

## ДИНАМИКА КОМПОНЕНТОВ ДЕРМЫ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ФИЛЛЕРОВ

<sup>1</sup>Могильная Г.М., <sup>1</sup>Фомичева Е.В., <sup>2</sup>Терехов А.Я., <sup>2</sup>Блатт Ю.Е.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Россия (г. Краснодар, ул. Седина, 4), e-mail: fomevg@mail.ru

<sup>2</sup>ООО «МЕРЦ ФАРМ», Пресненская наб., 10, корп. С, Москва, Россия, e-mail: Julia\_Blatt@mail.ru

В эксперименте изучены морфологические преобразования, происходящие в дерме в зоне введения препаратов Радиесс (Merz) и Люминера (Израиль). Препараты вводили субдермально крысам-самцам в объеме 0,05 мл, оценку результатов проводили через 2 недели. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для избирательного обнаружения ДНК использовали реакцию Фельгена. Для выявления коллагеновых волокон использованы окраски по Ван-Гизону, Маллори и Массону (Pears, 1969). С целью типирования фибриллярных структур дермы была использована окраска пикро-сириусом красным по Dayan et al (1989). Проведена морфометрия микросфер и дана оценка их оптической плотности. Показано, что динамика изменений затрагивает характеристику микросфер, цитогенную стromу вокруг них, статус аморфного компонента, причем реакция компонентов дермы на различные филлеры отличается разнонаправленностью.

Ключевые слова: кристаллы гидроксиапатита, филлер, препараты Радиесс, Люминера, неоколлагенез в дерме.

## DYNAMICS OF COMPONENTS DERMIS IN RESPONSE TO THE FILLERS

<sup>1</sup>Mogilnaya G.M., <sup>1</sup>Fomicheva E.V., <sup>2</sup>Terehov A.Y., <sup>2</sup>Blatt Y.E.

<sup>1</sup> Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia (350 063, Krasnodar, ul. Sedina, 4), e-mail: fomevg@mail.ru.

<sup>2</sup> «Merz Pharma" Presnenskaya nab., 10, kor. S. Moscow, Russia, e-mail: Julia\_Blatt@mail.ru

The morphological transformations taking place in the dermis in the area of drug administration Radiesse (Merz) and Luminaire (Israel) were studied in this experiment. Drugs were injected male rats hypodermically in the volume of 0.05 mL, evaluation of the results was carried out in 2 weeks. Sections were stained with hematoxylin and eosin for selective detection of DNA. For this purpose, Feulgen reaction was used. To identify the collagen fibers coloring according to Van Gieson, Mallory staining and Masson (Pears, 1969) were used. For typing fibrillary structures of the dermis it was used red PIKRA-sirius coloring according to Dayan et al (1989). Morphometry microspheres and evaluation of their optical density were made. It is shown that the dynamics of the changes affect the characteristics of the microspheres, cytogenetic stroma around them, the status of an amorphous component, the reaction of components of dermal on various fillers differs in different directions.

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

Среди многообразных патогенетических трансформаций кожи в процессе ее старения ведущими следует признать изменения, затрагивающие экстрацеллюлярный матрикс дермы [1; 2]. При этом нарушения полиморфны: с одной стороны – это изменения водного баланса кожи и, как результат, снижение уровня содержания гиалуроновой кислоты, с другой – снижение метаболических процессов в коже и, следовательно, ингибирование синтеза коллагена и эластина [7; 9], и наконец эффект накопления свободных радикалов с повреждением стенок кровеносных сосудов и трансэндотелиального транспорта. Используемые в косметологии филлеры имеют своей целью изменение обмена метаболитов, восстановление гидродинамического эффекта, стимуляцию пролиферации фибробластов и продукцию ими коллагена [4-6]. Наибольший интерес в аспекте преобразования экстрацеллюлярного матрикса дермы представляют филлеры, в состав которых входят кристаллы гидроксиапатита. При этом, по данным литературы, наиболее

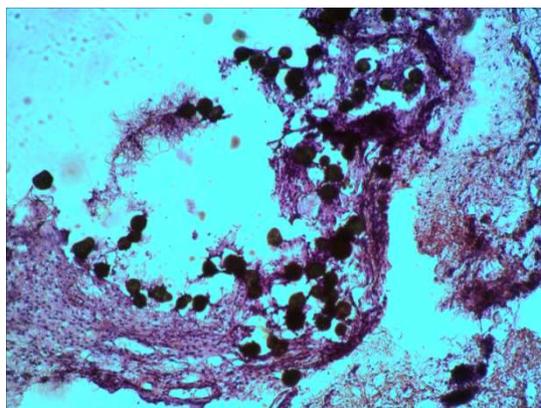
активно используемым в косметологии является препарат Радиесс [2; 3; 5], он характеризуется как эффективный субдермальный инъекционный имплант, главным элементом которого является кальций гидроксиапатит. Относительно механизма его действия ведутся дискуссии, но однозначно, что речь идет о процессе активации неколлагенеза в результате воздействия на фибробласты (путем растяжения или деструкции клеток) на фоне возрастания продукции цитокинов [4].

Целью настоящего исследования является сравнительное изучение морфологических изменений, происходящих в дерме в ответ на введение различных филлеров в ранние (2 недели) сроки после инъекции.

**Материал и методы.** Для сравнения морфологических преобразований в зоне дермы в качестве филлеров нами были использованы препараты Радиесс (Merz) и Люминера (Израиль). Объектом исследования послужили беспородные крысы–самцы весом 200-250 г (25 особей). Препарат вводили субдермально в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (холку) всем экспериментальным животным одновременно. Группе интактных животных (контроль) вводили стерильный физиологический раствор в той же дозе. Оценку результатов проводили спустя 2 недели. Для морфологического изучения использовали кусочки кожи с заделкой материала в парафин и окраску полученных срезов гематоксилином и эозином. Для выявления коллагеновых волокон использованы окраска по Ван-Гизону, а также окраски по Маллори и Массону (Pears, 1969). С целью типирования фибриллярных структур дермы нами была использована окраска пикро-сириусом красным по Dayan et al (1989). При этом в поляризованном свете свечение в спектре от желтого до красного цвета дает коллаген I типа. Коллаген III типа, формирующий ретикулярные волокна, дает свечение зеленого оттенка. Чем толще коллагеновые волокна, тем больше сдвиг цвета поляризации от зеленого через желтый в сторону красного. Для избирательного выявления ДНК использовали реакцию Фельгена (Pears, 1969). Полученные микропрепараты подвергали компьютерной морфометрии с использованием стандартизированных микрофотографий в формате TIF, полученных 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). Измерению подвергали диаметры ядер клеток дермы, объем аморфного и волокнистого компонентов, а также оптическую плотность ядер. Диаметры ядер использовали для расчета индекса ядерной симметрии. Все цифровые данные подвергались статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel.

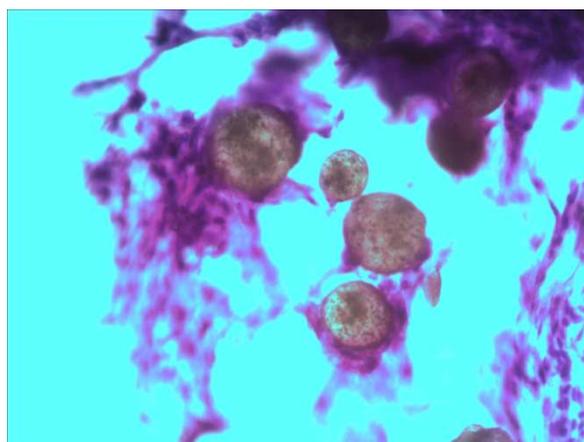
**Полученные результаты и их обсуждение.** Сравнительное изучение микропрепаратов с участков дермы в зонах введения филлеров в срок, соответствующий 2 неделям после

инъекции, показало наличие эффекта альтерации, обусловленной объемом вводимого филлера. В микропрепаратах на этих участках сохраняются разорванные коллагеновые волокна, в кровеносных сосудах наблюдается явление стаза, местами видны очаги ангиогенеза. В зоне дермы с инъецированным препаратом «Радиесс» при окраске гематоксилином и эозином типично видны темные гранулы – это микросферы, между которыми расположены тонкие неупорядоченно ориентированные волокна, которые по толщине и структурной организации соответствуют коллагеновым фибриллам (рис. 1).

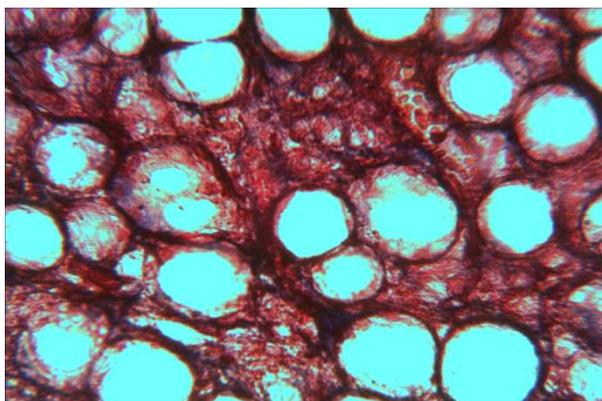


*Рис. 1. Микросферы препарата «Радиесс». Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 10х.*

При изучении самих микросфер видно, что на их поверхности располагаются уплощенные, напоминающие фибробласты клетки, расположенные в один ряд (рис. 2). Изредко встречаются клетки с двумя-тремя ядрами. На тех участках, где содержимое микросфер отсутствует при окраске по Массону и Маллори, отчетливо видны пустоты, стенки которых ограничены очень тонкими фибриллами (рис. 3).

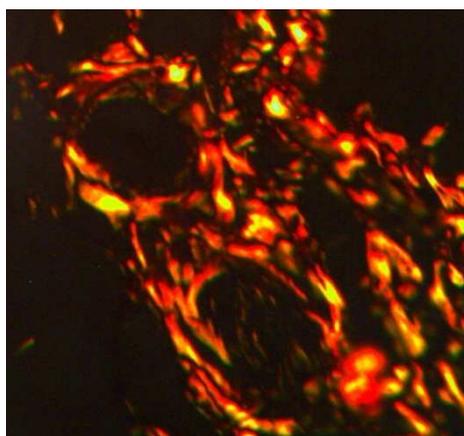


*Рис. 2. Микросферы препарата «Радиесс». Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40х. Ок. 10х.*



*Рис. 3. Зона инъекции препарата «Радиесс». Окраска по Массону. Об. 40х. Ок. 10х.*

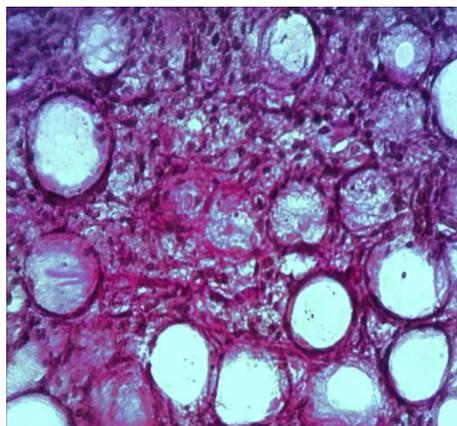
В условиях окраски пикро-сириусом красным оказалось, что эти фибриллы в поляризационном свете обладают эффектом анизотропии, при этом окружающие стенку капсулы фибриллы обнаруживают красное свечение (коллаген I типа), фибриллы желтого и зеленого цветов (коллаген III) встречаются здесь в виде вкраплений, создающих картину «штрихов». Вокруг зоны инъекции филлера чаще всего встречаются фибриллы, окрашенные в красный цвет (рис. 4). При оценке объема фибриллярного и аморфного компонентов оказалось, что количество фибриллярного компонента в среднем составляет  $33,7 \pm 1,5$  усл. ед. ( $18,3 \pm 0,6$  в контроле), то есть увеличивается почти вдвое. Объем аморфного компонента по отношению к контролю ( $28,6 \pm 0,6$ ), напротив, снижается до  $20,1 \pm 1,9$  (табл. 1). Цитогенная строма вокруг микросфер полиморфна. Мы провели компьютерную морфометрию ядер клеток в двух зонах локализации – клеток, окружающих микросферы, и клеток, находящихся в составе тяжей. Оказалось, что уровень средней оптической плотности ядер вокруг микросфер составляет  $132 \pm 2,28$ , и этот показатель был выше, чем в ядрах клеток в составе тяжей (табл. 1), и эти различия статистически достоверны.



*Рис. 4. Микросферы препарата «Радиесс». Окраска пикро-сириусом красным. Поляризационная микроскопия. Об. 40х. Ок. 10х.*

Индекс ядерной симметрии для клеток вокруг микросфер в 2 раза превышал диаметр ядер клеток в составе стромы. Общий объем ядерной массы по сравнению с уровнем

контроля снижается. Однако доля гиперхромных и гипохромных ядер меняется; так, число первых снижается, а последних увеличивается ( $19,8 \pm 0,07$ ). Не исключено, что мы имеем дело с эффектом эухроматинизации и, следовательно, повышением функциональной активности ДНК этих ядер. При изучении микропрепаратов, в окраске гематоксилином и эозином, в зоне инъекции люминеры спустя 2 недели видно, что вокруг микросфер, многие из которых лишены содержимого, появляется большое количество клеток, которые располагаются неупорядоченно. Особенно отчетливо удается рассмотреть стенку микросфер, не содержащих кристаллы гидроксиапатита, при этом видно, что она образована коллагеновыми фибриллами, снаружи от которых располагаются фиброциты (рис. 5). При окрашивании этих микросфер микро-сириусом красным с последующей поляризационной микроскопией видно, что волокна внутри микросфер окрашены в красный цвет и располагаются иерархически, среди них в виде включений типично короткие фибриллы желто-зеленого цвета (коллаген III типа) (рис. 6). При морфометрии объема волокнистого и аморфного компонентов оказалось, что в среднем он составляет  $17,0 \pm 3,3$  и  $28,9 \pm 1,23$  соответственно и не отличается от контроля ( $p > 0,05$ ). Объем ядерной массы по сравнению с исходным практически не меняется. Статус хроматина ядер клеток, расположенных вокруг микросфер и между ними, различается. При этом наибольшая оптическая плотность хроматина характерна для ядер клеток, расположенных вокруг микросфер с люминерой, что указывает на большую активность ДНК, значительное число молекул которой оказывается чувствительной к гидролизу, используемому в реакции Фельгена.



*Рис. 5. Зона инъекции препарата «Люминера». Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40х.  
Ок. 10х.*

. Соотношение гипохромных и гиперхромных ядер после инъекции люминеры характеризуется тенденцией к увеличению гипохромных ядер, но статистически эти различия не достоверны. Наиболее выраженным эффектом для препарата «Люминера» является увеличение оптической плотности ядер в окраске их реакцией Фельгена. Так, оказалось, что оптическая плотность ядер клеток вокруг микросфер с люминерой

увеличивается до  $153,83 \pm 1,5$  (в контроле  $127,33 \pm 4,35$  усл. ед.). При окраске по Ван-Гизону и при реакции Массона коллагеновые волокна дермы представляются достаточно широкими, плотно упакованными, и граница между сосочковым и сетчатым слоями дермы нивелируется. На отдельных участках видно увеличение объема аморфного матрикса, и здесь коллагеновые волокна представляются рыхло упакованными. Объем ядерной массы соответствует уровню контроля, не меняется и соотношение площади, занятой гиперхромными и гипохромными ядрами. Вместе с тем уровень энтропии коллагеновых волокон достаточно низкий – это  $2,9 \pm 0,03$  усл. ед., что указывает на упорядоченное расположение фибрилл.

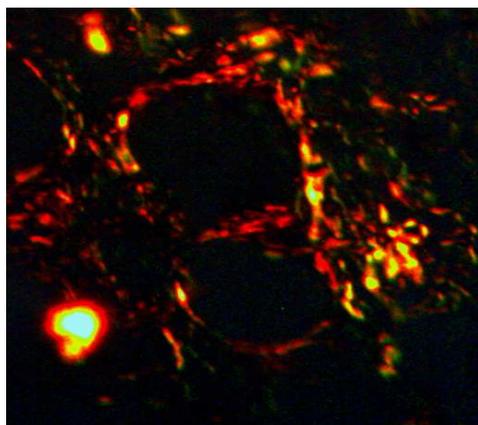
Таким образом, полученные данные показывают, что в случае использования филлеров, содержащих кристаллы гидроксиапатита, реакция дермы на их введение различается. Так, в случае использования препарата «Радиесс» спустя 2 недели после инъекции наблюдается феномен активации процесса коллагеновых фибрилл, однако внеклеточный процесс фибриллогенеза не завершается к этому сроку, и формирование типичных коллагеновых волокон не происходит. Доказательством активности процесса фибриллогенеза служит показатель увеличения объема волокнистого компонента в составе экстрацеллюлярного матрикса дермы, который в случае по сравнению с контролем увеличивается в 2 раза. Микросферы препарата «Радиесс» окружаются фибробластами, причем это удается наблюдать в отдельных микросферах, уже не окруженных субстратом-носителем, и эти клетки реагируют на филлер синтезом фибрилл, которые могут формировать вокруг отдельных микросфер волокнистую оболочку.

**Таблица 1**

**Морфометрия компонентов дермы спустя две недели после введения филлера**

Индуктор	Ядерная масса	Волокнистый компонент	Аморфный компонент	Гиперхромные ядра	Гипохромные ядра	Уровень энтропии
Контроль	$26,8 \pm 1,15$	$18,3 \pm 0,6$	$28,6 \pm 0,6$	$12,6 \pm 0,6$	$14,2 \pm 0,06$	$2,7 \pm 0,06$
Радиесс	$20,7 \pm 1,8$ P<0,05	$33,7 \pm 1,5$ P<0,001	$20,1 \pm 1,9$ P<0,01	$5,7 \pm 0,4$ P<0,001	$19,8 \pm 0,07$ P<0,001	$3,1 \pm 0,13$ P<0,05
Люминера	$27,9 \pm 2,5$ P>0,05	$17,0 \pm 3,3$ P>0,05	$28,9 \pm 1,23$ P>0,05	$10,0 \pm 1,3$ P>0,05	$16,2 \pm 1,8$ P>0,05	$3,1 \pm 0,03$ P<0,001

Примечание. P - отличие от контроля.



*Рис. 6. Микросферы препарата «Люминера». Окраска микро-сириусом красным. Поляризационная микроскопия. Об. 40х. Ок. 10х.*

Доказательством возможной функциональной активности этих клеток может служить увеличение показателя оптической плотности ядер клеток, окружающих микросферы при реакции Фельгена, избирательно выявляющей ДНК, а также увеличение общего объема гипохромных ядер, также проявляющих эффекты эухроматинизации. К этому сроку процесс неокollaгеноза не очень активный и появляющиеся вне микросфер волокна при исследовании в поляризованном свете содержат коллаген I и коллаген III типов. Фибробласты, сформировавшие тонкие фибриллы вокруг микросфер, остаются здесь же и трансформируются в фиброциты. Процесс неокollaгеноза смещается за пределы зоны локализации микросфер, но процесс внеклеточного фибриллогеноза даже здесь не завершается.

В случае использования препарата «Люминера» по сравнению с препаратом «Радиесс» происходит увеличение в зоне дермы объема аморфного матрикса (в 1,5 раза), что приближает его к эффекту индуктивного влияния на дерму гиалуроновой кислоты. Обращает внимание тот факт, что при введении люминеры происходит значительное увеличение оптической плотности ядер клеток вокруг микросфер, и это увеличение статистически значимо как для контроля, так и относительно аналогичного показателя для препарата «Радиесс». Интересно, что увеличение оптической плотности сопровождается снижением коэффициента соотношения диаметров ядер, который составляет  $1,71 \pm 0,1$  (вместо  $2,23 \pm 0,11$  контроля).

#### **Список литературы**

1. Beer K., John M., Cohen J. Evaluation of injectable CaHA for the treatment of mid-face volume loss // J. Drugs Dermatol. - 2008. - V. 7 (4). - P. 359-366.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. Jacovella P. Use of calcium hydroxylapatite (Radiesse) for facial augmentation. *Clinical interventions in Aging.* - 2008. - P. 161-174; Hevia O. Correction of lowerface with calcium hydroxylapatite // *Dermatol. Surg.* - 2009. - V. 35. – P. 1487-1494.
6. Lizzul P., Narurkar V. The role of calcium hydroxylapatite (Radiesse) in nonsurgical aesthetic rejuvenation // *J. Drugs Dermatol.* - 2010. - V. 9 (5). - P. 446-450.
7. Marmur E., Phelps R., Goldberg D. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler // *J. Cosmet Laser Ther.* – 2004. - V. 6. - P. 223-226.
8. Pearce A. *Histochemistry. Theoretical and applied.* – London, 1968. - 561 p.
9. 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.

**Рецензенты:**

Каде А.Х., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патфизиологии ГБОУ ВПО «КубГМУ» Минздрава России, г. Краснодар;

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