

На правах рукописи



Файзуллин Алексей Леонидович

**Применение антифибротических скаффолдов в регенеративной медицине
(экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование)**

14.03.02 – Патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Шехтер Анатолий Борухович

Официальные оппоненты:

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович – доктор медицинских наук, доцент, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», заместитель директора по научному развитию

Иванов Алексей Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной клеточной патологии, заведующий лабораторией

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» июня 2022 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Медицинские имплантаты, такие как стенты, протезы и искусственные ткани, применяются для лечения тяжёлых заболеваний, включая остеоартрит, инсульт, пороки развития кровеносных сосудов, злокачественные новообразования, а также тяжелые травматические и послеоперационные повреждения органов и тканей. Однако, даже самые биосовместимые имплантаты вызывают иммунную реакцию на инородное тело, ограничивающую функциональные результаты имплантации [Klopffleisch et al., 2017]. Периимплантное образование соединительнотканной капсулы является естественным ответом ткани на инородное тело, направленным на его изоляцию. Однако, склерозированная капсула становится толстой и неэластичной, превращается в очаг хронического воспаления. Полная изоляция имплантата от окружающих тканей препятствует транспортировке питательных веществ и лекарств в периимплантную зону, что усугубляет прогрессивное склерозирование и контракцию капсулы.

Актуальным направлением регенеративной медицины – области медицины, направленной на восстановление поврежденных или утраченных биологических тканей и органов, – является применение тканеинженерных конструкций [Lee et al., 2018]. Для создания имплантируемых искусственных тканей и органов используется комбинация биоматериалов, клеток, лекарств и биологических факторов. Природные и синтетические биоматериалы выполняют роль скаффолдов – каркасных конструкций для клеток, создающих их микроокружение до имплантации и на ранних этапах внутри организма, а также определяющих механические характеристики всей конструкции [Lee et al., 2018]. Важно, что именно скаффолд прежде всего распознается иммунными клетками реципиента как инородное тело, вследствие чего развивается тканевой ответ на имплантат [Mariani et al., 2019]. Вокруг большинства имплантируемых скаффолдов формируется соединительнотканная капсула, ограничивающая интеграцию искусственной ткани в организм реципиента [Chung et al., 2017].

Основу патологических морфологических изменений окружающих имплантат тканей, составляет фиброз. Хотя ключевые молекулярные механизмы периимплантного фиброза (ПИФ), такие как активация сигнального пути трансформирующего ростового фактора бета-1 (ТРФбета-1), были идентифицированы, этот процесс систематически не изучался на клеточном и тканевом уровнях [Li et al., 2007]. В частности, не изучена эффективность применения в клинической практике антагониста рецепторов ТРФбета-1, препарата пирфенидон [Veiseh et al., 2019]. Кроме того, отсутствие данных о биосовместимости имплантируемых материалов связано с методологической сложностью экспериментального моделирования взаимодействия ткани с

имплантатом *in vitro* и на лабораторных животных, а также ограниченной доступностью биопсийного материала от пациентов.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время сформированы три основных подхода к разработке имплантируемых материалов, препятствующих фиброзу окружающих тканей: 1) изменение химического состава имплантатов; 2) создание текстурированных поверхностей имплантатов; 3) локальная доставка биологически активных веществ.

Наиболее биологически совместимыми материалами, которые применяют для создания тканеинженерных конструкций и ИСДЛ, являются коллаген и фибрин. Но их быстрая деградация после имплантации и не достаточные для поддержания структурной целостности устройства механические характеристики вынуждают исследователей комбинировать их с другими, медленно или нерезорбируемыми материалами [Chailakhyan et al., 2021].

Заданная текстура поверхности имплантата помещает окружающие его клеточные компоненты в условия контролируемых механических нагрузок, обусловленных в том числе сдвиговым стрессом со стороны агрегатного вещества экстрацеллюлярного матрикса [Svehla et al., 2002]. Экспериментально было продемонстрировано, что увеличение неровности поверхности имплантата приводит к развитию более выраженной фибротической трансформации периимплантной ткани [Doloff et al., 2021].

Высвобождение антифибротических молекул из тканеинженерных конструкций направлено на продление времени интеграции имплантата в организм пациента. Так, в эксперименте *in vivo* было продемонстрировано противорубцовое действие полимерного скаффолда с алкалоидом женьшеня Rg3 [Cheng et al., 2013; Cheng et al., 2016]. Модификация искусственной уретры малыми интерферирующими рибонуклеиновыми кислотами ТРФбета-1 позволила предотвратить рестеноз [Li et al., 2013]. В другом исследовании, где уретропластика проводилась искусственной уретрой с ингибитором молекулярного пути Wnt ICG-001, локальная доставка препарата значительно подавила синтез коллагена фибробластами [Zhang et al., 2015].

Остается неисследованным вопрос межклеточного сигналинга и клеточных трансдифференцировок, ассоциированных с тканевой реакцией на биоматериалы. Контроль этой реакции осуществляется макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГМКИТ) [Sheikh et al., 2015]. Секреция медиаторных молекул макрофагами различалась при культивировании на различных коммерчески доступных имплантатах *in vitro* [Barr et al., 2017]. До представленных в нашей работе результатов сведения об иммунофенотипах периимплантных ГМКИТ были ограничены положительной экспрессией CD68 [de Bakker et al., 2018].

Прототип ИСДЛ, предложенный в представленной работе, является первым шагом к разработке комплексных биоразлагаемых скаффолдов для создания тканеинженерных конструкций, обеспечивающих местный пролонгированный контроль ПИФ. Основу исследовательского проекта по интерпретации результатов динамической фибротической трансформации периимплантных тканей составили проведенные нами проработки морфологических и физико-химических особенностей гипертрофических рубцов (ГР), моделируемых на ушах кроликов. Предложенная в статье Morris модель гипертрофического рубца содержала информацию о динамике изменений его размера, но не давала достаточно описаний динамических изменений клеточного состава и экстрацеллюлярного матрикса ткани [Morris et al., 1997]. Полученные результаты позволили нам определить сроки развития и стабилизации фиброза ткани уха кролика, таким образом определив продолжительность эксперимента по оценке профилактического антифибротического эффекта локальной доставки пирфенидона в участки имплантаций.

Цель работы

Установить динамические особенности моделируемого фиброза дермы кожи и эффекты медленно биodeградирующих полилактидных скаффолдов с пирфенидоном на реакцию на инородное тело и периимплантный фиброз в моделях кожной раны и кожного кармана на ушах кроликов.

Задачи исследования

1. Выявить морфологические особенности развития гипертрофических рубцов на ушах кроликов.
2. Установить временные сроки физико-химической стабилизации созревания гипертрофических рубцов в модели уха кролика.
3. Охарактеризовать морфологическую структуру периимплантных тканей вокруг полилактидных скаффолдов, фиксированных оригинальным способом подкожно на ушах кроликов.
4. Охарактеризовать распределение и высвобождение пирфенидона из полилактидных скаффолдов и их микроструктуру.
5. Установить морфологические особенности периимплантных тканей вокруг полилактидных скаффолдов с пирфенидоном.
6. Определить иммунофенотипы клеток периимплантных тканей с использованием маркеров миофибробластной трансдифференцировки фибробластов, α -гладкомышечного актина (α -SMA), и поляризации макрофагов, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и аргиназы-1 (Arg1).

7. Определить термическую стабильность и уровни экспрессии генов коллагена в периимплантах тканей.

Научная новизна

В настоящей работе впервые показано, что рубцы, которые развиваются в модели раны на кроличьих ушах, отражают особенности человеческих зрелых гипертрофических рубцов кожи, а также определен срок их полного созревания – 3 месяца. Предложена классификация стадий созревания гипертрофических рубцов на основе их морфологических паттернов, иммуногистохимического и физико-химического профилей внеклеточного матрикса. Полученные результаты позволили утверждать, что эта модель операции на ушах кроликов может быть применена для исследования фибротического компонента тканевой реакции на имплантированные биоматериалы при условии модификации – создания кожного кармана на ушах кроликов.

Впервые в проведенной работе применен для фармакологического контроля тканевой реакции на полилактидный имплантат антифибротический препарат - пирфенидон. Выявлены эффекты локальной доставки пирфенидона на развитие ПИФ на основании морфологических исследований. Результаты иммуногистохимического исследования утвердили и расширили наши знания о роли гигантских многоядерных клеток инородных тел и миофибробластов в формировании избыточного фиброза периимплантах соединительнотканной капсулы и в механизмах антифибротической терапии.

Показали возможность антифибротической модификации полилактидного имплантата для повышения биосовместимости тканеинженерных конструкций на основе полимерных и комбинированных скаффолдов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты данной работы предлагают новое видение межклеточного взаимодействия гигантских многоядерных клеток инородных тел и фибробластов в периимплантах соединительнотканых капсулах. Антифибротическая модификация скаффолдов, оказав влияние на макрофаги в ранний имплантационный период, предотвратила миофибробластную трансдифференцировку фибробластов и разрастание соединительной ткани *de novo* в участке имплантации.

Антифибротическая модификация применяемых в тканевой инженерии скаффолдов может позволить предотвратить постимплантационные осложнения в реконструированных органах, такие как стриктуры уретры, стенозы трахеи и рубцы кожи. К тому же, полученные данные о значимости ТРФбета-1 ассоциированной поляризации гигантских многоядерных

клеток инородных тел открывают новые возможные мишени для пост-имплантационной терапии.

Методология и методы исследования

Всего в работе было изучено 66 фрагментов тканей от 14 лабораторных кроликов. В работу по исследованию созревания гипертрофических рубцов вошли данные, полученные с 24 участков раневых дефектов и 6 участков интактной кожи от 8 кроликов-шиншилл. На вентральной стороне кроличьих ушей создали полнослойные раны кожи с удалением надхрящницы ушного хряща. Образцы тканей изучали на 30, 60, 90 и 120 послеоперационные дни с помощью гистопатологического исследования и морфометрии, а также биохимическим анализом. Супрамолекулярная организация коллагена исследовали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

Микроструктуру и высвобождение пирфенидона из полилактидных имплантатов, полученных методом селективного поверхностного лазерного спекания, охарактеризовали в исследовании антифибротических скаффолдов с пирфенидоном (дозировка 500 мкг). Воздействие антифибротических скаффолдов на ПИФ изучили на тканях 36 кожных карманов на ушах 6 кроликов-шиншилл на 30 и 60 послеоперационные дни. В контрольных группах имплантировали скаффолды без пирфенидона. Дополнительным контролем исследования была группа, в которой в места имплантаций «пустых» скаффолдов провели одноразовую подкожную инъекцию пирфенидона в дозировке 500 мкг. Толщину ткани вокруг имплантата в гистологических препаратах определяли морфометрически. Термическую стабильность коллагена в периимплантной капсуле определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Роль отдельных клеточных компонентов в ПИФ исследовали с помощью иммуногистохимии на маркеры поляризации макрофагов, iNOS и Arg1, и маркер миофибробластной трансдифференцировки фибробластов, α -SMA. Экспрессию генов цепей коллагена и ТРФбета-1 исследовали с помощью полимеразной цепной реакции. Межгрупповые различия проанализировали методами статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлены стадии и срок стабилизации созревания гипертрофических рубцов в модели уха кролика – 90 суток.
2. Имплантация скаффолда из полилактидных гранул приводит к образованию зрелой соединительнотканной капсулы на 60 сутки эксперимента.
3. Высвобождение пирфенидона из состава антифибротического скаффолда приводит к снижению морфологических признаков реакции на инородное тело и периимплантного фиброза.

4. Антифибротический эффект пирфенидона на периимплантные ткани коррелирует с изменением иммунофенотипов гигантских многоядерных клеток инородных тел (снижение экспрессии Arg1 при сохранении уровня iNOS) и фибробластов (снижение экспрессии α -SMA).

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертация выполнялась в рамках государственного задания: «Морфологические аспекты репаративной регенерации: обоснование применения новых тканеинженерных конструкций для пластики полых органов, хрящевой и костной ткани, физико-химических методов регенерации тканей (лазерная индукция, NO-терапия, фотодинамическая терапия), новых методов лечения ран и антифиброзной терапии» (ЕГИСУ НИОКТР АААА-А19-119121390049-8).

Внедрение в практику

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) при изучении образовательной программы «Введение в регенеративную медицину», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело (Акт №14 от 09.03.2022).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – Патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам: 2 – «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», 3 – «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется использованием достаточного количества биологических образцов (66 фрагментов тканей) лабораторных животных, приобретенных в сертифицированном питомнике в количестве 14 особей, что является достаточным для получения достоверных результатов. Достоверность результатов подтверждается также применением известных морфологических и иммуногистохимических методов исследования с использованием сертифицированного научного оборудования, наборов антител и реактивов, строгим следованием исследовательским методикам. Анализ результатов проведен с применением современных методов количественной статистики и с применением сертифицированных пакетов программ.

Апробация диссертации состоялась на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) протокол №3 от 11.03.2022 г.

Результаты диссертации были представлены на Итоговой Всероссийской студенческой научной конференции с международным участием «Медицинская весна» (2018), Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите (2018), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (2019), 10й Международной Конференции по Наномедицине в Сиднее (2019), Конференции по Биомиметике в Биоинженерии в Брисбене (2019), 14м Всемирном Конгрессе по Воспалению в Сиднее (2019) и Симпозиуме Пантхоокеанского Общества Соединительной Ткани (2020).

Личный вклад автора

Автором были проведены хирургическое моделирование гипертрофических рубцов и имплантации скаффолдов, забор и пробоподготовка аутопсийного материала, морфологический и иммуногистохимический анализ, а также статистический анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата. Автор принимал ведущее участие в написании статей и тезисов и их подготовке к публикации в научных изданиях. Результаты проведенного исследования были представлены в 9 научных публикациях.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе: - научных статей, отражающих основные результаты диссертации - 9 статей из них:

- в журналах, включенных в международную базу Scopus - 7;
- обзорных статей - 2;
- публикаций в международных и всероссийских научных конференциях - 3

Структура и объем диссертации

Диссертация построена по классическому типу и изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц и 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, главы методов исследования и глав собственных результатов, заключения, выводов и списка литературы, в котором 19 работ отечественных и 241 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Хирургическое моделирование гипертрофических рубцов

На левом ухе каждого кролика моделировали по три ГР в соответствии с опубликованным протоколом [Morris et al., 1997]. Дефекты кожи и надхрящницы на всю толщину создавались с

помощью 10-мм стерильного биопсийного перфоратора. На 30-й, 60-й, 90-й и 120-й послеоперационные дни (ПОД) кроликов выводили из эксперимента инъекцией Золетила 100 (60 мг / кг массы тела животного). Усыпляли по двое животных на каждую временную точку эксперимента. От каждого животного собирали по три рубца вместе с 2-3 мм ободком окружающей кожи, всего – 24 рубца.

Создание и характеристика скаффолдов

Гранулы поли-DL-лактида, полимера PURASORB PDL04 (1824008, Purac, Нидерланды), и ПФ (5-метил-1-фенил-2-[1H]-пиридон, HY-B0673, MedChemExpress, Китай) были использованы в качестве первичных материалов для создания имплантатов. Гранулы ПЛА (диаметром 2–3 мм) измельчали в ножевой мельнице и пропускали через сито для получения частиц размером <100 мкм. Полученный полимерный порошок использовали для изготовления имплантатов, использованных в контрольных группах (ПЛА⁰ и ПЛА⁰+инПФ). Часть порошка полимера смешивали с навеской ПФ из расчета 500 мкг ПФ на 0,3 г полимера. Полученную смесь вспенивали в сверхкритическом диоксиде углерода при 45 °С и давлении 20 МПа в течение 2ч.

Полученный совместно вспененный материал ПЛА и ПФ и чистый порошок ПЛА измельчали отдельно, просеивали во второй раз и использовали для формирования имплантатов в форме дисков (диаметром 10 мм и высотой 1 мм) ПЛА@ПФ и ПЛА⁰, соответственно. Формирование имплантатов осуществляли методом поверхностно-селективного лазерного спекания [Greibenik et al., 2018; Churbanov et al., 2018]. Порошки обрабатывали инфракрасным лазером с помощью скальпеля-коагулятора LS 1.9 (ИПГ ИРЭ-Полус, Россия) с длиной волны 1,94 мкм при мощности 150 мВт и скорости сканирования 15 мм/с, обеспечивающих локальное спекание только поверхностей полимера (на глубину <2 мкм от поверхности частиц полимера) без значительных тепловых нагрузок на объем полимера.

Текстуру поверхности спеченных имплантатов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Phenom ProX (Phenom World, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 10 кВ. Оценка краевых углов была выполнена с использованием метода лежащей капли на системе для измерения свойств поверхности (Acam D-2, Apex Instruments Co. Pvt. Ltd., Индия). Для исследования равномерности распределения ПФ в полимерном имплантате на микроуровне использовали метод спинового зонда [Kokorin, 2012]. Спектры электронного парамагнитного резонанса зонда регистрировали с помощью радиоспектрометра Bruker EMX 500 Plus X-диапазона (Bruker, Германия) при 90 К.

Динамику высвобождения ПФ сравнивали для композитного порошка ПЛА@ПФ и для спеченных имплантатов ПЛА@ПФ одинаковой сухой массы. Количество высвобожденного ПФ анализировали спектрофотометрически на длине волны 340 нм, соответствующей профилю

поглощения ПФ [Parmar et al., 2014], при этом образцы хранили при 37 °С в фосфатном буферном солевом растворе рН 7,4 в течение 6 дней.

Хирургические имплантации скаффолдов

Кожные карманы (1,5×1,5 см) были сформированы на вентральной стороне ушей кролика путем тупой сепарации дермы от надхрящницы хрящевой пластинки. Имплантаты фиксировали шовным материалом 3-0 Prolene (Ethicon, США) подкожно, в кожных карманах, для моделирования ПИФ. Один контрольный имплант ПЛА⁰, один имплант ПЛА⁰ с последующей инъекцией 500 мкг ПФ в 200 мкл фосфатного буферного солевого раствора (ПЛА⁰+инПФ) и один имплантат ПЛА с 500 мкг ПФ (ПЛА@ПФ) имплантировали в каждое ухо. Имплантаты помещались на расстоянии не менее 1,5 см от краевой артерии уха и друг от друга.

На 30-й и 60-й дни после операции кроликов выводили из эксперимента инъекцией раствора Золетила 100 (60 мг / кг массы тела животного). Места имплантации иссекали вместе с окружающими тканями на расстоянии примерно 2–3 мм от краев исходной раны вместе с имплантированными материалами. Всего – 36 участков имплантаций.

Гистологический анализ

Фиксированные в 10% нейтральном забуференном формалине ткани заливали в парафиновые блоки в строгой ориентации, обеспечивающей получение срезов в перпендикулярной поверхности кожи плоскости. Срезы толщиной 3-4 микрометра окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ), набором окраски по Ван Гизону (ВГ) и пикросириусом красным (ПСК) и исследовали с помощью универсального микроскопа LEICA DM4000 B, оснащенного видеокамерой LEICA DFC7000 T. Камера работает под управлением программного обеспечения LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия). Образцы изучали стандартной оптической микроскопией и в поляризованном свете.

Имуногистохимический анализ

Срезы образцов тканей, фиксированных в 10% нейтральным забуференном формалине и залитых в парафиновые блоки, толщиной 3-4 микрометра депарафинизировали, инкубировали с 3% перекисью водорода в течение 10 минут, подвергали индуцированной нагреванием антигенной демаскировке (буфер цитрата натрия, рН 6,0, 30 минут в водяной бане при 80 °С). Неспецифическое окрашивание предотвращали блокирующим раствором (Cell Marque, США) и инкубировали с мышинными моноклональными первичными антителами против коллагена типа I (GTX26308, GeneTex, США, разведение 1:4000), α -SMA (A2547, Merck, США, разведение 1:400), iNOS (MA5-17139, Invitrogen, США, разведение 1:400) и Arg1 (ab239731, Abcam, Великобритания, разведение 1:200). Визуализацию проводили с помощью вторичных козьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (G-21040, Invitrogen, США, разведенные 1:

1000), и диаминобензидином с контрастным окрашиванием гематоксилином. Экспрессию α -SMA в фибробластах и iNOS и Arg1 в ГМКИТ оценивали во всем периимплантном комплексе полуколичественным балльным подсчетом.

Морфометрический анализ

Линейные измерения на микрофотографиях гистологических препаратов производили в программном обеспечении LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия). Толщину рубца измеряли в каждом образце на пяти полях зрения как расстояние от базальной мембраны эпителия до надхрящницы. Фибротический индекс оценивали как отношение (%) толщины рубцовой ткани с параллельными пучками коллагена к средней общей толщине рубца. Количество клеток в рубцовой ткани подсчитывали при 400-кратном увеличении в 10 случайных полях зрения в каждом образце и рассчитывали среднее количество клеток всех типов на один мм² среза ткани. Гистологические признаки воспаления в рубце по сравнению с окружающей нормальной кожей оценивали с использованием полуколичественной оценки.

Толщину ткани вокруг имплантата измеряли в каждом гистологическом образце в пяти участках, расположенных на расстоянии ~400 мкм друг от друга в центре места имплантации. Измерения проводили от базальной мембраны эпидермиса до верхней поверхности надхрящницы хрящевой пластины. Относительную площадь имплантатов измеряли в центральных частях каждого гистологического препарата путем выбора и сегментации областей белых пикселей с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США), рассчитанных в мкм², поделенных на площадь поперечного сечения интактных имплантатов соответствующей длины, равной $3,5 \times 10^5$ мкм², и умноженной на 100%.

Химический анализ

Образцы высушенных тканей гидролизовали, и аминокислотный анализ проводили с помощью анализатора аминокислот Hitachi-835 (Hitachi, Япония) стандартным способом для анализа гидролизата белка. Содержание коллагена оценивали, принимая, что содержание гидроксипролина (Гип) в коллагене составляет 13,5% [Gasteiger et al., 2003]. Также определяли количество гидроксизина (Гил). Для анализа гликозаминогликанов (ГАГ) небольшие кусочки ткани сушили, взвешивали и погружали в водяную баню при 85 °C на 12-15 минут для денатурации тройной спирали коллагена. После этого кусочки растворяли в растворе трипсина с концентрацией 1 мг/мл в течение 24 часов при 37 °C; суспензию центрифугировали. Количество ГАГ определяли в супернатанте с помощью анализа 1,9-диметилметиленового синего (MP Biomedicals, США) [Farndale et al., 1986]. Поглощение при 589 нм измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Термический анализ

Образцы тканей примерно 7–10 мг помещали в герметично закрытые алюминиевые поддоны. Измерения методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили на калориметре Phoenix DSC 204 (Netzsch, Германия). Нагревание осуществляли от 20 °С до 90 °С со скоростью сканирования 10 °С/мин. Полученные кривые ДСК анализировали с использованием программного обеспечения Proteus Thermal Analysis (Netzsch, Германия). Деконволюция данных ДСК в области 40-85 °С в пики Гаусса была выполнена путем подгонки нескольких пиков с использованием программного обеспечения Origin 8.0 (OriginLab, США).

Генетический анализ

Суммарную РНК выделяли методом фенол-хлороформной депротеинизации нуклеиновых кислот с использованием набора реагентов «Проба-НК» (НПФ ДНК-технология, Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реактивов для проведения обратной транскрипции (НПФ ДНК-Технология, Россия) в объеме 15 мкл (7 мкл RT-смеси, 3 мкл 3 пМ раствора олигонуклеотидной затравки и 5 мкл выделенной РНК) с использованием в качестве затравки 15-рендом РНК. Реакцию проводили в температурном режиме: 30 мин при 16°С, 30 мин при 42°С и 5 мин при 85°С.

Измерение уровня экспрессии матричной РНК проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием набора реактивов для проведения ПЦР (НПФ «ДНК-Технология», Россия) и детектирующего амплификатора ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Реакцию проводили в объеме 20 мкл: 18,5 мкл ПЦР-смесь (включающая по 10 пмоль каждого из олигонуклеотидных праймеров и 5 пмоль олигонуклеотидного зонда). Реакцию проводили в следующем режиме: 50°С – 2 мин, 95°С – 10 мин и с последующими 50 циклами 95°С – 15 сек, 62°С – 15 сек. Количественную оценку мРНК проводили в условных единицах путем оценки дельты дельты порогового цикла по отношению к количеству мРНК Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, измеренному в том же объеме (5 мкл).

Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.00 для Windows (GraphPad Software, США) и статистической программы SPSS 21.0 (International Business Machines, США). Нормальность распределения количественных данных проверялась тестом нормальности Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия нормально распределенных данных анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Тьюки. Различия индексов воспаления и балльной оценки экспрессии иммуногистохимических маркеров оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна.

Непараметрический анализ межгрупповых сравнений проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Анализ корреляций между исследуемыми переменными проводили с использованием непараметрического коэффициента корреляции Спирмена и двусторонних статистических тестов. Р-значения $\leq 0,05$ считались статистически значимыми. Результаты статистического анализа были представлены в виде графиков разброса со средними значениями и стандартными отклонениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При **макроскопическом изучении** ушей кроликов во всех временных точках эксперимента определялись участки **рубцовой ткани**. Рубцы округлой формы, располагались подкожно и имели диаметр 10 мм. Визуально рубцы на ПОД30 не выбухали над поверхностью, кожа над ними была с выраженными признаками гиперемии. На ПОД60 в периферических областях дефект был представлен валиком из плотной рубцовой ткани, в центральной части дефекта на коже определялась зона умеренной гиперемии, под которой рубец имел эластичную консистенцию. Было отмечено значительное утолщение и уплотнение рубцовой ткани на ПОД90, рубец выступал над поверхностью кожи на 0,5 см. Участки рубцов на ПОД120 стали более плотными по сравнению с предыдущей временной точкой, кожа над ними была обычного вида с восстановленным волосным покровом. Внешний вид рубцов соответствовал гипертрофическим рубцам кожи человека, относящихся к патологическим рубцам.

Применяя количественные и полуколичественные методы объективной оценки **морфологических** и **физико-химических** характеристик рубцов, были выделены четыре стадии созревания экспериментальных ГР на кроличьем ухе.

1 стадия, ранний незрелый рубец. На ПОД30 отмечались выраженные дистрофические изменения эпителия: утолщение и акантоз. Рубцовая ткань была незрелой. Она состояла из богато васкуляризованной организованной грануляционной ткани с очень высокой клеточностью и признаками воспаления: очагами лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов, а также микроциркуляторными нарушениями, включая сладж эритроцитов, лимфостаз и кровоизлияния. Химическая характеристика включала пониженное содержание общего белка и коллагена, пониженное отношение Гип / Гил и резко увеличенное количество ГАГ. Рубец был толще дермы неповрежденной кожи, при этом еще не образовались пучки коллагена с параллельным расположением волокон. Термический анализ выявил единственный пик при $\sim 61^\circ\text{C}$, который указывал на большую долю ($\sim 50\%$) незрелого коллагена.

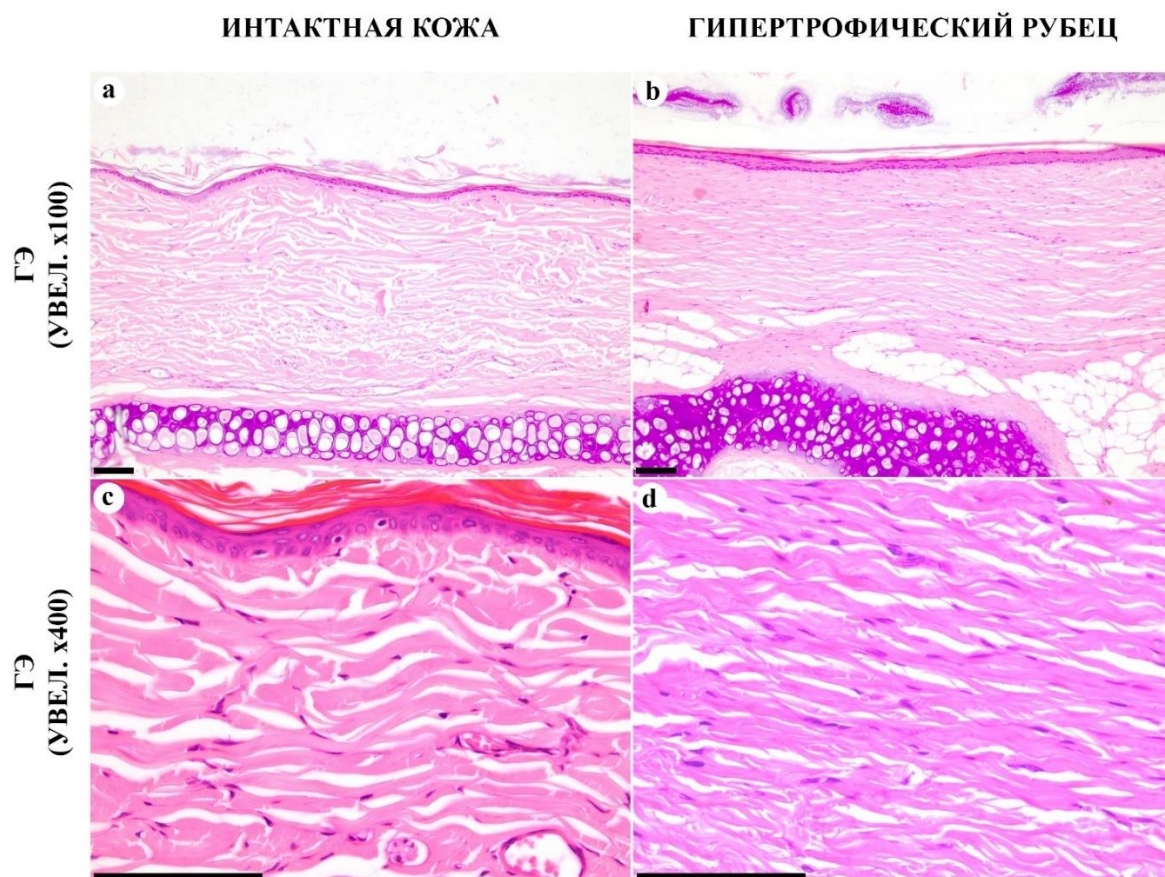


Рисунок 1 – Микрофотографии intactной кожи (а, с) и экспериментальных рубцов (b, d) на ПОД90, окрашивание ГЭ. Увеличения x100 (a,b) и x400 (c,d), масштабный отрезок – 100 мкм. (а) Эпителий intactной кожи на вентральной стороне уха кролика тонкий, архитектура дермы сетчатая, хрящевая пластина окружена надхрящницей. (b) Эпителий над гипертрофическим рубцов утолщен, волокна коллагена дермы ориентированы однонаправленно, параллельно эпителию. (с) Эпителий intactной кожи многослойный ороговевающий, представлен 2-3 слоями клеток. Внутри дермы волокна и клетки, преимущественно фибробласты, ориентированы разнонаправленно. (d) Волокна коллагена в гипертрофическом рубце образуют толстые пучки. Между волокнами обнаруживается высокое количество веретеновидных фибробластов

2 стадия, поздний незрелый рубец. Между ПОД30 и ПОД60 рубцы претерпели значительные изменения. Толщина рубца увеличилась, а количество фибробластов и очагов инфильтрации иммунными клетками снизилось. Общее содержание белка начало расти, а количество коллагена вернулось на уровень intactной кожи. Сформировался глубокий слой из параллельно уложенных толстых пучков коллагеновых волокон. Постепенное формирование слоистой структуры рубца было видно с помощью поляризационной микроскопии. Экспрессия коллагена типа I была относительно увеличена по всему рубцу. Отношение Гип / Гил было ниже, чем в intactной коже. Доля незрелого коллагена (по данным ДСК) все еще была намного выше, чем в нормальной коже.

3 стадия, ранний зрелый рубец. В интервале времени ПОД60-90 толщина рубцов перестала нарастать, количество клеточных элементов снизилось, а воспалительные изменения

были представлены единичными очагами инфильтрации лимфоцитами и макрофагами. Два слоя рубцовой ткани стали видны на препаратах, окрашенных ГЭ, в то время как поляризационная микроскопия показала почти однородное яркое свечение в образцах, окрашенных ПСК. Толстые пучки коллагена, ориентированные параллельно эпителию, начали преобладать в объеме рубца (Рисунок 1). Произошедшее заметное изменение ориентации пучков коллагена на более параллельное расположение характерно для микроскопической структуры ГР [Verhaegen et al., 2009]. Общее содержание белка увеличивалось, а экспрессия ГАГ и коллагена типа I продолжала снижаться. Отношение Гип / Гил и эндотермы ДСК приблизились к значениям интактной кожи. Изменения отношения Гип / Гил, выявленные в течение 90 дней после ранения, можно объяснить как изменением отношения типов коллагена [Blumenkrantz et al., 1978], так и изменением активности пролил- и лизилгидроксилаз и лизилоксидазы [Nayakawa et al., 1976].

4 стадия, поздний зрелый рубец. С ПОД90 толщина рубца стала стабильной, клеточность почти не изменилась, как и индекс воспаления. В то же время фибротический индекс увеличился: поверхностный и глубокий слои рубцовой ткани не различались гистологически, а подавляющее количество пучков коллагена были ориентированы параллельно поверхности эпителия. Экспрессия коллагена типа I немного снизилась по сравнению с ранними стадиями образования рубца. Кроме того, значительно снизилось содержание коллагена, но отношение Гип / Гил не сильно изменилось. Количество ГАГ и фракция незрелого коллагена (определенная с помощью ДСК) не изменились. Это соответствует литературным данным об увеличении лизилоксидазы в 3-месячных послеожоговых рубцах у пациентов в 2–2,5 раза по сравнению с нормальной кожей [Nayakawa et al., 1976]. Восстановление нормального отношения Гип / Гил кожи в рубцовых тканях, наблюдаемое на ПОД120, может указывать на перераспределение производства ключевых макромолекул, которые обеспечивают синтез коллагеновых волокон.

Ткани **кожных карманов** вокруг имплантатов ПЛА@ПФ и ПЛА⁰, примененных отдельно или в сочетании с однократной местной инъекцией эквивалентной дозы ПФ, были сравнительно изучены **гистопатологическими методами, ДСК и морфометрическим анализом**. Как мы наблюдали на ПОД30, РИТ во всех исследуемых группах привела к образованию периимплантного комплекса (ПИК), состоящего из периимплантной капсулы, колокализованной с имплантатом ткани (КЛИТ) и плотно контактирующей резидентной дермы. КЛИТ во всех группах содержал ГМКИТ, окружавшие частицы имплантата; фибробласты, кровеносные капилляры и воспалительный инфильтрат с макрофагами и лимфоцитами (Рисунок 2).

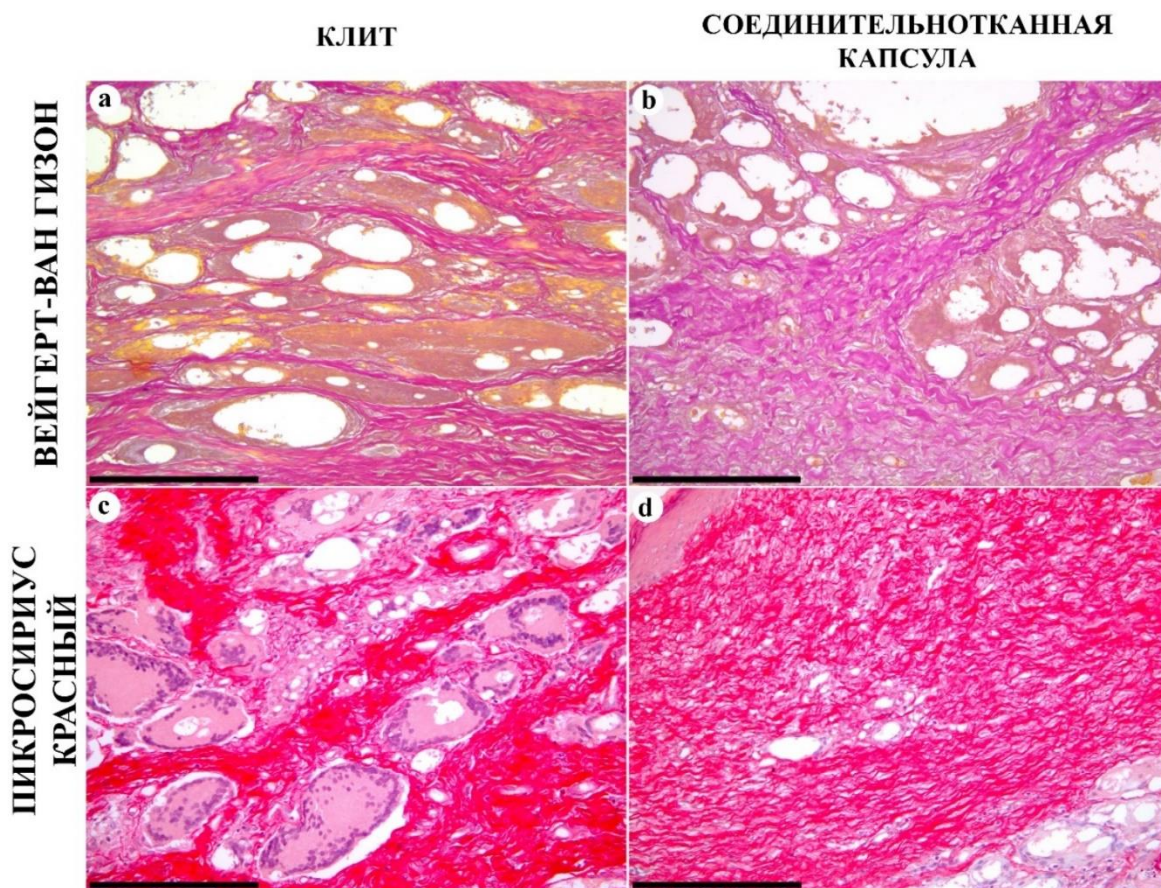


Рисунок 2 – Микрофотографии колокализованной с имплантатом ткани (КЛИТ) и соединительнотканной капсулы на ПОД60, увеличение $\times 200$, масштабный отрезок – 200 мкм. ГМКИТ окрашиваются пикринофильно с помощью ВГ (а), в то время как окружающие их волокна коллагена окрашиваются в ярко-розовый цвет (b). При окраске ПСК внутри ГМКИТ четко визуализируется подковообразная ориентация ядер (с), в то время как окружающая их соединительнотканная капсула становится ярко-красной (d)

Периимплантные капсулы были образованы фиброзной соединительной тканью, в которой определялись фибробласты, миофибробласты и кровеносные сосуды. Внеклеточный матрикс капсул состоял из пучков коллагеновых волокон, чьи расположение, плотность и архитектура различались между исследуемыми группами и менялись со временем. Структура периимплантных капсул в группе ПЛА⁰ была подобна капсулам, которые наблюдались ранее вокруг долгосрочных рассасывающихся биоматериалов, включая ПЛА и полилактико-гликолевые шовные материалы, текстурированные силиконовые грудные имплантаты [de Bakker et al., 2018] и даже электроды кохлеарных имплантатов [Seyyedi et al., 2014].

Наши результаты показали, что доставляемый медленно биоразлагаемым имплантатом ПФ может значительно изменить РИТ и облегчить или предотвратить ПИФ. Прежде всего мы обнаружили, что имплантаты ПЛА@ПФ более склонны к биодеградации, чем ПЛА⁰, как следует из результатов измерения относительной площади имплантата на гистологических срезах. Инъекционная доставка ПФ действительно стимулировала биодеградацию имплантата, но не в

такой степени, как в группе ПЛА@ПФ. Представляется разумным объяснить наблюдаемое ускорение деградации имплантата совместным действием ПФ и модификацией свойств материала имплантата после нагрузки ПФ в состав ПЛА носителя.

Толщина ПИК была одинаковой в исследуемых группах на ПОД30, но различалась на ПОД60. С помощью морфометрического анализа мы определили значительное уменьшение толщины в ПЛА@ПФ в сравнении с группами ПЛА⁰ и ПЛА⁰+инПФ. Важно отметить, что введенный инъекцией ПФ не вызывал такого эффекта. Точное измерение толщины капсулы вокруг имплантата, которое обычно используется для оценки выраженности ПИФ, было невозможно в настоящей работе из-за очень тесно взаимосвязанной пространственной структуры ПИК и резидентной дермы. В действительности толщина ПИК отражала как интенсивность ПИФ, так и степень биодegradации имплантата. Поскольку имплантаты деградировали быстрее в группе ПЛА@ПФ, объем остаточного материала имплантата, который вносил вклад в толщину ПИК, был ниже.

Результаты исследования выявили очень интересные различия в механизмах РИТ и ПИФ между экспериментальными группами. Было обнаружено, что толщина ПИК зависела от количества не относящихся к ГМКИТ клеток (в основном отражая интенсивность фиброплазии и воспаления в КЛИТ), которое в свою очередь зависело от экспрессии iNOS и Arg1. Общая экспрессия α -SMA и количество α -SMA положительных кровеносных сосудов в ПИК стимулировались iNOS и Arg1. Это означает, что КЛИТ и воспалительная реакция в этой ткани могут стать перспективными мишенями для таргетного фармакологического контроля ПИФ, например, терапии экзогенным оксидом азота [Shekhter et al., 2020]. Выявили более слабую связь между экспрессией Arg1 и общим уровнем α -SMA, что указывает на взаимосвязанный характер изменений этих показателей. Экспрессия α -SMA была снижена в тканях вокруг имплантатов в группах с применением ПФ по сравнению с группой ПЛА⁰ на ПОД30. Это показывает, что ПФ влияет на миофибробластную трансдифференцировку в основном на начальной стадии РИТ, что соответствует профилю высвобождения лекарства, наблюдаемому *in vitro*. Однако лечение ПФ также оказало влияние на динамику экспрессии iNOS и Arg1. Экспрессия iNOS стимулировалась инъекциями ПФ на ПОД60, что, возможно, соответствовало измененному характеру биодegradации имплантата и острого воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного диссертационного исследования

Возможность антифибротической модификации синтетического имплантата значительно расширяет инструментарий специалистов в областях тканевой инженерии и регенеративной

медицины. Фундаментальной задачей диссертационной работы стало определение клеток мишеней для фармакологического контроля тканевой реакции на инородное тело. Для оценки фибротической трансформации перимплантной ткани была выбрана и модифицирована известная модель гипертрофических рубцов на ушах кроликов. Для получения подробной информации о фиброзе дермы был проведен эксперимент с моделированием гипертрофических рубцов на четырех временных точках с комплексной морфологической и физико-химической оценкой.

При исследовании динамических особенностей развития гипертрофических рубцов было показано, что для их созревания необходимо не менее трех месяцев. Гистологическое исследование и морфометрический анализ позволили выделить четыре стадии созревания гипертрофического рубца: ранний незрелый рубец, поздний незрелый рубец, ранний зрелый рубец и поздний зрелый рубец. Супрамолекулярную организацию коллагена созревающих рубцов исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии, что позволило установить срок стабилизации созревания коллагеновых волокон, 3–4 месяца после формирования дефекта. Описанные объективные критерии стадий созревания гипертрофических рубцов будут способствовать улучшению дизайна и трансляции результатов экспериментальных исследований по предотвращению и лечению рубцов кожи человека.

С помощью оригинальной модели имплантации мы оценили динамику развития перимплантного фиброза методами морфологического, иммуногистохимического, термического и генетического анализов. Применение скаффолда из гранул полилактида позволило контролируемо индуцировать развитие перимплантного фиброза и обеспечило воспроизводимость результатов. Модель позволила в относительно короткий срок (60 суток) вызвать избыточный фиброз и получить зрелую перимплантную соединительнотканную капсулу, содержащую основные тканевые компоненты капсул вокруг используемых в клинической практике протезов (имплантируемые системы доставки лекарств, силиконовые и металлические протезы). Результаты исследований на этой модели обладают научной ценностью для специалистов, исследующих биологические свойства имплантируемых материалов.

Для создания скаффолда с антифибротическими свойствами в его состав был добавлен пирфенидон. Продолжительную локальную доставку пирфенидона реализовали путём нагрузки активного вещества в состав полилактидных гранул с помощью сверхкритического диоксида углерода. Распределение пирфенидона в составе скаффолда было равномерным, что было подтверждено методом электронного парамагнитного резонанса. Высвобождение пирфенидона *in vitro* при спектрофотометрическом определении было медленным и достигало 100% только через >80 часов.

Морфологическое исследование тканей участков имплантатов подтвердило, что локальная доставка пирфенидона в составе скаффолда предотвратила развитие толстой соединительнотканной капсулы и уменьшила общую толщину периимплантного комплекса на 63,2% на 60 сутки эксперимента. Методами стандартной оптической и поляризационной микроскопией подтвердили, что антифибротические скаффолды были окружены гигантскими многоядерными клетками инородных тел и интактной дермой, но не окружались и не прорастали соединительной тканью *de novo*. Образующая незрелая соединительнотканная капсула, состоящая из рыхлых пучков коллагеновых волокон, подвергалась инволюции к 60 суткам эксперимента. Этот результат подтверждают наши данные из модельного эксперимента, в котором было определено преобладание коллагена с малым количеством поперечных сшивок в первые два месяца эксперимента.

Признаки миофибробластной трансдифференцировки фибробластов наблюдали значительно реже в тканях вокруг антифибротических скаффолдов с пирфенидоном. Эти результаты коррелировали с толщиной периимплантного комплекса, что объясняется ролью миофибробластов в продукции коллагена в рубцах и фибротически измененных тканях. Гигантские многоядерные клетки инородных тел в периимплантных тканях изменили иммунофенотип, снизив экспрессию маркера M2 макрофагов, аргиназы-1. Переход иммунофенотипа клеток инородных тел от M2 к M1 коррелировал с уменьшением периимплантного фиброза и разрастания соединительной ткани вокруг скаффолда и усилением биологической резорбции материала. Таким образом, пирфенидон стимулировал реполяризацию гигантских многоядерных клеток инородных тел, что привело к изменению их функциональной активности.

Механизмы развития гипертрофических рубцов и фибротической трансформации периимплантной ткани имеют общие признаки. В их основе находится хроническое воспаление, развивающееся в ответ на некомпенсируемую (рубцы) или персистирующую (имплантаты) альтерацию мягких тканей. Ключевыми эффекторными клетками, ответственными за неконтролируемый синтез коллагена типа I, являются фибротически активированные фибробласты – миофибробласты. При их значительном количестве этих клеток ткань капсулы увеличивается в объеме, и может развиться ее контракция, ведущая к сжатию имплантата. Однако, ведущую регуляторную роль в фиброзе осуществляют макрофаги и гигантские многоядерные клетки инородных тел. Они определяют медиаторный профиль ткани, включающий в себя интерлейкины и TRФбета-1, которые запускают и поддерживают периимплантный фиброз. Эти клетки представляются наиболее многообещающими клетками-

мишенями для антифибротической терапии, поскольку находятся в прямом контакте с материалом имплантата.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены динамические особенности развития гипертрофических рубцов на ушах кроликов. К ним относятся постепенное увеличение объема рубца и образование параллельно ориентированных толстых пучков коллагеновых волокон, а также обратимое увеличение клеточной плотности в ткани рубца (в том числе, лимфоцитов и нейтрофилов). На основании гистологического исследования и морфометрии были выделены четыре стадии созревания гипертрофического рубца: ранний незрелый рубец, поздний незрелый рубец, ранний зрелый рубец и поздний зрелый рубец.

2. Установлены особенности супрамолекулярной организации коллагена, специфичные для стадий созревания гипертрофического рубца. Срок стабилизации созревания коллагеновых волокон составляет 90–120 суток после операции. Изменения содержания ГАГ и аминокислотного состава (в том числе, специфичных для коллагена гидроксипролина и гидроксизина) имеют временный характер и возвращаются к нормальным значениям через 90 суток.

3. Оригинальная модель оценки динамики развития периимплантного фиброза позволяет в относительно короткий срок (60 суток) воспроизводимо получать толстую соединительнотканную капсулу (избыточный периимплантный фиброз), состоящую из плотно расположенных пучков коллагеновых волокон, миофибробластов, макрофагов и кровеносных сосудов (в основном, артерий малого калибра).

4. Пирфенидон распределялся равномерно в составе скаффолдов из частиц полилактида (средний размер $40,0 \pm 29,9$ мкм), что обеспечило его пролонгированное высвобождение (полное высвобождение заняло более 80 часов) *in vitro*.

5. Относительная площадь антифибротических скаффолдов ($14,5 \pm 3,8\%$) через 60 суток после имплантации значительно меньше, чем площадь скаффолдов без пирфенидона ($64,4 \pm 33,2\%$). Толщина периимплантатного комплекса в участках имплантаций антифибротических скаффолдов на ПОД60 (532 ± 98 мкм) также значительно меньше, чем в группе контроля (1444 ± 140 мкм). Это различие обусловлено как ускорением резорбции ПЛА материала, так и предотвращением образования периимплантной соединительнотканной капсулы. На основании гистологического исследования, включая микроскопию в поляризованном свете, было установлено, что колокализованная с имплантатом ткань в экспериментальной группе окружена резидентной дермой с незначительными признаками фиброзирования.

6. Антифибротические скаффолды с пирфенидоном снижают экспрессию α -SMA в фибробластах периимплантных тканей, что указывает на подавление процесса миофибробластной трансдифференцировки фибробластов. Антифибротические скаффолды с пирфенидоном изменяют фенотип гигантских многоядерных клеток инородных тел в периимплантных тканях, снижая экспрессию маркера M2 макрофагов – аргиназы-1. Переход иммунофенотипа клеток инородных тел от M2 к M1 коррелирует с уменьшением периимплантного фиброза, разрастанием соединительной ткани вокруг скаффолда и усилением биологической резорбции материала.

7. Локальная доставка пирфенидона замедляет синтез коллагена клетками периимплантных тканей. Доля незрелого коллагена с малым количеством поперечных сшивок в участках имплантаций антифибротических скаффолдов на 30е сутки ($40\pm 6\%$) значительно ниже, чем в группе без пирфенидона ($60\pm 10\%$). Средние уровни мРНК генов коллагена типов I и III в периимплантных тканях в разных группах исследования значительно не различались между собой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Моделирование гипертрофических рубцов на ушах кроликов является оптимальным подходом к исследованию эффективности новых методов лечения рубцов. Для оценки профилактического эффекта антифибротической терапии воздействие на созревание рубцовой ткани должно оказываться в первые 3 месяца эксперимента. Терапевтические воздействия, направленные на ускорение инволюции зрелого рубца, должны осуществляться не ранее, чем через 3 месяца после моделирования рубца.

2. Локальная доставка 500 мкг пирфенидона в скаффолде тканеинженерной конструкции или имплантируемой системы доставки лекарств предотвращает фибротическую трансформацию периимплантной ткани и образование соединительнотканной капсулы. Пролонгированное высвобождение антифибротического агента можно использовать для повышения биологической совместимости медленно деградирующих или нерезорбируемых имплантатов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Solovieva, A.B. Is it possible to combine photodynamic therapy and application of dinitrosyl iron complexes in the wound treatment? / A.B. Solovieva, A.F. Vanin, A.B. Shekhter, N.N. Glagolev, N.A. Aksenova, V.D. Mikoyan, S.L. Kotova, T.G. Rudenko, **A.L. Fayzullin**, P.S. Timashev // **Nitric Oxide**. – 2019. – Vol. 83. – P. 24-32. DOI: 10.1016/j.niox.2018.12.004 [Scopus]

2. **Fayzullin, A.** Chronic inflammation progression in tissue reaction to biomaterials: in vitro and in vivo immunomorphological study / **A. Fayzullin**, S. Churbanov, A. Kapitannikova, M. Tokarev, D. Mudryak, Y. Khristidis, A. Guller, A. Kurkov, P. Timashev, A. Shekhter // 14th World Congress of Inflammation 2018. Sydney, 15-19 September 2019. – P.76
3. **Файзуллин, А.Л.** Локальная доставка пирфенидона для контроля периимплантного фиброза: эксперимент in vivo/ **Файзуллин А.Л.**, Чурбанов С.Н., Капитанникова А.Ю., Токарев М.В., Мудряк Д.Л., Христидис Я.И., Гуллер А.Е., Курков А.В., Бутенко А.В., Тимашев П.С., Шехтер А.Б. // Гены и клетки №4, Приложение «Сборник материалов IV Национального конгресса по регенеративной медицине». Москва, 20–23 Ноября 2019 г. – С.240
4. Shekhter, A.B. Physicochemical parameters of NO-containing gas flow affect wound healing therapy. An experimental study / A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, V.I. Telpukhov, P.V. Panyushkin, T.G. Rudenko, **A.L. Fayzullin**, N.A. Sharapov, A.F. Vanin // **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. – 2019. – Vol. 128. – P. 193-201. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.11.034 [**Scopus**]
5. Svistushkin, M.V. Collagen fibrillar structures in vocal fold scarring and repair using stem cell therapy: a detailed histological, immunohistochemical and atomic force microscopy study / M.V. Svistushkin, S.L. Kotova, A.B. Shekhter, V.M. Svistushkin, A.A. Akovantseva, A.A. Frolova, **A.L. Fayzullin**, S.V. Starostina, E.A. Bezrukov, R.B. Sukhanov // **Journal of microscopy**. – 2019. – Vol. 274. – P. 55-68. DOI: 10.1111/jmi.12784 [**Scopus**]
6. Shekhter, A.B. Medical applications of collagen and collagen-based materials / A.B. Shekhter, **A.L. Fayzullin**, M.N. Vukolova, T.G. Rudenko, V.D. Osipycheva, P.F. Litvitsky // **Current medicinal chemistry**. – 2019. – Vol. 26. – P. 506-516. DOI: 10.2174/0929867325666171205170339 [**Scopus**]
7. Shekhter, A.B. Dose-dependent effect of plasma-chemical NO-containing gas flow on wound healing. An experimental study / A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, A.V. Butenko, **A.L. Fayzullin**, T.G. Rudenko, N.A. Sharapov, N.B. Serejnikova, V.N. Vasilets // **Clinical Plasma Medicine**. – 2020. – Vol. 19. – P. 100101. DOI: 10.1016/j.cpme.2020.100101 [**Scopus**]
8. Solovieva, A. Broad-spectrum antibacterial and pro-regenerative effects of photoactivated Photodithazine-Pluronic F127-Chitosan polymer system: In vivo study / A. Solovieva, T. Rudenko, A. Shekhter, N. Glagolev, A. Spokoinyi, **A. Fayzullin**, N. Aksenova, A. Shpichka, V. Kardumyan, P. Timashev // **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. – 2020. – Vol. 210. – P. 111954. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111954 [**Scopus**]
9. **Fayzullin, A.** Pirfenidone inhibited peri-implant fibrosis through foreign-body giant cell repolarization: in vivo immunomorphological study / **A. Fayzullin**, S. Churbanov, A. Guller, M. Tokarev, D. Mudryak, A. Butenko, P. Timashev, A. Shekhter // Pan pacific connective tissue societies symposium 2020. Melbourne, 24-26 November 2020. – P.83

10. **Fayzullin, A.** Local Delivery of Pirfenidone by PLA Implants Modifies Foreign Body Reaction and Prevents Fibrosis / **A. Fayzullin, S. Churbanov, N. Ignatieva, O. Zakharkina, M. Tokarev, D. Mudryak, Y. Khristidis, M. Balyasin, A. Kurkov, E.N. Golubeva, N.A. Aksenova, T. Dyuzheva, P. Timashev, A. Guller, A. Shekhter** // **Biomedicines**. – 2021. – Vol. 9. – P. 853. DOI: 10.3390/biomedicines9080853 [Scopus]

11. **Fayzullin, A.** Modeling of Old Scars: Histopathological, Biochemical and Thermal Analysis of the Scar Tissue Maturation / **A. Fayzullin, N. Ignatieva, O. Zakharkina, M. Tokarev, D. Mudryak, Y. Khristidis, M. Balyasin, A. Kurkov, S. Churbanov, T. Dyuzheva, P. Timashev, A. Guller, A. Shekhter** // **Biology (Basel)**. – 2021. – Vol. 10. – P. 136. DOI: 10.3390/biology10020136 [Scopus]

12. **Fayzullin, A.** Implantable Drug Delivery Systems and Foreign Body Reaction: Traversing the Current Clinical Landscape / **A. Fayzullin, A. Bakulina, K. Mikaelyan, A. Shekhter, A. Guller** // **Bioengineering**. – 2021. – Vol. 8. – P. 205. DOI: 10.3390/bioengineering8120205 [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГ – окраска по Ван Гизону	ПЛА ⁰ – экспериментальная группа скаффолда из полилактида без пирфенидона
ГАГ – гликозаминогликаны	ПЛА ⁰ +инПФ – экспериментальная группа скаффолда из полилактида с подкожной инъекцией пирфенидоном
Гип – гидроксипролин	ПЛА@ПФ – экспериментальная группа скаффолда из полилактида с пирфенидоном
Гил – гидроксизин	ПОД – послеоперационный день
ГМКИТ – гигантская многоядерная клетка инородных тел	ПСК – пикросириус красный
ГР – гипертрофический рубец	ПФ – пирфенидон
ГЭ – гематоксилин и эозин	РИТ – реакция на инородное тело
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия	ТРФбета-1 – трансформирующий ростовой фактор бета-1
КЛИТ – колокализованная с имплантатом ткань	Arg1 – аргиназа-1
ИСДЛ – имплантируемая система доставки лекарств	iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
ПИК – периимплантатный комплекс	α -SMA – α -гладкомышечный актин
ПИФ – периимплантатный фиброз	
ПЛА – полилактид	