

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КОЖУ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ФИЛЛЕРА

В.Г. Тахмазян¹, Т.П. Полийчук¹, канд. мед. наук, Л.Л. Амбарцумян¹, Е.А. Варюшина², канд. биол. наук,
Г.В. Александров², канд. биол. наук, Т.А. Сазонова², О.С. Бабич¹, В.О. Матыцин¹, Т.Н. Королькова¹, докт. мед.
наук, профессор, Л.Ю. Колесова³, канд. мед. наук

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

²Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
Санкт-Петербург

³ООО «НовоНексус», Москва

E-mail: kmatitsin@list.ru

Проведено изучение реакций тканей кожи на применение филлеров, в частности биodeградируемого на основе гиалуроновой кислоты. Результаты проведенного исследования показали отсутствие на всех сроках наблюдения ранних и поздних тканевых реакций на введенный филлер, что свидетельствует о его эффективности и безопасности.

Ключевые слова:

контурная пластика,
филлер, гель,
гиалуроновая
кислота,
соединительная
ткань, фибробласты,
макрофаги, апоптоз

Key words:

contour plasty, filler,
gel, hyaluronic acid,
connective tissue,
fibroblasts,
macrophages,
apoptosis

В современной косметологии наряду с мезотерапией, пилингами, лазерными технологиями, ботулинотерапией активно развивается и широко используется такой метод коррекции возрастных изменений, как контурная пластика. Для улучшения рельефа кожи, заполнения дефектов, придания объема определенным участкам (например, губам) применяют различные по химическому составу филлеры. В качестве филлеров используются полимерные соединения синтетического и природного происхождения. Филлеры различаются по химическому составу полимера. Они могут быть изготовлены как из недеградируемого материала (силикон), так и деградирующего в тканях (коллаген, гиалуроновая кислота). Химическая инертность вещества филлера способствует минимизации риска развития реакций отторжения и более длительной сохранности эстетического эффекта. Однако эстетический эффект после введения недеградируемого геля может снижаться, поскольку развивающаяся со временем возрастная атрофия кожи делает отложения геля в тканях более заметными. Таким образом, сохранившийся в стареющей коже филлер зачастую становится косметической проблемой и требует удаления путем аспирации либо хирургическими методами.

В этом отношении филлеры из биodeградируемых материалов имеют преимущества. Они достаточно близки к веществу тканей организма, поэтому вероятность развития осложнений минимальна. А их способность к медленной деградации не создает в ходе естественного старения эстетических проблем. Кроме того, при необходимости введение геля в проблемные зоны можно повторять. В последнее время приоб-

ретают популярность гели на основе гиалуроновой кислоты. Сама по себе гиалуроновая кислота как основа межтканевого вещества соединительной ткани не является чужеродным соединением. Возможно, поэтому ее препараты не иммуногенные и не должны вызывать серьезных реакций отторжения. В тканях проявляет активность фермент гиалуронидаза, способный деградировать гиалуроновую кислоту, в том числе и экзогенную. Однако эстетический эффект после введения филлеров на основе гиалуроновой кислоты может сохраняться относительно долго. Например, есть данные о сохранности заполнения тканей филлером через 23–24 мес, хотя считается, что гель гиалуроновой кислоты сохраняется обычно от 6 до 9 мес [2, 7].

Несмотря на отсутствие иммуногенности у гиалуроновой кислоты, есть вероятность развития осложнений. Минимальные проявления воспаления (отек, болезненность, эритема, гематомы) могут наблюдаться в первые дни после введения геля. Обычно такие осложнения легко переносятся пациентами и быстро разрешаются. В редких случаях может развиваться и тяжелый постинъекционный некроз, а также иногда отмечаются гранулематозные реакции на гель гиалуроновой кислоты, которые могут расцениваться как индивидуальная непереносимость препарата [3–5]. Такие осложнения весьма редки (6 из 709 пациентов) [6]. Однако они встречаются именно как реакция на гиалуроновую кислоту [1]. Правда, это можно также объяснить широкой распространенностью ее препаратов на рынке.

Подобный опыт применения филлеров на основе гиалуроновой кислоты можно считать ретроспективным, но каждый (даже редкий) случай осложнений после введения филлеров является личной неудачей для пациента. Кроме того, в практике эстетической медицины затруднено применение инвазивных методов исследования, в частности гистологических и гистохимических. Поэтому возникла необходимость в проведении серии экспериментов по введению гелей животным с целью оценки ре-

акции тканей кожи и процессов деградации филлеров на основе гиалуроновой кислоты.

**ВВЕДЕНИЕ ФИЛЛЕРА НА ОСНОВЕ
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ**

В эксперименте были использованы самки белых беспородных мышей весом 20–22 г (питомник «Рапполово», Ленинградская область). Исследования проводились в соответствии с требованиями стандарта GLP. Животные были распределены на 3 группы: 1-я группа (опытная) состояла из 30 мышей, которым вводили гель; 2-я группа (контроль) – 20 мышей, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия; 3-я группа – 24 интактных животных (см. таблицу).

В качестве модельного использовали гель Repleri 3 (ООО «НовоНексус», Москва), представляющий собой стабилизированную гиалуроновую кислоту неживотного происхождения в концентрации 24 мг/мл, размер коллоидных – частиц 0,28–0,5 мкм. Перед введением геля мышам коротко обстригали шерсть на спине. Инъекционную иглу 30G вводили под кожу на всю длину, затем по мере ее извлечения подкожно вводили гель; делали 2 параллельные полосы длиной около 1–1,5 см. Из-за малой толщины и высокой подвижности мышиной кожи инъецированный гель распределялся чаще всего под подкожным мышечным слоем *panniculus carnosus*, у некоторых мышей – в гиподерме, над мышечным слоем. Поэтому технику введения геля изменили. Иглу вводили в кожу максимально поверхностно, оттягивая кожу вверх и ведя иглу параллельно поверхности (ощущается сопротивление тканей). При такой технике введения гель преимущественно заполнял гиподерму, между дермой и *panniculus carnosus*. Аналогичным способом вводили под кожу 0,9% раствор хлорида натрия.

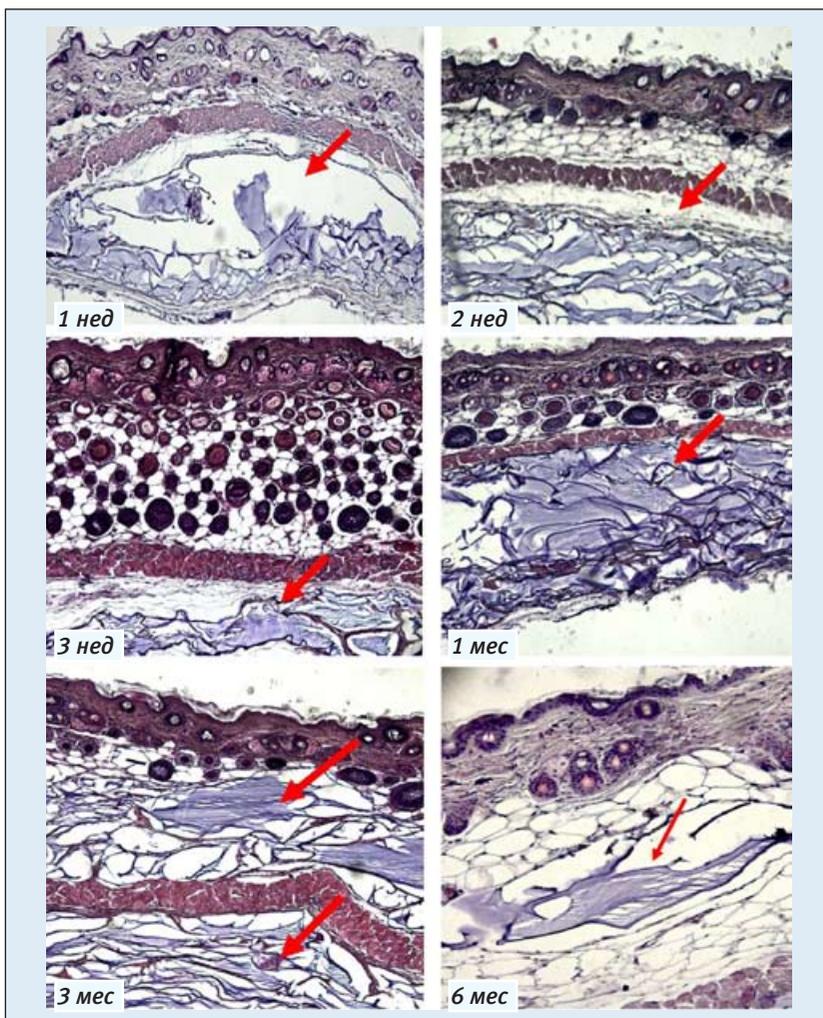
Животных забивали (по 4–5 особей из каждой группы за 1 день), затем осуществляли забор аутопсийного материала кожи через 1, 2, 3 нед, 1, 3 и 6 мес. Срок наблюдения до 6 мес установили исходя из того, что мышь является животным тахиметаболическим, с небольшими размерами тела и короткой продолжительностью жизни (2–3 года). Срок наблюдения в контрольной группе мышей сократили до 1 мес в силу быстрого распределения изотонического раствора в тканях.

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

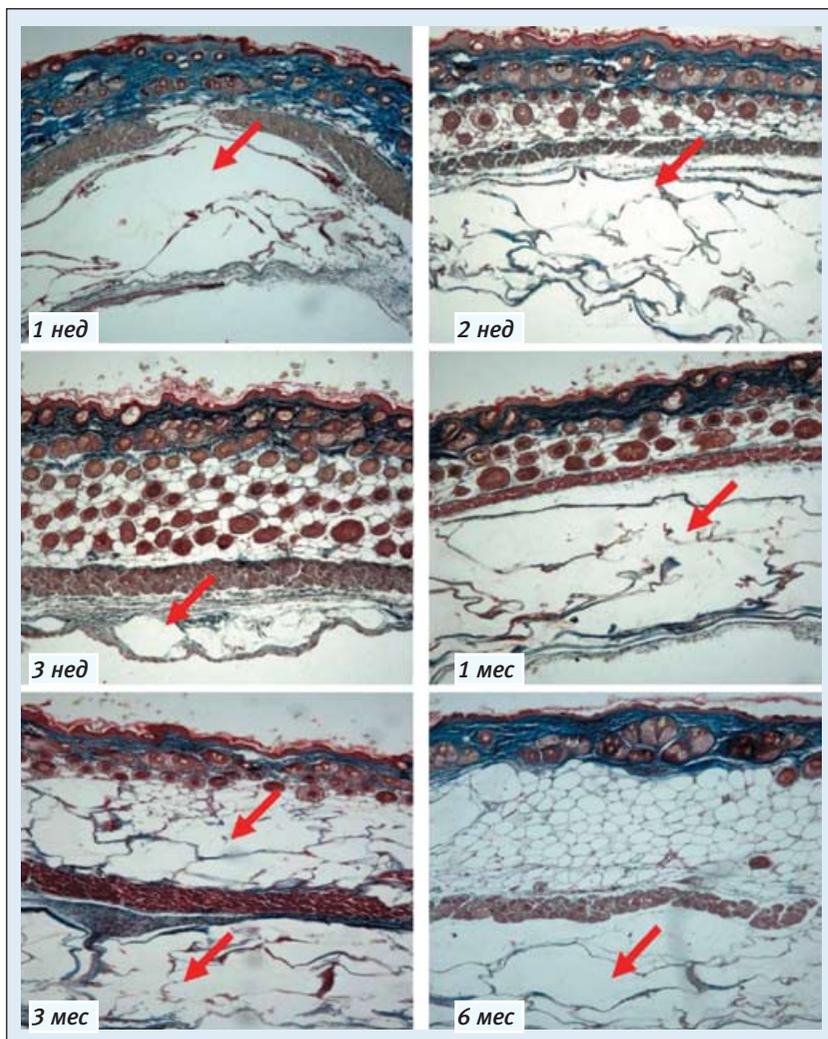
У животных, получивших гелевую инъекцию, забор аутопсий проводили в области локализации геля. У животных контрольной и ин-

Распределение животных по группам и сроки проведения аутопсий

Группа животных	Количество животных	Срок проведения аутопсий
Основная группа (n=30): введение геля с гиалуроновой кислотой	5	1 нед
	5	2 нед
	5	3 нед
	5	1 мес
	5	3 мес
	5	6 мес
Контрольная группа (n=20): введение 0,9% раствора хлорида натрия	5	1 нед
	5	2 нед
	5	3 нед
	5	1 мес
Интактная группа (n=24)	4	1 нед
	4	2 нед
	4	3 нед
	4	1 мес
	4	3 мес
	4	6 мес



■ **Рис. 1.** Репрезентативные срезы кожи мышей гелевой группы на всех сроках эксперимента. Стрелками показаны варианты распределения геля в тканях (под *panniculus carnosus*, в гиподерме и смешанный вариант). Окраска гематоксилином эозином; ×160



■ **Рис. 2.** Репрезентативные срезы кожи мышей после введения геля на всех сроках эксперимента. Стрелками показаны полости в местах локализации геля. Окраска по Массону; $\times 160$

тактной групп – в аналогичной области. Препараты фиксировали в 4% формальдегиде. Выполняли гистологическую проводку с обезвоживанием в среде Isorger («Бiovитрум», Санкт-Петербург) и заливкой в парапласт («Sigma», США). Из парапластовых блоков на санном микротоме (Reichert, Австрия) изготавливали срезы толщиной 6 мкм и монтировали на предметные стекла (Бiovитрум, Санкт-Петербург). Плоскость среза должна проходить перпендикулярно к поверхности кожи.

Препараты окрашивали 2 способами:

- гематоксилином эозином (Бiovитрум, Санкт-Петербург).
- анилиновым синим по методу Массона (Bio-optica, Италия).

Окраска препаратов гематоксилином эозином позволяет провести основную оценку морфологических изменений в структуре ткани, выявить большинство патологических изменений, включая инфильтрацию иммунокомпетентными клетками при развитии вос-

палительной реакции, связанной с отторжением геля, формирование крупных очагов фиброобразования вокруг участков, содержащих филлер.

Метод Массона (окраска анилиновым синим) в большей степени чувствителен к соединительной ткани и позволяет увидеть как очаги фиброобразования, так и другие патологические состояния соединительной ткани, которые могут быть не замечены при двухцветной окраске гематоксилином эозином. При использовании метода Массона ядра клеток окрашиваются в коричневый цвет, цитоплазма – в малиновый, а соединительная ткань – в ярко-синий.

Далее изучали и фотографировали препараты с использованием светового микроскопа с системой визуализации изображений DMLB и цифровой камеры DC 300.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биоптаты фиксировали в 4% растворе формальдегида, отмывали в фосфатно-солевом буфере – (ФСБ) (рН 7,2–7,4), затем пропитывали в ФСБ с добавлением 20% сахарозы при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и замораживали в жидком азоте. Изготавливали криостатные срезы толщиной 10 мкм на криостате CM 1510-1, так, чтобы плоскость сечения проходила вертикально, монтировали на предметные стекла Superfrost Plus, высушивали на воздухе, при необходимости хранили при температуре -20°C .

Иммуногистохимические исследования содержания коллагена III типа, экспрессии белка p53 и маркера макрофагов Mac-3 проводили методом непрямой иммуногистохимии с использованием системы экстравидин–биотин–щелочная фосфатаза.

На 1-м этапе срезы погружали в холодный ацетон (-20°C) на 2 мин и высушивали в течение 1 ч. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем инкубации срезов в ФСБ с 5% БСА в течение 15 мин.

Срезы инкубировали с кроличьими антителами, специфичными к белкам мыши:

- антителами к коллагену III типа в разведении 1:500 в 0,1 М буфере Трис-НСl рН 8,2 с добавлением 0,1% БСА 1,5 ч при комнатной температуре;
- антителами к p53 (Abcam) (ab32049) в разведении 1:25 в 0,05 М буфере Трис-НСl рН 8,2 с добавлением 0,9% NaCl, 0,1% БСА и 0,1% Тритона X100 1,5 ч при комнатной температуре.

Для определения маркера Mac-3 срезы фиксировали 2 мин в холодном ацетоне при температуре -20°C и после высушивания инкубировали 1,5 ч непосредственно с крысины-

ми антимышиными первыми антителами к Мас-3 в разбавителе для антител (Daco) в разведении 1:150 при комнатной температуре. Применение специального разбавителя для антител исключало необходимость проводить вышеописанную блокировку неспецифического связывания антител.

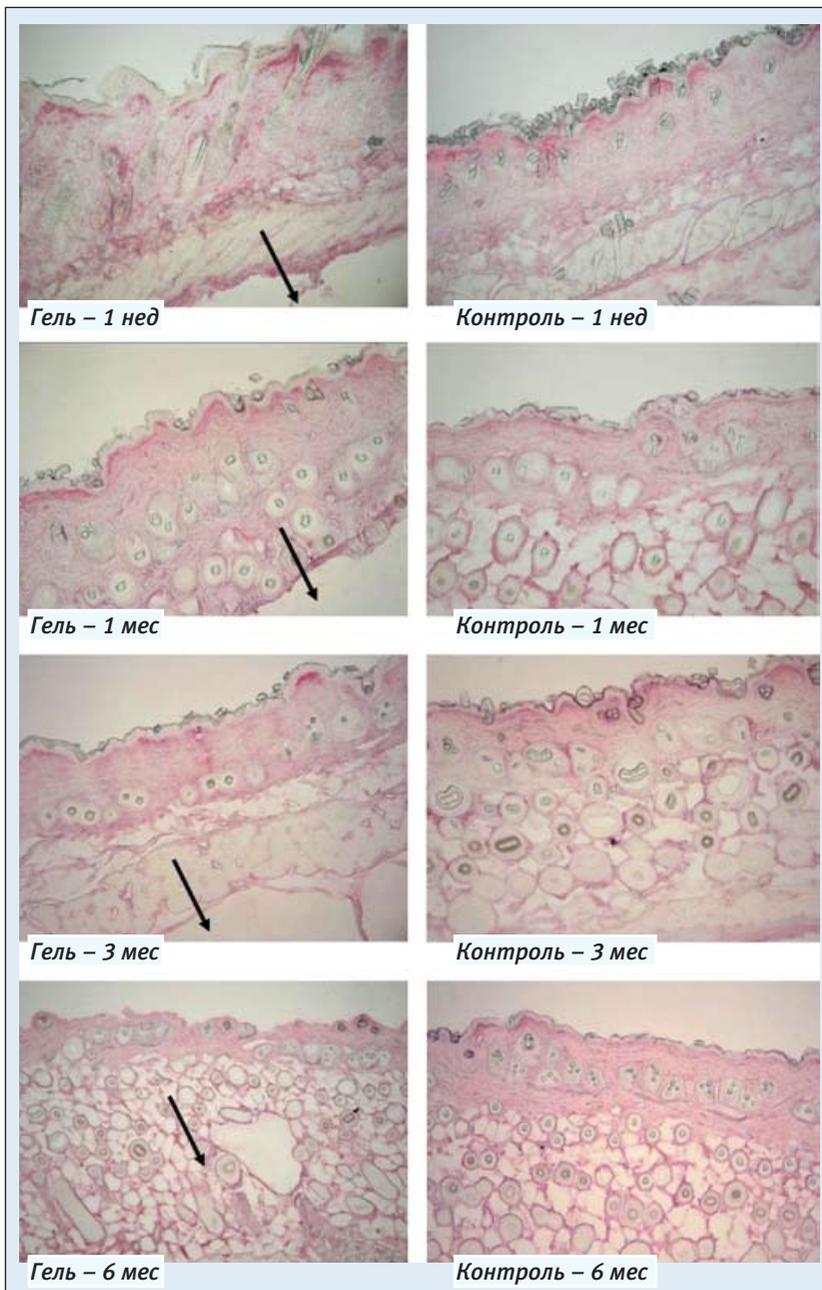
Контрольные срезы инкубировали без добавления первых антител. После первой и последующих инкубаций проводили отмывки 2 раза по 10 мин в буфере без БСА. На 2-м этапе срезы инкубировали со вторыми анти-кроличьими биотинилированными антителами в течение 1 ч, затем на 3-м этапе — с конъюгатом экстравидин–щелочная фосфатаза 45 мин. Краситель готовили следующим образом: 1 мг Naphtol-AS-MX фосфата растворяли в 0,04 мл формамида; добавляли 2 мл 0,1 М буфера Трис-НСl pH 8,2, 0,5 мг левомизола и 2 мг Fast Red TR, затем полученный раствор фильтровали. Окрашивали 5–15 мин, затем краску тщательно смывали водой и заключали в глицерин-желатину. Поло-жительные области окрашивались в красный цвет.

Срезы изучали с помощью светового микроскопа DMLB, микрофотографии получали цифровой камерой DC 300.

ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ТКАНЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ ВВЕДЕНИЯ ГЕЛЕЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Препарат геля гиалуроновой кислоты мышам вводили внутрикожно. Сроки наблюдений (еженедельно в течение месяца) позволили оценить раннюю реакцию соединительной ткани после стихания островоспалительных явлений, вызванных процедурой введения геля. Сроки наблюдений (3 и 6 мес) соответствовали возможному развитию поздних реакций: окрепших рубцов, фиброзных капсул, а также гранулем. Так как мышь в отличие от человека является животным с небольшим размером тела и очень малой продолжительностью жизни (2–3 года), то, следовательно, скорость и интенсивность метаболических процессов у нее гораздо более высокая. Исходя из этого, максимальный срок наблюдения составил 6 мес.

Окраска препаратов гематоксилином эозином (рис. 1) позволила провести анализ общих морфологических изменений, которые были вызваны введением биodeградируемого геля на основе гиалуроновой кислоты в ткани кожи мышей. У животных основной группы введенный гель, раздвигая ткани, разрывая волокна, формирует полости. Полости, заполненные гелем, располагались, в зависимости от способа введения, либо под мышечным слоем *panniculus carnosus*, либо в гиподерме между *panniculus carnosus* и дермой. В некото-



■ Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование экспрессии коллагена III типа на разных сроках исследования в тканях кожи мышей основной (введение геля) и контрольной групп; $\times 160$

рых случаях гель механически повреждал *panniculus carnosus*. Заполненные гелем полости наблюдались у всех мышей основной группы, вне зависимости от срока.

Содержащийся в полостях гель окрашивался в голубой цвет. У мышей контрольной группы, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия, подобных механических разрывов и полостей на самом раннем сроке наблюдения (1 нед) не было, и гистологическая картина тканей соответствовала таковой у интактных животных.

Окраска гематоксилином эозином не выявила вокруг полостей, содержащих гель, ка-

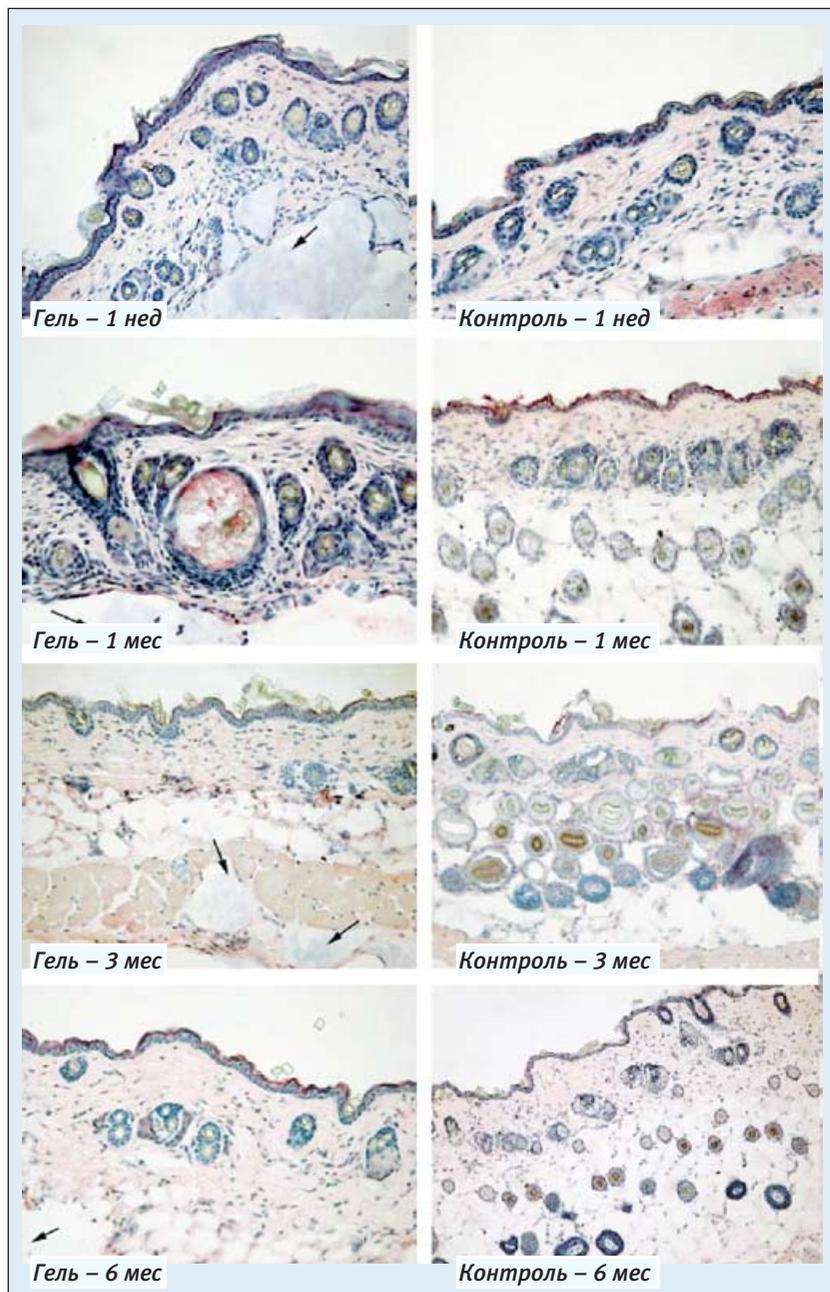


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка p53 на разных сроках эксперимента в тканях кожи мышей основной (гель) и контрольной групп; $\times 160$

ких-либо изменений, свидетельствующих о наличии воспаления в ответ на введение инородного высокомолекулярного вещества в ткани. Не отмечалось инфильтрации клетками — эффекторами воспаления, образования гранулем и явлений разрастания соединительной ткани не только на ранних сроках, но и по завершении периода наблюдения. При этом тканевая реакция не зависела от глубины локализации геля: проявления воспаления и фиброза отсутствовали как при более глубоком, так и при более поверхностном залегании геля. Кроме того, состояние эпидермиса, эпидермальных придатков кожи, дермы и прочих слоев вне участков локализации геля не обна-

руживало никаких изменений по сравнению с таковыми у животных контрольных групп.

Окраска анилиновым синим по Массону — более чувствительный метод для выявления реакции соединительной ткани по сравнению с окраской гематоксилином эозином (рис. 2). При окраске препаратов животных, получивших инъекцию геля, по методу Массона было показано наличие полостей в местах депонирования геля; сам гель при данном способе окраски не визуализируется. У животных контрольной группы, получивших инъекцию физиологического раствора, такие полости отсутствовали на всех сроках наблюдения; морфологическая картина кожи и подлежащих тканей соответствовала таковой у интактных мышей.

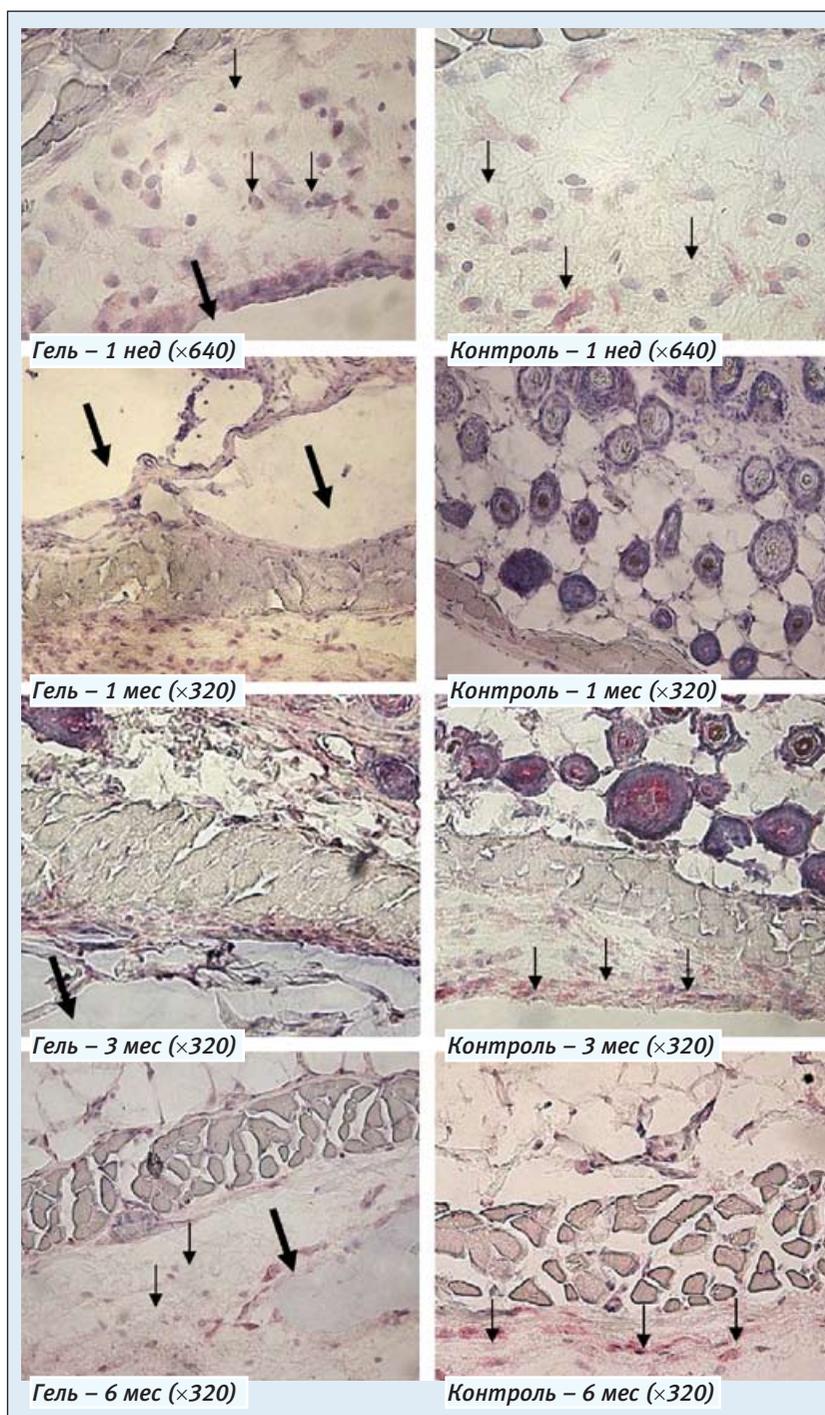
По границам полостей, содержащих гель, данный способ окраски выявил незначительное разрастание соединительной ткани, которое визуализировалось как несколько увеличенное количество фибробластов по периметру полости, хотя эти изменения были незначительны. В остальном у животных опытной группы вне локализации геля структура тканей не отличалась от таковой в контроле. В то же время иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами мыши к коллагену III типа не показало различий в распределении и содержании коллагена данного типа вокруг областей, содержащих гель, по сравнению с препаратами контрольных животных (рис. 3).

Как известно, под действием большинства повреждающих агентов в тканях развивается процесс альтерации, что приводит в конечном итоге к некробиозу — насильственной гибели клеток под воздействием выраженной гипоксии и при участии иммунокомпетентных клеток — участников воспаления. Согласно результатам гистологических исследований, признаков воспалительной реакции в тканях кожи мышей после введения геля гиалуроновой кислоты на всех сроках наблюдения зафиксировано не было. Тем не менее существует вероятность, что экзогенная гиалуроновая кислота, находясь в тканях, все же может выступать в роли повреждающего фактора. Однако интенсивность ее повреждающего действия не всегда достигает порога, при котором развиваются некробиоз и воспаление. Таким образом, при действии умеренного раздражителя на ткани может включаться процесс апоптоза, суть которого — в реализации генетических программ гибели клетки. Клетка в состоянии энергодифицита, вызванного умеренной гипоксией, активирует программу самоубийства; при этом процесс апоптоза не сопровождается воспалительной реакцией. Непосредственное уча-

ствие в активации этого процесса принимает белок p53, положительный регулятор апоптоза. Клетки в процессе апоптоза начинают активно экспрессировать p53. Поэтому по экспрессии данной молекулы можно оценить, является ли находящаяся в тканях экзогенная гиалуроновая кислота стимулятором апоптоза окружающих клеток. С этой целью провели иммуногистохимическое исследование тканей для выявления экспрессии p53. Исследование препаратов не выявило выраженной экспрессии белка p53 в коже мышей как контрольных, так и опытной групп; причем различий в показателях экспрессии у животных разных групп не было (рис. 4).

Элиминация «устаревших» и экзогенных макромолекул в тканях организма осуществляется главным образом за счет поглощения их макрофагами. При этом макрофаги способны не только поглощать макромолекулы, но и опосредовать развитие воспаления. Таким образом, при наличии в тканях депозитов высокомолекулярных веществ (например, введенного в кожу гиалуронового филлера) может быть выявлена локальная реакция макрофагов. С этой целью ткани кожи мышей типировали моноклональными антителами к макрофагальному антигенному маркеру Mac-3. Mac-3 – это гликопротеин 92–110 кДа, который экспрессируется на мышинных мононуклеарных фагоцитах. На препаратах кожи мышей выявлялись позитивно окрашенные антителами к маркеру Mac-3 клетки – макрофаги. Препараты изучали с целью определения наличия макрофагов в местах введения геля, у животных контрольных групп исследовали соответствующие слои кожи. Макрофаги отмечались на срезах кожи у мышей опытной группы после введения геля, а также в контрольных группах на всех сроках наблюдения (рис. 5). При этом не было выявлено увеличения количества макрофагов в местах введения геля по сравнению с контрольными препаратами.

Как показали результаты морфологического исследования тканей кожи мышей, введение филлера на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты Replegi 3 не вызывает воспалительной реакции, формирования выраженного фиброза, образования гранулем, инфильтрации иммунокомпетентными клетками, активации процесса апоптоза клеток. Следовательно, препарат не оказывает существенного влияния на функции кожного покрова исследованных мышей. Введенный гель сохраняется в тканях кожи в течение 6 мес. Отмечаются незначительные явления разрастания соединительной ткани вокруг полостей, содержащих гель, что указывает на некоторое усиление активности фибробластов. Однако



■ Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование экспрессии макрофагального маркера Mac-3 в тканях кожи мышей основной (гель) и контрольной групп

эта реакция не имеет клинических последствий и не влияет на эстетический эффект. Возможно, длительное сохранение геля в тканях мышей обусловлено медленно текущей реакцией его элиминации, скорее всего неиммунного характера. Таким образом, гель на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты способен относительно долго сохраняться в тканях кожи, не вызывая значимой реакции отторжения. Это позволяет рекомендовать его как эффективный и безопасный в применении филлер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alljotas-Reig J., Garcia-Gimenez V. Delayed immune-mediated adverse effects related to hyaluronic acid and acrylic hydrogel dermal fillers: clinical findings, long-term follow-up and review of the literature // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2008; 22(2): 150–161.
2. Bennett R., Taher M. Restylane persistent for 23 months found during Mohs micrographic surgery: a source of confusion with hyaluronic acid surrounding basal cell carcinoma // *Dermatol. Surg.* – 2005; 31(10): 1366–1369.
3. Dayan S.H., Arkins J.P., Mathison C.C. Management of impending necrosis associated with soft tissue filler injections // *J. Drugs Dermatol.* – 2011; 10(9): 1007–1012.
4. Fernandez-Acenero M.J., Zamora E., Borbujo J. Granulomatous foreign body reaction against hyaluronic acid: report of a case after lip augmentation // *Dermatol. Surg.* – 2003; 29(12): 1225–1226.
5. Kassir R., Kolluru A., Kassir M. Extensive necrosis after injection of hyaluronic acid filler: case report and review of the literature // *J. Cosmet. Dermatol.* – 2011; 10(3): 224–231.
6. Lowe N.J., Maxwell C.A., Lowe P. et al. Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2001; 45(6): 930–933.
7. Richards K.N., Rashid R.M. Twenty-four-month persistence of hyaluronic acid filler for an atrophic scar // *J. Cosmet. Dermatol.* – 2011; 10(4): 311–312.

SUMMARY

AN EXPERIMENTAL BEHAVIOR MODEL OF HYALURONIC ACID-BASED BIODEGRADABLE FILLER IN SKIN TISSUES

V.G. Takhmazyan¹; T.P. Polychuk, Cand. Med. Sci.¹;
L.L. Ambartsumyan¹, E.A. Varyushina, Cand. Biol. Sci.²;
G.V. Aleksandrov, Cand. Biol. Sci.²; T.A. Sazonova²;
O.S. Babich¹; V.O. Matytsin¹; Professor T.N. Korolkova, MD¹;
L.Yu. Kolesova³

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg

²State Research Institute of Highly Fine Biopreparations, Federal Biomedical Agency of Russia, Saint Petersburg

³ООО «NovoNexus», Moscow

The use of fillers, a hyaluronic acid-based biodegradable one in particular, was studied. The study showed no early and late tissue reactions to the injected filler in all observation periods, which is suggestive of its efficacy and safety.