

УДК 616.5-08:615.2-092.9

ХАРАКТЕР МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ ДЕРМЫ В УСЛОВИЯХ РАЗВЕДЕНИЯ ФИЛЛЕРА

¹Могильная Г.М., ¹Фомичева Е.В., ²Блатт Ю.Е.

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, e-mail: fomevg@mail.ru;

²ООО «МЕРЦ ФАРМ», Москва, e-mail: Julia_Blatt@mail.ru

В эксперименте изучены морфологические и гистохимические преобразования, происходящие в дерме в зоне локализации препарата «Радиесс» (Merz) в стандартной концентрации и при разбавлении стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:2 и 1:6. Препарат вводили крысам-самцам субдермально в объёме 0,05 мл. Оценку результатов проводили спустя 2 и 4 месяца после инъекции филлера. Морфология компонентов дермы изучена в микропрепаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, по Ван Гизону, Маллори и Массону. Для типирования фибриллярных структур дермы использовали окраску пикросириусом красным. Проведена морфометрия ядер клеток и дана оценка их оптической плотности. Показано, что ответная реакция цитогенного компонента и экстрацеллюлярного матрикса дермы при введении разбавленного препарата «Радиесс» проявляется формированием соединительнотканной капсулы и появлением в зоне локализации микросфер значительного количества клеток, формирующих клеточный инфильтрат. Величина оптической плотности ядер клеток нарастает, что указывает на повышение функциональной активности ДНК, процесс неоколлагеногенеза сдвигается в сторону синтеза коллагена III типа. С увеличением дозы разведения процесс неоколлагеногенеза смещается в сторону завершения внеклеточного этапа его синтеза и образования коллагена I типа.

Ключевые слова: кристаллы гидроксиапатита, филлер, препарат «Радиесс», неоколлагеногенез в дерме.

THE NATURE OF THE MORPHOLOGIC TRANSFORMATIONS OF THE DERMIS IN TERMS OF DILUTION OF THE FILLER

¹Mogilnaya G.M., ¹Fomicheva E.V., ²Blatt Y.E.

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: fomevg@mail.ru;

² «Merz Pharma», Moscow, e-mail: Julia_Blatt@mail.ru

The experiment studied the morphological and histochemical transformations taking place in the dermis in the area of Radiesse (Merz) drug injection in terms of its infusion in the standard concentration and its dilution by the aseptic saline in the ratio of 1:2 and 1:6. The drug was injected to the male rats subcutaneously in the volume of 0, 05 ml. The outcome evaluation was held after 2 and 4 months after the injection of the filler. The morphology of the dermis components was studied in micro drugs, dyed with hematoxylin-eosin according to Van Gieson, Mallory and Masson. PIKRA-sirius red was used to type fibrillar structures of the dermis. There were held the morphometry of the microspheres and the evaluation of their optical density. It has been found that the response reaction of the cytogenetic stroma and the extracellular matrix of the dermis during the injection of the diluted drug "Radiesse" manifest the formation of a connective-tissue capsule and the emergence of a significant number of cells, forming cell infiltration in the area of localization of the microspheres. The shape of the nucleus of the cytogenous stroma in terms of dilution was not changing, but the magnitude of its optical density was growing, which indicates the increase of the functional activity of DNA; the process of neocollagenesis is shifted in the direction of the synthesis of type III collagen. With the increase of the doses of the dilution the process of neocollagenesis is shifted in the direction of the completion of the extracellular stage of its synthesis and the formation of type I collagen.

Keywords: hydroxyapatite crystals, filler, Radiesse products, neocollagenesis in the dermis.

Обзор литературы, посвященный препарату «Радиесс», широко используемому в эстетической медицине, со всей очевидностью подтверждает эффективность и безопасность этого филлера для контурной пластики лица [1-4; 7; 10]. Ответом на его введение может быть реактивное воспаление по типу «реакция ткани на инородное тело» [5; 11]. Однако получение

лифтингового эффекта, увеличение объема экстрацеллюлярного матрикса дермы, достаточно пролонгированный период его действия - все это говорит в пользу целесообразности использования «Радиесса» в медицине [9]. Наблюдаемые в клинике осложнения после введения препарата весьма редки и чаще всего связаны с возможным риском миграции филлера из зоны его введения с последующим развитием гранулем [3; 4]. Считают, что одним из путей устранения осложнений подобного типа может быть разведение филлера анестетиком или физиологическим раствором. Это должно сделать более комфортной саму процедуру введения, а также обеспечить благоприятное течение постинъекционного периода [3]. Вместе с тем мы не встретили в литературе работ, касающихся реакции дермы на введение препарата «Радиесс» в условиях его разведения.

Целью настоящего исследования является морфологическое и гистохимическое изучение ответной реакции цитогенного компонента и экстрацеллюлярного матрикса дермы на эффект разведения препарата «Радиесс».

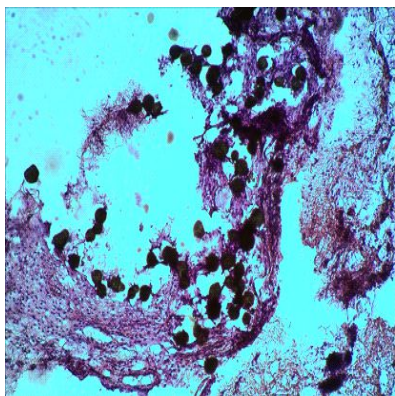
Материал и методы

Объектом исследования послужили беспородные крысы-самцы весом 200-250 г (25 особей). Эксперимент проводился с разрешения Этического комитета ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные были разделены на 4 группы. Первой группе вводили препарат «Радиесс» (Merz) в стандартной концентрации. Во второй группе препарат перед введением разбавляли стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:2, в третьей группе разведение проведено в соотношении 1:6. Четвертой группе контрольных животных вводили стерильный физиологический раствор в той же дозе. Препарат вводили субдермально по принципу микропапул в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (холку) всем экспериментальным животным. Оценку результатов проводили спустя 2 и 4 месяца после инъекции филлера. Для морфологического изучения использовали кусочки кожи с заделкой материала в парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также с помощью реакции по Маллори, Ван Гизону и Массону. Для типирования фибриллярных структур дермы использовали окраску пикросириусом красным по Dayan et al. (1989) с последующим изучением микропрепаратов в поляризованном свете. Для избирательного выявления ДНК использовалась реакция Фельгена [10]. Полученные микропрепараты подвергали компьютерной морфометрии с использованием стандартизированных микрофотографий в формате TiF, полученных с цифровой камеры для микроскопии DCM 310. Анализ полученных изображений проводили по компьютерной программе Scion Image фирмы

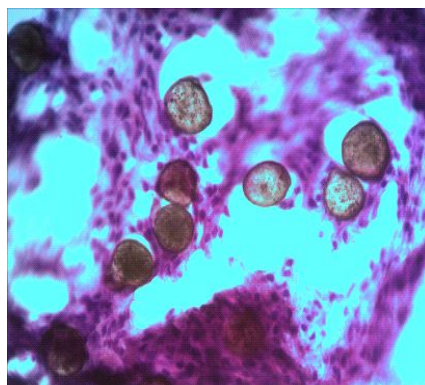
Scion Corporation, сертифицированной в 2000 году National Institute of Health (USA). Числовые значения результатов измерений выражали в единицах, заданных программой Scion Image. Измерению подвергали диаметры ядер клеток дермы, оптическую плотность ядер, а также определяли объем ядерной массы, характеризующий количество ядерного материала, приходящееся на единицу объема исследуемой ткани. Диаметры ядер использовали для расчета индекса ядерной симметрии [8]. Все цифровые данные подвергали статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel.

Полученные результаты и их обсуждение

Изучение срезов в окраске стандартными гистологическими методами показало, что спустя 2 месяца после инъекции Радиесса в зоне его введения четко типизируются микросферы, расположенные группами и поодиночке. Содержимое их окрашено очень слабо диффузно или не окрашено. Стенки микросфер четко контурируются за счет умеренно или интенсивно окрашенных фибрилл, между которыми удается рассмотреть интенсивно окрашенные уплощенные ядра (рис. 1 А, Б).



А



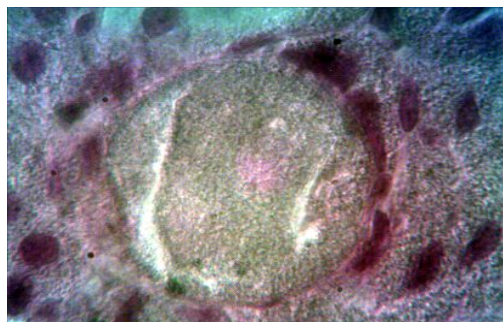
Б

*Рис. 1. А. Зона локализации микросфер (окраска гематоксилином и эозином. Об.10х, Ок.10х).
Б. Зона локализации микросфер (окраска гематоксилином и эозином. Об.40х, Ок.10х)*

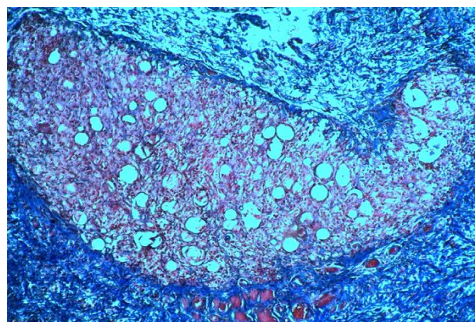
Местами встречаются многоядерные клетки инородных тел, по размеру соответствующие микросферам, число ядер в них от 5 до 8. По периферии зоны инъекции типизируются в единичные эпителиоидные гигантские клетки. Внутри зоны инъекции видны участки, заполненные круглоклеточным инфильтратом. Зона инъекции имеет четкие границы за счет сформировавшейся вокруг нее соединительнотканной капсулы. При этом одна часть капсулы, обращенная к дерме, представлена большим количеством интенсивно окрашенных коллагеновых волокон, а противоположная поверхность содержит более тонкие волокна и

меньшее их число.

После разведения Радиесса 1:2 в обзорных микропрепаратах отчетливо видно по периферии зоны инъекции филлера большое число кровеносных сосудов, заполненных эритроцитами. Структура ткани, формирующей капсулу, может быть охарактеризована как рыхлая соединительная ткань с небольшим количеством клеточных элементов. Волокна экстрацеллюлярного матрикса тонкие, лежат неупорядоченно, участки аморфного оксифильно окрашенного матрикса вакуолизированы. От места инъекции к зоне локализации гранул можно увидеть небольшое количество плотных оксифильных волокон, они указывают на путь смещения введенного филлера от зоны инъекции к глубоким слоям. Микросферы окружены клетками, распластанными по их поверхности. Содержимое микросфер разрыхлено, местами отсутствует (рис. 2А).



А



Б

Рис. 2. Зона локализации микросфер (окраска гематоксилином и эозином: А. Об.100х, Ок.10х; Окраска по Массону. Б. Об.10х, Ок.10х)

Вокруг микросфер достаточно много клеток фибробластического ряда, преимущественно с гиперхромными ядрами. В дерме над участком введения Радиесса наблюдается увеличение числа коллагеновых волокон, при этом они широкие и плотно упакованы: и сосочковый и сетчатый слои выглядят одинаково, граница между ними нивелируется.

При изучении зоны инъекции филлера в разведении 1:6 отмечается более глубокое его погружение, это уже не субдермальная граница, а участок на границе с мышечной тканью. Группы микросфер окружены более плотной соединительнотканной капсулой. Содержимое микросфер отличается рыхлостью, вокруг них сохраняется один ряд уплощенных клеток, формирующих капсулу. Между микросферами скапливается большое количество клеток типа фибробластов и макрофагов, отдельные клетки характеризуются наличием дисперсных ядер. Между микросферами появляются достаточно широкие прослойки рыхлой волокнистой

соединительной ткани с большим количеством кровеносных капилляров, заполненных кровью (рис. 2Б).

Таким образом, при разведении филлера происходит погружение его с эффектом увеличения объема фиброзной ткани, формирующей для него капсулу, которая типична в виде плотных коллагеновых тяжей, идущих от зоны дермы в глубину прилежащих к ней тканей.

Меняется и характер цитогенного компонента, окружающего микросферы. Так, при разведении Радиесса 1:6 появляются клеточные тяжи, а вокруг микросфер скапливается уже не один, а несколько, чаще два-три ряда клеток, где первый – это, вероятно, неактивные фибробласты: уплощенные клетки с гиперхромным ядром, скорее всего (фиброциты), а вокруг них - различного типа мононуклеары.

Не исключено, что выделяемые ими медиаторы инициируют эффект присутствия в зоне инъекции большого количества клеток. При этом число клеток в ряду: Радиесс – Радиесс 1:2 – Радиесс 1:6 нарастает. Во всяком случае увеличение числа клеток в зоне локализации филлера типично для эффекта его разведения.

Спустя 4 месяца после инъекции Радиесса при использовании стандартных гистологических реакций в микропрепаратах видна сохраняющаяся вокруг зоны инъекции капсула, образованная коллагеновыми фибриллами, между ними встречаются кровеносные сосуды, заполненные эритроцитами. Микросферы Радиесса чаще пустые и сохраняют на своей поверхности один слой фиброцитов. Однако между микросферами видны многоядерные клетки. Цитоплазма этих клеток пенистая, в ней выявляются мелкие точки, соответствующие фагоцитированным кристаллам гидроксиапатита. Не исключено, что здесь идет процесс их утилизации.

При разведении препарата Радиесс в соотношении 1:2 отмечается снижение числа микросфер. Содержимое их становится рыхлым, местами микросферы утрачивают фибриллярную оболочку. Однако между микросферами появляются участки, содержащие клетки с округлыми гиперхромными ядрами (лимфоциты). Местами встречаются гигантские многоядерные клетки. Измерение объема ядерной массы в зоне инъекции показало увеличение ее объема, особенно выраженное при разведении 1:6. Увеличение оптической плотности ядер при окраске по Фельгену в ряду: Радиесс без разведения, Радиесс 1:2 и Радиесс 1:6, составил $126,1 \pm 1,32$; $142,36 \pm 6,6$ и $151,06 \pm 3,0$ соответственно, что свидетельствует о нарастании функциональной активности ДНК.

Изучение экстрацеллюлярного матрикса дермы после окрашивания пикросириусом красным в поляризованном свете показало, что спустя 2 месяца после инъекции Радиесса в

стандартной концентрации вокруг микросфер визуализируются тонкие фибриллы, обнаруживающие зеленое свечение. Среди них встречаются более короткие широкие фибриллы, обнаруживающие желтое и красное свечение. В процентном соотношении объем этих волокон составил 50, 30 и 20% (рис. 3А).

Вне зоны инъекции участки дермы содержат широкие фибриллы различной длины с красным и оранжево-желтым свечением, зеленое свечение визуализируется в виде небольших коротких штрихов.

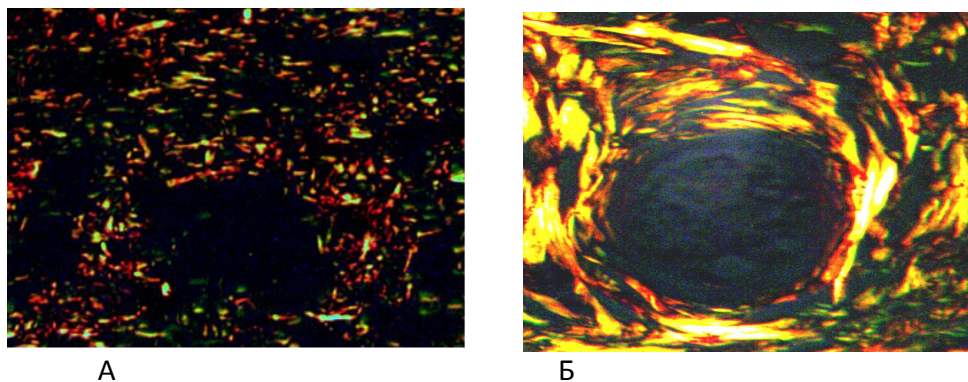


Рис. 3. Зона локализации микросфер. (Окраска пикросирусом красным. Поляризационная микроскопия. Об.40x; Ок.10x А, Б)

При разбавлении препарата 1:2 во всех образцах наблюдается довольно однообразная картина. Вокруг микросфер тонкие фибриллы обнаруживают зеленое свечение, их большинство – до 80%, среди них встречаются в виде штрихов структуры, обнаруживающие желтое свечение – до 20%; структуры, обнаруживающие красное свечение, практически отсутствуют. Вне зоны инъекции участки дермы содержат фибриллы различной длины с красным и оранжево-желтым свечением, зеленое свечение визуализируется в виде коротких штрихов.

В зоне введения препарата Радиесс, разбавленного 1:6, вокруг микросфер преобладают фибриллы с зеленым свечением, их до 60%, остальные фибриллы обнаруживают оранжево-красное свечение. Есть участки, где зеленое свечение практически отсутствует, здесь преобладают фибриллы, обнаруживающие красное свечение, которые имеют вид тонких волокон, окружающих пустые микросферы.

Таким образом, оказалось, что спустя 2 месяца после инъекции разбавленного препарата Радиесс в соотношении 1:2 процесс неколлагеногенеза сдвигается в сторону синтеза коллагена III типа. С увеличением дозы разведения 1:6 происходит активация неколлагеногенеза со сдвигом в сторону завершения внеклеточного этапа его синтеза с образованием до 40% общего

объема фибриллярного компонента коллагена I типа.

Изучение экстрацеллюлярного матрикса дермы после окраски пикросириусом красным с последующей поляризационной микроскопией показало, что через 4 месяца после инъекции препарата Радиесс микросферы сохраняют тонкую фибриллярную капсулу, обнаруживающую преимущественно красное свечение за счет коллагена I типа, среди которого встречаются единичные «штрихи» фибрилл зеленого цвета – это коллаген III типа.

Спустя 4 месяца после инъекции Радиесса в разведении 1:6 видно, что филлер погружен вглубь ткани за пределами дермы. При поляризационной микроскопии стенка микросфер содержит волокна, обнаруживающие оранжево-красное и зеленое свечения, число этих волокон находится в одинаковом соотношении, что указывает на наличие двух типов коллагенов: I и III. В зоне вне соединительнотканного тяжа превалирует зеленое свечение за счет коллагена III типа (рис. 3Б).

Сравнительное изучение клеток и экстрацеллюлярного матрикса дермы в ответ на введение препарата Радиесс показало, что эффект разведения проявляется: формированием соединительнотканной капсулы и появлением в зоне локализации сохранившихся микросфер значительного количества клеток, формирующих клеточный инфильтрат. Не исключено, что эти изменения являются результатом разведения препарата физраствором с образованием более подвижной массы инъекционного препарата, которая не удерживается в субдермальной зоне, а смещается в более глубокие слои.

Проведенное нами исследование объема ядерной массы показало, что в условиях разведения он действительно нарастает, составляя $27,2 \pm 1,3$ в контроле и $31 \pm 1,6$ ($p < 0,01$) и $36,9 \pm 1,5$ ($p < 0,001$) при разведении 1:2 и 1:6 соответственно. Следует отметить, что при разведении филлера 1:6 преобладают гиперхромные ядра, причем увеличение дозы разведения до 1:6 привело к нарастанию массы гиперхромных ядер почти в 2 раза (рис. 4).

Однако форма ядер цитогенного компонента, являющаяся по современным представлениям прогностическим показателем неопластических изменений, в условиях использованного разведения не менялась, индекс ядерной симметрии составлял в среднем $2,0 \pm 0,18$ и $1,95 \pm 0,13$ ($p > 0,05$) (при исходном статусе для Радиесса без разведения $1,83 \pm 0,12$ $p > 0,05$) [8]. Характерным для этих ядер является нарастание их оптической плотности, выявляемой в препаратах, окрашенных реакцией Фельгена. Это нарастание оптической плотности является результатом высвобождения большого числа альдегидных групп в процессе кислотного гидролиза, что может указывать на повышение функциональной активности ДНК, необходимой клеткам дифферона фибробласта для активации синтеза коллагена.

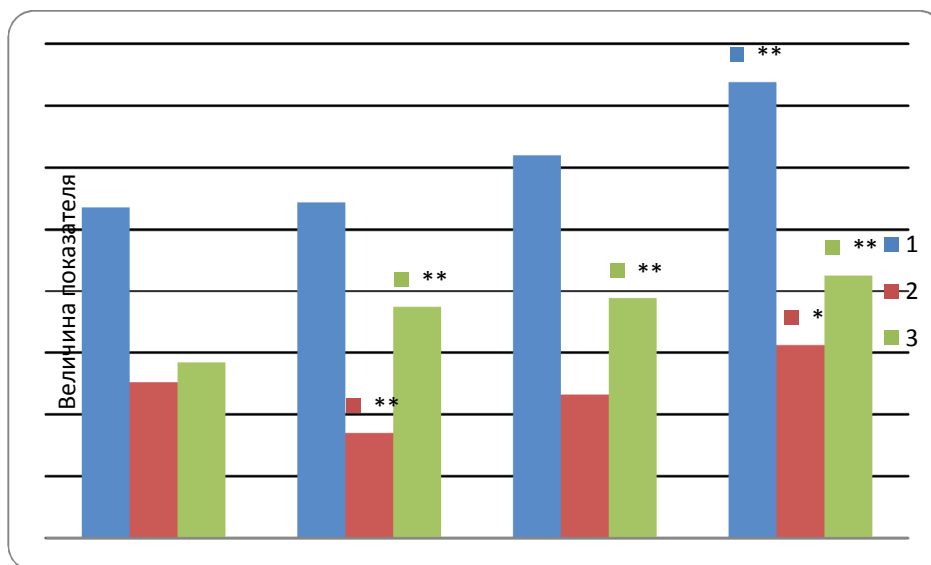


Рис. 4. Характеристика ядер клеточного компонента дермы спустя 4 месяца после введения филлера: 1 - ядерная масса; 2 - гиперхромные ядра; 3 - гипохромные ядра; * - $P < 0,01$; ** - $P < 0,001$

Выводы

Итак, введение разведенного препарата Радиесс приводит к ряду структурных изменений в дерме. При разведении 1:2 и 1:6 в сроки наблюдения, соответствующие 2 и 4 месяцам, происходит активация клеточного компонента дермы и вокруг сохранившихся микросфер появляется оболочка, состоящая из 2-3 клеточных рядов. Процесс неоколлагеногенеза при разведении 1:2 в первые 2 месяца наблюдения сдвигается в сторону синтеза коллагена III типа. С увеличением дозы разведения до 1:6 внеклеточный фибриллогенез завершается образованием коллагена I типа. Пролонгирование периода наблюдения до 4 месяцев подтверждает активацию неоколлагеногенеза I типа. При разведении Радиесса в соотношении 1:6 наблюдается эффект «погружения филлера», а вокруг зоны его введения формируется соединительнотканная капсула.

Список литературы

1. Могильная Г.М., Фомичева Е.В. Динамика морфологического статуса дермы в ответ на введение кристаллов гидроксиапатита // Современные проблемы науки и образования. - 2013. – № 6. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=11087>.

2. Могильная Г.М., Фомичева Е.В., Терехов А.Я., Блатт Ю.Е. Динамика компонентов дермы в ответ на введение филлера // *Современные проблемы науки и образования*. - 2015. – № 4. - URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21161>.
3. Чайковская Е.А. Радиесс: аспекты безопасности препарата. Обзор литературы / Е.А. Чайковская, Т.Д. Канарейцева // *Инъекционные методы в косметологии*. – 2013. – № 1. – С. 28-44 .
4. Daley T. Oral lesions associated with injected hydroxyapatite cosmetic filler / T. Daley, D.D. Damm, J.A. Haden, M.T. Kolodychak // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* - 2012. - P. 107-111.
5. Drobeck H.P. Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxyapatite / H.P. Drobeck, S.S. Rothstein, K.I. Gumaer, A.D. Sherer, R.G. Slighter // *J. Oral Maxillofac Surg.* - 1984. - Vol. 42 (3). - P. 143-149.
6. Eversole R. Lip augmentation dermal filler reactions, histopathologic features / R. Eversole, K. Tran, D. Hansen, J. Campbell // *J. Head Neck Pathol.* - 2013. - Vol. 7. - P. 241-249.
7. Lemperle G. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation / G. Lemperle, V. Morhenn, V. Charrier // *Aesthetic Plast. Surg.* - 2003. - Vol. 27 (5). - P. 354-366.
8. Sabo E. Computerized morphometry as an aid in determining the grade of dysplasia and progression to adenocarcinoma in Barrett's esophagus / A.H. Beck, E.A. Montgomery // *Laboratory Investigation.* - 2006. - Vol. 86. - P. 1261-1271.
9. Pavicic T. Calcium hydroxyapatite filler: an overview of safety and tolerability // *J. Drugs Dermatol.* - 2013. - Vol. 12. - P. 996-1002.
10. Pearce A. *Histochemistry. Theoretical and applied.* - London, 1968. - 561 p.
11. Quan T. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo / T. Quan, F. Wang, Y. Shao // *J. Invest Dermatol.* - 2013. - Vol. 133. - P. 658-670.