинают их применять через 2 недели после травмы, длительностью не менее 2 месяцев, не менее 12 часов в сутки [103];

– кортикостероиды редуцируют воспаление и пролиферацию, приводят к вазоконстрикции. Схемы лечения используются разные, от 1 до 3-х месяцев, это может быть, как местная терапия, так и инъекционная, часто применяются в комбинации с другими методами [130]. Кроме того, стероидная терапия уменьшает синтез коллагена, продукцию гликозаминогликана, пролиферацию фиброцита и приводит к дегенерации коллагена и фибробластов. Другим предложенным механизмом является индукция вазоконстрикции, опосредованная связыванием местного стероида с глюкокортикоидными рецепторами [123];

– прямое иссечение избыточного объема тканей рубца применяется чаще всего при комбинированном лечении. Хирургическое иссечение является традиционным методом лечения гипертрофических рубцов и келоидов. Фаза ремоделирования при классическом заживлении раны может длиться не один год, поэтому иссечение гипертрофических рубцов или келоидов должно быть рассмотрено после по крайней мере не ранее одного года после первичной обработки раны. С течением времени гипертрофические рубцы имеют тенденцию регрессировать естественным путем или при консервативном лечении (особенно при лечении глюкокортикоидами). Поэтому во многих случаях нет необходимости

выполнять операцию по ревизии рубца. Для келоидов же хирургическое иссечение само по себе часто приводит к неутешительным результатам и рецидиву. Главная задача операции по ревизии рубца - провести свободное от напряжения закрытие раны для уменьшения связанного с напряжением воспаления, тем самым уменьшить риск рецидива. Это может достигаться различными методами, включая трехслойные швы, подкожно/фасциальное растяжение восстановительные швы, Z-пластика или локальная реконструкция лоскута [120, 122]. Частота рецидивов гипертрофических рубцов после ревизионной операции рубца низкая, в отличии от частоты при келоидах от 45% до 100%;

- криотерапия – некротизирование тканей рубца жидким азотом;
- радиотерапия обладает противовоспалительным действием и уменьшает пролиферацию сосудов, ее применяют в течение 48 часов после ревизии рубца в дозировке 40 грей;

- лазеротерапия – «испарение» кровеносных сосудов с противовоспалительным эффектом. Используют от 2 до 6 сеансов каждые 3-4 недели;

- применение 5-флюороцила оказывает противовоспалительный эффект и подавляет ангиогенез, применяют ежедневные инъекции в течение 12 недель.

Также сейчас можно говорить об экспериментальных методах лечения, все они направлены на борьбу с избыточными проявлениями типовых патологических процессов при формировании послеоперационного рубца:

- использование мезенхимальных стволовых клеток позволяет модулировать провоспалительную активность, также МСК клетки обладают антифибротическим действием, способствуют нормальному ангиогенезу.

Применяют локальные и системные инъекции;

- пересадка жировой ткани, которая также является источником МСК клеток;



– применение интерферонов, которые через трансформирующий фактор роста регулируют пролиферацию фибробластов, синтез коллагена. Применяют инъекционно дважды в сутки 4 суток;

– лечение человеческим рекомбинантным TGF- $\beta$ 3/TGF-1, которому присуща регуляторная функция, назначают инъекции с 1-3 месячным интервалом.

Таким образом, современный взгляд на проблему направлен в сторону воспалительного процесса, как источника активных клеточных элементов, которые могут потребоваться для успешного решения проблемы фиброза [81]. В рамках традиционно сложившегося представления о необратимости фиброза особенно актуально эта проблема звучит с позиции новых возможностей таргетной терапии [147].

### **1.3. Патофизиологический континуум фиброза, воспаления и гипоксии**

Современный уровень развития науки позволяет выделить фиброз среди одновременно текущих процессов, таких как воспаление и гипоксия, несмотря на то что их фазы «наслаиваются» друг на друга во времени и зачастую имеют идентичный субстрат для реализации. Известно, что повреждение тканей может быть вызвано различными агентами, в том числе инфекциями, аутоиммунными реакциями, токсинами, а также механическими повреждениями. Все это вызывает воспалительную реакцию, играющую одну из важных ролей в инициации фиброза в различных органах и системах. Действительно, воспалительные триггеры имеют решающее значение для активизации программ, приводящих к фиброзу, снятие же воспалительного триггера — это наиболее простой способ, чтобы остановить прогрессирование ремоделирования тканей и восстановить их нормальную архитектуру [101].

В развитии и поддержании воспалительной реакции участвует целый ряд клеточных элементов крови, а также тромбоциты, поврежденные эпителиальные и эндотелиальные клетки, все они выделяют различные химические вещества,

которые в свою очередь привлекают моноциты и нейтрофилы к месту повреждения тканей. Нахождение макрофагов и нейтрофилов в месте повреждения ткани имеет важное благоприятное значение для процесса заживления, однако, эти клетки выделяют множество токсических медиаторов, в том числе активных форм кислорода и азота, которые наносят вред окружающим тканям. Следовательно, если макрофаги и нейтрофилы быстро не устранены, они могут привести к дальнейшему обострению воспалительной реакции, усиливая фиброгенез [43]. Действительно, как показывают недавние исследования, правильное заживление раны может произойти только после того, как эти воспалительные клетки находятся под контролем. Таким образом, ограничение активности воспаления может оказаться весьма полезным при самых разных хронических воспалительных и фиброзных заболеваниях. Активированные тромбоциты в свою очередь, выделяют факторы роста, такие как тромбоцитарный фактор роста (PDGF), являющийся мощным веществом для клеток воспаления и TGF- $\beta$ 1, стимулирующий синтез межклеточного вещества фибробластами [29]. Различным факторам роста и цитокинам, секретиремым воспалительными клетками (в том числе макрофагами, нейтрофилами, тучными клетками и эозинофилами) уже сейчас придается одна из ведущих ролей в патогенезе фиброза [46, 59]. Ключевым же является TGF- $\beta$ 1, обладающий провоспалительной и профибротической активностью. TGF- $\beta$ 1 способствует отложению белков межклеточного матрикса, уменьшая экспрессию металлопротеиназ (ММП). Макрофаги являются одним из основных клеток, синтезирующих TGF- $\beta$ 1. Уровень TGF- $\beta$ 1 коррелирует с прогрессированием фиброза органов, а торможение TGF- $\beta$ 1 сигнального пути уменьшает развитие фиброза во многих экспериментальных моделях. TGF- $\beta$ 1, выступая в роли профибротического цитокина, непосредственно индуцирует дифференцировку фибробластов на коллаген-секретирующие миофибробласты. В общем TGF- $\beta$ 1 можно охарактеризовать как многофункциональный цитокин с широким спектром деятельности, которая затрагивает множество важных биологических процессов. Они включают пути, участвующие в регуляции эмбриогенеза, иммунитета, канцерогенеза, клеточной пролиферации и миграции,

заживления ран, однако приоритетным его направлением являются воспаление и фиброз [152]. Важное участие в развитии фиброза принимают клетки иммунного ответа, синтезирующие цитокины, а именно лимфоциты различных популяций. Th17-лимфоциты, являясь провоспалительными и профибротическими типами клеток, экспрессируя провоспалительный цитокин Ил-17А, также становятся одним из факторов развития фиброза. Ил-17А вовлечен в патогенез легочного фиброза, фиброза миокарда и гепатит-индуцированного печеночного фиброза. Во многих случаях, Ил-17А связан со стойким нейтрофилезом, и было высказано предположение, что этот факт способствует развитию в поврежденной ткани фиброза [173]. Th 2-типа иммунитет в свою очередь также является мощным фактором прогрессирования фиброза. Многочисленные исследования показали, что тип 2 ответа цитокинов является ключевым фактором в прогрессировании фиброза [162]. Реакции Th2 - типа определяются продукцией Ил-4, Ил-5 и Ил-13 [163] и, хотя все три связаны с развитием фиброза, Ил-13 стал доминирующим медиатором, участвующим в ремоделировании тканей в экспериментальных и природных образцах фиброза [128]. Ил-13 был вовлечен в развитие фиброза при хроническом воспалении [116], в модели экспериментального фиброза легкого [94], системного склероза [63], атопического дерматита, индуцированного фиброза кожи [124], фиброза, связанного с язвенным колитом и фиброза печени в результате персистирующих инфекций [156]. Ряд исследований показывают, что Ил-13 может способствовать развитию фиброза независимо от TGF- $\beta$ 1 [98], напрямую активируя синтетические и пролиферативные свойства фибробластов, эпителиоцитов и гладкомышечных клеток [96]. Следовательно, в отличие от Ил-17, который, возможно, стимулирует фиброз косвенно, вызывая повреждения тканей и воспаление, Ил -13, как и TGF- $\beta$ 1 вызывает развитие фиброза напрямую.

И, действительно, современный взгляд на проблему направлен в сторону воспалительного процесса, как источника активных клеточных элементов, которые могут потребоваться для успешного решения проблемы фиброза.

В организме, любое восстановление тканей после повреждений, включает в себя сложный комплекс взаимодействий между клетками с участием химических

сигналов и белков внеклеточного матрикса, создающих определенную микросреду. Ключевым фактором этой микросреды является оксигенация тканей, которая достигается функцией кровеносных сосудов, как в физиологических, так и в патологических условиях доставлять кислород и питательные вещества [141]. Концентрация кислорода является жестко регулируемым параметром организма, поэтому изменение ее в клетках индуцирует определенные механизмы реагирования, которые пытаются восстановить поступление кислорода к клеткам и модулируют их функции в гипоксических условиях [102]. Учитывая, что гипоксия может быстро привести к метаболическому кризису и представлять собой серьезную угрозу для текущей физиологической функции и, в конечном счете, жизнеспособности, в организме существуют эффективные и быстрые молекулярные ответы на гипоксию в клетках путем индуцирования адаптивных генов, которые способствуют повышению доставки кислорода [146]. Большинство из этих реакций происходят через индукцию транскрипционного фактора HIF-1, который регулирует процессы, необходимые для восстановления во время гипоксии. HIF-1 считается главным регулятором гомеостаза кислорода и транскрипционной активности сотен генов, которые способствуют ангиогенезу, клеточной пролиферации, увеличению клеточного обмена и выживания в условиях гипоксии [137,138]. HIF-1 транскрипционно повышает метаболизм белков (GLUT-1, интегрин), растворимых факторов роста (TGF- $\beta$ , VEGF, CTGF, PDGF), компонентов внеклеточного матрикса (коллагена I типа и фибронектина), все это не только компенсирует гипоксию, но и благоприятно влияет на процесс восстановления тканей. По этим причинам HIF-1 рассматривается как позитивный регулятор заживления ран и потенциальный - тканевого фиброза [102].

При острой гипоксии HIF-1 существенно улучшает ангиогенные дефекты и ускоряет заживление ран [35; 100]. И наоборот, длительная гипоксия и чрезмерная стимуляция HIF-1 не рассматриваются в качестве основного механизма стимуляции ангиогенеза при хронических патологических состояниях, хотя высокие уровни HIF-1 все же отмечаются при ряде хронических заболеваний [114; 134; 135].

Дефицитом при гипоксии является молекулярный кислород, как конечный акцептор в цепи переноса электронов, и, таким образом, ключевой субстрат окислительного метаболизма. Достаточный уровень доставки кислорода имеет важное значение для обеспечения метаболической энергией, необходимой для эффективного восстановления тканей. Важность кислорода особенно возрастает при патологических состояниях и связана с его активным потреблением во все фазы воспалительного процесса [104]. В ранней фазе воспаления появляются нейтрофилы, которые необходимы для выполнения задач по очистке раны от патогенных микроорганизмов и других вредных веществ. Для этого нейтрофилы должны генерировать значительное количество активных форм кислорода, действующих как бактерицидные средства [40]. Синтезированные активные формы кислорода являются важным источником потребления кислорода во время воспалительной фазы. В процессе воспаления фибробластам необходимо производить большое количество коллагена, что также требует значительного количества кислорода. Таким образом, наличие кислорода имеет решающее значение для успешной регенерации и восстановления тканей. Все вышеперечисленные процессы требуют увеличения потребления кислорода в тканях [145]. Это касается и хронического воспаления, связанного с васкулопатией и сосудистой дисфункцией. При хронических воспалительных расстройствах степень тканевой гипоксии бывает наиболее выражена [139].

Гипоксия, является не просто свидетелем воспаления, она активизирует механизмы, которые регулируют характер, степень и продолжительность воспаления [102]. В свою очередь, гипоксия может усугубиться в связи с быстрым притоком воспалительных и мезенхимальных клеток с высокой метаболической потребностью в кислороде, что характерно для процесса воспаления. Так, гипоксия тканей, возникающая в ранах, является стимулирующей для притока нейтрофилов и макрофагов. Гипоксия стимулирует усиление активности лейкоцитарно–эндотелиальных молекул адгезии (селектинов и В2-интегрина), в результате увеличивая отек и воспаление [153]. Макрофаги проникают в ишемизированную рану, параллельно с нейтрофилами, изначально в меньших количествах, но со

временем (через 2-3 суток) становятся одними из самых распространенных воспалительных клеток в ране. Они остаются в ранах до реконструкции, как часть воспалительной фазы заживления ран. Как и нейтрофилы, макрофаги являются незаменимыми при удалении некротизированных тканей и защите от инфекции, а также необходимы для регуляции процесса ремоделирования. Это во многом зависит от их способности вырабатывать и высвобождать цитокины на поверхность раны, которые регулируют функции фибробластов и ангиогенез [111]. Эти цитокины включают PDGF, TGF- $\beta$ , FGFs и VEGF [148]. Этот коктейль растворимых факторов мощно стимулирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку кератиноцитов, фибробластов и эндотелиальных клеток, способствуя ангиогенезу и ремоделированию. Количество провоспалительных цитокинов, в том числе Ил-6 и СРБ, коррелирует с выраженностью гипоксии [24; 95]. После воспалительной реакции, восстановление целостности тканей и сосудов является фундаментальной функцией формирующейся ткани. Фибробласты синтезируют и выделяют различные необходимые факторы для успешного формирования и ремоделирования грануляционной ткани [54]. Как следствие этого, эндотелиальные и гладкомышечные клетки пролиферируют и дифференцируются, образуя новые сосуды, которые прорастают в грануляции, чтобы обеспечить кислородом и питательными веществами сформированную ткань.

Таким образом, гипоксия, вызывая усиление активности основных факторов ангиогенеза, увеличивая количество воспалительных и эндотелиальных клеток-предшественников, а также стимулируя миграцию фибробластов и кератиноцитов, координирует процессы ангиогенеза и фиброза [47; 85; 169; 155].

В отличие от других органов и тканей кожа находится в довольно уникальном положении, имея возможность получать кислород из атмосферы. Кожа взрослого человека усваивает его в ограниченном количестве, что при нормальных обстоятельствах может быть достаточным, чтобы обеспечить эпидермальную потребность в кислороде [143]. Однако, после повреждения увеличивается потребность в кислороде на фоне нарушения нормальной доставки кислорода из

сосудистого русла, и при возрастающих метаболических потребностях клеток в поврежденных тканях эпидермис и дерма начинают испытывать гипоксию.

Фиброзные расстройства чаще всего характеризуются развитием хронической гипоксии тканей вследствие микрососудистой окклюзии и высокого потребления кислорода [79]. В коже это наблюдается при рубцах, включая келоиды, гипертрофические поражения, а также склеродермии. Растет количество доказательств того, что гипоксия через индукцию HIF-1 может быть фактором в патогенезе фиброза при этих расстройствах. Например, накопление HIF-1 белка наблюдается в биоптатах келоидных рубцов и склеродермии, что говорит о связи гипоксии и фиброза [57]. Хотя последние исследования показали, что количество HIF-1 $\alpha$  в эпидермисе больных системной склеродермией меньше, даже по сравнению со здоровыми [56]. Предположено, что это может быть вызвано отрицательной обратной связью, приводящей к увеличению пролилгидроксилазы, которая вызывает более быструю деградацию HIF-1 [32].

На гипоксию сейчас устремлены взгляды исследователей, как на одну из причин осаждения внеклеточного матрикса и развития фиброза кожи. Парадигмой фиброза кожи является чрезмерное производство компонентов межклеточного матрикса фибробластами в ответ на TGF- $\beta$  и CTGF [150]. В последнее время говорится о том, что чрезмерное производство межклеточного матрикса отчасти вызвано реакцией этих фибробластов на гипоксическую среду, характеризующую фиброз. В условиях низкой концентрации кислорода HIF-1-зависимая регуляция повышает уровни TGF- $\beta$  и CTGF [73, 74, 171]. Кроме того, продолжающаяся при фиброзе кожи гипоксия постоянно увеличивает уровни TGF- $\beta$  и, следовательно, увеличивает производство межклеточного вещества, тем самым увеличивая фиброз [57]. Особую роль при гипоксии играет TGF- $\beta$ , известна его способность мощно стимулировать ангиогенез и при заживлении ран, и при патологическом фиброзе [85].

#### **1.4. Методы дифференциальной диагностики преобладающего патологического процесса при заживлении кожных ран**

Основным инвазивным диагностическим методом, выявляющим кожный фиброз, и до настоящего времени используемом в научных исследованиях и в практическом здравоохранении является гистологическое исследование. Это важная диагностическая процедура, которая остается золотым стандартом для многих нозологий, а иногда единственным инструментом для постановки диагноза. До настоящего времени гистологическое заключение является тем фактором, который определяет дальнейшую тактику лечения пациента при заболеваниях, сопровождающихся фиброзом кожи, но в реальности в рутинной клинической практике используется только при первичной постановке диагноза и в сложных диагностических случаях. Однако ни вне операционная (при системном фиброзе, сформировавшейся рубцовой ткани), ни интра операционная (иссечение краев ран) биопсии не могут рассматриваться как безболезненные и безвредные процедуры [84; 112], более того они могут ухудшить состояние исследуемых тканей. Также известно, что биопсийные пробы участков пораженной кожи имеют ограниченную ценность для сравнительного исследования, так как структура образцов подвергается существенным механическим повреждениям при заборе материала [13]. Нельзя не сказать и о субъективности исследования, потому что оно зависит от пробоподготовки, количества просмотренного врачом материала, и, конечно, от его квалификации.

Иммуногистохимические исследования можно использовать для диагностики фиброзного процесса, но в большинстве случаев это целесообразно только в научных исследованиях. Если говорить о практическом здравоохранении, то необходимость проведения биопсии, сложность, трудоемкость и стоимость иммуногистохимических методик позволяет в настоящее время использовать их прежде всего в онкологических исследованиях. Еще одной проблемой использования иммуногистохимии в рутинной практике для диагностики фиброза, является то, что маркеры не строго специфичны и могут быть выявлены при самых различных патологических процессах и вне фиброза (например, трансформирующий фактор роста при опухолевом росте) [38].



Использование цитологического метода ограничено возможностью его применения только при открытых ранах и наличии из них отделяемого. Исследование цитологических мазков позволяет прежде всего оценивать воспалительные изменения и отслеживать регенеративные процессы в ране, однако носит оно более субъективный характер, чем гистологическое исследование и поэтому на настоящее время достаточно редко применяется для научных и клинических исследований.

Также, в настоящее время определены несколько биомаркеров в хронических ранах. Эти маркеры потенциально могут быть использованы в качестве основы для диагностических тестов определения состояния раны [70]. Было показано, что уровень сериновых и матриксных металлопротеиназ ниже в хорошо регенерирующей ране, в отличие от незаживающих. Недостатком этого теста является его инвазивность (нужно достаточно большое количество раневой жидкости) и невозможность его применения в стадии рубцевания раны.

Наиболее часто из не инвазивных инструментальных методов используются высокочастотные ультразвуковые системы. Они дают информацию о глубине и площади распространения воспалительных процессов в коже и подкожной жировой ткани, необходимую для диагностики и контроля состояния кожи во время лечения. Современная ультразвуковая аппаратура с высокочастотными датчиками обеспечивает не только диагностику первичных опухолей кожи, но и распознает метастазы опухолей в кожу по ультразвуковым признакам характера роста, плотности, расположению сосудистой сети. Но возможности данного метода в диагностике фиброза кожи ограничены, так как обязательным условием является исследование здорового участка кожи с противоположной стороны, что не всегда бывает возможно в виду распространённости заболевания на коже. Также, ввиду того, что этот метод для диагностики фиброза кожи применяется достаточно редко как в научных исследованиях, так и в практическом здравоохранении, к его недостаткам можно добавить отсутствие специалистов, имеющих высокую квалификацию в этом направлении, что безусловно увеличивает субъективность исследования. Все это свидетельствует о том, что ультразвуковое исследование при

фиброзе кожи требует стандартизации оценки кожных изменений и самой методики измерения.

Конфокальная микроскопия - современный объективный неинвазивный метод, позволяющий проводить не только научные исследования, но и успешно использовать его в клинической практике. Но его особенности, заключающиеся в высоком разрешении и небольшой глубине проникновения (0,2 мм) в исследуемые ткани, не позволяют оценивать процессы в глубоких слоях кожи, а именно здесь происходят основные изменения при фиброзе [48].

Эластография – метод, который позволяет не инвазивно оценивать эластичность тканей [131]. Метод достаточно прост, не требует никаких дополнительных аппаратных средств. У пациентов с фиброзом кожи первое использование метода было проведено в 2010 году, однако результаты показали противоречивые данные, обнаружив, что методика на данном этапе не может быть надежным инструментом диагностики [78]. Последние исследования продемонстрировали более обнадеживающие результаты в измерении дермальной толщины кожи [55]. Однако возможность применения этого метода у пациентов с фиброзом кожи в клинической практике требует проведения еще большего количества научных исследований, для получения необходимых объективных критериев диагностики.

Магнитно-резонансная томография является информативным не инвазивным инструментом для морфологической и метаболической оценки функционирования практически всех органов и тканей тела человека, за исключением кожи. Прежде всего это связано с тем, что кожа граничит с воздушной средой. Магнитно-резонансная томография для изучения кожи была впервые использована в 1990 году [33], но так и не получила широкого клинического применения из-за отсутствия удовлетворительных результатов. Последние исследования с использованием МРТ с 1,5 сканером Тесла позволили оценить мелкие анатомические структуры кожи, в том числе сосуды с диаметром более 1 мм. Действительно, этот метод потенциально может использоваться для диагностики фиброза кожи, однако целесообразность этого ставится под сомнение из-за

высокой стоимости исследования и не доступности необходимого оборудования.

Оптические технологии занимают особое место в нише диагностических исследований и имеют большой потенциал развития. Для изучения микроциркуляции кожи доказал свою диагностическую ценность метод лазерной доплеровской флоуметрии (в том числе *image*, позволяющей одномоментно исследовать большую площадь тканей). Этот метод не инвазивный, достаточно простой в использовании, позволяет проводить непрерывную запись показаний микроциркуляторного русла и получать объективные результаты [15; 37]. Кроме того, в ряде работ было показано, что эта методика позволяет наблюдать за процессом рубцевания после химических ожогов и лучевых поражений кожи [37; 66]. Однако, в случае эксперимента применение этой методики не приемлемо, так как кожа мышей более тонкая и производимые измерения будут отражать события, происходящие в тканях, находящихся глубже. Данный метод исследования имеет большие перспективы для использования его в клинической практике, однако для диагностики фиброза кожи также необходима разработка специфических критериев.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) является новым методом визуализации с потенциально возможным применением для оценки кожи [18; 76]. Это не инвазивный метод, глубина проникновения которого составляет приблизительно 2 мм. ОКТ дополняет другие способы визуализации тканей, например, конфокальную микроскопию и высокочастотный ультразвук [107]. Начиная с 1991 года, ОКТ завоевал свое место в офтальмологии и в настоящее время является клиническим стандартом диагностики многих заболеваний в этой области. Непрерывное технологическое совершенствование системы ОКТ и растущий спрос на неинвазивную визуализацию позволяет находить свое применение этой методике и в других направлениях медицины, в том числе и в дерматологии [65]. В будущем, при накоплении большого количества исследований, метод будет иметь большие возможности в практическом здравоохранении для диагностики фиброза кожи.

Широкие перспективы флюоресцентной спектроскопии *in vivo* заложены в возможности с ее помощью (при достаточной чувствительности аппаратуры) регистрировать очень слабые свечения различных природных (эндогенных) флюорохромов. При флюоресцентном методе под воздействием лазерного излучения происходит возбуждение флюорохромов в биологическом объекте, и по показателям отражения кожи можно судить о микрорельефе и типе кожи. Эндогенные флюорохромы всегда присутствуют в тканях живых организмов и представлены: порфиринами, флавинами, NADH, эластином, коллагеном и рядом других. Перспективы использования оптических критериев для оценки структурных изменений тканей столь высоки, что метод лазерной флюоресцентной спектроскопии, например, нередко в литературе называют «оптической биопсией» [125]. Но в настоящее время большинство работ, проводимых с помощью оптических методик, в том числе флюоресцентной спектроскопии, посвящено либо конкретными нозологиями (онкология, атеросклероз) [39; 105; 115], либо исследованиям конкретных флюорофоров [126]. Флюоресцентная визуализация может использоваться для диагностики гипоксии, воспалительных изменений, ее высокая чувствительность достоверно определяет низкий уровень напряжения кислорода [133]. В условиях *in vivo* показана зависимость оптических параметров кожи (коэффициента поглощения, коэффициента светопроводимости) от ее морфологии и функционального состояния [9]. Однако работ по диагностике воспаления и гипоксии в рамках развития фиброза кожи нет.

Прижизненная микроскопия кожи и ее различные варианты (поверхностная микроскопия, микроскопия в падающем свете, эпиллюминесцентная микроскопия (дерматоскопия, интравитальная микроскопия) также относятся к оптическим методам исследования. Так, дерматоскопия, как наиболее распространенный метод, имеющийся на вооружении у дерматологов, позволяет проводить дифференциальную диагностику доброкачественных и злокачественных новообразований, а также других дерматозов [2]. Разновидностью дерматоскопии является контактная биомикроскопия, проводимая с применением контактных

объективов, фронтальная линза которых соприкасается с поверхностью изучаемого в коже объекта, а освещение осуществляется в падающем свете в нескольких спектральных режимах с помощью специальных светоделительных пластин и фильтров. Кроме изучения микроскопического изображения с увеличением от 50 до 600 раз контактная биомикроскопия дает возможность провести витальную микрофлюориметрию выбранных в коже объектов в режиме аутофлюоресценции или с использованием экзогенных флюорохромов. Метод является эффективным при диагностике некоторых буллезных дерматозов [12]. Однако данные технологии не позволяют получать нужную информацию при фиброзе кожи.

Из всего выше перечисленного, можно сделать вывод, что не инвазивные методы диагностики, в том числе оптические обладая большим потенциалом в дополнение к клинической оценке при фиброзе коже так и не нашли широкого применения в медицинской практике и, прежде всего, это связано с отсутствием четких диагностических критериев, понятных для практического врача. Оценка же рубцовой ткани до настоящего времени основана только на визуальном осмотре и опыте клинициста [113].

В современной медицине наиболее востребованы методы диагностики, минимизирующие инвазивность процедур, а рост численности и заболеваемости населения, увеличивая нагрузку на медицинский персонал, выдвигает на первое место медицинские технологии, обладающие максимальным эффектом при минимальной затрате времени и невысокой себестоимости. Этим требованиям в полной мере отвечают оптические методы диагностики, позволяющие с помощью флюоресценции, микроциркуляции и оксигенации изучать различные процессы в тканях. Эти методы не требуют расходных лабораторных материалов, не инвазивны и асептичны, являются существенно более дешевыми чем выше перечисленные инструментальные. В разной степени оптические методы имеют потенциал для дополнения традиционных клинических оценок заболеваний кожи, предоставляя детальную информацию, касающуюся компонентов кожи, недоступных для визуального осмотра.

Таким образом, фиброз как патологический процесс изучается уже на протяжении многих лет. Актуальность этих исследований обусловлена, главным образом, широкой распространённостью заболеваний, обусловленных или проявляющихся избыточным накоплением соединительной ткани вокруг очагов воспаления и повреждения, которое приводит к структурным и функциональным изменениям в органах.

Несмотря на то, что патогенез этого процесса изучен достаточно хорошо, диагностика сопряжена с объективными трудностями. В настоящее время, «золотым стандартом» диагностики фиброза остается гистологическое исследование, основным недостатком которого признается его инвазивность, ухудшающая состояние исследуемой ткани. При диагностике экстрадермальных поражений инвазивное получение материала для исследования может значительно повышать риск осложнений, в то время как отсутствие информации о стадии и особенности активности процесса снижает шансы на эффективную терапию. Кроме того, клиническая информативность морфологического исследования кардинальным образом зависит от выраженности изменений в полученных участках тканей, которая не всегда равномерна. В связи с этим, актуальность исследований, направленных на поиск высоко стандартизированных не инвазивных (или малоинвазивных), высокочувствительных и высокоспецифичных методов не вызывает сомнений.

Одним из таких перспективных методов являются лазерная флюоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия. Использование этих методов позволяет в режиме реального времени оценить морфологическую структуру и функциональное состояние тканей (в том числе – кожи), и имеет широкий потенциал для клинического применения, что было подтверждено несколькими небольшими исследованиями. Однако в настоящее время отсутствуют работы, посвященные изучению информативности этого метода для диагностики фиброза, определения его стадии и активности в сопоставлении с данными морфологического исследования, что и стало поводом для проведения настоящего исследования.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА И КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Протокол настоящего исследования был одобрен локальным комитетом по этике (протокол № 4 от 14 апреля 2016 г.) и утвержден решением Ученого совета государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (протокол № 4 от 18 апреля 2016 г.).

Исследования проведены с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986), а также принципов, изложенных в Приказе Минздрава СССР №755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Работа выполнена в отделе клинических и экспериментальных исследований (руководитель к.м.н. Куликов Д.А.) с привлечением патологоанатомического отделения (руководитель к.м.н. Федоров Д.Н.), научно-исследовательской лаборатории института (руководитель д.м.н., профессор Василенко И.А.), а также лаборатории конфокальной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова (руководитель к.м.н. Мосейнович М.М.).

### **2.1. Схема эксперимента**

Исследование проведено на лабораторных животных – мышах, белых беспородных, количеством 54 голов. Для проведения эксперимента была использована модель блеомицин-индуцированного фиброза кожи (протокол

Avouac J.) [26], которая является признанной в научном сообществе и применяется в исследованиях с 2000-х годов.

Животные были разделены на 2 группы. Первой группе (группа «блеомицин») (N = 33) вводились подкожные инъекции блеомицина в дозировке 0,1 мл (концентрация 0,5 мг / мл). Блеомицин, зарегистрированный на территории РФ лекарственный препарат (РУ № П N011332/01 от 21.11.2007), в стандартной практике используется как противоопухолевое средство. Представляет собой А<sub>2</sub>-фракцию, изолированную из культуры *Streptomyces verticillus*, содержащую собственно противоопухолевый антибиотик. Механизм действия связан со способностью вызывать фрагментацию молекул ДНК. Обладает слабо выраженной миелодепрессивной и иммунодепрессивной активностью. Однако препарат имеет ряд побочных эффектов, при местном применении это проявляется утолщением кожи за счет фибротических изменений. В эксперименте использовался блеомицин производства Nirron Кауаки, во флаконах 15 mg.

Второй группе (группа «физ. р-р») (N = 21) вводились подкожные инъекции 0,1 мл 0,9 % изотонический раствор натрия хлорида.

Животным групп «блеомицин» и «физ. р-р» инъекции проводились ежедневно в течение 21-х суток в предварительно депилированную кожу (VEET/Крем для депиляции для чувствительной кожи 200 мл) межлопаточной области спины. Введение препаратов (блеомицина и изотонического раствора натрия хлорида, соответственно) в этих группах осуществляли последовательно вершины предварительно обозначенного маркером квадрата размером 1 см<sup>2</sup>, затем – в центр квадрата (по одной инъекции ежедневно) (Рис. 2.1). Введение осуществлялось инсулиновым шприцом с иглой 28G.





Рис. 2.1. Введение блеомицина инсулиновым шприцом в центр квадрата.

На 0, 7, 14 и 21-е сутки в группах «блеомицин» и «физ. р-р» проводились измерения интенсивности эндогенной флуоресценции и тканевой сатурации оксигемоглобина. Показания снимались с поверхности кожи непосредственно над экспериментальной областью, при этом мы отслеживали, чтобы поверхность зонда не перекрывала штрихи маркера.

Помимо этого, на указанных этапах проводилось исследование тканей: морфологические, иммунохимическое, а также изучалась иммунофлуоресценция. Для этого животные выводились из исследования, усыплялись, после чего получали материал для исследования. Количество животных в эксперименте и количество выведенных из исследования животных на разных этапах указано в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Количество животных в эксперименте и количество выведенных из исследования животных на разных этапах.

	Этап эксперимента			
	0 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
	Животных под наблюдением			
Группа «блеомицин»	33	30	22	15
Группа «физ. р-р»	21	17	12	8
<b>Всего</b>	<b>54</b>	<b>47</b>	<b>34</b>	<b>23</b>
	Животных выведено			
Группа «блеомицин»	3	8	7	10 (остаток 5)
Группа «физ. р-р»	4	5	4	5 (остаток 3)
<b>Всего</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>15 (остаток 8)</b>

## 2.2. Лабораторные животные

Исследование проведено на белых беспородных мышах в возрасте 6 недель, массой 25 - 30 гр., общим количеством 54 особи. Для исключения половых различий, а также влияния циклических изменений секреции половых гормонов, в эксперимент были включены только самцы. Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре 21 – 23 °С, влажности 50 - 65%, 14 часовом дневном освещении. Они получали сбалансированный гранулированный корм, не содержащий флюорофоры, и имели свободный доступ к питьевой воде. Длительность периода карантина животных составила 10 суток.

С целью получения образцов тканей для проведения гистологических исследований мышей выводили из эксперимента летальной дозой наркоза (содержащего 1% Zoletil и 0.4% Rometar).

### 2.3. Пациенты

Возможность применения флюоресцентной спектрометрии и тканевой оксиметрии для прогнозирования исхода процесса заживления оценивалась нами с участием 17-ти пациентов с кожными ранами различной локализации. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

В группе было 7-ми мужчин и 10-ти женщин, средний возраст составил  $37 \pm 5,1$  года (от 24 до 49 лет). У 11 пациентов поражение было травматического характера. Была выполнена первичная хирургическая обработка раны и наложены первичные швы. Локализация поражения: у 8-ми пациентов – лицевой отдел головы (4 – щечная область, 2 – скуловая область, 2 – лобная область), 2-х пациентов – мягкие ткани предплечья, у 1-го – бедра. У 6-ти пациентов наложение швов было выполнено после плановых операций (у 5-ти пациентов после субтотальной резекции щитовидной железы, у 1-го – после тотальной паратиреоидэктомии).

Чтобы исключить влияние шовного материала и техники шва, в исследование были включены пациенты, у которых был наложен внутрикожный шов при помощи атравматического шовного материала с режущей иглой и нитью Prolen 4/0 (ETHICON, LLC, регистрационный номер ФСЗ 2010/06040). На 7-10 сутки нить удалялась.

Во всех случаях раны заживали первичным натяжением, однако исход заживления раны различался. У 10-ти пациентов заживление раны прошло с формированием нормотрофического рубца, у 7-ми – с образованием гипертрофических и келоидных рубцов.

### 2.4. Методы исследования

Экспериментальное исследование проведено с использованием оптических, гистологических, иммунохимических, и иммунофлюоресцентных методов обследования.

#### *2.4.1. Оптические измерения*

Все измерения проводились на многофункциональном лазерном диагностическом комплексе «ЛАКК – М» (ООО НПП «ЛАЗМА») (Рис. 2.2 и 2.3).

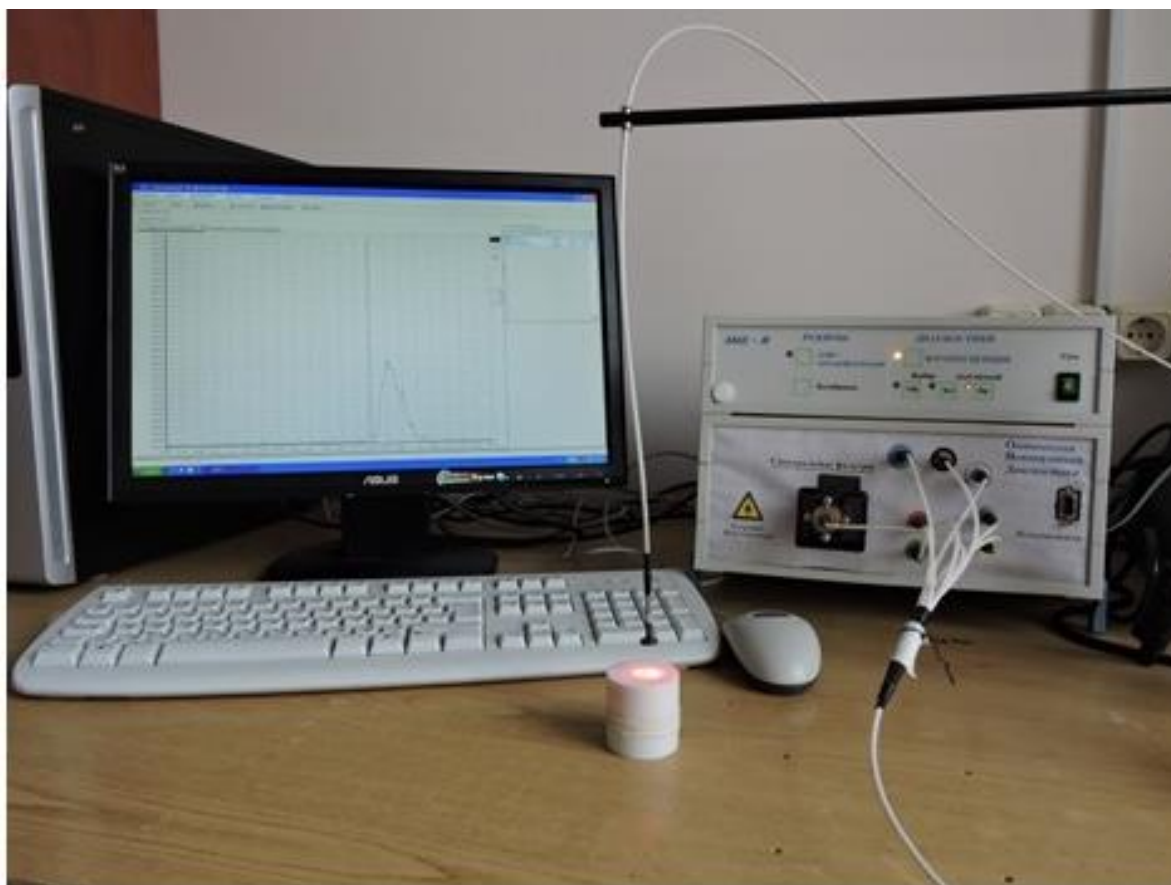


Рис. 2.2. Диагностический комплекс ЛАКК-М.

Режим работы «Флюоресценция» на ЛАКК-М реализует метод лазерной флюоресцентной спектрометрии. К поверхности исследуемого объекта с помощью оптоволоконного зонда по осветительному волокну доставляется маломощное излучение от выбранного источника. Выходная мощность на дистальном конце волоконно-оптического зонда составляет около 2 - 10 мВт для каждого источника

света. Через приёмное волокно вторичное излучение доставляется к спектрометру, а его спектр отражается на мониторе в режиме реального времени.



Рис. 2.3. Принципиальная схема диагностического комплекса ЛАКК-М

Для возбуждения флюоресценции в различных частях видимого и ближнего УФ спектра были использованы источники с длинами волн  $\lambda_e = 365$  и  $535$  нм. Длины волн, на которых флюоресценция исследуемых флюорофоров достигает максимальных значений, далее обозначались  $\lambda_f$ . Для коллагена длина волны флюоресценции  $\lambda_f = 455$  нм, для порфирина  $\lambda_f = 610$  нм, для липофусцина  $\lambda_f = 585$  нм. Отметим, что вклады коллагена и эластина в общий спектр трудноразделимы, поэтому далее считали, что флюоресценция на длине волны  $\lambda_f = 455$  нм отражает наличие обоих флюорофоров.

На рисунке 2.4 представлена типичная картина регистрации первичных данных на ЛАКК-М в режиме работы «Флюоресценция».

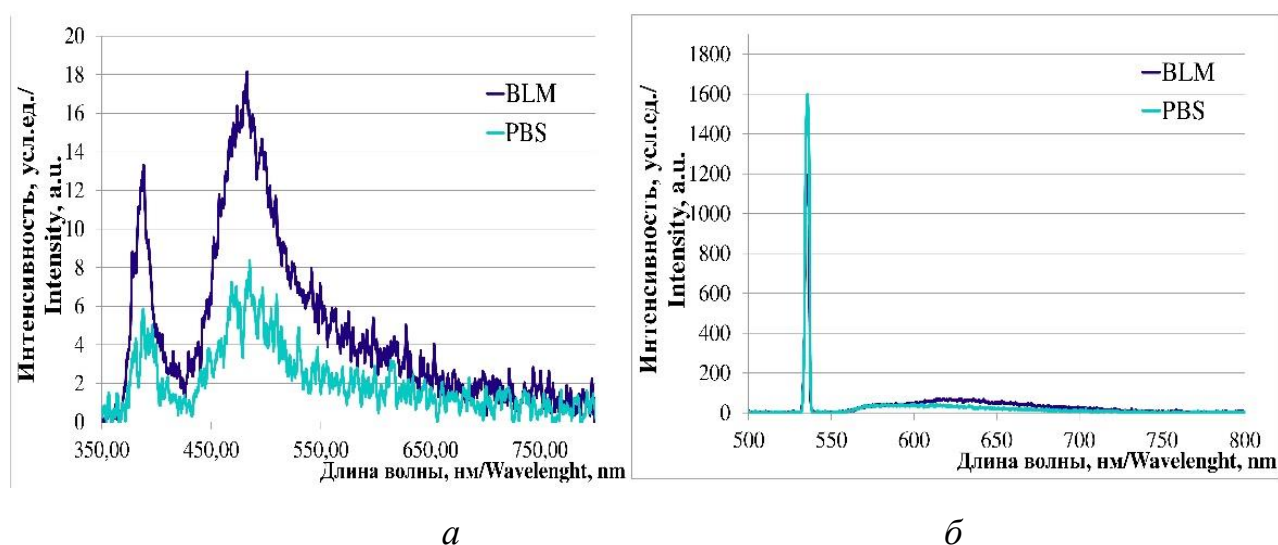


Рис. 2.4. Примеры спектров флюоресценции в области инъекций на 21-е сут.  
*а* – в УФ-диапазоне ( $\lambda_e = 365$  нм); *б* – в зеленом диапазоне ( $\lambda_e = 535$  нм).

В данной работе оценивалась динамика интенсивности на данных длинах волн (далее - «интенсивность флюоресценции») при отслеживаемых равных мощностях возбуждающего флюоресценцию излучения.

В режиме «Микроциркуляция» комплекс ЛАКК-М непрерывно измеряет сатурацию гемоглобина кислородом и объем фракции гемоглобина в зондируемой области исследования. Вычисление данных показателей производилось по методу абсорбционной спектроскопии и основано на разнице в регистрируемых сигналах при зондировании биоткани в красном и зеленом спектральных диапазонах длин волн. Сатурация гемоглобина определяется на основе разных оптических свойств оксигенированных и дезоксигенированных фракций гемоглобина, содержащихся в крови диагностического объёма. На основе данных показателей, усредненных по времени измерения (15с), вычислялось удельное потребление кислорода клетками ( $U$ ), характеризующее потребление кислорода на единицу объема циркулирующей в ткани крови по формуле [133]:

$$U = \frac{(S_p O_2 - S_t O_2)}{V_b}$$

Где  $S_t O_2$  - средняя тканевая сатурация оксигемоглобина (в процентах),  $V_b$  - среднее объемное кровенаполнение (в процентах). При этом сатурация оксигемоглобина ( $S_p O_2$ ) в артериальной крови была принята равной 98%.

Для исключения влияния индивидуального начального биохимического состава тканей, помимо динамики величин интенсивностей флюоресценции ( $I_f$ ), удельного потребления кислорода ( $U$ ) и концентраций С-реактивного белка, анализировалась также динамика их относительных изменений  $D(P)$  по сравнению с исходным уровнем (на 0 сутки):

$$D_i^n (P) = \frac{P_n(i)}{P_{n=0}(i)}$$

Где  $P_n(i)$  – один из анализируемых показателей, определенный на  $n$  сутки ( $n=0, 7, 14$  или  $21$ ) для  $i$ -ого животного. Полученные значения усреднялись по группе:

$$D^n (P) = \sum_{i=1}^{N \text{ в группе}} D_i^n (P)$$

Показания снимались с поверхности кожи непосредственно над экспериментальной областью, при этом отслеживалось, чтобы поверхность зонда не перекрывала штрихи маркера – процесс проведения измерений представлен на рисунке 2.5.





Рис. 2.5. Процесс проведения измерений на диагностическом комплексе ЛАКК-М.

#### *2.4.2. Гистологические и иммунофлюоресцентные исследования*

На 0, 7, 14 и 21-е сутки часть животных (таблица 2.1) из групп «блеомицин» и «физ. р-р» выводилась из эксперимента для получения материала на проведение гистологических, иммунохимических и иммунофлюоресцентных исследований.

Животных выводили из эксперимента летальной дозой наркоза (содержащего 1% Zoletil и 0.4% Rometar), вырезали фрагмент кожи размером 1x1 см (Рис. 2.6) и фиксировали в растворе Буена (насыщенная пикриновая кислота, 40% формалин и ледяная уксусная кислота в соотношении 15:5:1) 1 сутки.



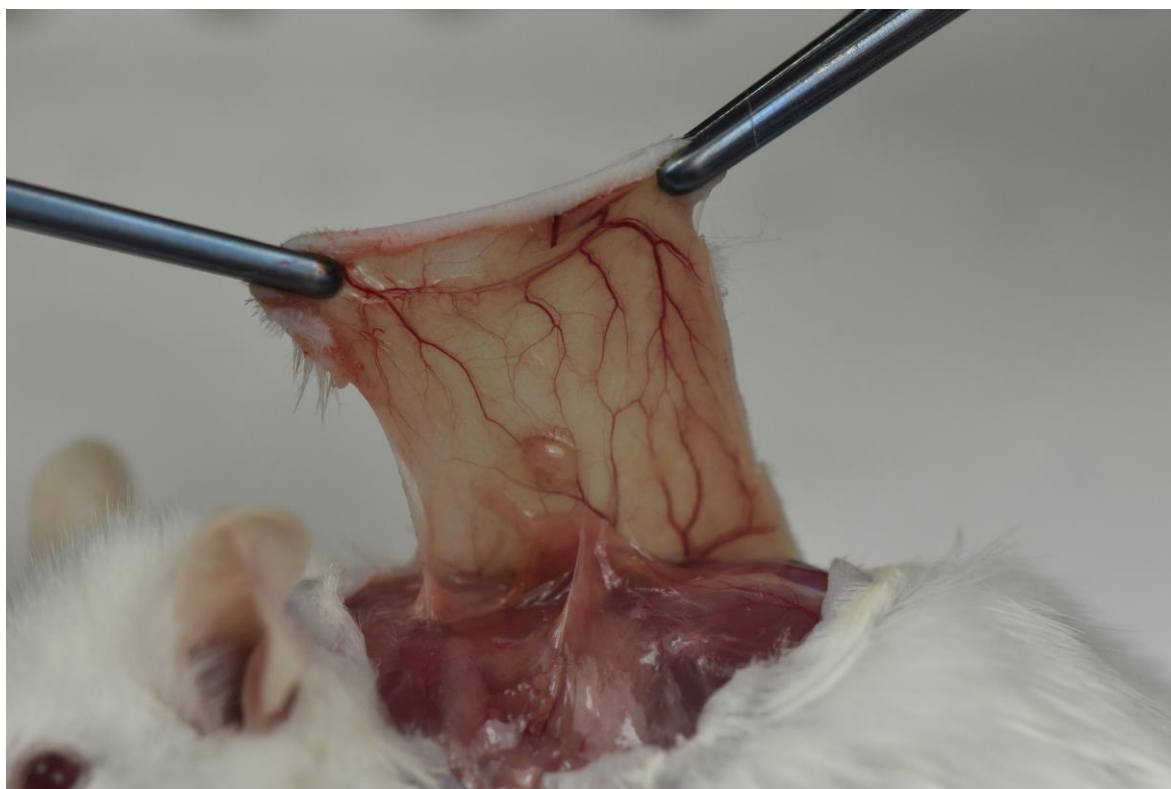


Рис. 2.6. Получение материала (кожи) для морфологического исследования.

Полученные образцы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали материал в Histomix, получали срез препарата толщиной 7 мкм. Проводка материала проводилась по стандартному протоколу с последующим окрашиванием срезов гематоксилин-эозином для проведения классического гистологического исследования и подсчета толщины дермы.

Толщину дермы измеряли после фотографирования под световым микроскопом в препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. Дермальная толщина была определена как среднее расстояние между эпидермально-дермальным и кожно-подкожно-жировым соединением и оценивалось по 6 разным участкам кожи у каждой мыши [110].

Для оценки выраженности накопления коллагена срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в этаноле, с последующей фиксацией в фиксаторе Буэна в течение 1 ч при 55 С. Ядра окрашивали раствором хлорида железа, затем коллаген окрашивали спиртовым раствором гематоксилина и раствором трихрома.

Общее содержание коллагена рассчитывалось в процентах от анилинового синего окрашивания ткани, деленного на общую площадь среза с использованием программного обеспечения Image [170]. Гистологическая оценка препаратов проводилась методом световой микроскопии при стократном -, четырехсот – и пятисоткратном увеличении (микроскоп ZEISS Axio Lab. A1).

Также проводили окраску препаратов иммунофлюоресцентными красителями. Перед этим проводили депарафинизацию посредством инкубации срезов в двух сменах О-ксилола по 20 минут при температуре 50 °С. Затем инкубировали срезы в Трис-буфере (10мМ Трис-НСl, 0.05% Твин 20, рН 9.0) 4 часа при 60°С и 20 минут при комнатной температуре, после чего отмывали срезы фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 1% Tween 20. Блокировку неспецифических сайтов связывания антител осуществляли посредством инкубации в течение 30 минут в ФСБ, содержащем 0,5% БСА, 1% Твин, 0,3 мМ глицин и 10% ФСБ. Подготовку срезов проводили в ФСБ с 0,5% БСА, 1% Тритон 100х, глицин 0,3мМ 1 час при комнатной температуре. Для выявления целевых антигенов инкубировали срезы в растворе антител из расчета 1:200 в ФСБ с 0,5% БСА, 1% Тритон 100х, глицин 0,3мМ при 4 °С в течение ночи. Удаляли не связавшиеся антитела, инкубируя срезы 3 раза по 2 минуты в ФСБ с 1% Твин 20. Изображения получали на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation) и объективом CFI Plan Apo VC 20x/0,75. Для обнаружения  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA – красный), был использован Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle - Cy3™ antibody, Mouse monoclonal (Sigma-Aldrich, cat. #C6198), ядра клеток – синий, выявлены Hoechst 33342. Для идентификации гранулоцитов (Gr-1 – зеленый), были использованы Ly6G-FITC ThermoFisher 11-5931-82 и Ly6C-PE-Cy7 ThermoFisher 25-5932-82, ядра клеток – синий, выявлены Hoechst 33342. Общелейкоцитарный антиген (CD45 – зеленый), выявлен с использованием CD45 Monoclonal Antibody (30-F11), FITC, eBioscience™ (ThermoFisher cat. #11-0451-82), ядра клеток – синий, выявлены Hoechst 33342. Макрофаги (F4/80 – зеленый), выявлены с использованием F4/80 Monoclonal Antibody (BM8), eBioscience™ (ThermoFisher cat. #14-4801-82), ядра клеток – синий, выявлены Hoechst 33342.

### *2.4.3 Иммунохимические исследования*

На 0, 7, 14 и 21-е сутки, у животных, которых выводились из эксперимента для проведения гистологических исследований одновременно проводился забор крови для проведения иммуноферментного анализа С-реактивного белка. Для этого, полученную из камер сердца кровь (объемом 1,0 мл, смешанную с 3 каплями цитрата натрия) предварительно центрифугировали в течение 15 минут в режиме 1500 g, далее полученную сыворотку использовали для проведения иммуноферментного анализа на микропланшетном фотометре для Stat Fax 2100 (Awareness Technology). В работе использовались наборы Mouse CRP (иммуноферментный набор для количественного определения СРБ мыши).

## **2.5. Методы статистического анализа полученных данных**

Проверка выборок на соответствие закону нормального распределения проводилась при помощи критерия Шапиро-Уилка. Переменные (имеющие нормальное распределение) представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

При сравнении двух выборок применялся непарный критерий Стьюдента с учетом равенности дисперсий. При анализе различий в двух группах на разных временных точках применялся двухфакторный дисперсионный анализ в качестве омнибусного теста. Проверка соблюдения допущений метода показала приемлемое качество модели. При проведении апостериорных сравнений проводилась коррекция уровня статистической значимости при помощи подхода FDR (false discovery rate). На графиках указывали среднее значение и 95%-доверительный интервал (95% ДИ).

Для оценки информативности выбранных критериев вычисляли чувствительность (долю наблюдений с интересующим исходом и наличием признака среди всех наблюдений с исходом) и специфичность (долю наблюдений с без наступления интересующего исхода и отсутствием признака среди всех наблюдений без наступления исхода интереса), а также 95% ДИ. При этом

пороговое значение признака определяли при помощи вычисления индекса Юдена (Youden's index, J statistic). Для оценки балансовой точности вычисляли площадь под ROC-кривой и 95%ДИ, для оценки силы связи признака и исхода – отношение шансов и 95%ДИ.

Расчеты проводились в программе GraphPad Prizm v.8. Оценивался двусторонний уровень значимости. Значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА КОЖИ

В соответствии с целью и задачами исследования, мы всесторонне оценили изменения, происходящие в коже при различных типах воздействия (у мышей двух групп).

#### 3.1 Результаты гистологических исследований

В ходе эксперимента в группе «блеомицин» удалось воспроизвести модель фиброза кожи. Данный результат был подтвержден гистологическими исследованиями. Морфологическая оценка кожи позволила через «гистологический срез» следить за процессом фиброза, как стадии формирования рубца.

Так, на нулевые сутки после депиляции мы не отметили изменений структуры эпидермиса и дермы (Рис. 3.1).

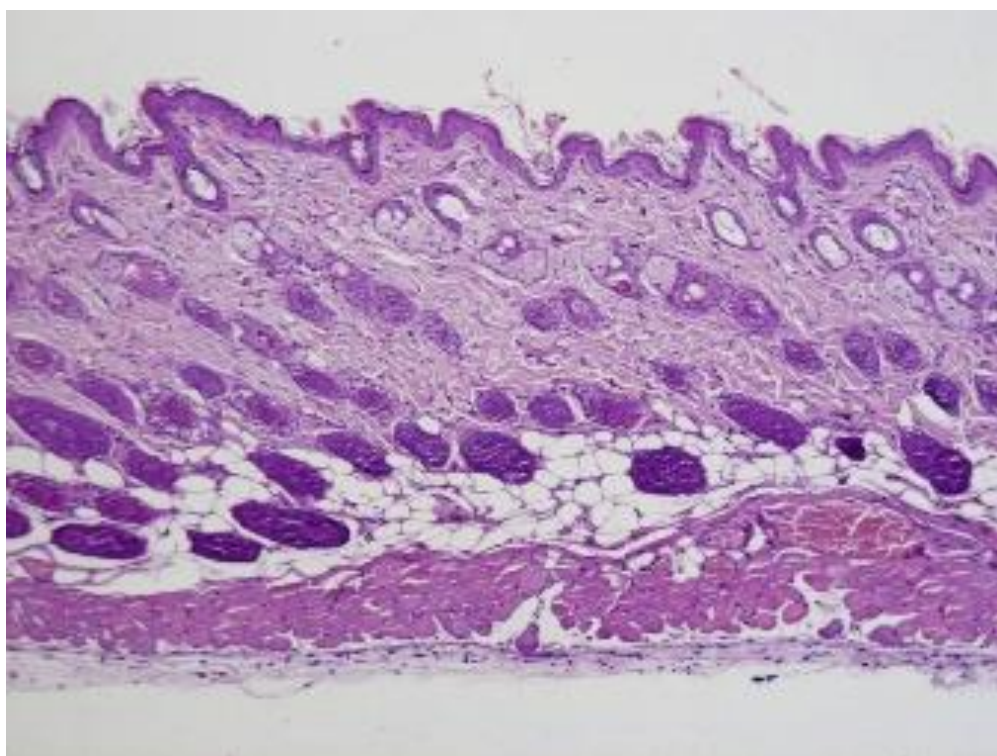


Рис. 3.1. Кожа мыши, 0-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение.

На рисунке 3.1 представлена кожа и подкожно-жировая клетчатка нормального гистологического строения. Воспалительные изменения в ней отсутствуют, придатки кожи сохранены. Аналогичная гистологическая картина кожи наблюдалась на 0 сутки и у животных группы «физ. р-р». Все значения результатов оптических и иммунохимических измерений у животных в этот период были приняты за физиологическую норму.

На седьмые сутки в группе «блеомицин» развивалась воспалительная инфильтрация долек жировой ткани лимфоцитами и гистиоцитами. Типичная микроскопическая картина приведена на рисунке 3.2.

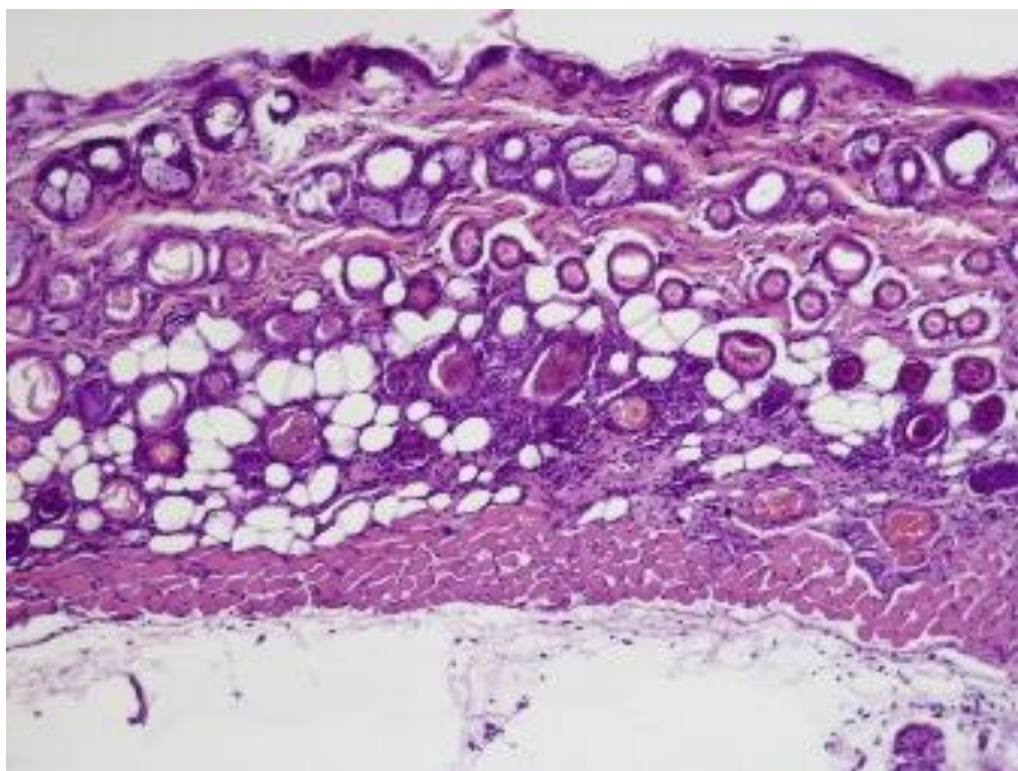


Рис. 3.2 Кожа мыши, 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение. Группа «блеомицин».

На рисунке 3.2 можно наблюдать воспаление жирового слоя кожи, очаги септолобулярного панникулита, с преимущественно лимфоцитарной инфильтрацией. Практически у всех животных из группы «блеомицин» процесс



воспаления начинался именно с подкожно-жирового слоя, с дальнейшим распространением на другие слои дермы.

На 14-е сутки происходило частичное замещение жировой ткани межклеточным матриксом и уменьшение выраженности воспалительной инфильтрации (Рис. 3.3).

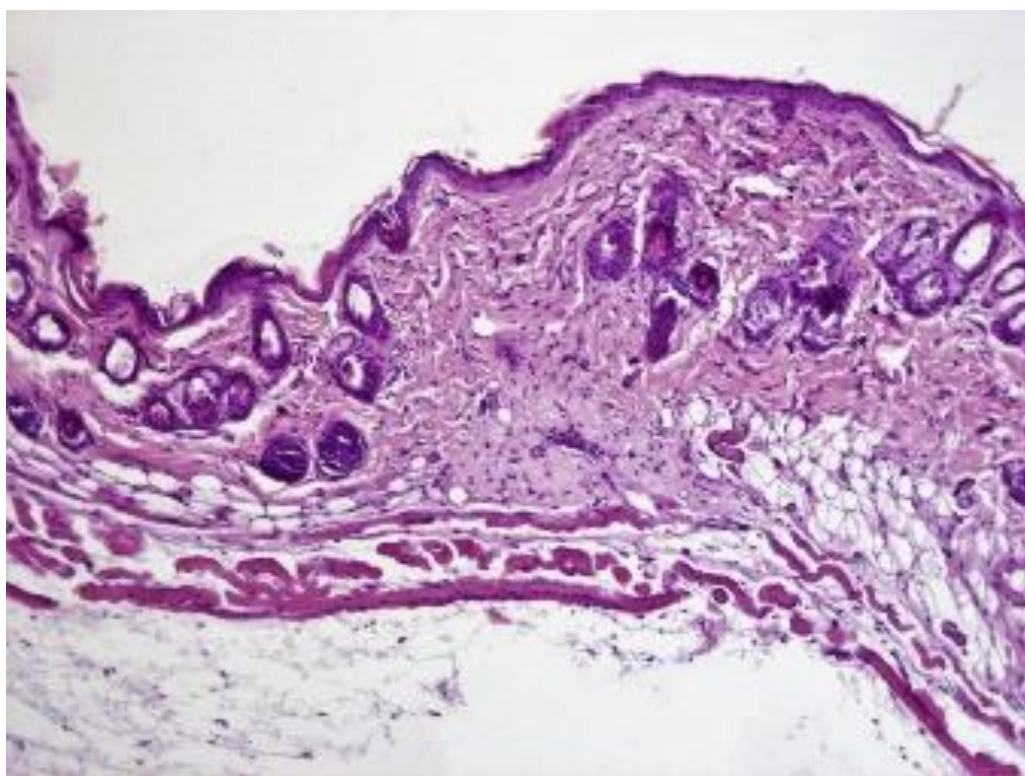


Рис. 3.3. Кожа мыши, 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение. Группа «блеомицин».

На рисунке 3.3 визуализируются очаги фиброза со сглаженностью коллагеновых волокон в глубоких отделах дермы. Часть подкожно-жировой клетчатки замещена соединительной тканью. Большая часть пилосебацейных комплексов атрофирована. Периваскулярные и интерстициальные (преимущественно лимфоцитарные) инфильтраты можно наблюдать в разных отделах кожи.

В заключительной стадии эксперимента на 21-е сутки при микроскопии отметили обширные очаги накопления межклеточного матрикса, обедненные клеточными элементами (гипоцеллюлярный фиброз), сглаженность коллагеновых волокон (Рис. 3.4).

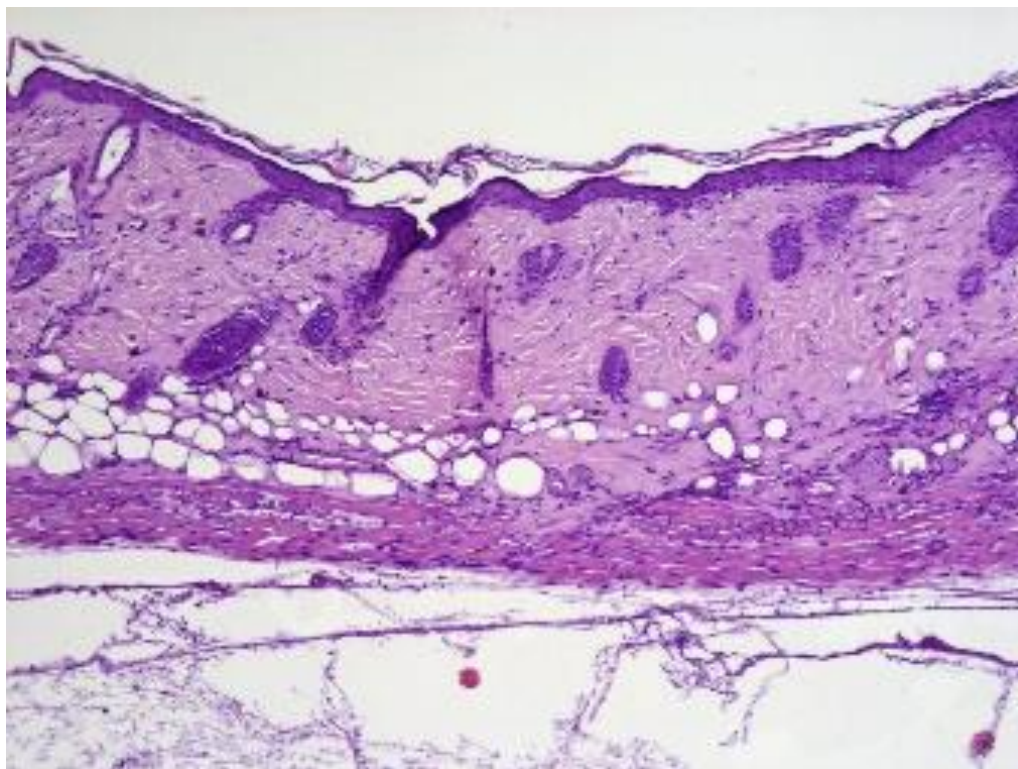


Рис. 3.4. Кожа мыши, на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение. Группа «блеомицин».

Как следует из рисунка 3.4, на 21-е сутки эксперимента, наблюдались диффузные фибротические изменения в дерме и подкожно-жировой клетчатке. Полная атрофия придатков кожи.

В группе «блеомицин» при 400-кратном увеличении хорошо видны участки гомогенизированного коллагена, обедненные клеточными элементами (Рис. 3.5). Однако, у части животных этой группы на 21-е сутки, несмотря на пролиферацию соединительной ткани, выраженную гомогенизацию коллагеновых волокон, сохранялись множественные очаги клеточной инфильтрации. Вероятнее всего это могло быть обусловлено реакцией на микротравмы кожи, которые могли быть получены при депилировании кожи животных.



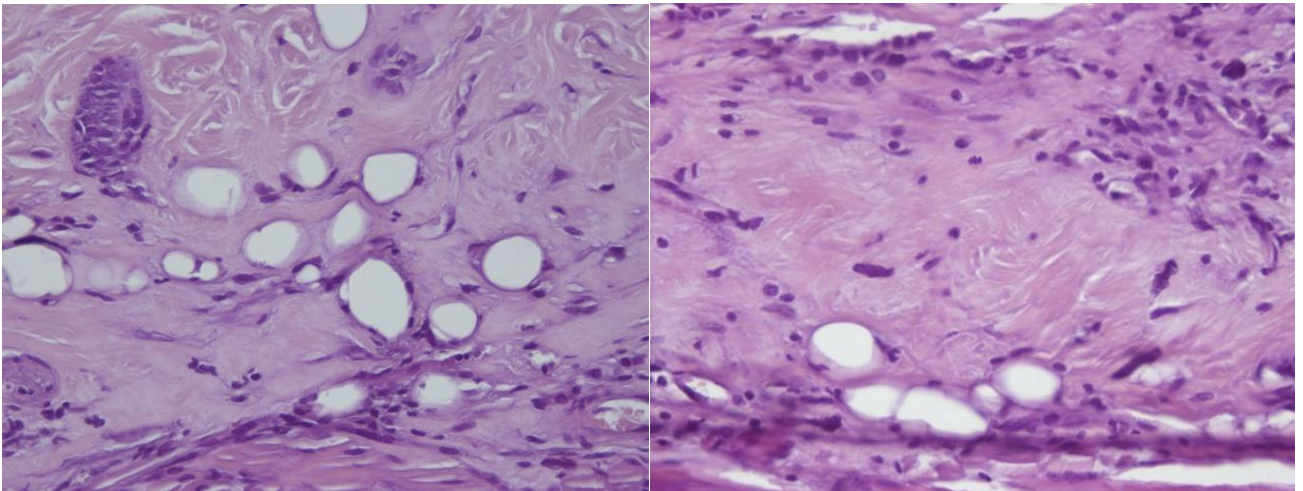


Рис. 3.5. Кожа мыши, 21-е сутки. Окраска гематоксилином-эозином, световая микроскопия, 400-кратное увеличение. Группа «блеомицин».

У некоторых животных из группы «блеомицин» морфологическая картина кожи на 21-е сутки была представлена гиперплазированным эпителием волосяных фолликулов, гиперплазией эпителия, образованием фолликулярных кист, заполненных роговыми массами (Рис. 3.6).

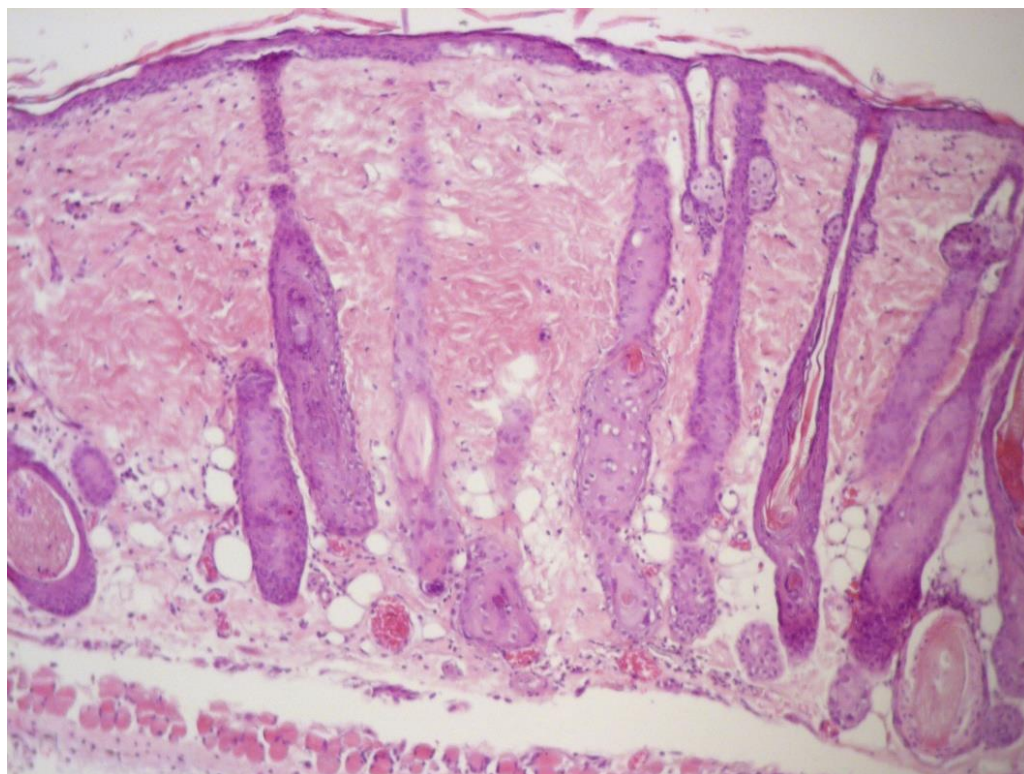


Рис. 3.6. Кожа мыши, 21-е сутки. Окраска гематоксилином-эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение. Группа «блеомицин».

Вероятнее всего, такая картина связана с забором материала в разные жизненные циклы волосяных фолликулов кожи экспериментальных животных.

Таким образом, в ходе эксперимента в группе «блеомицин» удалось воспроизвести модель фиброза кожи.

В препаратах животных группы «физ. р-р» начиная с седьмых суток эксперимента фиксировались воспалительные изменения в подмышечном слое дермы. Эти же изменения без тенденции к прогрессированию были отмечены нами и во все последующие этапы эксперимента. Таким образом, данные воспалительные изменения можно с уверенностью трактовать как неспецифическую реакцию, вызванную ежедневными инъекциями без развития фиброза.

Для сравнения на рисунке 3.7 приведены типичные микроскопические картины на 21-е сутки исследования в группах «блеомицин» и «физ. р-р».

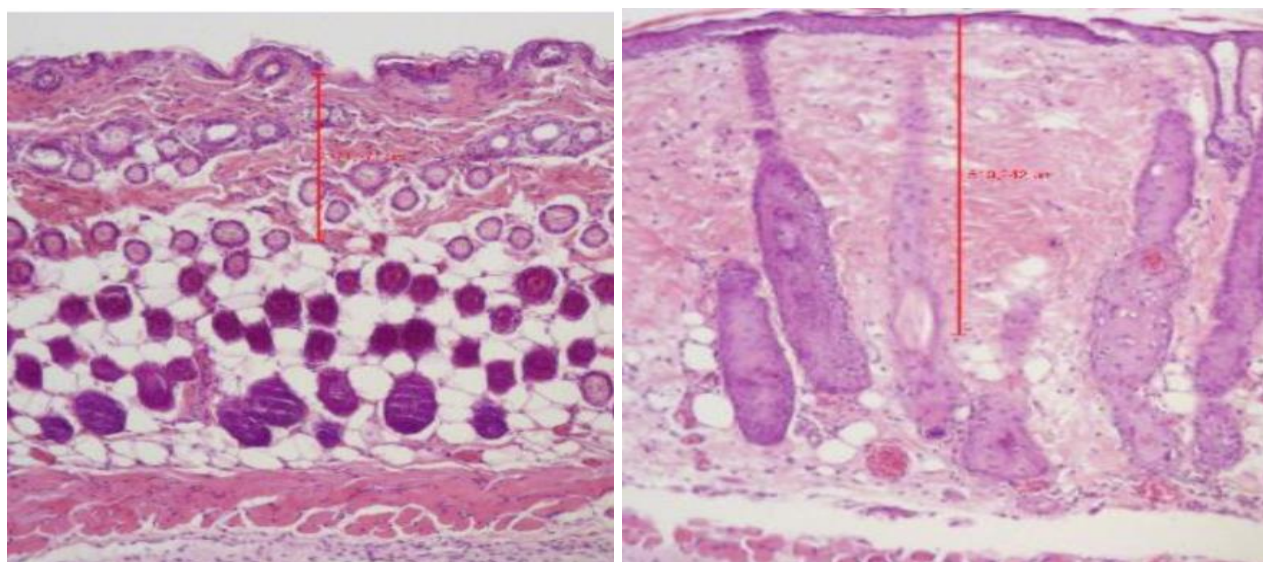


Рис. 3.7. Кожа мышей, 21-е сутки. Группа «физ. р-р» (слева) и «блеомицин» (справа). Окраска гематоксилином-эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение. Красная линия обозначает среднюю толщины дермы (в группе «физ. р-р» – 328,714 мкм, в группе «блеомицин» - 510,242 мкм).

Одним из результатов моделирования фиброза кожи, является постепенное утолщение дермы животных. Таковую картину можно проследить на рисунке 3.8.

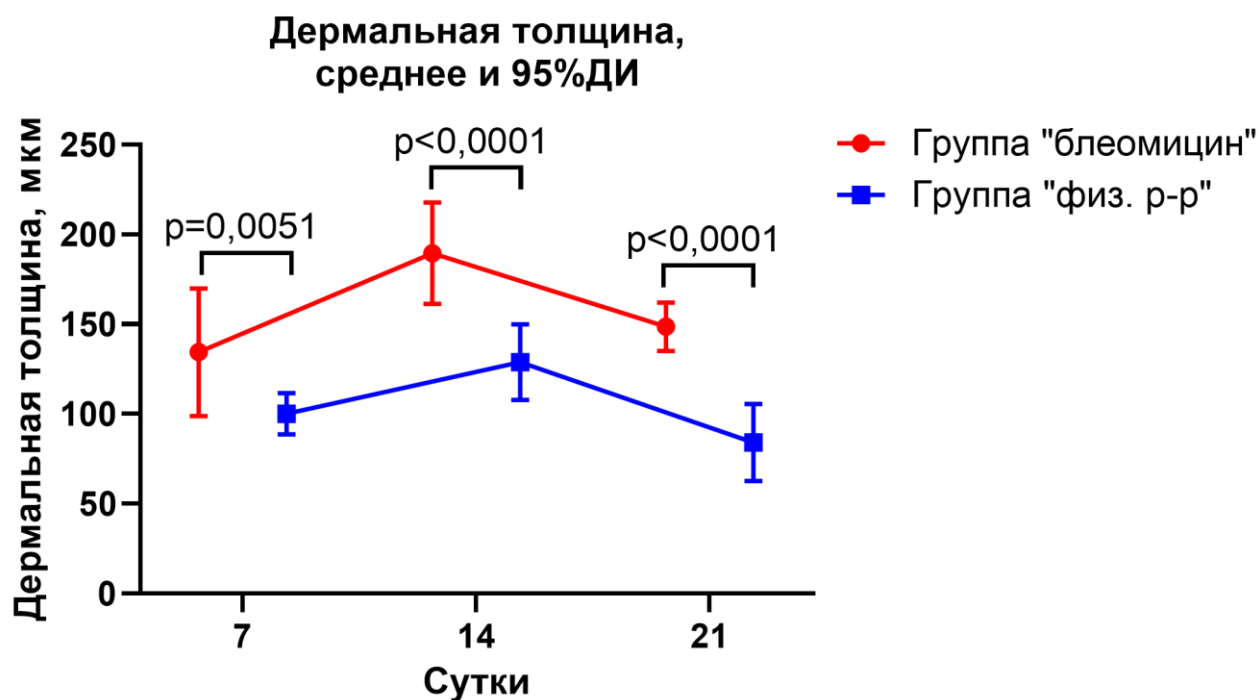


Рис. 3.8. Динамика толщины дермы у животных обеих групп.

Так у животных группы «блеомицин» к 14-м суткам происходило значительное увеличение толщины дермы по сравнению с 7-ми сутками ( $p=0,0001$ ). К 21-м суткам толщина дермы снизилась ( $p=0,0016$ ). В группе «физ. р-р» также на были отмечены подобные изменения: ( $p=0,0125$  – 7-14 сутки,  $p=0,0008$  – 14-21 сутки). Тем не менее, различия между группами были статистически значимы на всех временных точках:  $p=0,0051$  на 7-е сутки,  $p < 0,0001$  на 14-е сутки и  $p < 0,0001$  на 21-е сутки.

Типичная морфологическая картина в двух группах представлены на рисунке 3.9. Гистологическая картина в группе «блеомицин» на 7 сутки показывает нормальную структуру и толщину дермы, сохранение аднексальных структур и наличие мелкоочаговой лейкоцитарной инфильтрации в дерме и подкожной мышце. На 14 сутки появляется атрофия пилосебацейных комплексов, гомогенизация коллагена, замещение соединительной тканью подкожно-жировой клетчатки. Слабовыраженная диффузная лейкоцитарная инфильтрация всех слоев дермы, остатков жировой ткани и подкожного мышечного слоя. На 21 сутки наблюдается полное отсутствие придатковых структур кожи, склероз дермы и подкожно-жировой клетчатки, диффузная лейкоцитарная инфильтрация, более выраженная в верхних слоях дермы.



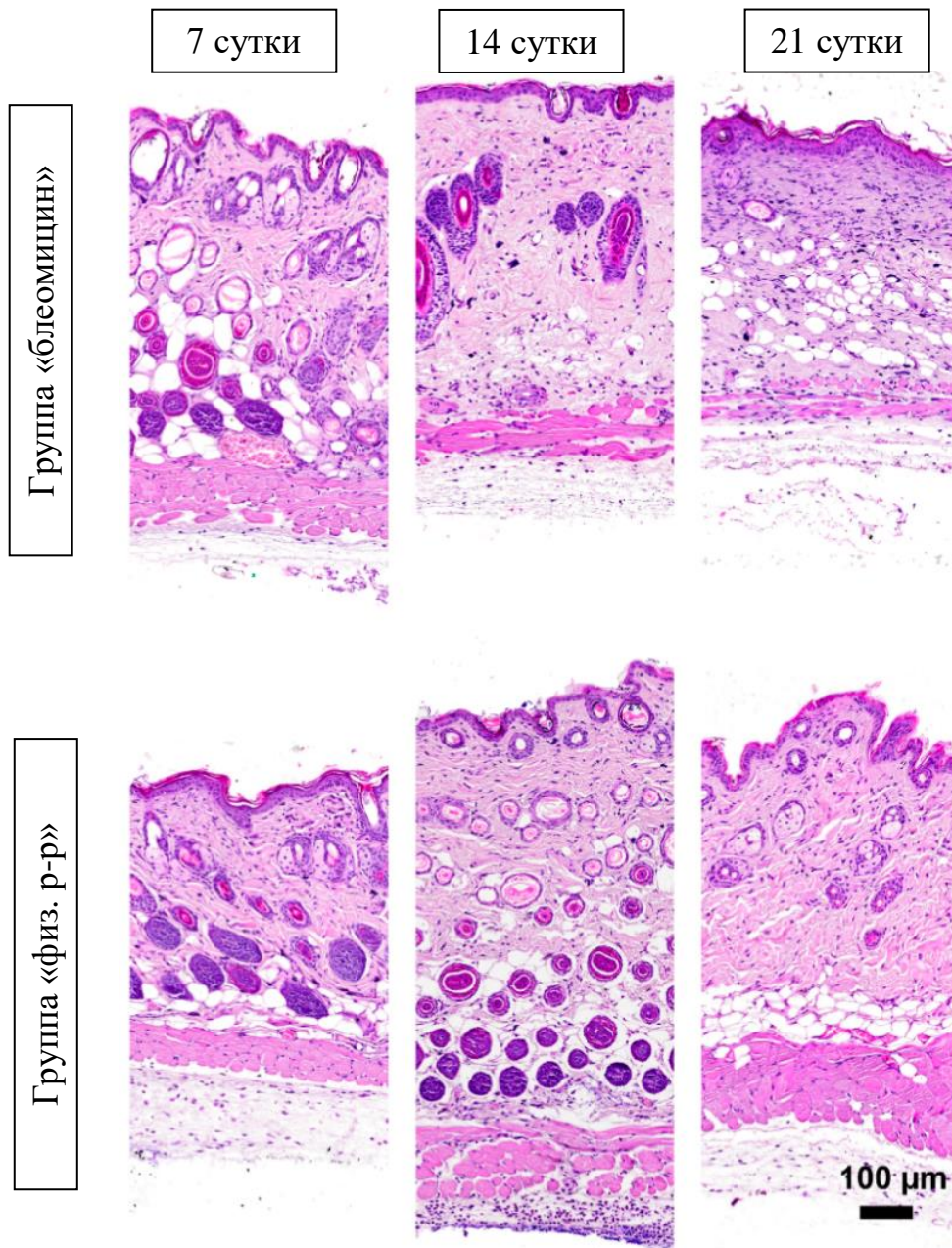


Рис. 3.9. Кожа мышей на 7, 14 и 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физ.р-р». Окраска гематоксилином-эозином, световая микроскопия, 100-кратное увеличение.

В группе «физ. р-р» на всех контрольных точках эксперимента отмечается воспалительная инфильтрация под подкожной мышцей, что вероятнее всего обусловлено ежедневными подкожными инъекциями. Структура дермы и эпидермиса не изменена.

Для того, чтобы подтвердить, что утолщение дермы кожи вызвано накоплением коллагена, как основного вещества соединительной ткани, у животных обеих групп были подготовлены препараты с окраской по Массону (трихром). Общее содержание коллагена рассчитывалось в процентах от анилинового синего окрашивания ткани, деленного на общую площадь среза (Рис. 3.10).

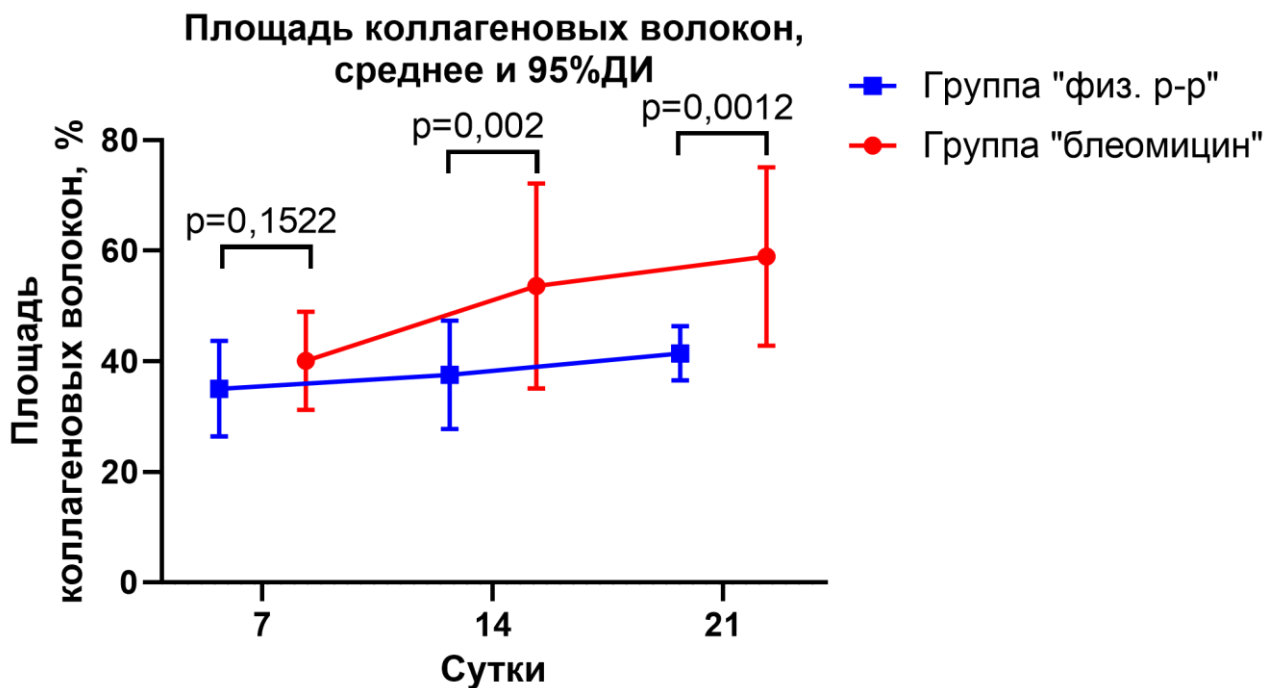


Рис. 3.10. Динамика площади коллагеновых волокон у животных обеих групп.

Так в группе «блеомицин» к 14-м суткам наблюдалось увеличение площади коллагеновых волокон ( $p=0,0054$  по сравнению с 7-ми сутками). К 21-м суткам этот показатель еще несколько увеличился ( $p=0,1513$ ) и был значительно выше по сравнению с 7-ми сутками. В группе «физ. р-р» статистически значимой динамики мы не отметили:  $p=0,2836$  при сравнении 7-14 сутки,  $p=0,2125$  при сравнении 14-21 сутки и  $p=0,1090$  при сравнении 7-21 сутки. Вместе с тем, на 14-е и 21-е сутки различия между группами были статистически значимы –  $p=0,002$  и  $p=0,0012$  соответственно, (но не 7-е сутки –  $p=0,1522$ ).

Типичная морфологическая картина в двух группах представлены на рисунке 3.11.

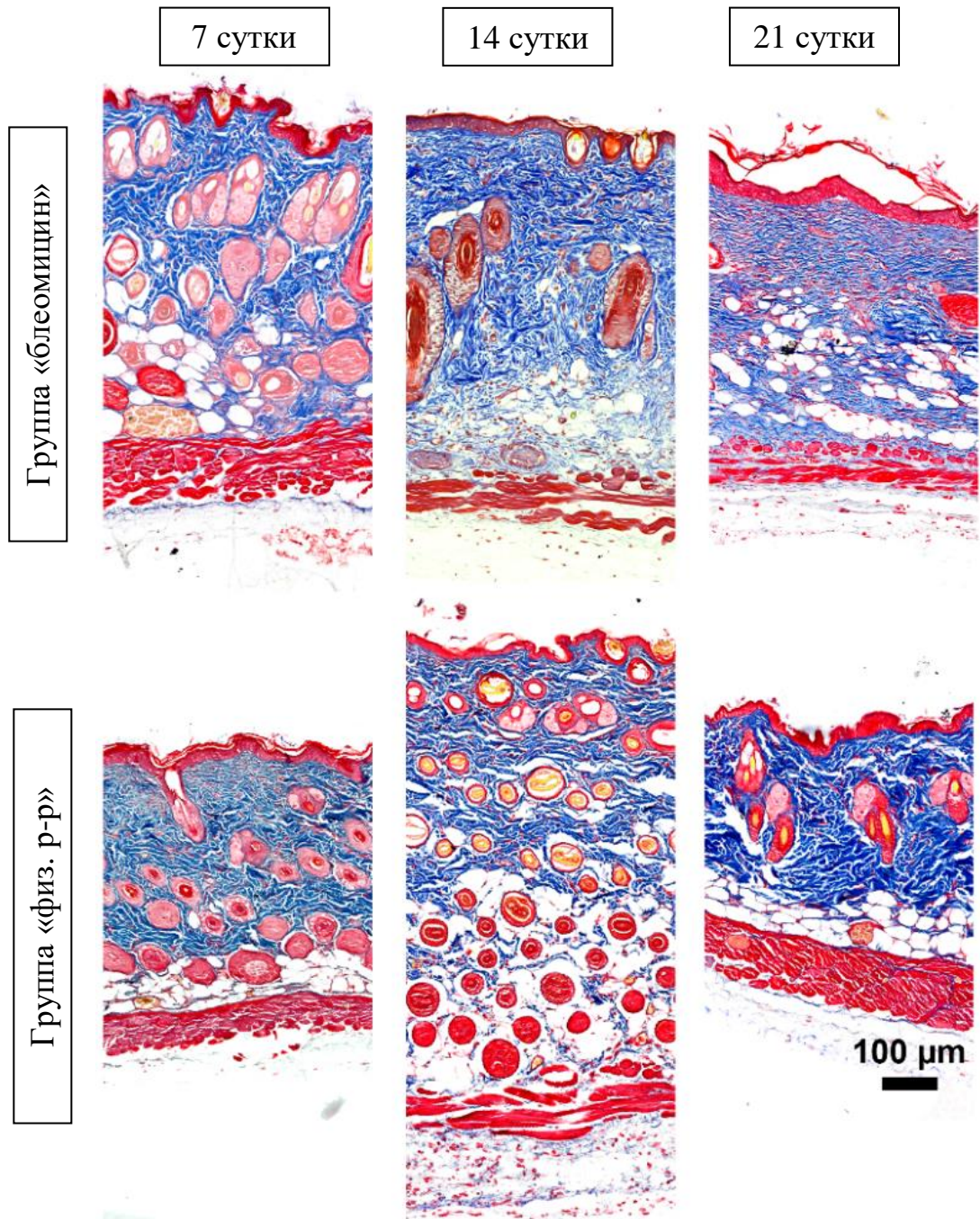


Рис. 3.11. Кожа мышей на 7, 14 и 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физ.р-р». Окраска по Массону (трихром), световая микроскопия, 100-кратное увеличение.



Таким образом, как следует из рисунков 3.10 и 3.11 в группе «блеомицин» отмечается избыточное отложение коллагеновых волокон. Кроме того, морфологически наблюдается истончение структуры коллагеновых волокон (с максимумом на 21 сутки), что коррелирует с картиной их гомогенизации по классической гистологии. В группе «физ. р-р».

### **3.2. Результаты иммунофлюоресцентных исследований**

На рисунке 3.12 можно проследить за состоянием микроциркуляторного русла дермы в процессе эксперимента в обеих группах. Так в группе «физ. р-р» характер сосудистого русла не меняется, даже несколько обогащается к 21 суткам. Противоположная картина с обеднением капиллярной сети, наиболее выраженная к 21 суткам, наблюдается в группе «блеомицин».

На рисунке 3.13 показана динамика гранулоцитов в тканях, отражающая преобладание этих клеток в группе «блеомицин» на 14 и 21 сутки. В группе «физ. р-р» гранулоциты не обнаружены.

На рисунке 3.14 визуализирован общелейкоцитарный антиген, с преобладанием в группе «блеомицин» на всех контрольных точках. Учитывая результаты иммунофлюоресценции Gr-1 – зеленый, клеточный состав вероятнее всего представлен преимущественно лимфоцитарным звеном.

Макрофаги являются активными клеточными участниками раневого процесса еще со стадии воспаления. Известно, что на стадии ремоделирования в патологических рубцах активируются макрофаги типа M2, которые связаны с активацией фибробластов, образованием коллагена и другими фиброгенными нарушениями [36]. Такую картину можно проследить на рисунке 3.15.



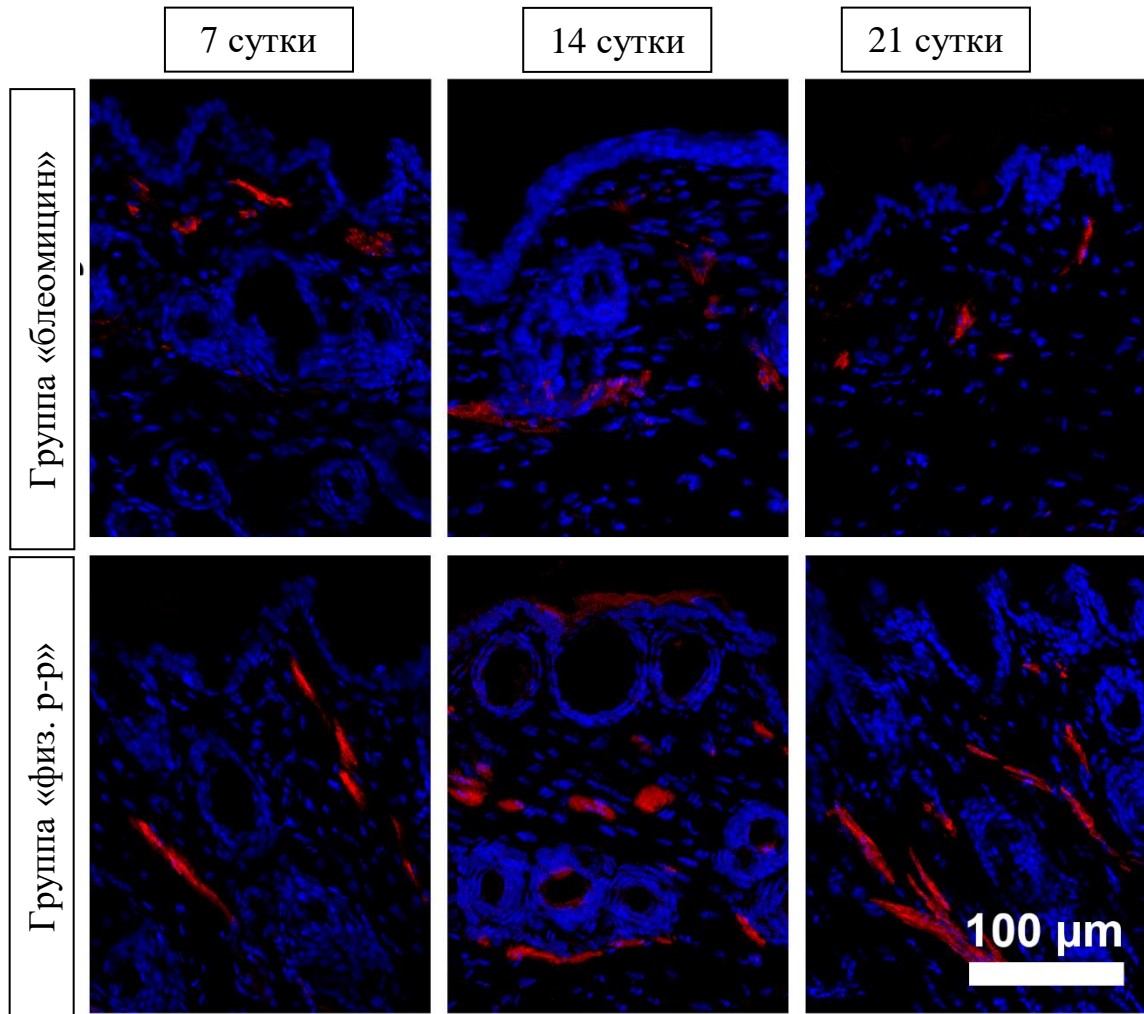


Рис. 3.12. Кожа мышей на 7, 14 и 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физ.р-р». Окраска  $\alpha$ -SMA – красный, флюоресцентная микроскопия, 100-кратное увеличение.

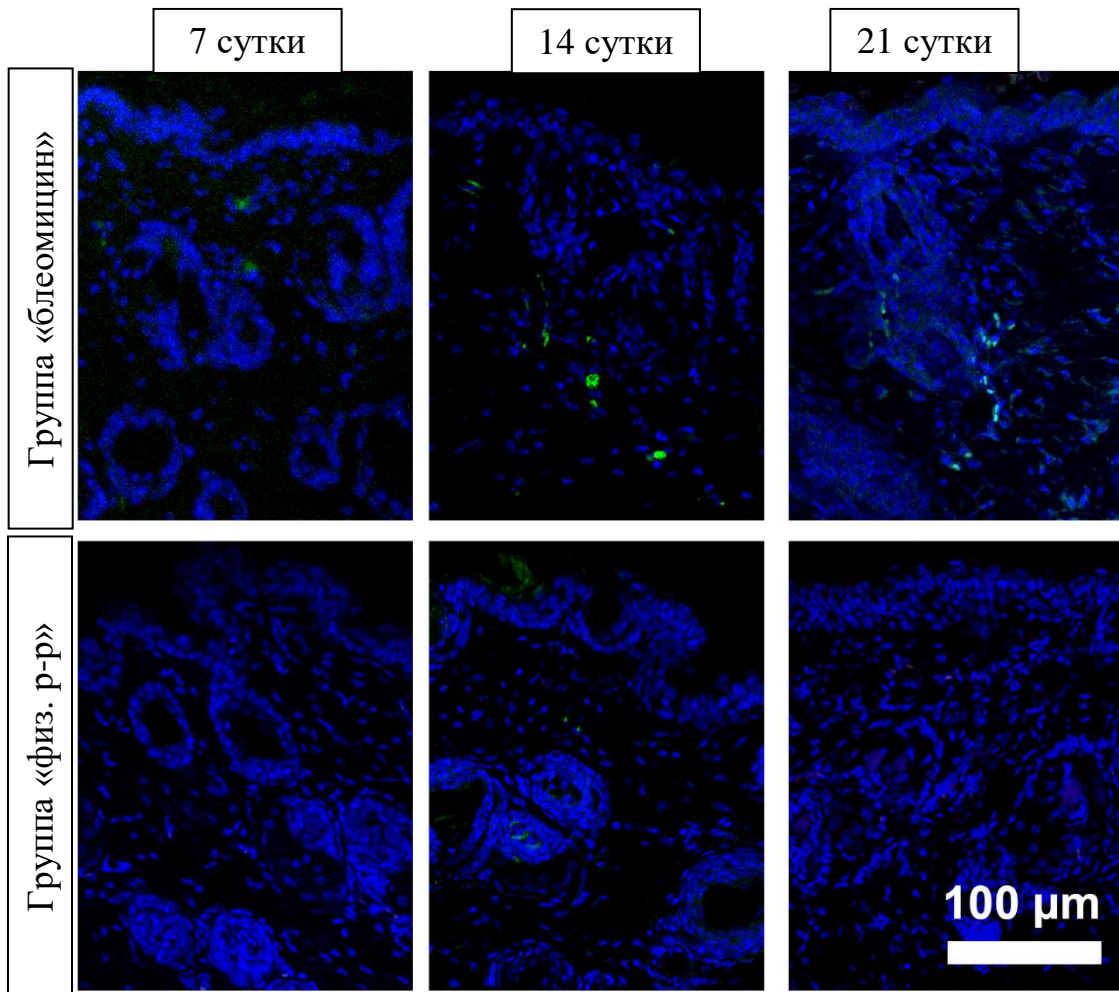


Рис. 3.13. Кожа мышей на 7, 14 и 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физр-р». Окраска Gr-1 – зеленый, флюоресцентная микроскопия, 100-кратное увеличение.

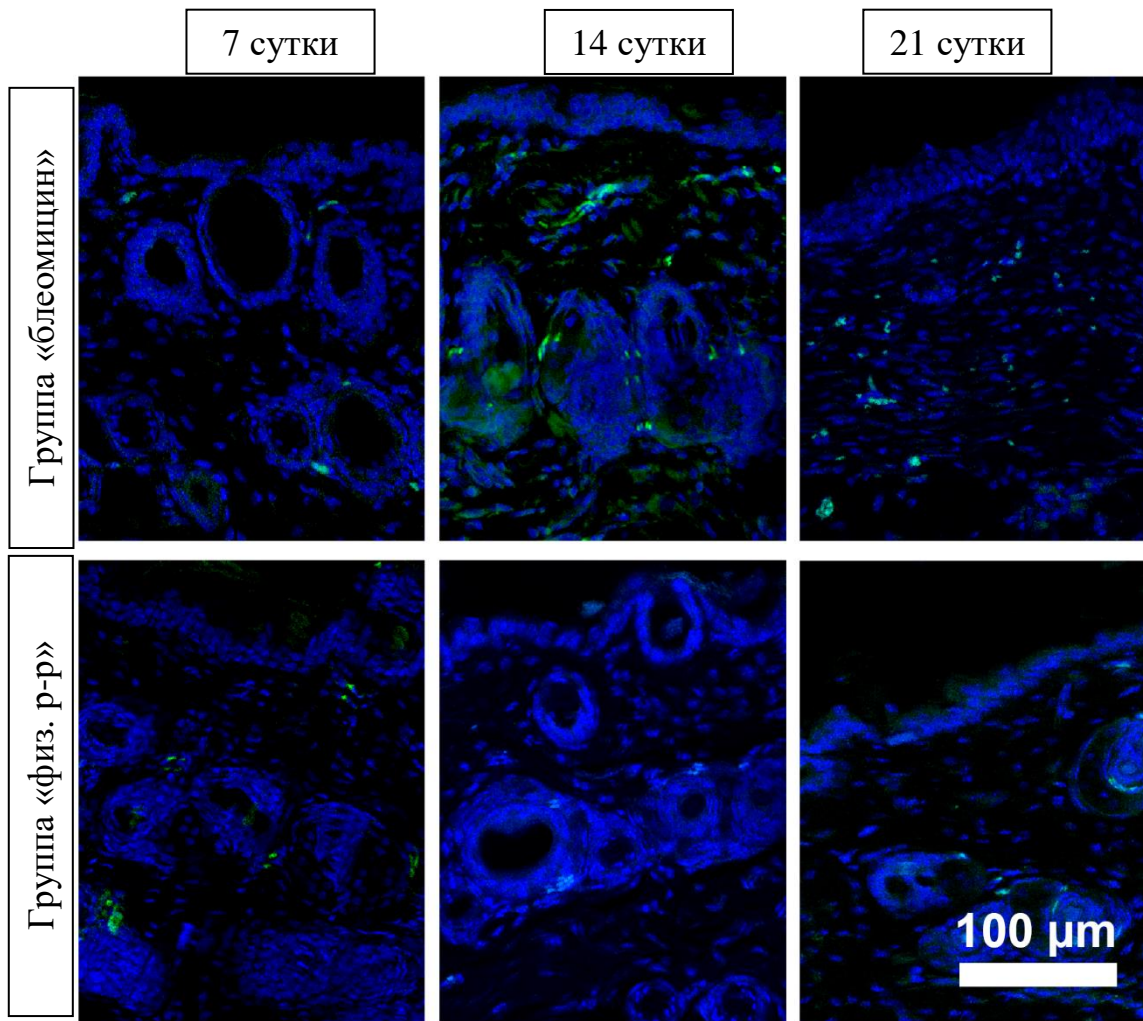


Рис. 3.14. Кожа мышей на 7, 14 и 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физ.р-р». CD45 – зеленый, флюоресцентная микроскопия, 100-кратное увеличение.



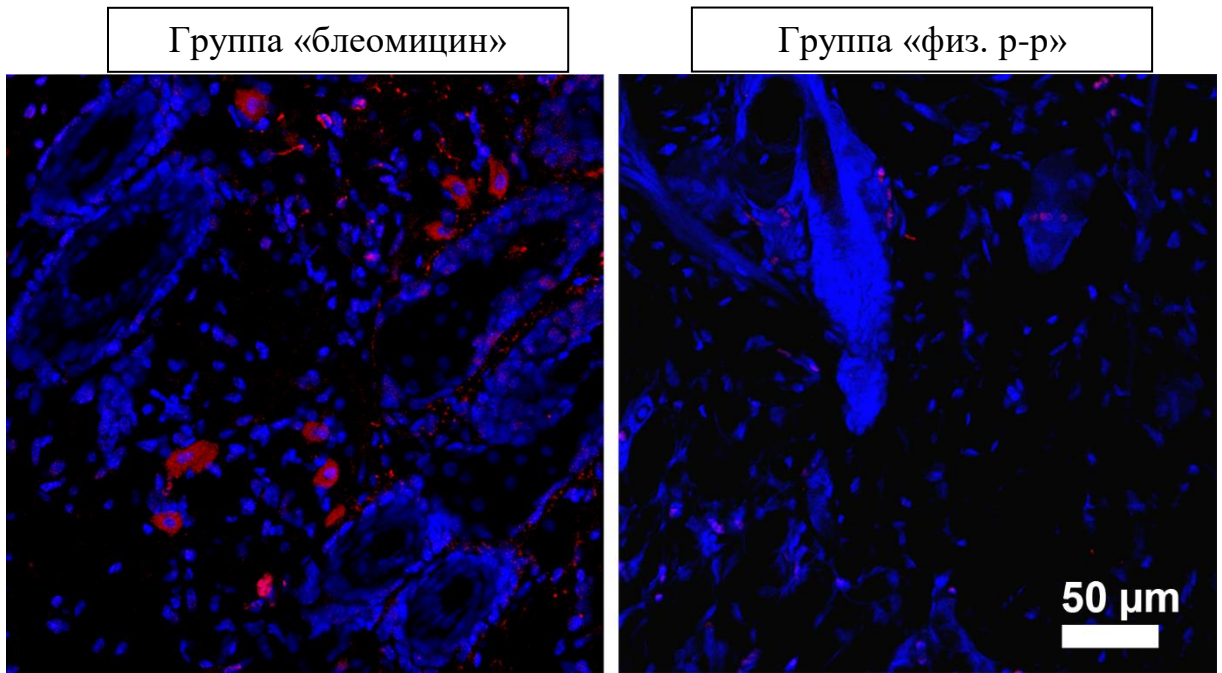


Рис. 3.15. Кожа мышей на 21-е сутки. Группы «блеомицин» и «физ.р-р». F4/80 – зеленый, флюоресцентная микроскопия, 400-кратное увеличение.

### 3.3. Результаты иммунохимических исследований

Полученные результаты по уровню СРБ представлены на рисунке 3.16.

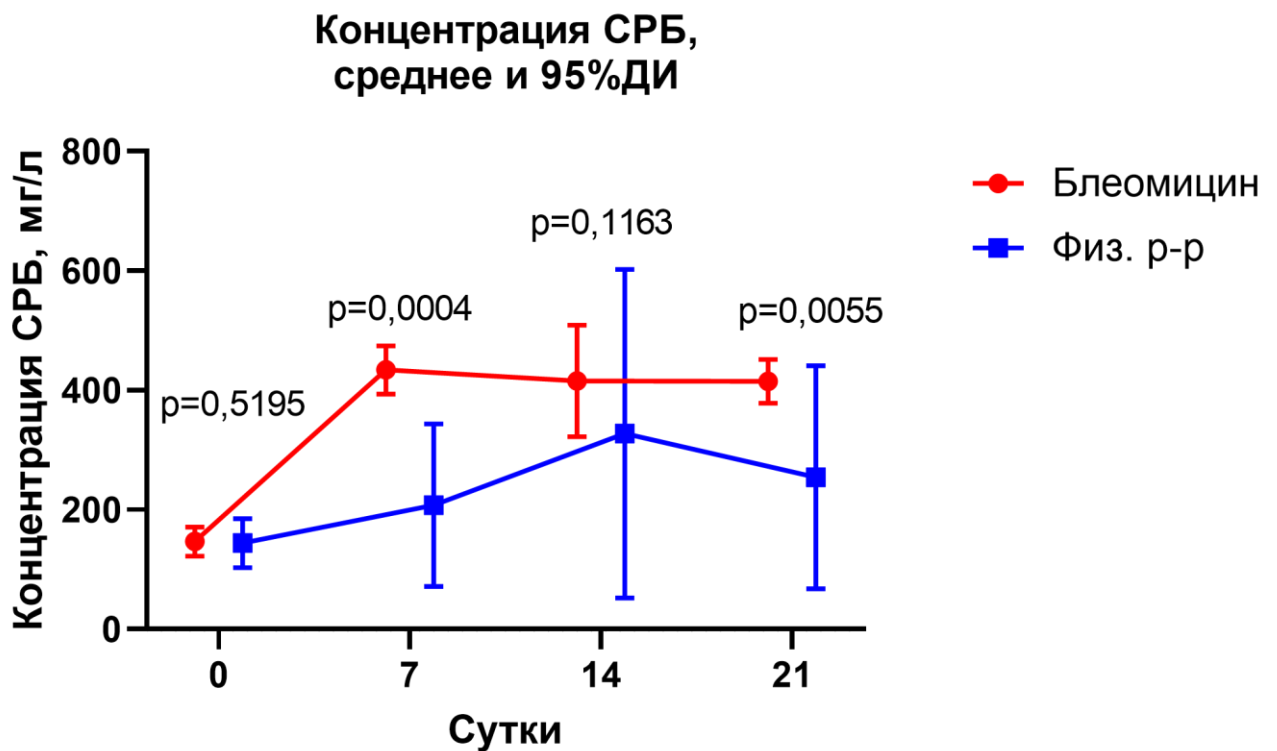


Рис. 3.16. Динамика концентрации СРБ в двух группах.

Статистически достоверная разница между группами «блеомицин» и «физ. р-р» была зафиксирована на 7-е сутки и 21-е сутки. Так к 7-м суткам с группе «блеомицин» было зафиксировано значительное увеличение содержания СРБ –  $p < 0,0001$ . В группе «физ. р-р» рост содержания СРБ был статистически незначимым –  $p = 0,195$ . На 7-е сутки различия между группами были статистически значимы –  $p = 0,0004$ . Далее в группе «блеомицин» концентрация СРБ оставалась относительно стабильной: на 14-е сутки по сравнению с 7-ми сутками – 0,4188 и на 21-е сутки по сравнению с 14-ми  $p = 0,5195$ . И на 14-е, и на 21 сутки концентрация СРБ была выше исходного уровня  $p < 0,0001$  и  $p < 0,0001$ , соответственно.

В группе «физ. р-р» динамика была несколько иной. На 14-е сутки концентрация СРБ продолжила увеличиваться, однако на этом этапе мы отметили выраженную изменчивость этого показателя. В итоге, различия не достигли необходимого уровня статистической значимости ( $p = 0,0521$ ). Значимые различия с группой сравнения на этом этапе также отсутствовали ( $p = 0,1163$ ). На 21-е сутки концентрация СРБ в группе «физ. р-р» несколько снизилась ( $p = 0,1672$ ). В результате на 21-е сутки различия с группой «блеомицин» были статистически значимы ( $p = 0,0055$ ). Таким образом, в группе «физ. р-р» мы отметили значимые различия с исходным уровнем только на 14-е сутки ( $p = 0,005$ ), но не на 21-е сутки ( $p = 0,0642$ ).

### **3.4. Особенности макроскопической картины фиброза кожи**

Типичная макроскопическая картина фиброза кожи на 21-е сутки в группе «блеомицин» представлена на рисунке 3.17.

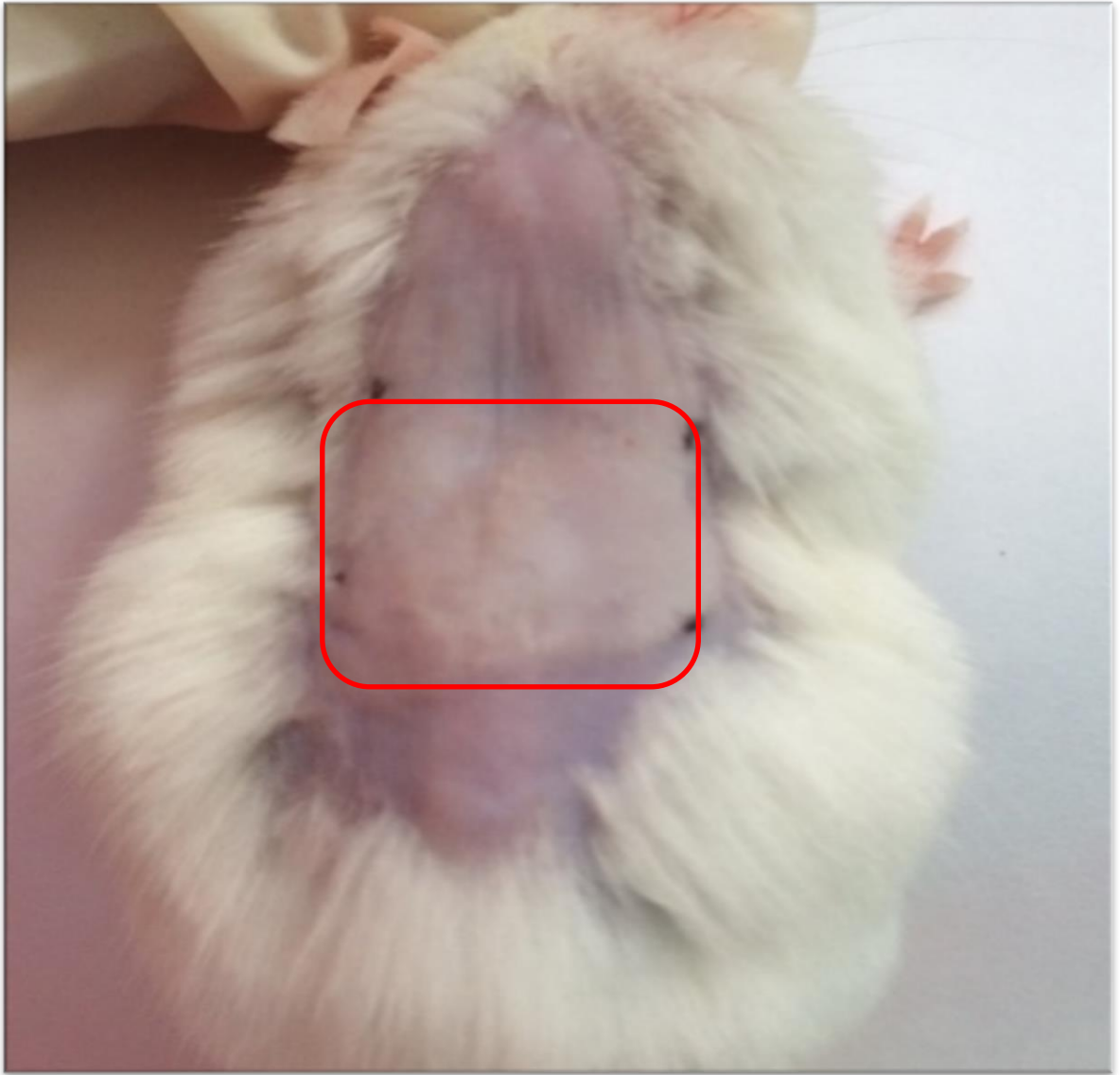


Рис. 3.17. Макроскопическая картина фиброза кожи на 21-е сутки в группе «блеомицин», гомогенный характер фиброза (красным отмечена область фиброза).

Однако, у некоторых животных к 21-м суткам эксперимента макроскопическая картина фиброза в группе «блеомицин» носила не гомогенный, а мозаичный характер. Такая картина показана на рисунке 3.18.

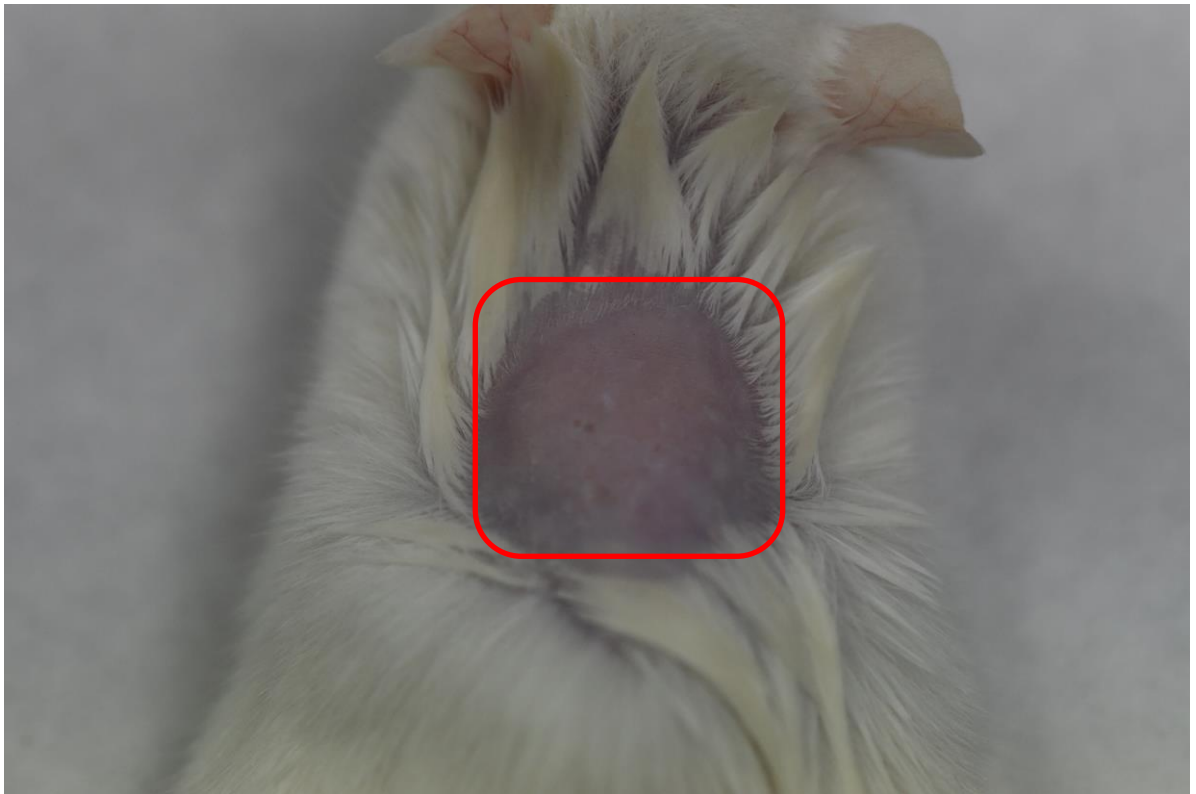


Рис. 3.18. Макроскопическая картина фиброза кожи на 21-е сутки в группе «блеомицин», мозаичный характер (красным отмечена область фиброза)

Для сравнения, на рисунке 3.19 макроскопически показан интактный характер кожи у животного на 21-е сутки в группе «физ. р-р».

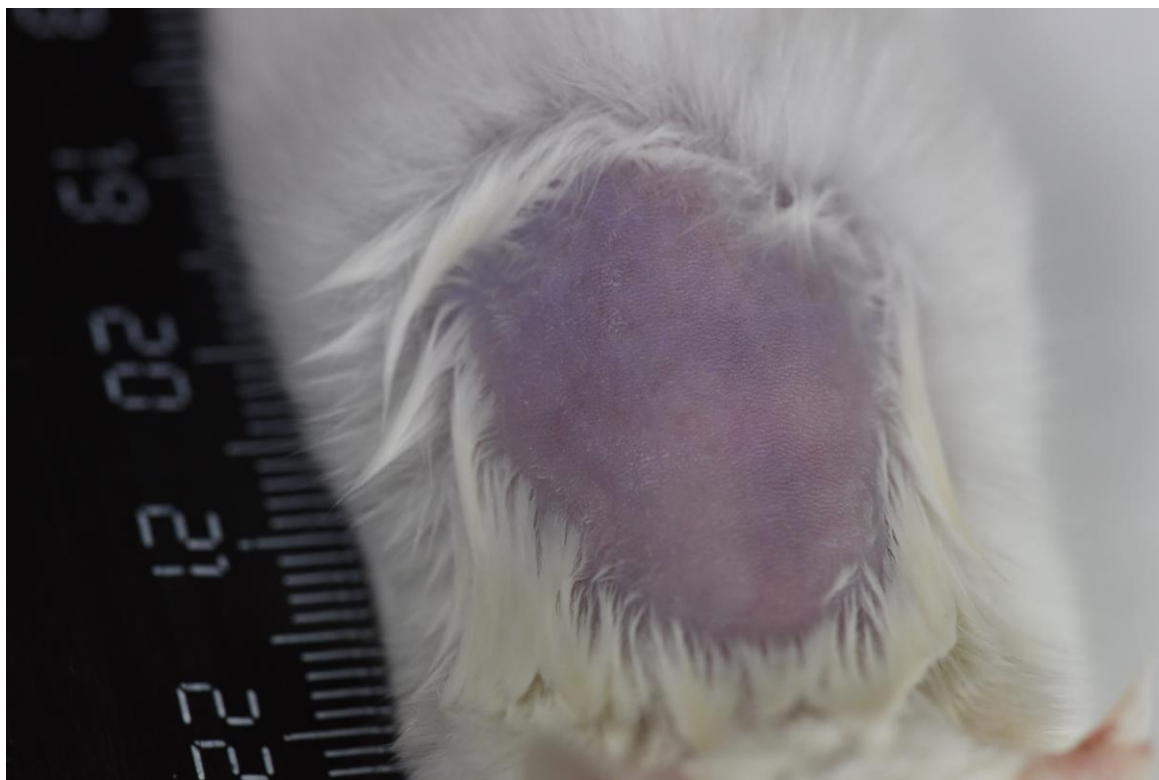


Рис. 3.19. Макроскопическая картина кожи на 21-е сутки в группе «физ. р-р», интактная кожа.



## ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОЖИ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ФАЗ ТЕЧЕНИЯ ФИБРОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА КОЖИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЕГО ИСХОДА В ЭКСПЕРИМЕНТА И КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.

### 4.1. Результаты применения лазерной флуоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии в эксперименте

На седьмые сутки после эксперимента интенсивность эндогенной флуоресценции  $I_f$  коллагена статистически незначимо уменьшалась в группе «блеомицин» ( $p=0,4757$ ), а в группе «физ. р-р» – увеличивалась ( $p=0,1462$ ) по сравнению с исходным уровнем (Рис. 4.1). В результате небольших, но разнонаправленных изменений этого показателя мы наблюдали значимые различия между группами. К 14-м суткам в группе «блеомицин»  $I_f$  коллагена незначимо увеличилась ( $p=0,1333$  по сравнению с 7-ми сутками) практически до исходных значений ( $p=0,6484$ ). В группе «физ. р-р»  $I_f$  коллагена напротив – несколько уменьшилась ( $p=0,2952$  по сравнению с 7-ми сутками) и так же приблизилась к исходным значениям ( $p=0,6484$ ). Таким образом, на 14-е сутки статистически значимые различия между группами отсутствовали ( $p=0,4764$ ).

На 21-е сутки  $I_f$  коллагена различалась статистически значимо –  $p=0,0008$ . В группе «блеомицин» этот показатель значимо увеличился и был значимо больше чем на 14-е, 7-е сутки и 0-е сутки:  $p=0,0029$ ,  $p<0,0001$  и  $p=0,0337$ , соответственно.

В группе «физ. р-р»  $I_f$  коллагена к 21-м суткам снизилась. В итоге значение этого показателя было меньше, чем на 14-е, 7-е сутки и 0-е сутки:  $p=0,3423$ ,  $p=0,0389$  и  $p=0,1462$ , соответственно.

Таким образом, в группах «блеомицин» и «физ. р-р» отмечается разнонаправленная динамика. Однако в группе при неблагоприятном течении гиперпластического процесса в коже (в группе «блеомицин») отмечаются более выраженные изменения интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена по

сравнению с благоприятным течением (группа «физ. р-р»). Значение этого показателя на 21-е сутки в группе «блеомицин» значительно отличалось от всех остальных этапов, в то время как в группе «физ. р-р» – только от значения на 7-е сутки.

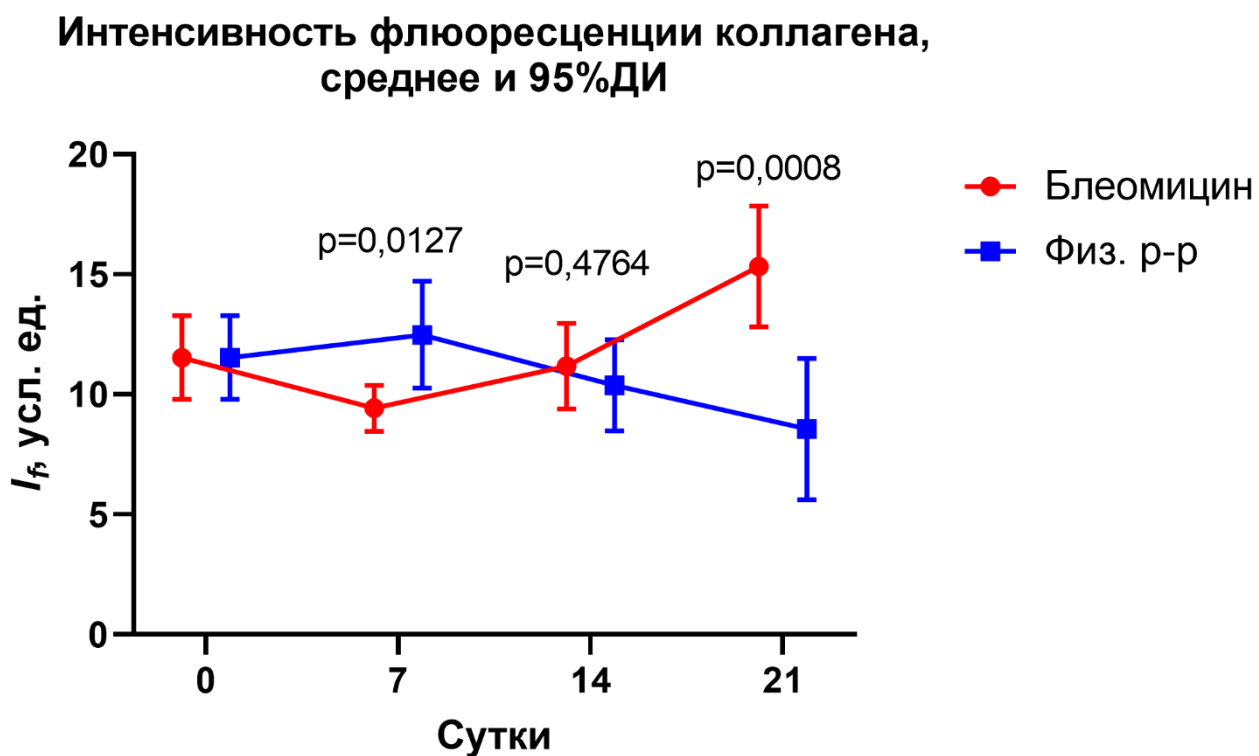


Рис. 4.1. Изменения интенсивности флюоресценции  $I_f$  коллагена в группах.

Поскольку в клинической практике, как правило, получить исходное значение показателя  $I_f$  коллагена не представляется возможным, и значение этого показателя подвержено некоторой межсубъектной вариабельности, полезной может быть оценка интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена по отношению к интактной кожи (Рис. 4.2).

Динамика относительного изменения флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена (по отношению к интактной коже) коллагена в целом была схожа с динамикой  $I_f$  коллагена, тем не менее анализ с учетом межсубъектной вариабельности показал, позволил выявить некоторые особенности. Мы так же отметили статистически значимые различия между группами «блеомицин» и «физ. р-р» на 7-е и 21 сутки, но не на 14-сутки –  $p=0,0144$ ,  $p=0,0004$  и  $p=0,6702$ , соответственно. В группе «физ.

р-р» на седьмые сутки произошло незначимое увеличение  $D(I_f)$  коллагена ( $p=0,3594$ ), а затем – постепенное снижение этого показателя. При этом, статистически значимых различий с исходным значением мы не отметили ни на 14-е, ни на 21-е сутки –  $p=0,5643$ ,  $p=0,2153$ . Таким образом, в этой группе  $D(I_f)$  коллагена оставался относительно стабильным.

В группе «блеомицин» на 7-е сутки отмечалось незначительное снижение  $D(I_f)$  коллагена ( $p=0,0909$ ), а затем монотонный рост. При этом статистически значимые различия с исходным уровнем были отмечены только на 21-е сутки, но не 14-е сутки –  $p=0,0007$  и  $p=0,6333$ , соответственно.

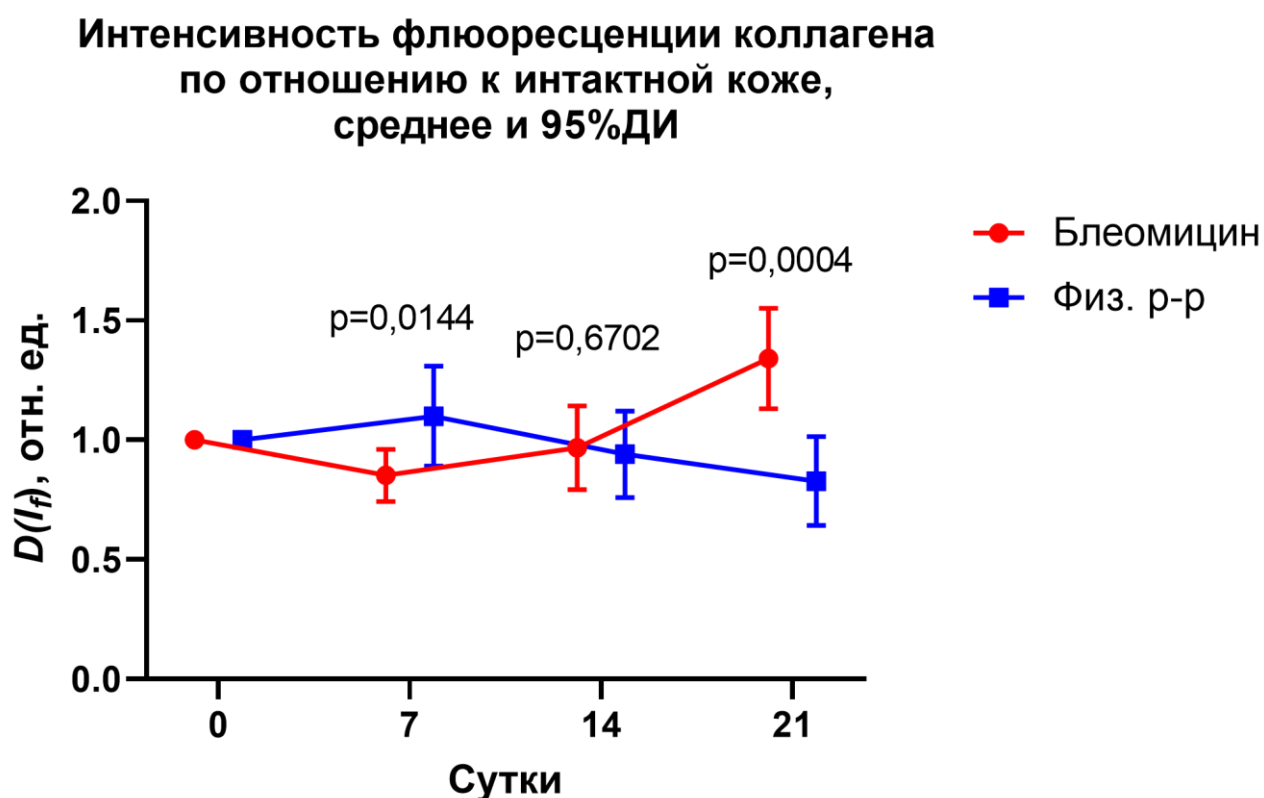


Рис. 4.2. Динамика относительного изменения интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена в группах.

В отличие от коллагена, мы отметили очень слабую вариабельность интенсивности флюоресценции  $I_f$  порфирина интактной кожи (среднее значение 26,98 [95%ДИ 25,23; 28,73]). При этом динамика этого показателя в обеих группах

была значительная и однонаправленная (в большинстве случаев). Тем не менее, мы отметили статистически значимые различия между группами «блеомицин» и «физ. р-р» на 7-е и 21-е сутки, но не на 14-е –  $p=0,003$ ,  $p=0,0214$  и  $p=0,1935$ , соответственно (Рис. 4.3).

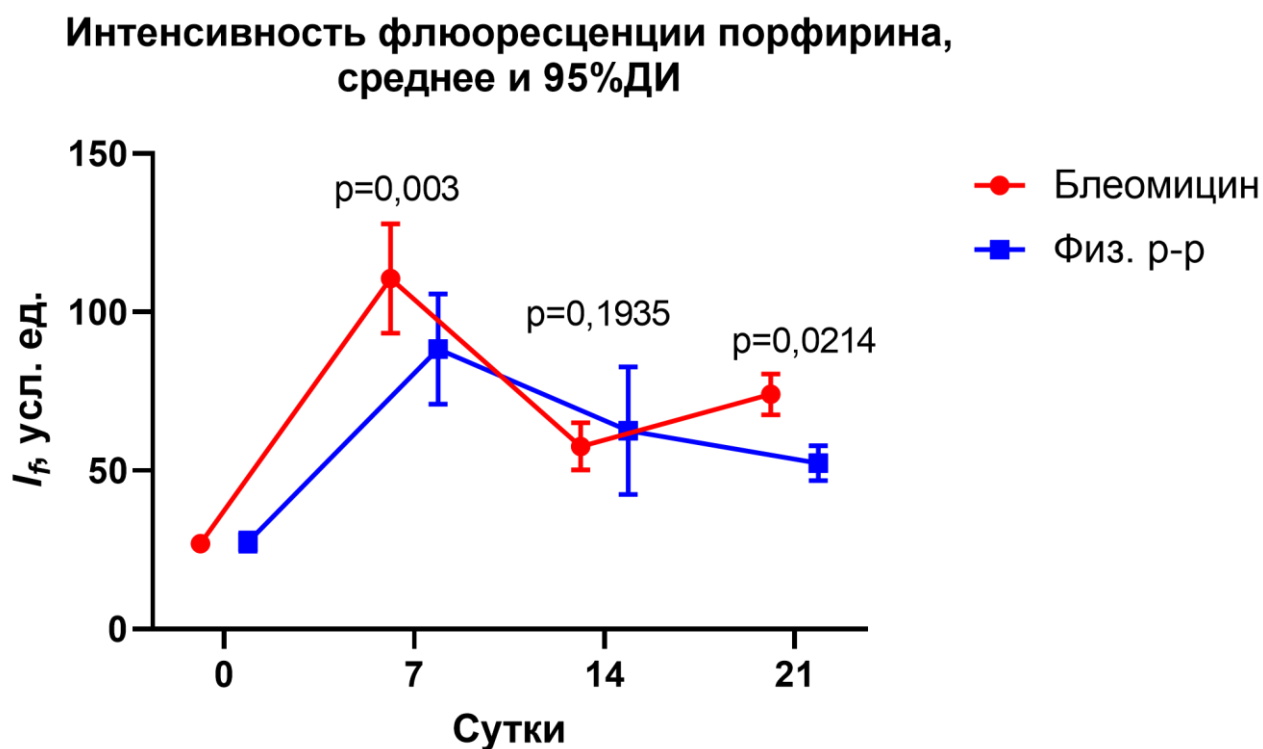


Рис. 4.3. Изменения интенсивности флюоресценции  $I_f$  порфирина в группах.

В группах «блеомицин» и «физ. р-р» на 7-е сутки происходило многократное, статистически значимое увеличение  $I_f$  порфирина ( $p<0,0001$  и  $p<0,0001$  соответственно), а на 14-е сутки – значительное снижение ( $p<0,0001$  и  $p=0,0063$  соответственно по отношению к 7-м суткам). К 21-м суткам в группе «физ. р-р» уменьшение  $I_f$  порфирина продолжилось, но было статистически незначимым ( $p=0,135$ ). В группе «блеомицин», напротив» показатель  $I_f$  порфирина увеличился статистически значимо ( $p=0,0221$ ).

В целом в группе «физ. р-р» и на 7-е, и 14-е, и 21-е сутки отмечались значительно повышенные уровни  $I_f$  порфирина по сравнению с исходным значением:  $p<0,0001$ ,  $p=0,0005$  и  $p=0,0399$ , что, по-видимому, свидетельствует о

неспецифической воспалительной реакции и течении гипоксических процессов в ответ даже на ежедневные инъекции 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида. В группе «блеомицин» так же и на 7-е, и 14-е, и 21-е сутки были отмечены значительно повышенные уровни  $I_f$  порфирина по сравнению с исходным значением:  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  и  $p < 0,0001$ .

Для повышения информативности диагностических критериев и исключения межсубъектной вариабельности, нами также была проведена оценка интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина по отношению к интактной коже (Рис. 4.4).

#### Интенсивность флюоресценции порфирина по отношению к интактной коже, среднее и 95%ДИ

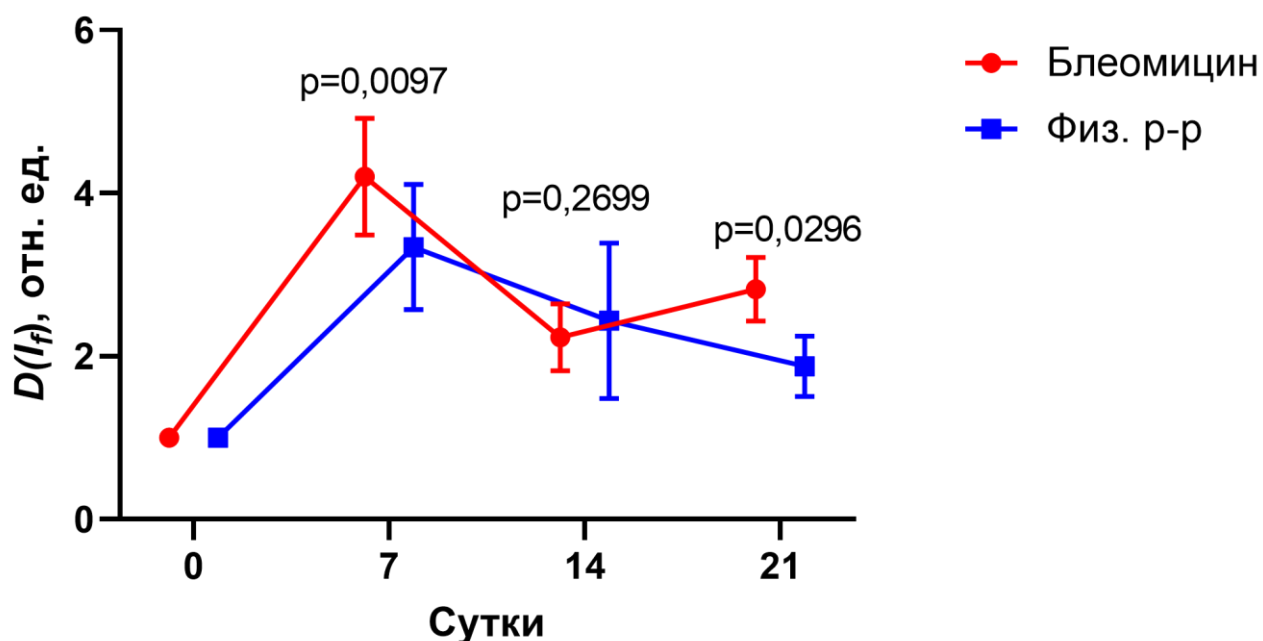


Рис. 4.4. Динамика относительного изменения интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина в группах.

Статистически значимые различия между группами мы отметили на 7-е и 21, но не 14-е сутки –  $p = 0,0097$ ,  $p = 0,2699$ ,  $p = 0,0296$ . В группе «физ. р-р» к 7-м суткам происходило значительно увеличение показателя относительного изменения интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина –  $p < 0,0001$ , а к 14 суткам –

значительное снижение ( $p=0,0295$  по отношению к 7-м суткам). На 21-е сутки снижение  $D(I_f)$  порфирина продолжилось, но было статистически незначимым по отношению к 14-м суткам –  $p=0,1409$ . Начиная с 7-х суток, показатель  $D(I_f)$  порфирина был больше исходного значения –  $p<0,0001$  на 7-е сутки,  $p=0,0011$  на 14-е сутки и  $p=0,0399$  на 21-е сутки.

В группе «блеомицин» динамика была несколько иной. К 7-м суткам также было отмечено значительно увеличение  $D(I_f)$  порфирина –  $p<0,0001$ . К 14 суткам произошло значительно снижение этого показателя –  $p<0,0001$  по отношению к 7-м суткам. В отличие от группы «физ. р-р», в группе «блеомицин» на 21-е сутки произошло существенное, статистически значимое увеличение  $D(I_f)$  порфирина –  $p=0,0369$  по отношению к 14-м суткам. Начиная с 7-х суток, показатель  $D(I_f)$  порфирина был больше исходного значения –  $p<0,0001$  на 7-е сутки,  $p=0,0002$  на 14-е сутки и  $p<0,0001$  на 21-е сутки.

Мы не отметили статистически значимых различий в интенсивности эндогенной флюоресценции  $I_f$  липофусцина (Рис. 4.5).

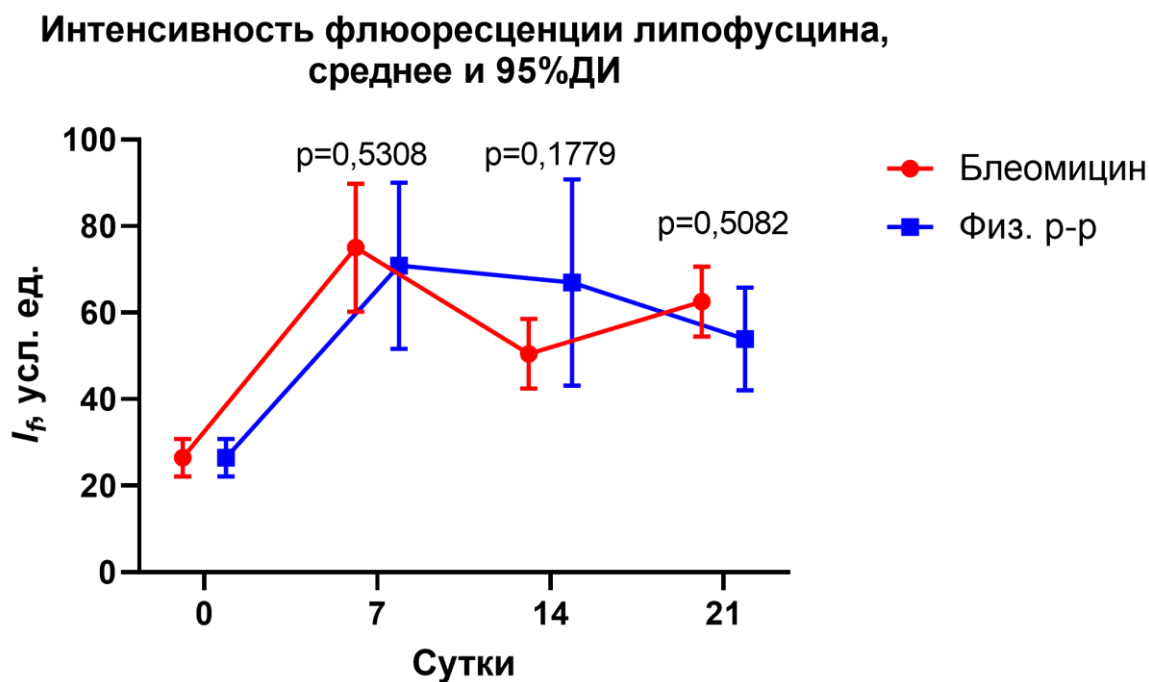


Рис. 4.5. Изменения интенсивности флюоресценции  $I_f$  липофусцина в группах.

В обеих группах на 7-е сутки отмечено значительное увеличение интенсивности флюоресценции  $I_f$  липофусцина –  $p=0,0005$  и  $p=0,0027$  для групп «блеомицин» и «физ. р-р», соответственно. Однако в результате синхронных и практически равнозначных изменений различия между группами отсутствовали –  $p=0,5308$ . К 14-м суткам происходило снижение показателя  $I_f$  липофусцина, наиболее выраженное в группе «блеомицин» ( $p=0,01$  по сравнению с 7-ми сутками), по сравнению с группой «физ. р-р» ( $p=0,5622$  по сравнению с 7-ми сутками). Не смотря на различную динамику, на этом этапе различия отсутствовали –  $p=0,1779$ . На 21-е сутки в группе «физ. р-р» отмечено продолжение постепенного снижения  $I_f$  липофусцина ( $p=0,4098$  по сравнению с 14-ми сутками), в то время как в группе «блеомицин»  $I_f$  липофусцина, напротив, несколько увеличивалась ( $p=0,278$ ). На 21-е сутки различия между группами также отсутствовали.

Тем не менее, в целом, и в группе «блеомицин», и в группе «физ. р-р» значения  $I_f$  липофусцина на большинстве этапов были существенно выше исходного уровня –  $p=0,0005$ ,  $p=0,07680$ ,  $p=0,00163$  и  $p=0,0027$ ,  $p=0,01$ ,  $p=0,0147$  на 7-е, 14-е, 21-е сутки, соответственно.

Чтобы убедиться, что выявленные закономерности сохраняются с учетом межсубъектной вариабельности, мы проанализировали интенсивность флюоресценции  $D(I_f)$  липофусцина по отношению к интактной коже (Рис. 4.6).

В целом мы отметили ту же динамику, но с некоторыми особенностями: ни на одной из временных точек мы не отметили статистически значимых различий между группами –  $p=0,3585$  на 7-е сутки,  $p=0,0707$  на 14-е сутки,  $p=0,3725$  на 21-е сутки. В группе «блеомицин» и «физ. р-р» происходило статистически значимое увеличение  $D(I_f)$  липофусцина –  $p<0,0001$  и  $p=0,0005$ , соответственно. К 14-м суткам в группе «блеомицин» происходило значительное снижение этого показателя ( $p=0,0053$  по отношению к 7-м суткам), тогда как в группе «физ. р-р» этот показатель оставался относительно стабильным с незначительной тенденцией к росту ( $p=0,6729$  по отношению к 7-м суткам). Несмотря на различную динамику, различия между группами на 14-е сутки не достигли необходимого уровня статистической значимости ( $p=0,0707$ ). К 21-м суткам в группе «блеомицин»  $D(I_f)$

липофусцина несколько возросла ( $p=0,2299$  по отношению к 14-м суткам), а в группе «физ. р-р» напротив – снизилась ( $p=0,1969$  по отношению к 14-м суткам).

В группе «блеомицин» и на 7-е, и на 14-е, и на 21-е сутки относительное значение интенсивности флюоресценции  $D_f$  липофусцина было существенно ниже исходного уровня –  $p<0,0001$ ,  $p=0,0288$ ,  $p=0,0021$  соответственно, а в группе «физ. р-р» – только на 7-е и 14-е, но не на 21-е сутки –  $p=0,0005$ ,  $p=0,0008$ ,  $p=0,0649$ , соответственно.

Таким образом, выявленные закономерности свидетельствуют о неспецифической гипоксии, которая имеет больший темп разрешения при благоприятном течении гиперпластического процесса. Тем не менее отсутствие статистически значимых различий между группами не позволяет использовать этого показатель как дифференциальный критерий.

#### Интенсивность флюоресценции липофусцина по отношению к интактной коже, среднее и 95%ДИ

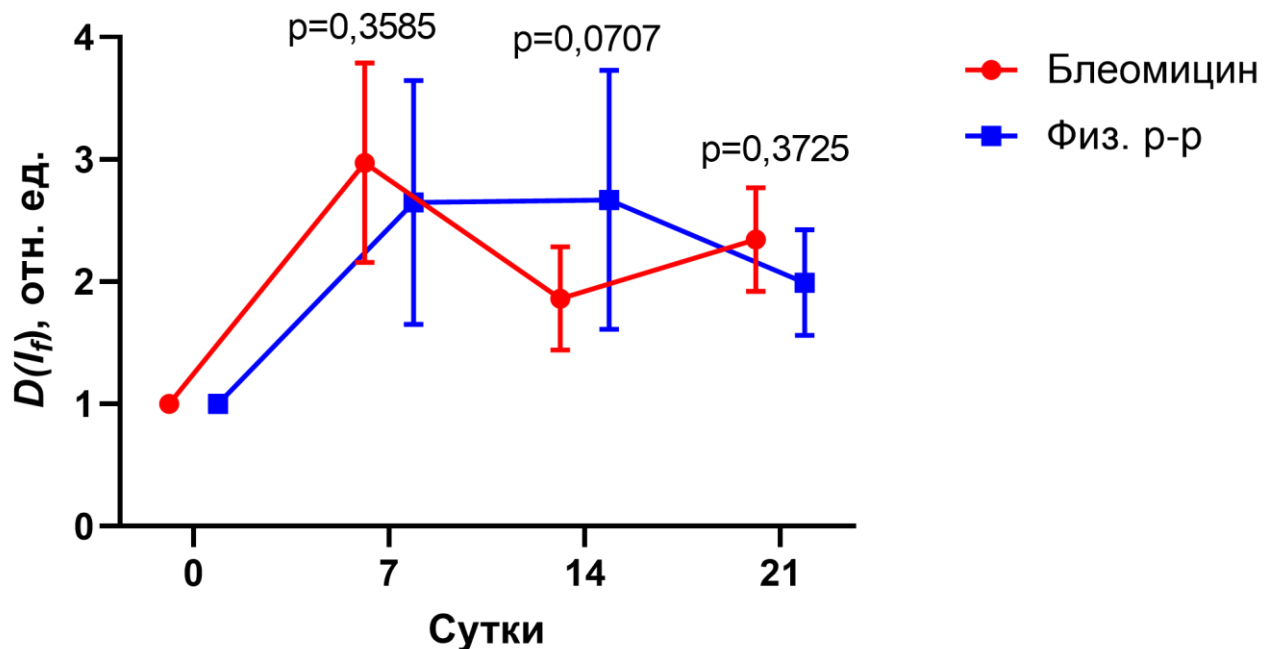


Рис. 4.6. Динамика относительного изменения интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  липофусцина в группах.



Очевидно, что различные варианты течения гиперпластического процесса оказывают непосредственное влияние на потребление кислорода тканями. Мы проанализировали изменения потребления кислорода  $U_f$  в двух группах (Рис. 4.7).

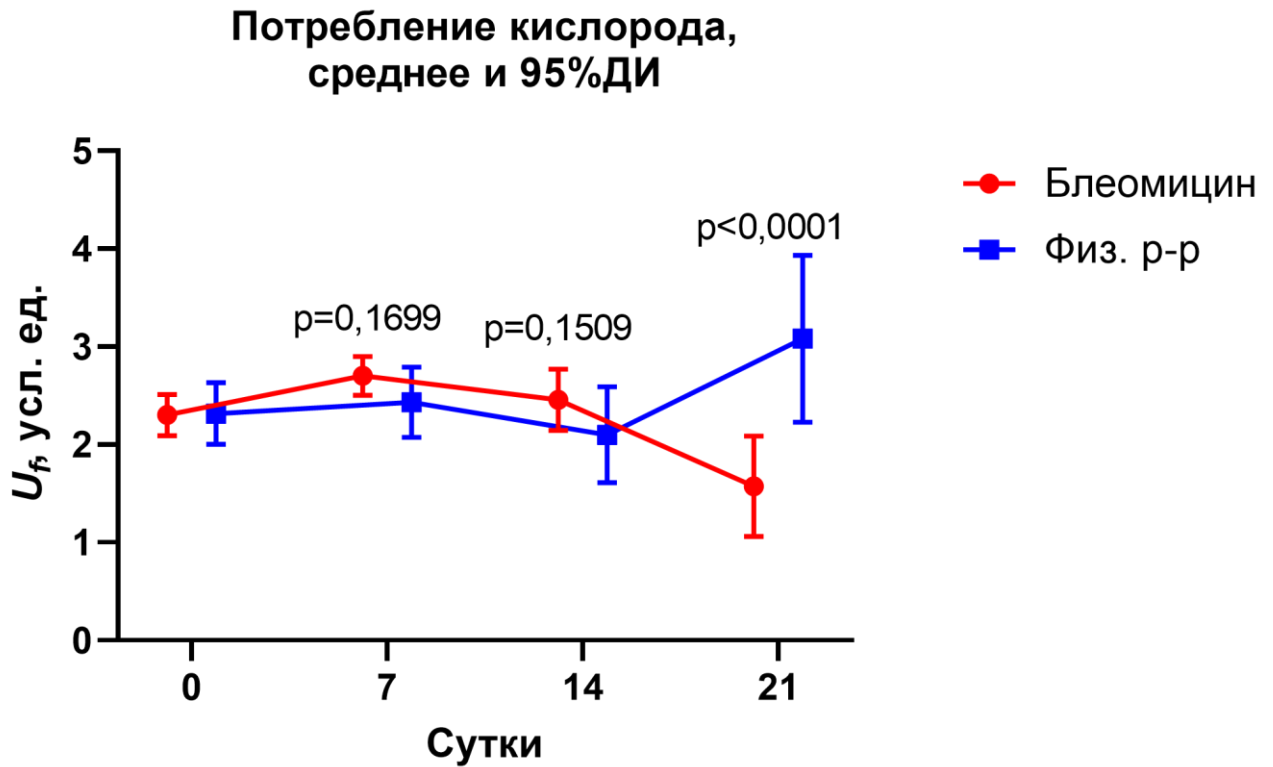


Рис. 4.7. Изменения потребления кислорода  $U_f$  в группах.

До 21-х суток в обеих группах отмечены синхронные, но не равнозначные изменения потребления кислорода  $U_f$ . Так на 7-е сутки в группе «блеомицин» отмечено статистически значимое увеличение потребления кислорода  $U_f$  ( $p=0,023$ ), тогда как в группе «физ. р-р» это изменение было не такое выраженное ( $p=0,4204$ ). На данном этапе различия между группами отсутствовали ( $p=0,1699$ ). К 14-м суткам в обеих группах произошло незначительное снижение этого показателя –  $p=0,1699$  в группе «блеомицин» и  $p=0,1699$  в группе «физ. р-р» по отношению к 7-м суткам. На 21-е сутки в группах отмечено разнонаправленная динамика: в группе «блеомицин» произошло существенное снижение потребления кислорода ( $p=0,0001$  по отношению к 14-м суткам), тогда как в группе «физ. р-р» – напротив,

существенное увеличение ( $p=0,0076$  по отношению к 14-м суткам). В результате этого, на 21-е сутки различия между группами были статистически значимы –  $p<0,0001$ .

В группе «блеомицин» на 7-е сутки потребление кислорода было статистически значимо больше ( $p=0,023$ ), на 14-е сутки не отличалось ( $p=0,3048$ ), а на 21-е сутки было существенно меньше исходного уровня ( $p=0,0024$ ), что связано с развитием гипоцеллюлярного фиброза с низкой метаболической активностью. В группе «физ. р-р», была отмечена иная динамика: потребление кислорода на 7-е и 14-е сутки не отличалось от исходного уровня –  $p=0,4204$  и  $p=0,3048$ , а на 21-е сутки было значительно больше ( $p=0,023$ ), что обусловлено активным репаративным процессом.

Мы так же проанализировали и изменение потребления кислорода в группах по отношению к интактной коже (Рис. 4.8).

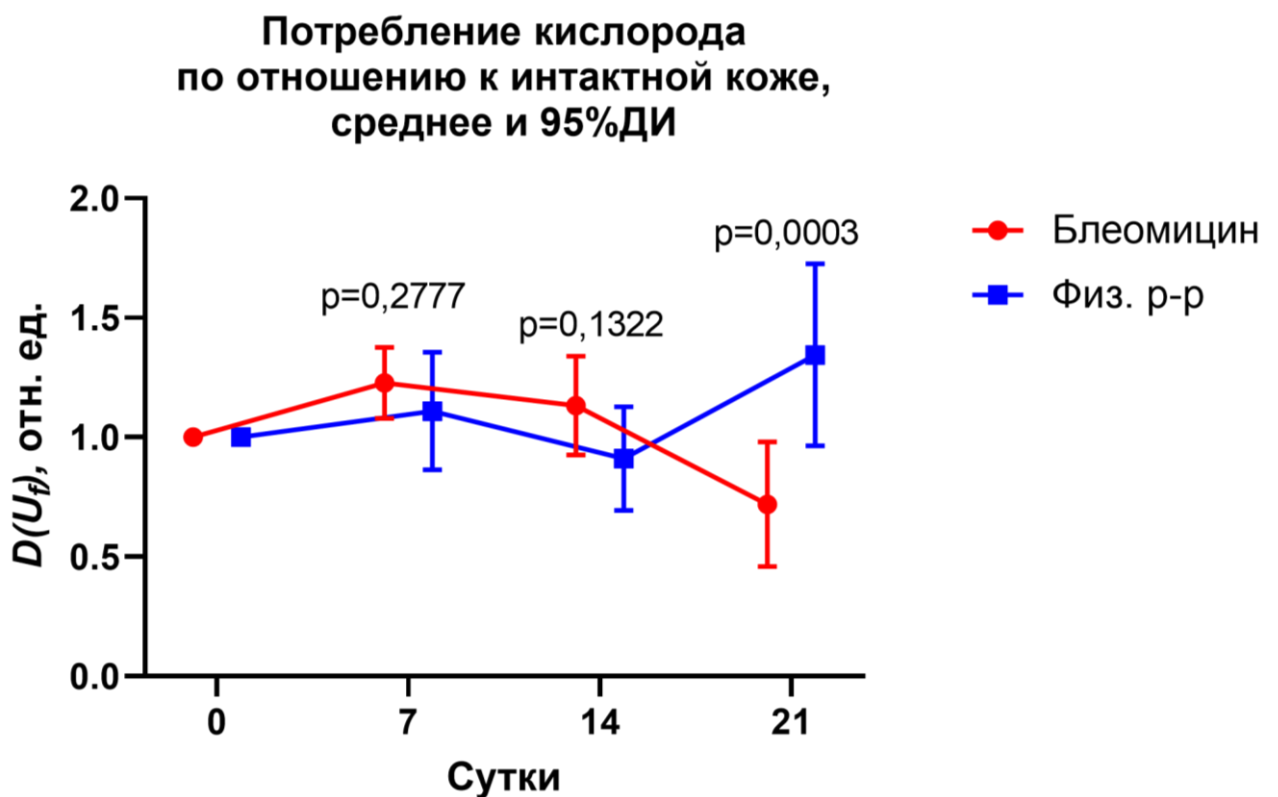


Рис. 4.8. Динамика относительного изменения потребления кислорода  $D(U_f)$  в группах.

На 7-е сутки в результате воспалительной реакции существенно увеличивалось потребление кислорода группе «блеомицин» ( $p=0,0323$ ), но не в группе «физ. р-р» ( $p=0,3362$ ). Тем не менее, различия между группами были статистически не значимы ( $p=0,2777$ ). На 14-сутки в обеих группах отмечено незначительное снижение этого показателя:  $p=0,3034$  «блеомицин», и  $p=0,2065$  в группе «физ. р-р» (по отношению к 7-м суткам). На данном этапе статистически значимые различия между группами также отсутствовали ( $p=0,1322$ ). На 21-е сутки в группе «блеомицин» отмечено увеличение потребления кислорода ( $p=0,0049$  по отношению к 14-м суткам), в то время как в группе «физ. р-р» напротив отмечено его снижение ( $p=0,0348$  к 14-м суткам). В результате разнонаправленной динамики, различия в потреблении кислорода тканями было статистически значимым ( $p=0,0003$ ).

В группе «блеомицин», потребление кислорода в тканях и на 7-е сутки было выше ( $p=0,0323$ ), на 14-е – не отличалось, а на 21-е сутки было существенно меньше исходного уровня ( $p=0,0348$ ). В группе «физ. р-р» потребление кислорода по отношению к исходному уровню оставалось относительно стабильным ( $p=0,3362$ ,  $p=0,4089$ ,  $p=0,0637$ , соответственно).

#### **4.2. Оценка информативности показателей флуоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии**

Таким образом, как свидетельствуют представленные выше результаты, на фоне различных вариантов течения фибропролиферативного процесса, отмечаются характерные изменения оцениваемых нами показателей: интенсивности эндогенной флуоресценции  $D(I_f)$  коллагена и порфирина, а также удельного потребления кислорода тканями  $D(U_f)$ . Мы сопоставили и обобщили оценки динамики этих показателей (Рис. 4.9).

Наибольший интерес с практической точки зрения представляет собой возможность прогнозирования варианта течения фибропролиферативного процесса, имеющего в своем исходе образование келоидного и гипертрофического

рубца. При этом важно определить пороговые значения показателей, свидетельствующих о высоком риске такого исхода. С этой целью нами была оценена информативность маркеров: чувствительность, специфичность, балансовая скрининговая точность (площадь под ROC-кривой).

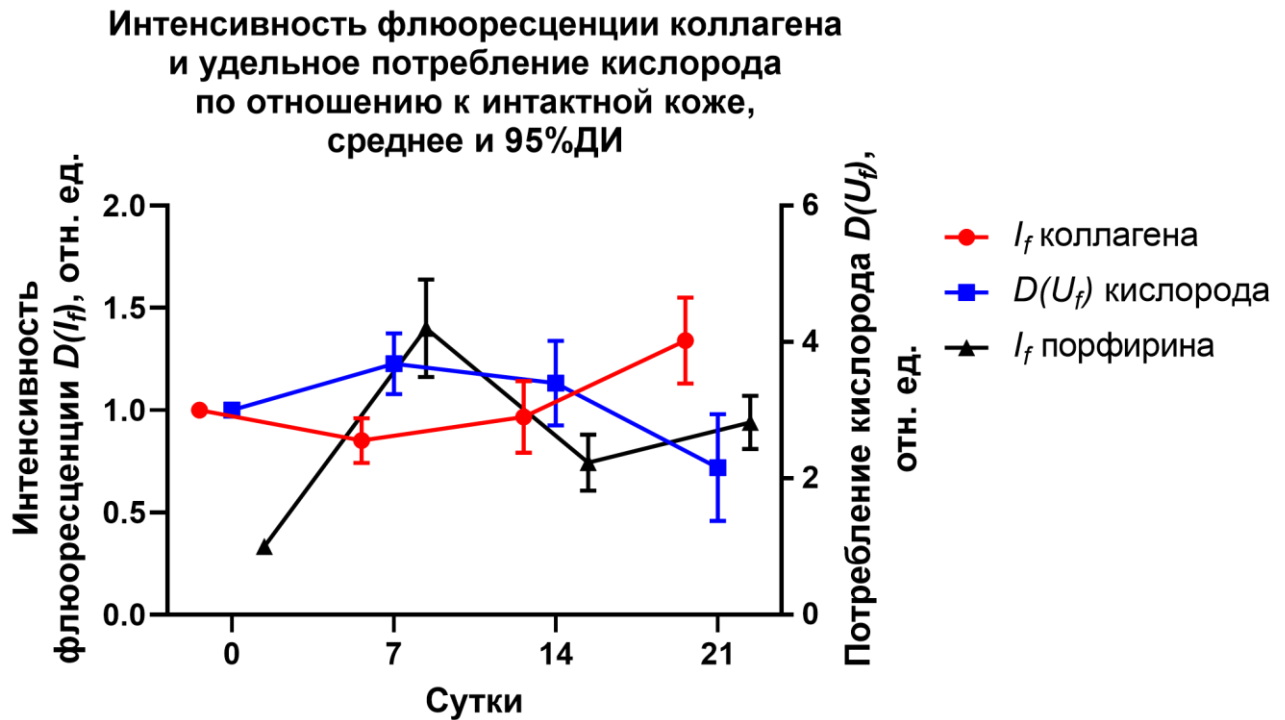


Рис. 4.9. Динамика изменения интенсивности флюоресценции  $I_f$  коллагена, порфирина и удельного потребления кислорода  $U_f$  тканями по отношению к интактной коже у животных в группе «блеомицин».

ROC-анализ показал, что при в целом интенсивность флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена является информативным скрининговым критерием – площадь под ROC-кривой составила 0,878 [95% ДИ 0,698; 0,97],  $p < 0,0001$ . При этом при пороговом значении этого показателя  $\geq 1,17$  достигаются значения чувствительности 0,714 [95% ДИ 0,492; 0,916] и специфичности 1 [95% ДИ 76,8; 1]. Данный признак крайне сильно ассоциирован с исходом (развитием фиброза) – отношение шансов 51,3 [95%ДИ 4,67; 564,16].

Интенсивность флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина также является информативным скрининговым критерием – площадь под ROC-кривой составила

0,782 [95% ДИ 0,510; 0,944],  $p=0,021$ . При этом при пороговом значении этого показателя  $\geq 2,3$  достигаются значения чувствительности 0,727 [95% ДИ 0,39; 0,94] и специфичности 1 [95% ДИ 0,478; 1]. Данный признак также крайне сильно ассоциирован с исходом (развитием фиброза) – отношение шансов 10,67 [95%ДИ 1,74; 65,27].

Балансовая скрининговая точность потребления кислорода в тканях  $D(U_f)$  – площадь под ROC-кривой составила 0,9 [95% ДИ 0,648; 0,992],  $p<0,0001$ . При этом при пороговом значении этого показателя  $\leq 0,79$  достигаются значения чувствительности 0,727 [95% ДИ 0,39; 0,94] и специфичности 1 [95% ДИ 0,478; 1]. Данный признак также крайне сильно ассоциирован с исходом (развитием фиброза) – отношение шансов 12 [95% ДИ 1,31; 110,52].

Разнонаправленную динамику оцениваемых нами параметров можно объяснить различными процессами, которые могут преобладать в течение заживления раны. Отличительной чертой фиброза кожи является значительное увеличение интенсивности флюоресценции коллагена. Однако в зависимости от стадии этого процесса можно выделить характерные изменения и остальных показателей. Так одновременная регистрация увеличенной флюоресценции коллагена на фоне сниженного потребления кислорода и увеличенной интенсивности флюоресценции порфирина наблюдается в тех случаях, когда преобладающим процессом является гипоксия. Эти же изменения интенсивности флюоресценции по фоне нормального или повышенного потребления кислорода свидетельствуют об активном воспалительном процессе. В свою очередь, регистрация повышенного значения интенсивности флюоресценции коллагена на фоне пониженных значений интенсивности флюоресценции порфирина и потребления кислорода свидетельствуют о завершении процесса фиброза с образованием гипоцеллюлярного рубца.

Возможно выделить параметры, указывающие на благоприятное течение фибропролиферативного процесса, не имеющего в своем исходе образование избыточной фиброзной ткани: нормальное значение интенсивности флюоресценции коллагена на фоне повышенного значения интенсивности

флюоресценции порфирина, на фоне нормального или повышенного потребления кислорода, свидетельствуют о воспалительных или гипоксических изменениях без образования фиброза.

Данную концепцию и пороговые значения оцениваемых параметров мы обобщили в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Показатели оптических параметров кожи при различных вариантах течения гиперпластического процесса.

Параметр	Регенерация через фибропролиферативный процесс			Регенерация без фибропролиферативного процесса
	Гипоксия	Воспаление	Фиброз	
$D(I_f)$ коллаген	$\geq 1,17$	$\geq 1,17$	$\geq 1,17$	$< 1,17$
$D(I_f)$ порфирины	$\geq 2,3$	$\geq 2,3$	$< 2,3$	$\geq 2,3$
$D(U_f)$ кислород	$\leq 0,79$	$> 0,79$	$\leq 0,79$	$> 0,79$

Таким образом, оптические параметры кожи могут быть использованы для оценки стадии течения фиброза, а также – для прогнозирования его исхода. Указанные критерии были апробированы нами в клинической практике.

#### **4.3. Применение результатов исследования в клинической практике для прогнозирования исхода фибропролиферативного процесса кожи**

Для оценки возможности использования оцениваемых нами параметров в клинической практике мы сравнили их у пациентов с различным характером течения рубцевания.

Так у пациентов с нормотрофическим рубцом мы отметили значительно меньшую интенсивность флюоресценции коллагена ( $p=0,0011$ ), (Рис. 4.10) и значительно более высокую интенсивность флюоресценции порфирина ( $p=0,0429$ ), (Рис. 4.11), а также – более высокое потребление кислорода ( $p=0,0099$ ), (Рис. 4.12) по сравнению с пациентами с гипертрофическими рубцами.

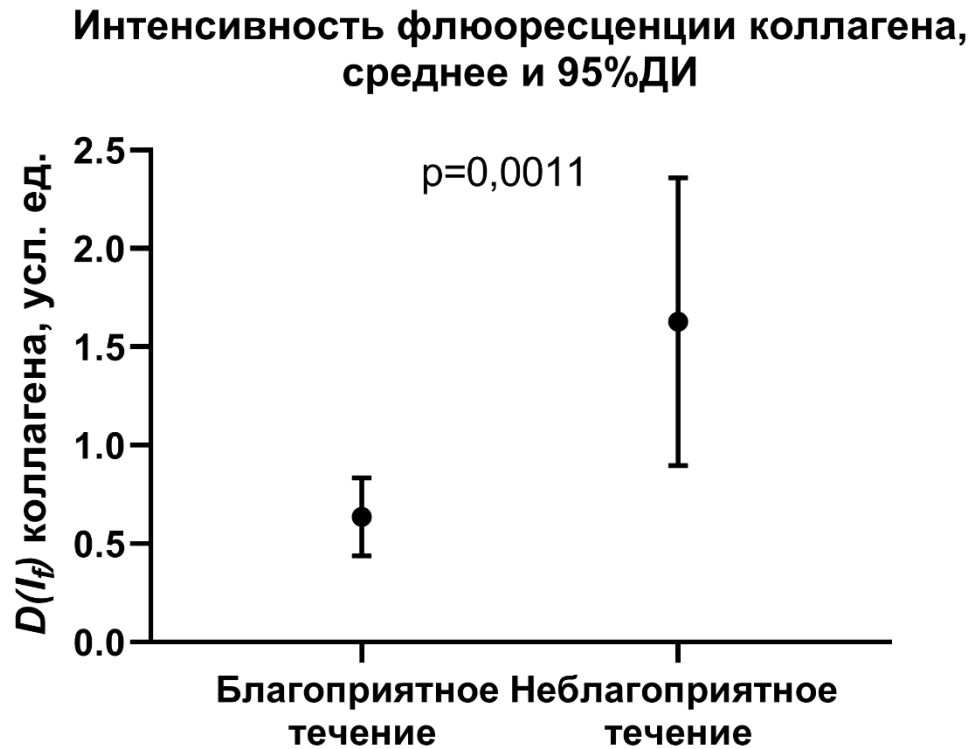


Рис. 4.10. Относительная интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена у пациентов с нормо- и гипертрофическими/келоидными рубцами.

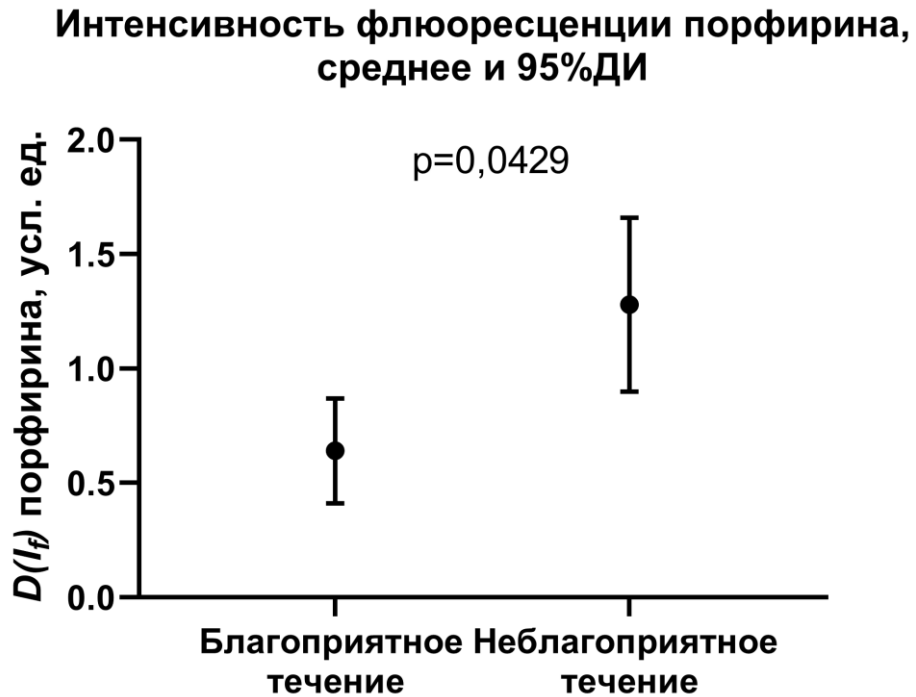


Рис. 4.11. Относительная интенсивности флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина у пациентов с нормо- и гипертрофическими/келоидными рубцами.

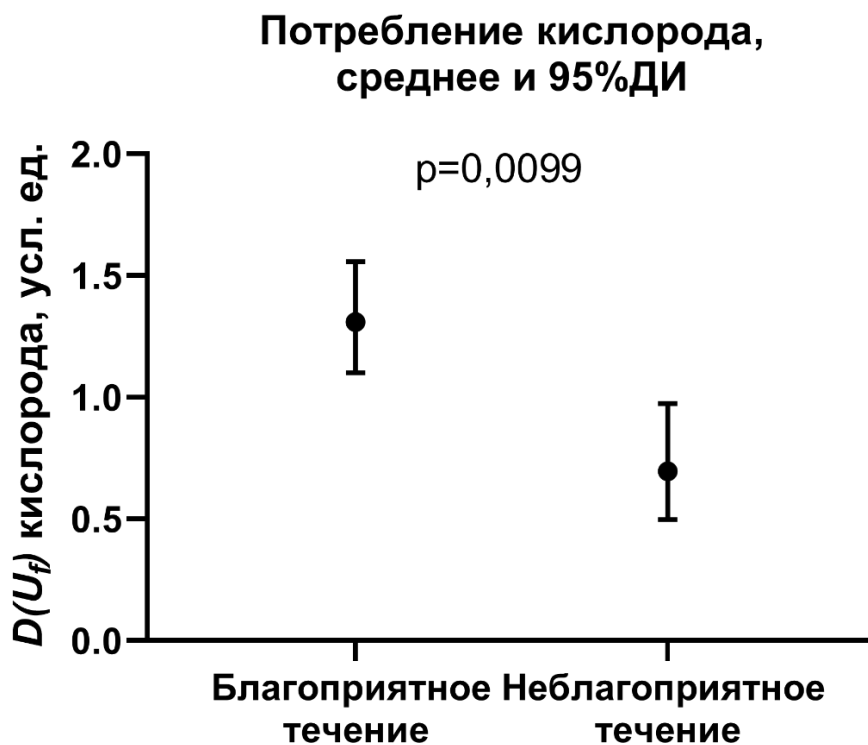


Рис. 4.12. Относительное потребление кислорода  $D(U_f)$  у пациентов с нормо- и гипертрофическими рубцами.



Приведем несколько клинических примеров.

Клинический пример 1. Больная В., 37 лет, наблюдалась в МОНИКИ с диагнозом: *постоперационная рубцовая деформация лобной области*. Пациентке было проведено исследование флуоресценции в области рубца на 20-е сутки после операции. Были получены значения  $D(I_f)$  коллагена = 0,98,  $D(I_f)$  порфирина = 2,5 и потребления кислорода  $D(U_f) = 1,1$ , что свидетельствует о благоприятном течении процесса рубцевания и образования нормотрофического рубца (Рис. 4.13).



Рис. 4.13. Пациентка 37 лет, нормотрофический рубец, 20-е сутки после первичной хирургической обработки раны.

*При биопсии фрагмента рубцовой ткани на 20-е сутки д определялся нормотрофический рубец, (Рис.4.14).*

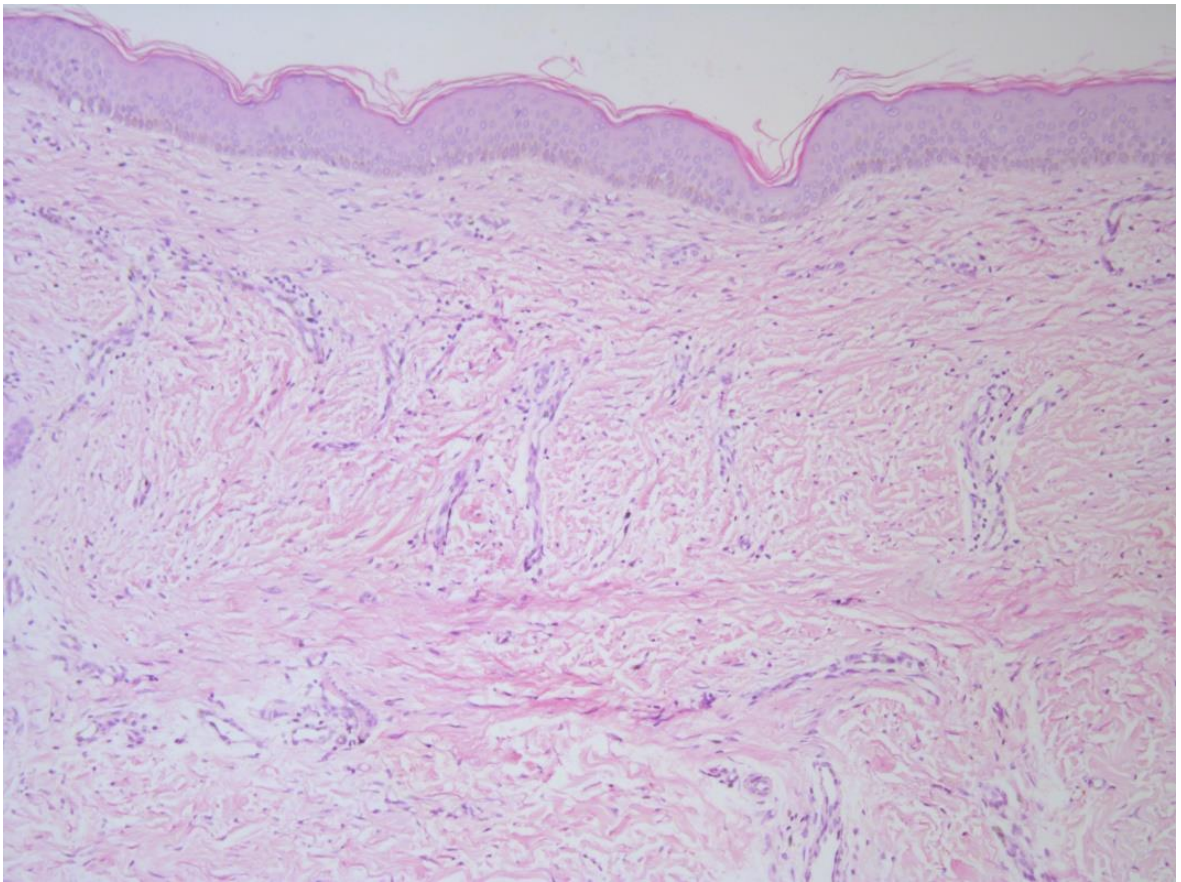


Рис. 4.14. Нормотрофический рубец, 20-е сутки. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение.

На рисунке 4.14 коллагеновые волокна ориентированы параллельно поверхности кожи. Аднексальные структуры отсутствуют, сосуды ориентированы вертикально. Морфологическая картина соответствует картине нормотрофического рубца.

Клинический пример 2. Пациент К, 37 лет, наблюдался в МОНИКИ с диагнозом: *посттравматическая рубцовая деформация скуловой области слева, состояние после первичной хирургической обработки раны* (Рис. 4.15). Было проведено исследование флуоресценции  $D(I_f)$  коллагена,  $D(I_f)$  порфирина и потребления кислорода  $D(U_f)$  на 19-е сутки после первичной хирургической обработки раны: значения составили 1,89, 3,1 и 0,65, соответственно. Это свидетельствовало о неблагоприятном прогнозе и высоком риске развития гиперпластического рубца. Пациенту было предложено проведение

*профилактического лечения, направленного на коррекцию рубца кожи, но от предложенного лечения пациент отказался. При осмотре повторно через 3 месяца после операции, диагноз: Гипертрофический рубец скуловой области слева.*



Рис. 4.15. Пациент 37 лет, гипертрофический рубец, 19-е сутки после первичной хирургической обработки раны.

*При гистологическом исследовании фрагмента рубцовой ткани диагноз подтвердился. На рисунках 4.16 и 4.17 визуализируются нодулярные структуры с разнонаправленными коллагеновыми волокнами, пролиферацией фибробластов.*



*Пилосебацейные структуры отсутствуют. Морфологическая картина соответствует гипертрофическому рубцу.*

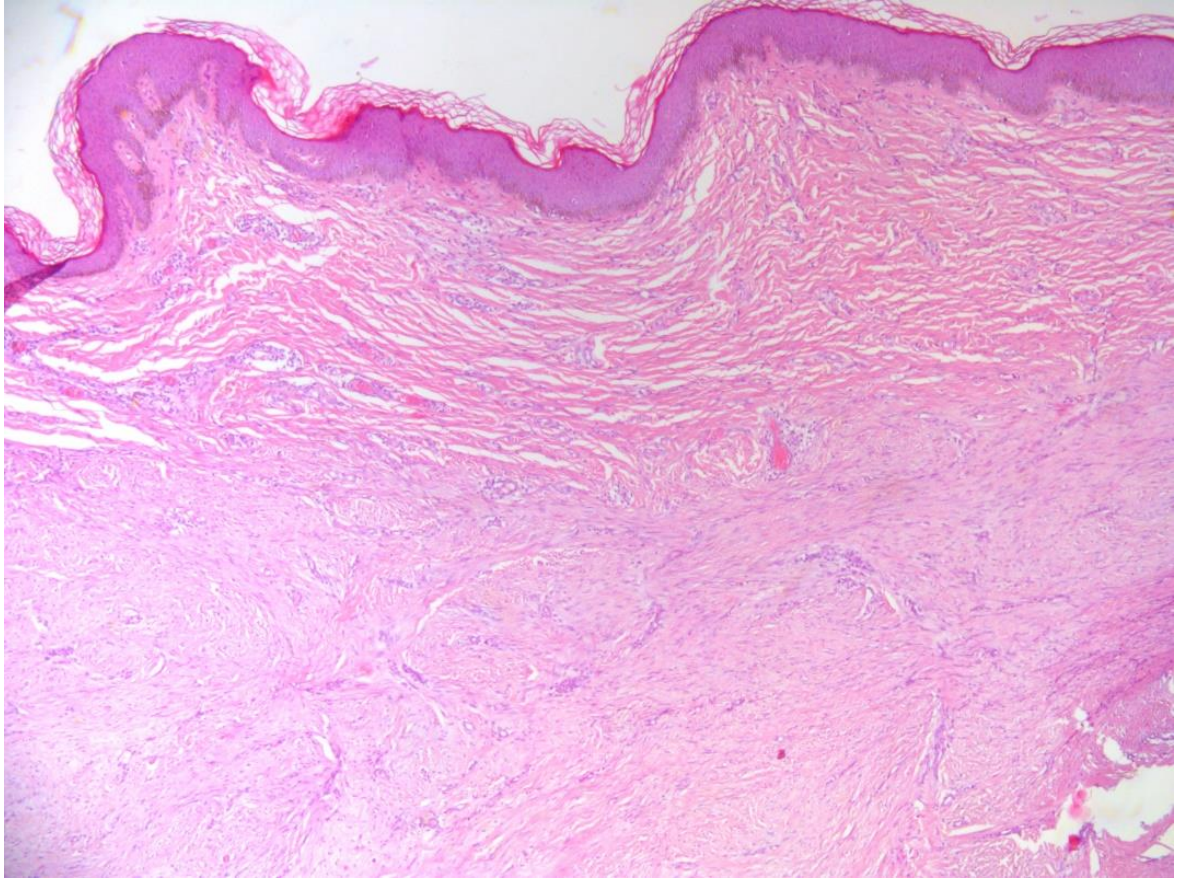


Рис. 4.16. Гипертрофический рубец, 19-е сутки. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение.

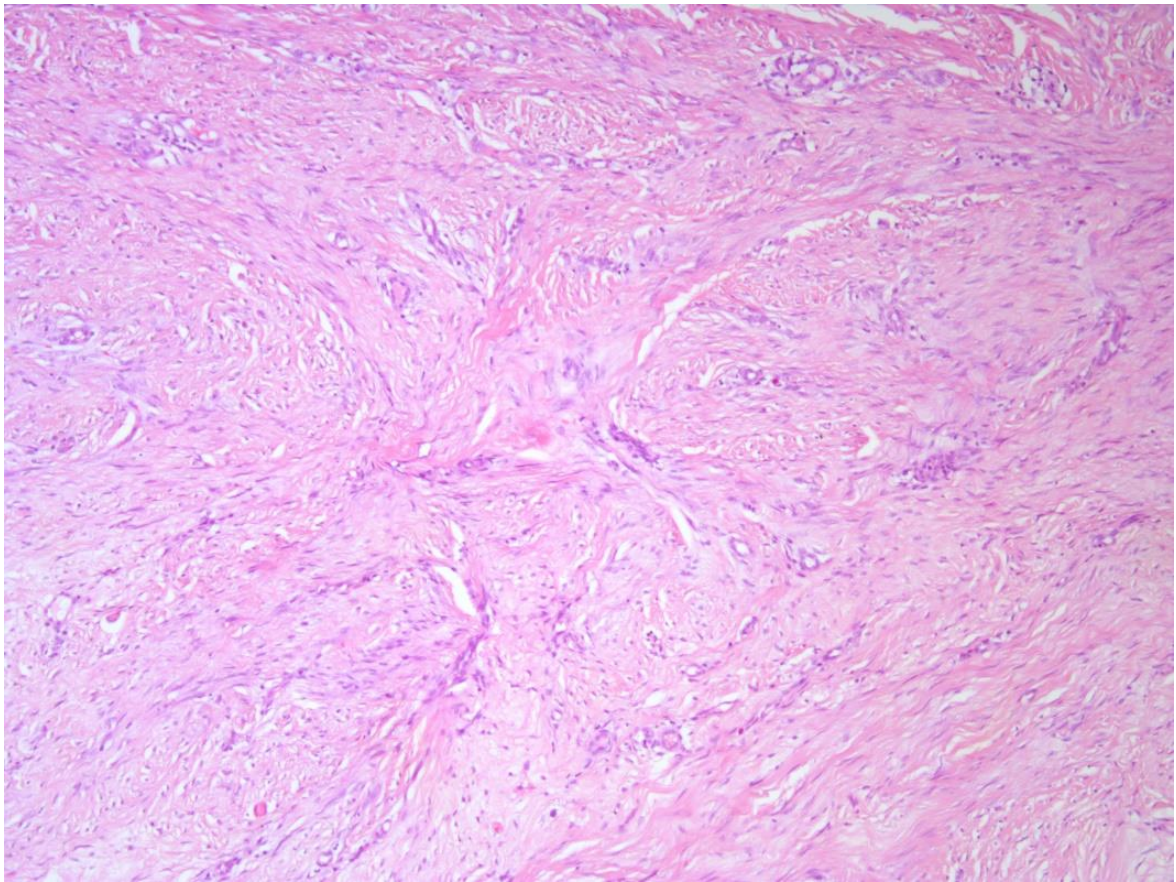


Рис. 4.17. Гипертрофический рубец, 19-е сутки. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение.

Клинический пример 3. Пациентка 27 лет, келоидный рубец, 3 месяца после операции. Больной была выполнена операция - тиреоидэктомия по поводу диффузного тиреотоксического зоба 2 степени, тяжелым тиреотоксикозом (Рис. 4.18).



Рис. 4.18. Пациентка 27 лет, келоидный рубец, 3 месяца после операции.

*Было проведено исследование исследование флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена,  $D(I_f)$  порфирина и потребления кислорода  $D(U_f)$  на 60 сутки после операции, получены значения 2,0, 3,1 и 0,55, соответственно. Это свидетельствовало и высоком риске развития патологического рубца. При гистологическом исследовании фрагмента рубцовой ткани диагноз подтвердился (Рис. 4.19 и 4.20). На микроснимках визуализируются широкие гиалинизированные ленты коллагена, аднексальные структуры кожи отсутствуют, что соответствует морфологической картине келоида.*



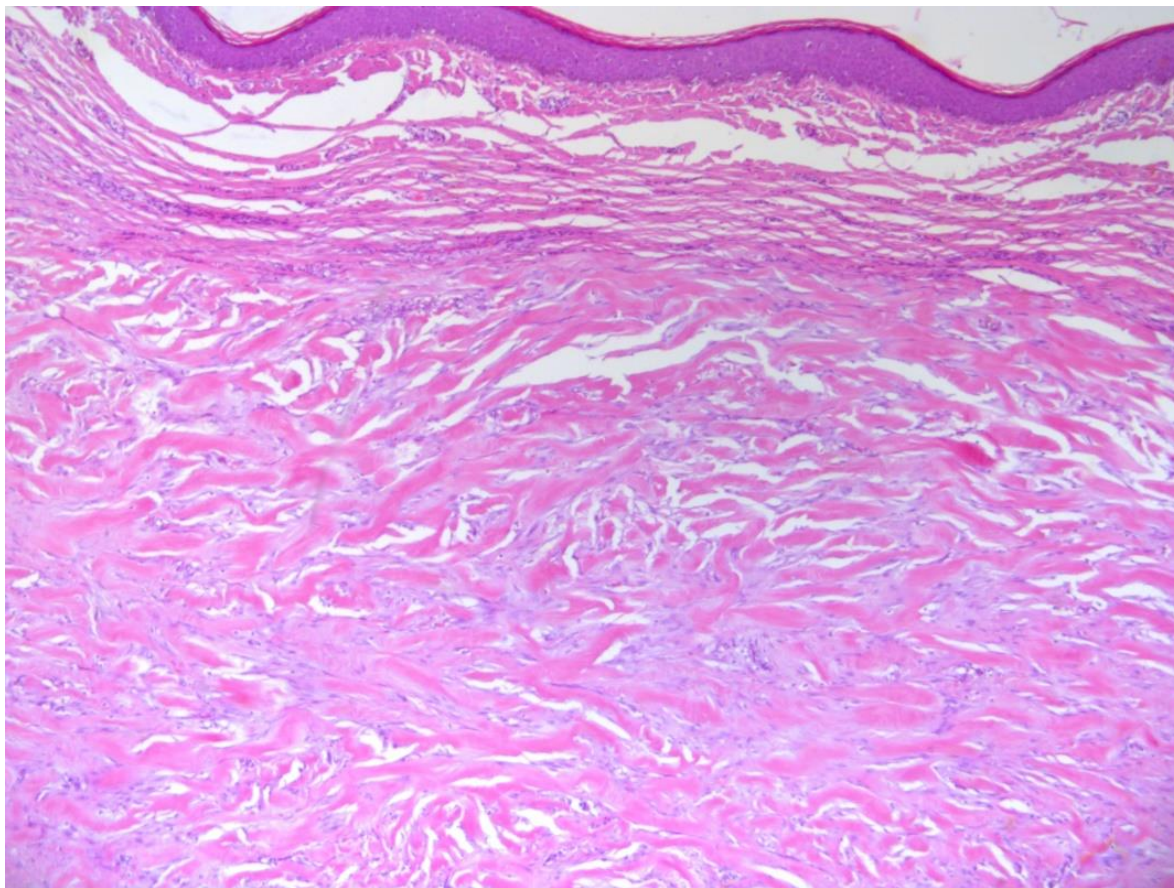


Рис. 4.19. Келоидный рубец, 3 месяца. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, 50-кратное увеличение

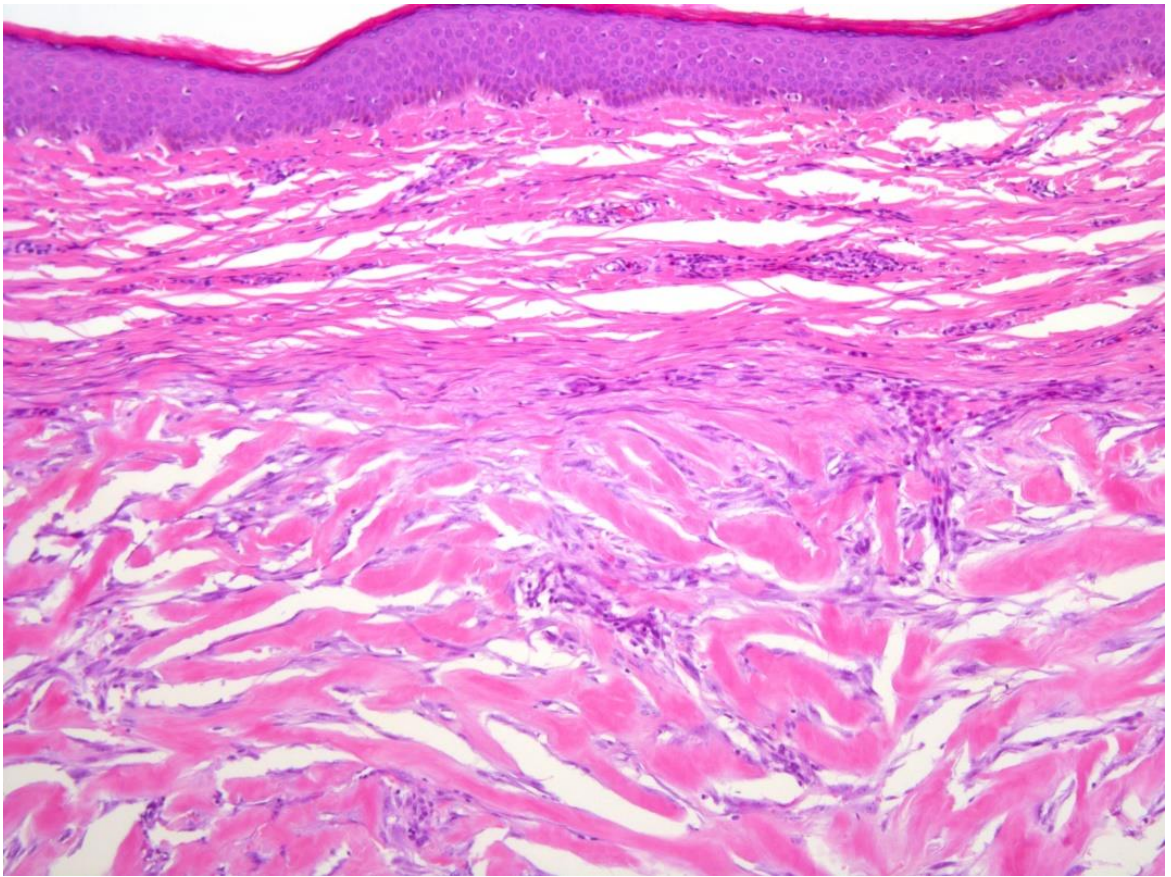


Рис. 4.20. Келоидный рубец, 3 месяца. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, 100-кратное увеличение.

*Пациентке было проведено профилактическое лечение дипроспаном. При наблюдении в сроках до 1 года у пациентки сформировался нормотрофический рубец, который пациентку устраивает косметически.*

Таким образом, данные клинические примеры, так же как и обобщенные данные по оптическим параметрам кожи свидетельствуют, что данный метод диагностики может быть применен в клинической практике.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не инвазивная диагностика системного и органного фиброза, а также прогнозирование исходов фибропролиферативных процессов представляют собой одну из актуальнейших проблем современной медицины.

Сложность дифференциальной диагностики стадий фиброза и оценки характера его течения обусловлена наличием множества этипатогенетических механизмов его развития и прогрессирования, а также особенностями компенсаторно-адаптационных процессов, присущих отдельным нозологическим единицам.

Наиболее эффективным подходом к профилактике осложнений фибротического поражения отдельных органов и тканей служит своевременное превентивное воздействие на основные патогенетические процессы. Это требует разработки информативных методов прогнозирования течения фибропролиферативного процесса.

Фиброз кожи является типичным патологическим процессом, с одной стороны сочетающим в себе многообразие патогенетических механизмов (гипоксии и воспаления), а с другой – позволяющий оценить информативность диагностических подходов, поскольку многие закономерности репаративного роста соединительной ткани остающиеся общими для всех патологических процессов, ведущих к фиброзу. Оценка клинической картины фиброза кожи опирается на субъективные, неколичественные методы или требует инвазивных процедур. Маркеров, способных с высокой информативностью определить прогноз течения заболевания или ответ на терапию, не хватает.

Одними из наиболее перспективных методов являются не инвазивные методы диагностики. Современные оптические методы позволяют быстро получить количественную информацию о состоянии тканей. Они отличаются безопасностью, неинвазивностью и информативностью, а также имеют невысокую себестоимость. Комплексное применение разных оптических способов диагностики может дать информацию не только о структурной, но и о

функциональной характеристике тканей, что достигается путем количественного анализа таких параметров как кровоток, уровень оксигенации, измерение флуоресценции белков соединительной ткани и порфиринов.

Перспективным современным методом диагностики является флуоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия. Среди ее положительных свойств можно отметить неинвазивность, независимость от клинического опыта специалиста, проводящего исследование, а также повторяемость результатов исследования. Таким образом, этот метод отвечает всем современным требованиям. Тем не менее, критерии прогноза течения фибропролиферативного процесса кожи в настоящее время отсутствуют. До настоящего времени практически не разработаны методы анализа и обработки результатов диагностики, дающие необходимую значимую именно медико-биологическую, а не физико-техническую информацию.

Учитывая вышесказанное, тема настоящего исследования (диагностика типовых патологических процессов при развитии послеоперационного рубца) представляется крайне актуальной. В качестве основных диагностических методов были выбраны лазерная флуоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи, последовательно решаемые в ходе работы: динамическое изучение оптических параметров кожи при развитии фиброза в эксперименте; разработка маркеров диагностики воспаления, гипоксии и фиброза на основе анализа корреляции оптических и морфологических параметров; разработка прогностических критериев исходов фибропролиферативных процессов; обоснование индивидуального подхода к лечению послеоперационных ран на основе разработанных критериев.

Для достижения поставленной цели и решения поставленных задач животные модели на первом этапе является наиболее подходящей моделью. Тем не менее в настоящее время фундаментальные исследования, позволяющие на экспериментальных моделях оценить возможности комплексного применения оптических методов диагностики для инструментального измерения процессов

воспаления и гипоксии, отсутствуют. Это, в свою очередь, также подчеркивает актуальность настоящего исследования, а также его научную новизну и практическую значимость. Работа была проведена с соблюдением всех этических норм и правил проведения научного исследования. Полученные результаты были апробированы в клинической практике отделения челюстно-лицевой хирургии.

Исследование было проведено на лабораторных животных – белых беспородных мышах, количеством 54 особей-самцов. Животные были разделены на 2 группы. У 33 животных первой группы (группа «блеомицин») был индуцирован блеомицин-индуцированный фиброз кожи по общепризнанной методике [26]. Животным данной группы вводились подкожные инъекции блеомицина в дозировке 0,1 мл (концентрация 0,5 мг / мл).

Второй группе (группа «физ. р-р») ( $N = 21$ ) вводились подкожные инъекции 0,1 мл 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида.

Животным обеих групп инъекции проводились ежедневно в течение 21 дня в предварительно депилированную кожу.

На 0, 7, 14 и 21-е сутки животным обеих групп проводили измерения интенсивности эндогенной флюоресценции коллагена, порфирина, липофусцина, а также оценку тканевой сатурации оксигемоглобина. Помимо этого, на указанных этапах проводилось исследование тканей: гистологические, иммунохимические, а также изучались иммунофлюоресцентные маркеры. Для этого животные выводились из исследования, усыплялись, после чего получали материал для исследования.

Все оптические измерения проводились на многофункциональном лазерном диагностическом комплексе «ЛАКК – М» (ООО НПП «ЛАЗМА»).

Для исключения влияния индивидуального начального биохимического состава тканей, помимо динамики величин интенсивностей флюоресценции ( $I_f$ ), удельного потребления кислорода ( $U$ ) и концентраций С-реактивного белка анализировались также динамика их относительных изменений  $D(P)$  по сравнению с исходным уровнем (на 0 сутки).

На первом этапе исследования была изучена информативность оптических параметров кожи в эксперименте на мышах. На втором, клиническом, этапе исследования разработанные критерии были апробированы в клинической практике. Возможность применения флуоресцентной спектрометрии и оптической тканевой оксиметрии для прогнозирования исхода процесса заживления оценивалась нами с участием 17 пациентов с кожными ранами различной локализации.

В группе было 7 мужчин и 10 женщин, средний возраст составил  $37 \pm 5,1$  года (от 24 до 49 лет). У 11-ти пациентов поражение было травматического характера. Была выполнена первичная хирургическая обработка раны и наложены первичные швы. Локализация поражения: у 8-ми пациентов – лицевой отдел головы (4 – щечная область, 2 – скуловая область, 2 – лобная область), 2-х пациентов – мягкие ткани предплечья, у одного – бедра. У 6-ти пациентов наложение швов было выполнено после плановых операций (у 5-ти пациентов после субтотальной резекции щитовидной железы, у 1-го – после тотальной паратиреоидэктомии).

Чтобы исключить влияние шовного материала и техники шва, в исследование были включены пациенты, у которых был наложен внутрикожный шов при помощи атравматического шовного материала с режущей иглой и нитью Prolen 4/0 (ETHICON, LLC, регистрационный номер ФСЗ 2010/06040). На 7-10 сутки нить удалялась.

Во всех случаях раны заживали первичным натяжением, однако исход заживления раны различался. У 10-ти пациентов заживление раны прошло с формированием нормотрофического рубца, у 7-ми – с образованием гипертрофических и келлоидных рубцов.

В ходе эксперимента на мышах в группе «блеомицин» удалось воспроизвести модель фиброза кожи. Данный результат был подтвержден гистологическими исследованиями.

На исходном этапе кожа и подкожно-жировая клетчатка была нормального гистологического строения. Воспалительных изменений выявлено не было. Все

значения результатов оптических и иммунохимических измерений у животных в этот период были приняты за физиологическую норму.

Практически у всех животных из группы «блеомицин» процесс воспаления начинался подкожно-жирового слоя с дальнейшим распространением на другие слои дермы. На седьмые сутки, в группе «блеомицин» развивалась воспалительная инфильтрация долек жировой ткани лимфоцитами и гистиоцитами. Такая морфологическая картина воспаления коррелировала с полученными оптическими параметрами: с увеличением флюоресценции порфирина, а также с увеличением концентрации СРБ сыворотки крови на 7-е сутки. В отличие от воспаления в подкожно-жировом слое в группе «блеомицин», в группе «физ. р-р» воспалительные элементы локализовались преимущественно под подкожной мышцей, однако это также вызвало увеличение флюоресценции порфирина и некоторое увеличение концентрации СРБ по сравнению с 0-ми сутками в этой же группе.

На 14-е сутки результаты оптических измерений свидетельствовали о сохранении повышенного уровня порфирина в группе «блеомицин» по сравнению с 0-ми сутками, вероятнее всего за счет сохранения воспалительных инфильтратов. При этом в группе «физ. р.р» в этот период также сохранялись повышенные уровни порфирина, что коррелировало с продолжающимся воспалением в области подкожной мышцы. Значения уровня СРБ сыворотки крови в двух группах были сопоставимы, что было обусловлено сохраняющимся воспалительным процессом.

На 21-е сутки эксперимента в группе «блеомицин» мы наблюдали диффузные фибротические изменения в дерме и подкожно-жировой клетчатке. Результаты оптических измерений на 21-е сутки показали увеличение флюоресценции коллагена, по сравнению с группой «физ. р-р» и исходным уровнем. Увеличение флюоресценции коллагена было связано с накоплением его большого количества в результате формирования фиброза, что было подтверждено гистологическим исследованием с подсчетом площади коллагеновых волокон.

Оптически на 21-е сутки в группе «блеомицин» регистрировалось достоверное снижение потребления кислорода по сравнению с группой «физ. р.р»

и исходным уровнем. Гистологически это подтверждалось участками гипоцеллюлярного фиброза, закономерно приводящего к снижению потребления кислорода. Избыточное накопление соединительной ткани приводило к микроциркуляторной гипоксии, в том числе за счет снижения васкуляризации ткани. Уменьшение количества сосудов по сравнению с 7-ми сутками и группой «физ. р-р» в этот временной период подтверждено иммунофлюоресцентными исследованиями. Флюоресцентной спектрометрией было зафиксировано достоверное увеличение флюоресценции порфирина на 21-е сутки в группе «блеомицин» по сравнению группой «физ. р-р» и исходным уровнем. Принимая во внимание, что порфирин является не только маркером воспаления, но и гипоксии, мы считаем, что оптические измерения, показывающие увеличение флюоресценции порфирина на фоне снижения потребления кислорода и увеличения флюоресценции коллагена, свидетельствуют не только о гипоксии на фоне фиброза, но и о снижении метаболической активности ткани.

Выявленные закономерности свидетельствуют, с одной стороны, о значительной микроциркуляторной гипоксии при развитии фиброза кожи (в группе «блеомицин»), а также развитии гипоцеллюлярного фиброза (с низкой метаболической активностью), с дефицитом клеточных элементов, являющихся основными потребителями кислорода. С другой стороны, в группе физ. р-р увеличение потребления кислорода вероятнее всего связано с продолжающимся воспалением без развития фиброза.

Результаты измерения интенсивности эндогенной флюоресценции коллагена на седьмые сутки по сравнению с нулевыми сутками показали его снижение в группе «блеомицин», вероятнее всего это связано, с отеком тканей за счет воспалительной экссудации, гистологически наиболее выраженной именно в это время. Повышение же интенсивности эндогенной флюоресценции коллагена и эластина на 21-е сутки в этой же группе вызвано их накоплением в области сформировавшегося фиброза, что также соответствует морфологической картине кожи. Принимая во внимание, что основным внеклеточным веществом

соединительной ткани при фиброзе кожи является коллаген, считаем, что вклад флюоресценции эластина в данном случае будет незначительным.

Установлено, что толщина дермы в группе «блеомицин» значительно увеличивается с 1-й недели и достигает максимума на 14-21-е сутки эксперимента, в то время как мыши, получавшие инъекции физиологического раствора, не показали увеличения поперечного размера дермы. Некоторое снижение толщины кожи на 21-е сутки у части лабораторных животных вероятнее всего связано с развитием склеротических изменений дермы, которые приводят к снижению толщины, но с сохранением при этом гомогенизированной структуры коллагеновых волокон.

У животных группы «блеомицин» на 7-е сутки несмотря на утолщение дермы, структура ее была нормальной, аднексальные структуры были сохранены, однако присутствовала мелкоочаговая лейкоцитарная инфильтрация в подкожной мышце. На 14-е сутки появилась атрофия пилосебацейных комплексов, гомогенизация коллагена, замещение соединительной тканью подкожно-жировой клетчатки, сохранялась слабовыраженная диффузная лейкоцитарная инфильтрация всех слоев дермы, остатков жировой ткани и подкожного мышечного слоя. На 21-е сутки наблюдалось полное отсутствие придатковых структур кожи, склероз дермы и подкожно-жировой клетчатки, диффузная лейкоцитарная инфильтрация, более выраженная в верхних слоях дермы.

В группе «физ. р-р» на всех контрольных точках эксперимента отмечалась воспалительная инфильтрация под подкожной мышцей, что вероятнее всего обусловлено ежедневными подкожными инъекциями. Структура дермы и эпидермиса была не изменена.

Современная концепция позволяет делить фиброгенный ответ на четыре фазы, перекрывающие друг друга: 1-я фаза – инициация ответа, вызванного первичным повреждением, 2-я фаза – активация эффекторных клеток, 3-я фаза – выработка внеклеточного матрикса, 4-я фаза – динамическое осаждение/недостаточная резорбция внеклеточного матрица. Результаты измерения флюоресценции коллагена и удельного потребления кислорода в

совокупности с морфологической картиной кожи позволяют нам провести корреляцию с фазами фиброгенного ответа. Так, в 1-ю и 2-ю фазы (0-7 сут) наблюдается повышение потребления кислорода эффекторными клетками за счет первичного повреждения ткани и следующего за ним воспаления и гипоксии потребления. В 3-й фазе (7-14сут.) нарастает флюоресценция коллагена, что подтверждается накоплением межклеточного матрикса, а уменьшение потребления кислорода – ослаблением процесса воспаления. 4-я фаза (14-21сут.) сопровождается избыточным накоплением межклеточного матрикса с обеднением клеточными элементами и резким падением потребления кислорода. Однако стоит отметить, что временные границы на данном этапе выделены условно ввиду особенностей проведения эксперимента.

Таким образом, как свидетельствуют полученные нами данные, на фоне различных вариантов фибропролиферативного процесса, отмечаются характерные изменения оцениваемых нами показателей. Достоверно известно, что воспаленная и пролиферирующая ткань имеет высокую потребность в кислороде. Наиболее ярко это выражено в структуре незрелых метаболически активных тканей рубца. Однако в тканях уже сформированного фиброза, в том числе за счет сокращения количества клеточных элементов, эта потребность уменьшается. В нашем эксперименте мы подтвердили это гистологически, а результаты вычисления удельного потребления кислорода клетками и показателя эндогенной флюоресценции коллагена и порфирина в группе «блеомицин» отразили данную зависимость.

Наибольший интерес с практической точки зрения представляет собой возможность прогнозирования варианта течения фибропролиферативного процесса, имеющего в своем исходе образование келоидного и гипертрофического рубца. При этом важно определить пороговые значения показателей, свидетельствующих о высоком риске такого исхода. С этой целью нами была оценена информативность маркеров: чувствительность, специфичность, балансовая скрининговая точность (площадь под ROC-кривой).



ROC-анализ показал, пороговыми значениями оптических параметров кожи, на основе которых можно сделать вывод о характере течения фибропролиферативного процесса кожи, являются интенсивность флюоресценции  $D(I_f)$  коллагена 1,17, интенсивность флюоресценции  $D(I_f)$  порфирина 2,3 и удельное потребление кислорода в тканях  $D(U_f)$  0,79.

Разнонаправленную динамику оцениваемых нами параметров можно объяснить различными процессами, преобладающих в течение заживления раны. Отличительной чертой фиброза кожи является значительное увеличение интенсивности флюоресценции коллагена. Однако в зависимости от стадии этого процесса можно выделить характерные изменения и остальных показателей. Так Одновременная регистрация увеличенной флюоресценции коллагена на фоне сниженного потребления кислорода и увеличенной интенсивности флюоресценции порфирина наблюдается в тех случаях, когда преобладающим процессом является гипоксия. Эти же изменения интенсивности флюоресценции по фоне нормального или повышенного потребления кислорода свидетельствуют об активном воспалительном процессе. В свою очередь, регистрация повышенного значения интенсивности флюоресценции коллагена на фоне пониженных значений интенсивности флюоресценции порфирина и потребления кислорода свидетельствуют о завершении процесса фиброза с образованием гипоцеллюлярного рубца.

Возможно выделить и параметры, указывающие на благоприятное течение гиперпластического процесса, не имеющего в своем исходе образование фибротической ткани: нормальное значение интенсивности флюоресценции коллагена на фоне повышенного значения интенсивности флюоресценции порфирина на фоне нормального или повышенного потребления кислорода, свидетельствуют о воспалительных или гипоксических изменениях без избыточного образования фиброза.

Фиброз необратим, если ткань становится малоклеточной и как следствие бедной биологически активными молекулами, необходимыми для деградации внеклеточного вещества соединительной ткани. Мы полагаем, что точку, когда

рост удельного потребления кислорода сменяется спадом, а параллельно начинает расти флюоресценция коллагена, можно считать точкой невозврата для фиброза. Мы предполагаем, что одновременное измерение флюоресценции коллагена и удельного потребления кислорода, позволит зафиксировать не только синхронный характер процессов воспаления и гипоксии в рамках фиброгенеза, но и предоставит новые возможности для диагностики фаз фиброза.

Таким образом, оптические параметры кожи могут быть использованы для оценки стадии течения фиброза, а также – для прогнозирования его исхода. Указанные критерии были апробированы нами в клинической практике.

Мы отметили, что у пациентов с неблагоприятным течением фибропролиферативного процесса кожи (при заживлении кожных ран) имеется сильная статистически значимая связь между выбранными нами оптически параметрами (интенсивность флюоресценции коллагена и порфирина, удельное потребление кислорода). Неблагоприятное течение фибропролиферативного процесса сопряжено со значительно повышенными значениями интенсивности флюоресценции коллагена и порфирина, а также сниженным потреблением кислорода. Это приводит к образованию патологических рубцов. Диагностические критерии, выработанные нами на животных моделях, были применены нами при прогнозировании исходов заживления кожных ран. Клинический опыт показал их достаточную клиническую прогностическую информативность.

В современном понимании фиброз описывается как динамически протекающий и обратимый процесс, связанный с воспалением и гипоксией, своевременное воздействие на которые повышает терапевтические возможности.

Реакция фиброзированных тканей на тот или иной вид лечения зависит от адекватности действующего лечебного фактора характеру патологического процесса, определяющего функциональное состояние ткани. Клиницисту объективно определить активность и вклад отдельных процессов (воспаление-гипоксия-фиброз) на основании осмотра не представляется возможным.

На основании полученных первичных данных и динамики их относительных изменений, анализа корреляции оптических (флюоресценции и тканевой

оксиметрии), морфологических параметров, результатов иммунофлюоресцентных и иммунохимических исследований мы полагаем, что оптические маркеры могут характеризовать как структурные характеристики тканей (фиброз), так и патологические процессы, такие как воспаление и гипоксия, протекающие в них.

В результате проведенной работы предложен алгоритм выбора клинической тактики (Рис. 5.1).

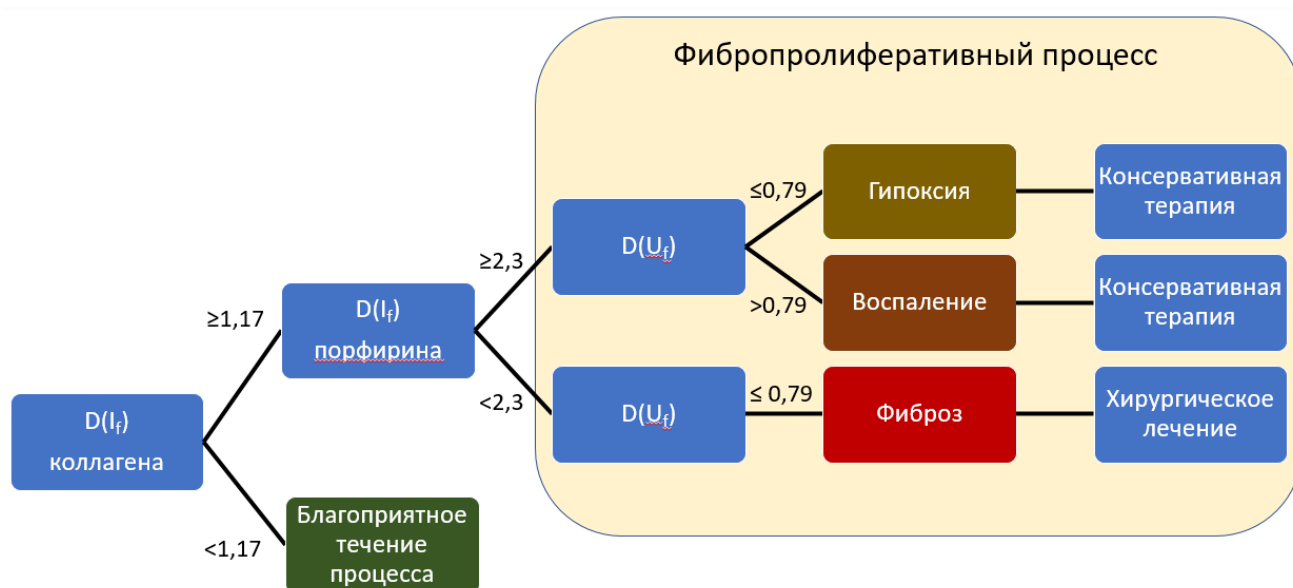


Рис. 5.1. Алгоритм выбора клинической тактики на основе оптических параметров кожи.

Таким образом, результаты проведенного исследования продемонстрировали возможность объективного не инвазивного динамического наблюдения за процессами воспаления и гипоксии в рамках развития фиброза кожи при формировании послеоперационного рубца с применением методов лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии. Предложенный подход позволяет получить количественный критерий для диагностики преобладающего патологического процесса и проведения периодизации фиброза. Это в свою очередь может позволить расширить возможности практикующих врачей в диагностике фиброза, персонализации лечебной тактики, прогнозировании исхода заболевания. Вместе с тем, данная

работа может быть продолжена для объективизации разработанных критериев и всесторонней валидации их в клинической практике. Важными остаются вопросы информативности разработанных критериев у пациентов разных возрастных групп, в зависимости от пола, индивидуальных характеристик пациента, сопутствующей патологии, локализации поражения, а также механизма повреждения кожи. Помимо этого, полученные нами данные свидетельствуют о потенциальной возможности для использования оптических не инвазивных методов диагностики для оценки состояния экстрадермальных тканей.

## ВЫВОДЫ

1. Флюоресцентная спектрометрия и оптическая тканевая оксиметрия – являются не инвазивными диагностическими методами, позволяющими с высокой точностью (площадь под ROC-кривой 0,782-0,9) дифференцировать преобладающие патогенетические механизмы фиброза, а также прогнозировать его исход.
2. Информативными маркерами фиброза, воспаления и гипоксии при развитии послеоперационного рубца кожи являются индексы интенсивности флюоресценции коллагена, порфирина и индекс потребления кислорода.
3. Регистрация индекса интенсивности флюоресценции коллагена более 1,17, индекса интенсивности флюоресценции порфирина более 2,3 свидетельствует о фибротическом процессе с высоким риском формирования гипертрофического или келоидного рубца, а регистрация индекса потребления кислорода при этом позволит выявить преобладание воспаления или гипоксии. Регистрация индекса интенсивности флюоресценции коллагена более 1,17, индекса интенсивности флюоресценции порфирина менее 2,3 и индекса потребления кислорода менее 0,79 свидетельствует о завершенности процесса формирования рубца. Регистрация индекса интенсивности флюоресценции коллагена менее 1,17, свидетельствуют об отсутствии фибропролиферативного процесса и позволяет прогнозировать образование нормотрофического рубца.
4. Лечебная тактика при заживлении раны должна основываться на индивидуальных оптических индексных показателях с учетом преобладающего патогенетического механизма и стадии процесса (завершенный или незавершенный фиброз).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Поскольку течение процесса фиброза является стадийным, следует проводить оценку оптических параметров в динамике для своевременного выявления повышенного риска развития келоидного или гипертрофического рубца и соответствующего лечебного воздействия.
2. Для стандартизации и объективизации полученных оценок, а также исключения межсубъектной вариабельности результатов следует отдать предпочтение индексным показателям (по отношению к интактной коже той же или контрлатеральной анатомической области), а не абсолютным значениям флюоресцентной спектроскопии.
3. Пороговыми значениями индексов интенсивности флюоресценции коллагена, порфирина и потребления кислорода являются 1,17, 2,3 и 0,79 соответственно. При этом для выявления преобладающего патогенетического механизма и стадии процесса данные оценки следует использовать в комплексе.
4. О благоприятном течении заживления раны свидетельствуют индексы интенсивности флюоресценции коллагена менее 1,17, что требует тактики наблюдения за пациентом. В иных случаях существует повышенный риск образования патологического рубца. При этом регистрация индексов флюоресценции коллагена более 1,17, порфирина менее 2,3 и потребления кислорода менее 0,79 свидетельствует о завершенном фибротическом процессе и при наличии показаний возможна хирургическая тактика лечения; регистрация индексов флюоресценции коллагена более 1,17, порфирина более 2,3 и потребления кислорода менее 0,79 свидетельствует о текущем фибротическом процессе с преобладанием гипоксии; а регистрация индексов флюоресценции коллагена более 1,17, порфирина более 2,3 и потребления кислорода более 0,79 свидетельствует о текущем фибротическом процессе с преобладанием воспаления, что требует назначения консервативной противовоспалительной терапии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

CTGF - фактор роста соединительной ткани

FGF s - фактор роста фибробластов

FN - фибронектин

GLUT-1 – глюкозный транспортер, тип 1

HIF-1 - гипоксия-индуцируемый фактор 1

NADH - Никотинамидадениндинуклеотид

PDGF - тромбоцитарный фактор роста

TGF-  $\beta$  - трансформирующий фактор роста бета

TIMP-1 - ингибиторы металлопротеиназ

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

$\alpha$ -SMA – альфа гладкомышечный актин

ИЛ - интерлейкин

MMP – металлопротеиназы

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ОКТ – оптическая когерентная томография

CD – кластер дифференцировки

СРБ – С-реактивный белок

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Богомолова Е. Б., Мартусевич А. К., Клеменова И. А. и др. Применение современных методов визуализации в оценке состояния и прогнозировании развития патологических рубцов//Медицина. – 2017. – Т.5, № 3. – С. 58-75.
2. Богущ П.Г., Богущ И.Г., Селицкий Д.Г. Дерматоонкологическая помощь населению: актуальные задачи // Вестн. дерматол. и венерол. - 2003. - № 6. - С. 7—9.
3. Вертиева Е. Ю., Олисова О. Ю., Кочергин Н. Г. и др. Обзор патогенетических механизмов и методов коррекции рубцов// Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2015. – Т.18, № 1. – С. 51–57.
4. Гайдина Т.А., Скрипкина П.А., Минкина О.В. и др. Профилактика образований гипертрофических рубцов после удаления доброкачественных новообразований кожи//Лечебное дело. - 2018. - № 2. - С. 94-99.
5. Грачев Н.С., Ворожцов И.Н., Марков Н.М. Планирование хирургических операций и послеоперационной реабилитации при новообразованиях головы и шеи у детей//Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи. – 2017. - № 4. – С. 19-29.
6. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 9-20.
7. Дворянкова Е., Корсунская И., Дениева М. и др. Качество жизни у больных хроническими заболеваниями кожи// Врач. - 2017. - № 7. - С. 75-77.
8. Дуванский В.А., Дзагнидзе Н.С., Бисеров О.В. и др. Микроциркуляция гнойных ран по данным лазерной доплеровской флоуметрии//Лазерная медицина. - 2007. - Т. 11, №1. - С. 46-49.
9. Журавель В.Г. Оптика и морфология кожи // Вестн. дерматол. и венерол. - 1997. - № 2. - С. 8—11.



10. Кручинская М.Г., Мантурова Н.Е. Осложнения в эстетической медицине и методы коррекции// Физиотерапевт. - 2019. - № 2. - С. 24-28;
11. Мухамадеева О.Р., Шарафутдинова Н.Х., Полунина В.В. и др. Уровень и структура заболеваемости населения болезнями кожи и подкожной клетчатки// Российский медицинский журнал. - 2019. - Т. 25, № 2. - С. 82-88;
12. Прохоренков В.И., Новиков А.И., Карачева Ю.В. и др. Возможности контактной биомикроскопии при дифференциальной диагностике буллезных поражений кожи // Росс. журн. кожных и венерич. болезней. - 2008. - № 4. - С. 32.
13. Резайкин А.В., Кубанова А.А., Резайкина А.В. Неинвазивные исследования кожи // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – Т. 6. – С. 28-32.
14. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. - Москва: Медицина, 1995. – 640 с.
15. Стешин А.В., Дуванский В.А., Азизов Г.А. и др. Лазерная доплеровская флоуметрия как метод оценки микроциркуляции гнойных ран//Инфекции в хирургии. - 2010. - Т. 8, № 1. - С. 24.
16. Черняков А.В. Профилактика и лечение патологических рубцов в хирургической практике // РМЖ. - 2017. - Т. 25, № 28. - С. 2063-2068.
17. Шанин В. Ю. Клиническая патофизиология. – Санкт-Петербург: Специальная литература, 1998. – 478 с.
18. Abignano G., Audin S.Z., Gallego C.C. et al. Virtual skin biopsy by optical coherence tomography: the first quantitative imaging biomarker for scleroderma // Annals of the rheumatic diseases. – 2013. – V. 72, №. 11. – P. 1845-1851.
19. Abignano G., Del Galdo F. Quantitating Skin Fibrosis: Innovative Strategies and Their Clinical Implications // Current Rheumatology Reports. – 2014. – V. 16, № 3. – P. 404.
20. Achterberg V.F., Buscemi L., Diekmann H. et al. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function // J Invest Dermatol. – 2014. – V. 134, № 7. – P. 1862-72.

21. Affrandi A.J., Radstake T. R.D.J., Marut W. Update on biomarkers in systemic sclerosis: tools for diagnosis and treatment // *Seminars in Immunopathology*. – 2015. - V. 37, №. 5. – P. 475 -487.
22. Akaishi S., Ogawa R., Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses // *Medical hypotheses*. – 2008. – V. 71, №. 1. – P. 32-38.
23. Amini-Nik S., Yousuf Y., Jeschke M. G. Scar management in burn injuries using drug delivery and molecular signaling: Current treatments and future directions // *Adv Drug Deliv Rev*. - 2018. - V.123. - P. 135-154.
24. Andrade C. F., Kaneda H., Der S. et al. Toll-like receptor and cytokine gene expression in the early phase of human lung transplantation // *The Journal of heart and lung transplantation*. – 2006. – V. 25, №. 11. –P. 1317-1323.
25. Andrews J.P, Marttala J., Macarak E. et al. Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment // *Matrix Biol*. – 2016. – V. 51. – P. 37–46.
26. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis // *Arthritis Research*. – Humana Press. - 2014. – P. 91-98.
27. Baisch A., Riedel F. Hyperplastic scars and keloids. Part I: Basics and prevention // *HNO*. – 2006. – V. 54. – P. 893–904.
28. Barkauskas C.E., Noble P.W. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2014. – V. 306, №.11. – P. 987-96.
29. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. et al. Growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair and Regeneration*. – 2008. – V. 16, №. 5. – P. 585-601.
30. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – V. 115, №. 2. – P. 209-218.
31. Baues M., Dasgupta A., Ehling J. et al. Fibrosis imaging: Current concepts and future directions // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2017. – V. 121. – P. 9-26.
32. Beyer C., Schett G., Gay S. et al. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis // *Arthritis research & therapy*. – 2009. – V. 11:220.

33. Bittoun J., Saint-Jalmes H., Querleux B.G. et al. In vivo high-resolution MR imaging of the skin in a whole-body system at 1.5 T // *Radiology*. – 1990. – V. 176. – №. 2. – P. 457-460.
34. Bond J.S., Duncan J.A., Mason T. et al. Scar redness in humans: How long does it persist after incisional and excisional wounding? // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008. – V. 121. – P. 487–496.
35. Botusan I. R. , Sunkari V.G., Savu O. et al. Stabilization of HIF-1 $\alpha$  is critical to improve wound healing in diabetic mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105, №. 49. – P. 19426-19431.
36. Braga T.T., Agudelo J.S., Camara N.O. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe // *Front Immunol.* – 2015. - V. 6: 602.
37. Bray R., Forrester K., Leonard C. et al. Laser Doppler imaging of burn scars: a comparison of wavelength and scanning methods // *Burns*. – 2003. – V. 29. – P. 199–206.
38. Brenner D.A., Phan S.H. Fibrosis research: methods and protocols // *Methods in molecular medicine*. – 2005. – P. 159.
39. Calin M.A., Parasca S.V., Savastru R. et al. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer // *J Cancer Res Clin*. – 2013. - V. 139. – P. 1083 – 1104.
40. Campbell E. L., Bruyninckx W.J., Kelly C.J. et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation // *Immunity*. – 2014. – V. 40, №. 1. – P. 66-77.
41. Cao L., Lafyatis R., Burkly L.C. Increased dermal collagen bundle alignment in systemic sclerosis is associated with a cell migration signature and role of Arhgdib in directed fibroblast migration on aligned ECMs // *PLOS ONE*. – 2017. – V. 12, № 6. – P. e0180751.
42. Castelino F.V., Varga J. Emerging cellular and molecular targets in fibrosis: implications for scleroderma pathogenesis and targeted therapy // *Curr Opin Rheumatol*. – V. 26, № 6. – P. 607-14.

43. Chambers R. C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? // *British journal of pharmacology*. – 2008. – V. 153, №. S1. – P. S367-S378.
44. Chiang R.S., Borovikova A.A., King K. et al. Current concepts related to hypertrophic scarring in burn injuries // *Wound Repair Regen*. – 2016. – V. 24. – P. 466–477.
45. Cho J.W., Cho S.Y., Lee S.R., Lee K.S. Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 in vitro and in vivo // *Int. J. Mol. Med*. – 2010. – V. 25. – P. 347–352/
46. Connolly M. K., Bedrosian A.S., Clair J. M. et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- $\alpha$  // *The Journal of clinical investigation*. – 2009. – V. 119, №. 11. – P. 3213-3225.
47. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E. et al. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation // *Cell*. – 2003. – V. 112, №. 5. – P. 645-657.
48. Dalimier E., Salomon D. Full-field optical coherence tomography: a new technology for 3D high-resolution skin imaging // *Dermatology*. – 2012. – V. 224, № 1. – P. 84–92.
49. Dallas S.L., Sivakumar P., Jones C.J. et al. Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1 // *J Biol Chem*. – 2005. – V. 280, № 19. – P. 18871-80.
50. Darby I. A., Hewitson T. D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis // *International review of cytology*. – 2007. – V. 257. – P. 143-179.
51. Darby I. A., Laverdet B., Bonte F., Desmouliere A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing // *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. – 2014. – V. 7. – P. 301.
52. De Langhe E, Lories R. Fibrogenesis, novel lessons from animal models // *Semin Immunopathol*. – 2015. - V.37. – P. 565–574.

53. Denkler K.A., Vaughn C.J., Dolan E.L. et al. Evidence-Based Medicine: Options for Dupuytren's Contracture: Incise, Excise, and Dissolve // *Plast Reconstr Surg.* – 2017. - V. 139, № 1. – P. 240e-255e.
54. Denton C. P., Khan K., Hoyles R.K. et al. Inducible lineage-specific deletion of T $\beta$ RII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2009. – V. 129, №. 1. – P. 194-204.
55. Di Geso L., Fillippucci E., Girolimetti R. et al. Reliability of ultrasound measurements of dermal thickness at digits in systemic sclerosis: role of elastosonography // *Clin Exp Rheumatol.* – 2011. – V. 29. – №. 6. – P. 926-932.
56. Distler J. H. W., jungle A., Pileckyte M. et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis // *Arthritis & Rheumatism.* – 2007. – V. 56, №. 12. – P. 4203-4215.
57. Distler O., Distler J.H.W., Scheid A. et al. Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis // *Circulation research.* – 2004. – V. 95, №. 1. – P. 109-116.
58. Driskell R. R., Lichtenberger B.M., Hoste E. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair // *Nature.* – 2013. – V. 504. – P. 277-281.
59. Duffield J. S., Forbes S., Constandinou Ch.M. et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair // *The Journal of clinical investigation.* – 2005. – V. 115, №. 1. – P. 56-65.
60. Duffield J.S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis // *J Clin Invest.* – 2014. – V. 124, № 6. – P. 2299-306.
61. Eyden B. The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. part 2-tumours and tumour-like lesions // *Journal of submicroscopic cytology and pathology.* – 2005. – V. 37, №. 3-4. – P. 231-296.

62. Follonier Castella L., Gabbiani G., McCulloch C.A., Hinz B. Regulation of myofibroblast activities: calcium pulls some strings behind the scene // *Exp Cell Res.* – 2010. – V.316. – P. 2390-2401.
63. Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis // *Cytokine.* – 2011. – V. 56, №. 3. – P. 544-549.
64. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases // *The Journal of pathology.* – 2003. – V. 200, №. 4. – P. 500-503.
65. Gambichler T., Jaedicke V., Terras S. Optical coherence tomography in dermatology: technical and clinical aspects // *Archives of dermatological research.* – 2011. – V. 303, №. 7. – P. 457-473.
66. Ghassemi P., Travis T. E., Moffatt L. T. A polarized multispectral imaging system for quantitative assessment of hypertrophic scars // *Biomedical Optics Express.* - 2014. – V. 5, № 10. – P. 3337-3354.
67. Ghatak, E.V. Maytin, J.A. Mack, V.C. et al. Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis // *Int J Cell Biol.* - 2015. – P. 20.
68. Goffin J. M., Pittet Ph., Csucs G. et al. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of  $\alpha$ -smooth muscle actin to stress fibers // *The Journal of cell biology.* – 2006. – V. 172, №. 2. – P. 259-268.
69. Grose R.; Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice // *Mol. Biotechnol.* – 2004. – V. 28. – P. 147–166.
70. Hahm G., Glaser J.J., Elster E.A. Biomarkers to predict wound healing: the future of complex war wound management // *Plast Reconstr Surg.* – 2011. – V. 127. – P. 21S–26S.
71. Hesselstrand R., Carlestam J., Wildt M. High frequency ultrasound of skin involvement in systemic sclerosis - a follow-up study // *Res Ther.* – 2015. - V. 19. – P. 17:329.
72. Higashiyama R., Nakao S., Shibusawa Y. et al. Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound

- healing and fibrogenesis in mice // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2011. – V. 131, №. 2. – P. 529-536.
73. Higgins D. F., Biju M.P., Akai Y. et al. Hypoxic induction of tgf is directly mediated by Hif-1 // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2004. – V. 287, №. 6. – P. F1223-F1232.
74. Hong K. H., Yoo S.A., Choi J. J. et al. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2006. – V. 146, №. 2. – P. 362-370.
75. Huang C., Akaishi S., Hyakusoku H., Ogawa R. Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder? A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings // *Int. Wound J.* – 2014. – V.11. – P. 517–522.
76. Huang D., Swanson E.A., Lin C. et al. Optical coherence tomography // *Science*. – 1991. – V. 254, №. 5035. – P. 1178.
77. Huang, C., Liu, L., You, Z. et al. Keloid progression: A stiffness gap hypothesis // *Int. Wound J.* – 2016. – V. 14, № 5.
78. Iagnocco A., Kaloudi O., Perella C. et al. Ultrasound elastography assessment of skin involvement in systemic sclerosis: lights and shadows // *The Journal of rheumatology*. – 2010. – V. 37. – №. 8. – P. 1688-1691.
79. Ichioka S., Ando T., Shibata M. et al. Oxygen consumption of keloids and hypertrophic scars // *Annals of plastic surgery*. – 2008. – V. 60, №. 2. – P. 194-197.
80. Imhof B.A., Jemelin S., Ballet R. et al. CCN1/CYR61-mediated meticulous patrolling by Ly6Clow monocytes fuels vascular inflammation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2016. – V.113. – P. E4847–E4856.
81. Iredale J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ // *Journal of clinical investigation*. – 2007. – V. 117, №. 3. – P. 539.
82. Issa R. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking // *Gastroenterology*. – 2004. – V. 126, №. 7. – P. 1795-1808.

83. Iwasaki A., K. Sakai K., Moriya K. Molecular Mechanism Responsible for Fibronectin-controlled Alterations in Matrix Stiffness in Advanced Chronic Liver Fibrogenesis // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291, № 1. – P. 72-88.
84. Jaskille A. D., Shupp J. W., Jordan, M. H., Jeng, J. C. Critical review of burn depth assessment techniques: Part I. Historical review // *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. - 2009. – V.30, № 6. – P. 937-47.
85. Jeon S. H., Chae B., Kim H. et al. Mechanisms underlying TGF- $\beta$ 1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis // *Journal of leukocyte biology*. – 2007. – V. 81, №. 2. – P. 557-566.
86. Johnson A., Dipietro L. A. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis // *The FASEB Journal*. – 2013. – V. 27, №. 10. – P. 3893-3901.
87. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer // *Nature Reviews Cancer*. – 2006. – V. 6, №. 5. – P. 392-401.
88. Karanjia R.N., Crossey M.M.E., Cox I.J. et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – V. 22, № 45. – P. 9880-9897.
89. Karsdal M.A., Nielsen S.H., Leeming D.J. et al. The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2017. – V.121. – P. 43-56.
90. Kastellorizios M, Tipnis N, Burgess D.J. et al. Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions // Springer International Publishing, Cham. – 2015. - P. 93-108.
91. Kim K.H., Won J.H., Cheng N., Lau L.F. The matricellular protein CCN1 in tissue injury repair // *J Cell Commun Signal*. – 2018. – V. 12, № 1. – P. 273 – 279.
92. Kisseleva T. The origin of fibrogenic myofibroblasts in fibrotic liver // *Hepatology*. - 2017 - V. 65, № 3. – P. 1039-1043.
93. Klingberg K., Hin B., White E.S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis // *J Pathol*. – 2013. – V. 229, № 2. – P. 298-309.



94. Kolodsick J. E., Toews G. B., Jacobzick C. et al. Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts // *The Journal of Immunology*. – 2004. – V. 172, №. 7. – P. 4068-4076.
95. Krüger B., Krick S., Dhillon N. et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106, №. 9. – P. 3390-3395.
96. Kuperman D. A., Huang X., Koth L.L. et al. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma // *Nature medicine*. – 2002. – V. 8, №. 8. – P. 885-889.
97. Kuroda K, Shinkai H, Okamoto O. Dermatopontin Expression is Decreased in Hypertrophic Scar and Systemic Sclerosis Skin Fibroblasts and is Regulated by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, Interleukin-4, and Matrix Collagen // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1999. – V. 112, №. 5. – P. 706-710.
98. Li Y., Jiang D., Liang J. et al. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44 // *The Journal of experimental medicine*. – 2011. – V. 208, №. 7. – P. 1459-1471.
99. Lian N., Li T. Growth factor pathways in hypertrophic scars: Molecular pathogenesis and therapeutic implications // *Biomed Pharmacother*. – 2016. – V. 84. – P. 42–50.
100. Liu L., Marti G.P., Wei X. et al. Age-dependent impairment of HIF-1 $\alpha$  expression in diabetic mice: Correction with electroporation-facilitated gene therapy increases wound healing, angiogenesis, and circulating angiogenic cells // *Journal of cellular physiology*. – 2008. – V. 217, №. 2. – P. 319-327.
101. Liu Y., Meyer C., Muller A. et al. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- $\beta$ -independent Smad signaling // *The Journal of Immunology*. – 2011. – V. 187, №. 5. – P. 2814-2823.

102. Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T.D., Darby I.A. Chapter three - Hypoxia and Hypoxia Signaling in Tissue Repair and Fibrosis // International review of cell and molecular biology. – 2012. – V. 296. – P. 139.
103. Macintyre L., Ferguson R. Pressure garment design tool to monitor exerted pressures // Burns. – 2013. – V. 39. – P. 1073–1082.
104. Manresa M. C., Godson C., Taylor C. T. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2014. – V. 307, № 12. – P. R1369-R1380.
105. Manrique-Guzman S, Castillo-Rueda L., Wolfsberger S. Fluorescence Guided Brain Tumor Surgery: Case Report // International Journal of neurology Research. – 2015. – V. 1, № 2. – P. 1-7.
106. Marielle W., Hinz B. Control tissue repair and fibrosis: extracellular matrix as a game changer // Matrix biology – 2018. – V. 71-72. – P. 205-224.
107. Marschall S., Sander B., Mogensen M. et al. Optical coherence tomography—current technology and applications in clinical and biomedical research // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2011. – V. 400, №. 9. – P. 2699-2720.
108. Miller M.C., Nanchahal J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring // BioDrugs. - 2005. – V. 19. - P.363–381.
109. Mine S. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging // PLoS One. – 2008. – V. 3, №. 12. – P. 40- 66.
110. Minrui L., Jiaoyan L., Linlin Z. A modified murine model of systemic sclerosis:bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis // Laboratory Investigation. – 2015. – V. 95. – P. 342–350.
111. Mirza R., Dipietro L. A., Koh T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice // The American journal of pathology. – 2009. – V. 175, №. 6. – p. 2454-2462.

112. Monstre S., Hoeksema H., Verbelen J. et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential // *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*. – 2008. – V.34, № 6. – P. 761-9.
113. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J. et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential // *burns*. – 2008. – V. 34, N. 6. – P. 761-769.
114. Moon J. OK., Welch T.P., Gonzalez F.J., Copple B.L. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -deficient mice // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2009. – V. 296, №. 3. – P. G582-G592.
115. Murayama Y., Ichikawa D., Koizumi N. et al. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid // *Anticancer research*. – 2012. – V. 32. P. - 5421–5427.
116. Murray L. A., Argentieri R.L., Farrell F.X. et al. Hyper-responsiveness of IPF/UIP fibroblasts: interplay between TGF $\beta$ 1, IL-13 and CCL2 // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2008. – V. 40, №. 10. – P. 2174-2182.
117. Mustoe T. A., Cooter R.D., Gold M.H. et al. International clinical recommendations on scar management // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2002. – V. 110, N. 2. – P. 560-571.
118. Mutalik S. Treatment of keloids and hypertrophic scars // *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* – 2005. – V.71. - P. 3–8.
119. Nauta T.D., van Hinsbergh V.W., Koolwijk P. Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15. – P. 19791–19815.
120. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. - P. 606.
121. Ogawa R., Akaishi S. Endothelial dysfunction may play a key role in keloid and hypertrophic scar pathogenesis—Keloids and hypertrophic scars may be vascular disorders // *Med. Hypotheses*. – 2016. –V. 96. – P. 51–60.
122. Ogawa R., Akaishi S., Huang, C. Clinical applications of basic research that shows reducing skin tension could prevent and treat abnormal scarring: The importance of fascial/subcutaneous tensile reduction sutures and flap surgery for keloid and

- hypertrophic scar reconstruction // *J. Nippon Med. Sch.* – 2011. – V. 78. – P. 68–76.
123. Ogawa R., Akaishi S., Kuribayashi S., Miyashita T. Keloids and Hypertrophic Scars Can Now Be Cured Completely: Recent Progress in Our Understanding of the Pathogenesis of Keloids and Hypertrophic Scars and the Most Promising Current Therapeutic Strategy // *J. Nippon Med. Sch.* – 2016. – V. 83. – P. 46–53.
124. Oh M. H., Oh S.Y., Yu J. et al. IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin // *The Journal of Immunology.* – 2011. – V. 186, № 12. – P. 7232-7242.
125. Paul D.W., Ghassemi P., Ramella-Roman J.C. et al. Noninvasive imaging technologies for cutaneous wound assessment: a review // *Wound Repair Regen.* – 2015. – V. 23. – P. 149-162.
126. Prabhu S.D., Frangogiannis N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis // *Circ Res.* – 2016. – V. 119, № 1 – P. 91-112.
127. Prabhu V., Rao S.B.S., Fernandes E.M. et al. Objective assessment of endogenous collagen in vivo during tissue repair by laser induced fluorescence // *PLoS One.* – 2014. - V. 9. – P. 1–15.
128. Reiman R. M., Thompson R. W., Feng C. G. et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity // *Infection and immunity.* – 2006. – V. 74, №. 3. – P. 1471-1479.
129. Reinke J.M., Sorg H: Wound repair and regeneration // *Eur Surg Res.* – 2012. – P. 49:35.
130. Reish R.G., Eriksson E. Scar treatments: Preclinical and clinical studies // *J. Am. Coll. Surg.* – 2008. – V. 206. – P. 719–730.
131. Rivaz H., Boctor E. M., Choti M. A. et al. Real-time regularized ultrasound elastography // *IEEE transactions on medical imaging.* – 2011. – V. 30. – №. 4. – P. 928-945.

132. Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – V. 372, № 12. – P. 1138-1149.
133. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – An overview of possible medical applications // *Photon Lasers Med*. – 2013. – V. 2, No. 3. – P. 225-240.
134. Safran M., Kim W.Y., Connell O. et al. Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103, №. 1. – P. 105-110.
135. Schreml S., Szeimies R.M., Prantl L. et al. Oxygen in acute and chronic wound healing // *British Journal of Dermatology*. – 2010. – V. 163, №. 2. – P. 257-26.
136. Schulz J-N., Plamann M., Sengle G. New developments on skin fibrosis - Essential signals emanating from the extracellular matrix for the control of myofibroblasts // *Matrix biology*. – 2018. - V. 68-69. – P. 522-532.
137. Semenza G. L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis // *Current opinion in genetics & development*. – 1998. – V. 8, №. 5. – P. 588-594.
138. Semenza G. L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 // *Annual review of cell and developmental biology*. – 1999. – V. 15, №. 1. – P. 551-578.
139. Semenza G. L. Vascular responses to hypoxia and ischemia // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2010. – V. 30, №. 4. – P. 648-652.
140. Sen C.K., Roy S. Oxygenation state as a driver of myofibroblast differentiation and wound contraction: Hypoxia impairs wound closure // *J. Investig. Dermatol.* - 2010. – V. 130. - P. 2701–2703.
141. Singer A. J., Clark R. A. F. Cutaneous wound healing // *New England journal of medicine*. – 1999. – V. 341, №. 10. – P. 738-746.
142. Steinbrech D.S., Mehrara B.J., Chau D. et al. Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts // *Ann. Plast. Surg.* – 1999. – V. 42. – P. 514–519.

143. Stücker M., Altmeyer P., Herde M. et al. The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis // *The Journal of physiology*. – 2002. – V. 538, № 3. – P. 985-994.
144. Suarez E., Syed F., Alonso-Rasgado T., Bayat A. Identification of biomarkers involved in differential profiling of hypertrophic and keloid scars versus normal skin // *Arch Dermatol Research*. – 2015. – V. 309, № 2. – P. 115-133.
145. Tandara A. A., Mustoe T. A. Oxygen in wound healing—more than a nutrient // *World journal of surgery*. – 2004. – V. 28, № 3. – P. 294-300.
146. Taylor C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway // *Biochemical journal*. – 2008. – V. 409, № 1. – P. 19-26.
147. Tyndall A., Matucci-Cerinic M., Müller-Ladner U. Future targets in the management of systemic sclerosis // *Rheumatology*. – 2009. – V. 48, № 3. – P. iii49 – iii53.
148. Ueda K., Yasuda Y., Furuya E., Oba S. Inadequate blood supply persists in keloids. *Scand J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg*. – 2004. – V. 38. – P. 267–271.
149. Van der Slot A.J., Zuurmond A.M., Van den Bogaerdt A.J. et al. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon // *Matrix Biology*. – 2004. – V. 23, № 4. – P. 251-257.
150. Van Hal T. W., van Bon L., Radstake T. A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis // *International journal of rheumatology*. – 2011. – V. 2011.
151. Verhaegen P.D.H.M., Van Zuijlen P.P.M., Pennings N.M. et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis // *Wound Repair and Regeneration*. – 2009. – V. 17, № 5. – P. 649-656.
152. Verrecchia F., Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis // *World journal of gastroenterology*. – 2007. – V. 13, № 22. – P. 3056-62.

153. Wang J. S., Lin C. T. Systemic hypoxia promotes lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress during moderate exercise // *European journal of applied physiology*. – 2010. – V. 108, №. 2. – P. 371-382.
154. Wang, P., Jiang L. Z., Xue B. Recombinant human endostatin reduces hypertrophic scar formation in rabbit ear model through down-regulation of VEGF and TIMP-1 // *Afr. Health Sci*. – 2016. – V. 16. – P. 542–553.
155. Weir L., Robertson D., Leigh I.M. et al. Hypoxia-mediated control of HIF/ARNT machinery in epidermal keratinocytes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2011. – V. 1813, №. 1. – p. 60-72.
156. Weng H. L., Lui Y., Chen J. et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor  $\beta$ 1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis // *Hepatology*. – 2009. – V. 50, №. 1. – P. 230-243.
157. Wermuth P.J., Jimenez S.A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases // *Clin Transl Med*. – 2015. – Vol.7. – P. 4:2.
158. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // *Physiological reviews*. – 2003. – V. 83, №. 3. – P. 835-870.
159. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. // *J. Investig. Dermatol*. – 2007. – V. 127. – P. 998–1008.
160. White E.S. Lung extracellular matrix and fibroblast function // *Ann Am Thorac Soc*. – 2015. – V.12, № 1. – P. S30-3.
161. Wu M., Schneider D.J., Mayes M.D. et al. Osteopontin in Systemic Sclerosis and its Role in Dermal Fibrosis // *The Journal of investigative dermatology*. – 2012. – V. 132, № 6. – P.1605-1614.
162. Wynn T. A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection // *Nature*. – 1995. - V. 376. - P. 594-596.
163. Wynn T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *The Journal of pathology*. – 2008. – V. 214, №. 2. – P. 199-210.
164. Wynn T. A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm // *Nature Reviews Immunology*. – 2004. – V. 4, №. 8. – P. 583-594.

165. Wynn T. A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *The Journal of experimental medicine*. – 2011. – V. 208, № 7. – P. 1339-1350.
166. Wynn T. A., Ramalingam T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nature medicine*. – 2012. – V. 18, № 7. – P. 1028-1040.
167. Xue M., Jackson C.J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring // *Advances in Wound Care*. – 2015. - V. 4, № 3. – P. 119-136.
168. Yang G., Volk A., Petley T. et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling // *Cytokine*. – 2004. – V. 28, № 6. – P. 224-232.
169. Zhang S., Dong Z., Peng Z., Lu F. Anti-Aging Effect of Adipose-Derived Stem Cells in a Mouse Model of Skin Aging Induced by D-Galactose // *PLoS ONE*. - 2014, - V.9, № 5. –P.e97573.
170. Zhang X., Liu L., Wei X. et al. Impaired angiogenesis and mobilization of circulating angiogenic cells in HIF-1 $\alpha$  heterozygous-null mice after burn wounding // *Wound repair and regeneration*. – 2010. – V. 18, № 2. – P. 193-201.
171. Zhou G., Dada L. A., Wu M. et al. Hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition requires mitochondrial ROS and hypoxia-inducible factor 1 // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2009. – V. 297, № 6. – P. L1120 - L1130.
172. Zhou X., Tan F.K., Guo X., Arnett F.C. Attenuation of collagen production with small interfering RNA of SPARC in cultured fibroblasts from the skin of patients with scleroderma // *Arthritis & Rheumatism*. – 2006. – V. 54, № 8. – P. 2626-2631.
173. Zhu F., Wang Q., Guo C. et al. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells—a potential mechanism for human acute coronary syndrome // *Clinical immunology*. – 2011. – V. 141, № 2. – P. 152-160.
174. Zhu Z., Ding J., Tredget E.E. The molecular basis of hypertrophic scars // *Burns Trauma*. – 2016. - V. 4 – P. 2.
175. Zollinger A.J., Smith M.L. Fibronectin, the extracellular glue // *Matrix Biol*. – 2017.-V. 60-61. – P. 27-37.