

СИНТЕЗ КОЛЛАГЕНА В УЧАСТКАХ ДЕРМЫ, СОДЕРЖАЩИХ ФИЛЛЕРЫ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Могильная Г.М.¹, Фомичева Е.В.¹, Евглевский А.А.¹, Горская А.А.²

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

²ООО «ЦПК Нероли», Нижний Новгород

В основе механизма реакции дермы на имплант лежит последовательность таких фаз воспалительной реакции, как альтерация и гомеостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование. Характер течения этих фаз определяется композицией биоматериала, типом полимера, его структурной организацией, размером формируемых микросфер (Chester, Brown, 2017). Авторы провели сравнительное изучение темпа синтеза коллагена в условиях нахождения в дерме трех филлеров, изготовленных на основе полимолочной кислоты. Поскольку наиболее важным компонентом экстрацеллюлярного матрикса, синтезируемого в условиях введения филлера, является коллаген, а темп его синтеза определяется фазой регенерации, то изучение объема синтезируемого коллагена было сопоставлено со сроком пребывания импланта в дерме. Работа выполнена на крысах (30 особей), которым вводили препараты AestheFill (Южная Корея), Gana V (Южная Корея) и Repart (Россия). Результат оценивали через 2, 4, 8, 16 и 24 недели после инъекции филлера. Оценку срезов проводили с использованием стандартных гистологических методов окраски и иммуногистохимического выявления коллагена с использованием антител Anti-Collagen I, Anti-Collagen II. Изучение трех различных филлеров позволило выявить общность ответной реакции дермы на имплант. Показателем общности авторы считали объем синтезируемого коллагена по результатам компьютерной морфометрии. Показано, что для каждого филлера характерен вектор увеличения неоколлагеногенеза в срок от 1 недели до 4 месяцев с небольшими колебаниями. Первая неделя характеризуется увеличением объема синтеза коллагена в случае использования филлера Gana, на второй неделе лидирует филлер Repart. К четвертому месяцу различия между филлерами нивелируются и темп продукции коллагена определяется как максимальный. К шестому месяцу пребывания имплантов в дерме имеют место стабилизация (или прекращение) эффекта биосинтеза коллагена в случае филлеров Aesthefill и Repart и явное снижение активации фибробластов на участке с локализацией филлера Gana.

Ключевые слова: дерма, полимолочная кислота, имплант, филлер, неоколлагеногенез в дерме, AestheFill, Gana, Repart.

COLLAGEN SYNTHESIS IN DERMAL AREAS CONTAINING POLYLACTOIC ACID FILLERS

Mogilnaya G.M.¹, Fomicheva E.V.¹, Evglevsky A.A.¹, Gorskaya A.A.²

¹Kuban State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Krasnodar, e-mail: fomevg@mail.ru;

²»NEROLI», Nizhny Novgorod

The mechanism of the reaction of the dermis to the implant is based on the sequence of such phases of the inflammatory response as alteration and homeostasis, inflammation, proliferation and remodeling. The nature of the flow of these phases is formed by the composition of the biomaterial, the type of polymer, its structural organization, and the size of the formed microspheres (Chester and Brown, 2017). We conducted a comparative study of the rate of collagen synthesis in the presence of three fillers based on polylactic acid in the dermis. Since the most important component of the ECM synthesized under conditions of filler injection is collagen, and the rate of its synthesis is determined by the regeneration phase, the study of the volume of synthesized collagen was compared with the duration of the implant in the dermis. The work was performed on rats (30 animals) that were injected with AestheFill (South Korea), Gana (South Korea), and Repart (Russia). The result was evaluated 2, 4, 8, 16, and 24 weeks after filler injection. were performed using standard histological staining methods and immunohistochemical detection of collagen using antibodies Anti-Collagen I, Anti-Collagen II. The study of three different fillers discovered a common response of the dermis to the implant. We considered the volume of synthesized collagen according to the results of computer morphometry as an indicator of commonality. It is shown that each filler is characterized by a vector of increase in neocollagenogenesis in the period from 1 week to 4 months with slight fluctuations. The first week is characterized by an increase in the volume of collagen synthesis in the case of the use of the Gana filler; in the second week, Repart is in the lead. By the fourth month, the differences between the fillers are leveled and the rate of collagen production is determined as the maximum. By the sixth month of the stay of the implants in the dermis, there is a stabilization (or termination) of the effect of collagen

biosynthesis in the case of Aesthefil and Repart fillers, and a clear decrease in the activation of fibroblasts in the area with the localization of the Gana filler.

Keywords: dermis, polylactic acid, implant, filler, neocollagenogenesis in the dermis, AestheFill, Gana, Repart.

Использование в современной эстетической медицине филлеров связано с реализацией стимуляции эффекта митотической активности фибробластов дермы с последующей активацией в них процесса неоколлагеногенеза [1, 2]. Оценка степени активации фибробластов может проводиться визуально по характеру аугментации дермы *in situ*, а также по объему коллагенпродуцируемого этими клетками экстрацеллюлярного матрикса с установлением для него продолжительности сохранения такого эффекта [3, 4].

В основе механизма реакции дермы на имплант обычно лежит последовательность таких фаз воспалительной реакции, как альтерация и гомеостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование [5, 6, 7]. Характер течения этих фаз определяется композицией биоматериала, типом полимера, его структурной организацией, размером формируемых микросфер и массой вводимого филлера [8].

Для оценки характера реконструкции экстрацеллюлярного матрикса под влиянием имплантов представляется интересным сравнительное изучение темпа синтеза коллагена в условиях нахождения в дерме каждого из трех филлеров, изготовленных на основе полимолочной кислоты: AestheFill (Южная Корея), Gana V (Южная Корея) и Repart (Россия), выбранных для исследования в качестве представляющих наибольший интерес для врачей-косметологов. Поскольку наиболее важным компонентом экстрацеллюлярного матрикса, синтезируемого в условиях введения филлера, является коллаген, а темп его синтеза определяется фазой регенерации, то изучение объема синтезируемого коллагена будет логически сопоставлено со сроком пребывания импланта в дерме.

Критической детерминантой, определяющей исход реакции дермы на имплант, являются выделяющиеся в фазу альтерации белки, которые абсорбируются имплантом с включением динамического феномена белковой адсорбции, ответная реакция определяется как эффект Roman [9]. Эти белки индуцируют формирование провизорного матрикса, в зоне которого поддерживается градиент для клеток нейтрофилов и макрофагов, а они приступают к выработке хемокинов, ферментов и цитокинов [10, 11]. Макрофаги продуцируют сигнальные молекулы, которые привлекают в зону локализации филлера фибробласты с выработкой ими коллагена внутри и вокруг импланта, а это меняет не только форму импланта, но и его функции и сигнальные возможности.

Цель исследования: сравнительная оценка объема синтезированного клетками фибробластами коллагена с выявлением зон его локализации в дерме и в импланте в зависимости от типа филлера и сроков пребывания импланта в дерме.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили крысы самцы зрелого возраста массой 200–250 г (30 особей), полученные из питомника ПЛЖ «Рапполово» Ленинградской области. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным в соответствии с Директивой европейского парламента и Союза 201/63/ЕС от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых для научных целей, с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Содержание и дизайн исследований согласованы с Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 54 от 11.10.2017 г.). Экспериментальные животные были разделены на четыре группы. Группе 1 (9 особей) вводили препарат AestheFill (Южная Корея), группе 2 (9 особей) вводили препарат Gana V (Южная Корея), а группе 3 (9 особей) – препарат Repart (Россия). Контрольной группе (3 особи) вводили стерильный физиологический раствор. Препараты вводили субдермально в область холки в объеме 0,05 мл всем животным одновременно.

Забор материала для гистологического исследования дермы из зоны введения импланта проводился в различные сроки: 2, 4, 8, 16 и 24 недели после инъекции. Проводку и заливку материала выполняли в процессорах фирмы Tissue-Tek VIP5Jr. (Япония). Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4–5 микрон с использованием ротационного микротомы HM 340 E (MICROM Laborgerate GmbH, Германия). Срезы окрашивали по Маллори в автоматическом мультистейнере Tissue-Tek Prisma, (Япония). Иммуногистохимическое выявление коллагена было проведено согласно протоколу производителя с использованием антител Anti-Collagen I, Anti-Collagen III. Окрашивание производили в иммуногистостейнере BenchMark XT. Для завершения окрашивания осуществляли фоновое контрастирование срезов Hematoxylin II (Roshe, Швейцария). С целью контроля окраски использовали эталоны позитивных и негативных образцов. Полученные микропрепараты подвергали визуальному исследованию в окрасках гематоксилином и эозином и по Маллори. Для получения количественных результатов применяли компьютерную морфометрию с использованием стандартизированных микрофотографий, окрашенных по Маллори в формате JPEG. Фотографирование осуществляли цифровой микрофотокамерой DCM 310 2 и микроскопа Laboval 2 производства Carl Zeiss при увеличении $\times 400$. Общая площадь каждой микрофотографии составила 3,15 мегапикселей². Анализ полученных изображений проводили в компьютерной программе ImageJ. Результаты измерений площади окрашенного продукта гистохимической реакции, соответствующей содержанию коллагена в зоне локализации импланта, выражали в мегапикселях².

Статистический анализ результатов исследования выполнен с применением компьютерной программы Statistica 13 Trial. Проверку характера распределения вариационных рядов производили с помощью критерия Пирсона. Во всех исследованных вариационных рядах значения A_s и E_x мало отличались от нуля, поэтому можно было констатировать, что распределение показателей является нормальным. Учитывая близость распределений значений к нормальному, дополнительно проводили сравнение средних величин по Стьюденту. Влияние фактора на различие значений показателей проводили с помощью однофакторного (фактор-препараты) дисперсионного анализа (по критерию Фишера $p < 0,001$). Нулевую гипотезу отвергали при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Визуальная оценка темпа синтеза коллагена в препаратах, окрашенных по Маллори, показала, что начальный этап его синтеза приурочен к первой неделе введения филлера AestheFill и связан с формированием вокруг импланта капсулы. Внутри импланта выявляются коллагеновые фибриллы, а вне его коллагеновые волокна как показатель завершения фибриллогенеза формируют капсулу, изолирующую имплант от дермы хозяина (рис. 1).

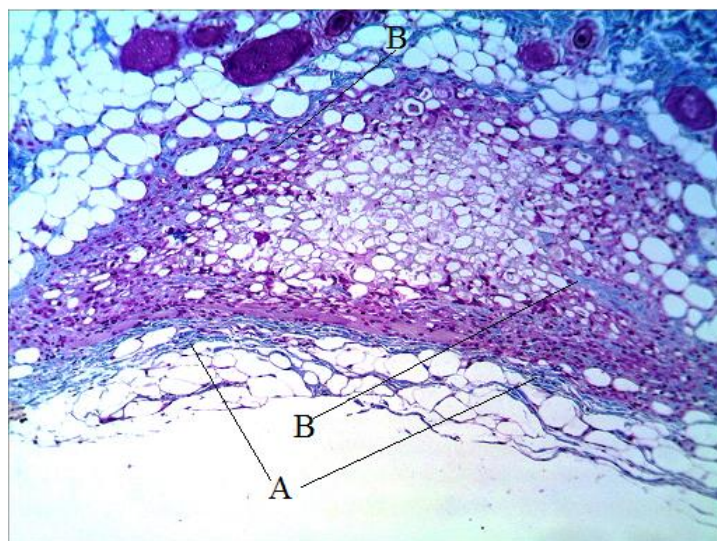


Рис.1. Распределение коллагена в зоне импланта через 1 неделю после введения филлера AestheFill. Окраска по Маллори. А – капсула вокруг импланта, В – коллагеновые фибриллы внутри импланта. Ув. x100

Ко второй неделе пребывания филлера в дерме процесс неоколлагеногенеза нарастает и смещается в сторону импланта. При введении филлера AestheFill (группа 1) наблюдается увеличение содержания коллагена вокруг импланта и в самом импланте (рис. 2).

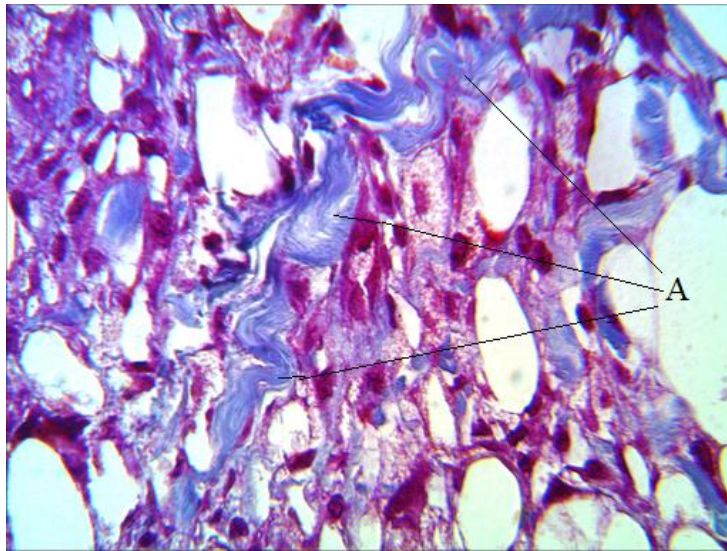


Рис. 2. Распределение коллагена в зоне импланта через 2 недели после введения филлера AestheFill. Окраска по Маллори. А – коллагеновые волокна. Ув. х600

При введении филлера Gana (группа 2) увеличение неоколлагеногенеза прослеживается в основном вокруг импланта, последний представляется достаточно плотным, фибробласты на таких участках слабо пролиферируют и не обнаруживают эффекта неоколлагеногенеза (рис. 3), а имплант мигрирует за пределы зоны дермы. Такой же эффект погружения прослеживается к концу 2-й недели и в зоне инъекции Repart (группа 3). Неоколлагеногенез смещается к периферии импланта, в самом импланте процесс затухает (рис. 4).

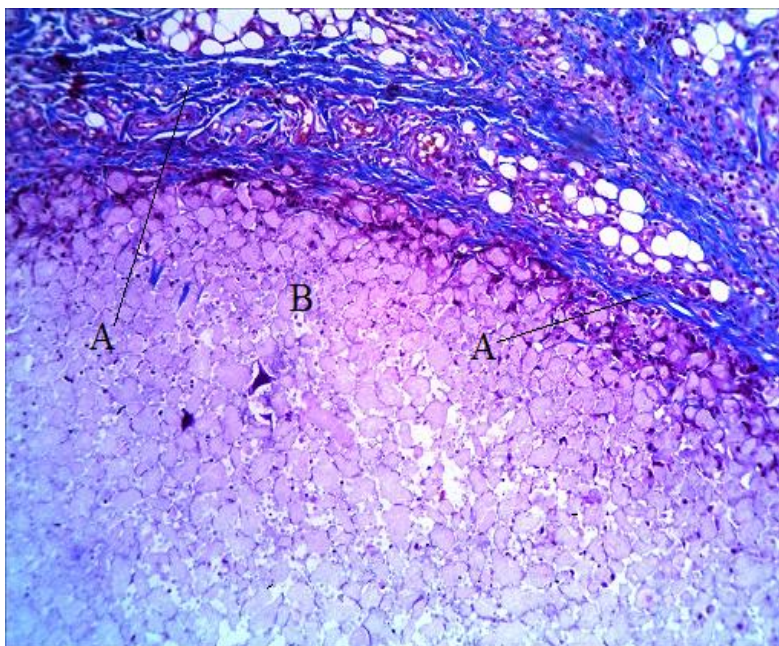
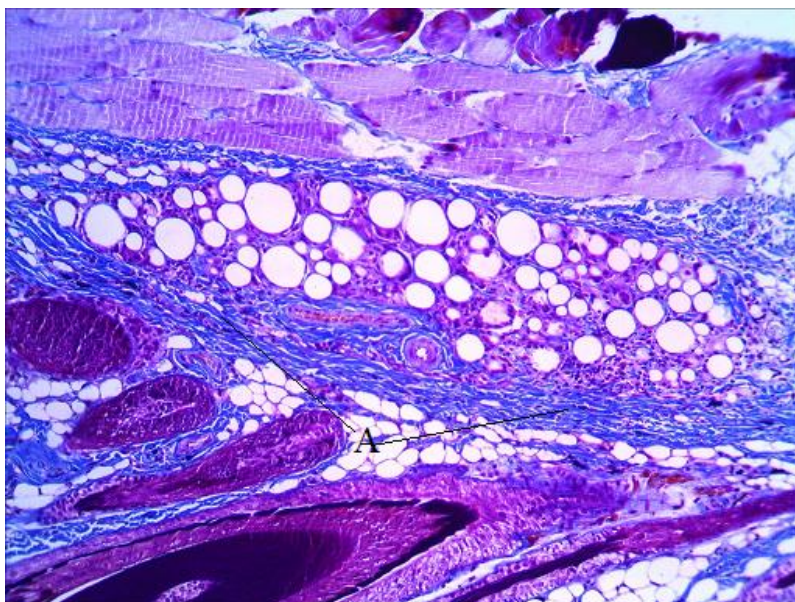
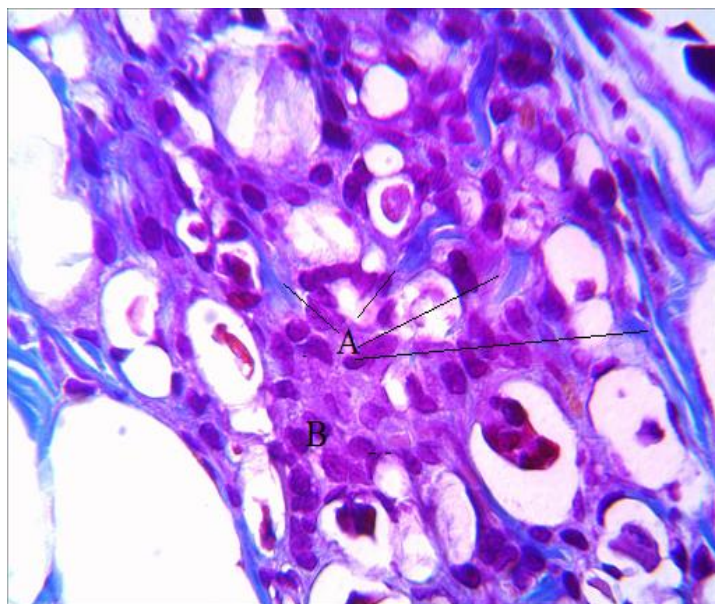


Рис. 3 Распределение коллагена в зоне импланта через 1 неделю после введения филлера Gana Окраска по Маллори. А – капсула вокруг импланта; В – имплант. Ув. х100



*Рис. 4. Распределение коллагена в зоне импланта через 1 неделю после введения филлера
Report. Окраска по Маллори. А – капсула вокруг импланта.) Ув. x100*

Пролонгирование времени пребывания импланта в дерме в срок до 1 месяца при введении AestheFill приводит к снижению объема импланта, но не к увеличению объема синтеза коллагена внутри. Для этого филлера характерно увеличение числа клеток и в зоне экстрацеллюлярного матрикса, что указывает на пролонгирование периода формирования грануляционной ткани (рис. 5).



*Рис. 5. Распределение коллагена в зоне импланта через 1 месяц после введения филлера.
Окраска по Маллори. А – коллагеновые волокна.
В – клетки экстрацеллюлярного матрикса. Ув. x600*

После четырехмесячного пребывания филлеров в дерме микросферы сохраняются в виде фрагментов. Так, фрагменты филлера AestheFill смещаются на границу с подкожно-жировой клетчаткой, сохраняя единичные микросферы, окруженные коллагеновыми волокнами и обширным клеточным инфильтратом (рис. 6). В срок, соответствующий шести месяцам, морфологических изменений не наблюдается.

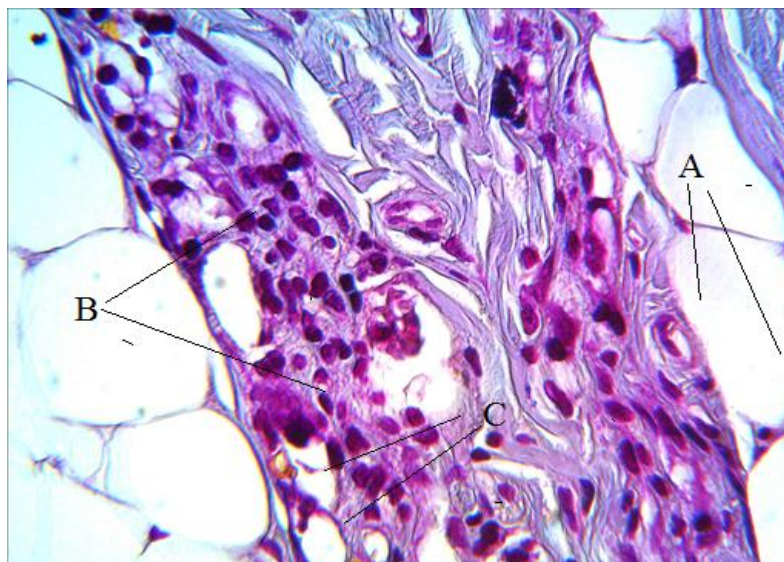


Рис. 6. Распределение коллагена в зоне импланта через 4 месяца после введения филлера AestheFill. Окраска по Маллори. А – подкожно-жировая клетчатка, В – клеточный инфильтрат, С – фрагменты филлера. Ув. х600

При введении Gana в эти же сроки микросферы сохраняются, вокруг микросфер видны многоядерные клетки, формирующие структуры, напоминающие «полулуния», содержимое микросфер становится менее плотным. В зоне экстрацеллюлярного матрикса много клеток округлой формы с базофильной цитоплазмой. Спустя 4 месяца вокруг филлера Gana сохраняется плотная капсула (рис. 7), а к шести месяцам зона бывшего импланта оценивается лишь по высокому уровню содержания коллагена в дерме над ним. На поверхности единичных микросфер типичны многоядерные клетки.

Компьютерная морфометрия коллагена как одного из показателей перестройки экстрацеллюлярного матрикса показала, что в первую неделю пребывания филлера в дерме наиболее активный неколлагеногенез характерен для Gana ($2,12 \pm 0,1$ мегапикселей²), во вторую неделю – для Repart ($2,2 \pm 0,05$ мегапикселей²), а для срока 1 месяц – AestheFill ($2,3 \pm 0,08$ мегапикселей²). Эти различия темпа синтеза коллагена нивелируются к сроку, соответствующему четвертому месяцу, где темп синтеза максимальный для всех видов филлеров.

При этом объем синтезированного коллагена заметно не снижается в процессе пролонгирования времени пребывания филлеров AestheFill и Repart до 6 месяцев. Не исключено, что сохранение объема коллагена в срок до шести месяцев пребывания филлеров в дерме соответствует периоду завершения ее ремоделирования (рис. 8).

При иммуногистохимическом типировании коллагенов оказалось, что дерма над имплантом реагирует на филлеры увеличением числа фибробластов, для которых характерна высокая экспрессия проколлагена. Клетки крупные, многоотростчатые, с большой территорией экзоцитоза. В зоне локализации импланта участки неколлагеногенеза определяются типом филлера. Так, в случае AestheFill процесс активизируется с первой недели его введения и проявляется локализацией коллагенов вокруг микросфер в соотношении коллагенов I и III типов 1:1. Коллаген I типа выявляется и в зоне экстрацеллюлярного матрикса.

В случае введения филлера Gana наличие коллагена регистрируется первоначально в зоне самого импланта по краю многочисленных микросфер, где присутствуют уплотненные клетки, экстрацеллюлярный матрикс обнаруживает реакцию умеренной интенсивности и местами представляется вакуолизированным. Относительно коллагена III типа наиболее высокий темп его синтеза характерен уже к первым неделям эксперимента, и в зоне импланта типизируются уплотненные клетки в составе стенок микросфер.

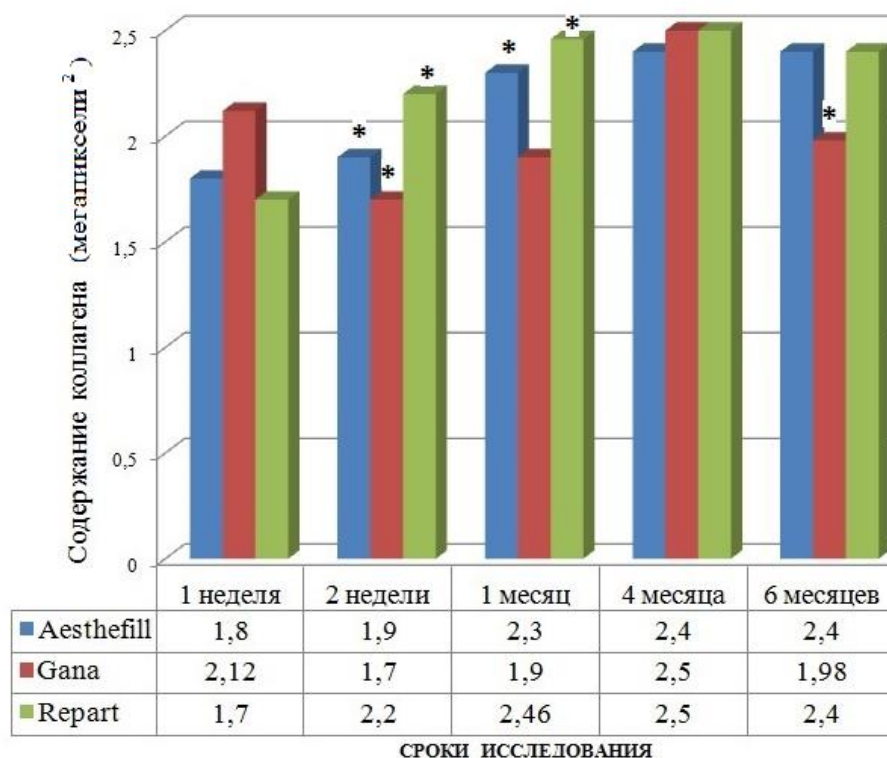


Рис. 8. Содержание коллагена в разные сроки после введения филлера.

- – достоверность отличия от предыдущего срока исследования, $p < 0,01$

При введении филлера Repart в первые недели проколлаген типифицируется в составе многочисленных фибробластов, обнаруживая высокий темп экспрессии проколлагена. Имплант в этом случае представлен в виде вакуолей различного диаметра, стенки этих вакуолей (микросфер) ограничены клетками, экспрессирующими коллаген I типа. Ассоциируя между собой, клетки формируют широкопетлистую сеть в зоне экстрацеллюлярного матрикса. При выявлении коллагена III типа его много в составе фибробластов, формирующих капсулу, при этом клетки имеют вид «клякс». С пролонгированием срока пребывания импланта в дерме реакцию на коллаген III типа сохраняют отдельные уплощенные клетки, включенные в зону экстрацеллюлярного матрикса.

Заключение

Таким образом, проведенное изучение трех различных филлеров, изготовленных на основе полимолочной кислоты, позволило выявить общие закономерности ответной реакции дермы на имплант в аспекте неоколлагеногенеза, показателем которой можно считать объем синтезируемого коллагена по результатам, полученным в условиях компьютерной морфометрии.

Показано, что для каждого филлера характерен вектор увеличения неоколлагеногенеза в срок от 1 недели до 4 месяцев с небольшими колебаниями. В период, соответствующий шестому месяцу, на фоне процесса продолжающегося ремоделирования дермы начинается падение объема синтеза коллагена. Морфометрические исследования свидетельствуют, что первая неделя характеризуется увеличением объема синтеза коллагена в случае использования филлера Gana, на второй неделе лидирует Repart. К четвертому месяцу различия между филлерами нивелируются, и темп продукции коллагена определяется как максимальный. К шестому месяцу пребывания имплантов в дерме имеют место стабилизация (или прекращение) эффекта биосинтеза коллагена в случае имплантации филлеров AestheFill и Repart и явное снижение активации фибробластов на участке с локализацией филлера Gana.

Полученные данные свидетельствуют, что первая ответная реакция дермы на имплант из полимолочной кислоты связана с увеличением объема дермы по типу его локальной гидратации с изменением ее физического статуса. Позже подключается процесс биоразложения микросфер с увеличением числа фибробластов и активации ими синтеза коллагена.

Список литературы

1. Cabral L.R.B., Teixeira L.N., Gimenez R.P., Demasi A.P.D., de Brito Junior R.B., de Araújo V.C., Martinez E.F. Effect of Hyaluronic Acid and Poly-L-Lactic Acid Dermal Fillers on Collagen Synthesis: An in vitro and in vivo Study // *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020. Vol. 13. P. 701-710. DOI: 10.2147/CCID.S266015.
2. D. Wahlsten A., Rüttsche D., Nanni M., Giampietro C., Biedermann T., Reichmann E., Mazza E. Mechanical stimulation induces rapid fibroblast proliferation and accelerates the early maturation of human skin substitutes. // *Biomaterials*. 2021. Vol. 19. P. 273-275. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120779.
3. Chester, A.C. Brown. The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair // *Matrix Biol*. 2017. Vol. 60. P. 124-140. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.004.
4. Volk W., Iqbal S.A., Bayat A. Interactions of the extracellular matrix and progenitor cells in cutaneous wound healing // *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2013. Vol. 2. Is. 6. P. 261-272. DOI: 10.1089/wound.2012.0417.
5. Gieseck R.D., Wilson M.S., Wynn T.A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis // *Nat. Rev. Immunol*. 2018. Vol. 18. Is. 1. P. 62-76. DOI: 10.1038/nri.2017.90.
6. Noskovicova N., Hinz B., Pakshir P. Implant Fibrosis and the Underappreciated Role of Myofibroblasts in the Foreign Body Reaction // *Cells*. 2021. Vol. 8. Is. 10. P. 1794-1798. DOI: 10.3390/cells10071794.
7. Roy B., Yuan L., Lee Y., Bharti A., Mitra A., Shivashankar G.V. Fibroblast rejuvenation by mechanical reprogramming and redifferentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. Vol. 19. Is. 117. P. 10131-10141. DOI: 10.1073/pnas.1911497117.
8. Shpichka A., Butnaru D., Bezrukov E.A., Sukhanov R.B., Atala A., Burdukovskii V., Zhang Y., Timashev P. Skin tissue regeneration for burn injury // *Stem Cell Res. Ther*. 2019. Vol. 1. Is. 10. P. 94-96. DOI: 10.1186/s13287-019-1203-3.
9. Zhang Y., Liang H., Luo Q., Chen J., Zhao N., Gao W., Pu Y., He B., Xie J. In vivo inducing collagen regeneration of biodegradable polymer microspheres // *Regen. Biomater*. 2021. Vol. 5. Is. 8. P. 1-13. DOI: 10.1093/rb/rbab042.
10. Должиков А.А., Колпаков А.Я., Ярош А.Л.1, Молчанова А.С., Должикова И.Н. Гигантские клетки инородных тел и тканевые реакции на поверхности имплантатов // *Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье"*. 2017. № 3. С. 86-94. DOI: 10.21626/vestnik/-3/15.
11. Litvinov R.I., Weisel J.W. Fibrin mechanical properties and their structural origins // *Matrix Biol*. 2017. Vol. 60. Is. 61. P. 38-56. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120779.