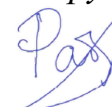


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Файзуллин Алексей Леонидович

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

14.03.02 – Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Шехтер Анатолий Борухович

Москва - 2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Тканевая реакция на имплантируемые системы доставки лекарств .....	15
1.2 Области применения имплантируемых систем доставки лекарств .....	18
1.2.1 Подкожные имплантируемые системы доставки лекарств .....	18
1.2.2 Имплантируемые помпы .....	21
1.2.3 Глазные имплантируемые системы доставки лекарств .....	24
1.2.4 Нейрональные имплантируемые системы доставки лекарств .....	29
1.2.5 Сердечно-сосудистые имплантируемые системы доставки лекарств .....	31
1.3 Моделирование фиброза в животных моделях .....	32
1.4 Терапевтические мишени тканевой реакции на биоматериалы .....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	39
2.1 Моделирование гипертрофических рубцов.....	39
2.1.1 Хирургическое моделирование гипертрофических рубцов .....	39
2.1.2 Гистологический анализ.....	41
2.1.3 Иммуногистохимический анализ .....	41
2.1.4 Морфометрический анализ .....	41
2.1.5 Химический анализ .....	42
2.1.6 Термический анализ.....	43
2.1.7 Статистический анализ.....	44
2.2 Применение антифибротического скаффолда для контроля периимплантного фиброза.....	44
2.2.1 Создание скаффолдов .....	44
2.2.2 Характеристика скаффолдов.....	45

2.2.3 Анализ нагрузки и высвобождения пирфенидона .....	46
2.2.4 Хирургические имплантации скаффолдов .....	47
2.2.5 Гистологический анализ .....	48
2.2.6 Иммуногистохимический анализ .....	49
2.2.7 Морфометрический анализ .....	50
2.2.8 Генетический анализ .....	50
2.2.9 Термический анализ .....	52
2.2.10 Статистический анализ .....	53
ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ РУБЦОВ .....	54
3.1 Макроскопическое описание .....	54
3.2 Гистологический, иммуногистохимический и морфометрический анализы ...	55
3.3 Химический анализ .....	61
3.4 Термический анализ .....	63
ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИФИБРОТИЧЕСКИХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПЕРИИМПЛАНТНОГО ФИБРОЗА .....	73
4.1 Характеристика скаффолдов .....	73
4.2 Макроскопическое описание .....	77
4.3 Гистологический, иммуногистохимический и морфометрический анализы ...	78
4.4 Генетический анализ .....	94
4.5 Термический анализ .....	95
4.6 Статистический анализ .....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	108
ВЫВОДЫ .....	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	116

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

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 [1]. 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. Эти изменения ассоциированы с болевым синдромом и косметическими дефектами [2]. Типичным примером данной проблемы является контрактура соединительнотканной капсулы вокруг силиконовых протезов молочных желез. Она является ведущей причиной проведения повторной операции (40,6% случаев, связанных с осложнениями после косметических операций), а встречаемость может превосходить 50% среди пациентов с давностью имплантации 5 и более лет [3, 4]. Другими примерами такого патологического склерозирования являются стриктура мочеиспускательного канала, стеноз трахеи и сдавление сосудистых протезов [5].

Актуальным направлением регенеративной медицины – области медицины, направленной на восстановление поврежденных или утраченных биологических тканей и органов, - является применение тканеинженерных конструкций [6]. 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 [6]. Важно, что именно скаффолд прежде всего распознается иммунными клетками реципиента как инородное тело, вследствие чего развивается тканевой ответ на имплантат [7]. Вокруг большинства имплантируемых скаффолдов формируется соединительнотканная капсула, ограничивающая интеграцию искусственной ткани в организм реципиента [8].

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 [9]. В частности, не изучена эффективность применения в клинической практике антагониста рецепторов ТРФбета-1, препарата пирфенидон [10]. 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.

Комплексность микросреды ткани периимплантной зоны не позволяет обеспечить ее биологически точное моделирование в традиционных однослойных клеточных культурах [1]. При этом следует учитывать сложность получения соединительнотканной капсулы *in vivo*, которая должна отражать избыточное, выраженное фиброзирование периимплантной ткани. Это связано с отсутствием возможности получить в эксперименте на грызунах патологические (гипертрофические и келоидные) рубцы кожи, часто возникающие у пациентов [11]. С другой стороны, разнообразие применяемых имплантируемых биоматериалов и устройств осложняет сравнительную оценку их эффективности в животных моделях из-за различий в топографии и механических свойствах. Наконец, преимущественное проведение гистологических исследований только

после клинических осложнений или после поэтапных или реконструктивных операций не позволяет исследовать механизмы биологической интеграции имплантатов на архивных материалах.

Несмотря на все перечисленные трудности, возможность выявления локальной тканевой реакции на имплантат необходима для внедрения в медицинскую практику имплантируемых систем доставки лекарств (ИСДЛ). В настоящее время среди коммерчески доступных ИСДЛ выделяют подкожные имплантаты, помпы, внутриглазные инсерты, а также внутримозговые имплантаты и сосудистые стенты [12]. За последние годы американский регулятор пищевых продуктов и медикаментов Food and Drug Administration (FDA) дал разрешение выйти на рынок долгосрочному контрацептиву (Nexplanon), имплантату для страдающих от опиоидной зависимости людей (Probuphine), полностью биodeградирующему стенту для лечения коронарного атеросклероза (Absorb GT1) и серии имплантатов, погружаемых через иглу в пространство заднего сегмента глаза (Puvien, Yutiq). Одним из наиболее ярких ранних примеров клинического использования полимерного ИСДЛ являются пластины Gliadel с кармустином, применяемые при лечении глиобластомы. Образование соединительнотканной капсулы вокруг этих имплантатов обычно игнорируется или рассматривается как благоприятный клинический исход. Тем не менее, фибротическая трансформация периимплантной ткани оказывает влияние на фармакокинетику лекарственного препарата и ассоциирована с местными клиническими осложнениями [13-16].

### **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 [17]. Альтернативный подход заключается в химической модификации материалов, например, увеличении поперечных сшивок между молекулами коллагена [18]. Также представляют интерес коллагеновые биологические материалы из моллюсков, которые не обладают вышеперечисленными недостатками, но они пока слабо изучены [19].

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 [20]. Экспериментально было продемонстрировано, что увеличение неровности поверхности имплантата приводит к развитию более выраженной фибротической трансформации периимплантной ткани [21]. В ряде последних исследований с применением электроспиннинга были получены волокнистые скаффолды с заданной ориентацией волокон, обеспечивающие биомиметичность, подражание естественной структуре внеклеточного матрикса вокруг имплантата [22]. Тем не менее, лекарственные препараты для контроля ПИФ ранее не применялись.

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 [23, 24]. Модификация искусственной уретры малыми интерферирующими рибонуклеиновыми кислотами (РНК) ТРФбета-1 позволила предотвратить рестеноз [25]. В другом исследовании, где уретропластика проводилась искусственной уретрой с ингибитором молекулярного пути Wnt ICG-001, локальная доставка препарата значительно подавила синтез коллагена фибробластами [26].

Остается неисследованным вопрос межклеточного сигналинга и клеточных трансдифференцировок, ассоциированных с тканевой реакцией на биоматериалы.

Известно, что контроль этой реакции осуществляется макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГМКИТ) [27]. Было определено, что секреция медиаторных молекул макрофагами различалась при культивировании на различных коммерчески доступных имплантатах *in vitro* [28]. Тем не менее до представленных в настоящей работе результатов сведения об иммунофенотипах периимплантных ГМКИТ были ограничены положительной экспрессией CD68 [29].

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 наши глубокие проработки морфологических и физико-химических особенностей гипертрофических рубцов, 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 [30]. 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,  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA), и поляризации макрофагов, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и аргиназы-1 (Arg1).
7. Определить термическую стабильность и уровни экспрессии генов коллагена в периимплантных тканях.

### **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 расширили наши знания о роли гигантских многоядерных клеток инородных тел и миофибробластов в формировании избыточного фиброза периимплантной соединительнотканной капсулы и в механизмах антифибротической терапии.

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

### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты данной работы предлагают новое видение межклеточного взаимодействия гигантских многоядерных клеток инородных тел и фибробластов в периимплантных 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**

В работу по исследованию созревания гипертрофических рубцов вошли данные, полученные с 24 участков раневых дефектов 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 содержания белков, гликозаминогликанов и аминокислотного состава. 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 однократную подкожную инъекцию пирфенидона в дозировке 500 мкг. Толщину ткани вокруг имплантата в гистологических препаратах определяли морфометрически. Термическую стабильность коллагена в периимплатной 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,  $\alpha$ -SMA. Экспрессию генов цепей коллагена и ТРФбета-1 исследовали с помощью полимеразной цепной реакции. Межгрупповые различия проанализировали методами статистики.

### **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).

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).

### **Основные 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  $\alpha$ -SMA).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 Патологическая анатомия; формуле специальности – специальность, на современном этапе занимающаяся решением проблем теории (общая и частная патология человека и животных) и практики (диагноз, эффективность лечения, прогноз заболевания, ятрогении и др.) медицины. Объектом ее внимания являются клетки, ткани и органы, исследуемые прижизненно (биопсийный и операционный материал) и постмортально (аутопсийный материал). Методические приемы, используемые в современных патологоанатомических исследованиях: темнопольная, фазово-контрастная, поляризационная, люминесцентная и электронная микроскопия, гистохимия, гистоэнзимохимия, иммуноморфология, морфометрия, математический анализ и др. Значимость решения научных и технических проблем данной специальности для народного хозяйства состоит в совершенствовании диагностических

мероприятий, создании теоретической и практической базы для разработки новых средств профилактики и терапии болезней.

### **Степень достоверности**

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 диссертационной работы**

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 Пантихоокеанского Общества Соединительной Ткани (2020).

### **Внедрение результатов исследования 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).

### **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 диссертационной работы**

По теме диссертации 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 статьи;
- обзорных статей – 2;
- публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций – 3.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 145 страницах машинописи, содержит 13 таблиц и 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, глав, заключения, выводов и списка литературы, из которых 19 работ отечественных и 241 зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Тканевая реакция на имплантируемые системы доставки лекарств

Эффективная доставка лекарств – один из важнейших вызовов, стоящих перед современной медициной. На пути к разработке идеальной лекарственной формы стоит целый спектр проблем, от побочных эффектов системного введения до несоблюдения пациентом режима лечения [31]. Терапевтическое действие обычных пероральных и внутривенных лекарственных средств ограничено их системным действием на ткани, не являющиеся мишенями, и метаболической активностью печени и почек. Системные побочные эффекты многих потенциальных лекарств не позволили им пройти первую фазу клинических испытаний [31]. Более того, сложный распорядок дня пациентов, которым необходимо принимать несколько таблеток или делать инъекции, затрудняет прием лекарств, что приводит к нестабильности терапевтических концентраций. Все эти ограничения создают спрос на новые формы доставки лекарств, которые преодолевают как биологические, так и психосоциальные барьеры на пути к персонализированной медицине [12].

ИСДЛ – это медицинское устройство, которое помещается внутрь тканей пациента для доставки терапевтического агента в организм и повышения его эффективности через контроль скорости, времени и места высвобождения лекарства в организме [32]. ИСДЛ представляет собой «умный» регулятор между биологической мишенью и депо лекарственного средства. Первым применением ИСДЛ была подкожная имплантация полимерного конструкта с депо гормонального препарата крупному рогатому скоту в 1930-х годах. Вскоре после этого о первом клиническом применении ИСДЛ сообщил Bishop, который назначал ИСДЛ женщинам для гормональной терапии [33]. Недавний всплеск развития ИСДЛ начался в 1990 году после того, как содержащий левоноргестрел противозачаточный имплантат Norplant получил одобрение FDA [34]. В настоящее время коммерчески доступные ИСДЛ применяются при трех очень разных группах

медицинских состояний: хронические заболевания, контроль беременности и лечение боли.

Преимущества ИСДЛ зависят от имплантата, но обычно включают некоторые из следующих аргументов: 1) пролонгированная доставка лекарства, которая делает терапию независимой от поведения пациента; 2) высокая концентрация препарата в области-мишени, что позволяет снизить количество препарата в системном кровотоке; 3) минимизация побочных эффектов за счет более низких системных концентраций действующего вещества и отсутствия риска неправильного введения препарата [35]. Более того, существует множество возможностей для совершенствования функционала технологии с помощью встроенных электронных сенсоров, например для противоэпилептических имплантаты или инсулиновой помпы с анализатором уровня глюкозы [12].

Однако ИСДЛ — это имплант, который может вызвать реакцию со стороны иммунной системы пациента. Механизм этого осложнения – реакция на инородное тело (РИТ), направленная на устранение или, в случае неудачи, на изоляцию нераспознанного материала [36]. Эта реакция будет зависеть от иммунной системы пациента, выбора места имплантации, воздействия хирургической операции как на ИСДЛ, так и на ткани, состав материала ИСДЛ и фармакологические эффекты доставляемых лекарств [7].

РИТ — это длительно текущий воспалительный процесс, в котором можно выделить на несколько этапов. Сразу после хирургической фиксации имплантата в ткани пациента белки крови абсорбируются на поверхность биоматериала. Этот процесс называется эффектом Вромана [37]. В основном вся внешняя поверхность ИСДЛ и, в зависимости от способа распределения лекарства внутри конструкта, его внутренние части и даже депо лекарства покрываются протеиновой «короной». Такое покрытие делает имплантат «видимым» для иммунных клеток [38]. Распознавание инородного тела позволяет клеткам врожденного иммунитета начать острую воспалительную реакцию и привлекать иммунные клетки из кровотока.

Медленные темпы РИТ и отсутствие резорбции имплантата вызывают процесс инкапсуляции ИСДЛ через 2-3 недели после операции. Ткань вокруг

имплантата обогащается капиллярами и фибробластами, образующими незрелую грануляционную ткань вокруг ИСДЛ [39]. В то же время макрофаги, находящиеся в непосредственном контакте с имплантатом, начинают образовывать ГМКИТ, или клетки инородных тел [40]. В этих клетках происходят их собственные морфологические и функциональные трансформации, изменяющие первичную программу фагоцитоза на стимулирование ПИФ. Они меняют свой иммунофенотип с преобладающей экспрессии iNOS на Arg1, которая коррелирует с высоким уровнем ТРФбета-1 [41]. Гигантские клетки используют ключевой профибротический медиатор ТРФбета-1 для стимуляции трансдифференцировки фибробластов в миофибробласты, сверхпродуцирующие коллаген и вызывающие контракцию перимплантной капсулы [40].

Формирование перимплантной капсулы снижает функциональную эффективность ИСДЛ, ограничивая основное преимущество данной технологии, – локальную доставку препарата. Фибротическая трансформация ткани вокруг имплантата не только добавляет дополнительный биологический барьер между резервуаром лекарственного средства и тканью-мишенью, но также может повлиять на конструкцию ИСДЛ посредством механического давления и клеточной резорбции [42]. Более того, хроническое воспаление может привести к местным дистрофическим и атрофическим изменениям паренхиматозной ткани в месте имплантации с вероятным участием биологической мишени лекарственного средства. Однако, фибротические осложнения, связанные с имплантатом, обычно возникают поздно и клинически проявляются через 3-5 лет после операции [4]. К этому моменту большинство клинически доступных ИСДЛ нуждаются в замене.

Не существует единой терапевтической стратегии при постимплантационных фибротических осложнениях ИСДЛ. С одной стороны, формирование капсулы вокруг имплантата является ожидаемым и условно «благоприятным» следствием операции. Но, с другой стороны, некоторые ИСДЛ, которые дойдут до IV фазы клинических испытаний в ближайшие годы, будут вызывать фиброз нервных и мягких тканей, что может привести к серьезным последствиям для здоровья пациентов. В частности, можно ожидать осложнения,

связанные с разрабатываемыми внутрочерепными ИСДЛ, кондуитами для направленной регенерации нервов и «умными» скаффолдами для тканевой инженерии [16, 43, 44].

## **1.2 Области применения имплантируемых систем доставки лекарств**

Множество ИСДЛ стали коммерчески доступными с тех пор, как первый современный контрацептивный имплантат, Norplant, был одобрен FDA в 1990 году [34]. Однако даже ограничение объема обзора коммерчески доступными продуктами предоставило несколько возможных подходов к выбору обзереваемых устройств. К ИСДЛ относятся комплексы биоматериалов и лекарств, хирургически помещаемые внутрь тканей пациента для местного и/или пролонгированного прямого терапевтического эффекта лекарства [12]. Такое определение позволило исключить из обзора таблетки, капсулы, вагинальные кольца, внутриматочные системы, кожные пластыри, инсерты для инсулиновой помпы, вакцины и ретард-препараты. Также оказался за рамками обзора Infuse Bone Graft, который является одобренным FDA имплантатом для реконструкции позвоночника. Причиной исключения стало отсутствие системы имплант-лекарство и болюсному высвобождению рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 человека из коллагенового каркаса, более чем на 80% за первые сутки. Важно отметить, что эта область медицины находится на подъеме, и многие потенциально эффективные типы ИСДЛ все еще находятся на доклинической стадии разработки. Сосредоточение внимания на тканевой реакции на ИСДЛ как на инородное тело позволяет выделить пять типов ИСДЛ в зависимости от места имплантации. Однако важно помнить, что трансформация периимплантной ткани происходит как по причине реакции на материал имплантата, так и вследствие эффектов лекарств.

### **1.2.1 Подкожные имплантируемые системы доставки лекарств**

Подкожные имплантаты применяются в разных областях медицины и имеют богатую историю, начиная с гормональной терапии в 1930-х годах [33]. У них есть

общие особенности, такие как системное распространение и длительное высвобождение активного вещества (обычно от 3 до 12 месяцев). Важно помнить, что возможная РИТ для этих имплантатов может проявляться только косметически или местной воспалительной реакцией и не будет напрямую влиять на ткань-мишень.

Norplant, высвобождающий левоноргестрел, стал первой технологически современной ИСДЛ, получившей одобрение FDA в 1990 году. Имплантат состоял из шести силиконовых стержней, имплантированных веером на плечо, над локтевым сгибом. Имплантат обеспечивал пятилетний эффективный контроль беременности, однако был снят с производства после того, как подвергся активной критике из-за осложнений, связанных со сложностью его хирургического удаления. Тем не менее, Jadelle, версия Norplant с двумя стержнями, была одобрена FDA в 1996 году, и позже было показано, что она имеет аналогичные эффекты. Однако этот продукт был снят с производства в Соединенных Штатах Америки (США) и в настоящее время используется в других странах [34]. Обеспокоенность врачебного и научного сообщества по поводу обоих имплантатов была связана с силиконовым составом стержней [45]. Сообщалось о нескольких случаях осложнений в участках имплантации, но опубликованные работы не содержали четкого указания на возможный ПИФ [46, 47].

Implanon – одобренный FDA одностержневой имплантируемый контрацептив с 68 мг этоноргестрела. Он широко используется во всем мире и заслужил репутацию безопасного и эффективного средства контроля беременности. Implanon имплантируется под кожу внутренней стороны плеча и обеспечивает достаточное ежедневное высвобождение этоноргестрела в течение трех-пяти лет [48]. О реакциях на инородное тело сообщалось только в нескольких статьях, осветивших отдельные клинические случаи [49, 50]. К сожалению, исследований биопсии не проводилось, однако поздняя реакция в одном случае и устойчивое к антибиотикам отторжение имплантата, вызвавшее изъязвление поверхности кожи у другого пациента, указывают на роль хронического воспаления. Одним из серьезных осложнений, о котором часто сообщали и врачи,

и пациенты, была миграция имплантата, обычно в краниальном направлении [51]. По этой причине на рынок была выпущена современная модель ИСДЛ с этоногестролом, содержащая рентгеноконтрастный ингредиент сульфат бария, Nexplanon. В исследовании Nexplanon Observational Risk Assessment была собрана информация от врачей об удалении 4373 ИСДЛ и сообщается, что наиболее частой проблемой было разрастание фиброзной ткани вокруг имплантата (29 случаев). Несколько врачей сообщили о пациентах с антибиотикоустойчивыми воспалительными реакциями в месте имплантации Nexplanon, развившимися в поздний послеимплантационный период [52, 53]. Однако, у одной из пациенток развилась реакция после того, как она решила перейти с Implanon на Nexplanon, что поднимает вопрос о возможной реакции на новый химический состав, включая барий. В другом случае гистологическое исследование показало активные макрофагальные и мастоцитарные реакции ткани, окружающей Nexplanon [13].

Недавно имплантируемые гранулы тестостерона, Testopel, наконец, дошли до широкого клинического применения после их одобрения FDA в 1972 году. Эта ИСДЛ назначается пациентам с синдромом дефицита тестостерона и состоит из нескольких гранул, которые имплантируются под кожу живота или ягодиц [54]. Testopel поддерживает терапевтический уровень тестостерона в течение 4-6 месяцев. Было показано, что иногда на месте имплантации остаются рубцы даже после растворения гранул, и это заставляет врачей выбирать новое место для каждой имплантации [55].

Имплантат Viadur, высвобождающий лейпролид, стал первым ИСДЛ для пациентов с раком простаты [56]. Он доставлял лекарство в течение 12 месяцев и был доступен в США с 2000 по 2007 год. Однако размер имплантата был довольно значительным (4 мм x 45 мм), а клинические данные о рыночной фазе очень ограничены. Тем не менее было показано, что система доставки обладает высокой биосовместимостью [57].

Высвобождающие гистрелин имплантаты Vantas и Supprelin LA являются коммерчески доступными ИСДЛ. Vantas используется для доставки гистрелина пациентам с раком простаты в суточных дозах 50 мг в течение 1 года [58]. Supprelin

LA ежедневно высвобождает 65 мг гистрелина детям с центральным преждевременным половым созреванием в течение того же периода [59]. Интересно, что оба ИСДЛ рассматриваются как кандидаты для подавления полового созревания у детей с гендерной дисфорией [60]. Есть только один зарегистрированный случай возможной тканевой реакции на имплантат, высвобождающий гистрелин (Supprelin LA), в котором стерильные абсцессы образовывались два раза после имплантации ИСДЛ под кожу на разных руках [61].

Самым последним дополнением к ИСДЛ, одобренным FDA, является Probuphin, имплантат, высвобождающий бупренорфин, для заместительной терапии пациентов с опиоидной зависимостью. Система имплантата состоит из четырех стержней, имплантированных под кожу плеча, по ориентации напоминая Norplast [14]. Probuphin обеспечивает высвобождение лекарства в течение 6 месяцев, позволяя пациентам вести полноценную социальную жизнь без ежедневных посещений врачей. О реакциях на имплантат не сообщалось. Однако в одном клиническом случае стержни Probuphin были эксплантированы из окружающих фиброзных тканей через 7 лет после введения. Сканирующая электронная микроскопия не выявила изменений в структуре имплантата или прорастания конструктора фиброзной тканью [62].

### 1.2.2 Имплантируемые помпы

Другая группа ИСДЛ — это имплантируемые помпы, которые значительно отличаются от описанных выше имплантатов как по размеру, так и по способу и локализации высвобождения лекарственных средств.

InfusAid была первой имплантируемой системой интратекальной доставки лекарств, которая была одобрена FDA в 1982 году. Она быстро распространила концепцию доставки лекарства к ткани-мишени среди врачей всех областей. Первоначально ИСДЛ была одобрена для гепарина и флоксуридина для лечения рака и метастазов в печени. Но за короткий период времени она получила одобрение для доставки также инсулина, морфина, 5-фторуроцила, метотрексата,

глицерина, блеомицина, цисплатина, амикацина и нетилмицина [63]. Однако применение InfusAid для доставки химиотерапии через печеночную артерию приводило к серьезной гепатобилиарной токсичности у большинства пациентов [64]. Более того, был описан тяжелый фиброз билиарной системы, развившийся как осложнение инфузии флоксуридина в печеночную артерию [65]. Применение InfusAid в качестве искусственной поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом часто сопровождалось тяжелыми осложнениями, включая обтурацию внутрибрюшного катетера [66]. К этим причинам добавились сообщения о имплантат-ассоциированных поражениях спинного мозга, вызванных интратекальными катетерами, что привело к прекращению использования помпы, которая была заменена вторым поколением ИСДЛ [67].

SynchroMed II — это наиболее широко используемый имплантируемый насос для пролонгированной доставки лекарств. Его первоначальная версия, SynchroMed, была одобрена FDA в 1991 году. Он применяется для интратекальной доставки баклофена при тяжелой спастичности и морфина и зиконотида для снятия боли [68, 69]. Кроме того, FDA одобрило внутривенное введение трепростинила пациентам с легочной артериальной гипертензией. Система состоит из двух отдельно установленных компонентов - резервуара объемом 20 или 40 мл и катетера. Объем помпы значительный, так как в ней находится батарея, рассчитанная на работу до 7 лет. Катетеры различаются по длине и форме из-за разных маршрутов имплантации. Основным преимуществом насосной системы является возможность программирования, позволяющая как врачу, так и пациенту возможность использовать инструмент для точной и динамической коррекции дозировки.

Осложнения, связанные с помпой, можно разделить на проблемы, связанные с катетером (миграция, смещение, разрыв, перекручивание, закупорка), с помпой (вращение, сбой, неправильная инфузия) и хирургическим вмешательством (инфекция, утечка спинномозговой жидкости) [70]. Вскоре после того, как SynchroMed стал коммерчески доступным, он стал предметом научных дискуссий об осложнениях, связанных с интратекальным катетером, в частности, об образовании асептических гранул с последующими неврологическими

последствиями [71]. Опрос нейрохирургов, имплантирующих насосы SynchroMed и InfusAid, показал, что 31 (6%) респондент сообщили, что у их пациентов отмечались повреждения вокруг имплантированных катетеров [72]. У 15 (43%) пациентов развился парез или паралич, состояние 10 из них улучшить не получилось. Большинство опубликованных работ содержали гистологические микрофотографии гранулем. Позже эти осложнения были воспроизведены у овец, в модели компрессии спинного мозга, через 43 дня после операции [73]. Наконец, исследование по оценке гранулематозных ответов на интратекальные катетеры на модели собак с несколькими контрольными группами (включая помпу SynchroMed II) показало, что гранулематозные поражения и инфильтрация иммунными клетками спинного мозга коррелировали с дозировками и концентрацией морфина [74]. Катетеры, высвобождающие физиологический раствор, приводили к компенсированному сдавлению спинного мозга без дегенерации его структуры, в то время как катетеры с морфином вызывали инфильтрацию тканей нейтрофилами, макрофагами и плазматическими клетками. Другая патология, рубцовая трансформация кожного кармана, происходит из-за прямого контакта помпы с апоневрозом и подкожно-жировой клетчаткой, а также повторных инъекций [75]. В результате могут произойти два серьезных осложнения - отсоединение катетера или нарушение процесса заправки помпы лекарством, что приводит к передозировке [76, 77].

Компания Codman 3000 представила новую конструктивную модель инфузионного насоса, которая не требовала батареи при работе с газожидкостной двигательной системой, управляемой температурой тела. Это нововведение устранило необходимость замены помпы. Устройство было одобрено FDA для интратекальной доставки морфина и баклофена для обезболивания и противоопухолевых инфузий через печеночную артерию [78]. Несмотря на многообещающие результаты, в 2018 году устройство было снято с производства, что можно объяснить высокой ценой и низким спросом (300 проданных помп за год в США) [35]. Недавно эта технология была приобретена Intera Oncology и

продается как единственное одобренное FDA устройство для инфузии флоксуридина в печеночную артерию.

Система интратекальной доставки лекарств Prometra II сочетает в себе лучшие характеристики осмотического и инфузионного насосов за счет добавления точной системы управления клапаном, питаемой от батареи. Она вышла на рынок как система доставки морфина и недавно была одобрена FDA для лечения спастичности баклофеном при различных состояниях, включая рассеянный склероз [35]. К сожалению, нет литературы, посвященной осложнениям, связанным с устройством, но можно ожидать больше информации в ближайшие годы благодаря инновационному подходу к динамическому управлению дозировкой анальгетиков.

### **1.2.3 Глазные имплантируемые системы доставки лекарств**

Основными причинами необратимой слепоты и нарушения зрения являются дегенеративные заболевания сетчатки, от которых страдают миллионы людей во всем мире. К основным заболеваниям, ведущим к дистрофии сетчатки, относят диабетическую ретинопатию, глаукому и дегенерацию желтого пятна [79]. Самым распространенным способом местного лечения офтальмологической патологии остается нанесение капель на поверхность глаза. Такое лечение эффективно при лечении роговицы и заболеваний переднего сегмента глаза, таких как конъюнктивит, блефарит, кератит, сухость глаз. Но такой подход мало эффективен при заболеваниях заднего сегмента глаза. Было подсчитано, что обычно менее 5% лекарственного средства для местного применения фактически проникает через роговицу и в конечном итоге достигает внутриглазных тканей [80]. В настоящее время лечение заболеваний, поражающих задний сегмент, ограничивается сложностью введения эффективных доз лекарств. Стратегии введения с использованием интравитреальных инъекций эффективны в преодолении барьеров, связанных с местным и системным введением офтальмологических препаратов. Внутриглазные инъекции стали стандартом лечения ряда офтальмологических заболеваний, особенно после одобрения ранибизумаба и

последующего одобрения афлиберцепта для лечения влажной формы возрастной макулярной дегенерации [81]. Интравитреальная инъекция является инвазивной и связана с серьезными побочными эффектами: кровотечением, ощущением инородного тела, стойким дискомфортом, отслоением сетчатки, развитием катаракты и бактериальным эндофтальмитом [82]. Плохое соблюдение пациентом режима лечения, трудности с точным введением лекарств и вариативная эффективность лекарств могут препятствовать достижению желаемых терапевтических результатов при глазных заболеваниях.

Имплантируемые устройства для доставки лекарств обладают многими преимуществами, такими как адресная местная доставка лекарств с постоянной скоростью, меньшая дозировка лекарств, необходимых для лечения патологического состояния, минимизация потенциальных побочных эффектов и повышенная эффективность лечения. Внутриглазные имплантаты, которые обычно классифицируются как небиоразлагаемые и биоразлагаемые ИСДЛ, трансплантируются непосредственно в стекловидное тело. Хирургическая фиксация ИСДЛ является инвазивной операцией и может привести к осложнениям, аналогичным тем, которые возникают при интравитреальных инъекциях [80]. Как правило, небиоразлагаемые ИСДЛ удерживают лекарство в резервуаре с небиоразлагаемыми мембранами для контроля высвобождения [83]. Они состоят из поливинилового спирта, этиленвинилацетата, полисульфонового капиллярного волокна [84].

В 1996 г. небиоразлагаемый имплантат Vitrasert был одобрен FDA для лечения цитомегаловирусного ретинита [85]. Имплант изготовлен из этиленвинилацетата и поливинилацетата, покрытых слоями гранулированного ганцикловира. Это устройство подшивали к склере. Небольшое отверстие в оболочке обеспечивает контроль высвобождения лекарства посредством пассивной диффузии в течение 6-8 месяцев [84]. После истечения срока действия имплантат требует хирургическое удаление. Послеоперационные осложнения возникали в 12% процедур имплантации ИСДЛ с ганцикловиrom и включали регматогенную отслойку сетчатки, кровоизлияние в стекловидное тело,

эндофтальмит и кистозный макулярный отек с вовлечением эпиретинальной мембраны [86]. Имплантат Vitrasert был изъят с европейского рынка Европейским агентством по оценке лекарственных средств в 2002 году из-за осложнений, а именно отслоения сетчатки [87].

Имплантат Retisert применяется для лечения хронического неинфекционного заднего увеита. Интравитреальный имплантат получил одобрение FDA и стал широкодоступным в 2005 году. Имплант Retisert состоит из центрального ядра, состоящего из флуцинолона ацетонида, сжатого до диаметра 1,5 мм. Таблетка лекарственного средства покрыта непроницаемым силиконовым покрытием с отверстием для высвобождения препарата. Это устройство доставляет 0,59 мг флуцинолона ацетонида в течение 2,5 лет, но затем его необходимо удалить [84]. ИСДЛ имплантируется в стекловидное тело, где фиксируется хирургическими швами. Имплант Retisert может распадаться, что приводит к интраоперационным осложнениям, включая задний разрыв сетчатки и ограниченное супрахориоидальное кровоизлияние [88]. В клинических испытаниях Retisert у 50–90% пациентов наиболее часто встречались побочные эффекты со стороны глаз, включая катаракту, повышение внутриглазного давления, послеоперационные осложнения и боль в глазах [89]. На основании клинических испытаний этого устройства, в течение 3 лет после имплантации примерно 77% пациентов потребуются препараты для снижения внутриглазного давления, а 37% пациентов потребуются процедуры фильтрации для контроля внутриглазного давления [90]. Также были зарегистрированы случаи цитомегаловирусного эндотелиита роговицы после имплантации флуоцинолона при увеите [91, 92].

Имплантат Iuvien — это недавно одобренная FDA (2014) небиоразлагаемая ИСДЛ с замедленным высвобождением флуоцинолона ацетонида, применяемая для лечения диабетического макулярного отека. Это устройство состоит из небольшой цилиндрической полиимидной трубки с мембранами для высвобождения лекарства с обоих концов трубки [93]. Имплант вводится в задний сегмент глаза с помощью иглы, создавая самовосстанавливающееся отверстие. Это устройство рассчитано на срок до 3 лет и сводит к минимуму системные

токсические эффекты. Через 36 месяцев можно установить новый имплант, не удаляя предыдущий. Сообщений о побочных эффектах от установки одновременно нескольких имплантатов в глаз на настоящий момент не было [94-96]. Тем не менее, со временем после имплантации может развиваться глазная гипертензия - одно из наиболее частых побочных эффектов, связанных с применением внутриглазных стероидов [15]. Более того, миграция имплантата Puvien в передний сегмент глаза может потребовать сложное хирургическое вмешательство [97].

Система доставки лекарственного средства дексаметазон Ozurdex представляет собой биоразлагаемый интравитреальный имплантат, который высвобождает небольшое количество (700 мкг) глюкокортикоидного дексаметазона в течение 6 месяцев. Он был одобрен FDA в 2009 году в качестве терапии первой линии для лечения отека желтого пятна после окклюзии ветви или центральной вены сетчатки, а также при неинфекционном заднем увеите [98]. Ozurdex вводится в полость стекловидного тела через иглу. Имплантат имеет двухфазное высвобождение препарата с ускоренным высвобождением в течение первых 2 месяцев, за которым следует поддерживающая доза до 6 месяцев [99]. Замедленное высвобождение обеспечивается матрицей цилиндрической сополимера молочной и гликолевой кислоты, которая полностью растворяется *in vivo*. Основными последствиями интравитреальной имплантации дексаметазона (Ozurdex) являются глазная гипертензия и катаракта [100]. Клинические исследования показали, что глазная гипертензия регистрировалась для 28,5% инъецированных глаз. К другим зарегистрированным осложнениям относились конъюнктивальное кровотечение (22%), боль в глазах (8%), гиперемия конъюнктивы (7%), катаракта (5%), отслойка стекловидного тела (2%), головная боль (4%), а лекарства для снижения внутриглазного давления требовались для 31% глаз [101, 102]. Некоторые из отмеченных осложнений представляли собой эпиретинальный фиброз, развившийся вокруг имплантата в послеоперационном периоде, который привел к повторной отслойке сетчатки, дефекту структуры имплантата Ozurdex в полости стекловидного тела и миграции имплантата в передний сегмент глаза [103-106].

Dextenza (гидрогелевая интраканаликулярная пробка) одобрена для лечения боли и воспаления после операции по удалению катаракты. Внутри слезного канальца помещается инсерт с замедленным высвобождением 0,4 мг дексаметазона, гарантируя последовательную и равномерную доставку лекарственного средства к поверхности глаза в течение 30 дней после однократного введения [107]. Дексаметазоновый инсерт вводится в каналец, набухает при гидратации и фиксируется на месте, не требуя хирургического удаления: после лечения он растворяется и выходит через носослезную систему [108]. Наиболее частыми побочными реакциями со стороны глаз были воспаление передней сегмента, включая ирит и иридоциклит (10%), повышение внутриглазного давления (6%), снижение остроты зрения (2%), боль в глазах (1%), кистозный макулярный отек (1%), отек роговицы (1%) и гиперемию конъюнктивы (1%).

Достижения в области биоматериалов и фармацевтики привели к значительному развитию инновационных глазных имплантатов. Небиоразлагаемый имплантат спиральной формы, покрытый триамцинолоном, I- vation, был разработан для высвобождения препарата в течение 36 месяцев у пациентов с диабетическим макулярным отеком. Однако устройство вызывало осложнения, включая повышение внутриглазного давления и катаракту, и его исследование было прекращено после 2 фазы клинических испытаний [109]. Другой подход к пролонгированной доставке лекарств был реализован с помощью технологии Verisome, полностью биоразлагаемой жидкой формы активного вещества. DEXYCU, содержащий дексаметазон на носителе Verisome, получил одобрение FDA для лечения послеоперационного воспаления в 2018 году. Хотя эта конкретная форма доставки лекарств ближе к препаратам замедленного действия, чем имплантаты, технология может поддерживать эффективную концентрацию препарата в течение нескольких месяцев [110]. Имплант с инкапсулированной клеточной технологией, Renexus, проходит клинические испытания для лечения телеангиэктазии желтого пятна и глаукомы. Генетически модифицированные клетки высвобождают цилиарный нейротрофический фактор человека в течение 18 месяцев [111]. Фаза 3 клинических испытаний безопасности и эффективности

Renexus при телеангиэктазии желтого пятна завершится в 2022 году, а предполагаемая дата завершения двойной интравитреальной имплантации Renexus при глаукоме – в конце 2023 года. Наконец, последние разработки в области контактных линз с лекарственным покрытием показывают их преимущество по сравнению с антиглаукомными каплями и гелями [112]. Постоянное поддержание низкого уровня внутриглазного давления имеет важное значение для предотвращения прогрессирующей потери зрения. Фаза 2 раннего исследования лечения глаукомы с помощью контактных линз с лекарственным покрытием LLT-ВМТ1 была завершена в 2021 году.

#### **1.2.4 Нейрональные имплантируемые системы доставки лекарств**

Проблема доставки лекарств в мозг заключается в первую очередь в преодолении гематоэнцефалического барьера. Именно на ИСДЛ возлагаются надежды как на форму доставки многих противоопухолевых лекарственных агентов, так как колокализация с тканью-мишенью позволит обойти это ограничение. В настоящее время основной областью внутричерепного применения ИСДЛ является лечение злокачественных глиальных опухолей.

Есть только четыре препарата и два устройства, которые были одобрены FDA для лечения злокачественных глиом: темозоломид, ломустин, кармустин для внутривенного введения, бевацизумаб, электромагнитные поля и пластины с кармустином [113]. Gliadel — это полимерный биоразлагаемый имплантат в форме круглой пластины, содержащий кармустин. Эта ИСДЛ была одобрена для лечения рецидивирующих глиом высокой степени злокачественности в 1996 году и была распространена на пациентов, перенесших первичную хирургическую резекцию в 2003 году. Восемь пластин имплантируются непосредственно в полость после резекции опухоли для местной химиотерапии. Десятилетние мультиинституциональные исследования показали, что Gliadel продлевает общую выживаемость до 14-20 месяцев по сравнению с 12 месяцами у пациентов, получающих только лучевую терапию [16, 114]. Большой ретроспективный анализ

тысячи трепанаций черепа показал, что не было значительной разницы в частоте осложнений между группами Gliadel и простой резекции, в частности, в периоперационной инфекции области хирургического вмешательства, утечке спинномозговой жидкости, менингите, трудности заживления ран, симптоматическом злокачественном отеке, эпилептических судорогах, тромбозе глубоких вен или тромбоземболии легочной артерии [114].

Было показано, что здоровая ткань мозга также реагирует на пластины Gliadel. Проспективное исследование выявило иммунофенотипы иммунных клеток, окружающих имплантаты, и ясно продемонстрировало, что количество клеток CD8+ и CD68+ было значительно выше, чем в контрольных резецированных тканях без ИСДЛ. Авторы связали противоопухолевое действие пластин Gliadel с рекрутированием иммунных клеток, убивающих опухолевые клетки, что может дополнять лечебный эффект кармустина [115]. Позже та же научная группа опубликовала статью о долгосрочном наблюдении после имплантации Gliadel с детальными гистологическими данными о паттернах макрофагов. В участке резекции не было заметно опухолевых клеток, хотя определялись CD68+ макрофаги. Эта пропорция переворачивалась по мере удаления от очага изначальной локализации глиомы [116]. На протяжении многих лет онкологи связывали пластины Gliadel с бактериальной инфекцией и местными сосудистыми реакциями [117, 118]. Однако накопление информации о тканевой реакции на имплантаты головного мозга важно для разработки новых внутричерепных имплантатов против ряда неврологических патологий. Пластины Gliadel все еще коммерчески доступны, однако они не стали стандартом лечения и постепенно потеряли интерес нейрохирургического сообщества из-за значительной разницы в показателях общей выживаемости между учреждениями и высокой стоимости.

Область исследования неврологических имплантатов не ограничивается ИСДЛ головного мозга. Всё еще ожидаются результаты клинических испытаний кондуитов, обеспечивающих направленную регенерацию нервов с помощью локальной доставки лекарств [43]. Кроме того, существует ряд клинических

испытаний, посвященных доставке клеток и лекарств к участкам повреждения спинного мозга с целью контроля воспалительной реакции [119].

### **1.2.5 Сердечно-сосудистые имплантируемые системы доставки лекарств**

Баллонная коронарная ангиопластика является стандартом лечения пациентов с обструкцией коронарных или периферических артерий. Механическая реперфузия с имплантацией стента - операция, спасающая жизни пациентов с острым инфарктом миокарда. Первые имплантаты - металлические стенты - были высокоэффективными, но вызвали рестеноз внутри стента через 6–12 месяцев [120]. Морфология процесса заключалась в однородной неоинтимальной пролиферации с преобладанием гладкомышечных клеток сосудов.

Разработка стентов с лекарственным покрытием нацелена на предотвращение пролиферативных изменений стенок сосудов и тромбоза, опосредованных проявлений реакции на инородное тело. ИСДЛ сосудов первого поколения (Cypher, Taxus, Xience, Promus, Endeavour, Resolute) были покрыты перманентными полимерами, доставляющими антипролиферативные препараты в течение 90-180 дней: паклитаксел, сиролимус, эверолимус и зотаролимус. Частота рестеноза после имплантации значительно снизилась по сравнению со стентами из чистого металла. Однако наблюдаемый риск тромбоза и около 10% встречаемости рестеноза наметили направление для последующих модификаций. Второе поколение сосудистых ИСДЛ (Orsiro, Synergy) было основано на биорезорбируемом полимерном покрытии металлических стентов сиролимусом, эверолимусом и биолимусом на срок 30-180 дней. К сожалению, распространенность рестеноза все еще составляла 5-10%, что можно объяснить действием как антипролиферативных препаратов, так и продуктов распада полимера. В результате морфологических исследований выявили, что стенки реперфузированных сосудов содержат признаки замедленной пролиферации интимы и очаги хронического воспаления. Еще одним осложнением этих стентов было развитие неоатеросклероза [121].

Последнее направление развития проектирования стентов исследует возможность полной резорбции полимерного стента. FDA одобрило первый полностью рассасывающийся стент, Absorb GT1 Bioresorbable Vascular Scaffold System, для лечения ишемической болезни сердца в 2016 году. Хотя нет серьезных опасений по поводу биоинтеграции и ингибирования тромбоза этими конструкциями, продолжаются дискуссии о рисках использования стента из-за возможности дефекта конструкции и последующего разрыва кровеносного сосуда из-за прогрессирующей потери механической жесткости в течение периода резорбции.

Ожидается, что сердечные пластыри, биоматериальные носители, станут «золотым стандартом» для ухода за больными с сердечно-сосудистыми заболеваниями в будущем. Их способность доставлять клетки и факторы роста для облегчения регенерации сердечной ткани была показана на животных моделях. Более того, возможность разработки систем высвобождения лекарств по запросу может стать чрезвычайно полезной при лечении пациентов с хроническими сердечными патологиями [122].

### **1.3 Моделирование фиброза в животных моделях**

Гипертрофические рубцы (ГР) — это очаги фиброза кожи, возникающие после травм, ожогов и хирургических операций. В отличие от нормотрофических рубцов они выбухают над поверхностью кожи и отличаются от них гиперплазией фибробластов, продольной ориентацией клеток и коллагеновых волокон. В отличие от келоидов они остаются в пределах исходной раны, не растут постоянно, не рецидивируют после удаления и не имеют узловой структуры [123, 124]. Эти рубцы широко распространены в клинической практике [125], ими страдают 4,5–16% населения [126]. ГР расположены выше поверхности здоровой кожи, обладают пониженной эластичностью и могут привести к образованию рубцовых контрактур. Часто они отличаются по цвету от здоровых участков кожи, зудят или

сопровождается болью. ГР могут стать причиной инвалидности и социальной изоляции [125].

ГР характеризуются стадийностью формирования и созревания. После эпителиализации раны грануляционная ткань трансформируется в рубцовую ткань [127, 128]. Этот процесс может занять несколько месяцев [129]. Затем рубцовая ткань подвергается инволюции и ремоделированию, что означает ее адаптацию к местной биомеханической нагрузке и системному ответу на травму. Изменения внешнего вида, гистологической структуры и функциональной активности рубца отражают его созревание. К ним относятся уменьшение объема и тургора рубца, изменение цвета (в сторону большего сходства с интактной кожей), а иногда и изменение интенсивности субъективных ощущений (зуд, боль и т.д.) [123, 130, 131]. Согласно литературным данным, созревание ГР у человека обычно занимает от трех до шести месяцев [132], но может продолжаться и до нескольких лет [133]. Рекомендуется рассматривать период в 6-12 месяцев как среднее время, необходимое для созревания ГР [134].

Морфологическая картина созревания рубца до конца не изучена [135]. С течением времени в рубце реорганизуется внеклеточный матрикс, подавляются воспалительные реакции, снижается васкуляризация и модифицируется фенотип фибробластов, включая трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты, обеспечивающие сокращение рубца [123, 133, 135-140]. Скорость созревания рубца зависит от задержки эпителиализации, интенсивности контракции ткани [30, 140, 141], а также размера и местоположения рубца (более крупные и глубокие раны имеют больше шансов на длительное созревание).

Что важно для клинической практики, зрелая рубцовая ткань становится функционально инертной и гораздо меньше поддается лечению, чем рубцы, существующие менее одного года [125]. Известно, что в исследованиях по лечению рубцов голосовых складок на послеоперационное созревание фиброзной ткани выделяется не менее трех месяцев [142]. Зрелые рубцы представляют собой проблему, требующую решения хирургическим путем [131, 134]. В то же время хирургические вмешательства на молодых рубцах (когда ГР и келоиды менее четко

дифференцированы [143]) связаны с риском избыточного постоперативного рубцевания [123, 140]. Следовательно, необходимо более четкое понимание процесса созревания ГР.

Модели ГР на животных имеют ряд ограничений из-за различий в структуре кожи и подкожных тканей и других физиологических аспектов между людьми и животными [144]. Ключевым отличием является более высокая эластичность и подвижность кожи животных, что приводит к более быстрому заживлению ран у животных [145]. Это считается важным ограничением при моделировании ГР. Прорывная модель ГР была предложена Morris и соавторами [30], которые обнаружили, что ишемические раны на вентральной стороне ушей кроликов заживают с образованием рубцов, визуально похожих на человеческие ГР. Эта модель [30] основана на четырех-шести круговых иссечениях кожи с удалением надхрящницы ушной раковины на вентральной стороне ушей кролика. Иссечение выполняется с помощью перфоратора для биопсии диаметром 6-10 мм. В этой модели эпителиализация наступает через 15-20 дней с последующим образованием рубцовой ткани через 30-60 дней с максимальным возвышением рубца через 30 дней после операции. Модель [30] была подтверждена более чем в 70 исследованиях как воспроизводимый инструмент для исследования новых диагностических методов и местного лечения рубцов [11, 145, 146]. Большинство этих работ выполнялись на сроках до формирования максимально высоких рубцов. Это означает, что созревание рубца в таких работах еще не завершилось. В то же время арсенал инструментов для объективного определения степени зрелости рубца ограничен [135, 143]. Кроме того, ограниченная продолжительность использования моделей рубцов, включая обычную модель на ухе кролика, остается серьезным препятствием для трансляции результатов экспериментов *in vivo* на людей [144].

#### 1.4 Терапевтические мишени тканевой реакции на биоматериалы

Имплантация биоматериалов, протезов, устройств, ИСДЛ [147] и других ксеногенных структур в организм человека и животных сопровождается локальным иммунным ответом, известным как реакция на инородное тело [1, 148, 149]. Он начинается с образования протеиновой «короны» и адгезии макрофагов и других клеток [7] на поверхности имплантата с последующим слиянием макрофагов в ГМКИТ и дальнейшим прогрессированием воспаления, ангиогенеза и созревания кровеносных сосудов, за которыми следует формирование фиброзной капсулы [1]. Острая фаза воспаления РИТ способствует разрушению (резорбции, лизису) имплантата, в то время как более поздняя фаза приводит к его инкапсуляции плотной капсулой соединительной ткани и изоляции от ткани хозяина. Баланс между ранним, провоспалительным, литическим и последним, профиброзным, РИТ регулируется соответствующим секреторным переключателем (известным как поляризация M1 и M2 [150, 151]) в популяции макрофагов, который, в значительной степени, зависит от свойств поверхности имплантата [152-156]. Маркеры макрофагов такого переключения включают, в частности, iNOS в качестве маркера острого воспаления / резорбтивной РИТ и Arg1 в качестве маркера прорегенеративного / фиброзного ответа [8, 157]. Интересно, что ГМКИТ, которые формируются путем слияния макрофагов, также могут быть классифицированы по их поверхностным маркерам и профилю секрета как M1- или M2-поляризованные клетки [158]. Однако важно подчеркнуть, что макрофаги *in vivo* могут иметь смешанные фенотипы и коэкспрессировать маркеры M1 и M2, отражая скорее континуум функциональных преобразований [40].

Степень биодegradации имплантата зависит от свойств его материала. Это позволяет классифицировать имплантируемые материалы и устройства как полностью или частично биодegradируемые и небидegradируемые [147, 159]. Скаффолды чаще всего состоят полностью или частично из волокон коллагена, придающих конструкту высокую биологическую совместимость, но относительно быстро резорбируемых [160]. Имплантация небидegradируемых конструкций

приводит к макрофагальной реакции и образованию ГМКИТ [7], что приводит к хроническому РИТ и чрезмерному фиброзу, в то время как биodeградируемые имплантаты вызывают последовательность и комбинацию как резорбтивного, так и фиброзного ответа [7].

Имплантация медленно биodeградируемых и небиodeградируемых структур через 2–4 недели приводит к росту незрелой грануляционной ткани, обогащенной фибробластами и капиллярами крови, аналогичной грануляционной ткани в ранах, между слоем ГМКИТ и резидентной тканью пациента. Эта незрелая ткань постепенно замещается волокнистой соединительной тканью и становится капсулой вокруг имплантата [1]. Капсула имплантата на ранней стадии обогащена кровеносными сосудами, фибробластами и иммунными клетками [1]. Дальнейшее созревание капсулы отражает процесс ПИФ [1]. Хотя ПИФ все еще находится под значительным влиянием воспалительной фазы РИТ и, в частности, макрофагов с M1 поляризацией [36], он также значительно регулируется путем TRФбета-1 [9, 10]. Это связано с активацией фибробластов, перицитов и макрофагов. Многие из этих клеток экспрессируют миофибробластоподобный фенотип (маркер  $\alpha$ -SMA) и способствуют чрезмерному накоплению компонентов внеклеточного матрикса и сокращению ткани капсулы.

Осложнения, связанные с РИТ и ПИФ, являются широкой проблемой в реконструктивной хирургии и регенеративной медицине [2, 5, 161]. Рубцы и контрактуры ткани вокруг имплантата являются одними из наиболее распространенных и плохо контролируемых проблем, возникающих после имплантаций, включая побочные реакции, связанные с имплантацией устройств с лекарственным покрытием [162]. Одним из предлагаемых решений этой проблемы является применение ИСДЛ, которые обеспечивают локальную доставку соединений, способных модулировать РИТ [10, 24-26]. В этом отношении наиболее известный подход подразумевает доставку нестероидных противовоспалительных препаратов, глюкокортикоидов, ингибиторов тирозинкиназ, стимуляторов ангиогенеза и других классов препаратов [10, 39, 162].

Диапазон одобренных FDA препаратов с доказанным антифибротическим действием в настоящее время ограничен антагонистом ТРФбета-1 пирфенидоном (ПФ) и ингибитором ангиокиназы, нинтеданибом. Оба препарата используются при лечении идиопатического фиброза легких. Активность ПФ по блокированию ТРФбета-1 [163], а также ключевая роль ТРФбета-1 в различных фибротических патологиях делают этот препарат ведущим противофиброзным средством. Было продемонстрировано, что ПФ подавляет трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты и подавляет реполяризацию макрофагов в сторону профибротического фенотипа М2, что приводит к снижению накопления коллагена и активации других антифиброзных механизмов [164]. Важно отметить, что ПФ действует не только на эффекты ТРФбета-1, связанные с М2-поляризованными макрофагами, но также подавляет синтез провоспалительного цитокина фактора некроза опухолей- $\alpha$  [165, 166], преимущественно секретируемого М1 макрофагами. Более того, спектр фармакологических эффектов позволяют классифицировать ПФ как иммунодепрессант, обладающий не только антифиброзным, но и противовоспалительным, антиоксидантным [167] и фототоксическим [168] действием. Потенциальные терапевтические применения ПФ (помимо идиопатического фиброза легких) привлекают значительное внимание. Многообещающие эффекты ПФ были продемонстрированы при клиническом и экспериментальном лечении ожогов [169], фиброза печени [170], почечного интерстициального фиброза, связанного с хроническим отторжением аллотрансплантата почки [171], язв диабетической стопы [172], глаукомы [173, 174], рассеянного склероза [175], несколько типов злокачественных опухолей [176-183] и других болезней.

Однако, несмотря на доказанную эффективность ПФ против гиперактивации ТРФбета-1, существуют серьезные препятствия для более широкого применения этого препарата при лечении органоспецифических фиброзов. Во-первых, природа сигнального пути ТРФбета-1 указывает на то, что системное применение ПФ может оказать влияние на его физиологическую роль в репарации и нормальном морфогенезе. Другая проблема связана с фармакокинетическими свойствами и

побочными эффектами ПФ, который применяется в виде таблеток для приема внутрь. С увеличением дозы во время курса лечения могут развиваться желудочно-кишечные осложнения и фоточувствительность кожи. Период полувыведения ПФ менее 3ч. ПФ также имеет сильное сродство к белку и быстро выводится из организма [184]. Фототоксичность ПФ - дополнительная проблема, связанная с его системным применением [168]. Эти обстоятельства, а также необходимость высокой частоты перорального приема и стоимость лечения указывают на то, что местная доставка и устойчивое / пролонгированное высвобождение ПФ может помочь значительно повысить эффективность и безопасность ПФ [170, 185-188].

Было показано, что местно применяемый гель, содержащий ПФ, эффективен при гипертрофических рубцах у детей [189]. Перорально введенный ПФ уменьшал ПИФ в экспериментальном исследовании протезирования груди с помощью силиконовых имплантатов у крыс через 56 дней после имплантации [190]. Недавнее исследование продемонстрировало возможность предотвращения рубцевания внутриглазной инъекцией ПФ, выполненной после имплантации дренажного устройства против глаукомы, и указало на перспективность местного введения ПФ для контроля РИТ [164]. Однако простой локальной доставки недостаточно, чтобы справиться с проблемой короткого времени циркуляции ПФ и быстрого снижения активной дозы. Одно из возможных решений этой проблемы может быть основано на разработке ИСДЛ с пролонгированным высвобождением ПФ. Применение полимерных ИСДЛ для доставки ПФ может стать одним из наиболее осуществимых и адаптивных подходов из-за широкого спектра возможностей контроля над составом и свойствами материалов медицинских полимеров, наличия клинически одобренных медленно биodeградируемых материалов, таких как полимолочная кислота, или полилактид (ПЛА), и ее сополимеры (подробно рассмотренные в работах [191] и [192]), а также технологии изготовления имплантатов из этих соединений [147, 159]. Ограничением применения полимерной основы для ИСДЛ является гидрофобность полимеров на основе ПЛА [192], которая снижает нагрузочную способность таких имплантатов для высокогидрофильных лекарственных средств [188].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Моделирование гипертрофических рубцов

#### 2.1.1 Хирургическое моделирование гипертрофических рубцов

Эксперимент на восьми кроликах породы шиншилла (самцы, 2-2,5 кг) был одобрен Локальным этическим комитетом Сеченовского университета (протокол заседания № 06-19 / 15.05.2019). Животных содержали по одному в клетке и обеспечивали комплексным гранулированным лабораторным кормом и постоянным доступом к воде. На левом ухе каждого кролика моделировали по три ГР в соответствии с опубликованным протоколом [30, 141] с небольшими изменениями. Дефекты кожи и надхрящницы на всю толщину создавались с помощью 10-мм стерильного биопсийного перфоратора. Перед операцией животных анестезировали внутримышечной инъекцией ЗОЛЕТИЛА 100 (VIRBAC, Франция; 6 мг / на 1 кг массы тела) с локальной инфильтрацией операционного поля 0,5% новокаином. Раны накрывали пластырями Cosmopor E (Paul Hartmann, Германия). Послеоперационную антибактериальную терапию проводили путем внутримышечных инъекций Байтрила 5% (Bayer, Германия; 5 мг энрофлоксацина на 1 кг массы тела животного), ежедневно в течение пяти дней после операции.

Таблица 1 – Сводная таблица лабораторных животных и объектов исследования в эксперименте по моделированию гипертрофических рубцов

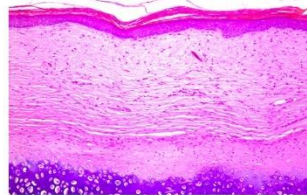
Параметр исследования	Значение
Количество кроликов-шиншилл	8
Количество моделированных рубцов	24
Количество неповрежденных фрагментов кожи	6
Временные точки эксперимента	ПОД30, ПОД60, ПОД90, ПОД120

## МОДЕЛЬ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ РУБЦОВ НА УШАХ КРОЛИКОВ

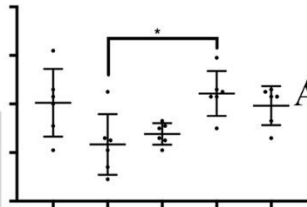
6 ОБРАЗЦОВ НА КАЖДУЮ  
ВРЕМЕННУЮ ТОЧКУ  
(30, 60, 90, 120 СУТОК)



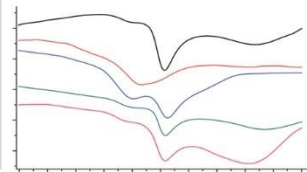
МЕТОДЫ АНАЛИЗА:



ГИСТОЛОГИЯ



АМИНОКИСЛОТНЫЙ  
СОСТАВ



ТЕРМИЧЕСКИЙ  
АНАЛИЗ

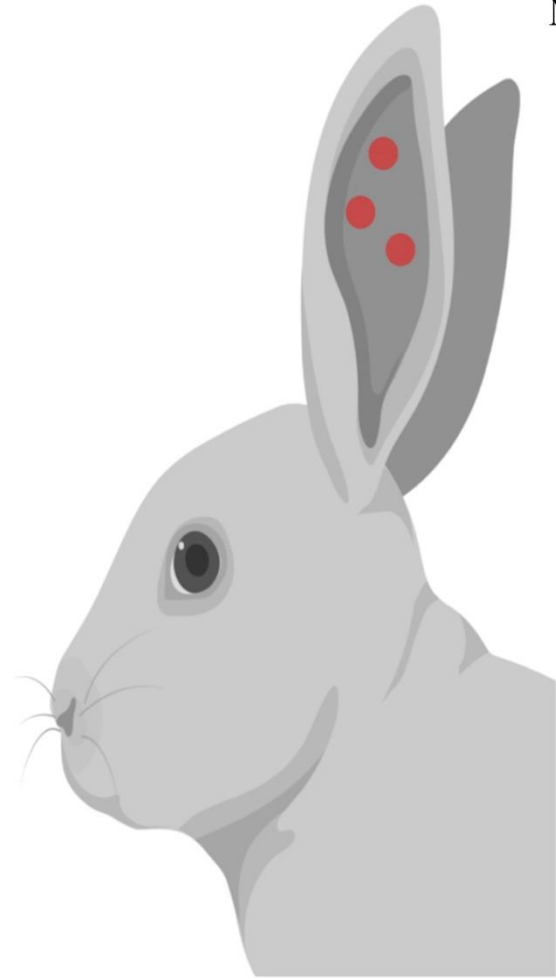


Рисунок 1 – Схематическое изображение участков моделирования ГР на ушах кроликов, а также временные точки и экспериментальные методы

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. Каждый образец ткани был разделен на три части: половину каждого образца фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине для гистологического анализа; треть исходного образца была погружена в криогель О.С.Т. и заморожена в жидком азоте для иммуногистохимического окрашивания. Оставшиеся фрагменты рубцов помещали в физиологический раствор для проведения биохимических анализов (Рисунок 1). Неповрежденные (контрольные) фрагменты кожи были вырезаны из правых ушей животных, выведенных из эксперимента на ПОД30 (Таблица 1).

### **2.1.2 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) 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.

### **2.1.3 Иммуногистохимический анализ**

Срезы замороженных тканей толщиной четыре мкм получали с помощью криотома Leica CM1950, обрабатывали 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и блокирующим раствором (Cell Marque, Германия), инкубировали с мышинными моноклональными первичными антителами против коллагена типа I (GTX26308, GeneTex, США, разведение 1:4000) и вторичными козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (G-21040, Invitrogen, США, разведенные 1:1000). Образованные иммунные комплексы выявляли с помощью диаминобензидина с контрастированием гематоксилином. Образцы изучали стандартной оптической микроскопией с помощью универсального микроскопа LEICA DM4000 B, оснащенного видеокамерой LEICA DFC7000 T, под управлением программного обеспечения LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия).

### **2.1.4 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 мм<sup>2</sup> среза ткани. Гистологические признаки воспаления в рубце по сравнению с окружающей нормальной кожей оценивали с использованием полуколичественной оценки (Таблица 2).

Таблица 2 – Критерии полуколичественной оценки морфологических признаков воспаления в рубцовой ткани

<b>Индекс воспаления</b>	<b>Критерий</b>
0	Отсутствие очаговых инфильтраций иммунными клетками (лимфоцитами и/ или нейтрофилами)
1	Несколько очаговых инфильтраций иммунными клетками
2	Множественные очаговые инфильтрации иммунными клетками и/ или микроциркуляторные нарушения в единичных кровеносных сосудах (слабж эритроцитов, тромбоз сосудов, кровоизлияния)
3	Диффузная инфильтрация иммунными клетками и/ или микроциркуляторные нарушения в большинстве кровеносных сосудов

### 2.1.5 Химический анализ

Образцы высушенных тканей гидролизовали, и аминокислотный анализ проводили с помощью анализатора аминокислот Hitachi-835 (Hitachi, Япония) стандартным способом для анализа гидролизата белка с катионообменным разделением и постколоночной дериватизацией нингидрина. Содержание коллагена оценивали, принимая, что содержание гидроксипролина (Гип) в коллагене составляет 13,5% [193]. Для анализа гликозаминогликанов (ГАГ) небольшие кусочки ткани сушили, взвешивали и погружали в водяную баню при

85 °С на 12-15 минут для денатурации тройной спирали коллагена. После этого кусочки растворяли в растворе трипсина с концентрацией 1 мг/мл, содержащем 0,02% (мас/об) азида натрия, в течение 24 часов при 37 °С; суспензию центрифугировали. Количество ГАГ определяли в супернатанте с помощью анализа 1,9-диметилметиленового синего (MP Biomedicals, США), используя опубликованный метод [194] с небольшими модификациями. При приготовлении раствора заменили соляную кислоту на уксусную кислоту, исключили добавление хлорида натрия и добавили обработку раствора в ультразвуковой ванне в течение 5 минут. Эти изменения позволили существенно улучшить калибровочный график. Калибровочные стандарты готовили с использованием раствора хондроитинсульфата А (С6737, Merck, Германия). Поглощение при 589 нм измеряли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония), используя раствор 1,9-диметилметиленового синего в качестве стандарта.

### 2.1.6 Термический анализ

Образцы тканей примерно 7–10 мг промокали салфеткой для удаления поверхностной воды и 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). Теплота денатурации коллагена была приведена к сухому весу ткани. 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). Долю соответствующей популяции коллагена в смеси оценивали по площади под каждым пиком (оценивали путем деконволюции пика).

### 2.1.7 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью 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 (толщина рубца, количество клеток в  $1\text{мм}^2$ , фибротический индекс, данные химического и термического анализов) анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Тьюки. Различия индексов воспаления между экспериментальными группами оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна. Непараметрические корреляции были проанализированы для изучения связей между исследуемыми переменными. Использовались двусторонние статистические тесты. Р-значения  $\leq 0,05$  считались статистически значимыми. Результаты статистического анализа были представлены в виде графиков разброса со средними значениями и стандартными отклонениями (SD).

## 2.2 Применение антифибротического скаффолда для контроля периимплантного фиброза

### 2.2.1 Создание 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 (ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ). Часть порошка полимера смешивали с навеской ПФ из расчета 500 мкг ПФ на 0,3

г полимера. Полученную смесь помещали в стеклянную пробирку диаметром 9 мм и высотой 35 мм, герметизировали фторсодержащей полимерной пленкой для предотвращения адгезии порошка и вспенивали в сверхкритическом диоксиде углерода ( $\text{scCO}_2$ ) 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 ПЛА<sup>0</sup>, соответственно. Формирование имплантатов осуществляли методом поверхностно-селективного лазерного спекания, описанным в наших предыдущих работах [44, 195] с небольшими изменениями. Порошки обрабатывали лазером с помощью инфракрасного лазера, скальпеля-коагулятора LS 1.9 (ИПГ ИРЭ-Полюс, 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. Температурный контроль спекания осуществляли с помощью инфракрасной камеры FLIR T530/24° (FLIR Systems, США). Температурная нагрузка на массу полимера не превышала 63,2 °С. Поскольку температура плавления ПФ составляет 102–111 °С, химическая структура пропитанного в имплантат препарата сохранялась [188].

### 2.2.2 Характеристика скаффолдов

Текстуру поверхности спеченных имплантатов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Phenom ProX (Phenom World, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 10 кВ. Размер формирующих имплантаты частиц был проанализирован с помощью процедуры сегментации и морфометрии на изображениях, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США), как описано в статье [196]. Количество измеряемых частиц превышало 1500.

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 [197]. Для этого использовали стабильный парамагнитный радикал 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксилбензоат (4-гидрокси-ТЕМПО бензоат, № 371343, Sigma-Aldrich, США), который по химическому составу напоминает структуру и геометрические параметры ПФ. Спиновый зонд вводили в порошок ПЛА в условиях, аналогичных тем, которые использовались для приготовления порошка ПЛА@ПФ (в скСО<sub>2</sub> при температуре 45 °С и давлении 20 МПа). Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) 4-гидрокси-ТЕМПО бензоата регистрировали с помощью радиоспектрометра Bruker EMX 500 Plus X-диапазона (Bruker, Германия) при 90 К. Полученные образцы вспененного порошка ПЛА-4-гидрокси-ТЕМПО бензоата помещали в кварцевые ампулы с внутренним диаметром 3–4 мм. Спектры регистрировались при мощности микроволн 0,1 мВт и амплитуды модуляции 0,1 мТл.

### 2.2.3 Анализ нагрузки и высвобождения пирфенидона

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 [198], при этом образцы хранили при 37 °С в фосфатном буферном солевом растворе (PBS) pH 7,4 в течение 6 дней.

Эффективность нагрузки ПФ в порошке ПЛА@ПФ рассчитывали по формуле (1):

$$(m1 - m2) / m1 \times 100\% \quad (1)$$

где  $m_1$  и  $m_2$  - массы первоначально добавленного и не загруженного ПФ, соответственно.

#### 2.2.4 Хирургические имплантации скаффолдов

Эксперимент на шести кроликах породы шиншилла (самцы, 2–2,5 кг) был одобрен Локальным этическим комитетом Сеченовского университета (протокол № 06-19 / 15.05.2019). Кроликов содержали в стандартных условиях вивария, по одному животному в клетке, предоставляя комплексный гранулированный лабораторный корм и постоянный доступ к воде.

Перед операцией животных анестезировали путем внутримышечного введения раствора ЗОЛЕТИЛА 100 (VIRBAC, Франция; 6 мг / кг массы тела животного) с местной анестезией операционного поля раствором новокаина 0,5%. 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 ПЛА<sup>0</sup>, один имплант ПЛА<sup>0</sup> с последующей инъекцией 500 мкг ПФ в 200 мкл PBS (ПЛА<sup>0</sup>+инПФ) и один имплантат ПЛА с 500 мкг ПФ (ПЛА@ПФ) имплантировали в каждое ухо (Таблица 3). Имплантаты помещались на расстоянии не менее 1,5 см от краевой артерии уха и друг от друга.

Таблица 3 – Сводная таблица лабораторных животных и объектов исследования в эксперименте по применению антифибротических скаффолдов

Параметр исследования	Значение
Количество кроликов-шиншилл	6
Временные точки эксперимента	ПОД30, ПОД60
Экспериментальные группы	ПЛА <sup>0</sup> , ПЛА <sup>0</sup> +инПФ, ПЛА@ПФ
Количество кожных карманов со скаффолдами	36

Послеоперационная антибактериальная терапия проводилась путем внутримышечных инъекций Байтрила 5% (Bayer, Германия) – из расчета дозировки энрофлоксацина 5 мг на 1 кг массы тела животного ежедневно в течение пяти дней после операции.

На 30-й и 60-й дни после операции (ПОД30 и ПОД60, соответственно) кроликов выводили из эксперимента инъекцией раствора ЗОЛЕТИЛА 100 (VIRBAC, Франция; 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. Каждый из образцов участков имплантаций разделили на три части: половину каждого образца фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине для гистологического анализа; треть исходного образца погружали в О.С.Т. криогель (Fisher Healthcare, США) и замораживали в жидком азоте для генетического анализа. В оставшемся фрагменте каждого образца ткани участка имплантации ткани капсулы были механически отделены от окружающей кожи и помещены в холодный стерильный физиологический раствор для термического анализа. Для контрольной группы эксперимента были забраны образцы неповрежденной кожи уха кролика.

### **2.2.5 Гистологический анализ**

Фиксированные в 10% нейтральном забуференном формалине ткани заливали в парафиновые блоки в строгой ориентации, обеспечивающей получение срезов в перпендикулярной поверхности кожи плоскости. Материал имплантата растворялся во время стандартной гистологической обработки образцов. Срезы образцов тканей, фиксированных формалином и парафином, толщиной 3-4 микрометра окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ), набором окраски по Ван Гизону (ВГ) и пикросириусом красным (ПСК) для обнаружения коллагеновых волокон. Универсальный микроскоп LEICA DM4000 B, оснащенный цифровой камерой LEICA DFC7000 T, работающей под управлением программного

обеспечения Leica Application Suit V4.8 (Leica Microsystems, Германия), использовался для исследования и визуализации образцов. Образцы были исследованы методами стандартной оптической микроскопии (для образцов, окрашенных ГЭ, ВГ и ПСК) и поляризационной микроскопии (для образцов, окрашенных ПСК).

### 2.2.6 Иммуногистохимический анализ

Срезы образцов тканей, фиксированных в 10% нейтральным забуференном формалине и залитых в парафиновые блоки, толщиной 3-4 микрометра депарафинизировали, инкубировали с 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 минут, подвергали индуцированной нагреванием антигенной демаскировке (буфер цитрата натрия, pH 6,0, 30 минут в водяной бане при 80 °C). Неспецифическое окрашивание предотвращали блокирующим раствором (Cell Marque, США) и инкубировали с мышиными моноклональными первичными антителами против  $\alpha$ -SMA (A2547, Merck, США, разведение 1:400), iNOS (MA5-17139, Invitrogen, США, разведение 1:400) и Arg1 (ab239731, Abcam, Великобритания, разведение 1:200).

Таблица 4 – Критерии полуколичественной оценки иммуногистохимического окрашивания клеток периимплантных тканей антителами к  $\alpha$ -SMA, iNOS и Arg1

Балл	Критерий	
	Экспрессия $\alpha$ -SMA в фибробластах	Экспрессия iNOS и Arg1 в ГМКИТ
0	Нет окрашивания	
1	Единичные положительные клетки	
2	Тонкий ( $\leq 30$ мкм) непрерывный слой положительных клеток	Положительные клетки составляют $\leq 30\%$ от всех клеток
3	Толстый ( $> 30$ мкм) непрерывный слой положительных клеток	Положительные клетки составляют $> 30\%$ от всех клеток

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  $\alpha$ -SMA, iNOS и Arg1 оценивали во всем периимплантном комплексе. Оценку интенсивности окрашивания (коричневый цвет хромогена) проводили полуколичественным подсчетом баллов (Таблица 4).

### **2.2.7 Морфометрический анализ**

Толщину ткани вокруг имплантата измеряли в каждом гистологическом образце в пяти участках, расположенных на расстоянии  $\sim 400$  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  $\text{мкм}^2$ , поделенных на площадь поперечного сечения интактных имплантатов соответствующей длины, равной  $3,5 \times 10^5 \text{ мкм}^2$  (с учетом того, что исходная высота имплантатов составляла 1 мм, диаметр - 10 мм; а средняя длина неповрежденного фрагмента имплантата, видимого при выбранном увеличении микроскопа, составляла 350 мкм), и умноженной на 100%.

### **2.2.8 Генетический анализ**

Суммарную РНК выделяли методом фенол-хлороформной депротеинизации нуклеиновых кислот с использованием набора реагентов «Проба-НК» (НПФ ДНК-технология, Россия). Образцы ткани помещали в пробирки с 300 мкл лизирующего буфера и инкубировали при  $65^\circ\text{C}$  1 час. Пробирки центрифугировали при 13000g в течение 10 мин при комнатной температуре ( $18\text{-}25^\circ\text{C}$ ). Отбирали надосадочную жидкость и к ней добавляли равный объем забуференного насыщенного раствора фенола, перемешивали на вортексе в течение 3-5 сек. Центрифугировали пробирки

при 13000g в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25°C). Добавляли в каждую пробирку 250 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт, перемешивали на вортексе в течение 3-5 сек. Отбирали чистую водную фазу в новую микроцентрифужную пробирку объёмом 1,5 мл. Добавляли в каждую пробирку 500 мкл 96% этилового спирта, перемешивали на вортексе в течение 3-5 сек. Центрифугировали пробирки при 13000g в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25°C). Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки. Добавляли к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 (70% этиловый спирт), перемешивали на вортексе в течение 3-5 сек. Центрифугировали пробирки при 13000g в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25°C). Открывали крышки пробирок и высушивали осадок при температуре 65°C в течение 5 мин. Добавляли к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогревали пробирки при температуре 65°C в течение 10 мин. Осаждали конденсат центрифугированием при 13000g в течение 30 сек при комнатной температуре (18-25°C). Выделенную суммарную РНК хранили при -80°C.

Таблица 5 – Описание олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

мРНК	Специфический праймер
Коллаген типа I mF	aag gag aag aag cac gtg tgg
Коллаген типа I mR	ccccattgcactgtctcg
Коллаген типа III mF	cgc tg ttc ttg cag tgg tag g
Коллаген типа III mR	gcc atc ttc tcc tta gcc
ТРФбета-1-F	aca ttg act tcc gca agg ac
ТРФбета-1-R	tag tac acg atg ggc agt gg
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа-F	gca ccg tca agg ctg aga ac
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа-R	atg gtg gtg aag acg cca gt

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°C, 30 мин при 42°C и 5 мин при 85°C.

Измерение уровня экспрессии матричной РНК (мРНК) 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°C – 2 мин, 95°C – 10 мин и с последующими 50 циклами 95°C – 15 сек, 62°C – 15 сек (Таблица 5).

Количественную оценку мРНК проводили в условных единицах путем оценки дельты дельты порогового цикла ( $\Delta\Delta Ct$ ) по отношению к количеству мРНК Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, измеренному в том же объеме (5 мкл).

### 2.2.9 Термический анализ

Перед началом термического анализа каждый образец механически разделили на три части: образец на всю толщину (для получения релевантных термограмм) и отдельные периимплантные и субэпидермальные фрагменты участков имплантации (для пространственной атрибуции эндотермических пиков). Образцы тканей примерно 7–11 мг вырезали, промокали папиросной бумагой для удаления поверхностной воды и помещали в герметично закрытые алюминиевые поддоны. Измерения с помощью ДСК выполняли с использованием дифференциального сканирующего калориметра Phoenix DSC 204 (Netzsch, Германия) при нагревании от 20 °C до 90 °C со скоростью сканирования 10 °C/мин. Полученные кривые ДСК анализировали с использованием программного обеспечения Proteus Thermal Analysis (Netzsch, Германия). Теплота денатурации

коллагена была приведена к сухому весу ткани. Деконволюцию данных в области 40–85 °С в пики Гаусса выполнили с помощью аппроксимации нескольких пиков с использованием программного обеспечения Origin 8.0 (OriginLab, США). Долю соответствующей популяции коллагена в смеси оценивали по площади под каждым пиком (оценивали путем деконволюции пика).

### 2.2.10 Статистический анализ

Статистический анализ экспериментальных количественных данных проводили с помощью стандартного программного пакета GraphPad Prism версии 8.00 для Windows (GraphPad Software, США) и SPSS 26.0 (International Business Machines, США). Нормальность распределения количественных данных проверяли тестом нормальности Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия нормально распределенных данных (линейные измерения на микрофотографиях, результаты генетического и термического анализов) анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Тьюки. Анализ различий балльной оценки экспрессии иммуногистохимических маркеров проводили с использованием 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 ( $R_s$ ) 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 SD.

## ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКИХ РУБЦОВ

### 3.1 Макроскопическое описание

Макроскопически на вентральных поверхностях 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. Гиперемия кожи практически сошла на нет, а сами рубцы приобрели светло-серый цвет. Участки рубцов на ПОД120 стали более плотными по сравнению с предыдущей временной точкой, кожа над ними была обычного вида с восстановленным волосным покровом (Рисунок 2). Внешний вид рубцов соответствовал гипертрофическим рубцам кожи человека.

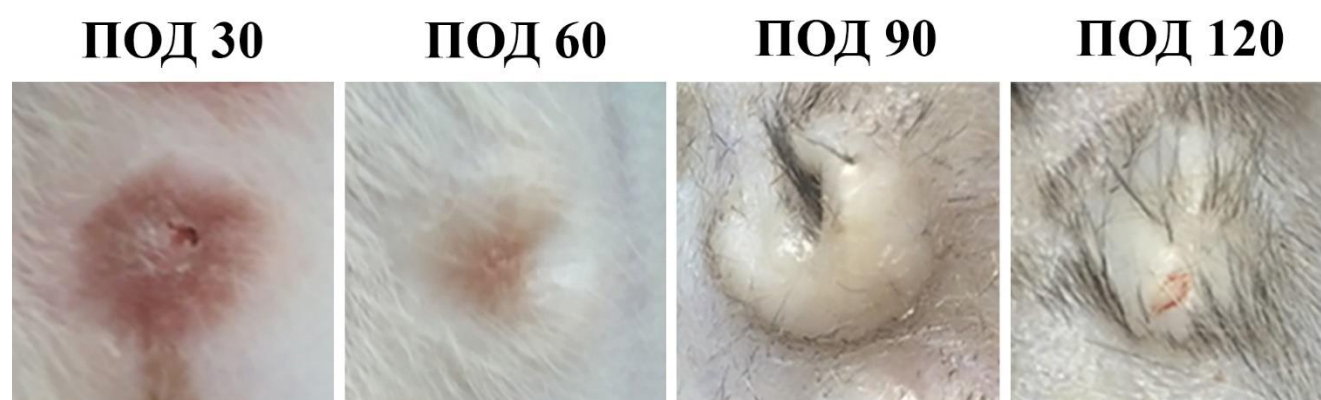


Рисунок 2 – Макроскопическая картина гипертрофических рубцов на ПОД30, ПОД60, ПОД90 и ПОД120

### 3.2 Гистологический, иммуногистохимический и морфометрический анализы

Гистологическая структура экспериментальных рубцов заметно отличалась от структуры интактных участков кожи на вентральной стороне ушной раковины (Рисунок 3). Нормальная кожа уха кролика выстлана многослойным ороговевающим эпителием, состоящим из 2-3 слоев кератиноцитов. Под эпителием располагается дерма, состоящая из сети тонких пучков коллагеновых волокон. Между ними находятся веретеновидные фибробласты и единичные капилляры. В дерме определяются компактно расположенные придатки кожи: волосяные фолликулы и сальные железы. Толщина слоя дермы составляет  $302 \pm 15$  мкм. В интактной ткани признаки инфильтрации иммунными клетками и микроциркуляторных нарушений, включая стаз эритроцитов, лимфостаз и кровоизлияния, отсутствуют. Под дермой располагается тонкая надхрящница, состоящая из 2-3 пучков коллагеновых волокон и веретеновидных клеток. Хрящевая пластина представлена эластическим хрящом, состоящим из лакун с хондроцитами и гомогенно окрашивающегося внеклеточного матрикса.

На ПОД30 рубец был полностью покрыт утолщенным слоем эпителия с признаками акантоза. Подлежащая ткань была представлена незрелым рубцом, образованным фиброзированной грануляционной тканью. Преобладали веретеновидные фибробласты с признаками пролиферации, в некоторых из них определялись фигуры митоза. Плотность клеток в этой рубцовой ткани была намного выше, чем в интактной дерме и составила  $(8,5 \pm 0,1) \times 10^3$  против  $(1,5 \pm 0,8) \times 10^3$  клеток в  $1 \text{ мм}^2$  среза ткани ( $p < 0,001$ ). Грануляционная ткань была сильно васкуляризована и содержала капилляры, артериолы и вены (Рисунок 4). Некоторые сосуды имели утолщенную стенку за счет пролиферации эндотелия и инфильтрации лимфоцитами, что соответствовало морфологической картине продуктивного панваскулита. Обращала на себя внимание слабовыраженная периваскулярная и множественная очаговая инфильтрация из макрофагов, лимфоцитов и единичных нейтрофилов. Глубокие слои рубцовой ткани содержали

меньше клеток и имели чуть более организованные пучки коллагеновых волокон, в то время как поверхностная часть (под эпидермисом) состояла из тонких, беспорядочно ориентированных переплетенных пучков коллагена.

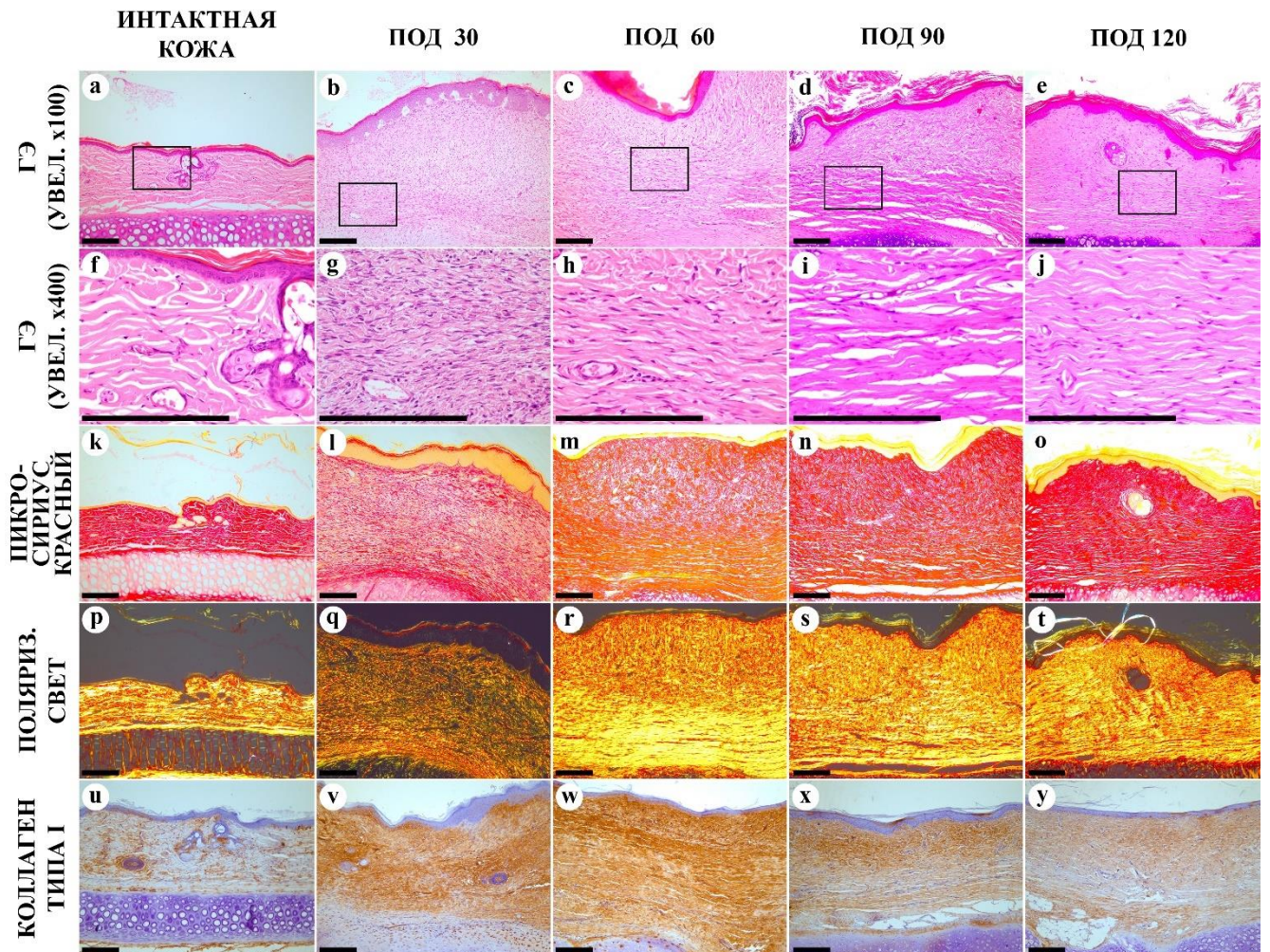


Рисунок 3 – Микрофотографии intactной кожи и экспериментальных рубцов на вентральной стороне ушей кроликов. (a-j) окрашивание ГЭ; (k-t) окрашивание ПСК; (u-y) антитела к коллагену типа I, иммунопероксидазная реакция. В столбцах показаны исследуемые группы (intactная кожа и экспериментальные рубцы на ПОД30, ПОД60, ПОД90 и ПОД120). Изображения были получены методами стандартной оптической микроскопии (a-o и u-y) и в поляризованном свете (p-t). Увеличения x100 (a-e, k-y) и x400 (f-j), масштабный отрезок – 200 мкм

Волокна внеклеточного матрикса окрашивались в красный цвет при окраске ПСК, но интенсивность окрашивания была не столь выраженной, чем у неповрежденной дермы. При микроскопии рубцов, окрашенных ПСК, в поляризованном свете в ткани преобладало диффузное зеленое свечение, что

указывало на незрелость коллагена. При иммуногистохимической реакции с антителами к коллагену типа I на ПОД30 определялось умеренное, диффузное окрашивание всей рубцовой ткани. Интенсивность окрашивания была выше, чем в интактной коже. Вентральная сторона хрящевой пластины содержала лакуны с гипертрофированными хондроцитами.

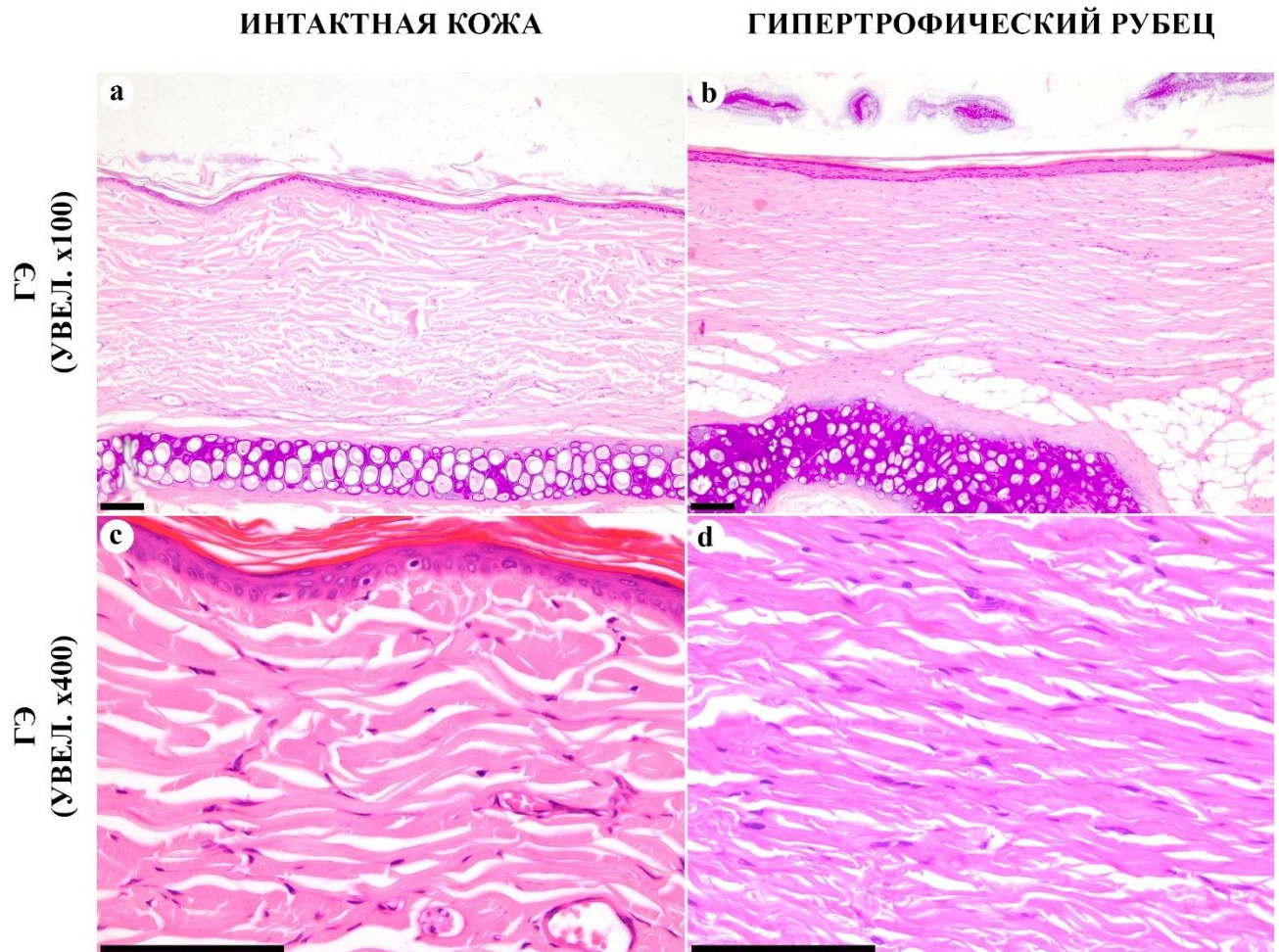


Рисунок 4 – Микрофотографии интактной кожи (а, с) и экспериментальных рубцов (b, d) на ПОД90, окрашивание ГЭ. Увеличения x100 (a,b) и x400 (c,d), масштабный отрезок – 100 мкм. (а) Эпителий интактной кожи на вентральной стороне уха кролика тонкий, архитектура дермы сетчатая, хрящевая пластина окружена надхрящницей. (b) Эпителий над гипертрофическим рубцов утолщен, волокна коллагена дермы ориентированы однонаправленно, параллельно эпителию. (с) Эпителий интактной 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

На ПОД60 дистрофические изменения эпителия изменились: признаков акантоза и утолщения не было, отмечался гиперкератоз. Рубцовая ткань стала более зрелой по сравнению с ПОД30. Количество фибробластов значительно уменьшилось, фигуры митозов не обнаруживались, а юные формы фибробластов с преобладанием цитоплазмы практически отсутствовали. Значительно снизилась интенсивность васкуляризации и инфильтрации ткани иммунными клетками. Были выявлены единичные очаги периваскулярных инфильтратов, состоящих из небольших групп лимфоцитов и макрофагов. Наблюдалась более четкая дифференциация поверхностного и глубокого слоев рубцовой ткани с беспорядочным и однонаправленным расположением коллагена соответственно. Это различие было наиболее заметно в образцах, окрашенных ПСК. Поверхностный слой был менее плотным и окрашивался ПСК в красный цвет, тогда как глубокий слой был желто-красным. При микроскопии в поляризованном свете образцы, окрашенные ПСК, давали ярко-желтое свечение, в отличие от ПОД30, когда свечение было зеленым, что свидетельствует об образовании толстых и зрелых пучков коллагена. Глубокий слой рубца имел ярко-желтое свечение, в то время как поверхностный слой излучал тускло-желтый цвет. Иммуногистохимическая реакция позволила выявить значительную диффузную экспрессию антител к коллагену типа I в поверхностном слое рубца; интенсивность окрашивания на ПОД60 была выше, чем на ПОД30. Кроме того, были отмечены морфологические признаки слабовыраженной репаративной реакции в хрящевой пластине уха. В частности, отдельные хондроциты были гипертрофированы, а часть неповрежденного ушного хряща была замещена фиброзной хрящевой тканью.

На ПОД90 рубцовая ткань была покрыта тонким слоем эпителия без признаков дистрофических изменений. В окрашенных ГЭ образцах зрелая волокнистая соединительная ткань, представленная толстыми, параллельно ориентированными пучками коллагена, расположенными в глубоком слое участка дефекта, составляла почти половину рубца. Поверхностный слой рубца был представлен более толстыми и однонаправленными пучками коллагена, чем на

ПОД60. Количество клеток, васкуляризация и инфильтрация ткани лимфоцитами и нейтрофилами были снижены по сравнению с такими же характеристиками на ПОД60. При окрашивании ПСК, весь срез рубца имел более однородное и равномерное красноватое окрашивание. Микроскопия в поляризованном свете образцов, окрашенных ПСК, показала ярко-желтое свечение в обоих слоях рубцовой ткани. Интенсивность иммуногистохимической реакции с антителами для коллагена типа I была не столь выраженной по сравнению с ПОД30 и ПОД60, но выше, чем в нормальной ткани. Морфологическая структура хрящевой пластины не отличалась от таковой в интактных участках.

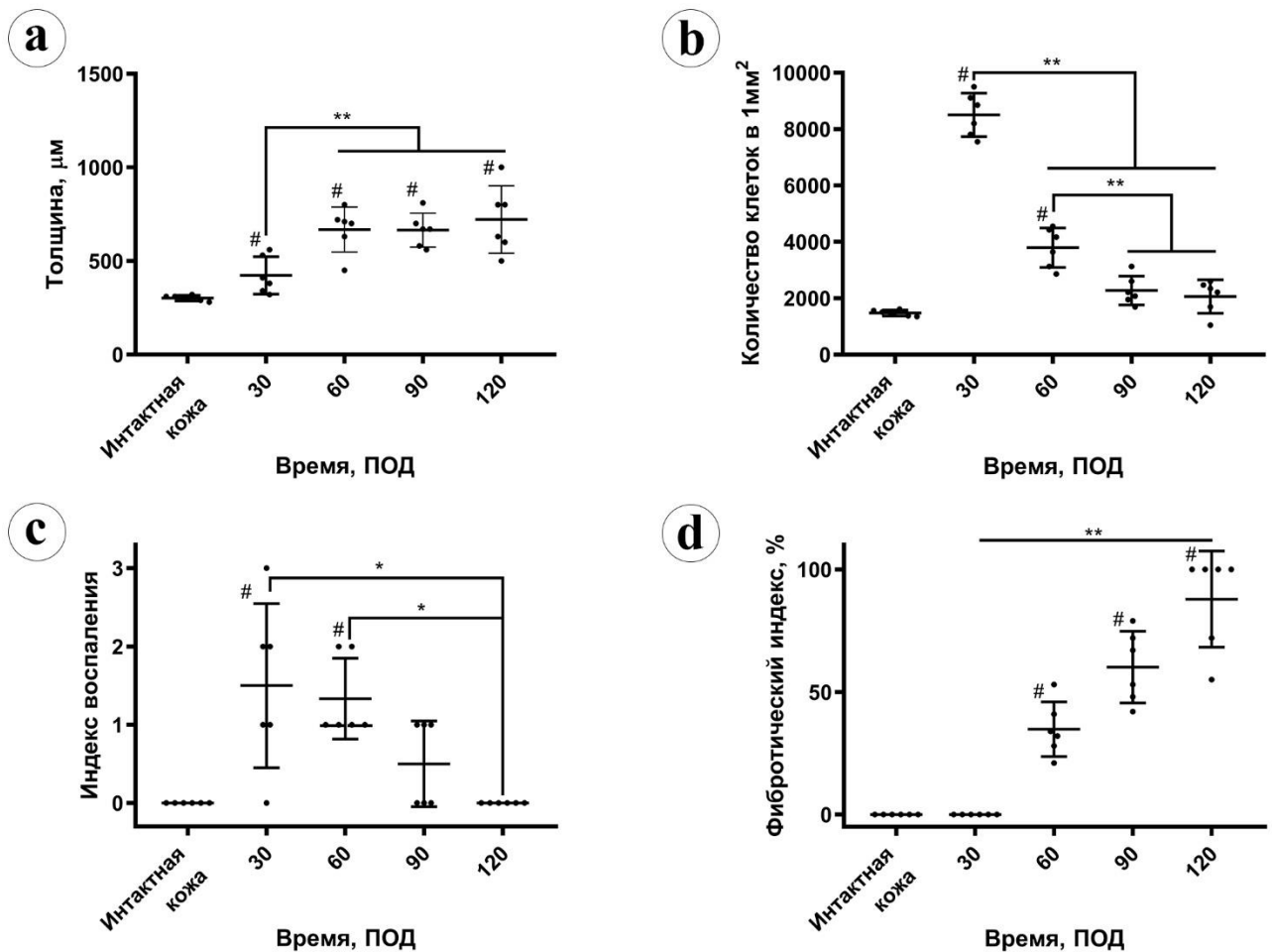


Рисунок 5 – Морфометрический анализ: (а) толщина неповрежденной кожи и экспериментальных рубцов; (б) количество клеток в  $1\text{mm}^2$  ткани; (с) индекс воспаления; (d) фибротический индекс. Статистическая значимость: \* -  $p \leq 0,05$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ . Средние значения  $\pm$  SD

На ПОД120 эпителий был тонким и состоял из 2-3 слоев клеток. Структура рубца стала более однородной по сравнению с предыдущей временной точкой: коллагеновые пучки были ориентированы параллельно поверхности эпидермиса. Средняя толщина пучков была меньше в диаметре по сравнению с предыдущей временной точкой эксперимента. Волокна внеклеточного матрикса ярко диффузно окрашивались антителами к коллагену типа I, а также давали специфический для коллагена красный цвет при окрашивании ПСК при стандартной оптической микроскопии и однородную желтую люминесценцию в поляризованном свете. Клеточный состав и паттерны васкуляризации были такими же, как на ПОД90. Признаки локальной воспалительной реакции и дистрофические изменения в хрящевой пластине отсутствовали.

По результатам морфометрического анализа, толщины рубцов динамически изменяли на протяжении всего срока эксперимента (Рисунок 5). На ПОД30 рубцы были толще, чем неповрежденная кожа ( $423 \pm 100$  мкм; с 95% доверительным интервалом для среднего значения (ДИ95%) [319; 528] мкм против  $302 \pm 15$  мкм; ДИ95% [286; 317] мкм); разница была статистически значимой ( $p = 0,014$ ). На ПОД60 толщина рубца значительно увеличилась ( $p < 0,001$ ) по сравнению с ПОД30 и достигла  $668 \pm 120$  мкм; ДИ95% [543; 794] мкм. После этого статистически значимых изменений толщины рубца не наблюдали, она составила  $665 \pm 90$  мкм на ПОД90 (ДИ95% [570; 760] мкм) и  $722 \pm 180$  мкм на ПОД120 (ДИ95% [533; 911] мкм).

Плотность клеток в ткани рубца достигла пика на ПОД30, затем снижалась до ПОД90 и не изменялась между ПОД90 и ПОД120. Различия между количеством клеток в рубцовой ткани были статистически значимыми только между временными точками на ПОД30, ПОД60 и ПОД90. Мы обнаружили статистически значимую умеренную отрицательную корреляцию ( $R_s = -0,494$ ;  $p = 0,014$ ) между толщиной рубца и плотностью клеток.

Индекс воспаления в рубцах на ПОД30 был выше, чем в интактной коже ( $p = 0,007$ ). Позже, между ПОД30 и ПОД60, он статистически не изменился ( $p = 0,727$ ), но затем снизился с ПОД60 до ПОД90 ( $p = 0,030$ ) и не менялся между ПОД90 и

ПОД120 ( $p = 0,56$ ). Не было статистически значимой корреляции между толщиной рубца и индексом воспаления, в то время как клеточность и индекс воспаления взаимно положительно коррелировали ( $R_s = 0,586$ ,  $p = 0,003$ ).

Фибротический индекс рубцов увеличился с ПОД30 на ПОД60 ( $33 \pm 10\%$ ; ДИ95% [23; 44]%) и ПОД90 ( $60 \pm 16\%$ ; ДИ95% [44; 76]%), а затем достиг максимума на ПОД120 ( $87 \pm 22\%$ ; ДИ95% [64; 100]%). Фибротический индекс положительно коррелировал с толщиной рубца ( $R_s = 0,478$ ,  $p = 0,018$ ). Он также сильно отрицательно коррелировал с клеточностью рубцов ( $R_s = -0,826$ ,  $p < 0,001$ ) и умеренно отрицательно коррелировал с индексом воспаления ( $R_s = -0,661$ ;  $p < 0,001$ ).

### 3.3 Химический анализ

Общее содержание белка (Рисунок 6) в неповрежденной коже составило  $73 \pm 18\%$  (ДИ95% [54; 92]%). В рубцах на ПОД30 этот показатель был немного меньше (не на уровне статистической значимости,  $p = 0,103$ ) по сравнению с интактной кожей  $64 \pm 4\%$  (ДИ95% [59; 68]%). Постепенно, не статистически значимо ( $p = 0,087$ ), он увеличился до  $69 \pm 2\%$  (ДИ95% [66; 71]%) на ПОД60. Затем, на ПОД90, количество белка составило  $84 \pm 3\%$ . (ДИ95% [81; 87]%), превосходя значения, определенные для рубцов и кожи на более ранних сроках ( $p < 0,001$ ). На ПОД120 он статистически значимо снизился ( $p = 0,003$ ) по сравнению с ПОД90 и составил  $77 \pm 2\%$  (ДИ95% [74; 79]%), приближаясь к значению, определенному для интактной кожи. Общее содержание белка в экспериментальных рубцах положительно коррелировало с толщиной рубца ( $R_s = 0,566$ ,  $p = 0,004$ ) и фибротическим индексом ( $R_s = 0,738$ ,  $p < 0,001$ ), в то время как сильно отрицательно коррелировало с клеточностью ( $R_s = -0,747$ ,  $p < 0,001$ ) и индексом воспаления ( $R_s = -0,520$ ,  $p = 0,009$ ).

Содержание коллагена в протеиновой массе рубцов на ПОД30 было значительно ( $p < 0,001$ ) ниже, чем в интактной коже ( $30 \pm 3\%$ ; ДИ95% [28; 33]%) против  $41 \pm 4\%$ ; ДИ95% [36; 45]%). На ПОД60 количество коллагена в рубцах

увеличилось до уровня неповрежденной кожи  $38 \pm 2\%$  (ДИ95% [36; 41]%), а затем постепенно снизилось до  $32 \pm 4\%$  (ДИ95% [28; 36]%) на ПОД90 и  $29 \pm 3\%$  (ДИ95% [27; 32]%) на ПОД120, оставаясь ниже измерений в интактной коже. Количество коллагена в протеиновой массе рубцов не коррелировало с толщиной рубца, фибротическим индексом, клеточностью, индексом воспаления и общим содержанием белка.

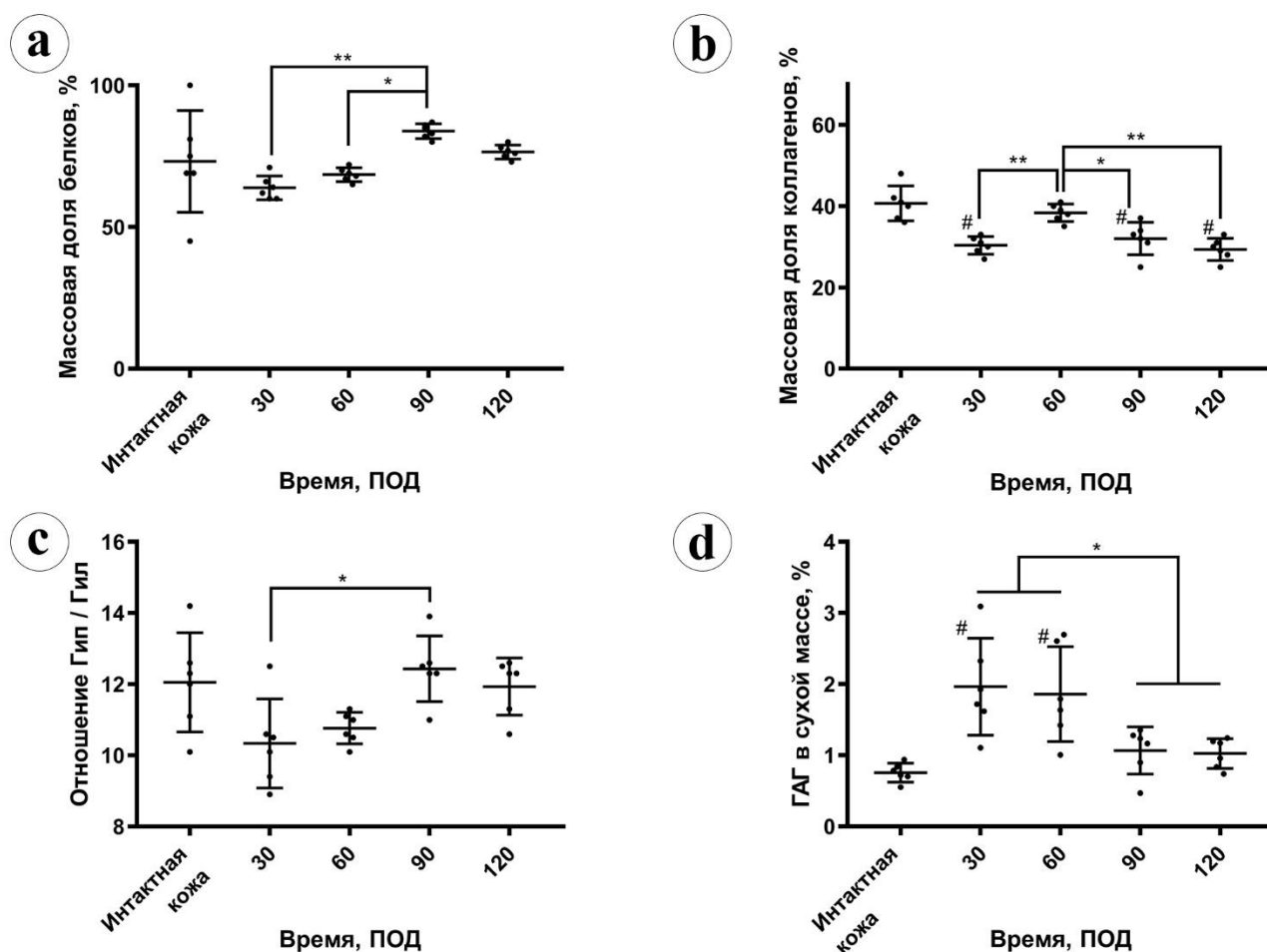


Рисунок 6 – Химический анализ: (а) массовая доля белков в образцах кожи и рубцов; (b) массовая доля коллагена в образцах кожи и рубцов; (c) отношение гидроксипролина к гидроксилизу; (d) спектрофотометрическое измерение количества ГАГ. Статистическая значимость: \* -  $p \leq 0,05$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ . Средние значения  $\pm$  SD

По результатам аминокислотного анализа, статистически значимое снижение молярного отношения гидроксипролина к гидроксилизу (Гип / Гил) в рубцах

(10±1%) по сравнению с неповрежденной кожей (12±1%) было обнаружено на ПОД30 ( $p = 0,048$ ) и на ПОД60 (11±1%;  $p = 0,044$ ). Это отношение вернулось к нормальным значениям кожи на ПОД90 и ПОД120 (12±1%). Отношение Гип / Гил в рубцах положительно коррелировало с общим количеством белка ( $R_s = 0,596$ ,  $p = 0,002$ ) и фибротическим индексом ( $R_s = 0,606$ ,  $p = 0,02$ ) и отрицательно – с клеточностью ( $R_s = -0,509$ ,  $p = 0,011$ ). Не было выявлено статистически значимой корреляции между отношением Гип / Гил и толщиной рубца, воспалением и содержанием коллагена.

Количество сульфатированных ГАГ в сухой массе рубцов резко и статистически значимо ( $p = 0,002$ ) увеличилось в рубцах на ПОД30 (2,0±0,7%) по сравнению с неповрежденной кожей (0,8±0,1%). На ПОД60 оно составило 1,9±0,7% (без статистической разницы по сравнению с ПОД30), а затем снизилось до 1,1±0,3% на ПОД90 и 1,0±0,1% на ПОД120. Падение содержания ГАГ между ПОД60 и ПОД90 было статистически значимым ( $p = 0,027$ ), тогда как позже концентрация ГАГ статистически не изменилась. Количество ГАГ положительно коррелировало с клеточностью ( $R_s = 0,698$ ,  $p < 0,001$ ) и воспалением ( $R_s = 0,543$ ,  $p = 0,06$ ). Отрицательная корреляция наблюдалась между содержанием ГАГ и толщиной рубцов ( $R_s = -0,428$ ,  $p = 0,037$ ), фибротическим индексом ( $R_s = -0,626$ ,  $p = 0,001$ ), долей протеинов ( $R_s = -0,597$ ,  $p = 0,002$ ). и отношение Гип / Гил ( $R_s = -0,509$ ,  $p = 0,011$ ).

### 3.4 Термический анализ

При интерпретации результатов термического анализа, эндотерма денатурации неповрежденной дермы может быть разложена на два отдельных тепловых перехода (Тп), отражающих популяции коллагена (Рисунок 7). Первый, низкотемпературный переход (Тп1) определили на ~59°C. Он составлял ~14% от общей калориметрической энтальпии и отражал денатурацию недавно синтезированного коллагена, характеризующегося слабой степенью поперечного сшивания [199, 200]. Основной переход (Тп2, пик на ~66°C) представляет более

60% общей энтальпии и соответствует денатурации зрелого коллагена, стабилизированного поперечными сшивками (Таблица 6).

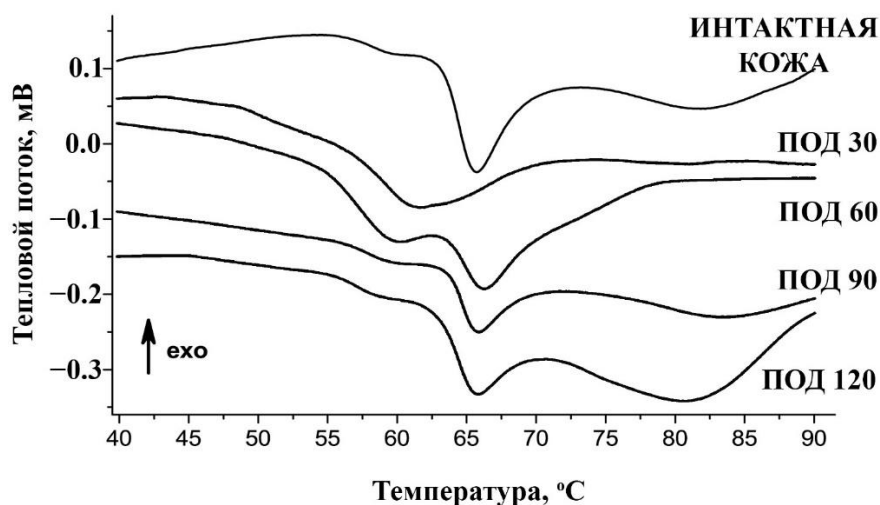


Рисунок 7 – Термограммы интактной кожи и рубцовых тканей

В рубцах на ПОД30 основная масса коллагена была представлена единственной фракцией с малым количеством сшивок, что отражалось в наличии единственного пика на  $\sim 61^\circ\text{C}$ . На ПОД30 условно определенная доля «незрелого» коллагена в рубцах значительно увеличилась и достигла примерно 50%.

Таблица 6 – Пики температурных переходов и доли низкотемпературных переходов от общей энтальпии (статистическая значимость по сравнению с интактной тканью: \* -  $p \leq 0,05$ )

Образцы	Среднее значение $\pm$ SD		
	Тп1, °С	Тп2, °С	Доля низкотемпературного пика, %
Интактная кожа	58.9 $\pm$ 1.1	65.6 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 5.5
Рубцы, ПОД30	61.6 $\pm$ 1.4		49.9 $\pm$ 16.4*
Рубцы, ПОД60	59.4 $\pm$ 0.6	66.2 $\pm$ 0.5	35.4 $\pm$ 11.8*
Рубцы, ПОД90	58.8 $\pm$ 0.3	66.1 $\pm$ 0.5	14.9 $\pm$ 3.3
Рубцы, ПОД120	58.9 $\pm$ 0.5	66.1 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 6.0

На ПОД60 в рубцах стали обнаруживаться две фракции коллагена, включая Тп1 для коллагена с низкой степенью поперечных связей и Тп2 для «зрелого»

коллагена. Доля «незрелого» коллагена на ПОД60 была больше, чем в интактной дерме ( $\geq 35\%$ ). На ПОД90 и ПОД120 эндотермы денатурации коллагена были аналогичны кривым, наблюдаемым при анализе интактной кожи.

### **Обсуждение**

Обычно модель ГР уха кролика используется для апробации новых методов лечения, направленных на предотвращение и инволюцию рубца [141]. Лечение обычно начинается на ПОД30 и продолжается в течение четырех недель [126, 128, 136-139, 201-207]. Результаты настоящего исследования показывают, что в этот период рубец еще не стабилизировался. Это означает, что многие лечебные эффекты, о которых сообщается в соответствующей литературе, определяются в период продолжающегося созревания рубца. Является ли предлагаемое лечение таким же эффективным для давних, зрелых ГР, остается открытым вопросом.

В представленной работе период наблюдения за созреванием ГР уха кролика был продлен до ПОД120. До нашей работы были опубликованы только несколько кратких описаний гистологической структуры ГР уха кролика на сроках более двух месяцев с момента хирургического моделирования [30, 208]. Раньше для получения таких зрелых рубцов ушей кроликов вместо пункционной биопсии делали большие (1,5-2 см  $\times$  4,5-7 см) полноразмерные эксцизионные / электрокаутеризованные раны на вентральной стороне ушей кроликов. Тем не менее гистологических описательных данных о таких рубцах мало в доступной научной литературе [30]. Авторы сообщали о возвышении рубца над уровнем кожи, фибротической трансформации ткани, легких признаках воспаления в рубцовой ткани и утолщении хрящевой пластины в течение периода до ПОД90 (без описаний стадийности этого процесса). Моделируемые ГР определялись макроскопически на протяжении девяти месяцев после травматизации кожи. Большой размер ран и модификации хирургических техник сделали эту модель хронического рубца менее воспроизводимой, чем классический подход; дальнейшее использование этой модели хронического ГР было минимальным. В настоящей работе была поставлена задача исследовать микроскопическую структуру зрелых ГР, полученных воспроизводимой хирургической методологией, на протяжении рационального

времени наблюдения, 4 месяца. Высокая воспроизводимость рубцовой трансформации была достигнута за счет небольшого увеличения диаметра ран после перфорации, с 7 до 10 мм. Применяя количественные и полуквантитативные методы объективной оценки морфологии и физико-химических характеристик рубцов, были выделены четыре стадии созревания экспериментальных ГР на кроличьем ухе (Рисунок 8).

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, а поляризационное свечение (анизотропия) коллагена, окрашенного ПСК, было тусклым и зеленоватым, что свидетельствовало о высоком содержании коллагена типа III. Термический анализ выявил потерю двух отдельных кожно-специфических тепловых переходов на кривой ДСК и присутствие единственного пика при  $\sim 61^{\circ}\text{C}$ , который указывал на большую долю ( $\sim 50\%$ ) незрелого коллагена.

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 интактной кожи. Сформировался глубокий слой из параллельно уложенных толстых пучков коллагеновых волокон. Постепенное формирование слоистой структуры рубца было видно с помощью поляризационной микроскопии. При этом отмечалась интенсивная анизотропия, свидетельствующая о преимущественном содержании коллагена типа I. Экспрессия коллагена типа I была относительно

увеличена по всему рубцу. Отношение Гип / Гил было ниже, чем в интактной коже. Доля незрелого коллагена (по данным ДСК) все еще была намного выше, чем в нормальной коже. Это можно объяснить низкой активностью лизилоксидазы на ранних стадиях фиброза грануляционной ткани [209], что приводит к снижению доли коллагена с большим количеством поперечных связей в 4-10 раз [145]. Количество ГАГ по-прежнему было очень высоким.

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. Произошедшее заметное изменение ориентации пучков коллагена на более параллельное расположение характерно для микроскопической структуры ГР [210]. Общее содержание белка увеличивалось, а экспрессия ГАГ и коллагена типа I продолжала снижаться. Отношение Гип / Гил и эндотермы ДСК приблизились к значениям интактной кожи. Наблюдаемая динамика изменений содержания ГАГ соответствует ранее опубликованным данным о концентрации хондроитин-сульфата в грануляционной ткани, незрелых ГР (в шесть раз выше, чем в коже) и зрелых рубцах (несколько выше, чем в коже) [127]. Изменения отношения Гип / Гил, выявленные в течение 90 дней после ранения, можно объяснить как изменением отношения типов коллагена [211], так и изменением активности пролил- и лизилгидроксилаз и лизилоксидазы [209, 212]. В текущем исследовании отношение Гип / Гил в рубцах в основном оставалось близким к значениям нормальной кожи [213] и опускалось ниже «кожного диапазона» только на первых двух стадиях созревания рубца (до ПОД60). Это снижение отношения специфических для коллагена аминокислот может быть связано с возможным увеличением относительного количества коллагена типа IV из-за высокого содержания сосудистых элементов (общеизвестная локализация этого типа

коллагена), поскольку он характеризуется низким отношением Гип / Гил, 2,6–3,0 [213]. Вероятно, отношение Гип / Гил увеличилось на стадии 3 созревания рубца (ПОД60-90) из-за временного преобладания количества коллагена типа III, который имеет высокое значение Гип / Гил, около 22,0 [213].

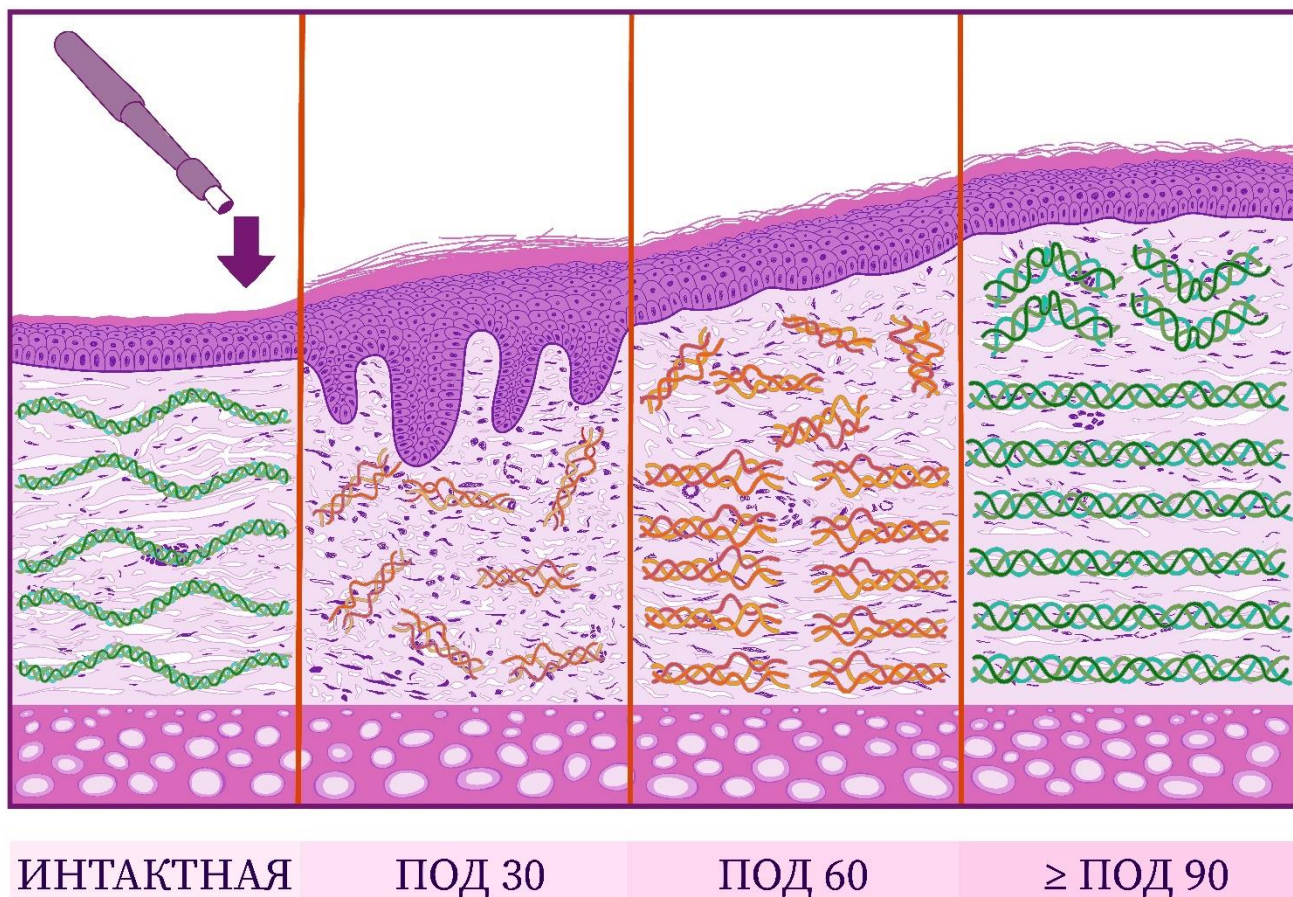


Рисунок 8 – Схема динамического созревания гипертрофических рубцов в модели на ушах кроликов. Внеклеточный матрикс интактной дермы представлен сетью пучков коллагеновых волокон. При созревании рубцовой ткани на месте дефекта, созданного перфоратором, новообразованная ткань на ПОД30 представлена разнонаправленными молодыми коллагеновыми волокнами с малым количеством поперечных сшивок. На ПОД60 в морфологической структуре рубца можно выделить поверхностный слой из более тонких и разнонаправленных волокон и глубокий слой из толстых однонаправленных пучков коллагеновых волокон. К ПОД90 доля однонаправленных пучков коллагеновых волокон превышает половину толщины рубца

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 [209]. Восстановление нормального отношения Гип / Гил кожи в рубцовых тканях, наблюдаемое на ПОД120, может указывать на перераспределение производства ключевых макромолекул, которые обеспечивают синтез коллагеновых волокон.

Мы предлагаем несколько интерпретаций результатов корреляционного анализа, касающихся механизмов рубцевания и возможных последствий для дальнейшего моделирования и лечения ГР.

Во-первых, обнаружено, что толщина рубца продолжала расти между ПОД30 и ПОД60, в то время как пиковое значение клеточной плотности было достигнуто на ПОД30 и позже уменьшилось. Это указывает на то, что клеточная гиперплазия не определяла увеличение объема рубца, по крайней мере, после ПОД30. Это дает возможность предположить, что при созревании рубца и уменьшении количества фибробластов оставшиеся клетки усиливают биосинтез коллагена. Более того, абсолютные значения Rs указали на то, что толщина рубцов больше зависела от изменений внеклеточного матрикса (фибротического индекса), чем от клеточности и воспаления. В то же время фибротический индекс сильно отрицательно коррелировал с индексом клеточности и воспаления.

Наиболее заметное увеличение общего содержания белка наблюдали на 3 стадии созревания рубца (ПОД60-90). После чего отмечалось снижение уровня белка. Это соответствовало организации двухслойной структуры с толстыми пучками коллагена с последующим его ремоделированием в более однородный и регулярный коллагеновый каркас с более тонкими пучками, что может быть

связано с активностью металлопротеиназ. Общее содержание белка, толщина рубца и фибротический индекс положительно коррелировали друг с другом и отрицательно - с плотностью клеток. Это означает, что повышенное количество белка, объем рубца и фиброз были поддержаны не гиперплазией (увеличением числа) фибробластов, а их повышенной функциональной эффективностью. Вероятно, цитостатическая и противовоспалительная обработка рубцов может привести к увеличению общего содержания белка или ускорению организации фиброза, способствуя общему созреванию рубца. Интересно, что содержание коллагена не коррелировало с толщиной рубца, фибротическим индексом, клеточностью, воспалением и общим содержанием белка. Это может свидетельствовать о роли неколлагеновых соединений, возможно, белковой природы (протеогликанов, гликопротеинов) в формировании объема рубца.

Наконец, резкое увеличение содержания сульфатированных ГАГ положительно коррелировало с клеточностью и воспалением и отрицательно - с толщиной рубца, фибротическим индексом и общим количеством белка. Это указывает на то, что ГАГ вряд ли являлись неколлагеновым компонентом внеклеточного матрикса, ответственным за выступание рубца. Важно отметить, что накопление ГАГ и белка в рубцах было разделено во времени. ГАГ были увеличены до ПОД60, тогда как после этого момента времени концентрация ГАГ снизилась, в то время как накопление белка резко возросло. Это соответствует ранее показанному накоплению сульфатированных ГАГ в грануляционной ткани [127] и в незрелых ГР [214]. Возможно, ГАГ, являясь высокополярными, связывающими молекулы воды соединениями, распределяют механические напряжения по увеличенному объему в незрелых рубцах, когда структурных компонентов рубца недостаточно, чтобы выдерживать напряжение. Это похоже на «амортизирующую» функцию ГАГ, описанную прежде всего в хрящах [215]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе описанного переключения с увеличения концентрации ГАГ на накопление белка в созревающих ГР, еще не ясны. Считается, что различные скорости синтеза и трансформации ГАГ и протеинов являются одними из факторов, которые могут этому способствовать.

Однако оценка скорости и значимости этих процессов затруднена, так как на них могут повлиять многочисленные условия [216, 217].

Представленные результаты могут служить обоснованием для использования модели ГР с целью изучения новых материалов имплантов в регенеративной медицине, а также для новых терапевтических стратегий лечения рубцов, специфичных для каждой стадии. Например, контроль концентраций ГАГ потенциально может быть использован на 1 и 2 стадиях созревания рубца с помощью физиотерапии, которая способствует перераспределению связанной с ГАГ воды и активирует механосенсорные реакции клеток [218]. В качестве альтернативного подхода можно применять различные фармакологические стратегии для контроля метаболизма или локальной концентрации ГАГ [217, 219]. Некоторые положительные изменения рубцовой ткани, такие как увеличение содержания эластических волокон и клиническое улучшение, наблюдались после лечения ранних ГР хондроитиназами в традиционной модели уха кролика [220] и в келоидах человека [221]. Тем не менее, ГАГ-снижающий терапевтический подход требует определенной осторожности и дальнейших исследований, поскольку он может привести к значительным изменениям биомеханического и гуморального сигнального баланса после высвобождения факторов роста из ГАГ-ассоциированного депо и перераспределения механических напряжений из-за вытеснения несвязанной воды [215, 222]. Более того, недавние данные показали, что сильно сульфатированный хондроитинсульфат может защищать фибробласты ГР от активации экспрессии  $\alpha$ -SMA после стимуляции трансформирующим ростовым фактором бета, основным регулятором фиброза [223]. В этом исследовании не были идентифицированы отдельные типы ГАГ, поскольку этот вопрос рассматривался в других работах [127, 214, 223-237]. Однако текущие результаты ясно указывают на роль ГАГ в созревании ГР, и поэтому дальнейшие, более целенаправленные исследования в этой области могут помочь лучше контролировать ремоделирование рубцовой ткани.

С другой стороны, коррекция белкового состава, например, с помощью биологических подходов, таких как контроль клеточного фенотипа, профилей

секреции [238] или ремоделирования внеклеточного матрикса [239, 240], выглядит более оправданной на более поздних стадиях рубцевания, актуальных для задач реконструктивной и пластической хирургии. Принимая во внимание результат текущего исследования, указывающий на роль неколлагеновых белковых компонентов внеклеточного матрикса в увеличении толщины рубцов, поисковая работа по определению динамических изменений широкого спектра компонентов матрикса представляется особенно многообещающей. В этом отношении омиксные технологии и методы науки о данных [241, 242], могут сыграть ключевую роль в идентификации новых целей для контроля рубцовой трансформации внеклеточного матрикса.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что зрелые ГР могут воспроизводимо моделироваться в кроличьем ухе с незначительной модификацией хирургической техники по сравнению с традиционным подходом и для созревания ГР уха кролика необходимо не менее трех месяцев. Описанные объективные критерии четырех стадий созревания ГР расширят возможности экспериментального дизайна исследований новых методов диагностики и лечения зрелых рубцов кожи человека.

## ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИФИБРОТИЧЕСКИХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПЕРИИМПЛАНТНОГО ФИБРОЗА

### 4.1 Характеристика скаффолдов

Дискообразные (высотой 1 мм и диаметром 10 мм) имплантаты ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ (Рисунок 9) обладали механической стабильностью.

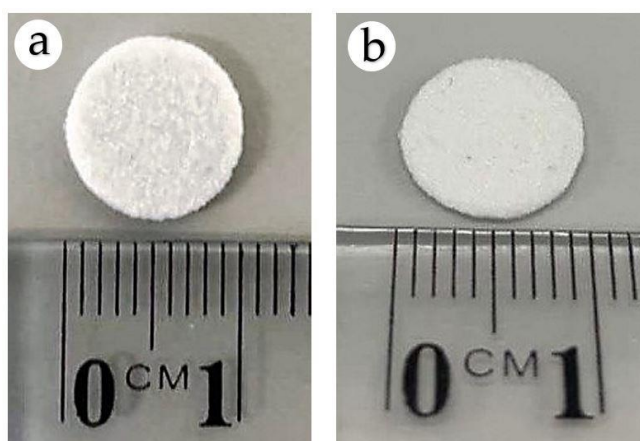


Рисунок 9 – Макрофотографии ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ скаффолдов

Режим лазерного спекания обеспечивал только поверхностное плавление полимерных частиц (Рисунок 10).

Таблица 7 – Размеры частиц ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ скаффолдов

Тип скаффолда	Размер, мкм					
	Среднее±SD	ДИ95%		Медиана	Минимум	Максимум
		Нижняя граница	Верхняя граница			
ПЛА <sup>0</sup>	46.4±29.4	44.9	47.9	36.5	11.3	167.1
ПЛА@ПФ	40.0±29.9	38.5	41.5	30.0	10.0	170.0

Средний диаметр частиц, расположенных на поверхности имплантатов, составлял  $46,4 \pm 29,4$  мкм для ПЛА<sup>0</sup> и  $40,0 \pm 29,9$  мкм для ПЛА@ПФ (Таблица 7). Согласно результатам статистического теста Манна-Уитни, размер частиц в имплантате ПЛА@ПФ был меньше, чем в имплантате ПЛА<sup>0</sup> ( $p < 0,001$ ), однако при этом он варьировал в аналогичном диапазоне. Краевые углы смачивания спеченных образцов составили  $128 \pm 3^\circ$  для имплантатов ПЛА@ПФ и ПЛА<sup>0</sup>, что указывало на аналогичную гидрофобность материалов.

На основании анализа спектра ЭПР ( $d_1 / d$ , где  $d_1$  - расстояние между максимумами боковых компонент, а  $d$  - амплитуда центральной компоненты, зарегистрированной при 90К в отсутствие вращательной подвижности), расстояния между молекулами 4-гидрокси-ТЕМПО бензоата в носителе ПЛА были не менее 3 нм. Кроме того, не было никаких признаков синглетной линии, указывающей на локальное накопление зонда (Рисунок 11). Оба факта указывают на равномерное распределение парамагнитных центров в структуре имплантата ПЛА, нагруженного 4-гидрокси-ТЕМПО бензоатом.

Достигнутая эффективность нагрузки ПФ для имплантатов ПЛА@ПФ составила  $97,9 \pm 13,8\%$ . Высвобождение ПФ из порошка ПЛА@ПФ в PBS при 37°C было интенсивным в течение первых часов и достигло  $49,1 \pm 2,1\%$  через 5 часов инкубации (Рисунок 12).

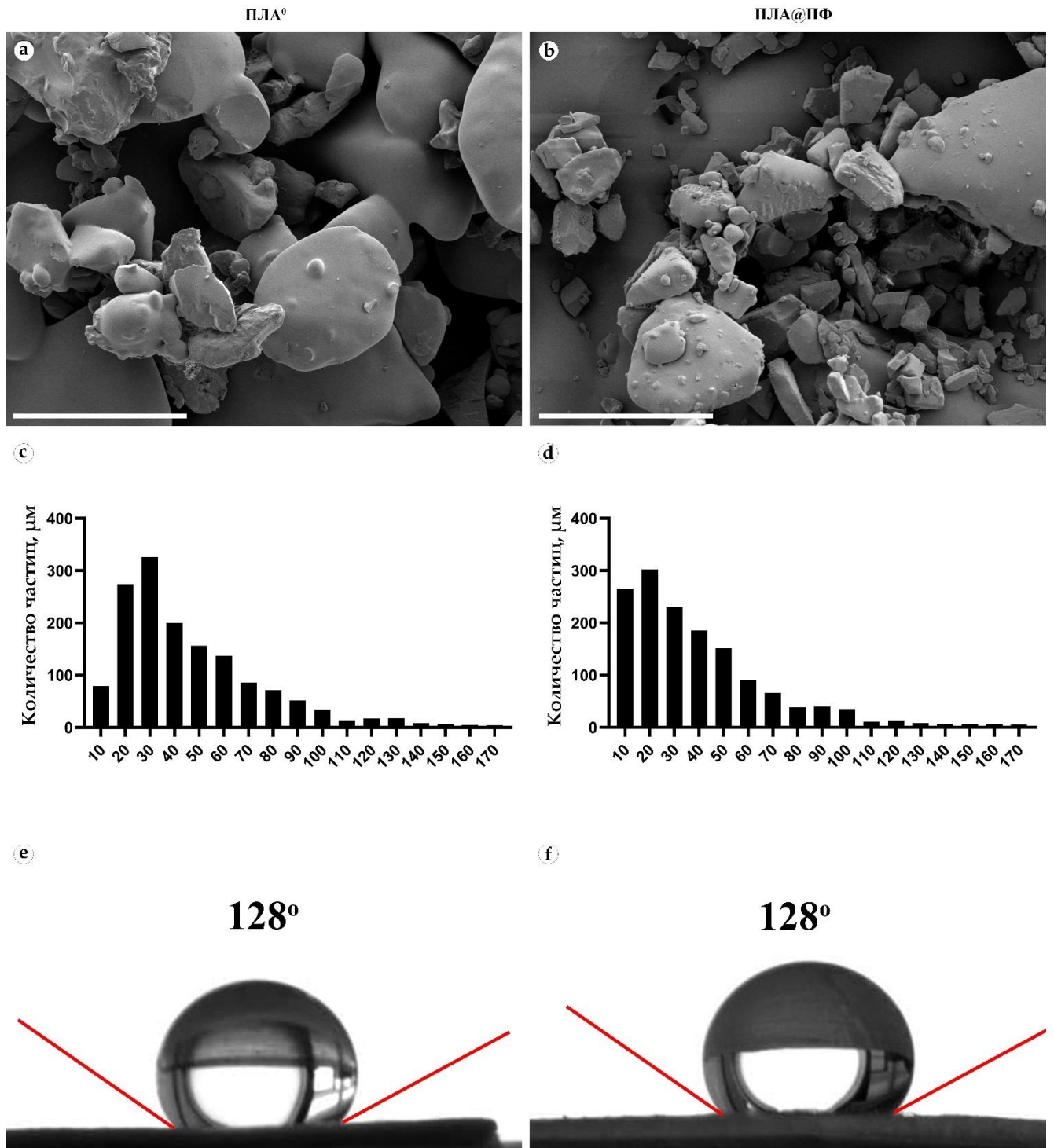


Рисунок 10 – (а, б) Сканирующая электронная микроскопия текстуры поверхности имплантатов ПЛА<sup>0</sup> (а) и ПЛА@ПФ (б), масштабный отрезок – 100 мкм. (с, д) Гистограммы распределения по размерам 1500 случайно измеренных частиц имплантатов ПЛА<sup>0</sup> (с) и ПЛА@ПФ (д). (е, ф) Краевые углы смачивания имплантатов ПЛА<sup>0</sup> (е) и ПЛА@ПФ (ф)

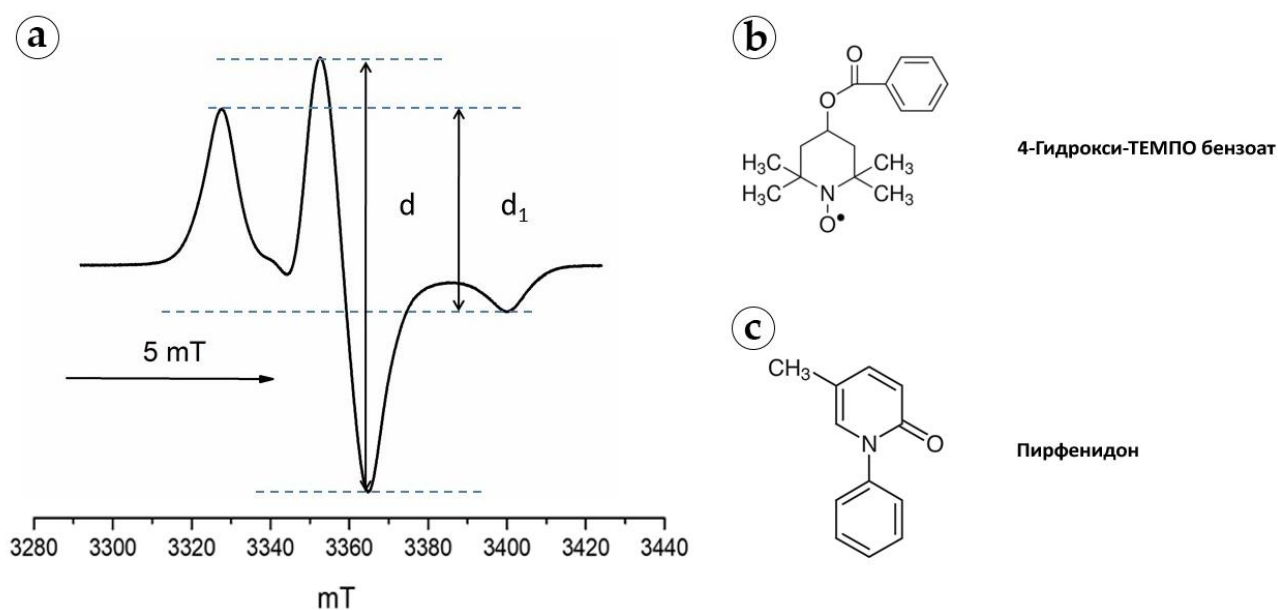


Рисунок 11 – Спектр ЭПР 4-гидрокси-ТЕМПО бензоата в имплантате ПЛА при 90 К (а). Структурные формулы 4-гидрокси-ТЕМПО бензоата (b) и ПФ (с)

Напротив, высвобождение ПФ из спеченного лазером имплантата ПЛА@ПФ той же массы было более стабильным: только  $33,6 \pm 1,8\%$  лекарства высвободилось в течение 5-часового интервала. Полное (100%) высвобождение ПФ из обоих типов образцов произошло через  $\sim 80$  ч.

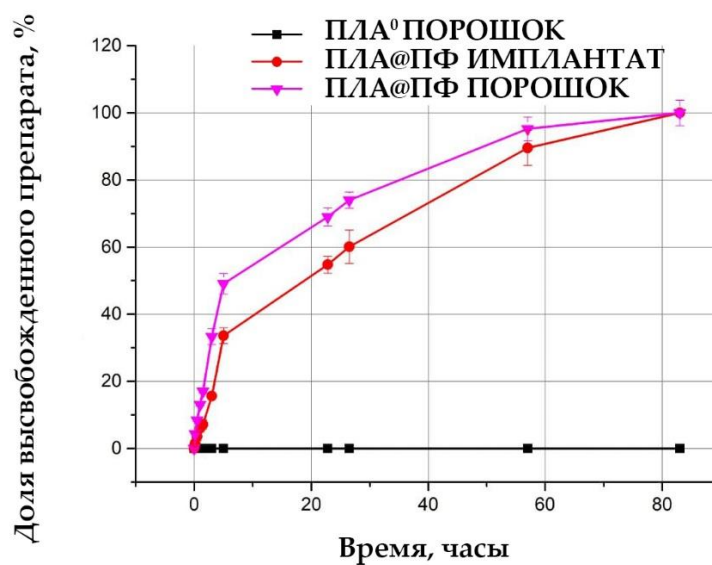


Рисунок 12 – Спектрофотометрическая кинетика высвобождения ПФ в раствор PBS из порошков ПЛА и имплантатов ПЛА@ПФ при 37°C

## 4.2 Макроскопическое описание

При макроскопическом исследовании кожных карманов на ушах кроликов во всех временных точках эксперимента определялись выбухающие над поверхностью округлые участки ткани, покрытые кожей с ярко выраженной гиперемией. Во всех экспериментальных группах на ПОД30 присутствовали плотные округлые подкожные валики ткани с умеренной гиперемией на краях и более светлой кожей в центре дефекта. Шовный материал, которым ушили дефект, был покрыт наложениями из нитей фибрина, образующих рыхлый сгусток. При освещении направленным источником света уха кролика с дорсальной стороны, визуализировался скаффолд округлой формы, располагающийся подкожно. На ПОД60 в группе ПЛА0 определялись значительное утолщение и уплотнение рубцовой ткани с формированием валика на периферии кожного кармана, кожа над валиком была с умеренными признаками гиперемии в центре. В этой же временной точке в группе ПЛА0+инПФ кожный карман изнутри был заполнен плотной рубцовой тканью. В группе ПЛА@ПФ на ПОД60 кожа в области карманов практически не выбухала над интактными участками, но была значительно гиперемирована (Рисунок 13).

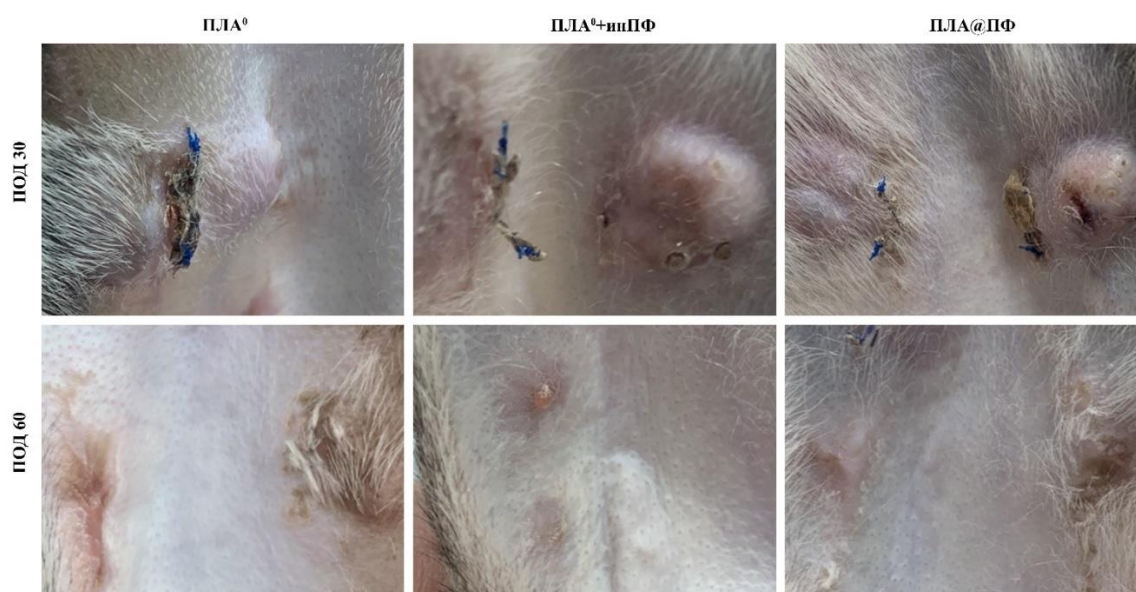


Рисунок 13 – Макроскопическая картина кожных карманов со скаффолдами на ПОД30 и ПОД60

### 4.3 Гистологический, иммуногистохимический и морфометрический анализы

Образцы иссеченных тканей участков имплантаций, как правило, имели одинаковые структурные компоненты (Рисунок 14). Многослойный ороговевающий эпителий был представлен 2-4 слоями клеток, в отдельных случаях – с признаками гиперкератоза. Дерма состояла из сети тонких пучков коллагеновых волокон, среди которых определялись волосяные фолликулы и сальные железы. Представляющие интерес тканевые элементы, включая периимплантную соединительнотканную капсулу и окружающие ткани, располагались между эпителием кожи вентральной стороны и надхрящницей ушного хряща. Поскольку искусственный (материал имплантата) и тканевой (резидентная и *de novo* сформированная ткань) компоненты были тесно связаны между собой, это позволило назвать всю зону интереса периимплантатным комплексом (ПИК).



Рисунок 14 – Схематическое изображение структуры и расположения ПИК в кожном кармане уха кролика

В центре ПИК располагались остатки материала имплантата, которые определялись на срезах ткани не как объемные структуры, а как «пустоты» из-за растворения ПЛА во время гистологической проводки. Частицы имплантатов

наблюдали во всех образцах на всех временных точках эксперимента. Их количество варьировало между разными группами: на ПОД60 их было меньше, особенно в экспериментальных группах с ПФ.

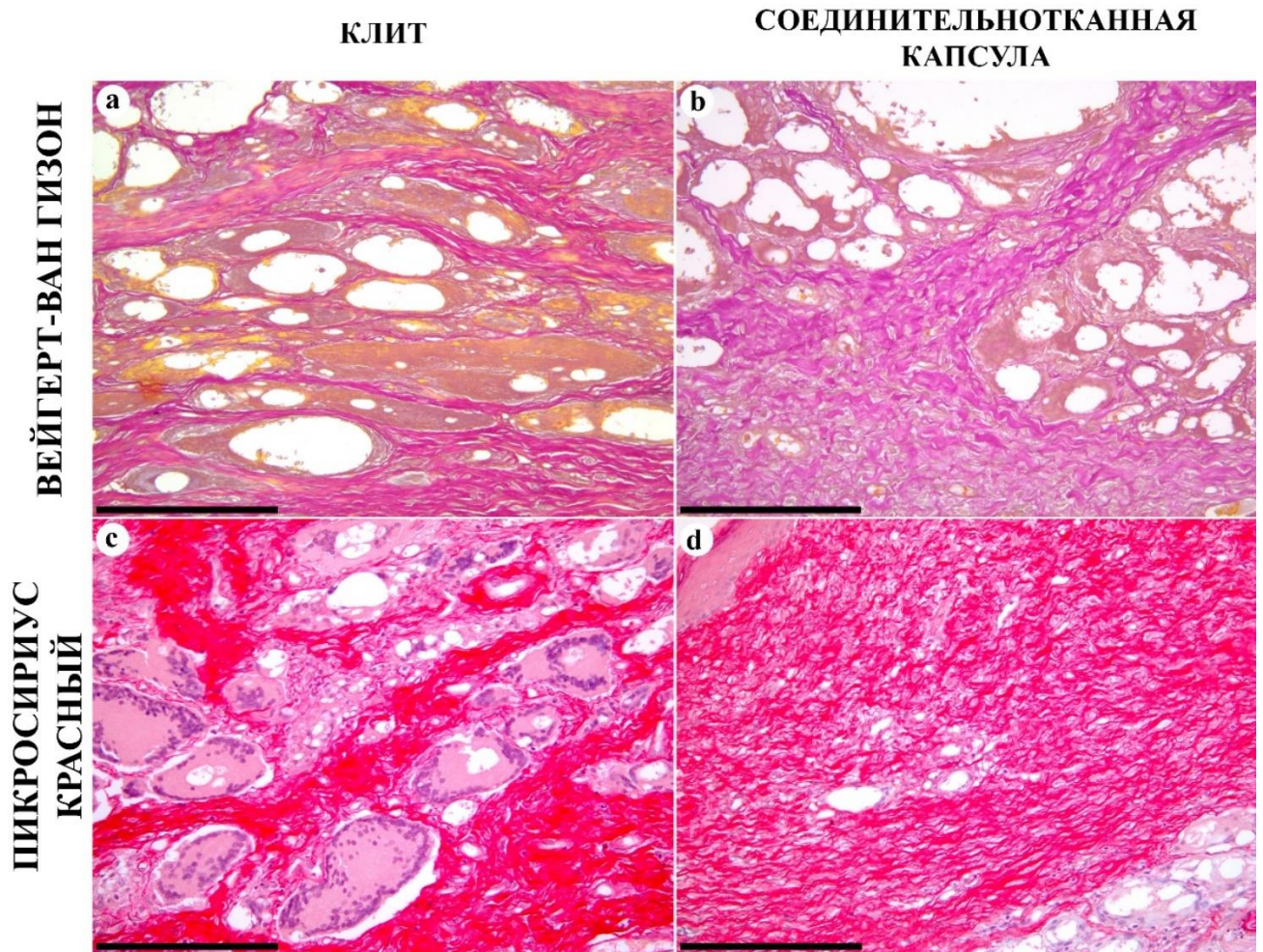


Рисунок 15 – Микрофотографии колокализованной с имплантатом ткани (КЛИТ) и соединительнотканной капсулы на ПОД60, увеличение  $\times 200$ , масштабный отрезок – 200 мкм. ГМКИТ окрашиваются пикринофильно с помощью ВГ (а), в то время как окружающие их волокна коллагена окрашиваются в ярко-розовый цвет (b). При окраске ПСК внутри ГМКИТ четко визуализируется подковообразная ориентация ядер (с), в то время как окружающая их соединительнотканная капсула становится ярко-красной (d)

Во всех экспериментальных группах гранулы имплантатов были окружены ГМКИТ и фиброзированной грануляционной тканью или плотной соединительной

тканью. Эту колокализованную с имплантатом ткань (КЛИТ) легко идентифицировали при световой микроскопии на срезах, окрашенных с помощью ВГ по пикринофильному цвету (от желтого до оранжевого), и на образцах, окрашенных ПСК (бледно-красный цвет). В ходе исследования выявили, что КЛИТ окружала соединительнотканная периимплантная капсула, которая сливалась с сетчатым слоем дермы с одной стороны и граничила с надхрящницей с другой стороны (Рисунок 15).

В группе ПЛА<sup>0</sup> на ПОД30 фрагменты имплантата были окружены плотной фиброзной соединительнотканной капсулой с параллельно уложенными пучками коллагеновых волокон. Капсула имела толщину около 200–400 мкм, была умеренно фуксинофильной при окрашивании ВГ и имела ярко-красный цвет при окраске срезов ПСК (Рисунок 16). Она также давала сильное двойное лучепреломление в образцах, окрашенных ПСК, в поляризованном свете. Во внешней части капсулы находились многочисленные артерии малого и среднего калибра. Материал имплантата был окружен ГМКИТ (Рисунок 17). Пространства между ГМКИТ были обильно инфильтрированы лимфоцитами и макрофагами, а также содержали незначительное количество фибробластов. Все эти клетки в дальнейшем упоминаются как клетки, не относящиеся к ГМКИТ (Таблица 8). Вместе с кровеносными сосудами эти клеточные компоненты образовывали незрелую соединительную ткань. В отличие от периимплантной капсулы, КЛИТ окрашивался пикринофильно с помощью ВГ, в бледно-красный цвет с помощью ПСК и не давал двойное лучепреломление в окрашенных ПСК образцах в поляризованном свете. Фрагменты имплантата, видимые в образцах этой группы на ПОД30, в основном были небольшими, размером ~30–50 мкм.

На ПОД60 в группе ПЛА<sup>0</sup> граница между периимплантной капсулой и окружающей дермой была слабо идентифицируемой (Рисунок 18). Толщина капсулы составила ~200 мкм. Она была более фуксинофильна (в окрашенных ВГ образцах) по сравнению с ПОД30, окрашивалась в ярко-красный цвет ПСК и давала сильное двойное лучепреломление в желтом и красном спектре (поляризационная

микроскопия). В капсуле обнаруживали фибробласты и артерии малого и среднего калибра (Рисунок 19).

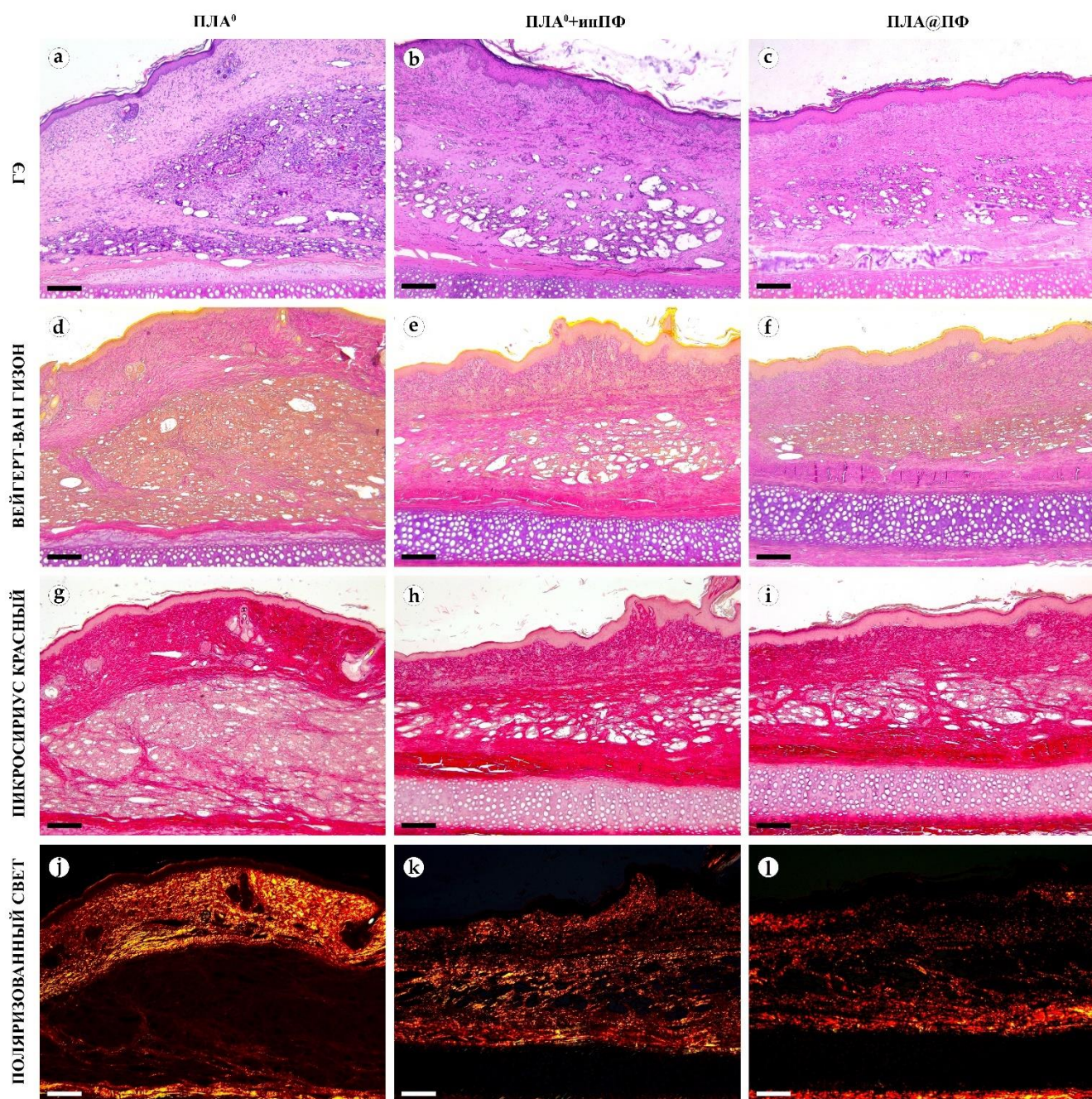


Рисунок 16 – Микрофотографии тканей участков имплантаций на ушах кроликов на ПОД30, обзор структуры при малом увеличении: окрашивание ГЭ (a – c), ВГ (d – f) и ПСК (g – i), увеличение x50, масштабный отрезок – 200 мкм, стандартная оптическая микроскопия (a – i) и поляризационная микроскопия (j – l). Изображения образцов, окрашенных ПСК, полученные с помощью микроскопии в светлом поле и в поляризованном свете, совпадают по местоположению. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

Очагов инфильтрации иммунными клетками или признаков нарушения микроциркуляции не наблюдалось. КЛИТ была разделена незрелыми прослойками соединительной ткани, ориентированными параллельно эпителию. Они были бледно-красными при окрашивании ВГ, ярко-красными при окрашивании ПСК и не давали двойного лучепреломления при окрашивании ПСК при исследовании в поляризованном свете. Размер частиц имплантата был в основном небольшим (<50 мкм), но несколько крупных (~100 мкм) агрегатов частиц определялись в более глубоких участках ткани.

В группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ на ПОД30 периимплантная капсула имела умеренную плотность, содержала полиморфные фибробласты и иммунные клетки (в основном лимфоциты). Общая толщина капсулы варьировала от 200 до 400 мкм. Ткань капсулы представляла собой не единый слой, а образовывала множественные разнонаправленные соединительнотканые прослойки вокруг материала имплантата. Васкуляризация капсулы была умеренной. КЛИТ содержала в основном ГМКИТ и небольшое количество фибробластов и окрашивалась аналогично КЛИТ в группе ПЛА<sup>0</sup>. В нескольких случаях в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ соединительная ткань капсулы прорастала в зону КЛИТ, разделяя ее на фрагменты. Эти врастания прослоек капсулы были фуксинофильными (ВГ), ярко-красными (ПСК) и анизотропными (ПСК в поляризованном свете). Фрагменты имплантата в этой группе были преимущественно крупными ( $\geq 100$  мкм).

На ПОД60 в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ фиброзная периимплантная капсула имела тинкториальное сходство с окружающей дермой. Она плотно сливалась с дермой, как в группе ПЛА<sup>0</sup> на ПОД60 и состояла из толстых пучков коллагеновых волокон, ориентированных параллельно эпидермису и разделяющих КЛИТ на поверхностные и глубокие участки. Эти участки были образованы небольшими (<50 мкм) фрагментами материала имплантата, которые были окружены сливающимися ГМКИТ. Фибробласты, артерии среднего калибра и небольшое количество иммунных клеток также входили в состав КЛИТ. Компоненты ПИК окрашивались так же, как и на ПОД30, но объем комплекса визуально уменьшился.

Таблица 8 – Количество не являющихся ГМКИТ клеток в периимплантных капсулах

Временные точки	Группа	Количество клеток		
		Среднее±SD	ДИ95%	
			Нижняя граница	Верхняя граница
ПОД30	ПЛА <sup>0</sup>	5866±1268	4535	7197
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	6622±3698	2740	10503
	ПЛА@ПФ	5611±1669	3859	7362
ПОД60	ПЛА <sup>0</sup>	3811±984	2777	4844
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	3700±1261	2376	5023
	ПЛА@ПФ	4977±1576	3323	6632

В группе ПЛА@ПФ на ПОД30 ПИК включал в себя тонкую (~100 мкм) и плотную периимплантную капсулу с параллельно ориентированными коллагеновыми волокнами и веретеновидными фибробластами с яркой эозинофильной цитоплазмой. Капсула отделяла материал имплантата и КЛИТ, содержащую ГМКИТ, от интактной кожи. При окрашивании методом ВГ капсула была несколько более фуксинофильной, чем в других группах на ПОД30. Она также окрашивалась в более ярко-красный цвет ПСК и давала сильное двойное лучепреломление (ПСК в поляризованном свете). Периимплантная ткань была богато васкуляризирована артериями малого и среднего калибра. КЛИТ содержала ГМКИТ и редкие очаги инфильтрации иммунными клетками: лимфоцитами и макрофагами. КЛИТ была пикринофильной (при окрашивании ВГ), бледно-красной при окрашивании ПСК и изотропной при микроскопии в поляризованном свете. Окружающая ГМКИТ соединительная ткань была рыхлой, состояла из тонких пучков коллагена и фибробластов. Признаков значительного врастания соединительной ткани со стороны периимплантной капсулы в области КЛИТ не наблюдали. Фрагменты материала имплантата, окруженные ГМКИТ и грануляционной тканью в этой группе, были меньше, чем фрагменты имплантата, разделенные прослойками соединительной ткани в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ. Размер частиц имплантата не варьировал значительно, большинство из них имели диаметр 50–80 мкм.

На ПОД60 в группе ПЛА@ПФ имплантат был окружен сетью пучков коллагеновых волокон, характерных для сетчатой дермы ушной раковины кролика. В периимплантной ткани отмечались незначительные признаки фибротической трансформации, прослойки соединительной ткани между ГМКИТ не определялись. На границе капсулы и дермы видны артерии среднего калибра, признаков микроциркуляторных нарушений не было. Материал имплантата ПЛА@ПФ был окружен компактно расположенными ГМКИТ, фибробластами и множественными лимфоцитами. Фрагменты имплантата были в основном небольшими, но присутствовали редкие крупные агрегаты ( $\geq 100$  мкм). Тинкториальные свойства компонентов ПИК были аналогичны тем, которые наблюдали в этой группе на ПОД30.

В то же время внутренняя организация ПИК и гистоморфологические признаки РИТ и ПИФ в исследуемых группах заметно различались.

Толщина ПИК в экспериментальных группах была выше, чем в интактной дерме (которая имела среднюю толщину  $302 \pm 15$  мкм) на протяжении всего периода эксперимента (Таблица 9). На ПОД30 не было статистически значимых различий между исследуемыми группами по толщине ПИК ( $p = 0,180$ ). Интересно, что от ПОД30 до ПОД60 толщина ПИК статистически значимо уменьшалась только в группах ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ ( $p = 0,016$  и  $p = 0,004$ , соответственно). Напротив, в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ толщина ПИК не изменилась в течение периода исследования ( $p = 0,748$ ). На ПОД60 толщина ПИК в группе ПЛА@ПФ была статистически значимо ниже, чем в ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p < 0,001$  в обоих случаях). В то же время статистически значимого различия в толщине ПИК между группами ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ не было ( $p = 1,000$ ). ПИК в группе ПЛА@ПФ в конце экспериментального периода (ПОД60) был менее чем в два раза толще, чем неповрежденная дерма; разница все еще была статистически значимой ( $p = 0,018$ ). В контрольных группах на ПОД60 ПИК был в 4–5 раз толще интактной дермы.

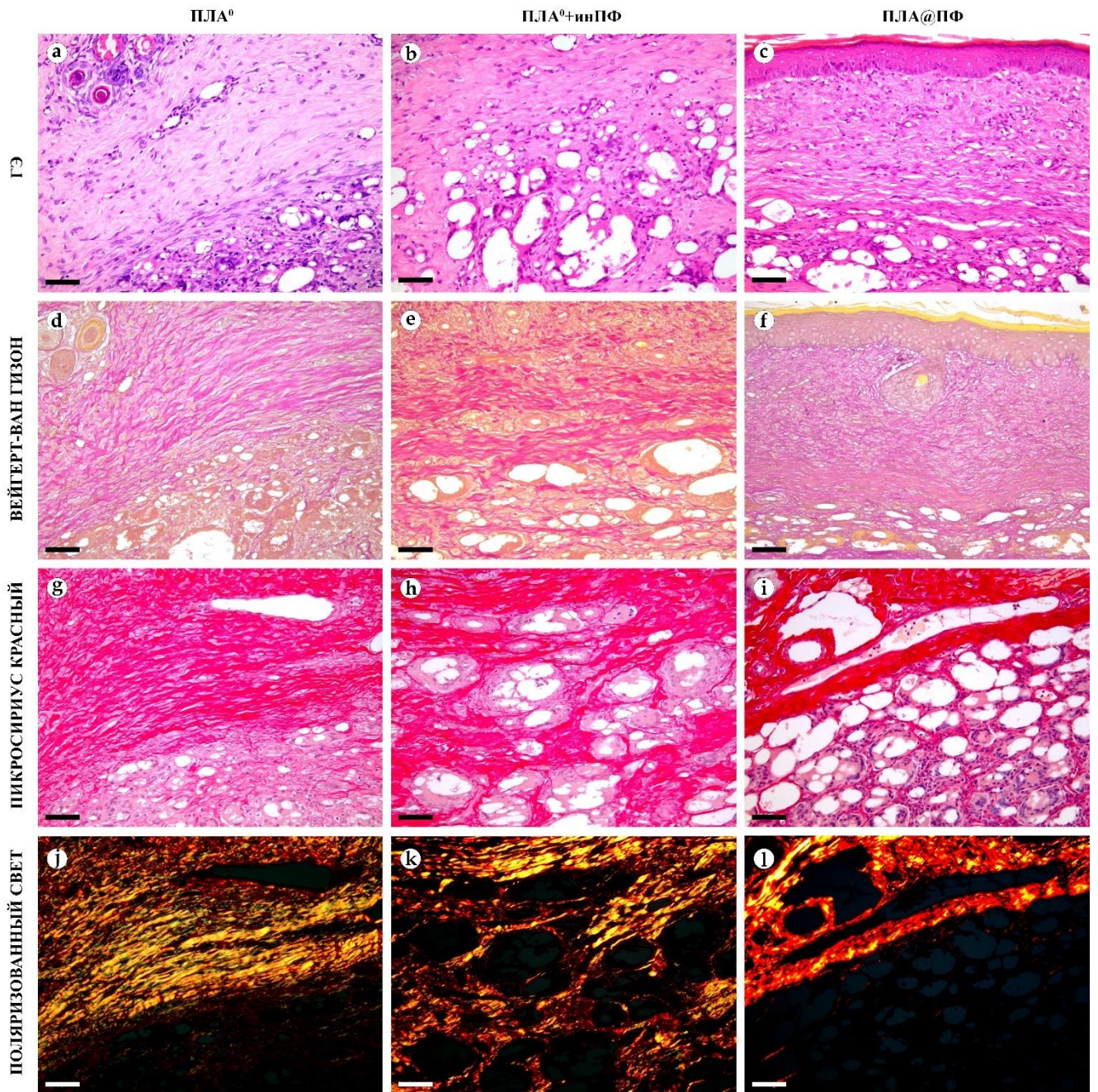


Рисунок 17 – Микрофотографии тканей участков имплантаций на ушах кроликов на ПОД30, обзор структуры при большом увеличении: окрашивание ГЭ (a – c), ВГ (d – f) и ПСК (g – l), увеличение x200, масштабный отрезок – 50 мкм, стандартная оптическая микроскопия (a – i) и поляризационная микроскопия (j – l). Изображения образцов, окрашенных ПСК, полученные с помощью микроскопии в светлом поле и поляризованном свете, совпадают по местоположению. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

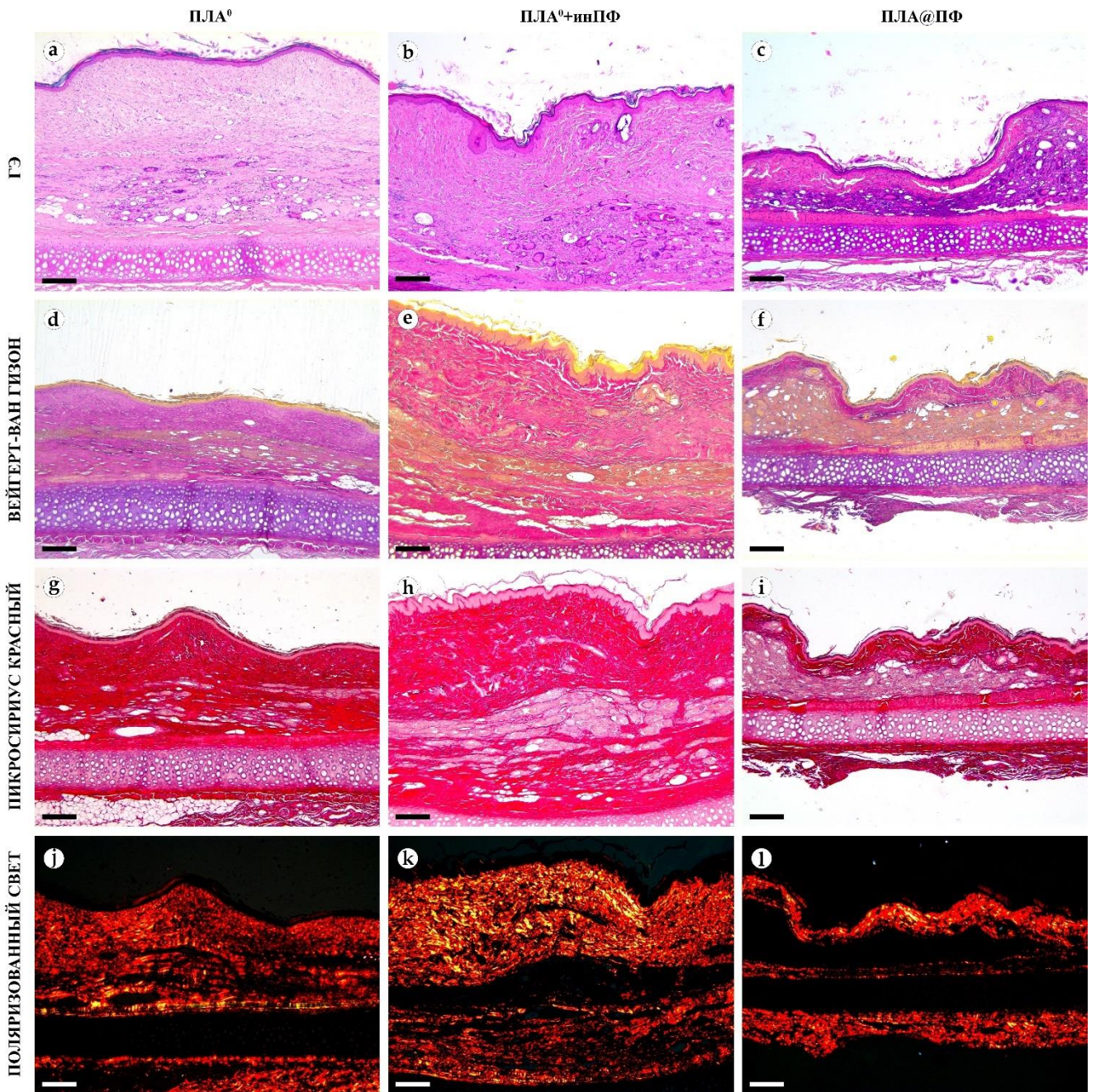


Рисунок 18 – Микрофотографии тканей участков имплантаций на ушах кроликов на ПОД60, обзор структуры при малом увеличении: окрашивание ГЭ (а – с), ВГ (d – f) и ПСК (g – l), увеличение x50, масштабный отрезок – 200 мкм, стандартная оптическая микроскопия (а – i) и поляризационная микроскопия (j – l). Изображения образцов, окрашенных ПСК, полученные с помощью микроскопии в светлом поле и в поляризованном свете, совпадают по местоположению. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

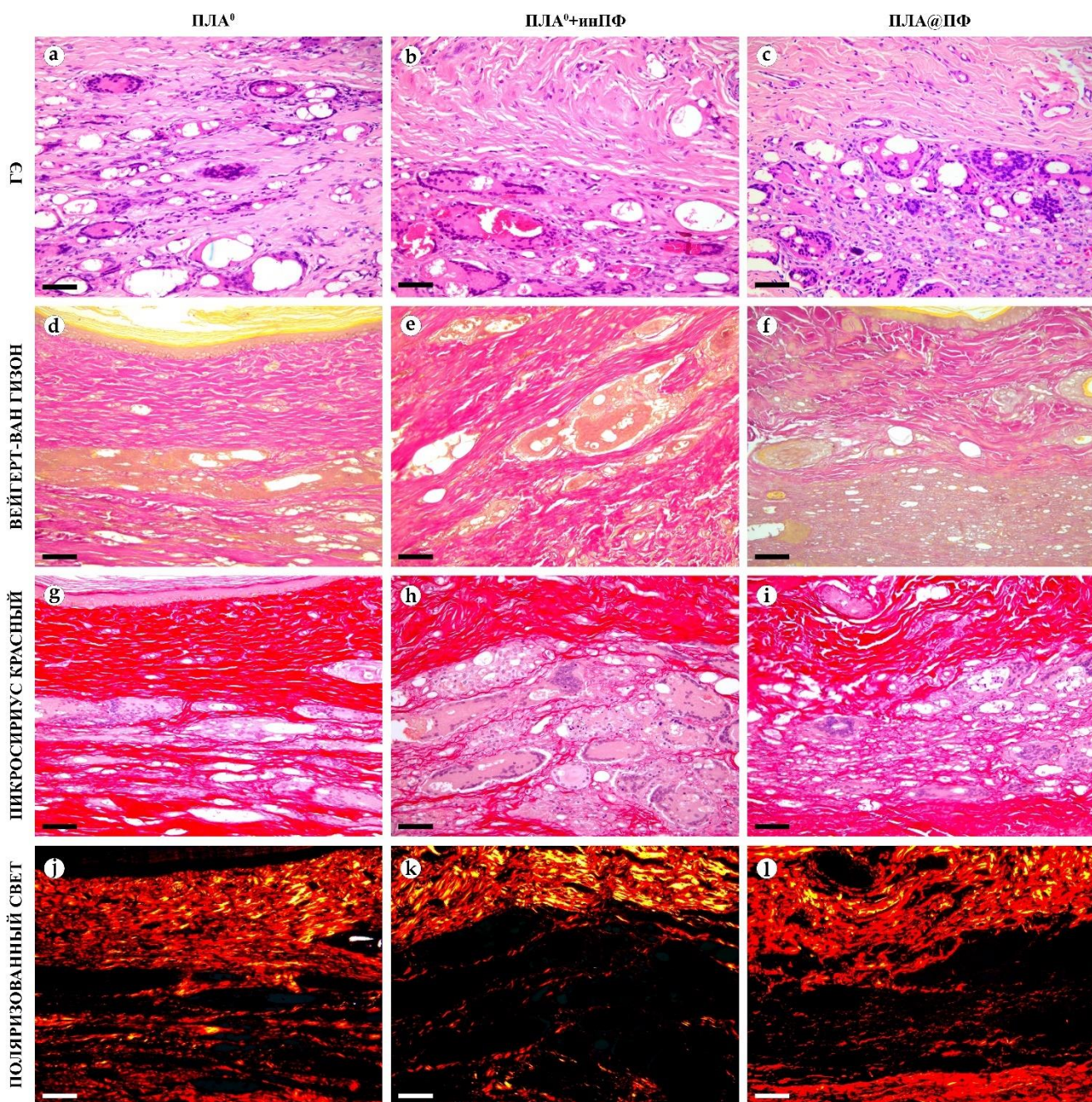


Рисунок 19 – Микрофотографии тканей участков имплантаций на ушах кроликов на ПОД60, обзор структуры при большом увеличении: окрашивание ГЭ (a – c), ВГ (d – f) и ПСК (g – l), увеличение x200, масштабный отрезок – 50 мкм, стандартная оптическая микроскопия (a – i) и поляризационная микроскопия (j – l). Изображения образцов, окрашенных ПСК, полученные с помощью микроскопии в светлом поле и в поляризованном свете, совпадают по местоположению. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

Относительная площадь материала имплантата на гистологических срезах (Таблица 10) статистически не различалась между исследуемыми группами на ПОД30 ( $p = 0,663$ ).

Таблица 9 – Толщина интактной кожи и ПИК

Временные точки	Толщина, мкм			
	Интактная дерма	ПИК		
		ПЛА <sup>0</sup>	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	ПЛА@ПФ
ПОД30	302±15	1580±348	1229±402	1249±283
ПОД60		1444±140	1212±163	532±98

Кроме того, не было статистически значимого изменения относительной площади имплантата в группе ПЛА<sup>0</sup> между ПОД30 и ПОД60 ( $p = 0,089$ ). Напротив, в группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ на ПОД60 количество материала имплантата уменьшилось по сравнению с предыдущей временной точкой ( $p = 0,015$  и  $p = 0,001$ , соответственно).

Наиболее выраженную биodeградацию (при измерении на ПОД60) наблюдали в группе ПЛА@ПФ, где относительная площадь имплантата составляла всего  $14,5 \pm 3,8\%$  от его исходного размера, в то время как в ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ она составляла  $64,4 \pm 33,2\%$  и  $33,8 \pm 14,9\%$  соответственно (Рисунок 20).

Таблица 10 – Динамические изменения относительных площадей скаффолдов

Временные точки	Группа	Относительная площадь, %		
		Среднее±SD	ДИ95%	
			Нижняя граница	Верхняя граница
ПОД30	ПЛА <sup>0</sup>	104.3±40.8	62.0	147.5
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	92.2±46.8	43.1	141.4
	ПЛА@ПФ	116.7±.3	63.9	169.5
ПОД60	ПЛА <sup>0</sup>	64.4±32.2	29.6	99.2
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	33.8±14.9	18.2	49.4
	ПЛА@ПФ	14.5±3.8	10.5	18.5

Различия были статистически значимыми между группами ПЛА@ПФ и ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,004$ ) и между группами ПЛА@ПФ и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,012$ ), но не между группами ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,066$ ). Применение ПФ либо в качестве инъекции, либо в качестве компонента имплантата привело к статистически

значимому уменьшению относительной площади имплантата, измеренной на ПОД60, по сравнению с группой ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,005$ ).

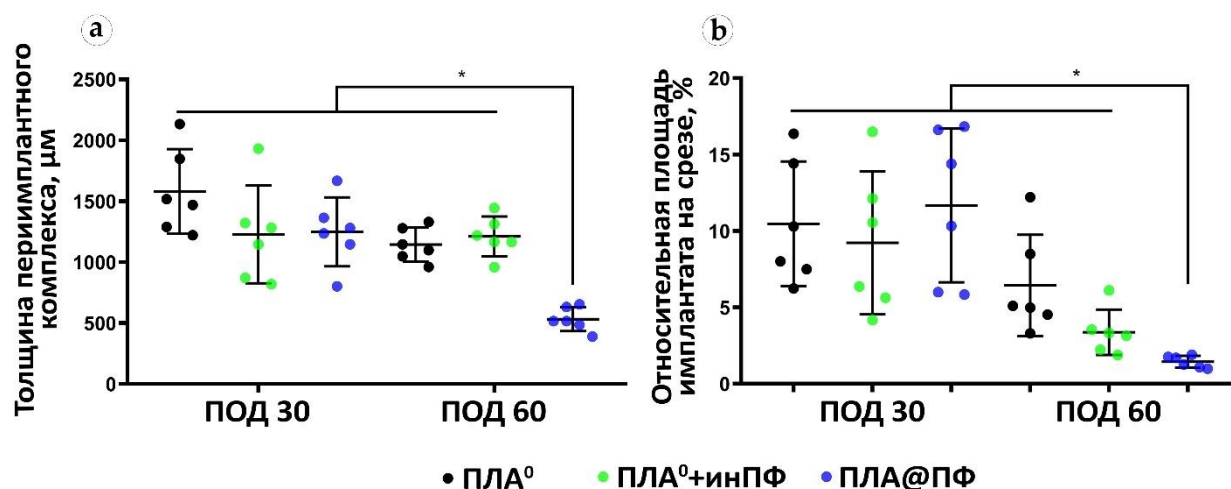


Рисунок 20 – Морфометрическая оценка структуры ПИК: (а) общая толщина ПИК, мкм. (б) Относительная площадь сечения остаточного материала имплантата на гистологических препаратах, %. Статистическая значимость: \* -  $p \leq 0,05$ . Средние значения  $\pm$  SD

Экспрессию  $\alpha$ -SMA в ПИК обнаружили во всех группах во всех временных точках эксперимента, но преимущественно в активированных фибробластах (миофибробластах) и в стенках кровеносных сосудов (Таблица 11).

Таблица 11 – Количество  $\alpha$ -SMA положительных сосудов в  $1\text{мм}^2$  периимплантной капсулы

Временные точки	Группа	Количество клеток		
		Среднее $\pm$ SD	ДИ95%	
			Нижняя граница	Верхняя граница
ПОД30	ПЛА <sup>0</sup>	86.7 $\pm$ 20.3	65.3	108.0
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	91.0 $\pm$ 43.2	45.7	136.3
	ПЛА@ПФ	95.0 $\pm$ 50.8	41.7	148.3
ПОД60	ПЛА <sup>0</sup>	39.7 $\pm$ 11.9	27.2	52.1
	ПЛА <sup>0</sup> +инПФ	75.0 $\pm$ 29.5	44.0	106.0
	ПЛА@ПФ	78.3 $\pm$ 44.9	31.2	125.5

На ПОД30 толстый слой  $\alpha$ -SMA-положительных, параллельно ориентированных миофибробластов выстилал внутреннюю часть периимплантной капсулы в группе ПЛА<sup>0</sup> (Рисунок 21). Этот слой практически отсутствовал в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ. Вместо этого вокруг зоны КЛИТ обнаружили рассеянные очаги  $\alpha$ -SMA-положительных фибробластов. В группе ПЛА@ПФ экспрессия  $\alpha$ -SMA была еще слабее в фибробластах капсулы, но сильной в кровеносных сосудах. Однако периимплантная капсула в этой группе имела заметно большую пространственную плотность кровеносных сосудов, положительных по  $\alpha$ -SMA.

На ПОД60 экспрессия  $\alpha$ -SMA во всех исследуемых группах была ограничена в основном сосудистыми структурами, тогда как в фибробластах периимплантной ткани она практически отсутствовала.

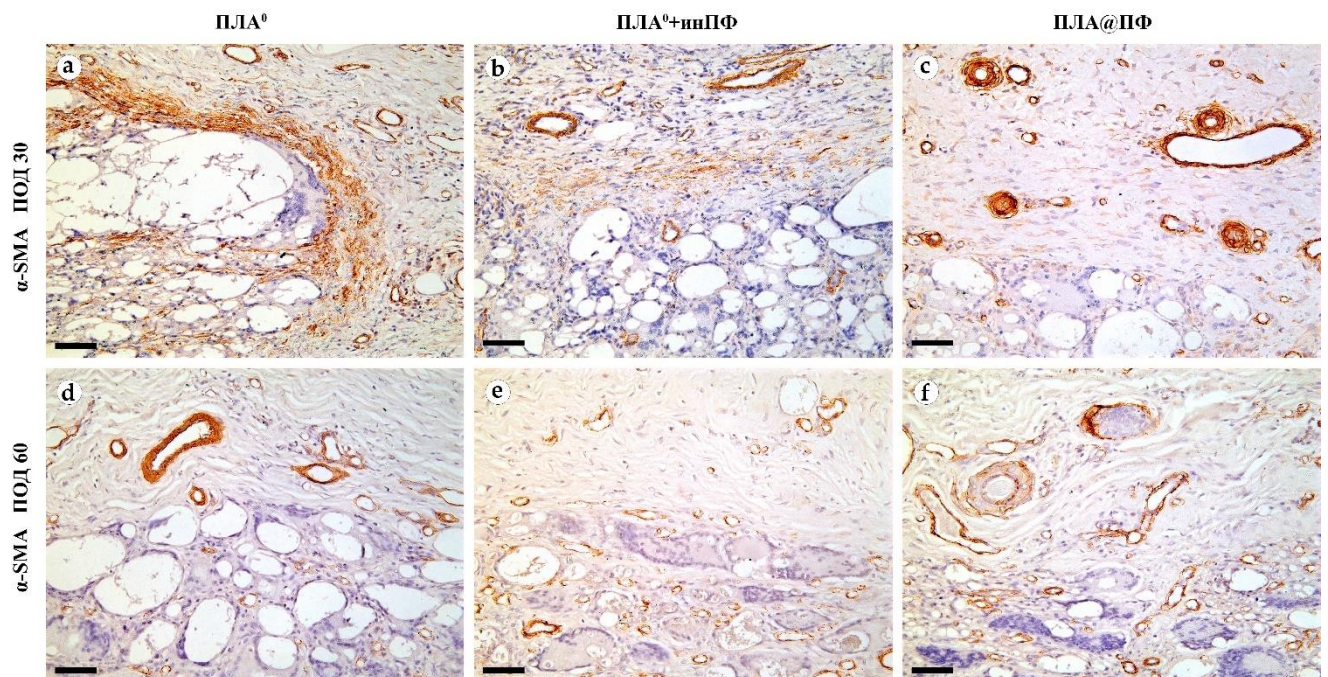


Рисунок 21 –  $\alpha$ -SMA в ПИК на ушах кроликов на ПОД30 (a – c) и ПОД60 (d – f). Увеличение  $\times 200$ , масштабный отрезок – 50 мкм, антитела к  $\alpha$ -SMA, иммунопероксидазная реакция. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

Количество  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в периимплантных капсулах не различалось между исследуемыми группами на ПОД30 и ПОД60, тогда как в группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ наблюдали тенденцию к увеличению этого

параметра по сравнению с ПЛА<sup>0</sup>. В группе ПЛА<sup>0</sup> количество  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в периимплантных капсулах статистически значительно снизилось с ПОД30 на ПОД60, но в других группах такое снижение не отметили.

Статистически значимое снижение экспрессии  $\alpha$ -SMA между ПОД30 и ПОД60 наблюдали только в группе ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,003$ ), тогда как в группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ интенсивность экспрессии этого маркера статистически не изменялась после ПОД30 ( $p = 0,465$  и  $p = 0,093$  соответственно). Применение ПФ привело к значительному снижению экспрессии  $\alpha$ -SMA в фибробластах в группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ на ПОД30. Однако на ПОД60 не было статистически значимой разницы в интенсивности экспрессии  $\alpha$ -SMA между исследуемыми группами (Рисунок 22).

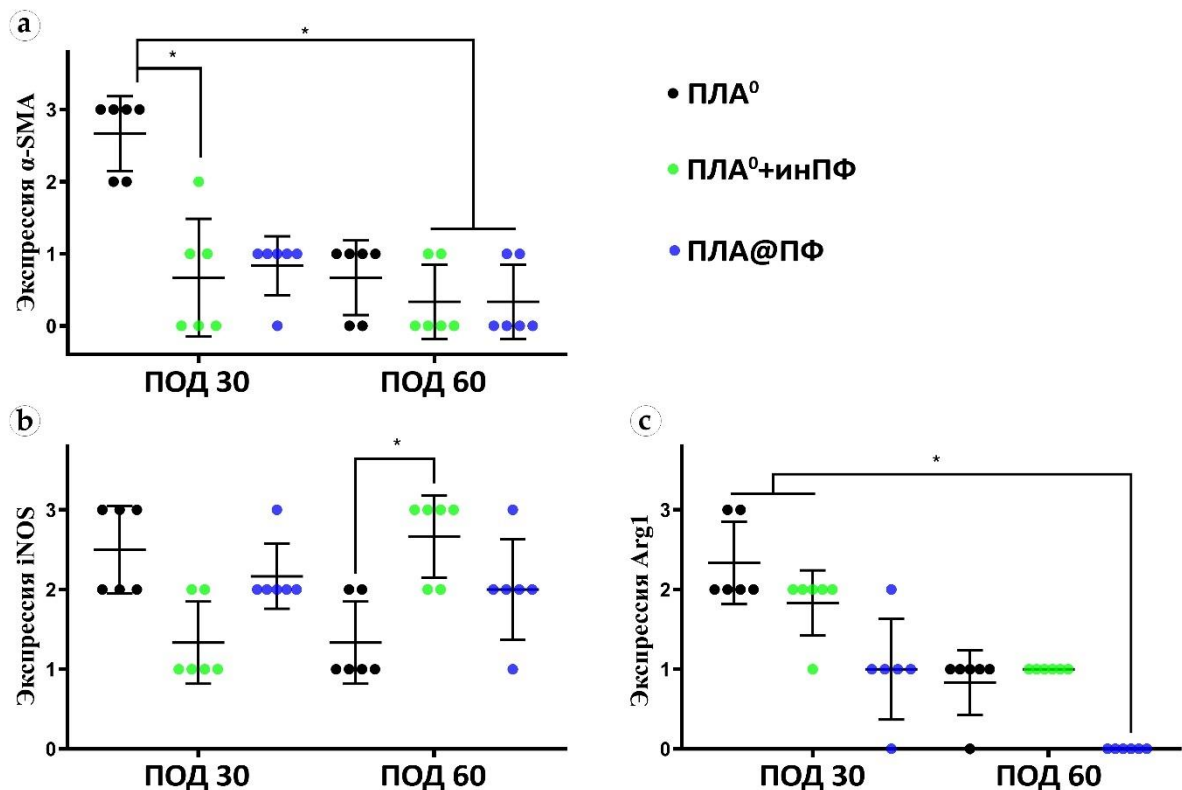


Рисунок 22 – Полуколичественный анализ экспрессии иммуногистохимических маркеров в ПИК, исследуемых по интенсивности окрашивания: (a)  $\alpha$ -SMA, (b) iNOS и (c) Arg1. Статистическая значимость: \* -  $p \leq 0,05$ . Средние значения  $\pm$  SD

Иммуногистохимическую экспрессию iNOS (Рисунок 23) обнаружили во всех группах на обеих временных точках. Положительное окрашивание на этот маркер определяли в основном в КЛИТ и, в гораздо меньшей степени, в капсуле вокруг имплантата. В частности, большинство ГМКИТ были сильно положительны на iNOS на ПОД30. Однако часть ГМКИТ окрашивалась отрицательно на iNOS.

От ПОД30 до ПОД60 экспрессия iNOS снизилась в группе ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,011$ ), увеличилась в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,007$ ) и не изменилась в группе ПЛА@ПФ ( $p = 0,598$ ).

Между исследуемыми группами наблюдали статистически значимые различия в экспрессии iNOS. На ПОД30 экспрессия iNOS в группе ПЛА<sup>0</sup> была выше ( $p = 0,011$ ), а на ПОД60 - ниже ( $p = 0,007$ ), чем в группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ. Интересно, что не было статистически значимой разницы между экспрессией iNOS между группами ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ в оба момента времени ( $p = 0,241$  для ПОД30 и  $p = 0,075$  для ПОД60). На ПОД30 экспрессия этого маркера также увеличивалась в группе ПЛА@ПФ по сравнению с группой ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,018$ ), но не отличалась от нее в группе ПОД60 ( $p = 0,075$ ).

Экспрессия аргиназы-1 была даже более специфической для КЛИТ и исключительно локализовалась в макрофагах и ГМКИТ. На ПОД30 большинство ГМКИТ в группе ПЛА<sup>0</sup> были Arg1-положительными. Экспрессия Arg1 была слабее в группах, где применялся ПФ, особенно в группе ПЛА@ПФ. На ПОД60 единичные фокусы, содержащие Arg1-положительный ГМКИТ, наблюдали в группах ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ, тогда как в группе ПЛА@ПФ ПИК был полностью Arg1-отрицательным.

Результаты проведенного статистического анализа подтвердили, что экспрессия Arg1 значительно снизилась с ПОД30 до ПОД60 во всех исследуемых группах ( $p = 0,002$  для ПЛА<sup>0</sup>,  $p = 0,005$  для ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и  $p = 0,006$  для ПЛА@ПФ). Уровни Arg1 статистически не различались между группами ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ на ПОД30 ( $p = 0,092$ ) и ПОД60 ( $p = 0,317$ ). В то же время экспрессия этого маркера была снижена в обеих исследуемых временных точках в группе ПЛА@ПФ по

сравнению с ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,007$  для ПОД30 и  $p = 0,005$  для ПОД60) и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,026$  для ПОД30 и  $p = 0,001$  для ПОД60).

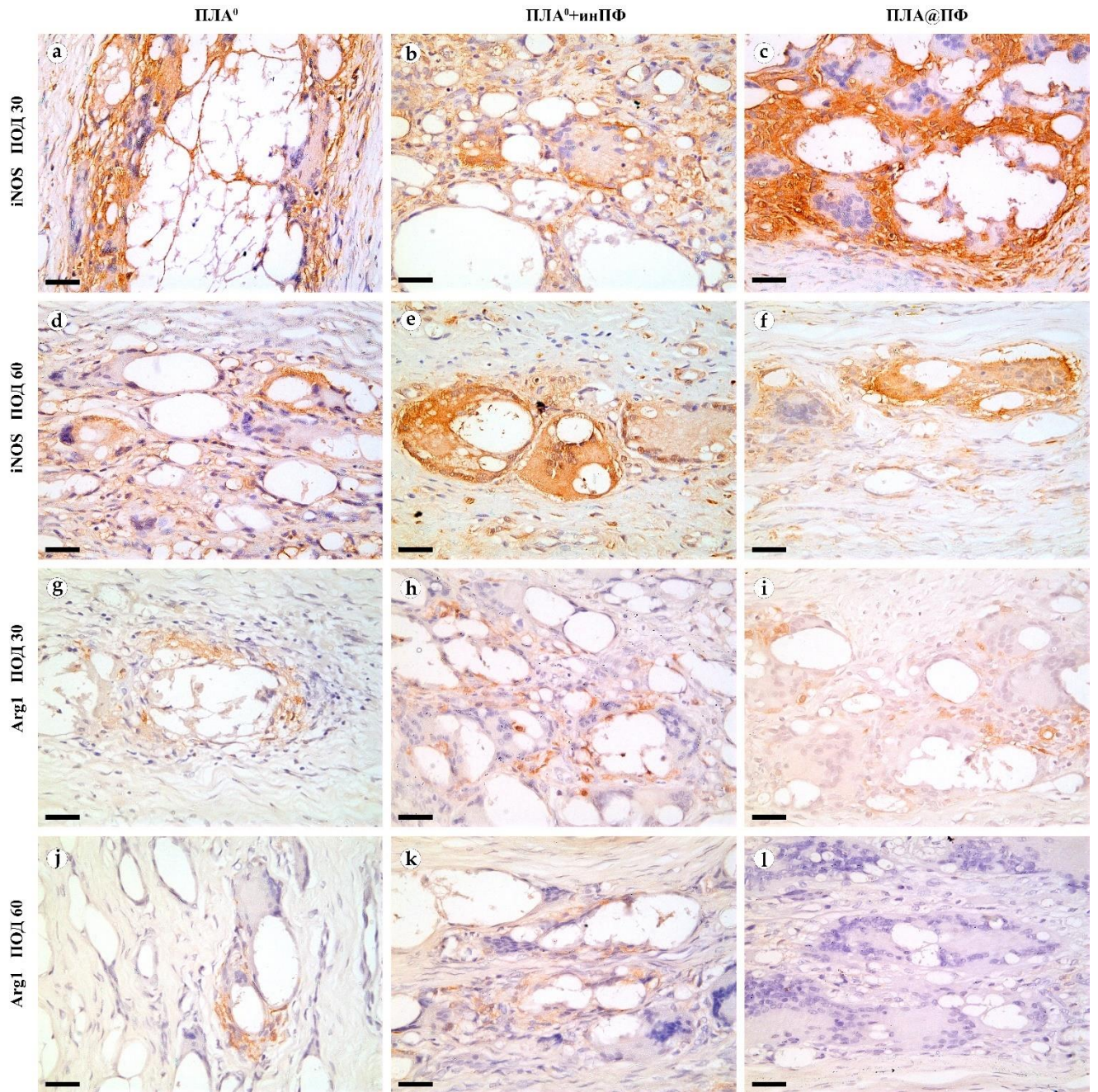


Рисунок 23 – iNOS (a – f) и Arg1 (g – l) в ПИК на ушах кроликов на ПОД30 (a – c и g – i) и ПОД60 (d – f и j – l). Увеличение  $\times 400$ , масштабный отрезок – 25 мкм, антитела к iNOS и Arg1, иммунопероксидазная реакция. Столбцы отображают исследуемые группы (имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ)

#### 4.4 Генетический анализ

По данным генетического анализа, среднее количество мРНК коллагена типа I в образцах участков имплантаций составляло от 9,6 до 14,4 условных единиц ( $\Delta\Delta Ct$  / мРНК). Статистически достоверную разницу обнаружили только между группой ПЛА<sup>0</sup> на ПОД30 и группой ПЛА@ПФ на 60е сутки. Интересно, что был отмечен тренд на границе статистической достоверности ( $p = 0,056$ ) в группе ПЛА@ПФ между ПОД30 и ПОД60 (Рисунок 24).

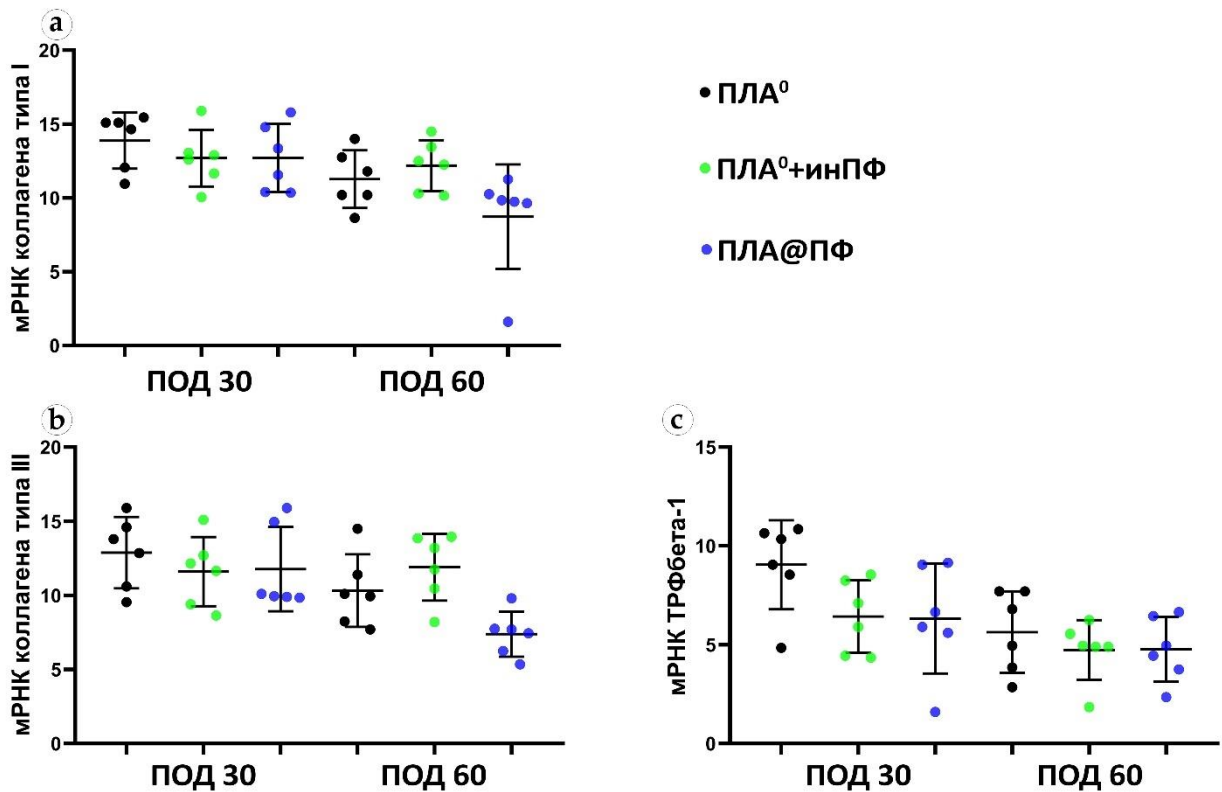


Рисунок 24 – Экспрессия мРНК коллагенов типов I и III и трансформирующего ростового фактора бета-1, ПЦР, условные единицы ( $\Delta\Delta Ct$  / мРНК). Средние значения  $\pm$  SD

При исследовании содержания мРНК коллагена типа III в периимплантных тканях, отмечался большой разброс средних значений, находившихся в промежутке от 7,9 до 13,2 условных единиц. Статистически достоверная разница

определялась между группой ПЛА@ПФ на ПОД60 и всеми группами на ПОД30, а также группой ПЛА<sup>0</sup>+инПФ на ПОД60 ( $p < 0,05$ ). Общее снижение количества мРНК коллагенов типов I и III в группе ПЛА@ПФ на ПОД60 указывает на замедление процесса ремоделирования внеклеточного матрикса, лежащего в основе тканевых изменений при фиброзе.

Уровни мРНК ТРФбета-1 были значительно ниже, чем у мРНК коллагенов типов I и III и составляли в среднем 5,8 условных единиц. Уровень мРНК ТРФбета-1 в группе ПЛА на ПОД30 был достоверно выше, чем в группах с инъекциями и локальной доставкой пирфенидона на ПОД60 ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Термический анализ

В результате проведенного анализа выявили, что термограммы ДСК денатурации коллагена для образцов интактной кожи содержали ярко выраженный пик с максимумом на  $\sim 64^\circ\text{C}$  с прилегающим низкотемпературным плечом с пиком  $\sim 59^\circ\text{C}$  и высокотемпературным широким и гладким пиком (Рисунок 25). Для полноразмерных экспериментальных образцов термограммы денатурации коллагена находились в более широких пределах, а низкотемпературное плечо трансформировалось в четкий пик с максимумом  $\sim 59^\circ\text{C}$ .

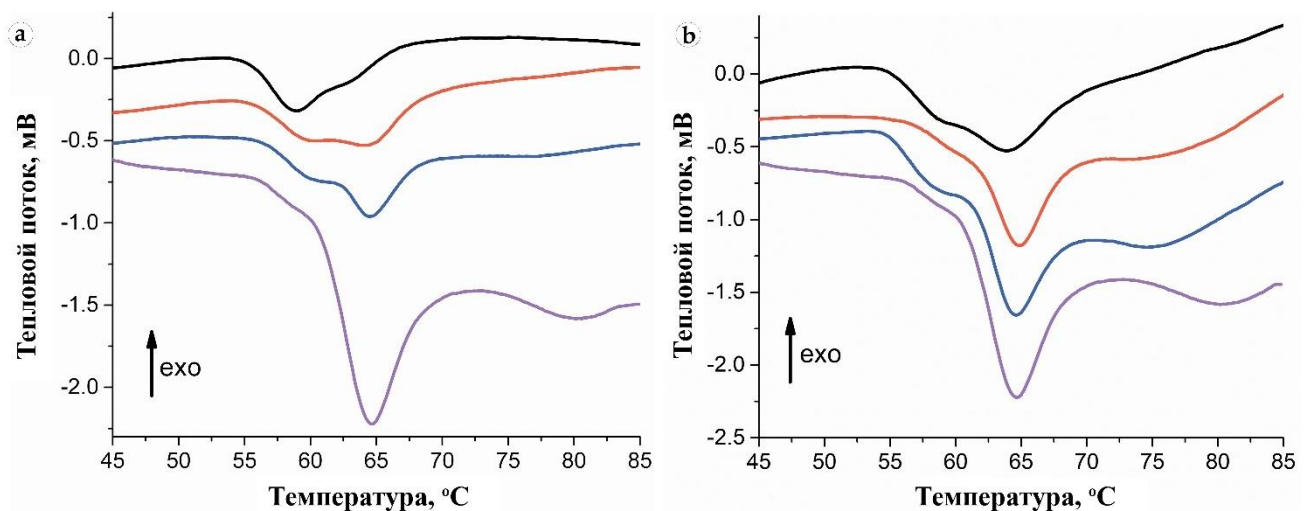


Рисунок 25 – Термограммы тканей вокруг имплантатов ПЛА<sup>0</sup> (черная), ПЛА<sup>0</sup>+инПФ (красная) и ПЛА@ПФ (синяя) на ПОД30 (а) и ПОД60 (б). Термограмма интактной ткани дермы уха (фиолетовая)

Термография сепарированных тканей ПИК методом ДСК позволила выявить ярко выраженный низкотемпературный пик, при этом субэпидермальные области не отличались от интактных образцов.

На ПОД30 термограммы образцов всех исследуемых групп состояли из низкотемпературного пика на 40–60% с максимумом  $\sim 59^{\circ}\text{C}$  (Таблица 12). Более того, по соотношению низкотемпературных пиков, в группе имплантатов ПЛА<sup>0</sup> более половины коллагена денатурировало при температуре  $< 60^{\circ}\text{C}$ . Доли низкотемпературных пиков в группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ также достоверно отличались от пиков интактной дермы, но были выше, чем в группе ПЛА<sup>0</sup>.

Таблица 12 – Пики температурных переходов (Тп) и доли низкотемпературных пиков термограмм исследуемых тканей (статистическая значимость по сравнению с интактной тканью: \*  $p \leq 0,05$ )

Образцы	Толщина, мкм			
	Временные точки	Тп1, °С	Тп2, °С	Доля низкотемпературного пика, %
Интактная дерма	-	58.5±1.0	65.6±0.9	15±5.0
ПЛА <sup>0</sup>	ПОД30	57.8±1.0	64.7±1.0	60.0±10.0*
ПЛА <sup>0</sup> +инПФ		58.4±0.8	65.1±1.0	48.0 ±15.0*
ПЛА@ПФ		58.4±1.0	64.9±0.6	40.0±6.0*
ПЛА <sup>0</sup>	ПОД60	58.5±0.7	65.2±0.5	24.0±11.0
ПЛА <sup>0</sup> +инПФ		58.3±1.0	65.5±0.6	23.0±10.0
ПЛА@ПФ		58.7±1.0	65.5±0.5	20.0±3.0

Термограммы образцов группы ПЛА<sup>0</sup> на ПОД60 имели заметный пик при температуре  $\sim 59^{\circ}\text{C}$  без деконволюции. В группах ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ этот пик имел вид низкотемпературного плеча, аналогичного таковому у неповрежденной кожи.

Статистически значимых различий между значениями пиков температурных переходов различных групп на обе исследуемые временные точки не выявили. Однако доли низкотемпературных пиков статистически значимо различались между группами на ПОД30. В частности, они были выше в группах ПЛА<sup>0</sup>,

ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ ( $p = 0,004$  для всех пар), чем в интактной дерме. Однако статистически значимой разницы между группами ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+инПФ ( $p = 0,106$ ) и группами ПЛА<sup>0</sup>+инПФ и ПЛА@ПФ ( $p = 0,0332$ ) не было. Важно отметить, что соотношение долей низкотемпературных пиков было значительно снижено в группе ПЛА@ПФ по сравнению с группой ПЛА<sup>0</sup> ( $p = 0,004$ ).

#### 4.6 Статистический анализ

В результате проведенного статистического анализа корреляций выявили некоторые интересные скрытые связи между изученными морфологическими признаками РИТ и ПИФ в разных группах.

Параметры, включенные в корреляционный анализ (Таблица 13), позволили оценить описанные статистически значимые корреляции. Результаты скорректированных по временным точкам корреляций и корреляционного анализа для всей выборки данных представлены далее.

В группе ПЛА<sup>0</sup> наблюдали сильные отрицательные статистически значимые корреляции между несколькими параметрами и временем после операции. К ним относились толщина ПИК ( $R_s = -0,724$ ,  $p = 0,008$ ), количество не относящихся к ГМКИТ клеток в капсуле вокруг имплантата ( $R_s = -0,724$ ,  $p = 0,008$ ), интенсивность  $\alpha$ -SMA ( $R_s = -0,869$ ,  $p < 0,001$ ), экспрессия iNOS ( $R_s = -0,772$ ,  $p = 0,003$ ) и Arg1 ( $R_s = -0,920$ ,  $p < 0,001$ ) и соотношение низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = -0,878$ ,  $p < 0,001$ ), что указывает на то, что эти параметры почти линейно снижаются между ПОД30 и ПОД60.

Относительная площадь имплантата положительно коррелировала с толщиной ПИК ( $R_s = 0,664$ ,  $p = 0,018$ ).

В свою очередь, толщина ПИК положительно коррелировала с количеством не-ГМКИТ-клеток в периимплантной капсуле ( $R_s = 0,790$ ,  $p = 0,002$ ), плотностью  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в периимплантной капсуле ( $R_s = 0,692$ ,  $p = 0,013$ ), экспрессией iNOS ( $R_s = 0,771$ ,  $p = 0,003$ ), уровнем Arg1 ( $R_s = 0,622$ ,

$p = 0,031$ ) и соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,580$ ,  $p = 0,048$ ).

Таблица 13 – Включенные в корреляционный анализ параметры

Параметр	Тип	Мера	Кодирование номинальных и порядковых параметров
Группа	Численный	Номинальный	0 – интактная кожа, 1 – ПЛА <sup>0</sup> , 2 – ПЛА <sup>0</sup> +инПФ, 3 – ПЛА@ПФ
Был применен ПФ?	Численный	Порядковый	0 – нет, 1 – да
Время после операции (ПОД)	Численный	Порядковый	1 – ПОД30, 2 – ПОД60
Относительная площадь скаффолда, %	Численный	Количественный	-
Толщина ПИК, мкм	Численный	Количественный	-
Количество не являющихся ГМКИТ клеток в перимплантной ткани, 1/мм <sup>2</sup>	Численный	Количественный	-
Интенсивность экспрессии $\alpha$ -SMA	Численный	Порядковый	Как в Таблице 4
Количество $\alpha$ -SMA положительных сосудов в перимплантной ткани, 1/мм <sup>2</sup>	Численный	Количественный	-
Интенсивность экспрессии iNOS	Численный	Порядковый	Как в Таблице 4
Интенсивность экспрессии Arg1	Численный	Порядковый	Как в Таблице 4
Доля низкотемпературного пика, %	Численный	Количественный	-
Тп1, °С	Численный	Количественный	-
Тп2, °С	Численный	Количественный	-

Количество не-ГМКИТ клеток в перимплантной капсуле положительно коррелировало с экспрессией  $\alpha$ -SMA ( $R_s = 0,655$ ,  $p = 0,021$ ), количеством  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в перимплантной капсуле ( $R_s = 0,685$ ,  $p =$

0,014), уровнем iNOS ( $R_s = 0,775$ ,  $p = 0,003$ ), экспрессией Arg1 ( $R_s = 0,644$ ,  $p = 0,024$ ) и соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,608$ ,  $p = 0,036$ ).

Интенсивность экспрессии  $\alpha$ -SMA положительно коррелировала с плотностью  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в периимплантной капсуле ( $R_s = 0,873$ ,  $p < 0,001$ ), экспрессией Arg1 ( $R_s = 0,856$ ,  $p < 0,001$ ) и отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,883$ ,  $p < 0,001$ ). Корреляция с экспрессией iNOS почти достигла принятого уровня статистической значимости ( $R_s = 0,570$ ,  $p = 0,053$ ).

Плотность  $\alpha$ -SMA-положительных кровеносных сосудов в периимплантной капсуле положительно коррелировала с экспрессией iNOS ( $R_s = 0,656$ ,  $p = 0,021$ ), Arg1 ( $R_s = 0,883$ ,  $p = 0,001$ ) и, примечательно, статистически значимо коррелировала с отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,919$ ,  $p < 0,001$ ).

Уровень iNOS положительно коррелировал с экспрессией Arg1 ( $R_s = 0,651$ ,  $p = 0,022$ ) и соотношением низкотемпературных пиков при в ДСК ( $R_s = 0,745$ ,  $p = 0,005$ ).

Экспрессия Arg1 положительно коррелировала с соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,853$ ,  $p < 0,001$ ).

В группе ПЛА<sup>0</sup>+инПФ обнаружили отрицательные статистически значимые корреляции между несколькими параметрами и временем после операции. К ним относились относительная площадь имплантата ( $R_s = -0,772$ ,  $p = 0,003$ ), экспрессия Arg1 ( $R_s = -0,845$ ,  $p = 0,001$ ) и соотношение низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = -0,792$ ,  $p = 0,002$ ), что связано со снижением этих параметров между ПОД30 и ПОД60. В отличие от группы ПЛА<sup>0</sup>, экспрессия iNOS сильно коррелировала со временем после операции ( $R_s = 0,816$ ,  $p = 0,001$ ). Кроме того, не было статистически значимых корреляций между временем после операции и толщиной ПИК, количеством не являющихся ГМКИТ клеток в периимплантной капсуле, интенсивностью  $\alpha$ -SMA и другими параметрами.

Относительная площадь имплантата отрицательно коррелировала с уровнем iNOS ( $R_s = -0,710$ ,  $p = 0,010$ ) и положительно – с Arg1 ( $R_s = 0,759$ ,  $p = 0,004$ ) и отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,746$ ,  $p = 0,005$ ).

В отличие от группы ПЛА<sup>0</sup>, экспрессия iNOS отрицательно коррелировала с Arg1 ( $R_s = -0,828$ ,  $p = 0,001$ ), а отрицательную корреляцию умеренной силы наблюдали с соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = -0,667$ ,  $p = 0,018$ ).

Экспрессия Arg1 положительно коррелировала с соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,803$ ,  $p = 0,002$ ).

В группе ПЛА@ПФ наблюдали сильные отрицательные статистически значимые корреляции между временем после операции и толщиной ПИК ( $R_s = -0,871$ ,  $p < 0,001$ ), относительной площадью имплантата ( $R_s = -0,869$ ,  $p < 0,001$ ), уровнем Arg1 ( $R_s = -0,826$ ,  $p = 0,001$ ) и отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = -0,878$ ,  $p < 0,001$ ). В отличие от группы ПЛА<sup>0</sup>, не было статистически значимой связи между временем после операции и количеством не-ГМКИТ-клеток в периимплантной капсуле, интенсивностью экспрессии  $\alpha$ -SMA и iNOS. Примечательно, что площадь имплантата в группе ПЛА@ПФ со временем уменьшалась. У животных с имплантированными ПЛА@ПФ не только площадь имплантата, но и толщина ПИК уменьшалась со временем по сравнению с группой ПЛА<sup>0</sup>+инПФ.

Относительная площадь имплантата положительно коррелировала с толщиной ПИК ( $R_s = 0,788$ ,  $p = 0,002$ ),  $\alpha$ -SMA ( $R_s = 0,612$ ,  $p = 0,034$ ) и Arg1 ( $R_s = 0,734$ ,  $p = 0,007$ ), а также с отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,693$ ,  $p = 0,013$ ). Также она отрицательно коррелировала с пиком температуры Тп2 в ДСК ( $R_s = -0,667$ ,  $p = 0,018$ ).

Толщина ПИК положительно коррелировала с экспрессией Arg1 ( $R_s = 0,819$ ,  $p = 0,001$ ) и отношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,765$ ,  $p = 0,004$ ).

Экспрессия  $\alpha$ -SMA в ПИК положительно коррелировала с экспрессией Arg1 ( $R_s = 0,698$ ,  $p = 0,012$ ).

Экспрессия Arg1 положительно коррелировала с соотношением низкотемпературных пиков в ДСК ( $R_s = 0,854$ ,  $p < 0,001$ ).

Пики температурных переходов T<sub>п1</sub> и T<sub>п2</sub> в ДСК также были почти линейно взаимосвязаны ( $R_s = 0,928$ ,  $p < 0,001$ ).

### **Обсуждение**

В настоящей работе были установлены эффекты нового экспериментального прототипа ИСДЛ для локальной доставки ПФ на фибротическую трансформацию периимплантной ткани в модели имплантации в карман кожи уха кролика [41]. Экспериментальная модель, использованная в этой работе, представляет собой модификацию подхода, используемого для моделирования чрезмерного (гипертрофического) рубцевания, который основан на ишемической природе ран на коже уха кролика [30, 243]. Имплантаты фиксировали хирургическим путем на границе дермы и хрящевой пластины. Затем примененная методология позволила смоделировать РИТ и фиброз окружающей имплантат ткани.

Эффективность ИСДЛ зависит от её способности пролонгированно высвобождать лекарство, а также от биосовместимости и биодegradации, которые вместе определяют фармакокинетический профиль препарата [147, 153, 159, 244-247]. В представленной работе высокая эффективность нагрузки имплантатов ПЛА@ПФ ПФ ( $97,9 \pm 13,8\%$  от исходной дозы 500 мкг ПФ на 0,3 г порошка ПЛА) была достигнута путем совместного вспенивания сухих порошков ПЛА и ПФ в скСО<sub>2</sub> по методике, предложенной ранее [248], что позволило обойти проблему плохой совместимости гидрофобного материала-носителя (ПЛА) [192] и высокогидрофильного препарата (ПФ) [188]. Послойное лазерное спекание [44, 195] применялось для формирования прочных и механически стабильных имплантатов. Важно отметить, что в представленном исследовании режим лазерной обработки был настроен для достижения поверхностного плавления краев частиц ПЛА, послойно, без перегрева основной части структуры имплантата, чтобы предотвратить повреждение молекул лекарства. Гомогенное распределение лекарственного средства в носителе ПЛА после примененной операции подтвердили модельным экспериментом методом ЭПР со спиновым зондом,

структурно напоминающим ПФ. Анализ высвобождения лекарства из спеченных имплантатов ПЛА@ПФ проводили *in vitro* в физиологических условиях (PBS, 37°C). Этот эксперимент продемонстрировал, что время полного высвобождения ПФ из имплантатов ПЛА@ПФ составило более 80 часов после начального быстрого высвобождения примерно 50% лекарства в течение первых 24 часов. Это время высвобождения было намного больше, чем период, описанный для различных типов линз для зрения, нагруженных ПФ (до 12 часов) [249, 250].

В этом исследовании мы сосредоточились на биомедицинских аспектах локальной доставки ПФ носителем ПЛА, а не на разработке и оптимизации ИСДЛ. В частности, высвобождение ПФ из имплантатов ПЛА@ПФ *in vivo* непосредственно не измерялось. Кроме того, необходимо отметить, что пустые имплантаты ПЛА<sup>0</sup> и имплантаты ПЛА@ПФ имели незначительные, но статистически значимые различия в среднем размере частиц (где ПЛА@ПФ имел более мелкогранулярную структуру). Известно, что этот параметр может влиять на различные свойства поверхности и биоразлагаемость материала. В частности, полимерные имплантаты с гранулами меньшего размера демонстрируют ускоренное разрушение [251]. Дальнейшая разработка ИСДЛ потребует дополнительную стандартизацию получаемых имплантатов, в частности, путем корректировки обработки  $\text{scCO}_2$  [252].

РИТ и ПИФ вокруг имплантатов ПЛА@ПФ и ПЛА<sup>0</sup>, применяемых 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 ПИК, состоящего из периимплантной капсулы, 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. 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 ПЛА<sup>0</sup> была подобна капсулам, которые наблюдались ранее вокруг долгосрочных рассасывающихся биоматериалов, включая ПЛА и полилактико-гликолевые шовные материалы, текстурированные силиконовые грудные имплантаты [29] и даже электроды кохлеарных имплантатов [253]. С другой стороны, развившееся благодаря ГМКИТ гранулематозное воспаление является типичным иммунным ответом не только на синтетические биоматериалы, но и на различные ксеногенные структуры в отсутствие специфического механизма резорбции [254]. Подобные реакции можно наблюдать после применения хитозановых и целлюлозных пленок, инфицирования паразитами и микобактериями [255]. Таким образом, можно сделать вывод, что исследование механизмов РИТ имеет важное значение для контроля ПИФ.

Для представленного прототипа ИСДЛ выбрали наиболее известный и клинически одобренный антифибротический препарат, ПФ, который является антагонистом ТРФбета-1, оказывающим местные и системные антифибротические эффекты. Первое предложение о применении ПФ для контроля РИТ было сделано за несколько лет до одобрения FDA первой пероральной формы ПФ – Эсбриет (Roche, Швейцария). У грызунов ПФ уменьшал объем соединительной ткани вокруг имплантата и подавлял экспрессию мРНК  $\alpha$ -SMA и ТРФбета-1 [190]. Совсем недавно та же группа авторов показала эффект перорального ПФ на предотвращение контракции капсул вокруг грудных имплантатов в клинических испытаниях [256]. Также была предложена местная доставка ПФ для предотвращения образования капсулы вокруг дренажного устройства от глаукомы [174]. Антифибротический эффект ПФ в этих исследованиях был связан с уменьшением количества  $\alpha$ -SMA положительных клеток, что коррелирует и с нашими результатами. Тем не менее, более глубокий анализ воздействия локально доставленного ПФ еще не проводился.

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 ПЛА<sup>0</sup> (в том числе при инъекции ПФ), как следует из результатов измерения относительной площади имплантата на гистологических срезах. Интересно, что не было корреляции между временем после операции и площадью имплантата в группе ПЛА<sup>0</sup>, но в группах, где использовался ПФ, площадь имплантата уменьшилась в течение экспериментального периода. Доставка ПФ путем инъекции 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 ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА<sup>0</sup>+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 интактной дермы. В действительности толщина ПИК отражала как интенсивность ПИФ, так и степень биодеградации имплантата. Поскольку имплантаты деградировали быстрее в группе ПЛА@ПФ, объем остаточного материала имплантата, который вносил вклад в толщину ПИК, был ниже. Однако, согласно результатам корреляционного анализа, толщина ПИК положительно коррелировала с относительной площадью имплантата только в группах ПЛА<sup>0</sup> и ПЛА@ПФ, но не у животных, которым вводили ПФ инъекционно. В группе ПЛА<sup>0</sup> объем имплантата не изменялся со временем, в то время как в группах с применением ПФ он уменьшался на ПОД60. Только в группе ПЛА@ПФ

положительная корреляция толщины ПИК и площади имплантата отражала сонаправленное изменение, указывающее на уменьшение объема КЛИТ, перимплантной капсулы и ПИФ.

Результаты исследования выявили очень интересные различия в механизмах РИТ и ПИФ между экспериментальными группами. Несколько механизмов положительной обратной связи (самоактивации) были идентифицированы в ткани животных, которым вводили ненагруженные имплантаты ПЛА<sup>0</sup>, путем анализа корреляции гистологических и иммуногистохимических результатов. В частности, 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  $\alpha$ -SMA и количество  $\alpha$ -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 [257, 258]. Эти механизмы обратной связи были нарушены в группе ПЛА@ПФ. Толщина ПИК положительно коррелировала только с экспрессией Arg1. Однако в этой группе данный маркер на ПОД60 вообще не экспрессировался. Выявили более слабую связь между экспрессией Arg1 и общим уровнем  $\alpha$ -SMA, что указывает на взаимосвязанный характер изменений этих показателей. Экспрессия  $\alpha$ -SMA была снижена в тканях вокруг имплантатов в группах с применением ПФ по сравнению с группой ПЛА<sup>0</sup> 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 биодеградации имплантата и острого воспаления. Пролонгированное высвобождение ПФ из имплантатов ПЛА@ПФ значительно изменило РИТ в тканях вокруг имплантата.

Считается, что ключевыми регуляторами РИТ и фиброза являются макрофаги и ГМКИТ [27]. В экспериментах *in vitro* ПФ подавлял фибротическую активацию фибробластов на контрактционных гелях [259] и снижал экспрессию маркеров M2 макрофагов [260]. Вероятно, что в нашем исследовании большая часть препарата доставлялась к макрофагам / ГМКИТ путем прямого контакта с имплантатом. В результате профибротическая передача сигналов, миофибробластная трансформация и избыточный синтез коллагена были подавлены в группе ПЛА@ПФ.

Мы добились высокой чувствительности при определении созревания структур соединительной ткани с помощью анализа термостабильности коллагена в образцах тканей, полученных из участков имплантаций, методом ДСК. Полученные измерения подтвердили наши выводы, сделанные в эксперименте по моделированию ГР на ушах кролика [243]. Термостабильность коллагена зависит от количества ковалентных поперечных связей, взаимодействия молекул коллагена и структурной целостности коллагенового каркаса ткани. Низкотемпературный пик (или плечо) отражал денатурацию недавно синтезированного незрелого коллагена, характеризующегося наличием слабых поперечных сшивок. Основной пик соответствовал денатурации зрелого, организованного в волокна коллагена, стабилизированного поперечными связями. В настоящем исследовании выявили корреляции между температурными пиками ДСК и соотношением низкотемпературных пиков, а также гистологическими и иммуногистохимическими характеристиками ПИК. В частности, соотношение низкотемпературных пиков и их динамика коррелировали с содержанием  $\alpha$ -SMA положительных клеток и, особенно, с плотностью  $\alpha$ -SMA положительных кровеносных сосудов в ткани ПИК. Этот показатель также положительно коррелировал с экспрессией Arg1. Предполагается, что связь между термостабильностью коллагена в периимплантных тканях и  $\alpha$ -SMA положительными кровеносными сосудами указывает на то, что синтез коллагена с низкой термостабильностью из-за низкого уровня сшивки (как в грануляционной

ткани [209]) происходил в клетках кровеносных сосудов, что указывает на еще одну потенциальную терапевтическую мишень.

Прототип ИСДЛ, предложенный в этом исследовании, является первым шагом к разработке более сложных биоразлагаемых систем доставки лекарств для подкожной и внутриорганной имплантации с целью контроля фиброза. Дальнейшая оптимизация конструкции ИСДЛ, состоящей из полимера и антифибротического агента, может быть направлена на те потенциальные мишени таргетированного фармакологического контроля ПИФ, которые были установлены в рамках представленной работы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 периимплантной 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 периимплантного фиброза методами морфологического, иммуногистохимического, термического и генетического анализов. Применение скаффолда из гранул полилактида позволило контролируемо индуцировать развитие периимплантного фиброза и обеспечило воспроизводимость результатов. Модель позволила в относительно короткий срок (60 суток) вызывать избыточный

фиброз и получить зрелую периимплантную 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 загрузки 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 TRFбета-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, что значительно повышает эффективность доставки лекарственного препарата.

## 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 периимплатного 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 ( $532 \pm 98$  мкм) также значительно меньше, чем в группе контроля ( $1444 \pm 140$  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 фиброобразования.

6. Антифибротические скаффолды с пирфенидоном снижают экспрессию  $\alpha$ -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 периимпантной ткани и образование соединительнотканной капсулы. Пролонгированное высвобождение антифибротического агента можно использовать для повышения биологической совместимости медленно деградирующих или нерезорбируемых имплантатов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВГ – окраска по Ван Гизону
- ГАГ – гликозаминогликаны
- Гип – гидроксипролин
- Гил – гидроксизин
- ГМКИТ – гигантская многоядерная клетка инородных тел
- ГР – гипертрофический рубец
- ГЭ – гематоксилин и эозин
- ДИ95% – 95% доверительный интервал
- ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
- КЛИТ – колокализованная с имплантатом ткань
- ИСДЛ – имплантируемая система доставки лекарств
- мРНК – матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
- ПИК – периимплантатный комплекс
- ПИФ – периимплантный фиброз
- ПЛА – полилактид
- ПЛА<sup>0</sup> – экспериментальная группа скаффолда из полилактида без пирфенидона
- ПЛА<sup>0</sup>+инПФ – экспериментальная группа скаффолда из полилактида с подкожной инъекцией пирфенидоном
- ПЛА@ПФ – экспериментальная группа скаффолда из полилактида с пирфенидоном
- ПОД – послеоперационный день
- ПСК – пикросириус красный
- ПФ – пирфенидон
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РИТ – реакция на инородное тело
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- скСО<sub>2</sub> – сверхкритический диоксид углерода

США – Соединенные Штаты Америки

T<sub>п</sub> – тепловой переход

ТРФбета-1 – трансформирующий ростовой фактор бета-1

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

Arg1 – аргиназа-1

CD – кластер дифференцировки

FDA – Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

PBS – фосфатный буферный солевой раствор

R<sub>s</sub> – коэффициент корреляции Спирмена

SD – стандартное отклонение

4-гидрокси-ТЕМПО бензоат – 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксилбензоат

α-SMA – α-гладкомышечный актин

ΔΔCt – дельта дельта порогового цикла

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Klopffleisch, R. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials / R. Klopffleisch, F. Jung // *J Biomed Mater Res A*. – 2017. – Vol. 105. – P. 927-940.
2. Magnusson, M.R. Breast Implant Illness: A Way Forward / M.R. Magnusson, R.D. Cooter, H. Rakhorst, P.A. McGuire, W.P. Adams, Jr., A.K. Deva // *Plast Reconstr Surg*. – 2019. – Vol. 143. – P. 74S-81S.
3. Vishwanath, S. Breast Device Surgery in Australia: Early Results from the Australian Breast Device Registry / S. Vishwanath, B. Pellegrini, E. Parker, A. Earnest, S. Kalbasi, P. Gartoulla, E. Elder, G. Farrell, C. Moore, R.D. Cooter // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2021. – Vol. 74. – P. 2719-2730.
4. Bachour, Y. Risk factors for developing capsular contracture in women after breast implant surgery: A systematic review of the literature / Y. Bachour, C.A. Bargon, C.J. de Blok, J.C. Ket, M.J. Ritt, F.B. Niessen // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2018. – Vol. 71. – P. e29-e48.
5. Palminteri, E. Management of urethral stent failure for recurrent anterior urethral strictures / E. Palminteri, M. Gacci, E. Berdondini, M. Poluzzi, G. Franco, V. Gentile // *Eur Urol*. – 2010. – Vol. 57. – P. 615-621.
6. Lee, S.J. Biomaterials and tissue engineering / S.J. Lee, J.J. Yoo, A. Atala // *Clinical regenerative medicine in urology*. – 2018. – P. 17-51.
7. Mariani, E. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? / E. Mariani, G. Lisignoli, R.M. Borzi, L. Pulsatelli // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20.
8. Chung, L. Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine / L. Chung, D.R. Maestas, Jr., F. Housseau, J.H. Elisseeff // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2017. – Vol. 114. – P. 184-192.
9. Li, A.G. Elevation of transforming growth factor beta (TGFbeta) and its downstream mediators in subcutaneous foreign body capsule tissue / A.G. Li, M.J. Quinn, Y. Siddiqui, M.D. Wood, I.F. Federiuk, H.M. Duman, W.K. Ward // *J Biomed Mater Res A*. – 2007. – Vol. 82. – P. 498-508.

10. Veiseh, O. Domesticating the foreign body response: Recent advances and applications / O. Veiseh, A.J. Vegas // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2019. – Vol. 144. – P. 148-161.
11. Li, J. Experimental models for cutaneous hypertrophic scar research / J. Li, J. Wang, Z. Wang, Y. Xia, M. Zhou, A. Zhong, J. Sun // *Wound Repair Regen.* – 2020. – Vol. 28. – P. 126-144.
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.
13. Serati, M. Delayed-type hypersensitivity reaction against Nexplanon® / M. Serati, G. Bogani, S. Kumar, A. Cromi, F. Ghezzi // *Contraception.* – 2015. – Vol. 91. – P. 91-92.
14. Barnwal, P. Probuphine®(buprenorphine implant): a promising candidate in opioid dependence / P. Barnwal, S. Das, S. Mondal, A. Ramasamy, T. Maiti, A. Saha // *Therapeutic advances in psychopharmacology.* – 2017. – Vol. 7. – P. 119-134.
15. Massa, H. Intravitreal fluocinolone acetonide implant (ILUVIEN®) for diabetic macular oedema: a literature review / H. Massa, A.M. Nagar, A. Vergados, P. Dadoukis, S. Patra, G.D. Panos // *Journal of International Medical Research.* – 2019. – Vol. 47. – P. 31-43.
16. Champeaux, C. Implantation of carmustine wafers (Gliadel®) for high-grade glioma treatment. A 9-year nationwide retrospective study / C. Champeaux, J. Weller // *Journal of neuro-oncology.* – 2020. – Vol. 147. – P. 159-169.
17. Chailakhyan, R.K. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells provide complete regeneration in a rabbit model of the Achilles tendon bundle rupture / R.K. Chailakhyan, E. Kon, A.B. Shekhter, S.V. Ivannikov, V.I. Telpukhov, A.G. Grosheva, D.S. Suslin, N.N. Vorobieva, Y.V. Gerasimov, S.N. Churbanov // *International Orthopaedics.* – 2021. – Vol. 45. – P. 3263-3276.
18. Bardakova, K. Tailoring the collagen film structural properties via direct laser crosslinking of star-shaped polylactide for robust scaffold formation / K. Bardakova, E.

Grebenik, N. Minaev, S. Churbanov, Z. Moldagazyeva, G. Krupinov, S. Kostjuk, P. Timashev // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 107. – P. 110300.

19. Frolova, A. A Collagen Basketweave from the Giant Squid Mantle as a Robust Scaffold for Tissue Engineering / A. Frolova, N. Aksenova, I. Novikov, A. Maslakova, E. Gafarova, Y. Efremov, P. Bikmulina, V. Elagin, E. Istranova, A. Kurkov // *Marine Drugs*. – 2021. – Vol. 19. – P. 679.

20. Svehla, M. The effect of substrate roughness and hydroxyapatite coating thickness on implant shear strength / M. Svehla, P. Morberg, W. Bruce, B. Zicat, W. Walsh // *The Journal of Arthroplasty*. – 2002. – Vol. 17. – P. 304-311.

21. Doloff, J.C. The surface topography of silicone breast implants mediates the foreign body response in mice, rabbits and humans / J.C. Doloff, O. Veiseh, R. de Mezerville, M. Sforza, T.A. Perry, J. Haupt, M. Jamiel, C. Chambers, A. Nash, S. Aghlara-Fotovvat // *Nature biomedical engineering*. – 2021. – Vol. 5. – P. 1115-1130.

22. Tan, G.Z. Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review / G.Z. Tan, Y. Zhou // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2020. – Vol. 69. – P. 947-960.

23. Cheng, L. In vivo inhibition of hypertrophic scars by implantable ginsenoside-Rg3-loaded electrospun fibrous membranes / L. Cheng, X. Sun, C. Hu, R. Jin, B. Sun, Y. Shi, L. Zhang, W. Cui, Y. Zhang // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9. – P. 9461-9473.

24. Cheng, L. Surface biofunctional drug-loaded electrospun fibrous scaffolds for comprehensive repairing hypertrophic scars / L. Cheng, X. Sun, X. Zhao, L. Wang, J. Yu, G. Pan, B. Li, H. Yang, Y. Zhang, W. Cui // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 83. – P. 169-181.

25. Li, C. Urethral reconstruction with tissue engineering and RNA interference techniques in rabbits / C. Li, Y.M. Xu, Z.S. Liu, H.B. Li // *Urology*. – 2013. – Vol. 81. – P. 1075-1080.

26. Zhang, K. Application of Wnt pathway inhibitor delivering scaffold for inhibiting fibrosis in urethra strictures: in vitro and in vivo study / K. Zhang, X. Guo, W. Zhao, G. Niu, X. Mo, Q. Fu // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – Vol. 16. – P. 27659-27676.

27. Sheikh, Z. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials / Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer // *Materials*. – 2015. – Vol. 8. – P. 5671-5701.

28. Barr, S. Functional biocompatibility testing of silicone breast implants and a novel classification system based on surface roughness / S. Barr, E. Hill, A. Bayat // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2017. – Vol. 75. – P. 75-81.

29. de Bakker, E. The Histological Composition of Capsular Contracture Focussed on the Inner Layer of the Capsule: An Intra-Donor Baker-I Versus Baker-IV Comparison / E. de Bakker, L.J. van den Broek, M. Ritt, S. Gibbs, F.B. Niessen // *Aesthetic Plast Surg*. – 2018. – Vol. 42. – P. 1485-1491.

30. Morris, D.E. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies / D.E. Morris, L. Wu, L.L. Zhao, L. Bolton, S.I. Roth, D.A. Ladin, T.A. Mustoe // *Plast Reconstr Surg*. – 1997. – Vol. 100. – P. 674-681.

31. Tibbitt, M.W. Emerging frontiers in drug delivery / M.W. Tibbitt, J.E. Dahlman, R. Langer // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – Vol. 138. – P. 704-717.

32. Jain, K.K. Drug delivery systems-an overview / K.K. Jain // *Drug delivery systems*. – 2008. – P. 1-50.

33. Santos, A. Drug-releasing implants: current progress, challenges and perspectives / A. Santos, M.S. Aw, M. Bariana, T. Kumeria, Y. Wang, D. Losic // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2. – P. 6157-6182.

34. McDonald-Mosley, R. Contraceptive implants / R. McDonald-Mosley, A.E. Burke // *Seminars in reproductive medicine*. – Vol. 28 –Thieme Medical Publishers, 2010. – P. 110-117.

35. Pons-Faudoa, F.P. Advanced implantable drug delivery technologies: transforming the clinical landscape of therapeutics for chronic diseases / F.P. Pons-Faudoa, A. Ballerini, J. Sakamoto, A. Grattoni // *Biomed Microdevices*. – 2019. – Vol. 21. – P. 47.

36. Witherel, C.E. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis / C.E. Witherel, D. Abebayehu, T.H. Barker, K.L. Spiller // *Adv Healthc Mater.* – 2019. – Vol. 8. – P. e1801451.

37. Horbett, T.A. Fibrinogen adsorption to biomaterials / T.A. Horbett // *Journal of biomedical materials research Part A.* – 2018. – Vol. 106. – P. 2777-2788.

38. Visalakshan, R.M. Biomaterial surface hydrophobicity-mediated serum protein adsorption and immune responses / R.M. Visalakshan, M.N. MacGregor, S. Sasidharan, A. Ghazaryan, A.M. Mierczynska-Vasilev, S. Morsbach, V. Mailänder, K. Landfester, J.D. Hayball, K. Vasilev // *ACS applied materials & interfaces.* – 2019. – Vol. 11. – P. 27615-27623.

39. DiEgidio, P. Biomedical implant capsule formation: lessons learned and the road ahead / P. DiEgidio, H.I. Friedman, R.G. Gourdie, A.E. Riley, M.J. Yost, R.L. Goodwin // *Ann Plast Surg.* – 2014. – Vol. 73. – P. 451-460.

40. Witherel, C.E. Regulation of extracellular matrix assembly and structure by hybrid M1/M2 macrophages / C.E. Witherel, K. Sao, B.K. Brisson, B. Han, S.W. Volk, R.J. Petrie, L. Han, K.L. Spiller // *Biomaterials.* – 2021. – Vol. 269. – P. 120667.

41. 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 // *Biomedicines.* – 2021. – Vol. 9. – P. 853.

42. Matriano, J. Addressing Immunogenicity for Implantable Drug-delivery Devices and Long-acting Injectables, Including Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Correlations / J. Matriano // *Implantable Technologies*, 2021. – P. 131-159.

43. Manoukian, O.S. Functional polymeric nerve guidance conduits and drug delivery strategies for peripheral nerve repair and regeneration / O.S. Manoukian, J.T. Baker, S. Rudraiah, M.R. Arul, A.T. Vella, A.J. Domb, S.G. Kumbar // *Journal of Controlled Release.* – 2020. – Vol. 317. – P. 78-95.

44. Grebenik, E.A. Osteoinducing scaffolds with multi-layered biointerface / E.A. Grebenik, V.D. Grinchenko, S.N. Churbanov, N.V. Minaev, B.S. Shavkuta, P.A.

Melnikov, D.V. Butnaru, Y.A. Rochev, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev // *Biomed Mater.* – 2018. – Vol. 13. – P. 054103.

45. Ramdhan, R.C. Complications of subcutaneous contraception: a review / R.C. Ramdhan, E. Simonds, C. Wilson, M. Loukas, R.J. Oskouian, R.S. Tubbs // *Cureus.* – 2018. – Vol. 10.

46. Wysowski, D.K. Serious adverse events in Norplant users reported to the Food and Drug Administration's MedWatch Spontaneous Reporting System / D.K. Wysowski, L. Green // *Obstetrics & Gynecology.* – 1995. – Vol. 85. – P. 538-542.

47. Chadha-Gupta, A. Fat atrophy at the site of a subdermal contraceptive implant / A. Chadha-Gupta, A. Moss // *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care.* – 2007. – Vol. 33. – P. 123.

48. Funk, S. Safety and efficacy of Implanon™, a single-rod implantable contraceptive containing etonogestrel / S. Funk, M.M. Miller, D.R. Mishell Jr, D.F. Archer, A. Poindexter, J. Schmidt, E. Zampaglione, I.U.S. Group // *Contraception.* – 2005. – Vol. 71. – P. 319-326.

49. Gwinnell, E. Expulsion of Implanon® / E. Gwinnell // *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care.* – 2007. – Vol. 33. – P. 211.

50. Patel, P.R. A foreign body reaction to a contraceptive implant / P.R. Patel // *J Womens Health Gynecol.* – 2014. – Vol. 1. – P. 1-3.

51. Park, J.U. Removal of a subdermal contraceptive implant (Implanon NXT) that migrated to the axilla by C-arm guidance: A case report and review of the literature / J.U. Park, H.S. Bae, S.M. Lee, J. Bae, J.W. Park // *Medicine.* – 2017. – Vol. 96.

52. Chaudhry, F. Adverse reaction to Nexplanon® / F. Chaudhry // *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care.* – 2013. – Vol. 39. – P. 231-232.

53. Mansour, D. Comment on 'Adverse reaction to Nexplanon®' / D. Mansour // *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care.* – 2013. – Vol. 39. – P. 232-233.

54. McCullough, A.R. A multi-institutional observational study of testosterone levels after testosterone pellet (Testopel®) insertion / A.R. McCullough, M. Khera, I.

Goldstein, W.J. Hellstrom, A. Morgentaler, L.A. Levine // *The journal of sexual medicine.* – 2012. – Vol. 9. – P. 594-601.

55. McCullough, A. A review of testosterone pellets in the treatment of hypogonadism / A. McCullough // *Current sexual health reports.* – 2014. – Vol. 6. – P. 265-269.

56. Fowler Jr, J.E. Patient-reported experience with the Viadur 12-month leuprolide implant for prostate cancer / J.E. Fowler Jr, V.S. Group // *Urology.* – 2001. – Vol. 58. – P. 430-434.

57. Wright, J.C. Critical variables associated with nonbiodegradable osmotically controlled implants / J.C. Wright // *The AAPS journal.* – 2010. – Vol. 12. – P. 437-442.

58. Shore, N. Introducing vantas: the first once-yearly luteinising hormone-releasing hormone agonist / N. Shore // *European Urology Supplements.* – 2010. – Vol. 9. – P. 701-705.

59. Lewis, K.A. A single histrelin implant is effective for 2 years for treatment of central precocious puberty / K.A. Lewis, A.K. Goldyn, K.W. West, E.A. Eugster // *The Journal of pediatrics.* – 2013. – Vol. 163. – P. 1214-1216.

60. Olson-Kennedy, J. Histrelin implants for suppression of puberty in youth with gender dysphoria: a comparison of 50 mcg/day (Vantas) and 65 mcg/day (SupprelinLA) / J. Olson-Kennedy, L.H. Streeter, R. Garofalo, Y.-M. Chan, S.M. Rosenthal // *Transgender Health.* – 2021. – Vol. 6. – P. 36-42.

61. Miller, B.S. Sterile abscess formation in response to two separate branded long-acting gonadotropin-releasing hormone agonists / B.S. Miller, A.R. Shukla // *Clinical therapeutics.* – 2010. – Vol. 32. – P. 1749-1751.

62. Frost, M. Buprenorphine implant removal 7 years postinsertion: a case report / M. Frost, R. Bobb // *Journal of addiction medicine.* – 2019. – Vol. 13. – P. 79-80.

63. Johnston, J. Shiley INFUSAID Pump technology / J. Johnston, S. Reich, A. Bailey, J. Sluetz // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1988. – Vol. 531. – P. 57-65.

64. Hohn, D.C. Toxicities and complications of implanted pump hepatic arterial and intravenous floxuridine infusion / D.C. Hohn, A.A. Rayner, J.S. Economou, R.J. Ignoffo, B.J. Lewis, R.J. Stagg // *Cancer*. – 1986. – Vol. 57. – P. 465-470.

65. Haq, M.M. Fibrosis of extrahepatic biliary system after continuous hepatic artery infusion of floxuridine through an implantable pump (Infusaid pump) / M.M. Haq, L.G. Valdes, D.F. Peterson, W.K. Gourley // *Cancer*. – 1986. – Vol. 57. – P. 1281-1283.

66. Broussolle, C. French multicentre experience of implantable insulin pumps / C. Broussolle, N. Jeandidier, H. Hanaire-Broutin // *The Lancet*. – 1994. – Vol. 343. – P. 514-515.

67. Teddy, P. Complications of intrathecal baclofen delivery / P. Teddy, A. Jamous, B. Gardner, D. Wang, J. Silver // *British journal of neurosurgery*. – 1992. – Vol. 6. – P. 115-118.

68. Farid, R. Accuracy and precision of the SynchroMed II pump / R. Farid, K. Binz, J.A. Emerson, F. Murdock // *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*. – 2019. – Vol. 22. – P. 805-810.

69. Bourge, R.C. Treprostinil administered to treat pulmonary arterial hypertension using a fully implantable programmable intravascular delivery system: results of the DelIVery for PAH trial / R.C. Bourge, A.B. Waxman, M. Gomberg-Maitland, S.M. Shapiro, J.H. Tarver III, D.L. Zwicke, J.P. Feldman, M.M. Chakinala, R.P. Frantz, F. Torres // *Chest*. – 2016. – Vol. 150. – P. 27-34.

70. Taira, T. Rate of Complications Among the Recipients of Intrathecal Baclofen Pump in Japan: A Multicenter Study / T. Taira, T. Ueta, Y. Katayama, M. Kimizuka, A. Nemoto, H. Mizusawa, M. Liu, M. Koito, Y. Hiro, H. Tanabe // *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*. – 2013. – Vol. 16. – P. 266-272.

71. North, R.B. Spinal cord compression complicating subarachnoid infusion of morphine: case report and laboratory experience / R.B. North, P.N. Cutchis, J.A. Epstein, D.M. Long // *Neurosurgery*. – 1991. – Vol. 29. – P. 778-784.

72. Schuchard, M. Neurologic sequelae of intraspinal drug delivery systems: results of a survey of American implanters of implantable drug delivery systems / M.

Schuchard, R. Lanning, R. North, E. Reig, E. Krames // *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*. – 1998. – Vol. 1. – P. 137-148.

73. Johansen, M.J. Safety of continuous intrathecal midazolam infusion in the sheep model / M.J. Johansen, T.L. Gradert, W.C. Satterfield, W.B. Baze, K. Hildebrand, L. Trissel, S.J. Hassenbusch // *Anesthesia & Analgesia*. – 2004. – Vol. 98. – P. 1528-1535.

74. Michael, A. An in vivo canine study to assess granulomatous responses in the MedStream Programmable Infusion System™ and the SynchroMed II Infusion System® / A. Michael, E. Buffen, R. Rauck, W. Anderson, M. McGirt, H.V. Mendenhall // *Pain Medicine*. – 2012. – Vol. 13. – P. 175-184.

75. Borrini, L. Occurrence of adverse events in long-term intrathecal baclofen infusion: a 1-year follow-up study of 158 adults / L. Borrini, D. Bensmail, J.-B. Thiebaut, C. Hugeron, C. Rech, C. Jourdan // *Archives of physical medicine and rehabilitation*. – 2014. – Vol. 95. – P. 1032-1038.

76. Jones, R.L. The diagnosis of intrathecal infusion pump system failure / R.L. Jones, P.K. Rawlins // *Pain Physician*. – 2005. – Vol. 8. – P. 291-296.

77. Gofeld, M. Ultrasound-guided intrathecal pump access and prevention of the pocket fill / M. Gofeld, C.K. McQueen // *Pain Medicine*. – 2011. – Vol. 12. – P. 607-611.

78. Jones, R. Spinal Cord Stimulation and Implanted Intrathecal Drug Infusion / R. Jones // *Pain Procedures in Clinical Practice* Elsevier, 2011. – P. 483-506.

79. Manickavasagam, D. Critical assessment of implantable drug delivery devices in glaucoma management / D. Manickavasagam, M.O. Oyewumi // *Journal of drug delivery*. – 2013. – Vol. 2013.

80. Geroski, D.H. Transscleral drug delivery for posterior segment disease / D.H. Geroski, H.F. Edelhauser // *Advanced drug delivery reviews*. – 2001. – Vol. 52. – P. 37-48.

81. Rofagha, S. Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP) / S. Rofagha, R.B. Bhisitkul, D.S. Boyer, S.R. Sadda, K. Zhang, S.-U.S. Group // *Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 120. – P. 2292-2299.

82. Olsen, T.W. Cannulation of the suprachoroidal space: a novel drug delivery methodology to the posterior segment / T.W. Olsen, X. Feng, K. Wabner, S.R. Conston, D.H. Sierra, D.V. Folden, M.E. Smith, J.D. Cameron // *American journal of ophthalmology*. – 2006. – Vol. 142. – P. 777-787. e772.

83. Stevenson, C.L. Reservoir-based drug delivery systems utilizing microtechnology / C.L. Stevenson, J.T. Santini Jr, R. Langer // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 1590-1602.

84. Jervis, L. A summary of recent advances in ocular inserts and implants / L. Jervis // *J. Bioequiv. Bioavailab.* – 2017. – Vol. 9. – P. 320-323.

85. Musch, D.C. Treatment of cytomegalovirus retinitis with a sustained-release ganciclovir implant / D.C. Musch, D.F. Martin, J.F. Gordon, M.D. Davis, B.D. Kuppermann, G.I.S. Group // *New England Journal of Medicine*. – 1997. – Vol. 337. – P. 83-90.

86. Lim, J.I. Visual and anatomic outcomes associated with posterior segment complications after ganciclovir implant procedures in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis / J.I. Lim, R.A. Wolitz, A.H. Dowling, H.R. Bloom, A.R. Irvine, D.M. Schwartz // *American journal of ophthalmology*. – 1999. – Vol. 127. – P. 288-293.

87. Lallemand, F. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge / F. Lallemand, O. Felt-Baeyens, K. Besseghir, F. Behar-Cohen, R. Gurny // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2003. – Vol. 56. – P. 307-318.

88. Nicholson, B.P. Evaluation of fluocinolone acetonide sustained release implant (Retisert) dissociation during implant removal and exchange surgery / B.P. Nicholson, R.P. Singh, J.E. Sears, C.Y. Lowder, P.K. Kaiser // *American journal of ophthalmology*. – 2012. – Vol. 154. – P. 969-973. e961.

89. Jaffe, G.J. Fluocinolone acetonide implant (Retisert) for noninfectious posterior uveitis: thirty-four-week results of a multicenter randomized clinical study / G.J. Jaffe, D. Martin, D. Callanan, P.A. Pearson, B. Levy, T. Comstock, F.A.U.S. Group // *Ophthalmology*. – 2006. – Vol. 113. – P. 1020-1027.

90. Berger B.B. Fluocinolone Implant for Idiopathic Non-Infectious Posterior Uveitis / B.B. Berger // *Retinal Physician*. – 2012. – P. 2-6.

91. Sims, J. Cytomegalovirus endotheliitis following fluocinolone acetonide (Retisert) implant / J. Sims, S. Chee // *Eye*. – 2010. – Vol. 24. – P. 197-198.
92. Park, U.C. Cytomegalovirus endotheliitis after fluocinolone acetonide (Retisert) implant in a patient with Behçet uveitis / U.C. Park, S.J. Kim, H.G. Yu // *Ocular immunology and inflammation*. – 2011. – Vol. 19. – P. 282-283.
93. Callanan, D.G. Treatment of posterior uveitis with a fluocinolone acetonide implant / D.G. Callanan, G.J. Jaffe, D.F. Martin, P.A. Pearson, T.L. Comstock // *Arch ophthalmol*. – 2008. – Vol. 126. – P. 1191-1201.
94. Borkar, D.S. Sustained Release Corticosteroid Therapy for Noninfectious Uveitis / D.S. Borkar, C. Ung, L. Sobrin // *International ophthalmology clinics*. – 2017. – Vol. 57. – P. 193-202.
95. Logan, S.A. Intravitreal steroid implants in the management of retinal disease and uveitis / S.A. Logan, C.Y. Weng, P.E. Carvounis // *International ophthalmology clinics*. – 2016. – Vol. 56. – P. 127-149.
96. Yasin, M.N. Implants for drug delivery to the posterior segment of the eye: a focus on stimuli-responsive and tunable release systems / M.N. Yasin, D. Svirskis, A. Seyfoddin, I.D. Rupenthal // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 196. – P. 208-221.
97. Papastavrou, V.T. Observation: fluocinolone acetonide (ILUVIEN) implant migration into the anterior chamber / V.T. Papastavrou, H. Zambarakji, I. Dooley, H. Eleftheriadis, T.L. Jackson // *Retinal cases & brief reports*. – 2017. – Vol. 11. – P. 44-46.
98. Williams, G.A. Dexamethasone posterior-segment drug delivery system in the treatment of macular edema resulting from uveitis or Irvine-Gass syndrome / G.A. Williams, J.A. Haller, B.D. Kuppermann, M.S. Blumenkranz, D.V. Weinberg, C. Chou, S.M. Whitcup, D.D.P.I.S. Group // *American journal of ophthalmology*. – 2009. – Vol. 147. – P. 1048-1054. e1042.
99. Chang-Lin, J.E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant / J.E. Chang-Lin, M. Attar, A.A. Acheampong, M.R. Robinson, S.M. Whitcup, B.D. Kuppermann, D. Welty // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2011. – Vol. 52. – P. 80-86.

100. Fassbender Adeniran, J.M. Common and rare ocular side-effects of the dexamethasone implant / J.M. Fassbender Adeniran, D. Jusufbegovic, S. Schaal // *Ocular immunology and inflammation*. – 2017. – Vol. 25. – P. 834-840.

101. Malclès, A. Safety of intravitreal dexamethasone implant (Ozurdex): the SAFODEX study. Incidence and risk factors of ocular hypertension / A. Malclès, C. Dot, N. Voirin, A.-L. Vié, É. Agard, D. Bellocq, P. Denis, L. Kodjikian // *Retina*. – 2017. – Vol. 37. – P. 1352-1359.

102. Dugel, P. I-Vation™ TA: 24-month clinical results of the phase I safety and preliminary efficacy study / P. Dugel, D. Elliott, H. Cantrill, T. Mahmoud, R. Avery, S. Erickson // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – Vol. 50. – P. 4332-4332.

103. Bakri, S.J. Fibrotic encapsulation of a dexamethasone intravitreal implant following vitrectomy and silicone oil for rhegmatogenous retinal detachment / S.J. Bakri, S.T. Alniemi // *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*. – 2014. – Vol. 45. – P. 243-245.

104. Agrawal, R. Desegmentation of Ozurdex implant in vitreous cavity: report of two cases / R. Agrawal, G. Fernandez-Sanz, S. Bala, P.K. Addison // *Br J Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 98. – P. 961-963.

105. Eadie, J.A. Migration of Ozurdex implant into the anterior chamber / J.A. Eadie, R. Lesser, A. Capone Jr // *Retinal Cases and Brief Reports*. – 2012. – Vol. 6. – P. 269-270.

106. Pardo-Lopez, D. Anterior chamber migration of dexametasone intravitreal implant (Ozurdex(R)) / D. Pardo-Lopez, E. Frances-Munoz, R. Gallego-Pinazo, M. Diaz-Llopis // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 250. – P. 1703-1704.

107. Suner, I.J. Dexamethasone Sustained-Release Intracanalicular Insert for Control of Postoperative Inflammation After Pars Plana Vitrectomy / I.J. Suner, M.C. Peden // *Clin Ophthalmol*. – 2021. – Vol. 15. – P. 3859-3864.

108. Walters, T. Efficacy and Safety of Sustained Release Dexamethasone for the Treatment of Ocular Pain and Inflammation after Cataract Surgery: Results from Two

Phase 3 Studies / T. Walters, S. Bafna // *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 07.

109. Thrimawithana, T.R. Drug delivery to the posterior segment of the eye / T.R. Thrimawithana, S. Young, C.R. Bunt, C. Green, R.G. Alany // *Drug Discov Today*. – 2011. – Vol. 16. – P. 270-277.

110. Hu, M. Verisome™, a Novel injectable, Sustained Release, Biodegradable, Intraocular Drug Delivery System and Triamcinolone Acetonide / M. Hu, G. Huang, F. Karasina, V. Wong // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2008. – Vol. 49. – P. 5627-5627.

111. Zhang, K. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration / K. Zhang, J.J. Hopkins, J.S. Heier, D.G. Birch, L.S. Halperin, T.A. Albini, D.M. Brown, G.J. Jaffe, W. Tao, G.A. Williams // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – Vol. 108. – P. 6241-6245.

112. Ciolino, J.B. In vivo performance of a drug-eluting contact lens to treat glaucoma for a month / J.B. Ciolino, C.F. Stefanescu, A.E. Ross, B. Salvador-Culla, P. Cortez, E.M. Ford, K.A. Wymbs, S.L. Sprague, D.R. Mascoop, S.S. Rudina // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35. – P. 432-439.

113. Fisher, J.P. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas / J.P. Fisher, D.C. Adamson // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – P. 324.

114. Attenello, F.J. Use of Gliadel (BCNU) wafer in the surgical treatment of malignant glioma: a 10-year institutional experience / F.J. Attenello, D. Mukherjee, G. Dato, M.J. McGirt, E. Bohan, J.D. Weingart, A. Olivi, A. Quinones-Hinojosa, H. Brem // *Annals of surgical oncology*. – 2008. – Vol. 15. – P. 2887-2893.

115. Shibahara, I. Tumor microenvironment after biodegradable BCNU wafer implantation: Special consideration of immune system / I. Shibahara, M. Hanihara, T. Watanabe, M. Dan, S. Sato, H. Kuroda, A. Inamura, M. Inukai, A. Hara, Y. Yasui // *Journal of neuro-oncology*. – 2018. – Vol. 137. – P. 417-427.

116. Shibahara, I. Long-term follow-up after BCNU wafer implantation in patients with newly diagnosed glioblastoma / I. Shibahara, K. Miyasaka, A. Sekiguchi, H.

Ishiyama, M. Inukai, Y. Yasui, T. Watanabe, S. Sato, T. Hide, T. Kumabe // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2021. – Vol. 86. – P. 202-210.

117. Muntasser, H. Gliadel wafers acting as a lattice for bacterial growth: a case illustration / H. Muntasser, I. Liaquat, A. Barlow, I. Whittle // *Acta neurochirurgica*. – 2011. – Vol. 153. – P. 2099.

118. Sato, K. Chronic phase intracranial hemorrhage caused by ruptured pseudoaneurysm induced by carmustine wafer implantation for insulo-opercular anaplastic astrocytoma: a case report / K. Sato, M. Dan, D. Yamamoto, Y. MiYajiMa, A. Hara, T. Kumabe // *Neurologia medico-chirurgica*. – 2015. – P. cr. 2015-0186.

119. Ziemba, A.M. Biomaterials for local, controlled drug delivery to the injured spinal cord / A.M. Ziemba, R.J. Gilbert // *Frontiers in pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 245.

120. Quarterman, J.C. Evolution of drug-eluting biomedical implants for sustained drug delivery / J.C. Quarterman, S.M. Geary, A.K. Salem // *Eur J Pharm Biopharm*. – 2021. – Vol. 159. – P. 21-35.

121. Shlofmitz, E. Restenosis of Drug-Eluting Stents: A New Classification System Based on Disease Mechanism to Guide Treatment and State-of-the-Art Review / E. Shlofmitz, M. Iantorno, R. Waksman // *Circ Cardiovasc Interv*. – 2019. – Vol. 12. – P. e007023.

122. Mei, X. Recent development in therapeutic cardiac patches / X. Mei, K. Cheng // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2020. – Vol. 7. – P. 294.

123. Wolfram, D. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management / D. Wolfram, A. Tzankov, P. Pulzl, H. Piza-Katzer // *Dermatol Surg*. – 2009. – Vol. 35. – P. 171-181.

124. Limandjaja, G.C. Hypertrophic scars and keloids: Overview of the evidence and practical guide for differentiating between these abnormal scars / G.C. Limandjaja, F.B. Niessen, R.J. Scheper, S. Gibbs // *Exp Dermatol*. – 2020. – Vol. n/a.

125. Bayat, A. Skin scarring / A. Bayat, D.A. McGruther, M.W. Ferguson // *BMJ*. – 2003. – Vol. 326. – P. 88-92.

126. Zhang, T. Effect of UVA1 on hypertrophic scarring in the rabbit ear model / T. Zhang, Z. Shen, J. Zheng, R. Jiang // *Biosci Rep.* – 2020. – Vol. 40.
127. Kischer, C.W. Collagen and mucopolysaccharides in the hypertrophic scar / C.W. Kischer, M.R. Shetlar // *Connect Tissue Res.* – 1974. – Vol. 2. – P. 205-213.
128. Lu, L. The temporal effects of anti-TGF-beta1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation / L. Lu, A.S. Saulis, W.R. Liu, N.K. Roy, J.D. Chao, S. Ledbetter, T.A. Mustoe // *J Am Coll Surg.* – 2005. – Vol. 201. – P. 391-397.
129. Шехтер, А.Б. Морфологическая характеристика рубцовых тканей и новая клинико-морфологическая классификация рубцов кожи человека / А.Б. Шехтер, А.Е. Гуллер // *Архив патологии.* – 2008. – Т. 70. – С. 6-13.
130. Ogawa, R. Animal models of keloids and hypertrophic scars / R. Ogawa, M.S. Chin // *J Burn Care Res.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1016-1017.
131. Del Toro, D. Advances in scar management: prevention and management of hypertrophic scars and keloids / D. Del Toro, R. Dedhia, T.T. Tollefson // *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2016. – Vol. 24. – P. 322-329.
132. Chun, Q. Dynamic biological changes in fibroblasts during hypertrophic scar formation and regression / Q. Chun, W. ZhiYong, S. Fei, W. XiQiao // *Int Wound J.* – 2016. – Vol. 13. – P. 257-262.
133. Kant, S. Duration of Scar Maturation: Retrospective Analyses of 361 Hypertrophic Scars Over 5 Years / S. Kant, E. van den Kerckhove, C. Colla, R. van der Hulst, A. Piatkowski de Grzymala // *Adv Skin Wound Care.* – 2019. – Vol. 32. – P. 26-34.
134. Mustoe, T.A. International clinical recommendations on scar management / T.A. Mustoe, R.D. Cooter, M.H. Gold, F.D. Hobbs, A.A. Ramelet, P.G. Shakespeare, M. Stella, L. Teot, F.M. Wood, U.E. Ziegler, M. International Advisory Panel on Scar // *Plast Reconstr Surg.* – 2002. – Vol. 110. – P. 560-571.
135. Kelf, T.A. Scar tissue classification using nonlinear optical microscopy and discriminant analysis / T.A. Kelf, M. Gosnell, B. Sandnes, A.E. Guller, A.B. Shekhter, A.V. Zvyagin // *J Biophotonics.* – 2012. – Vol. 5. – P. 159-167.

136. Saulis, A.S. Silicone occlusive treatment of hypertrophic scar in the rabbit model / A.S. Saulis, J.D. Chao, A. Telser, J.E. Mogford, T.A. Mustoe // *Aesthet Surg J.* – 2002. – Vol. 22. – P. 147-153.

137. Kim, I. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring / I. Kim, J.E. Mogford, C. Witschi, M. Nafissi, T.A. Mustoe // *Wound Repair Regen.* – 2003. – Vol. 11. – P. 368-372.

138. Reid, R.R. Inhibition of procollagen C-proteinase reduces scar hypertrophy in a rabbit model of cutaneous scarring / R.R. Reid, J.E. Mogford, R. Butt, A. deGiorgio-Miller, T.A. Mustoe // *Wound Repair Regen.* – 2006. – Vol. 14. – P. 138-141.

139. Wang, H. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model / H. Wang, Z. Chen, X.J. Li, L. Ma, Y.L. Tang // *Eur J Pharmacol.* – 2015. – Vol. 751. – P. 42-49.

140. Commander, S.J. Update on Postsurgical Scar Management / S.J. Commander, E. Chamata, J. Cox, R.M. Dickey, E.I. Lee // *Semin Plast Surg.* – 2016. – Vol. 30. – P. 122-128.

141. Kloeters, O. Hypertrophic scar model in the rabbit ear: a reproducible model for studying scar tissue behavior with new observations on silicone gel sheeting for scar reduction / O. Kloeters, A. Tandara, T.A. Mustoe // *Wound Repair Regen.* – 2007. – Vol. 15 Suppl 1. – P. S40-45.

142. 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.

143. Perry, D.M. Current tools for noninvasive objective assessment of skin scars / D.M. Perry, D.A. McGrouther, A. Bayat // *Plast Reconstr Surg.* – 2010. – Vol. 126. – P. 912-923.

144. van den Broek, L.J. Human hypertrophic and keloid scar models: principles, limitations and future challenges from a tissue engineering perspective / L.J. van den

Broek, G.C. Limandjaja, F.B. Niessen, S. Gibbs // *Exp Dermatol.* – 2014. – Vol. 23. – P. 382-386.

145. Ramos, M.L. Is there an ideal animal model to study hypertrophic scarring? / M.L. Ramos, A. Gragnani, L.M. Ferreira // *J Burn Care Res.* – 2008. – Vol. 29. – P. 363-368.

146. Seo, B.F. Models of abnormal scarring / B.F. Seo, J.Y. Lee, S.N. Jung // *Biomed Res Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 423147.

147. Kleiner, L.W. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems / L.W. Kleiner, J.C. Wright, Y. Wang // *J Control Release.* – 2014. – Vol. 181. – P. 1-10.

148. Coleman, D.L. The foreign body reaction: a chronic inflammatory response / D.L. Coleman, R.N. King, J.D. Andrade // *J Biomed Mater Res.* – 1974. – Vol. 8. – P. 199-211.

149. Anderson, J.M. Foreign body reaction to biomaterials / J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang // *Semin Immunol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 86-100.

150. Brown, B.N. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine / B.N. Brown, B.D. Ratner, S.B. Goodman, S. Amar, S.F. Badylak // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – P. 3792-3802.

151. Spiller, K.L. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds / K.L. Spiller, S. Nassiri, C.E. Witherel, R.R. Anfang, J. Ng, K.R. Nakazawa, T. Yu, G. Vunjak-Novakovic // *Biomaterials.* – 2015. – Vol. 37. – P. 194-207.

152. Anderson, J.M. Phenotypic dichotomies in the foreign body reaction / J.M. Anderson, J.A. Jones // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – P. 5114-5120.

153. Veiseh, O. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates / O. Veiseh, J.C. Doloff, M. Ma, A.J. Vegas, H.H. Tam, A.R. Bader, J. Li, E. Langan, J. Wyckoff, W.S. Loo, S. Jhunjunwala, A. Chiu, S. Siebert, K. Tang, J. Hollister-Lock, S. Aresta-Dasilva, M. Bochenek, J. Mendoza-Elias, Y. Wang, M. Qi, D.M. Lavin, M. Chen, N. Dholakia, R. Thakrar, I. Lacik, G.C. Weir, J. Oberholzer, D.L. Greiner, R. Langer, D.G. Anderson // *Nat Mater.* – 2015. – Vol. 14. – P. 643-651.

154. Sridharan, R. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles / R. Sridharan, A.R. Cameron, D.J. Kelly, C.J. Kearney, F.J. O'Brien // *Materials Today*. – 2015. – Vol. 18. – P. 313-325.

155. Sridharan, R. Material stiffness influences the polarization state, function and migration mode of macrophages / R. Sridharan, B. Cavanagh, A.R. Cameron, D.J. Kelly, F.J. O'Brien // *Acta Biomater*. – 2019. – Vol. 89. – P. 47-59.

156. Noskovicova, N. Suppression of the fibrotic encapsulation of silicone implants by inhibiting the mechanical activation of pro-fibrotic TGF-beta / N. Noskovicova, R. Schuster, S. van Putten, M. Ezzo, A. Koehler, S. Boo, N.M. Coelho, D. Griggs, P. Ruminski, C.A. McCulloch, B. Hinz // *Nat Biomed Eng*. – 2021.

157. Dellacherie, M.O. Macroscale biomaterials strategies for local immunomodulation / M.O. Dellacherie, B.R. Seo, D.J. Mooney // *Nature Reviews Materials*. – 2019. – Vol. 4. – P. 379-397.

158. Miron, R.J. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? / R.J. Miron, D.D. Bosshardt // *Tissue Eng Part B Rev*. – 2018. – Vol. 24. – P. 53-65.

159. Mohtashami, Z. Pharmaceutical implants: classification, limitations and therapeutic applications / Z. Mohtashami, Z. Esmaili, M.A. Vakilinezhad, E. Seyedjafari, H. Akbari Javar // *Pharm Dev Technol*. – 2020. – Vol. 25. – P. 116-132.

160. 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.

161. Booler, H. Foreign Body Reaction, Retinal Degeneration, and Epiretinal Membranes Associated With Intravitreal Administration of PLGA Rods / H. Booler, T. Larsen, A. Shelton, V. Bansteev, M.S. Mitra // *Toxicol Pathol*. – 2021. – Vol. 49. – P. 656-662.

162. Morais, J.M. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response / J.M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess // *AAPS J*. – 2010. – Vol. 12. – P. 188-196.

163. Schaefer, C.J. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models / C.J. Schaefer, D.W. Ruhmund, L. Pan, S.D. Seiwert, K. Kossen // *Eur Respir Rev.* – 2011. – Vol. 20. – P. 85-97.

164. Conte, E. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF-beta-induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts / E. Conte, E. Gili, E. Fagone, M. Fruciano, M. Iemmolo, C. Vancheri // *Eur J Pharm Sci.* – 2014. – Vol. 58. – P. 13-19.

165. Grattendick, K.J. Effects of three anti-TNF-alpha drugs: etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF-alpha in medium and TNF-alpha associated with the cell in vitro / K.J. Grattendick, J.M. Nakashima, L. Feng, S.N. Giri, S.B. Margolin // *Int Immunopharmacol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 679-687.

166. Cain, W.C. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone / W.C. Cain, R.W. Stuart, D.L. Lefkowitz, J.D. Starnes, S. Margolin, S.S. Lefkowitz // *Int J Immunopharmacol.* – 1998. – Vol. 20. – P. 685-695.

167. Misra, H.P. Pirfenidone inhibits NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and scavenges hydroxyl radicals / H.P. Misra, C. Rabideau // *Mol Cell Biochem.* – 2000. – Vol. 204. – P. 119-126.

168. Seto, Y. Photosafety assessments on pirfenidone: photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization / Y. Seto, R. Inoue, M. Kato, S. Yamada, S. Onoue // *J Photochem Photobiol B.* – 2013. – Vol. 120. – P. 44-51.

169. Mecott, G.A. Efficacy and Safety of Pirfenidone in Patients with Second-Degree Burns: A Proof-of-Concept Randomized Controlled Trial / G.A. Mecott, I. Gonzalez-Cantu, E.G. Dorsey-Trevino, D. Matta-Yee-Chig, O. Saucedo-Cardenas, R. Montes de Oca-Luna, S. Perez-Porras, M.M. Garcia-Perez // *Adv Skin Wound Care.* – 2020. – Vol. 33. – P. 1-7.

170. Poo, J.L. Benefits of prolonged-release pirfenidone plus standard of care treatment in patients with advanced liver fibrosis: PROMETEO study / J.L. Poo, A. Torre, J.R. Aguilar-Ramirez, M. Cruz, L. Mejia-Cuan, E. Cerda, A. Velazquez, A. Patino, C. Ramirez-Castillo, L. Cisneros, F. Bosques-Padilla, L. Hernandez, F. Gasca, F. Flores-

Murrieta, S. Trevino, G. Tapia, J. Armendariz-Borunda, L.E. Munoz-Espinosa // *Hepato Int.* – 2020. – Vol. 14. – P. 817-827.

171. Qiu, Z.Z. Renoprotective effects of pirfenidone on chronic renal allograft dysfunction by reducing renal interstitial fibrosis in a rat model / Z.Z. Qiu, J.M. He, H.X. Zhang, Z.H. Yu, Z.W. Zhang, H. Zhou // *Life Sci.* – 2019. – Vol. 233. – P. 116666.

172. Gasca-Lozano, L.E. Pirfenidone Accelerates Wound Healing in Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Randomized, Double-Blind Controlled Trial / L.E. Gasca-Lozano, S. Lucano-Landeros, H. Ruiz-Mercado, A. Salazar-Montes, A. Sandoval-Rodriguez, J. Garcia-Banuelos, A. Santos-Garcia, J.R. Davila-Rodriguez, J. Navarro-Partida, H. Bojorquez-Sepulveda, J. Castaneda-Gomez, J. Dominguez-Rosales, M.A. Ruiz-Arcos, M.G. Sanchez-Parada, J. Armendariz-Borunda // *J Diabetes Res.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 3159798.

173. Kasar, K. The effect of halofuginone and pirfenidone on wound healing in experimental glaucoma filtration surgery / K. Kasar, T. Demir, M.M. Akin, S. Gungor Kobat // *J Fr Ophtalmol.* – 2021. – Vol. 44. – P. 340-349.

174. Jung, K.I. Pirfenidone inhibits fibrosis in foreign body reaction after glaucoma drainage device implantation / K.I. Jung, C.K. Park // *Drug Des Devel Ther.* – 2016. – Vol. 10. – P. 1477-1488.

175. Walker, J.E. Pirfenidone for chronic progressive multiple sclerosis / J.E. Walker, S.B. Margolin // *Mult Scler.* – 2001. – Vol. 7. – P. 305-312.

176. Burghardt, I. Pirfenidone inhibits TGF-beta expression in malignant glioma cells / I. Burghardt, F. Tritschler, C.A. Opitz, B. Frank, M. Weller, W. Wick // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 354. – P. 542-547.

177. Kozono, S. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells / S. Kozono, K. Ohuchida, D. Eguchi, N. Ikenaga, K. Fujiwara, L. Cui, K. Mizumoto, M. Tanaka // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – P. 2345-2356.

178. Widemann, B.C. Phase II trial of pirfenidone in children and young adults with neurofibromatosis type 1 and progressive plexiform neurofibromas / B.C. Widemann, D. Babovic-Vuksanovic, E. Dombi, P.L. Wolters, S. Goldman, S. Martin, A. Goodwin, W. Goodspeed, M.W. Kieran, B. Cohen, S.M. Blaney, A. King, J. Solomon,

N. Patronas, F.M. Balis, E. Fox, S.M. Steinberg, R.J. Packer // *Pediatr Blood Cancer*. – 2014. – Vol. 61. – P. 1598-1602.

179. Mediavilla-Varela, M. The anti-fibrotic agent pirfenidone synergizes with cisplatin in killing tumor cells and cancer-associated fibroblasts / M. Mediavilla-Varela, K. Boateng, D. Noyes, S.J. Antonia // *BMC Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – P. 176.

180. Fujiwara, A. Pirfenidone plays a biphasic role in inhibition of epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer / A. Fujiwara, Y. Shintani, S. Funaki, T. Kawamura, T. Kimura, M. Minami, M. Okumura // *Lung Cancer*. – 2017. – Vol. 106. – P. 8-16.

181. Polydorou, C. Pirfenidone normalizes the tumor microenvironment to improve chemotherapy / C. Polydorou, F. Mpekris, P. Papageorgis, C. Voutouri, T. Stylianopoulos // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 24506-24517.

182. Marwitz, S. The Multi-Modal Effect of the Anti-fibrotic Drug Pirfenidone on NSCLC / S. Marwitz, K. Turkowski, D. Nitschkowski, A. Weigert, J. Brandenburg, N. Reiling, M. Thomas, M. Reck, D. Dromann, W. Seeger, K.F. Rabe, R. Savai, T. Goldmann // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1550.

183. Aboukheyr Es, H. Pirfenidone reduces immune-suppressive capacity of cancer-associated fibroblasts through targeting CCL17 and TNF-beta / H. Aboukheyr Es, S. Zhand, J.P. Thiery, M.E. Warkiani // *Integr Biol (Camb)*. – 2020. – Vol. 12. – P. 188-197.

184. Costabel, U. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis: expert panel discussion on the management of drug-related adverse events / U. Costabel, E. Bendstrup, V. Cottin, P. Dewint, J.J. Egan, J. Ferguson, R. Groves, P.M. Hellstrom, M. Kreuter, T.M. Maher, M. Molina-Molina, K. Nordlind, A. Sarafidis, C. Vancheri // *Adv Ther*. – 2014. – Vol. 31. – P. 375-391.

185. Trivedi, R. Local delivery of biodegradable pirfenidone nanoparticles ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice / R. Trivedi, E.F. Redente, A. Thakur, D.W. Riches, U.B. Kompella // *Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 23. – P. 505101.

186. Chowdhury, S. Pirfenidone nanoparticles improve corneal wound healing and prevent scarring following alkali burn / S. Chowdhury, R. Guha, R. Trivedi, U.B. Kompella, A. Konar, S. Hazra // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – P. e70528.

187. Meng, H. Pirfenidone-loaded liposomes for lung targeting: preparation and in vitro/in vivo evaluation / H. Meng, Y. Xu // *Drug Des Devel Ther*. – 2015. – Vol. 9. – P. 3369-3376.

188. Kumari, N. Enhancing the Pharmaceutical Properties of Pirfenidone by Mechanochemical Cocrystallization / N. Kumari, B. Bhattacharya, P. Roy, A.A.L. Michalchuk, F. Emmerling, A. Ghosh // *Crystal Growth & Design*. – 2019. – Vol. 19. – P. 6482-6492.

189. Armendariz-Borunda, J. A controlled clinical trial with pirfenidone in the treatment of pathological skin scarring caused by burns in pediatric patients / J. Armendariz-Borunda, I. Lyra-Gonzalez, D. Medina-Preciado, I. Gonzalez-Garcia, D. Martinez-Fong, R.A. Miranda, R. Magana-Castro, P. Pena-Santoyo, S. Garcia-Rocha, C.A. Bautista, J. Godoy, J. Flores-Montana, J. Floresvillar-Mosqueda, O. Armendariz-Vazquez, M.S. Lucano-Landeros, M. Vazquez-Del Mercado, M.G. Sanchez-Parada // *Ann Plast Surg*. – 2012. – Vol. 68. – P. 22-28.

190. Gancedo, M. Pirfenidone prevents capsular contracture after mammary implantation / M. Gancedo, L. Ruiz-Corro, A. Salazar-Montes, A.R. Rincon, J. Armendariz-Borunda // *Aesthetic Plast Surg*. – 2008. – Vol. 32. – P. 32-40.

191. da Silva, D. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems / D. da Silva, M. Kaduri, M. Poley, O. Adir, N. Krinsky, J. Shainsky-Roitman, A. Schroeder // *Chem Eng J*. – 2018. – Vol. 340. – P. 9-14.

192. Tyler, B. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications / B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, H. Brem // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2016. – Vol. 107. – P. 163-175.

193. Gasteiger, E. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis / E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch // *Nucleic Acids Res*. – 2003. – Vol. 31. – P. 3784-3788.

194. Farndale, R.W. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue / R.W. Farndale, D.J. Buttle, A.J. Barrett // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1986. – Vol. 883. – P. 173-177.

195. Churbanov, S.N. Features of Polymeric Structures By Surface—Selective Laser Sintering of Polymer Particles Using Water as Sensitizer / S.N. Churbanov, N.V. Minaev, V.D. Grinchenko, S.A. Minaeva, V.N. Bagratashvili, P.S. Timashev // *KnE Energy*. – 2018. – Vol. 3.

196. Mazzoli, A. Particle size, size distribution and morphological evaluation of airborne dust particles of diverse woods by Scanning Electron Microscopy and image processing program / A. Mazzoli, O. Favoni // *Powder Technology*. – 2012. – Vol. 225. – P. 65-71.

197. Kokorin, A. Nitroxides: Theory, Experiment and Applications / A. Kokorin IntechOpen, 2012.

198. Parmar, V.K. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Pirfenidone in Pharmaceutical Formulations / V.K. Parmar, S.B. Desai, T. Vaja // *Indian J Pharm Sci*. – 2014. – Vol. 76. – P. 225-229.

199. le Lous, M. Influence of collagen denaturation on the chemorheological properties of skin, assessed by differential scanning calorimetry and hydrothermal isometric tension measurement / M. le Lous, F. Flandin, D. Herbage, J.C. Allain // *Biochim Biophys Acta*. – 1982. – Vol. 717. – P. 295-300.

200. Kronick, P. The locations of collagens with different thermal stabilities in fibrils of bovine reticular dermis / P. Kronick, B. Maleeff, R. Carroll // *Connect Tissue Res*. – 1988. – Vol. 18. – P. 123-134.

201. Saulis, A.S. Effect of Mederma on hypertrophic scarring in the rabbit ear model / A.S. Saulis, J.H. Mogford, T.A. Mustoe // *Plast Reconstr Surg*. – 2002. – Vol. 110. – P. 177-183; discussion 184-176.

202. Reid, R.R. Reduction of hypertrophic scar via retroviral delivery of a dominant negative TGF-beta receptor II / R.R. Reid, N. Roy, J.E. Mogford, H.

Zimmerman, C. Lee, T.A. Mustoe // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2007. – Vol. 60. – P. 64-72; discussion 73-64.

203. Tandara, A.A. The role of the epidermis in the control of scarring: evidence for mechanism of action for silicone gel / A.A. Tandara, T.A. Mustoe // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2008. – Vol. 61. – P. 1219-1225.

204. Tollefson, T.T. Comparison of effectiveness of silicone gel sheeting with microporous paper tape in the prevention of hypertrophic scarring in a rabbit model / T.T. Tollefson, F. Kamangar, S. Aminpour, A. Lee, B. Durbin-Johnson, S. Tinling // *Arch Facial Plast Surg.* – 2012. – Vol. 14. – P. 45-51.

205. Zhang, H. Curative effects of oleanolic Acid on formed hypertrophic scars in the rabbit ear model / H. Zhang, Y. Zhang, Y.P. Jiang, L.K. Zhang, C. Peng, K. He, K. Rahman, L.P. Qin // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 837581.

206. Friedrich, E.E. Thermal injury model in the rabbit ear with quantifiable burn progression and hypertrophic scar / E.E. Friedrich, S. Niknam-Bienia, P. Xie, S.X. Jia, S.J. Hong, T.A. Mustoe, R.D. Galiano // *Wound Repair Regen.* – 2017. – Vol. 25. – P. 327-337.

207. Zhu, J. Gene expression profile analysis on different stages of hypertrophic scarring in a rabbit ear model / J. Zhu, M. Sun, Y. Wang, H. Bi, C. Xue // *Exp Ther Med.* – 2020. – Vol. 20. – P. 1505-1513.

208. Xiang, J. Establishment of an animal model with hypertrophic scar / J. Xiang, Z.Y. Wang, S.X. Jia, S.W. Jin, S.L. Lu, Z.J. Liao // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* – 2004. – Vol. 20. – P. 281-283.

209. Hayakawa, T. Lysyl oxidase activity in human normal skins and postburn scars / T. Hayakawa, N. Hino, H. Fuyamada, T. Nagatsu, H. Aoyama // *Clin Chim Acta.* – 1976. – Vol. 71. – P. 245-250.

210. Verhaegen, P.D. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis / P.D. Verhaegen, P.P. van Zuijlen, N.M. Pennings, J. van Marle, F.B. Niessen,

C.M. van der Horst, E. Middelkoop // *Wound Repair Regen.* – 2009. – Vol. 17. – P. 649-656.

211. Blumenkrantz, N. Hydroxyproline to hydroxylysine molar ratio indicates collagen type / N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen // *Acta Derm Venereol.* – 1978. – Vol. 58. – P. 111-115.

212. Hayakawa, T. Prolyl hydroxylase activity in human normal skins and post-burn scars / T. Hayakawa, M. Hino, H. Fuyamada, T. Nagatsu, H. Aoyama // *Clin Chim Acta.* – 1977. – Vol. 75. – P. 137-142.

213. Ignat'eva, N.Y. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues / N.Y. Ignat'eva, N.A. Danilov, S.V. Averkiev, M.V. Obrezkova, V.V. Lunin, E.N. Sobol' // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2007. – Vol. 62. – P. 51-57.

214. Savage, K. A comparison of glycosaminoglycan synthesis by human fibroblasts from normal skin, normal scar, and hypertrophic scar / K. Savage, D.A. Swann // *J Invest Dermatol.* – 1985. – Vol. 84. – P. 521-526.

215. Sasarman, F. Biosynthesis of glycosaminoglycans: associated disorders and biochemical tests / F. Sasarman, C. Maftai, P.M. Campeau, C. Brunel-Guitton, G.A. Mitchell, P. Allard // *J Inherit Metab Dis.* – 2016. – Vol. 39. – P. 173-188.

216. Reeds, P.J. Energy costs of protein and fatty acid synthesis / P.J. Reeds, K.W. Wahle, P. Haggarty // *Proc Nutr Soc.* – 1982. – Vol. 41. – P. 155-159.

217. Ghiselli, G. Drug-Mediated Regulation of Glycosaminoglycan Biosynthesis / G. Ghiselli // *Med Res Rev.* – 2017. – Vol. 37. – P. 1051-1094.

218. Sobol, E. Laser-induced regeneration of cartilage / E. Sobol, A. Shekhter, A. Guller, O. Baum, A. Baskov // *J Biomed Opt.* – 2011. – Vol. 16. – P. 080902.

219. Volpi, N. Therapeutic applications of glycosaminoglycans / N. Volpi // *Curr Med Chem.* – 2006. – Vol. 13. – P. 1799-1810.

220. Liu, Y. Effects of chondroitinase on hypertrophic scar in rabbit ears / Y. Liu, L.-j. Hao, J.-h. Pang // *Chinese Journal of Aesthetic and Plastic Surgery.* – 2006. – Vol. 17. – P. 336-339.

221. Ishiko, T. Chondroitinase injection improves keloid pathology by reorganizing the extracellular matrix with regenerated elastic fibers / T. Ishiko, M. Naitoh, H. Kubota, S. Yamawaki, M. Ikeda, K. Yoshikawa, H. Fujita, H. Yamaguchi, Y. Kurahashi, S. Suzuki // *J Dermatol.* – 2013. – Vol. 40. – P. 380-383.

222. Roth, M. Biological Function of Glycosaminoglycans / M. Roth, E. Papakonstantinou, G. Karakiulakis // *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications* – Oxford: Elsevier, 2008. – P. 209-226.

223. Horigome, T. Sulfated glycosaminoglycans and non-classically secreted proteins, basic FGF and epimorphin, coordinately regulate TGF-beta-induced cell behaviors of human scar dermal fibroblasts / T. Horigome, S. Takumi, K. Shirai, T. Kido, N. Hagiwara-Chatani, A. Nakashima, N. Adachi, H. Yano, Y. Hirai // *J Dermatol Sci.* – 2017. – Vol. 86. – P. 132-141.

224. Shetlar, M.R. Glycosaminoglycans in Granulation-Tissue and Hypertrophic Scars / M.R. Shetlar, C.L. Shetlar, C.W. Kischer // *Burns.* – 1981. – Vol. 8. – P. 27-31.

225. Shetlar, M.R. The hypertrophic scar. Hexosamine containing components of burn scars / M.R. Shetlar, C.L. Shetlar, S.F. Chien, H.A. Linares, M. Dobrkovsky, D.L. Larson // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1972. – Vol. 139. – P. 544-547.

226. Shetlar, M.R. The hypertrophic scar: Location of glycosaminoglycans within scars / M.R. Shetlar, C.L. Shetlar, H.A. Linares // *Burns.* – 1977. – Vol. 4. – P. 14-19.

227. Alexander, S.A. The Histochemistry of Glycosaminoglycans within Hypertrophic Scars / S.A. Alexander, R.B. Donoff // *Journal of Surgical Research.* – 1980. – Vol. 28. – P. 171-181.

228. Donoff, R.B. Glycosaminoglycans of normal and hypertrophic human scar / R.B. Donoff, D.A. Swann, S.H. Schweidt // *Exp Mol Pathol.* – 1984. – Vol. 40. – P. 13-20.

229. Dunn, M.G. Mechanical analysis of hypertrophic scar tissue: structural basis for apparent increased rigidity / M.G. Dunn, F.H. Silver, D.A. Swann // *J Invest Dermatol.* – 1985. – Vol. 84. – P. 9-13.

230. Swann, D.A. Studies on human scar tissue proteoglycans / D.A. Swann, H.G. Garg, W. Jung, H. Hermann // *J Invest Dermatol.* – 1985. – Vol. 84. – P. 527-531.

231. Honda, T. The proteoglycans in hypertrophic scar / T. Honda, E. Matsunaga, K. Katagiri, H. Shinkai // *J Dermatol.* – 1986. – Vol. 13. – P. 326-333.
232. Shetlar, M.R. Implants of keloid and hypertrophic scars into the athymic nude mouse: changes in the glycosaminoglycans of the implants / M.R. Shetlar, C.L. Shetlar, C.W. Kischer, J. Pindur // *Connect Tissue Res.* – 1991. – Vol. 26. – P. 23-36.
233. Scott, P.G. Immunohistochemical localization of the proteoglycans decorin, biglycan and versican and transforming growth factor-beta in human post-burn hypertrophic and mature scars / P.G. Scott, C.M. Dodd, E.E. Tredget, A. Ghahary, F. Rahemtulla // *Histopathology.* – 1995. – Vol. 26. – P. 423-431.
234. Scott, P.G. Chemical characterization and quantification of proteoglycans in human post-burn hypertrophic and mature scars / P.G. Scott, C.M. Dodd, E.E. Tredget, A. Ghahary, F. Rahemtulla // *Clin Sci (Lond).* – 1996. – Vol. 90. – P. 417-425.
235. Kozma, E.M. An accumulation of proteoglycans in scarred fascia / E.M. Kozma, K. Olczyk, A. Glowacki, R. Bobinski // *Mol Cell Biochem.* – 2000. – Vol. 203. – P. 103-112.
236. Varkey, M. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar / M. Varkey, J. Ding, E.E. Tredget // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – P. 7581-7591.
237. Sidgwick, G.P. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring / G.P. Sidgwick, A. Bayat // *J Eur Acad Dermatol Venereol.* – 2012. – Vol. 26. – P. 141-152.
238. Lingzhi, Z. Biological approaches for hypertrophic scars / Z. Lingzhi, L. Meirong, F. Xiaobing // *Int Wound J.* – 2020. – Vol. 17. – P. 405-418.
239. Schilter, H. The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis / H. Schilter, A.D. Findlay, L. Perryman, T.T. Yow, J. Moses, A. Zahoor, C.I. Turner, M. Deodhar, J.S. Foot, W. Zhou, A. Greco, A. Joshi, B. Rayner, S. Townsend, A. Buson, W. Jarolimek // *J Cell Mol Med.* – 2019. – Vol. 23. – P. 1759-1770.
240. Tjin, G. Lysyl oxidases regulate fibrillar collagen remodelling in idiopathic pulmonary fibrosis / G. Tjin, E.S. White, A. Faiz, D. Sicard, D.J. Tschumperlin, A.

Mahar, E.P.W. Kable, J.K. Burgess // *Dis Model Mech.* – 2017. – Vol. 10. – P. 1301-1312.

241. Bingham, G.C. Spatial-omics: Novel approaches to probe cell heterogeneity and extracellular matrix biology / G.C. Bingham, F. Lee, A. Naba, T.H. Barker // *Matrix Biol.* – 2020. – Vol. 91-92. – P. 152-166.

242. Naba, A. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era / A. Naba, K.R. Clauser, H. Ding, C.A. Whittaker, S.A. Carr, R.O. Hynes // *Matrix Biol.* – 2016. – Vol. 49. – P. 10-24.

243. 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.

244. George, P.M. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics / P.M. George, A.W. Lyckman, D.A. LaVan, A. Hegde, Y. Leung, R. Avasare, C. Testa, P.M. Alexander, R. Langer, M. Sur // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 3511-3519.

245. Bose, S. A retrievable implant for the long-term encapsulation and survival of therapeutic xenogeneic cells / S. Bose, L.R. Volpatti, D. Thiono, V. Yesilyurt, C. McGladrigan, Y. Tang, A. Facklam, A. Wang, S. Jhunjhunwala, O. Veiseh, J. Hollister-Lock, C. Bhattacharya, G.C. Weir, D.L. Greiner, R. Langer, D.G. Anderson // *Nat Biomed Eng.* – 2020. – Vol. 4. – P. 814-826.

246. Rohner, N.A. Affinity Effects on the Release of Non-Conventional Antifibrotics from Polymer Depots / N.A. Rohner, D. Nguyen, H.A. von Recum // *Pharmaceutics.* – 2020. – Vol. 12. – P. 275.

247. 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.

248. Timashev, P. Formation of porous matrices from lactide and  $\epsilon$ -caprolactone copolymers in supercritical carbon dioxide medium / P. Timashev, N. Vorobieva, N. Minaev, Y.A. Piskun, I. Vasilenko, S. Lakeev, S. Kostyuk, V. Lunin, V.J.R.J.o.P.C.B. Bagratashvili // . – 2016. – Vol. 10. – P. 1195-1200.

249. Stahnke, T. Development of a biodegradable antifibrotic local drug delivery system for glaucoma microstents / T. Stahnke, S. Siewert, T. Reske, W. Schmidt, K.P. Schmitz, N. Grabow, R.F. Guthoff, A. Wree // Biosci Rep. – 2018. – Vol. 38.

250. Wu, C. Controllable release of pirfenidone by polyvinyl alcohol film embedded soft contact lenses in vitro and in vivo / C. Wu, P.W. Or, J.I.T. Chong, K.P.D. IK, C.H.C. Lee, K. Wu, M. Yu, D.C.C. Lam, Y. Yang // Drug Deliv. – 2021. – Vol. 28. – P. 634-641.

251. Zandstra, J. Microsphere size influences the foreign body reaction / J. Zandstra, C. Hiemstra, A.H. Petersen, J. Zuidema, M.M. van Beuge, S. Rodriguez, A.A. Lathuile, G.J. Veldhuis, R. Steendam, R.A. Bank, E.R. Popa // Eur Cell Mater. – 2014. – Vol. 28. – P. 335-347.

252. Gangapurwala, G. PLA/PLGA-Based Drug Delivery Systems Produced with Supercritical CO<sub>2</sub>-A Green Future for Particle Formulation? / G. Gangapurwala, A. Vollrath, A. De San Luis, U.S. Schubert // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – P. 1118.

253. Seyyedi, M. Intracochlear inflammatory response to cochlear implant electrodes in the human / M. Seyyedi, J.B. Nadol Jr // Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society and European Academy of Otology and Neurotology. – 2014. – Vol. 35. – P. 1545.

254. Eming, S.A. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration / S.A. Eming, T.A. Wynn, P. Martin // Science. – 2017. – Vol. 356. – P. 1026-1030.

255. 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.

256. Veras-Castillo, E.R. Controlled clinical trial with pirfenidone in the treatment of breast capsular contracture: association of TGF-beta polymorphisms / E.R. Veras-Castillo, L. Cardenas-Camarena, I. Lyra-Gonzalez, J.F. Munoz-Valle, S. Lucano-Landeros, J. Guerrerosantos, B. Gonzalez-Ulloa, J.L. Mercado-Barajas, M.G. Sanchez-Parada, R. Azabache-Wennceslao, J. Armendariz-Borunda // *Ann Plast Surg.* – 2013. – Vol. 70. – P. 16-22.

257. 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.

258. 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.

259. Saito, M. Pirfenidone suppresses keloid fibroblast-embedded collagen gel contraction / M. Saito, M. Yamazaki, T. Maeda, H. Matsumura, Y. Setoguchi, R. Tsuboi // *Arch Dermatol Res.* – 2012. – Vol. 304. – P. 217-222.

260. Toda, M. Pirfenidone suppresses polarization to M2 phenotype macrophages and the fibrogenic activity of rat lung fibroblasts / M. Toda, S. Mizuguchi, Y. Minamiyama, H. Yamamoto-Oka, T. Aota, S. Kubo, N. Nishiyama, T. Shibata, S. Takemura // *J Clin Biochem Nutr.* – 2018. – Vol. 63. – P. 58-65.