

УДК 616.5-08:615.2-092.9

## ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ДЕРМЫ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ ГИДРОКСИАПАТИТА

Могильная Г.М., Фомичева Е.В.

*ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Краснодар, Россия (Краснодар, ул. Седина, 4), e-mail: evglandr@ru.*

В эксперименте изучены морфологические преобразования, происходящие в дерме в зоне инъекции препарата «Радиесс». Препарат вводили крысам-самцам в объеме 0,05 мл. Оценку результатов проводили на 2,4,6,8 и 16 неделе эксперимента. Морфология компонентов дермы изучена в микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином по Вейгерту и Вангизону. Проведены морфометрия микросфер и дана оценка их оптической плотности. Показано, что первыми клетками, реагирующими на «Радиесс», являются макрофаги и фибробласты (2-ая неделя). Позже (4-ая неделя) происходит трансформация макрофагов в остеокласты и активация синтеза коллагена фибробластами. Микросферы уплощаются, размеры их увеличиваются, а оптическая плотность снижается. Микробицидный статус нейтрофильных лейкоцитов при всех сроках наблюдения практически не меняется.

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

## DYNAMICS OF THE MORPHOLOGICAL STATUS DERMIS IN RESPONSE TO THE HYDROXYAPATITE CRYSTALS

Mogilnaya G.M., Fomicheva E.V.

*Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, Sedin st.,4), e-mail:evglandr@ru.*

The morphological transformations which took place in the dermis in the area of injections of the drug "Radiesse" are analyzed in the experiment. The drug was injected to male rats in the volume of 0.05 ml. Evaluation was carried out at 2,4,6,8, and 16 weeks of the experiment. The morphology of the components of dermis was studied in the slides stained with hematoxylin and eosin, and Weigert and Vangizon method. The morphology of microspheres was held and also was estimated it's optical density. Investigation showed that the first cells that responded to "Radiesse", were macrophages and fibroblasts (2nd week). Later (4th week) was observed the transformation of macrophages into osteoclasts and activation of collagen synthesis by fibroblast. The microspheres flattened, their size increased, and the optical density reduced. The microbicide status of neutrophils didn't change at all stages of observation.

Keywords: crystals of hydroxyapatite, drug "Radiesse", neocollagenesis in the dermis.

Использование кристаллов гидроксиапатита («Радиесс») в дерматологической практике не могло не привлечь к нему широкого, а по результатам эстетической медицины вполне заслуженного внимания [9, 12, 15]. При этом используемые в косметологии кристаллы можно расценить как природные, поскольку они входят в состав зубов и костного скелета и в качестве биоматериала не вызывают эффекта отторжения [5]. Одной из основных особенностей этого филлера является активация процесса коллагеногенеза, который меняет морфологический статус дермы в зоне инъекции. Несмотря на ряд достаточно интересных работ [4, 5, 10], механизм такого ответа до конца остается не изученным.

**Целью** настоящего исследования является изучение динамики морфологических изменений, происходящих в зоне инъекции препарата «Радиесс» в эксперименте, а также оценка статуса микробицидной системы нейтрофильных лейкоцитов крови на его введение.

**Материал и методы.** Для изучения морфологических изменений в зоне инъекции препарата «Радиесс» поставлены серии экспериментов *in vivo*. Объектом исследования послужили беспородные крысы-самцы весом 200-250 г. (24 особи). Препарат вводили интрадермально в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (холку) всем экспериментальным животным одновременно. Оценку результатов проводили через 2, 4, 6, 8 и 16 недель. Группе интактных животных (фоновый контроль) вводили стерильный физиологический раствор в той же дозе. Для морфологического изучения использовали кусочки кожи с заделкой материала в парафин. Окраску срезов проводили гематоксилином и эозином по Вейгерту и Вангизону [11]. Для оценки иммунологической реакции на введение препарата изучен микробицидный статус нейтрофильных лейкоцитов периферической крови крыс с определением уровня неферментных катионных белков (КБ) по В.Е. Пигаревскому [3] и активности миелопероксидазы (МП) по Sato (модификация) [2]. Изображения микросфер в формате TIF получали с цифровой камеры для микроскопии DCM 310. Анализ полученных изображений проводили с помощью компьютерной программы Scion Image фирмы Scion Corporation, сертифицированной в 2000 году National Institute of Health (USA). Все цифровые данные подвергались статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel.

**Результаты и обсуждение.** Изучение микропрепаратов в объеме стандартизированных морфологических тестов показало, что спустя две недели после инъекции «Радиесс» в микропрепаратах четко типизируются участки, заполненные микросферами, соединительная ткань вокруг зоны введения филлера растянута, коллагеновые волокна местами разорваны. У отдельных животных в зоне вокруг инъекции можно увидеть большое количество мелких кровеносных сосудов, заполненных эритроцитами (явление стаза). К концу 2 недели на поверхности единичных микросфер появляются плоские клетки, они располагаются на одной из сторон и напоминают собой маленькие базофильно окрашенные «шапочки». Спустя 4 недели конгломераты, сформированные микросферами, сохраняются, однако между ними появляются относительно короткие, тонкие оксифильно окрашенные фибриллы коллагена. Здесь же выявлено появление большого количества уплощенных базофильно окрашенных фибробластов. Лишь у одного из экспериментальных животных в срок, соответствующий 4 неделям, вокруг группы микросфер видны заполненные эритроцитами кровеносные капилляры, в этих участках видна лейкоцитарная инфильтрация, местами встречаются плазматические клетки (Рис.1).

На 8-й неделе эксперимента в препарате сохраняется достаточно много микросфер, но отчетливо видно, что они собраны в группы, насчитывающие 5-6 микросфер, и окружены веретеновидными клетками, окрашенными базофильно, вероятно, это фибробласты. На

поверхности микросфер отчетливо видны уплощенные клетки, они распластаны по поверхности микросфер. Местами удается типировать, что эти клетки уже содержат многочисленные ядра, не исключено, что это макрофаги, трансформированные в остеокласты (Рис.2).

На 16-й неделе микросферы располагаются также группами, но число их гранул в составе этих групп снижено. Контуры большинства микросфер четкие, на поверхности их сохраняются остеокласты. Другие микросферы окружены темным диффузным ободком, часть материала становится рыхлой с зонами просветления, что свидетельствует об их фрагментации. Между микросферами, а также на отдельных участках зоны инъекции, отчетливо видны оксифильно окрашенные, собранные в пучки, фибриллярные волокна, они достаточно тонкие, а между ними типированы клетки округлой формы с четко структурированными ядрами (Рис.3).

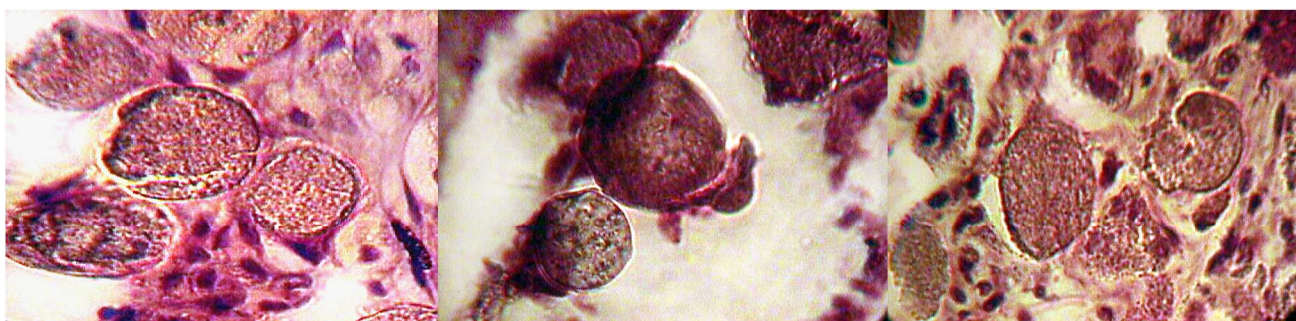


Рис.1 Морфологические изменения в зоне инъекции препарата «Радиесс» на 4 неделе эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин; Об.40х , Ок.7х;

Рис.2 Морфологические изменения в зоне инъекции препарата «Радиесс» на 8 неделе эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин; Об.40х , Ок.7х;

Рис.3 Морфологические изменения в зоне инъекции препарата «Радиесс» на 16 неделе эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин; Об.40х , Ок.7х;

При морфометрии микросфер оказалось, что их диаметр, начиная с 4 недели наблюдения, в среднем составляет  $23 \pm 0,61$  мкм. С пролонгированием срока наблюдения до 8 недель происходит размывание границ микросфер, они уплощаются, а средний диаметр их увеличивается до  $25 \pm 0,61$  мкм. К концу 16 недели размер микросфер в среднем составляет  $27 \pm 0,67$ . При этом на всех сроках наблюдения различия статистически достоверны ( $p < 0,01$ ). Изучение средней оптической плотности микросфер в зоне инъекции показало, что в срок, соответствующий 2 неделям, средняя оптическая плотность составляет  $76,1 \pm 1,12$ . Спустя 4 недели средний показатель соответствует  $79,2 \pm 1,8$ , а к концу 8 недели возрастает до  $84,47 \pm 1,55$ , с тем чтобы резко снизиться спустя 16 недель от начала эксперимента. К этому периоду средняя оптическая плотность большинства микросфер составляет  $73,8 \pm$

1,16, обнаруживая статистически достоверное различие по отношению к 8-ой неделе эксперимента.

Результаты изучения микробицидного статуса нейтрофильных лейкоцитов, показали, что на 4 неделе эксперимента активность миелопероксидазы (МП) нейтрофильных лейкоцитов составляет в среднем  $2,17 \pm 0,012$  при коэффициенте вариации, равном 9,38%. При этом уровень неферментных катионных белков (КБ) был равен  $2,28 \pm 0,08$ , а коэффициент вариации – 11,40%. Сравнение полученных результатов с данными контроля – ( $2,23 \pm 0,09$ ) и ( $2,31 \pm 0,17$ ) указывают на отсутствие статистически значимых различий, ( $P > 0,05$ ). Эти результаты нашли подтверждение и в случае изучения местного иммунного ответа в зоне инъекции препарата «Радиесс» на мазках-отпечатках. Так, оказалось, что единичные нейтрофильные лейкоциты, выявляемые в поле зрения, отличаются одинаковым с контролем уровнем содержания катионного белка и активностью миелопероксидазы.

**Обсуждение.** Результаты изучения кристаллов гидроксиапатита в качестве препарата волноимизации подтвердило его биосовместимость, отсутствие некрозов и тканевой дегенерации [7, 14, 15]. Особое значение придается его способности активизировать процесс коллагеногенеза внутри макропористых микросфер или вокруг них при макропористой структуре [4, 8]. Механизмы активации этого процесса в литературе дискутируются [4, 8]. Проведенное нами исследование показало, что интрадермальное введение кристаллов гидроксиапатита действительно приводит к изменению морфологического статуса дермы. Так, спустя 2 недели после инъекции вокруг кристаллов сохраняются разорванные коллагеновые волокна и явления геморрагического стаза. При этом на поверхности отдельных микросфер типично встречаются молодые макрофаги, а в зоне вокруг микросфер появляются фибробласты. Не исключено, что описанные изменения отражают первую фазу реакции дермы на введение биоматериала. Исследованиями, проведенными Coleman K. et all [5] в эксперименте, также показано, что инъекция препарата «Радиесс» не приводит к формированию капсулы, а интрадермальное введение его вызывает более активный неоколлагенез, чем субдермальное. С пролонгированием срока наблюдения за зоной инъекции кристаллов гидроксиапатита оказалось, что вокруг фибробластов начинают появляться тонкие короткие оксифильно окрашенные волокна, последние располагаются неупорядоченно, но эффект капсулирования здесь отсутствует. Местами видно, что фибриллы собираются в плотные пучки. Макрофаги, расположившиеся в первые две недели на поверхности микросфер, приобретают большое число ядер и теперь напоминают клетки остеокласты. Несмотря на то, что они плотно контактируют с микросферами, эффект герметизации полости резорбции здесь отсутствует и процесс деминерализации, присущий истинным остеокластам, не происходит. Считают, что в основе разрушения кристаллов

гидроксиапатита, скорее всего, лежит процесс ферментативного остеолизиса, а не фагоцитоза [9]. При этом утилизация фосфатных ионов и их метаболизм протекают по типу регулируемого гомеостаза [13]. Что касается размеров микросфер, инъецированных в зону дермы, то нами выявлены изменения этого параметра, а также определена динамика оптической плотности. При этом между ними существует обратная коррелятивная связь: размеры кристаллов в срок наблюдения до 18 недель увеличиваются за счет их декомпактизации, а величина оптической плотности, напротив, снижается. По данным Lemperle et all [9], уменьшение размеров кристаллов регистрируется в период от 3-х до 9 месяцев. При этом часть микросфер деформируется и фрагментируется. Проведенное исследование позволяет представить следующую динамику морфологического статуса компонентов дермы на введение препарата «Радиесс»:

1. В первые 2 недели – увеличение числа фибробластов и появление в зоне инъекции макрофагов.
2. На 4 неделе – трансформация макрофагов в остеокласты и начало синтеза коллагена фибробластами.
3. Увеличение размеров микросфер в течение первых 16 недель наблюдения и снижение их оптической плотности.
4. Сохранение микробицидного статуса нейтрофильных лейкоцитов на всех сроках эксперимента.

### Список литературы

1. Венедиктова И.И. Радиесс (Radiess) – новый дермальный филлер. Инъекционные методы и материалы // Косметология и пластическая хирургия. – 2009 (А). – С. 1-7.
2. Нестерова И.В., Фомичева Е.В. «Способ прогнозирования развития гнойных осложнений при хирургическом лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, осложненной стенозом» Патент России №2237251 27.09.2004 Бюл. №27.
3. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.: Медицина, 1978. – С. 214-216.
4. Berlin A., Hussan M., Goldberg D. Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis // Dermatol.Surg. – 2008. – Vol.34. – P. 64-67.
5. Busso M., Moers-Carpi M., Storck R., Ogilvie P., Ogilvie A. Multicenter, randomized trial assessing the effectiveness and safety of calcium hydroxylapatite for hand rejuvenation// Dermatol.Surg. – 2010. – V.36 – P. 790-797.
6. Coleman K., Voigts R., De Vore D. et al. Neocollagenesis after injection of Calcium Hydroxylapatite composition in a canine model // Dermatol. Surg. – 2008. – V.34. – P. 553-555.

7. Hevia O. Correction of lowerface with calcium hydroxylapatite // *Dermatol. Surg.*– 2009. – V. 35. – P. 1487-1494.
8. Hobar P., Pantaloni M., Byrd H. Porous hydroxylapatite granules for alloplastic enhancement of the facial region // *Clin Plast Surg.* – 2000. – V. 27. – P. 557-569.
9. Lemperle G., Morhenn V., Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation // *Aesthetic plastic surgery.* – 2004. – V.26. – P. 1-29.
10. Marmur E., Phelps R., Goldberg D. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calciumhydroxylapatite filler// *J.Cosmet Laser Ther.* – 2004. – V.6. – P. 223-226.
11. Pearce A. *Histochemistry. Theoretical and applied.* London,1968. – 561 p.
12. Sundaram H., Voigts R., Beer K., Meland M. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers : calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid // *Dermatol.Surg.* – 2010. – V.36. – P. 1859-1865.
13. Tomacic-Jeciz, Merritt K., Umbreit T. Significance of type and the size of biomaterial particles on phagocytosis and tissue distribution // *J.Biomed.Mater.Res.* – 2001. – P. 55-523.
14. Tzikas T.L. Evaluation of Radiance FN soft tissue filler for facial soft tissue augmentation// *Archives of Plastic Surgery.* – 2004. – V. 6. – P. 234-239.
15. Voigts R., De Vore D., Neuman P., Grazer J. Dispersion of a calcium hydroxylapatite accumulation in the skin: animal studies and clinical practices // *Dermatol.Surg.* – 2010. – V. 36.

**Рецензенты:**

Алексянц Г.Д., д.м.н., профессор, проректор по научно- исследовательской работе ФГБОУ ВПО КГУФКСТ, г. Краснодар.

Павлюченко И.И., д.м.н., профессор, декан фармацевтического факультета ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.