

ЛАЗЕРНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И ОПТИЧЕСКАЯ ТКАНЕВАЯ ОКСИМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ФИБРОЗА КОЖИ

Ю.В. Чурсинова¹, Д.А. Куликов¹, Д.А. Рогаткин¹, И.А. Разницына^{1,2}, Д.В. Мосальская¹, М.А. Бобров¹, Е.Н. Петрицкая¹, А.В. Молочков¹

¹Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского), Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Резюме

В современной медицинской практике нет эффективных мер борьбы с фиброзом. Одна из причин – поздняя диагностика, связанная с отсутствием доступных клинических биомаркеров и эффективных методов неинвазивного обнаружения этого процесса. Фиброзирующие заболевания кожи характеризуются фиброзом дермы, подлежащих тканей и представлены широким спектром нозологий. Наибольший интерес для изучения представляют склеродермия и рубцы кожи. На экспериментальной модели методами лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии изучены изменения кожи в рамках развития блеомицин-индуцированного фиброза. Выявлен достоверный рост показателей эндогенной флуоресценции порфиринов на 7 и на 21 сут, вызванный воспалением и гипоксией. Зафиксированы повышение интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена и снижение показателей удельного потребления кислорода на 21 сут исследования, связанные с избыточным накоплением межклеточного матрикса. Синхронные измерения флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода позволили провести корреляцию с фазами фиброгенного ответа, описанного морфологически. Полученные результаты позволяют судить о выраженности воспаления и гипоксии в процессе развития фиброза. Объективный и количественный характер регистрируемых параметров дает возможность разработки критериев для диагностики фаз развития фиброза.

Ключевые слова: фиброз, лазерная флуоресцентная спектроскопия, оптическая тканевая оксиметрия, диагностика *in vivo*.

Для цитирования: Чурсинова Ю.В., Куликов Д.А., Рогаткин Д.А., Разницына И.А., Мосальская Д.В., Бобров М.А., Петрицкая Е. Н., Молочков А.В. Лазерная флуоресцентная спектроскопия и оптическая тканевая оксиметрия в диагностике фиброза кожи // Biomedical Photonics. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 38–45. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-38-45.

Контакты: Чурсинова Ю.В., e-mail: yu.chursinova@monikiweb.ru

LASER FLUORESCENT SPECTROSCOPY AND OPTICAL TISSUE OXIMETRY IN DIAGNOSTICS OF SKIN FIBROSIS

Chursinova Yu.V.¹, Kulikov D.A.¹, Rogatkin D.A.¹, Raznitsyna I.A.^{1,2}, Mosalskaya D.V.¹, Bobrov M.A.¹, Petritskaya E.N.¹, Molochkov A.V.¹

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI"), Moscow, Russia

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

Abstract

There are currently no effective measures to combat fibrosis in modern medical practice. One of the reasons for that is the late diagnosis associated with the lack of available clinical biomarkers and effective methods of non-invasive detection of the process. Fibrosis of the skin is characterized by fibrosis of the dermis, underlying tissues and is represented by a wide range of nosologies. Scleroderma and scars are of the greatest interest for the study. Skin changes in the development of bleomycin-induced fibrosis was studied in the experimental model using laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry. A significant increase in the rates of endogenous fluorescence of porphyrins, caused by inflammation and hypoxia, was detected at 7 and 21 days. An increased intensity of endogenous collagen fluorescence and a decreased specific oxygen uptake due to excess accumulation of the extracellular matrix were recorded on the 21st day after bleomycin treatment. Synchronous measurements of the collagen fluorescence and the specific oxygen uptake allowed to correlate the obtained data and the phases of the fibrogenic response described morphologically. The results allow to judge the severity of inflammation and hypoxia in the process of the fibrosis development. The objective and quantitative nature of the recorded parameters makes it possible to develop criteria for diagnosing the phases of fibrosis development.

Keywords: fibrosis, laser fluorescence spectroscopy, optical tissue oximetry, diagnostics *in vivo*

For citations: Chursinova Yu.V., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., Raznitsyna I.A., Mosalskaya D.V., Bobrov M.A., Petritskaya E. N., Molochkov A.V. Laser fluorescence spectroscopy and optical tissue oximetry in the diagnosis of skin fibrosis, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1 pp. 38–45 (in Russ.). doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–38–45.

Contacts: Chursinova Yu.V., e-mail: yu.chursinova@monikiweb.ru

Введение

Системный и органнй фиброз представляют собой одну из серьезных медицинских проблем, затрагивающих значительную долю населения земного шара [1]. Фиброз является ведущим процессом при развитии аутоиммунных состояний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, системная красная волчанка, а также при заболеваниях печени, почек, легочном альвеолите и сердечной недостаточности [2].

В отечественной медицинской школе избыточное накопление соединительной ткани в коже принято обозначать как склероз, являющийся конечным этапом фиброзирования тканей, с потерей функций органа [3]. Сегодня в периодических изданиях, всё чаще процессы накопления и дезорганизации соединительной ткани обозначаются фиброзом [4].

Фиброз кожи наиболее часто проявляется склеродермией, гипертрофическими и келоидными рубцами [5]. Фиброзные изменения при этом могут иметь различную степень тяжести: от косметических дефектов при рубцовой деформации до жизнеугрожающих состояний при системной склеродермии [6–8]. Патогенез фиброза кожи при разных заболеваниях имеет схожие черты и характеризуется пролиферацией фибробластов, миофибробластов, чрезмерным синтезом и накоплением соединительной ткани [9]. Активация фибробластов всегда является ключевым звеном в фиброзе кожи [10]. Известно, что хроническое воспаление, инфекция, аутоиммунные и аллергические реакции, а также повреждение кожи вследствие излучения или химического воздействия вызывают их неконтролируемую пролиферацию. Стойкая активация фибробластов при этом способствует избыточному синтезу межклеточного вещества, в основном состоящего из коллагена, эластина, не коллагенового гликопротеина и протеогликана [11]. Результатом чрезмерного синтеза волокон и осаждения межклеточного матрикса является фиброз кожи.

В научной литературе обсуждается точка зрения, описывающая фиброз не как исход повреждения тканей, но как динамически протекающий и обратимый процесс, связанный с воспалением и гипоксией [12, 13], своевременное воздействие на которые повышает терапевтические возможности [14]. Так обоснованный выбор метода лечения формирующихся гипертрофи-

ческих и келоидных рубцов опирается на понимание преобладающего в нем процесса (воспаление-гипоксия-фиброз). Исследования в этой области показывают, что реакция фиброзированных тканей на тот или иной вид лечения зависит от адекватности действующего лечебного фактора характеру патологического процесса, определяющего функциональное состояние ткани [15]. Клиницисту объективно определить активность и вклад отдельных процессов (воспаление-гипоксия-фиброз) в процессе осмотра не представляется возможным. Гистологическое исследование позволяет получить дополнительный объем объективной информации, однако процесс забора биологического материала (биопсия) может стать причиной последующего избыточного роста рубца [16]. Сегодня отсутствуют общепринятые алгоритмы выбора метода лечения рубцов, а тактика лечения конкретного пациента основана на личном опыте врача и традициях отдельных клинических школ и организаций [17].

Анализ современных исследований показал, что неинвазивные методы диагностики фиброза кожи, такие как ультразвуковое исследование, эластография, конфокальная микроскопия, оптическая когерентная томография, до сих пор не нашли своего широкого применения в повседневной медицинской практике. Прежде всего это связано с отсутствием критериев, достоверно характеризующих фиброз [18]. Поэтому с уверенностью можно говорить, что вопрос разработки способа быстрой, неинвазивной, количественной оценки фиброза остается актуальным для медицины. Мы полагаем, что оптические технологии могут иметь диагностический потенциал, который может стать основой принципиально нового подхода к комплексной оценке этого процесса. Например, известно, что избыток коллагена можно зафиксировать методом лазерной флуоресцентной спектроскопии, так как под воздействием света в УФ-диапазоне это вещество флуоресцирует [19], а в красном и зеленом спектре также можно обнаружить флуорофоры, ответственные за воспаление и гипоксию [20]. Методы оптической тканевой оксиметрии позволяют определить удельное потребление кислорода тканями, что характеризует активность пролиферативных процессов. Поэтому, предположительно, результаты лазерной флуоресцентной спектроско-

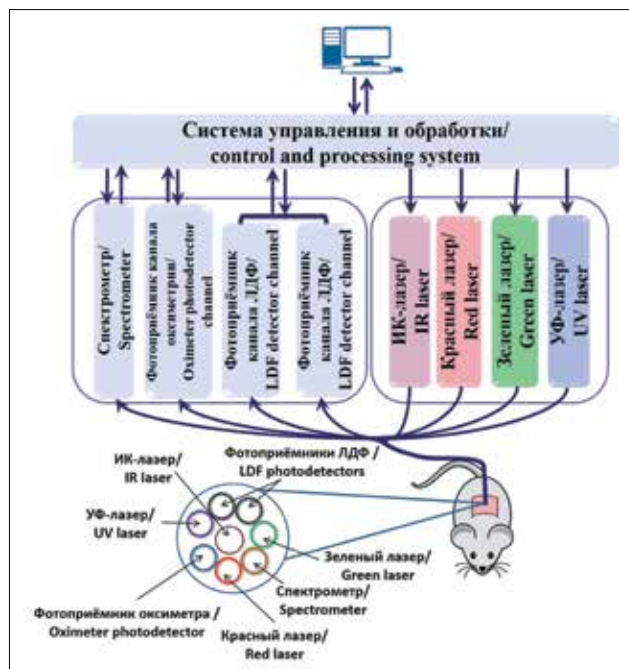


Рис. 1. Схема экспериментальной установки и расположение осветительных и приёмных волокон в оптоволоконном жгуте
Fig. 1. Experimental setup and location of illuminating and receiving optical fibers in the probe

пии и оптической тканевой оксиметрии в совокупности могли бы помочь в определении ведущего патологического процесса, что позволит персонализировано подойти к подбору терапии.

Целью нашей работы стало изучение диагностических возможностей оптических методов лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии при оценке фиброза кожи животных.

Материалы и методы

Исследование проводилось на беспородных белых мышах, самцах, в возрасте 6 нед, массой 25–30 г в количестве (N) 47 голов. Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре 21–23°C, влажности 50–65%, 14-часовом дневном освещении. Они получали сбалансированный гранулированный корм, не содержащий флуорофоры, доступ к питьевой воде был свободным.

Эксперимент выполнен с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

Для создания фиброза использовалась релевантная модель фиброза кожи на животных, которая

используется при изучении склеродермии и рубцовых изменений кожи [21, 22]. Животные были разделены на 2 группы. Первой группе ($N=30$) вводились подкожные инъекции блеомцина (BLM) в дозировке 0,1 мл (концентрация 0,5 мг/мл). Второй (контрольной) группе ($N=17$) вводились подкожные инъекции 0,1 мл 0,9% NaCl (PBS). Всем животным инъекции проводились ежедневно в течение 21 сут в предварительно депилированную кожу межлопаточной области спины. Первые четыре инъекции осуществлялись в вершины предварительно обозначенного маркером квадрата размером 1 см², пятая – в центр квадрата.

На 0, 7, 14 и 21 сут проводились измерения интенсивности эндогенной флуоресценции, тканевой сатурации оксигемоглобина и объемного кровенаполнения кожи *in vivo*. Показания снимались с поверхности кожи непосредственно над экспериментальной областью (рис. 1). Все измерения проводились на многофункциональном лазерном диагностическом комплексе «ЛАКК-М» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) [23].

На рис. 1 представлена принципиальная схема комплекса «ЛАКК-М». Комплекс работает в режимах «флуоресценция» и «микроциркуляция». В режиме «микроциркуляция» комплекс непрерывно измеряет насыщение гемоглобина кислородом и объем фракции гемоглобина в зондируемой области исследования. Вычисление данных показателей производится по методологии абсорбционной спектроскопии и основано на разнице в регистрируемых сигналах при зондировании биоткани в красном и зеленом спектральных диапазонах длин волн. Насыщение гемоглобина кислородом определяется на основе разных оптических свойств оксигенированных и дезоксигенированных фракций гемоглобина, содержащихся в крови диагностического объема. На основе данных показателей, усредненных по времени измерения (15 с), вычислялось удельное потребление кислорода клетками (U), характеризующее потребление кислорода на единицу объема циркулирующей в ткани крови по формуле [24]:

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

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

Режим работы «флуоресценция» реализует метод лазерной флуоресцентной спектроскопии. К поверхности исследуемого объема с помощью оптоволоконного зонда по осветительному волокну доставляется излучение от выбранного источника. Через приёмное волокно вторичное излучение доставляется к спектрометру.

Для возбуждения флуоресценции в различных частях спектра использовались маломощные лазеры

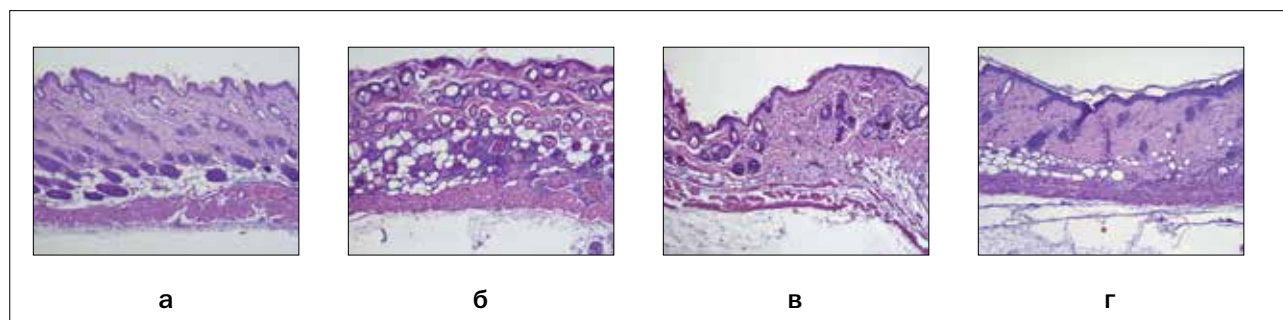


Рис. 2. Кожа мышей в группе BLM. Гистологические препараты, окраска гематоксилином и эозином (увеличение $\times 100$):
а – 0 сут, структура эпидермиса и дермы не изменена;
б – 7 сут, воспалительная инфильтрация долек жировой ткани лимфоцитами и гистиоцитами;
в – 14 сут, частичное замещение жировой ткани межклеточным матриксом, уменьшение воспалительной инфильтрации;
г – 21 сут, обширные очаги накопления межклеточного матрикса, обедненные клеточными элементами (гипоцеллюлярный фиброз), сглаженность коллагеновых волокон

Fig. 2. The skin of mice in the BLM group. Histological preparations, hematoxylin and eosin staining (magnification $\times 100$):
а – Day 0: the structure of epidermis and dermis is not changed;
б – Day 7: inflammation in the lobule of adipose tissue due to infiltration of lymphocytes and histiocytes;
в – Day 14: partial replacement of the adipose tissue by extracellular matrix, reduction of inflammatory infiltration;
г – Day 21: extensive foci of the extracellular matrix deposition, depleted of cellular elements (hypocellular fibrosis), smoothness of collagen fibers

с длинами волн $\lambda_e = 365$ и 535 нм. Выходная мощность на дистальном конце волоконно-оптического зонда составляет около 2–3 мВт для каждого источника света. Длины волн, на которых флуоресценция исследуемых флуорофоров достигает значений, наиболее эффективных для регистрации, далее обозначались λ_r . Для коллагена $\lambda_r = 445$ – 455 нм, для порфирина $\lambda_r = 600$ – 620 нм [19]. Отметим, что вклады коллагена и эластина в общий спектр трудноразделимы, поэтому далее считали, что флуоресценция в диапазоне длин волн $\lambda_r = 445$ – 455 нм отражает наличие обоих флуорофоров. В данной работе оценивалась динамика интенсивности на данных длинах волн (далее – «интенсив-

ность флуоресценции») при отслеживаемых равных мощностях лазерного излучения.

Образцы для гистологических исследований забирались на 0, 7, 14 и 21 сут. Выделялись фрагменты кожи из исследуемой области размером $1,0 \times 1,0$ см с последующей окраской гистологических препаратов гематоксилин-эозином. При изучении морфологической картины оценивалось состояние эпидермиса, воспалительные изменения в дерме, подкожно-жировой клетчатке и структура коллагеновых волокон.

Статистический анализ проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft corp., USA). Гипотезы о наличии различий между группами проверяли с помо-

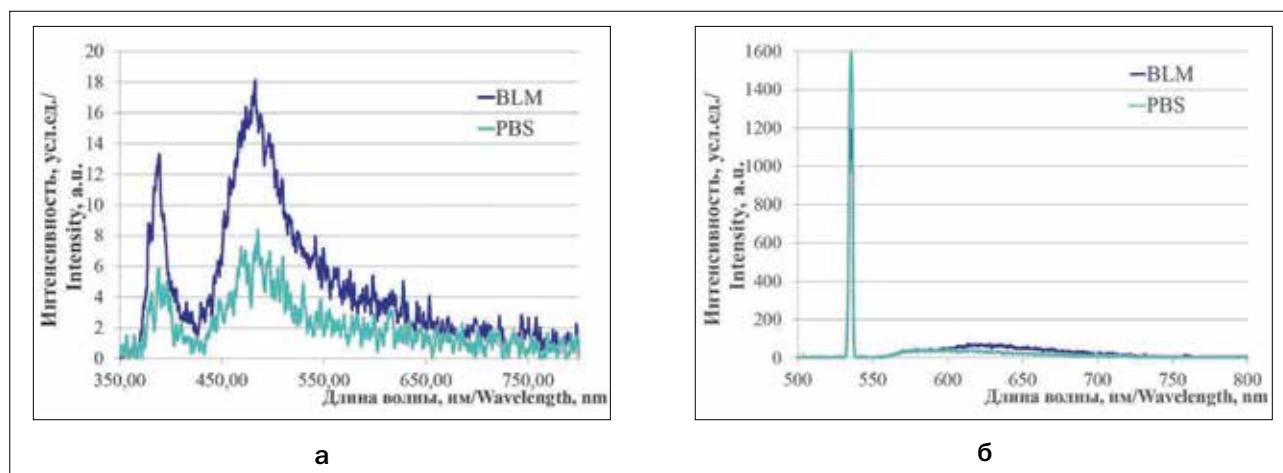
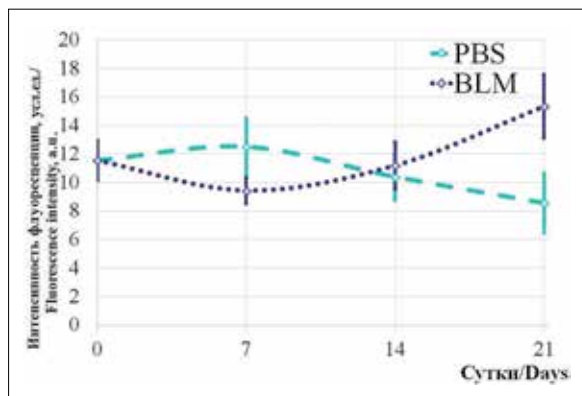
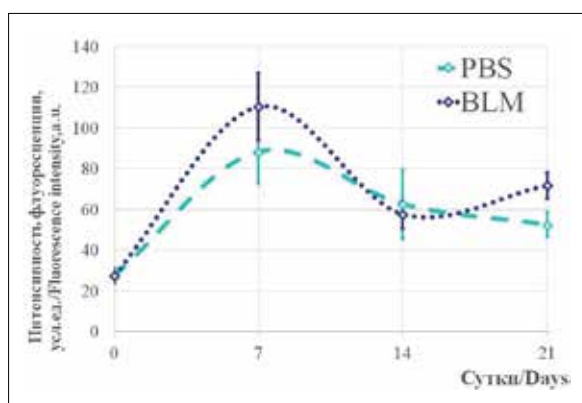


Рис. 3. Примеры спектров флуоресценции в области инъекций на 21 сут:
а – в УФ-диапазоне ($\lambda_e = 365$ нм);
б – в зеленом диапазоне ($\lambda_e = 535$ нм)

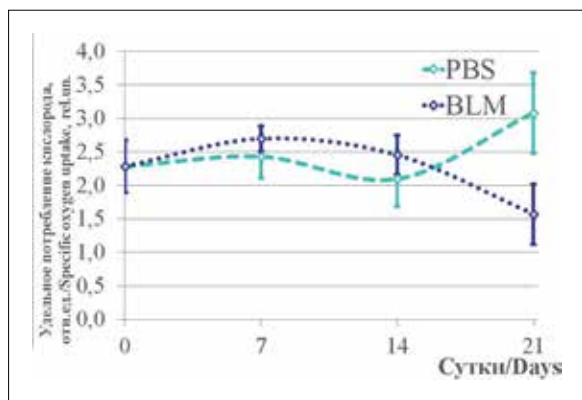
Fig. 3. Example of the fluorescence spectra at the injection site at day 21:
а – in the UV wavelength range ($\lambda_e = 365$ нм);
б – in the green wavelength range ($\lambda_e = 535$ нм)



а



б



в

Рис. 4. Динамика показателей оптической диагностики в группах BLM (инъекция блеомицина) и PBS (инъекция физраствора):

- а – интенсивности флуоресценции коллагена и эластина ($\lambda_e = 365$ нм, $\lambda_f = 445-455$ нм);
- б – интенсивности флуоресценции порфирина ($\lambda_e = 535$ нм, $\lambda_f = 610$ нм);
- в – удельного потребления кислорода тканями

Fig.4. Dynamics of optical diagnostic indicators in the BLM (bleomycin injection) and PBS (saline injection) groups:

- а – fluorescence intensity of collagen and elastin ($\lambda_e = 365$ nm, $\lambda_f = 445-455$ nm);
- б – fluorescence intensity of porphyrin ($\lambda_e = 535$ nm, $\lambda_f = 610$ nm);
- в – specific oxygen uptake by tissues

щью сравнения средних арифметических значений и построения 95%-ых доверительных интервалов для средних арифметических значений.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента в группе животных BLM воспроизведен фиброз кожи, подтвержденный гистологически (рис. 2).

На рис. 3 показан пример усредненных значений при измерении спектров флуоресценции на коже животных в области инъекций, демонстрирующий различия в здоровой ткани и ткани с фиброзом.

На рис. 4 приведены результаты проведенных оптических измерений в контрольные дни эксперимента.

На рис. 4а представлена динамика усредненной по группам интенсивности флуоресценции коллагена и эластина. Мы полагаем, что снижение интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена на 7 сут по сравнению с 0 сут в группе BLM, вероятнее всего связано с отеком тканей за счет воспалительной экссудации, гистологически наиболее выраженной именно в это время. Повышение же интенсивности эндогенной флуоресценции коллагена и эластина на 21 сут в группе BLM вызвано их накоплением в области сформировавшегося фиброза, что также соответствует морфологической картине фиброза кожи. Принимая во внимание, что основным внеклеточным веществом соединительной ткани при фиброзе кожи является коллаген [25], вклад флуоресценции эластина в данном случае будет незначительным.

Установлено, что порфирины быстро реагируют на метаболические изменения в тканях. В частности, их синтез активно повышается в клетках, находящихся в состоянии хронической гипоксии и воспаления [26]. Динамика усредненной по группам интенсивности флуоресценции порфирина (рис. 4б) показывает достоверный рост показателей на 7 сут по сравнению с 0 сут эксперимента в обеих группах животных, что, вероятно, отражает воспалительные процессы, вызванные ежедневными подкожными инъекциями. Кроме того, на 21 сут эксперимента получены достоверные различия в группе BLM и PBS. Мы полагаем, что повышение интенсивности эндогенной флуоресценции порфиринов в коже с фиброзом в этот период вызвано гипоксией, возникшей прежде всего за счет нарушения перфузии в тканях [27].

Результаты измерения удельного потребления кислорода показывают достоверное снижение его показателей к 21 сут в группе BLM (рис. 4в), предположительно за счет образования гипоцеллюлярного фиброза с низкой метаболической активностью.

Достоверно известно, что воспаленная и пролиферирующая ткань имеет высокую потребность в кислороде. Наиболее ярко это выражено в структуре

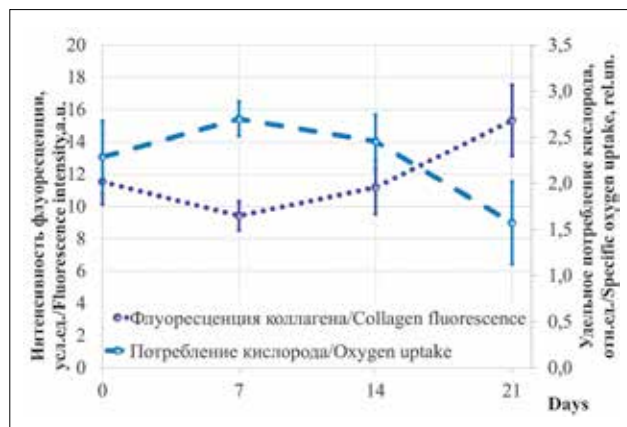


Рис. 5. Динамика интенсивности флуоресценции коллагена и эластина ($\lambda_e = 365$ нм, $\lambda_f = 445-455$ нм) и удельного потребления кислорода тканями.

Fig. 5. Dynamics of collagen and elastin fluorescence intensity ($\lambda_e = 365$ nm, $\lambda_f = 445-455$ nm) and specific oxygen uptake by tissues

незрелых метаболически активных тканей рубца. Однако уже сформированный фиброз, в том числе за счет сокращения количества клеточных элементов, такую потребность уменьшает [28]. В нашем эксперименте мы подтвердили это гистологически, а результаты вычисления удельного потребления кислорода клетками и показатели эндогенной флуоресценции коллагена на 14 и 21 сут в группе BLM отразили данную зависимость (рис. 5).

Современная концепция позволяет делить фиброгенный ответ на четыре фазы, перекрывающие друг друга: 1 фаза – инициация ответа, вызванного первичным повреждением, 2 фаза – активация эффекторных клеток, 3 фаза – выработка внеклеточного матрикса, 4 фаза – динамическое осаждение/недостаточная резорбция внеклеточного матрикса [4]. Результаты измерения флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода в совокупности с морфологической картиной кожи позволяют нам провести корреляцию с фазами фиброгенного ответа. Так, в 1 и 2 фазы (0–7 сут) наблюдается повышение потребления кислорода эффекторными клетками за счет первичного повреждения ткани и следующего за ним воспаления и гипоксии потребления. В 3 фазе (7–14 сут) нарастает флуоресценция коллагена, что подтверждается накоплением межклеточного матрикса, а уменьшение потребления кислорода – ослабле-

нием процесса воспаления. 4 фаза (14–21 сут) сопровождается избыточным накоплением межклеточного матрикса с обеднением клеточными элементами и резким падением потребления кислорода. Однако стоит отметить, что временные границы на данном этапе выделены условно ввиду особенностей проведения эксперимента.

Ряд исследователей придерживается мнения, что фиброз необратим, если ткань становится мало-клеточной и, как следствие, бедной биологически активными молекулами, необходимыми для деградации внеклеточного вещества соединительной ткани [29, 30]. Это соответствует периоду, когда увеличение удельного потребления кислорода сменяется его спадом, вследствие уменьшения количества клеток его потребляющих. При этом параллельно регистрируется рост флуоресценции коллагена, как основного биомаркера фиброза. Мы полагаем, что одновременное измерение флуоресценции коллагена и удельного потребления кислорода, позволит зафиксировать не только синхронный характер процессов воспаления и гипоксии в рамках фиброгенеза, но и предоставит новые возможности для диагностики фаз фиброза.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали возможность объективного неинвазивного динамического наблюдения за процессами воспаления и гипоксии в рамках развития фиброза кожи с применением методов лазерной флуоресцентной спектроскопии и оптической тканевой оксиметрии. Развитие предложенных подходов может быть реализовано путем разработки количественных критериев для четкой периодизации формирования фиброза. Объективность исследования также может быть повышена за счёт использования дополнительных методов, позволяющих параллельно оценить и сопоставить проявления изучаемых процессов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Это, в свою очередь, расширит возможности практикующих врачей в диагностике фиброза, персонализации лечебной тактики, прогнозировании исхода заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-02-00564/18.

ЛИТЕРАТУРА

- Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 7. – P. 1028–1040.
- Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208. – No. 7. – P. 1339–1350.

REFERENCES

- Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease, *Nature medicine*, 2012, vol. 18, no. 7, pp. 1028–1040.
- Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis, *Journal of Experimental Medicine*, 2011, vol. 208, no. 7, pp. 1339–1350.

3. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. 6-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – С. 254–255.
4. Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 372. – No. 12. – P. 1138–1149.
5. Andrews J.P., Marttala J., Macarak E., et al. Keloids: The paradigm of skin fibrosis—Pathomechanisms and treatment // *Matrix Biology*. – 2016. – Vol. 51. – P. 37–46.
6. Bijlard E., Kouwenberg C.A., Timman R., et al. Burden of keloid disease: A cross-sectional health-related quality of life assessment // *Acta dermato-venereologica*. – 2017. – Vol. 97, No. 2. – P. 225–229.
7. Bock O., Schmid-Ott G., Malewski P., Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring // *Archives of dermatological research*. – 2006. – Vol. 297, No. 10. – P. 433.
8. Muangchan C., Harding S., Khimdas S., et al. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: Results from the Canadian Scleroderma Research Group // *Arthritis Care Res (Hoboken)*. – 2012. – Vol. 64, No. 9. – P. 1405–1414.
9. Habieli D.M., Hogaboam C. Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis // *Frontiers in pharmacology*. – 2014. – Vol. 5, No. 2. – P. 1–6.
10. Wang W., Qu M., Xu L., et al. Sorafenib exerts an anti-keloid activity by antagonizing TGF- β /Smad and MAPK/ERK signaling pathways // *J Mol Med (Berl)*. – 2016. – Vol. 94, No. 10. – P. 1181–1194.
11. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair // *Nature*. – 2013. – Vol. 504. – P. 277–281.
12. Manresa M.C., Godson C., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2014. – Vol. 307, No. 12. – P. R1369–R1380.
13. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – Vol. 117, No. 3. – P. 539–548.
14. Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T.D., Darby I.A. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2012. – Vol. 296. – P. 139–185.
15. Гуллер А.Е., Шехтер А.Б. Клинический тип и гистологическая структура кожных рубцов как прогностические факторы исхода лечения // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. – 2007. – № 4. – С. 19–31.
16. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J., et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential // *Burns*. – 2008. – Vol. 34, No. 6. – P. 761–769.
17. Mustoe T.A., Cooter R.D., Gold M.H., et al. International Advisory Panel on Scar Management. International clinical recommendations on scar management // *Plast Reconstr Surg*. – 2002. – Vol. 110, No. 2. – P. 560–571.
18. Kang T., Abignano G., Lettieri G., et al. Skin imaging in systemic sclerosis // *Eur J Rheumatol*. – 2014. – Vol. 1, No. 3. – P. 111–116.
19. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2012. – Vol. 5, No. 2. – P. 1250010.
20. Franco W., Gutierrez-Herrera E., Kollias N., Doukas A. Review of applications of fluorescence excitation spectroscopy to dermatology // *Br J Dermatol*. – 2016. – Vol. 174, No. 3. – P. 499–504.
21. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis // *Methods Mol Biol*. – 2014. – Vol. 1142. – P. 91–8.
22. Li Y., Zhang J., Zhang W., et al. MicroRNA-192 regulates hypertrophic scar fibrosis by targeting SIP1 // *J Mol Histol*. – 2017. – Vol. 48, No. 5–6. – P. 357–366.
3. Strukov A.I., Serov V.V. *Patologicheskaya anatomiya. 6-e izd.* [Pathological anatomy. 6th ed.]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2015. pp. 254–255.
4. Rockey D.C., Bell P.D., Hill J.A. Fibrosis—a common pathway to organ injury and failure, *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 372, no. 12, pp. 1138–1149.
5. Andrews J.P., Marttala J., Macarak E., Rosenbloom J., Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis—Pathomechanisms and treatment, *Matrix Biology*, 2016, vol. 51, pp. 37–46.
6. Bijlard E., Kouwenberg C.A., Timman R., Hovius S.E., Busschbach J.J., Mureau M.A. Burden of keloid disease: A cross-sectional health-related quality of life assessment, *Acta dermato-venereologica*, 2017, vol. 97, no. 2, pp. 225–229.
7. Bock O., Schmid-Ott G., Malewski P., Mrowietz U. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring, *Archives of dermatological research*, 2006, vol. 297, no. 10, pp. 433.
8. Muangchan C., Harding S., Khimdas S., Bonner A., Canadian Scleroderma Research group, Baron M., Pope J. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: Results from the Canadian Scleroderma Research Group, *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, vol. 64, no. 9, pp. 1405–1414.
9. Habieli D.M., Hogaboam C. Heterogeneity in fibroblast proliferation and survival in idiopathic pulmonary fibrosis, *Frontiers in pharmacology*, 2014, vol. 5, no. 2, pp. 1–6.
10. Wang W., Qu M., Xu L., Wu X., Gao Z., Gu T., Zhang W., Ding X., Liu W., Chen Y.L. Sorafenib exerts an anti-keloid activity by antagonizing TGF- β /Smad and MAPK/ERK signaling pathways, *J Mol Med (Berl)*, 2016, vol. 94, no. 10, pp. 1181–1194.
11. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., Kretzschmar K., Simons B.D., Charalambous M., Ferron S.R., Herault Y., Pavlovic G., Ferguson-Smith A.C., Watt F.M. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair, *Nature*, 2013, vol. 504, pp. 277–281.
12. Manresa M.C., Godson C., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2014, vol. 307, no. 12, pp. R1369–R1380.
13. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ, *The Journal of clinical investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 539–548.
14. Lokmic Z., Musyoka J., Hewitson T.D., Darby I.A. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis, *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, vol. 296, pp. 139–185.
15. Guller A.E., Shekhter A.B. Clinical type and histological structure of skin scars as prognostic factors of treatment outcome, *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i estheticheskoy hirurgii*, 2007, no. 4, pp. 19–31. (in Russ.)
16. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J., Pirayesh A., Blondeel P. Assessment of burn depth and burn wound healing potential, *Burns*, 2008, vol. 34, no. 6, pp. 761–769.
17. Mustoe T.A., Cooter R.D., Gold M.H., Hobbs F.D., Ramelet A.A., Shakespeare P.G., Stella M., Téot L., Wood F.M., Ziegler U.E. International Advisory Panel on Scar Management. International clinical recommendations on scar management, *Plast Reconstr Surg*, 2002, vol. 110, no. 2, pp. 560–571.
18. Kang T., Abignano G., Lettieri G., Wakefield R.J., Emery P., Del Galdo F. Skin imaging in systemic sclerosis, *Eur J Rheumatol*, 2014, vol. 1, no. 3, pp. 111–116.
19. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes, *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2012, vol. 5, no. 2, p. 1250010.
20. Franco W., Gutierrez-Herrera E., Kollias N., Doukas A. Review of applications of fluorescence excitation spectroscopy to dermatology, *Br J Dermatol*, 2016, vol. 174, no. 3, pp. 499–504.
21. Avouac J. Mouse model of experimental dermal fibrosis: the bleomycin-induced dermal fibrosis, *Methods Mol Biol*, 2014, vol. 1142, pp. 91–98.

23. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petrinskaya E.N., et al. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. – 2009. DOI: 10.1117/12.831602
24. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – An overview of possible medical applications // *Photon Lasers Med*. – 2013. – Vol. 2, No. 3. – P. 225–240.
25. Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., Kapoor M. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis // *Nat Rev Rheumatol*. – 2014. – Vol. 10, No. 7. – P. 390–402.
26. Petritskaya E.N., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., et al. Use of fluorescence spectroscopy for diagnosis of hypoxia and inflammatory processes in tissue // *Journal of Optical Technology*. – 2015. – Vol. 82, No. 12. – P. 810–814.
27. Van Hal T.W., van Bon L., Radstake T.A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis // *International Journal of Rheumatology*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 824972
28. Darby I.A., Hewitson T.D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis // *Cell and tissue research*. – 2016. – Vol. 365, No. 3. – P. 553–562.
29. Issa R., Zhou X., Constandinou C.M., et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 126, No. 7. – P. 1795–1808.
30. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ // *Journal of clinical investigation*. – 2007. – Vol. 117, No. 3. – P. 539–548.
22. Li Y., Zhang J., Zhang W., Liu Y., Li Y., Wang K., Zhang Y., Yang C., Li X., Shi J., Su L., Hu D. MicroRNA-192 regulates hypertrophic scar fibrosis by targeting SIP1, *J Mol Histol*, 2017, vol. 48, no. 5–6, pp. 357–366.
23. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petrinskaya E.N., Sidorov V.V., Shumskiy V.I. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that, *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*, 2009. DOI: 10.1117/12.831602
24. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – An overview of possible medical applications, *Photon Lasers Med*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 225–240.
25. Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., Kapoor M. Fibrosis—a lethal component of systemic sclerosis, *Nat Rev Rheumatol*, 2014, vol. 10, no. 7, pp. 390–402.
26. Petritskaya E.N., Kulikov D.A., Rogatkin D.A., Guseva I.A., Kulikova P.A. Use of fluorescence spectroscopy for diagnosis of hypoxia and inflammatory processes in tissue, *Journal of Optical Technology*, 2015, vol. 82, no. 12, pp. 810–814.
28. Van Hal T.W., van Bon L., Radstake T.A system out of breath: how hypoxia possibly contributes to the pathogenesis of systemic sclerosis, *International Journal of Rheumatology*, 2011, vol. 2011, p. 824972
29. Darby I.A., Hewitson T.D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis, *Cell and tissue research*, 2016, vol. 365, no. 3, pp. 553–562.
30. Issa R., Zhou X., Constandinou C.M., Fallowfield J., Millward-Sadler H., Gaca M.D., Sands E., Suliman I., Trim N., Knorr A., Arthur M.J., Benyon R.C., Iredale J.P. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking, *Gastroenterology*, 2004, vol. 126, no. 7, pp. 1795–1808.
31. Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ, *Journal of clinical investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 539–548.