

УДК 616.5-08:615.2-092.9

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС МАКРОФАГОВ ДЕРМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ФИЛЛЕРА

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

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, e-mail: fomevg@mail.ru*

Работа посвящена изучению зависимости функционального статуса макрофагов дермы в ответ на введение различных филлеров (кристаллы гидроксиапатита, полимолочная кислота), которые обладают различным характером утилизации их в организме. Исследование выполнено на крысах (30 особей) с субдермальным введением препаратов в объеме 0,05 мл. Оценку результатов проводили спустя две недели, 1, 2 и 4 месяца после инъекции. Постановку иммуногистологической реакции осуществляли согласно протоколам, прилагаемым к используемым антителам. Для выявления макрофагов использовали молекулярный маркер CD68 (LabVision). Показано, что динамика числа макрофагов, включающихся в ответную реакцию на инородное тело, зависит от временного фактора. Установлена связь между распределением макрофагов и характером используемого филлера. Выявлены также различия и в механизме генерации ответа на филлер. Так, в случае препарата «Радиесс» кристаллы гидроксиапатита индуцируют трансформацию макрофагов в остеокласты. При использовании полимолочной кислоты, деградация которой происходит путем гидролиза в лактат с последующим окислением до CO<sub>2</sub>, участие макрофагов видится в развитии субклинической воспалительной реакции с последующим привлечением фибробластов, которые регулируют объем синтеза экстрацеллюлярного матрикса дермы.

Ключевые слова: дерма, макрофаг, полимолочная кислота, кристаллы гидроксиапатита, радиесс, имплант, филлер.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL STATUS OF MACROPHAGES OF THE DERMIS DEPENDING ON THE TYPE OF FILLER

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

*Kuban State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, e-mail: fomevg@mail.ru*

The work is devoted to the study of the dependence of the functional status of the dermal macrophages in response to the injection of fillers based on calcium hydroxyapatite and polylactic acid, which have a different ways of their utilization in the body. The study was performed on rats (30 animals) with subdermal injection of fillers in a volume of 0,05 ml. Result were evaluated 2 weeks, 1, 2 and 4 months after injection. A molecular marker CD 68 (LabVision) was used to identify macrophages. It is shown that dynamics of the number of macrophages involved in the response to a foreign substance depends on the time factor. There are also differences in the mechanism of generating response to the filler. So in the case of Radiesse, hydroxyapatite crystals induce the transformation of macrophages into osteoclasts. When using polylactic acid, the degradation of which occurs by hydrolysis into lactate, followed by oxidation to CO<sub>2</sub>, the participation of macrophages is seen in the development of a subclinical inflammatory reaction followed by the involvement of fibroblasts that regulate the synthesis of the extracellular matrix of the dermis.

Keywords: dermis, macrophage, polylactic acid, filler, calcium hydroxyapatite implant.

Изучение клеточных и молекулярных особенностей дермы в ответ на введение филлеров, используемых для контурной пластики лица, определяется статусом одной из важнейших ее клеточных популяций - макрофагами. Клетки этого типа обеспечивают фагоцитоз, регулируют пролиферативную активность других клеток дермы, контролируют объем внеклеточного матрикса. По данным литературы, первая ответная реакция на филлер связана с активацией в течение 1 суток нейтрофилов, мигрирующих в зону альтерации [1; 2].

При этом характер воспалительного ответа и его морфологические фазы определяются совокупностью клеточных элементов дермы, где одним из важнейших компонентов является система фагоцитирующих мононуклеаров [3]. Степень активности этих клеток обеспечивает защиту и фагоцитоз, а также модуляцию других клеточных типов, ответственных за контроль объема синтезируемого экстрацеллюлярного матрикса [4]. Спустя 1-2 суток подключаются макрофаги, обеспечивающие развитие острой воспалительной реакции.

Целью данного исследования является сравнительное изучение иммуногистохимического статуса макрофагов дермы в условиях введения кристаллов гидроксиапатита кальция и полимолочной кислоты.

**Материал и методы исследования.** В настоящем исследовании мы использовали препарат Radiesse (Merz America, Inc., Raleigh, NC, USA), основу его составляют микросферы размером 25-45 мкм, образованные кристаллами гидроксиапатита кальция и транспортным гелем. Вторым филлером был препарат полимолочной кислоты (AestheFill, Korea). Объектом исследования послужили беспородные крысы-самцы весом 200-250 г (30 особей, ПЛЖ «Рапполово» Ленинградской области). Эксперимент проводился с разрешения Этического комитета ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Препараты вводили субдермально в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (холку). В группе интактных животных (контроль) использовали стерильный физиологический раствор в той же дозе. Оценку результатов проводили спустя 2 недели, 1, 2 и 4 месяца после инъекции. Для морфологического изучения использовали биоптаты кожи, которые подвергали стандартной гистологической обработке. С целью определения экспрессии ИГХ-маркеров использовали моноклональные антитела CD68 (LabVision) и систему визуализации Ultra Vision LP (LabVision). Исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 4 мкм с полилизинным покрытием. Постановку гистохимической реакции осуществляли согласно протоколам, прилагаемым к используемым антителам. Для завершения окрашивания осуществляли фоновое контрастирование срезов Hematoxylin II (Roshe, Швейцария). Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 7. Статистическую значимость параметрических данных оценивали по критерию Стьюдента. Различия между группами считались достоверными при  $p < 0,05$ .

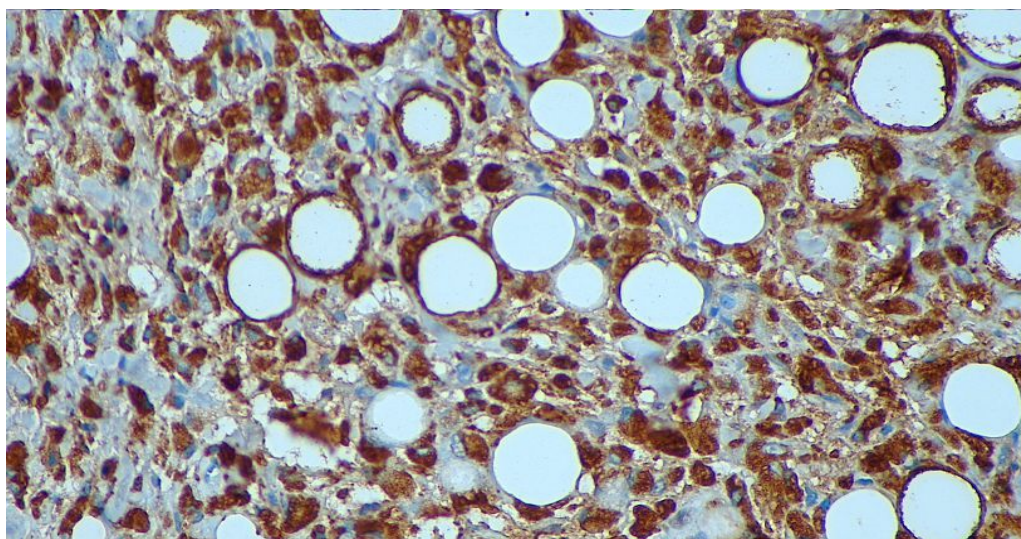
### **Результаты исследования и их обсуждение**

Изучение зоны импланта спустя 2 недели после введения препарата «Радиесс» показало присутствие в нем большого числа клеток, экспрессирующих CD-68. При этом на поверхности отдельных микросфер видно слияние нескольких макрофагов, и такие участки визуально воспринимаются как «шапочки». Между микросферами выявляется большое

количество макрофагов ( $48 \pm 0,77$ ) с высокой экспрессией CD-68, при этом клетки этого типа различаются по характеру экспрессии CD-68. Так, одни макрофаги характеризуются присутствием пенистой вакуолизированной цитоплазмы, тогда как другие окрашиваются диффузно и даже содержат пылевидные гранулы. Встречаются макрофаги, имеющие неровный, «изъеденный» край, обращенный во внутреннюю полость микросфер. Не исключено, что это клетки, пытающиеся формировать «гофрированную каемку», известную для остеокластов.

Спустя месяц после введения радиесса наблюдается увеличение числа макрофагов, экспрессирующих CD-68 в зоне дермы над имплантом. При этом клетки локализуются как в поверхностном, так и в глубоком слое дермы. По форме они становятся вытянутыми, веретенообразными с неровными краями. Интенсивность реакции сохраняется высокой. Однако распределение окраски диффузное, или же цитоплазма пенистая, но также интенсивно окрашенная.

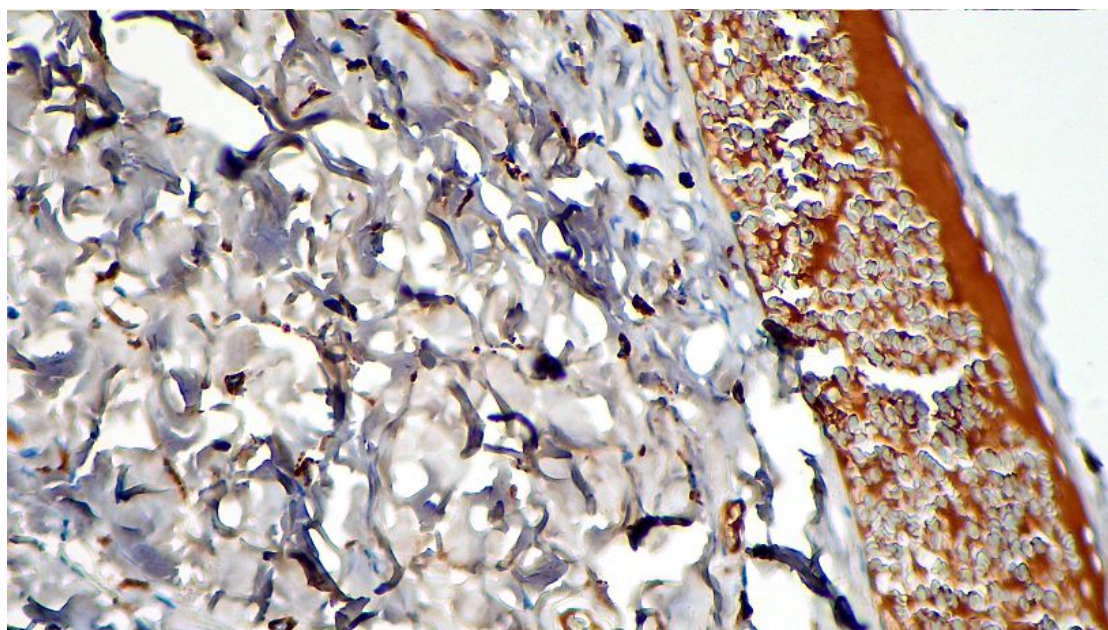
Видно увеличение числа макрофагов и по краю формируемой фиброзной капсулы, окружающей имплант, здесь преобладают клетки вытянутой формы с высоким уровнем содержания CD-68. Резкое увеличение числа макрофагов характерно и для самого импланта, но расположение клеток относительно микросфер различается. Так, отдельные микросферы окружены тонкой капсулой, сформированной клетками с уплощенными ядрами. На поверхности таких микросфер видны единичные макрофаги с высоким уровнем экспрессии CD-68. На других микросферах четко видны группы макрофагов, по 2-3 клетки, слившихся между собой (рис. 1), это клетки, находящиеся на стадии фузии. Местами видны единичные многоядерные клетки инородных тел. В зоне соединительной ткани, расположенной между микросферами, много макрофагов с пенистой, интенсивно окрашенной цитоплазмой.



*Рис. 1. Зона введения радиесса через 2 недели. Иммуногистохимическая реакция, CD68+ макрофаги. (Об. x10; Ок. x40)*

Местами встречаются микросферы, внутренний край которых неровный, «зубчатый», эта «каемка» также обнаруживает присутствие рецепторов для CD-68. Не исключено, что это макрофаги, трансформирующиеся в остеокласт с типичной для него «гофрированной каемкой». Микросфер такого типа особенно много по периферии импланта, контактирующего с внутренним листком капсулы, окружающей его. Интересно, что CD-68 положительные макрофаги зоны капсулы и импланта разнятся. Для первых характерна пеннистая цитоплазма с высоким уровнем экспрессии CD-68. У макрофагов капсулы - форма тела вытянутая, веретеновидная, окраска диффузная, не исключено, что это группа оседлых макрофагов.

Изучение зоны введения препарата радиесс спустя 2 месяца после пребывания в дерме показало, что число макрофагов на участке импланта снижается, а выявляющиеся клетки сохраняют умеренный уровень экспрессии CD-68. В дерме над имплантом макрофагов достаточно много (рис. 2), они небольшого размера и отличаются умеренной экспрессией CD-68. При пролонгировании срока наблюдения до четырех месяцев имплант типифируется как участок с высоким уровнем экспрессии CD-68 за счет числа микросфер и их содержимого, которое выглядит неомогенным и состоит из отдельных разрушающихся фрагментов.



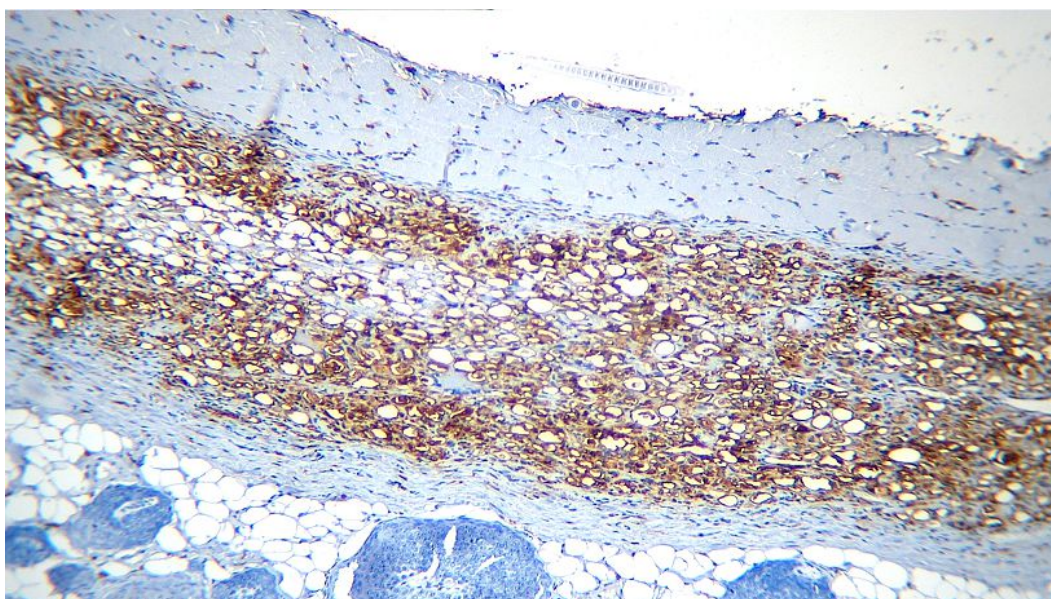
*Рис. 2. Зона введения радиесса через 2 месяца. Иммуногистохимическая реакция, CD68+ макрофаги. (Об. x10; Ок. x10)*



Участки дермы вне импланта содержат макрофаги с высоким уровнем экспрессии CD-68. Топографически эти зоны соответствуют периферии импланта, контактирующей с соединительнотканной капсулой.

При изучении экспрессии CD-68 макрофагами в зоне введения полимолочной кислоты (ПК) установлено, что спустя 2 недели в дерме над имплантом как в сосочковом, так и в сетчатом слое появляются клетки, обнаруживающие положительную реакцию. Распределение окраски диффузное, уровень экспрессии от умеренного до интенсивного. Местами встречаются многоядерные клетки.

В импланте реакцию дают стенки микросфер, заполненные ПК (рис. 3). При этом видно, что цитоплазма этих клеток окрашивается слабо или умеренно. Снаружи выявляется большое число макрофагов с пенистой цитоплазмой. Спустя месяц в зоне капсулы, окружающей имплант, появляются многоядерные клетки, цитоплазма которых экспрессирует умеренные количества CD-68. Достаточно много макрофагов, обнаруживающих экспрессию CD-68, сохраняется в сосочковом слое, тогда как для зоны сетчатого слоя характерно наличие клеток с низким содержанием CD-68. Здесь также можно увидеть фрагменты экстрацеллюлярного матрикса с очень слабой реакцией на CD-68.



*Рис. 3. Зона введения ПК через 1 месяц. Иммуногистохимическая реакция, CD68+ макрофаги. (Об. 10x; Ок. 10x)*

Через 2 месяца уровень экспрессии CD-68 макрофагами и в импланте, и в дерме над ним нарастает, здесь появляется большое число клеток, обнаруживающих интенсивную реакцию. При этом клетки такого типа встречаются как в сосочковом, так и в сетчатом слое дермы. Здесь появляется достаточно большое число многоядерных клеток, среди которых

можно выделить небольшие клетки, сформированные за счет слияния 10-12 макрофагов, и достаточно крупные, насчитывающие до 20 клеток. Слабую диффузную реакцию обнаруживают отдельные участки экстрацеллюлярного матрикса.

После пребывания импланта в течение четырех месяцев в дерме по-прежнему выявляется достаточно большое количество макрофагов. Речь идет об увеличении их числа, поскольку интенсивность реакции на CD-68 снижается до умеренной, число интенсивно окрашенных клеток небольшое, уменьшается число и гигантских многоядерных клеток, сохраняющих локализацию по периферии импланта.

Подсчет числа макрофагов в условиях введения филлеров показал, что при наличии радиесса, спустя 2 недели после его введения, происходит резкое увеличение числа макрофагов, составляющее в среднем  $64,3 \pm 1.9$  ( $p < 0,001$ ). В случае полимолочной кислоты увеличение количества макрофагов в этот же период выражено не столь резко ( $30,5 \pm 0.9$ ;  $p < 0,05$ ). Для препарата радиесс в последующие сроки наблюдения, соответствующие одному и четырем месяцам, динамика макрофагов связана со снижением в течение первого месяца и с последующим увеличением их числа, но уже сообразно топографическим зонам; максимальное - в зоне импланта ( $62,25 \pm 1.1$ ;  $p < 0,001$ ), умеренное - в зоне под имплантом ( $48,5 \pm 0.50$ ;  $p < 0,001$ ) и низкое ( $30,0 \pm 1.0$ ;  $p < 0,001$ ) на участке над имплантом. В случае полимолочной кислоты выявлено, что в течение первого месяца происходит увеличение числа макрофагов и в среднем их число составляет  $55,3 \pm 0,56$  ( $p < 0,001$ ), однако к концу четвертого месяца количество макрофагов снижается до  $14,0 \pm 1.3$  ( $p < 0,05$ ).

Итак, сравнительное изучение распределения макрофагов и оценка степени экспрессии ими CD-68 показали различие этапов ответной реакции дермы на введение кристаллов гидроксиапатита (препарат радиесс) и полимолочной кислоты. Так, при введении препарата радиесс в срок, соответствующий 2 неделям, стенка вокруг микрогранул образована фибриллами и клетками с уплощенным ядром, которые не реагируют на CD-68. Лишь кнаружи от этой капсулы встречаются макрофаги с CD-68 положительной реакцией. В то же время на участке с полимолочной кислотой положительную реакцию с CD-68 обнаруживают клетки, выстилающие полости с ПК. Клетки уплощены и содержат одно ядро. Подсчет числа макрофагов в случае использования препарата радиесс показал более чем в 2 раза превалирование числа макрофагов по сравнению с зоной введения полимолочной кислоты.

В срок, соответствующий 1 месяцу после введения радиесса, происходит увеличение числа макрофагов, экспрессирующих CD-68. Этот эффект реализуется как поверхностная, так и глубокая зоны дермы, а также капсула, формируемая вокруг импланта. В зоне самого импланта происходит увеличение числа макрофагов за счет перемещения их от капсулы к

центру. При введении полимолочной кислоты в срок, соответствующий 1 месяцу, выявляются различия в степени экспрессии CD-68 макрофагами сосочкового слоя дермы, клетки этого типа окрашиваются более интенсивно. Кроме того, здесь рано появляются многоядерные клетки инородного тела. В условиях пролонгирования срока наблюдения препарата радиесс после введения до 2, а затем и до 4 месяцев активность макрофагов дермы сохраняется.

Изменения макрофагов во временном аспекте от 2 недель до 4 месяцев проходят по следующей схеме. Появление макрофагов, приуроченное ко второй неделе наблюдения, – это эффект рекрутирования большого числа нейтрофилов и моноцитов, с трансформацией их в макрофаги, появляющиеся между микросферами и на их поверхности. В последующем макрофаги реализуют эффект фузии в попытке сформировать функционирующий остеокласт, но этот процесс не завершается, ибо многоядерный остеокласт с зоной «светлой полоски», контактирующей с кристаллами гидроксиапатита, здесь не образуется, и, следовательно, разрушение кристаллов филлеры с привлечением протонов водорода, растворяющих их, не имеет места.

Однако жизненный цикл группы слившихся макрофагов продолжается в виде формируемых ими многоядерных клеток инородных тел, для которых принято определение как макрофаги, не завершившие фагоцитоз. В связи с появлением в литературе работы S. Zerbinati [5] вопрос об утилизации кристаллов гидроксиапатита становится спорным. Эти авторы на основе использования электронной микроскопии описывают присутствие в зоне локализации импланта массы пузырьков, открывающихся в лабиринте плазмолеммы, которые они интерпретируют как появление клетки остеокласта.

В случае использования полимолочной кислоты капсула микросфер изначально образована макрофагами, имеющими вид уплощенных клеток, распластанных по внутренней поверхности лакун, заполненных полимолочной кислотой. Вероятно, это неактивные клетки. В зоне между ними появляется большое число активированных макрофагов, о чем свидетельствует наличие у них пенистой цитоплазмы с высоким уровнем экспрессии CD-68. Макрофаги в случае ПК выступают в качестве ключевых клеток, реализующих реакцию дермы на инородное тело. Первоначально они индуцируют фибробласты к пролиферации и синтезу коллагена, что обеспечивает прирост объема экстрацеллюлярного матрикса дермы. Завершением этого процесса является рекрутирование фибробластов к дифференцировке в миофибробласты, которые инкапсулируют каждую микросферу ПК за счет образования коллагена.

### **Заключение**

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что реакция макрофагов на

введение импланта проявляется динамикой числа этих клеток, включающихся в ответную реакцию на инородное тело, и этот процесс временно зависимый. Установлена также связь между распределением макрофагов и характером используемого филлера. Так, в случае препарата радиесс кристаллы гидроксиапатита индуцируют трансформацию макрофагов в остеокласты. Не исключено, что это может изменить механизм генерации эффекта прироста объема экстрацеллюлярного матрикса. При использовании полимолочной кислоты, деградация которой происходит путем гидролиза в лактат с последующим окислением до CO<sub>2</sub> [6], участие макрофагов видится в развитии субклинической воспалительной реакции с последующим привлечением фибробластов, которые регулируют объем синтеза экстрацеллюлярного матрикса дермы.

### Список литературы

1. Lemperle G., Knapp T., Sadick N., Lemperle S.M. Arte Fill permanent injectable for soft tissue augmentation: I. Mechanism of action and injection techniques. *Aesth Plast Surg*. 2010. Vol. 34. P. 264-272. DOI: 10.1007/s00266-009-9413-1.
2. Quan T., Fisher G.J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review experimental section. *Gerontology*. 2015. Vol. 61. P. 427-434. DOI: 10.1159/000371708 a16.
3. Chang F., Shen Y. Ponnuswamy Mohanasundarametall. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- $\beta$ -Slug signaling. *Proc. Natl AcadSci U S A*. 2016. Vol. 113 (30). P. 4320-4327. DOI: 10.1073/pnas. 1519197113.
4. Могильная Г.М., Фомичева Е.В., Блатт Ю.Е. Морфогистохимическая характеристика импланта из полимолочной кислоты // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018. Т. 25. № 6. С.114-118. DOI: 10.25207/1608-6228-2018-25-6-114-118.
5. Zerbinati N., Pier Camillo Parodi., Alberto Calligaro. Microscopikan ultrastructural evidences in human skin following calcium hidroxyapatite filler treatmen. *Arch. Dermatol. Res*. 21 March 2017. DOI: 10.1007/s00403-017-1734-3.
6. Stein P., Vitavska O., Kind P., Hoppe W., Wieczorek H., Schurer N.Y. The biological basis for poly-L-lactic acid-induced augmentation. *Journal of Dermatological Science*. 2015. Vol. 78. P. 26-33. DOI:10.1016/j.jdermsci. 2015. 01.012.