

ИНЪЕКЦИОННЫЙ ИМПЛАНТ FASETEM И РЕАКЦИЯ ДЕРМЫ НА ЕГО ВВЕДЕНИЕ

Могильная Г.М.¹, Ковальчук Ю.В.², Фомичева Е.В.¹, Пейливаньян Э.Г.¹,
Евглевский А.А.¹

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

В эксперименте изучены морфологические и гистохимические преобразования, происходящие в дерме в зоне имплантации скаффолда из Facetem. Препарат Facetem изготовлен на основе гидроксиапатита кальция, относится к имплантам нового поколения за счет использования микросфер, изготовленных по технологии Lattice-pore (Южная Корея). Исследование выполнено на крысах (30 особей) с субдермальным введением препарата в объеме 0,05 мл. Оценку результатов проводили спустя 1 и 2 недели, 1, 2, 3, 4, 5 месяцев после инъекции филлера. Для морфологического изучения использовали биоптаты кожи, которые подвергали стандартной гистологической обработке. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизона, с помощью реакции Массона. Установлено, что филлер Facetem относится к биodeградируемым, в условиях его пролонгированного пребывания в дерме он обеспечивал увеличение объема экстрацеллюлярного матрикса за счет синтеза коллагена клетками фибробластами. Механизм действия филлера Facetem реализовался по типу развития ответной реакции на введение инородного тела. Сопутствующее данной реакции воспаление полностью нивелировалось к 3-му месяцу после введения импланта. В ответ на инъекцию импланта Facetem происходит активизация процесса неоколлагенеза с образованием коллагеновых волокон вокруг введенного препарата и постепенным замещением структур микросфер волокнами коллагена.

Ключевые слова: дерма, имплант, филлер, Facetem, неоколлагенез в дерме, гидроксиапатит кальция.

FACETEM INJECTION IMPLANT AND THE REACTION OF THE DERMIS TO ITS INTRODUCTION

Mogilnaya G.M.¹, Kovalchuk Y.V.², Fomicheva E.V.¹, Pehlivanian E.G.¹, Evglevskiy A.A.¹

¹ФГБОУ professional education "Kuban state medical University" Krasnodar, e-mail: fomevg@mail.ru;

²ООО "NEO PROMEDTEK", Moscow, e-mail: info@promedtec.net

The experiment studied morphological and histochemical transformations occurring in the dermis in the area of implantation of the Facetem scaffold. Facetem, a preparation based on calcium hydroxyapatite, belongs to a new generation of implants using microspheres made using Lattice-pore technology (South Korea). The study was carried out on rats (30 animals) with subdermal injection of the drug in a volume of 0.05 ml. The results were evaluated after 1 and 2 weeks, 1,2,3,4,5 months after the filler injection. For morphological study, skin biopsies were used, which were subjected to standard histological processing. Sections were stained with hematoxylin and eosin, according to the Van Gieson method, using the Masson reaction. It has been established that the Facetem filler is biodegradable and under conditions of its prolonged stay in the dermis provides an increase in the volume of the extracellular matrix due to the synthesis of collagen by fibroblasts cells. The mechanism of action of the Facetem filler is realized by the type of development of a response to the introduction of a foreign body. The inflammation accompanying this reaction is completely leveled by 3 months after the injection of the implant. In response to the Facetem implant injection, the neocollagenesis process is activated with the formation of collagen fibers around the injected filler and the gradual replacement of the microsphere structures with collagen fibers.

Keywords: dermis, implant, filler, Facetem, neocollagenogenesis in the dermis, calcium hydroxyapatite.

Современная регенеративная медицина широко использует клеточные технологии для активации процесса регенерации [1-3]. Однако одним из основных препятствий внедрения их в практику являются потенциальные риски, связанные с возможным нарушением пролиферации, дифференцировки и миграции этих клеток. Избежать таких осложнений представляется возможным в случае использования биodeградирующих скаффолдов. Особенно привлекательными представляются биополимеры, обладающие естественной

биодegradацией [4-8]. Среди них наиболее перспективные филлеры, содержащие в своем составе кристаллы гидроксиапатита: «Радиесс» (Германия) и «Люминера» (Израиль). Эти биодegradируемые филлеры применяются в челюстно-лицевой хирургии, травматологии, фармакологии и косметологии. В последнем случае эти вещества обуславливают стимуляцию возрастных фибробластов [9], а также восстановление поврежденных участков кожи в процессе синтеза ее внеклеточного матрикса [10; 11]. К филлерам подобного типа можно отнести и препарат Facetem, представленный концерном Daewoong Group, разработанный на основе кристаллов гидроксиапатита кальция по новой технологии Lattice-pore, используемой для формирования микросфер.

Цель исследования: настоящее исследование посвящено изучению морфологических преобразований дермы, происходящих в зоне имплантации скаффолда из Facetem.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 30 беспородных крысах-самцах массой 200-250 г (ПЛЖ «Рапполово» Ленинградской области). Животным вводили препарат Facetem, изготовленный на основе гидроксиапатита кальция. Он относится к имплантам нового поколения за счет использования микросфер, изготовленных по технологии Lattice-pore (производитель Южная Корея). При проведении эксперимента соблюдались этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным. Содержание и дизайн исследований согласованы с Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России (протокол № 54 от 11.10.2017 г.). Введение филлера проводилось после выстригания волосяного покрова субдермально в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (площадь 3x3 см). Объектом морфологического и гистохимического изучения стали фрагменты кожных покровов в области введения препарата. Забор материала производили спустя одну и две недели, 1, 2, 3, 5 месяцев после инъекции. Проводку и заливку материала выполняли в процессорах фирмы Tissue-Tek VIP5Jr., (Япония). Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-6 микрон с использованием ротационного микротомы HM 340 E (MICROM Laborgerate GmbH, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизона, по Маллори и Массону [11] в автоматическом мультитейнере Tissue-Tek Prisma (Япония).

Статистический анализ результатов исследования выполнен с применением компьютерной программы Statistica 13 Trial.

Результаты исследования и их обсуждение

Визуализация препаратов дермы после окраски гематоксилином и эозином, а также при реакциях Маллори, Массона и Ван Гизона показали, что спустя одну неделю после введения импланта зона локализации его типировалась по наличию микросфер. Последние имели вид

цист, окруженных одним слоем плоских клеток с гиперхромными ядрами. Между микросферами располагались фрагменты коллагеновых волокон темно-синего цвета в окраске по Маллори (рис. 1). В зоне экстрацеллюлярного матрикса типировался клеточный инфильтрат, большинство ядер этих клеток находились в стадии активации, о чем свидетельствовал их дисперсный хроматин и наличие в них 1-2 ядрышек (рис. 2). В зоне импланта выявлялись клетки с пенистым и вакуолизированным содержимым (рис. 2).

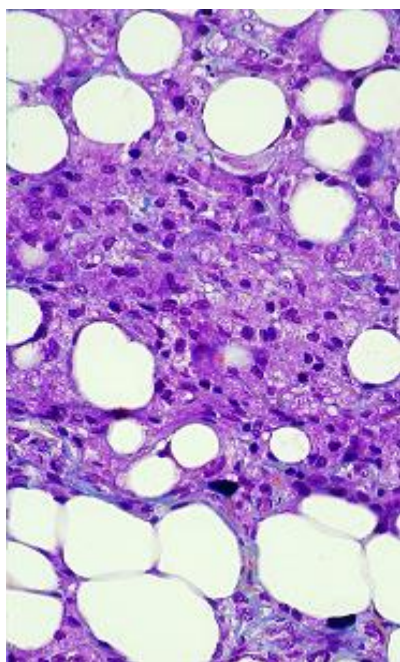


Рис. 1. Участок дермы через 1 неделю после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 40x; Ок. 10x

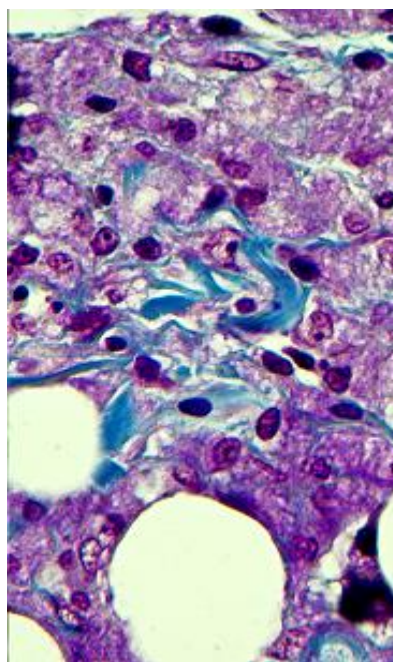


Рис. 2. Участок дермы через 1 неделю после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 100x; Ок. 10x

В дерме над и под имплантом дифференцировались три типа клеток: молодые фибробласты с базофильной цитоплазмой, макрофаги с пенистой цитоплазмой и структурированными ядрами и, наконец, плазматические клетки с эксцентрически расположенным ядром. Количественное соотношение этих типов клеток на различных участках дермы варьировало.

Процесс неоколлагеногенеза к этому сроку наблюдения мог быть установлен при использовании окраски по Маллори, где на отдельных участках зоны импланта выявлялись широкие, но короткие фибриллярные ленты темно-синего цвета (рис. 2).

К двум неделям наблюдения в зоне импланта типировалось большее число коллагеновых волокон, при этом они не только окружали имплант, но и врастали внутрь, разделяя его на фрагменты (рис. 3). Микросферы в этих условиях сохраняли один клеточный слой или тонкую фибриллярную оболочку. Между микросферами много ядер,

принадлежащих вакуолизированным клеткам (рис. 3). Статус ядер варьирует от гиперхромных к структурированным.

Спустя 1 месяц изменения, наблюдаемые в зоне локализации Facetem, могли быть определены как активация процесса неокollaгеногенеза, ибо на всем участке импланта появлялись короткие пучки волокон, расположенные между фибробластами и мононуклеарами (рис. 4).

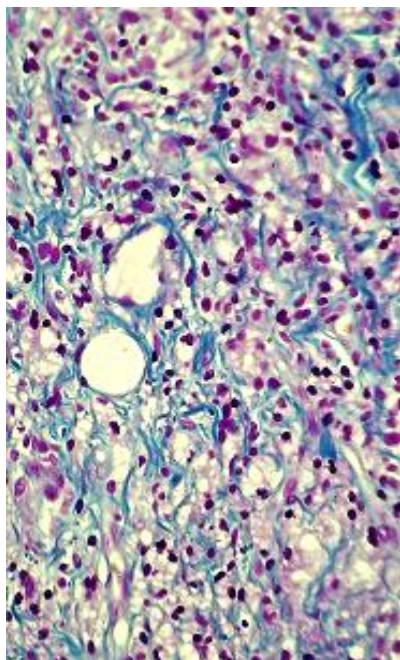


Рис. 3. Участок дермы через 2 недели после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 40x; Ок. 10x

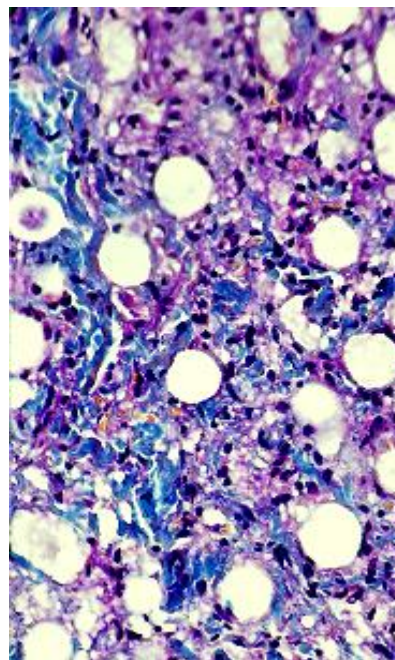


Рис. 4. Участок дермы через 1 месяц после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 40x; Ок. 10x

Микросферы к этому сроку окружены фибриллами или уплощенным клеточным монослоем, вокруг микросфер типировалась гомогенизированная вакуолизированная масса с большим числом гиперхромных ядер. Местами вокруг микросфер можно увидеть широкие, короткие коллагеновые волокна.

К концу 2-го месяца зона импланта окружена уже плотной волокнистой соединительной тканью с большим количеством коллагеновых волокон. Часть этих волокон от капсулы вдавалась вглубь импланта и делила его на отдельные фрагменты, где располагались микросферы с уплощенным слоем базофильно окрашенных клеток, между которыми видны тонкие коллагеновые фибриллы (рис. 5). В зоне матрикса выявлялось большое число фибробластов, находящихся на различной стадии созревания, здесь достаточно много и мононуклеаров. Местами типировались участки матрикса, имеющие пенный вид. Не исключено, что это собранные в виде групп макрофаги, трансформированные в

эпителиоидные клетки. Полинуклеары, встречающиеся здесь, характеризовались слиянием большого числа клеток и содержали от 15 до 20 ядер (рис. 6).

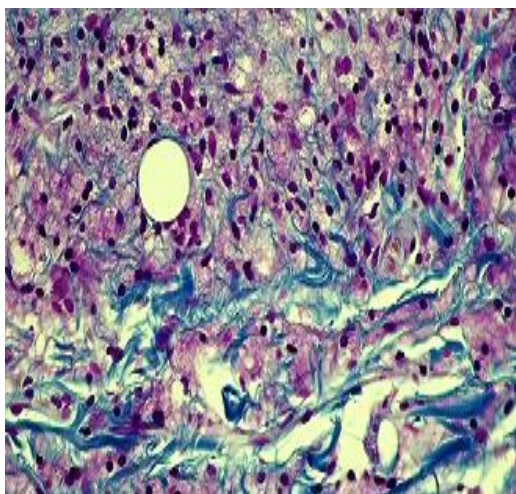


Рис. 5. Участок дермы через 2 месяца после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 40х; Ок. 10х

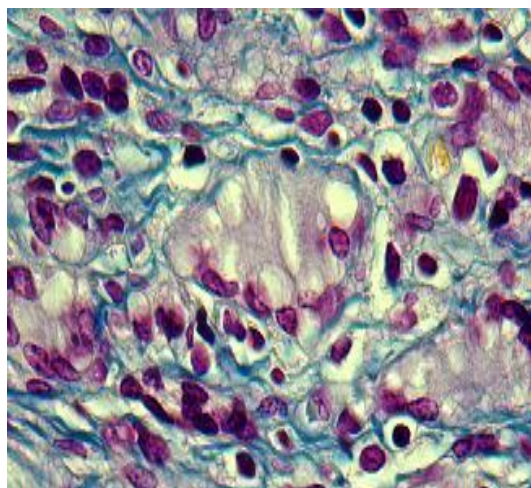


Рис. 6. Участок дермы через 2 месяца после введения филлера. Окраска по Маллори. Об. 100х; Ок. 10х

Эффект коллагеногенеза вокруг импланта связан с формированием хорошо выраженной капсулы, окружающей имплант. Вместе с тем число микросфер в зоне импланта по сравнению с 1-м месяцем снижалось почти в 2 раза, а число клеток в составе инфильтрата между волокнами коллагена, заполняющими зону импланта, увеличивалось. Здесь можно увидеть также базофильно окрашенные клетки – «кляксы» округлой формы – вероятно, это макрофаги. Клетки вытянутой веретеновидной формы, вероятно, являлись фибробластами.

После 3 месяцев пребывания импланта в дерме он может быть типирован по двум структурам. Первая – округлые, вакуолизованные клетки со значительным числом ядер, то есть многоядерные клетки инородного тела. С другой стороны – многочисленные отростчатые клетки с базофильно и диффузно окрашенной цитоплазмой – это фибробласты. Повсюду видны прослойки широких коллагеновых волокон, в зоне импланта волокна тонкие и не формируют пучки. Имплант сохраняет островки из микросфер, окруженных большим числом коллагеновых волокон, сформированных в виде пучков. В составе этих островков микросфер мало. Здесь встречались многоядерные клетки, а также вакуолизованные клетки, или же клетки, заполненные большим числом интенсивно окрашенных гранул. В прослойках соединительной ткани много клеток, напоминающих тучные, некоторые из этих клеток находились в стадии дегрануляции. После пяти месяцев пребывания импланта в дерме ни в одном из фрагментов полученного материала он не сохранился. Весь участок дермы представлен достаточно плотной соединительной тканью. И сосочковый слой здесь

нивелируется. Структура дермы в остальном не нарушена, и картина хронического воспаления и клеточные инфильтраты отсутствуют.

Итак, морфологические преобразования дермы, происходящие под влиянием импланта из Facetem, могут быть представлены в виде схемы (рис. 7) которая отражает динамику процессов, укладываемых в четыре следующие фазы. Первая – это альтерация с явлением коагуляции и гемостаза. Вторая – это развитие воспалительной реакции, третья – пролиферативная фаза, и четвертая – фаза ремоделирования. Каждая из упомянутых фаз меняет, прежде всего, структурную организацию экстрацеллюлярного матрикса дермы, являющегося метаболически активным и постоянно реконструируемым ее компонентом.

Первым ответом на альтерацию, то есть в первую неделю наблюдения после введения импланта, происходил выход из циркулирующей крови массы моноцитов, затем к ним присоединялись клетки, образующиеся в результате последующего митоза (клетка делится один раз). Вся эта клеточная масса подвергалась дифференцировке, заканчивающейся образованием макрофагов. Формирующийся инфильтрат содержал мало нейтрофилов, много лимфоцитов, моноцитов и малодифференцированных клеток. Описанные изменения позволяют охарактеризовать их как стадию реактивного воспаления, где в роли главного координирующего фактора выступают макрофаги, секретирующие биологически активные вещества, обладающие токсичностью по отношению к дерме. Подтверждением факта развития пролиферативного воспаления выступали появляющиеся к началу 2-й недели и типичные в последующие сроки наблюдения вакуолизированные или эпителиоидные клетки, являющиеся результатом трансформации макрофагов. Эти клетки снижали фагоцитарную активность, но запускали процесс синтеза провоспалительных медиаторов, которые и вызывали клеточный ответ.



Рис. 7. Стадии реакции дермы на Facetum

Участие макрофагов в этом процессе не ограничивается эффектом трансформации, они индуцировали пролиферацию фибробластов с последующим коллагеногенезом, при этом формирующиеся клеточные кооперации меняли компоненты экстрацеллюлярного матрикса за счет усиления метаболизма фибробластов с последующим синтезом ими коллагена. Во всяком случае, эти биомаркеры могут быть использованы для мониторинга статуса экстрацеллюлярного матрикса.

К концу первого месяца наблюдения в зоне импланта появлялись гигантские клетки инородных тел. Единичные клетки этого типа можно выявить и в срок, соответствующий двум неделям, но это, скорее всего, многоядерные клетки типа Пирогова-Лангханса.

Исходом морфологической трансформации макрофагов может быть эпителиоидная гранулема. В данном случае она могла бы стать клиническим ответом на плохо фагоцитируемый материал импланта. Однако в сроки, соответствующие трем и пяти месяцам, происходила утилизация материала Facetem со снижением числа микросфер в зоне импланта. Поскольку эффект активации макрофагов сопровождался пролиферацией фибробластов с присущим для этих клеток коллагеногенезом, то можно считать, что в условиях использования препарата Facetem эффект лифтингового филлера может быть реализован.

По данным литературы (Stein et al. 2015) и собственных исследований (Могильная, Фомичева, 2018), характер разыгрывающейся ответной реакции на имплант Facetem сопоставим с механизмом ответной реакции дермы на введение полимолочной кислоты. Во всяком случае, речь также идет о процессе развития воспалительной реакции на инородное тело. Различия между сравниваемыми имплантами существует, но они могут быть расшифрованы с привлечением исследования клеток дермы на молекулярном уровне с использованием методов иммуногистохимии.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что филлер Facetem относится к биodeградируемым и в условиях его пролонгированного пребывания в дерме обеспечивает увеличение объема экстрацеллюлярного матрикса дермы этими клетками за счет синтеза коллагена фибробластами. Механизм ответной реакции дермы разыгрывается по типу воспалительной реакции. Выявленная фазность – это реакция на инородное тело с оседанием белков плазмы на поверхности импланта (провизорный матрикс), вызванная модулированием активности макрофагов с последующей их пролиферацией и активацией фибробластов с переходом острого воспаления в хроническое с последующим эффектом ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса.

Список литературы

1. Putlyaev V.I., Yevdokimov P.V., Mamonov S.A., Zirin V.N., Klimashina E.S., Safronova T.V., Garchev A.V. Stereolithographic 3D Printing of Bioceramic Scaffolds of a Given Shape and Architecture for Bone Tissue Regeneration. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2019. Vol. 10 (5). P. 1101-1108.
2. Roy B., Yuan L., Lee Y., Bharti A., Mitra A., Shivasankra G.V. Fibroblast rejuvenation by mechanical reprogramming and redifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. Vol. 117 (19). P. 201911497.
3. Shinde A., Frangogiannis N. Mechanisms of Fibroblast Activation in the Remodeling Myocardium. *Curr Pathobiol Rep*. 2017. Vol. 5. Is. 2. P. 145-152.
4. Lemperle G., Morhenn V., Charrier U. Human Histology and Persistence of Various Injectable Filler Substances for Soft Tissue Augmentation. *Aesth. Plast. Surg*. 2003. Vol. 27. P. 354–366.
5. Vlegaar D., Fitzgerald R., Lorenc P. Composition and mechanism of action of poly-L-lactic acid in soft tissue augmentation. *Journal of drugs in dermatology*. 2014. Vol. 13. Is. 4. P. 29-31.
6. Zerbinatti N., D'Este E., Parodi P.C., Calligaro A. Microscopic and ultrastructural evidences in human skin following calcium hydroxylapatite filler treatment. *Arch. Dermatol. Res*. 2017. Vol. 309 (5). P. 389-396.
7. Могильная Г.М., Фомичева Е.В. Характер ответной реакции дермы на сочетанное введение двух филлеров // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2020. № 27 (4). С. 72-81.
8. Lorenc Z., Bass L., Fitzgerald R. Physiochemical Characteristics of Calcium Hydroxylapatite (CaHA). *Aesthetic Surgery Journal*. 2018. Vol. 38 (S1). P. 8–12.
9. Shpichka A., Butnaru D., Bezrukov E., Roman B., Sukhanov A.A., Burdukovskii V. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019. Vol. 10. Article P. 1-16.
10. Urciuolo F., Casale C., Imperato G., Paolo A. Netti Bioengineered Skin Substitutes: the Role of Extracellular Matrix and Vascularization in the Healing of Deep Wounds. *J. Clin. Med*. 2019. Vol. 8. Is. 12. P. 2083.
11. Kiernan J.A. *Histological and Histochemical methods*. 2009. P. 595.