

Г. М. МОГИЛЬНАЯ, Е. В. ФОМИЧЕВА, Ю. Е. БЛАТТ

МОРФОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИМПЛАНТА ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Седина, д. 4, Краснодар, Россия, 350063.

АННОТАЦИЯ

Цель. Характеристика морфоиммуногистохимического статуса импланта из полимолочной кислоты (ПК), расположенного в дерме.

Материалы и методы. Исследование выполнено на крысах (30 особей) с субдермальным введением препарата в объеме 0,05 мл. Оценку результатов проводили спустя две недели, 1 и 2 месяца после инъекции. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, с помощью реакции Маллори и Массона. Коллагеновые волокна изучали после окраски пикросирусом красным в поляризованном свете. Для определения экспрессии ИГХ маркеров использовали моноклональные антитела СД68 и антитела к виментину.

Результаты. Показано, что темп синтеза коллагена на различных участках дермы различается. Так вокруг импланта имеет место резкое увеличение объема волокнистого компонента, а в самом импланте – лишь тенденция к увеличению синтеза. При этом увеличение объема экстрацеллюлярного матрикса связано с коллагеном I и III типов.

Заключение. Выявленная активация синтеза коллагена фибробластами может быть использована в качестве регулятора объема матрикса, что весьма актуально для современной регенеративной медицины.

Ключевые слова: дерма, полимолочная кислота, имплант, филлер, неоколлагеногенез в дерме

Для цитирования: Могильная Г.М., Фомичева Е.В., Блатт Ю.Е. Морфогистохимическая характеристика импланта из полимолочной кислоты *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018; 25(6): 114-118. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-6-114-118

For citation: Mogilnaya G.M., Fomicheva E.V., Blatt J.E. Morphogistoschemical characteristic of the implant from polylactic acid. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2018; 25(6): 114-118. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-6-114-118

G. M. MOGILNAYA, E. V. FOMICHEVA, J. E. BLATT

MORPHOGISTOSCHEMICAL CHARACTERISTIC OF THE IMPLANT FROM POLYLACTIC ACID

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Sedina str., 4, Krasnodar, Russia, 350063.

ABSTRACT

Aim. The study was conducted for the characteristics of the morphoimmunohistochemical status of the implant from polylactic acid (PLA) located in the dermis.

Materials and methods. The study was performed on rats (30 individuals) with subdermal administration of the drug in a volume of 0,05 ml. The results were evaluated after two weeks, 1 and 2 months after the injection. The sections were stained with hematoxylin and eosin, according to Van Gieson, with the help of Mallory and Masson reaction. Collagen fibers were studied after the staining with picosirius red under polarized light. Monoclonal antibodies of CD 68 and antibodies to vimentin were used to determine the expression of immunohistochemical markers.

Results. It is shown that the rate of collagen synthesis varies in different parts of the dermis. There is a sharp increase in the volume of the fibrous component around the implant, and there is only a tendency to increase in the synthesis in the implant itself. In this case, the increase in the volume of the extracellular matrix is associated with type I and III collagen.

Conclusion. The detected activation of collagen synthesis by fibroblasts can be used as a regulator of the volume of the matrix, which is very important for the modern regenerative medicine.

Keywords: dermis, polylactic acid, implant, filler, neocollagenogenesis in the dermis

Введение

Современная регенеративная медицина активно использует методы клеточной терапии для стимуляции процессов регенерации, а также для восстановления функции тканей в условиях их

повреждения. При этом наиболее эффективными считаются клетки фибробласты, реализующие способность к дифференцировке в нескольких направлениях [1, 2, 3]. Трафик фибробластов в место повреждения и их участие в регенеративном процессе может проходить по типу естественного ответа, присущего фибробласту – это активация синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса и, прежде всего, коллагена. При этом продукция коллагена в дерме регулируется структурным состоянием ее экстрацеллюлярного матрикса. Многочисленные исследования, проводимые косметологической медициной, направлены, прежде всего, на изучение механизма активации стареющей дермы, когда инъекция филлера стимулирует локальную пролиферацию фибробластов, включая значительное число реакций, приводящих к увеличению механической силы дермы [4, 5].

Рассматриваемая нами проблема синтеза коллагена фибробластами (неоколлагеногенез) – это не только частный случай изменения объема дермы, но и перспектива возможности регулирования заданного количества продуцируемого экстрацеллюлярного матрикса.

Среди значительного числа филлеров, используемых для изменения объема мягких тканей, особое внимание привлекают биodeградирующие синтетические полимеры, разработанные на основе α -полимолочной кислоты, клинический эффект которой реализуется за счет развития контролируемого воспаления с медленным разрушением вводимого импланта и отложением в ткани коллагена [6].

Цель исследования: характеристика морфоиммуногистохимического статуса импланта из полимолочной кислоты (ПК), расположенного в дерме.

Материалы и методы

В настоящем исследовании для изучения эффекта стимуляции фибробластов дермы мы использовали препарат полимолочной кислоты (AestheFill, Korea), который интерпретируется как биологически совместимый компонент, не вызывающий отторжения, обладающий механическими свойствами, которыми можно управлять. Этот продукт полностью резорбируется и элиминируется из организма естественным путем [7].

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». Крыс содержали в стандартных условиях с контролируемым режимом температуры и свободным доступом к воде и пище. Всем животным вводили препарат полимолочной- α -кислоты 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 две недели, 1 и 2 месяца после инъекции. Для морфологического изучения использовали биоптаты кожи, которые подвергали стандартной гистологической обработке. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, а также с помощью реакций Маллори и Массона [8]. Для типирования фибриллярных структур дермы использовали окраску пикросириусом красным [9] с последующим изучением микропрепаратов в поляризованном свете при скрещенном анализаторе и поляризаторе микроскопа МП-8, где превалирование красного спектра в поляризованном свете интерпретировали как показатель наличия коллагена I типа, а превалирование зеленого спектра – как факт присутствия коллагена III типа. Изучение количественного соотношения коллагенов I и III типа в препаратах, окрашенных с пикросириусом красным, проводили, используя автоматизированный морфометрический метод определения содержания компонентов внеклеточного матрикса и количественной оценки ядерных антигенов [10].

С целью определения экспрессии ИГХ маркеров использовали моноклональные антитела CD68 (LabVision), виментин (LabVision) и системы 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). С целью контроля окраски использовали эталоны позитивных и негативных образцов. Для морфометрической характеристики доли объема аморфного и волокнистого компонентов дермы и импланта использовали микропрепараты, окрашенные по Ван-Гизону. При этом микрофотографии в формате TIF получали с помощью цифровой камеры для микроскопии DCM 310 и программы Scion Image. Соотношение аморфного и волокнистого компонента рассчитывали как процент площади видеозаписи микропрепарата при увеличении 40x10. Измеряемая площадь составляла 100x100 пиксел компьютерного монитора класса SVGA при его разрешении 600x800 пикселей. Все цифровые данные подвергались статистической обработке по программе Microsoft Excell.

Результаты и обсуждение

Изучение микропрепаратов после инъекции полимолочной кислоты (ПК) в субдермальную зону в срок, соответствующий 2 неделям, показало, что при окраске стандартными гистологическими красителями участок введения четко типифируется за счет окружающей его капсулы. Она сформирована рыхлой соединительной тканью с большим коли-

чеством кровеносных сосудов с явлением стаза. На наружной стороне капсулы, обращенной к прилежащим тканям, типично большое число коллагеновых волокон. В некоторых случаях различия в толщине капсулы, окружающей имплант, отсутствуют. С пролонгированием срока наблюдения до 1 месяца в центре импланта появляются группы коллагеновых волокон, разделяющих его на отдельные территории. Структура этих прослоек соответствует капсуле, окружающей имплант. В зоне самого импланта типичны различного размера вакуоли, окруженные моноцеллюлярным слоем. Форма вакуолей, окружающих микросферы с ПК, различна, в некоторых из них видно оксифильно (или базофильно) окрашенное содержимое. Между микро-сферами располагаются элементы матрикса с достаточно большим количеством клеток, различных по форме (уплощенные, округлые) и величине. С удлинением срока наблюдения до 2-х месяцев происходит снижение размеров импланта и уменьшение объема полости микросфер.

Морфометрия объема волокнистого и аморфного компонентов на участках импланта и дермы, прилежащей к нему, показали, что для импланта соотношение названных компонентов меняется лишь ко 2-му месяцу наблюдения с увеличением объема фибриллярного компонента до $34,2 \pm 1,4$ ($24 \pm 2,1$ в контроле) при $p < 0,05$. На участке дермы над имплантом объем волокнистого компонента также нарастает, составляя $31,1 \pm 1,4$, и это различие по отношению к норме статистически достоверно ($p < 0,001$). Объем аморфного компонента в этих условиях снижается.

Результаты выявления коллагенов I и III типов в окраске пикросириусом красным и последующая поляризационная микроскопия показали, что спустя 2 недели после введения ПК в зоне вокруг импланта дифференцируется капсула. При этом капсула содержит волокна, которые обнаруживают свечение от желтого к красному спектру, что указывает на присутствие в ней коллагена I типа. Более тонкая наружная капсула с короткими фибриллами дает свечение красного и желтого цветов, последний в виде «штрихов». Спустя 1 месяц после введения импланта, эффект свечения в зоне капсулы сохраняется с превалированием в ее составе коллагена I типа. Однако во внутренней части этой капсулы появляются волокна зеленого цвета, что указывает на присутствие коллагена III типа (рис. 1).

Через 2 месяца внутри импланта появляются волокна, обнаруживающие свечение красного, желтого и зеленого цветов, но эти волокна достаточно короткие. Местами типичны микросферы, ограниченные желто-красными волокнами, формирующими стенку отдельных микросфер. Результаты морфометрического изучения доли, занятой коллагеном I и III типов, показали, что в срок, соответствующий 2 неделям после инъекции, капсула, окружающая имплант на поверхно-

сти, обращенной к дерме (внутренняя), содержит 17,2 % коллагена III типа и 82,8 % – I типа. Наружная капсула обнаруживает сочетание этих типов коллагена 31,7 % и 68,27 % соответственно.

Участок дермы над имплантом характеризуется присутствием изученных коллагенов в равных соотношениях: первого 48,6 % и третьего типа – 51,4%. С удлинением срока наблюдения в зоне внутренней части капсулы изменения типов коллагена связаны с увеличением доли коллагена III типа (41,08 %) и снижением содержания коллагена I типа (58,92 %). В тоже время соотношение этих коллагенов на участке наружной капсулы практически не меняется. На участке дермы с удлинением срока наблюдения соотношение изученных типов коллагена сохраняется.

При иммуногистохимическом обнаружении виментина спустя 2 недели после инъекции в зоне импланта выявляется большое число микросфер, стенки которых окрашены в темно-коричневый цвет. Между микросферами видны диффузно окрашенные округлые или вытянутые клетки, интенсивность реакции высокая. В стенке кровеносных сосудов окрашены эндотелиальные клетки.

На участке дермы, находящейся над поверхностью импланта, в зоне сосочкового слоя выявляется большое количество уплощенных отростчатых клеток, окрашенных в темно-коричневый цвет. Клетки этого типа инфильтрируют все участки дермы и стенки кровеносных сосудов. Спустя один месяц, число интенсивно окрашенных клеток в зоне и сосочкового, и сетчатого слоев нарастает.

Для зоны импланта характерно нарастание уровня содержания виментина во всех его структурных компонентах: в отростчатых клетках, в зоне вокруг сосудов, в клетках между микросферами. При этом реакцию обнаруживают периферическая часть импланта, в центральной его части упомянутые компоненты не окрашены (рис. 2).

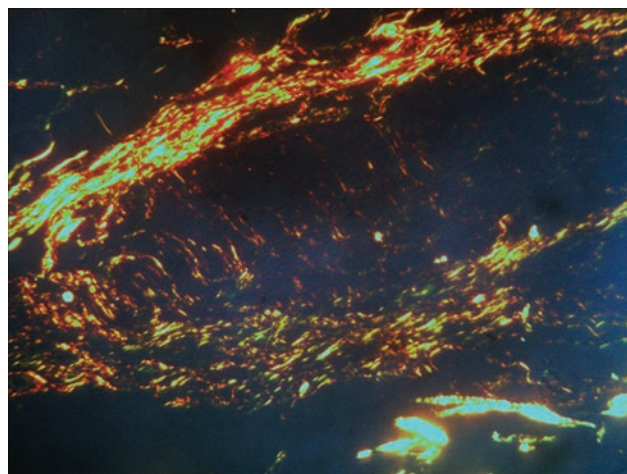


Рис. 1. Участок дермы через 1 месяц после введения импланта. Коллагены I и III типов в окраске пикросириусом красным. Поляризационная микроскопия. (Об.40×; Ок.10×)

Fig. 1. Section of the dermis 1 month after the implantation. Collagen types I and III in the staining with picosirius red. Polarization microscopy. (O.40×; Ok.10×)

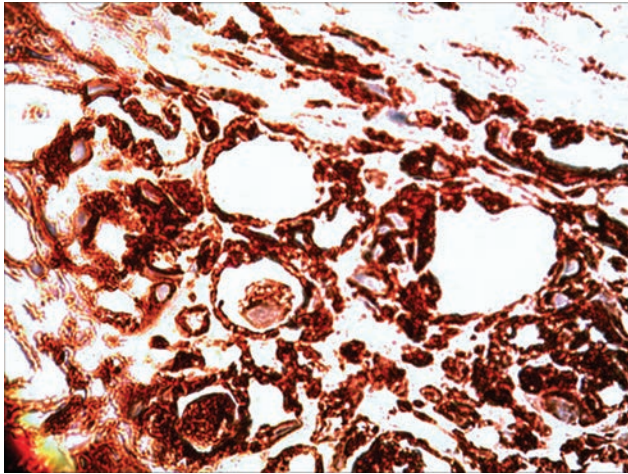


Рис. 2. Зона введения ПК, видны микросферы, окруженные макрофагами и фибробластами, положительно окрашенные на виментин. Иммуногистохимическая реакция (Об.20×; Ок.10×).

Fig. 2. The zone of introduction of polylactic acid, microspheres surrounded by macrophages and fibroblasts, positively stained for vimentin, are visible. Immunohistochemical reaction (O.20×; Ok.10×).

Через 2 месяца при иммуногистохимическом выявлении виментина в зоне дермы над имплантом количество положительно окрашенных клеток снижается, но сохранившиеся клетки обнаруживают такую же интенсивную реакцию. Имплант окрашивается по всей площади, сохраняя очень интенсивную реакцию, в нем окрашиваются оболочки микросфер, их содержимое, расположенные между микросферами клетки, сосуды и встречающиеся гигантские клетки инородных тел (рис. 3).

В клетках этого типа много ядер, они типично являются как пустоты на фоне интенсивно окрашенной цитоплазмы.

При избирательном выявлении макрофагов с CD68 оказалось, что спустя 2 недели клетки этого типа в зоне импланта отсутствуют, однако их достаточно много в зоне дермы над имплантом. Располагаются они в основном между кровеносными сосудами. Спустя 1 месяц клетки с CD68 смещаются в зону границы сосочкового и сетчатого слоев дермы. Содержимое их имеет вид гранул, окрашивающихся умеренно.

Единичные клетки появляются и в самом импланте. К концу второго месяца клетки, экспрессирующие CD68, удается увидеть лишь в дерме над имплантом.

Полученные данные показали, что спустя две недели после инъекции полимолочной кислоты имплант уже ограничен от зоны дермы капсулой. С учетом данных литературы, за этот срок на поверхности биоматериала и вокруг него происходит каскад реакций, связанных с адсорбцией и десорбцией белков крови, что, в конечном счете, приводит к формированию «временной матрицы» с набором веществ, обеспечивающих в дальнейшем реакцию ткани на инородное тело, а затем и процесс заживления [7, 11]. Исходом такой реакции следует считать факт формирования биологиче-

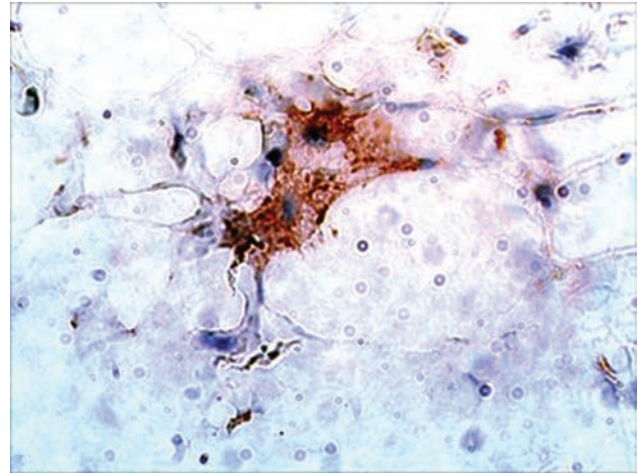


Рис. 3. Зона введения ПК, видны микросферы и гигантские клетки инородных тел положительно окрашенные на виментин. Иммуногистохимическая реакция (Об.20×; Ок.10×).

Fig. 3. The zone of introduction of polylactic acid, microspheres and giant cells of foreign bodies are positively stained for vimentin. Immunohistochemical reaction (Ob.20×; Oks.10×).

ской системы, способной к модуляции активности макрофагов, а также к пролиферации и активации фибробластов, задействованных в воспалительной реакции, а затем и в процессе заживления.

Начало образования грануляционной ткани относится к концу 2-й недели, то есть к изученному нами сроку наблюдения. При этом, между микросферами ПК появляются фибробласты, капилляры и отдельные коллагеновые волокна. Изменения прослеживаются и в зоне импланта, и в дерме над ним. Так, на второй неделе после введения импланта, вокруг него появляется соединительнотканная капсула с преимущественным содержанием коллагена I типа. В зоне импланта вокруг микросфер формируется капсула, образованная одним слоем уплощенных клеток. Между микросферами много клеток макрофагального типа. На участке дермы, прилежащем к импланту, появляются фибробласты.

Спустя 1 месяц имплант содержит уже до 40 % микросфер, а остальной объем составляет сформированная грануляционная ткань. При этом микросферы импланта полностью инкапсулированы, оболочка их сформирована фиброцитами и коллагеновыми волокнами. Число макрофагов снижается. Можно считать, что имплант стимулирует выработку коллагена, который не только окутывает микросферы, но и формирует капсулу импланта.

Полимолочная кислота стимулирует процесс неоколлагеногенеза, при этом механизм ее действия сопоставим с индуцированием воспалительной реакции. Одним из этапов этого воспаления может служить эффект инкапсулирования микросфер за счет синтеза фибробластами коллагена [12]. Эти данные перекликаются с результатами исследований, проведенных Lamperle et al [13]. Авторы утверждают, что инъекция ПК может сформировать «живой скаффолд», в котором про-

цесс синтеза соединительной ткани с постоянным клеточным обновлением интегрируется с достаточно хорошим кровоснабжением.

Характер участия макрофагов с CD68 в разрывающемся процессе может быть представлен как один из ранних этапов реакции на инородное тело [14, 15]. Последующее участие макрофагов в ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса дермы, скорее всего, связано с секрецией ими белков с формированием фиброза. Отдельные макрофаги объединяются в гигантские клетки инородного тела, и этот эффект можно интерпретировать как макрофагальная реакция с пролонгированным механизмом удаления инородного тела.

Заключение

На участке дермы, прилежащей к импланту, эффект индукции проявляется увеличением числа фибробластов и уровня содержания в них виментина. Фибробласты заполняют не только сосочковый, но и сетчатый слой дермы, их много и вокруг волосяных фолликулов. При этом высокое содержание виментина удерживается до двух месяцев, а затем снижается. Фибробласты с высоким уровнем содержания виментина характерны для сосочкового слоя, а с низким или умеренным – для сетчатого. В некоторых случаях фибробласты, нагруженные виментином, мигрируют в зону эпидермиса, достигая в нем зернистого слоя. В связи с имеющимися в литературе данными [3] роль этих промежуточных филамент для фибробласта видится в активации их пролиферации, а также в синтезе ими фактора TGF- β 1. Все описанные изменения позволяют считать участие ПК в синтезе коллагена.

Таким образом, выявленная активация синтеза коллагена фибробластами может быть использована в качестве регулятора объема матрикса, что весьма актуально для современной регенеративной медицины.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимального происхождения? Вестник эстетической медицины. 2011; 10(2): 101-107. [Bozo I.J., Deev R.V., Pinaev G.P. Is "Fibroblast" a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives? Vestnik yesteticheskoi mediciny. 2011; 10: 2. (In Russ; English abstract)].
2. Fisher G. Varani J., Voorhees J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. Arch. Dermatol. 2008; 144: 666-672. DOI:org/10.1001/archderm.144.5.666.
3. Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S. et al. Tissue

– Engineered Skin Constructs and Application of Stem Cells for Creation of Skin Equivalents. STM. 2017; 9(1): 198-2018. DOI:org/10.17691/stm2017.9.1.24.

4. Eckest B, et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblast. J. Cell Sci. 1998; 111(13): 1897-1907.
5. Varani J., Dame M.K. et al. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. The American Journal of Pathology. 2006; 168(6): 1861-1868. DOI:org/10.2353/ajpath.2006.051302.
6. Lowe N.J., Maxwell C.A., Patnaik R. Adverse reaction to dermal fillers: review. Dermatol Surg. 2005; 11(2): 1616-1625.
7. Goldberg D., Guana A., Volk A., et al. Single-arm study for the characterization of human tissue response to injectable poly-L-lactic acid. Dermatol Surg. 2013; 39: 915-922. DOI:org/10.1111/dsu.12164.
8. Pearce A. Histochemistry. Theoretical and applied. London. 1968. 561 p.
9. Rich L., Whittaker P. Collagen and Picrosirius Red Staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. Braz.J. Morphol.Sci. 2005; 22: 97-104.
10. Гуменюк И.С., Чуприненко Л.М., Сотниченко А.С., Гайворонская Т.В., Гуменюк С.Е., Губарева Е.А., Кувяда Е.В., Крутова В.А., Алексеенко С.Н. Автоматизированный морфометрический анализ как метод определения содержания компонентов внеклеточного матрикса и количественной оценки ядерных антигенов. Архив патологии. 2017; 79(5): 49-56. [Gumenyuk I.S., Chuprinenko L.M., Sotnichenko A.S., Gaivoronskaya T.V., Gumenyuk S.E., Gubareva E.A., Kuevda E.V., Krutova V.A., Alekseenko S.N. Avtomatizirovannyi morfometricheskii analiz kak metod opredeleniya soderzhaniya komponentov vnekletochnogo matriksa i kolichestvennoi ocenki jadernykh antigenov. Arhiv patologii. 2017; 79(5): 49-56. (In Russ)].
11. Chang F. Shen Y., Mohanasundaram P. et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016; 113(30): E4320-4327. DOI:org/10.1073/pnas.1519197113.
12. Schierle C., Casas L. Nonsurgical rejuvenation of the aging face with injectable poly-L-lactic acid for restoration of soft tissue volume. Aesthet Surg J. 2011; 31: 95-109. DOI:org/10.1177/1090820x10391213.
13. Lamperle G., Knapp T., Sadick N. et al. ArteFill permanent injectable for soft tissue augmentation: I. Mechanism of action and injection techniques. Aesthet Plast Surg. 2010; 34: 264-272. DOI:org/10.1007/s00266-009-9413-1.
14. Stein P., Vitavska O., Peter Kind. et al. The biological basis for poly-L-lactic acid-induced augmentation. Journal of Dermatological Science. 2015; 78: 26-33. DOI:org/10.1016/j.jdermsci.2015.01.012.
15. Vleggaar 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; 13: Issue 4.

Поступила / Received 05.09.2018

Принята в печать / Accepted 23.10.2018

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest

Контактная информация: Фомичева Евгения Васильевна; тел.: +7 (918) 151-44-48; e-mail: fomevg@mail.ru; 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4.