

СТАТУС ЭПИДЕРМИСА ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТОВ «РАДИЕСС» И «ЛЮМИНЕРА»

¹Кафедра гистологии с эмбриологией

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»,
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4; тел. (861) 262-72-71. E-mail: fomevg@mail.ru;

²ООО «МЕРЦ ФАРМ»,

Россия, 123317, г. Москва, Пресненская наб., 10, корп. С. E-mail: Julia_Blatt@mail.ru

В эксперименте изучены изменения, происходящие в эпидермисе кожи после инъекции препаратов «радиесс» и «люминера». Препараты вводили интрадермально, оценку результатов проводили на 2, 4 и 16-й неделях эксперимента для препарата «радиесс» и на 2-й и 16 неделе для препарата «люминера». Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Вейгерту и Ван-Гизону, для избирательного обнаружения ДНК использовали реакцию Фельгена. Распределение суммарного белка изучали в препаратах, окрашенных амидо-черным при pH 2,2, а катионного белка при pH 8,2. Проведена морфометрия ядер дифференцированных слоев эпидермиса, и дана оценка их оптической плотности. Показано, что введение филлеров приводит к увеличению толщины эпидермиса более чем в 1,5 раза. Зона герминативного компартмента увеличивает митотическую активность эпителиоцитов. Клетки зернистого слоя наращивают темп синтеза белков, обладающих катионным зарядом. Выявленные изменения индуцируются функциональным статусом ДНК ядер клеток дифференцированных слоев эпидермиса.

Ключевые слова: кристаллы гидроксипатита, препарат «радиесс», люминера, эпидермис, филлер.

G. M. MOGILNAYA¹, E. V. FOMICHEVA¹, Yu. E. BLATT²

STATUS EPIDERMIS IN INTRODUKTION OF THE DRUG «RADIESSE» AND «LUMINAIRE»

¹Department of gistology and embryology Kuban state medical university,

Russia, 350063, Krasnodar, Sedin str., 4; tel. (861) 262-72-71. E-mail: fomevg@mail.ru;

²«Merz Farma»,

Russia, 123317, Moskva, Presnenskaya nab. 10, bloc C. E-mail: Julia_Blatt@mail.ru

Changes occurring which took place in epidermis skin after injection drugs «radiess» and «luminaire» are analyzed in the experiment. Preparations introduced endodermal evaluation results conducted at 2, 4 and 16 weeks experiment to drug «radiess» and at 2 and 16 weeks to drug «luminaire». Slices stained hematoxylin and eosin, by Weigert and Van-Gieson for selective detection DNA used reaction Feulgen. Distribution of total protein studied in preparations stained amido – black at pH 2.2, and cationic at pH 8.2. Spended the morphometry of cores were differentiated in layers epidermis and given assessment their optical density. It is shown that the introduction of fillers lead to increase thickness epidermis more than 1.5. The zone of germinative compartment increases mitotic activity in epithelial cells. Cells of granular layer increasing temp of protein synthesis having cationic charge. Revealed changes induced status DNA cell nuclei differentiated layers epidermis.

Key words: crystals hydroxyapatite drug «radiess», luminaire, the epidermis, filler.

Современная косметология имеет на вооружении несколько категорий филлеров, среди которых типична группа веществ, стимулирующих продукцию коллагена. Особенностью таких филлеров (радиесс и люминера) следует считать присутствие в их составе кристаллов гидроксипатита. При этом наиболее известным является радиесс, который зарекомендовал себя как непиrogenный, когезивный, субдермальный препарат, не обладающий токсичностью и мутагенностью [1, 2, 3]. Обзор литературы, посвященной этому филлеру, со всей очевидностью показал, что

главной темой исследований радиесса является изучение его влияния исключительно на ткани дермы с описанием ответной реакции экстрацеллюлярного матрикса и фибробластов [4, 5]. При этом описывают несколько механизмов активации неколлагенеза: растяжение фибробластов, локальная деструкция клеток при введении филлера и возрастание концентрации цитокинов. Все это в конечном итоге активует фибробласты и запускает процесс неколлагенеза. Вместе с тем результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что после инъекции

упомянутых филлеров при внешнем осмотре кожи часто наблюдается очень хороший, связанный с улучшением статуса эпидермиса косметический эффект.

Настоящее исследование посвящено изучению влияния препаратов «радиесс» и «люминера» на морфологический статус эпидермиса кожи.

Материалы и методы

Для изучения морфологических изменений в зоне инъекции препаратов «радиесс» и «люминера» поставлены серии экспериментов *in vivo*. Объектом исследования послужили беспородные крысы-самцы весом 200–250 г (ветеринарный сертификат 247 № 0136638) в количестве 48 особей. Препарат вводили интрадермально в объеме 0,05 мл в заднюю часть шеи (холку) всем экспериментальным животным одновременно. Оценку результатов проводили через 2, 4 и 16 недель для препарата «радиесс» и на 2-й и 16-й неделях для препарата «люминера». Группе интактных животных (фоновый контроль) вводили стерильный физиологический раствор в той же дозе. Для морфологического изучения использовали кусочки кожи с заделкой материала в парафин по общепринятой методике. Окраску срезов проводили гематоксилином и эозином, по Вейгерту, а также по Ван-Гизону. Для избирательного обнаружения ДНК использовали реакцию Фельгена [6]. Полученные микропрепараты подвергали компьютерной морфометрии с использованием стандартизированных микрофотографий в формате TIF, полученных с помощью цифровой камеры для микроскопии DCM 310 с разрешением 3 мегапиксела, смонтированной на микроскопе «МБИ-6». Анализ полученных изображений проводили с помощью компьютерной программы «Scion Image» фирмы «Scion Corporation», сертифицированной в 2000 г. National institute of health (США). Измерению подвергали диаметры ядер эпителиоцитов эпидермиса шиповатого и зернистого слоев, толщину эпидермиса, а также оптическую плотность ядер эпителиоцитов, окрашенных по Фельгену (гидролиз в 5 н HCL при 20° C). В ядрах измеряли два диаметральных диаметра с последующим расчетом индекса ядерной симметрии (ИЯС) по формуле $IЯС = d_{max} : d_{min}$, где d_{max} – больший из измеренных диаметров, а d_{min} – меньший. Так как определение абсолютных размеров ядер эпителиоцитов и толщины эпидермиса не входило в задачу исследования, измерения проводили в условных единицах (усл. ед.), предлагаемых программой «Scion Image», которые соответствуют количеству пикселей компьютерного монитора в измеряемом отрезке. Оптическую плотность ядер эпителиоцитов измеряли виртуальным зондом постоянных размеров с использованием параметра «optical densiti» программы «Scion Image».

Распределение суммарного белка изучали визуально в препаратах, окрашенных амидо-черным при pH 2,2, а катионного белка тем же красителем при pH 8,2 [6]. Все цифровые данные подвергались статистической обработке методами вариационной статистики с использованием программы «Microsoft Excel».

Полученные результаты и их обсуждение

У контрольных животных изучение микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, по Вейгерту, а также по Ван-Гизону, не выявило существенных различий. При этом эпидермис достаточно тонкий, с четко дифференцированными зонами: базальной, шиповатой, зернистой и роговой (рис. 1). При выявлении суммарного белка в окраске амидо-черным pH 2,2 весь пласт окрашивается интенсивно и диффузно, деление на слои отсутствует. При окрашивании этим же красителем, но при pH 8,2 с выявлением катионного белка отчетливо видно снижение интенсивности реакции в клетках герминативной зоны по сравнению с амидо-черным pH 2,2.

Спустя 2 недели после инъекции радиесса в препарате видны участки эпидермиса, где дерма обычной структуры, и участки, где дерма заполнена микросферами с кристаллами гидроксиапатита. Последние собраны в виде групп, регионарные кровеносные сосуды заполнены эритроцитами, часть волокон дермы деформирована. Эпидермис в зоне эксперимента существенно не изменен – это типичной толщины пласт с герминативной зоной и с одним слоем диффузно и базофильно окрашенных зернистых клеток, а также с тонким оксифильным роговым слоем. При окрашивании амидо-черным pH 2,2 сохраняется диффузная окраска всего пласта, а при избирательном выявлении катионных белков при pH 8,2 четко типичен зернистый слой. Результаты изучения эпидермиса на участках инъекции препарата «люминера» спустя 2 недели показали общность морфологии пласта и характера распределения в нем суммарного и катионного белков.

Через 4 недели после инъекции радиесса конгломераты, сформированные микросферами, сохраняются, между ними отчетливо видны коллагеновые фибриллы в виде оксифильно окрашенных волокон. Дерма обнаруживает присутствие большого числа фибробластов. В этот же период, соответствующий 4 неделям эксперимента, над участком, заполненным микросферами, при окраске гематоксилином и эозином отмечается утолщение эпидермиса, при этом ядра клеток базального слоя выглядят четко структурированными. Число клеток в составе герминативного компартмента нарастает. Утолщение эпидермиса связано также и с увеличением числа клеточных рядов в составе зернистого слоя, который пред-

ставлен уже 2–3 рядами. Роговой слой четко дифференцируется и окрашивается оксифильно. При выявлении катионного белка амидо-черным рН 8,2 в зоне эпидермиса отчетливо дифференцируется зернистый слой – в виде интенсивно окрашенных клеток с большим числом гранул.

На 16-й неделе эксперимента микросферы препарата «радиесс» сохраняют групповое расположение, но число микросфер в составе этих групп снижено. С учетом изменения размеров микросфер, а к этому сроку они действительно уменьшаются, можно предположить, что здесь имеет место ферментативный остеолит с высвобождением фосфатных ионов, которые могут влиять на местный гомеостаз. В этих условиях и регистрируется изменение морфологического статуса эпидермиса, который увеличивает число клеточных рядов в ростковой зоне. Этот компартмент насчитывает до 5–6 клеточных рядов с увеличением размеров и самих клеток. Наибольший интерес представляют клетки зернистого слоя, где происходит увеличение и числа их клеточных рядов (до 3), и количества кератогиалиновых гранул в составе этих клеток (рис. 2А). Последние

избирательно окрашиваются при выявлении катионного белка при рН 8,2. Отмечается некоторое утолщение самого рогового слоя.

Спустя 16 недель после использования препарата «люминера» эпидермис был изучен над участком с сохранившимися местами микросферами. При окраске гематоксилином и эозином отчетливо видно утолщение эпителиального пласта за счет увеличения рядов клеток в составе герминативного компартмента (до 4 рядов), увеличивается и число клеток зернистого слоя. Клетки здесь крупные, уплотненные и содержат большое количество базофильно окрашенных гранул (рис. 2Б). Последние окрашиваются и при избирательном обнаружении катионного белка при рН 8,2.

Результаты изучения морфометрических параметров ядер дифференцированных слоев эпидермиса показали, что спустя 2 недели после инъекции препарата «радиесс» клетки базального слоя увеличивают размер ядер по сравнению с контролем. При этом максимальный диаметр этих ядер в среднем составляет $20,5 \pm 0,87$ усл. ед., тогда как в контроле такой параметр оказался равным $12,7 \pm 0,47$ усл. ед., и эти различия были

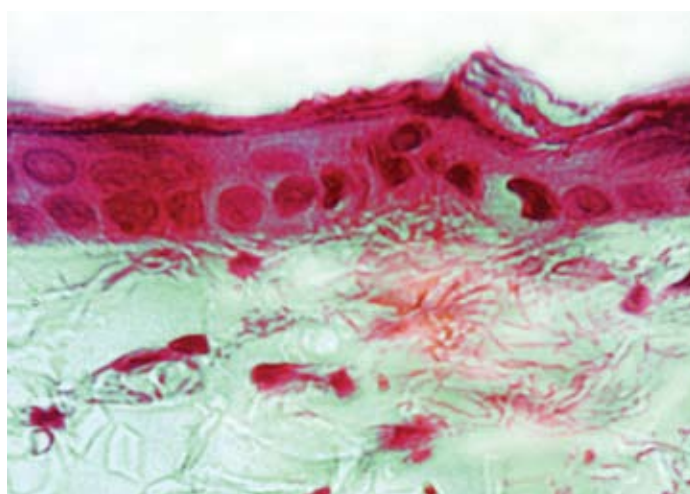
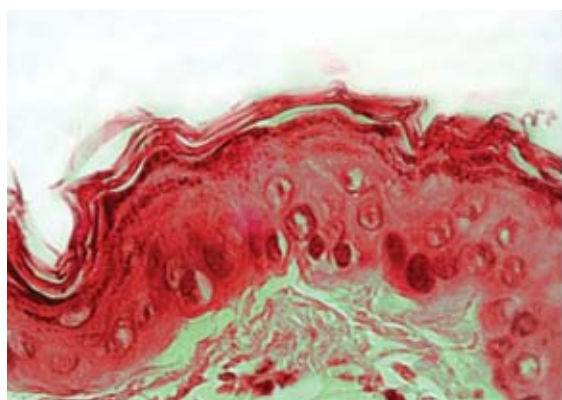
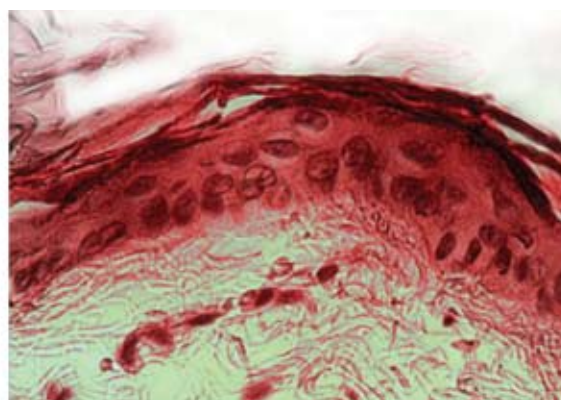


Рис. 1. Эпидермис в контрольной группе. Окраска по Ван-Гизону (об.20х; ок.7х)



А



Б

Рис. 2. Эпидермис под зоной локализации препарата «радиесс» (А) и препарата «люминера» (Б). Окраска по Ван-Гизону (об.20х; ок.7х)

статистически достоверны ($p < 0,001$). Сопоставление показателя соотношения диаметров ядер для клеток базального слоя контроля и после введения препарата «радиесс» не обнаружило различий. Средняя оптическая плотность ядер клеток базального слоя эпидермиса для контрольной группы оказалась равной $90,7 \pm 4,39$, тогда как в ядрах этих же клеток в зоне введения препарата «радиесс» оптическая плотность оказалась в 2 раза ($46,3 \pm 2,14$ усл. ед.) ниже уровня контроля.

Компьютерная морфометрия ядер базального слоя эпидермиса спустя 2 недели после введения препарата «люминера» показала, что ядра становятся крупнее и диаметр их в среднем составляет $15,4 \pm 0,48$ усл. ед., что выше, чем в контроле. Эти различия статистически значимы, но данный показатель меньше, чем после введения препарата «радиесс» (таблица). Выявленная монотонность динамики показателя ИЯС может свидетельствовать об отсутствии неопластической трансформации.

Оптическая плотность ядер при введении филлеров снижается, что в случае реакции Фельгена может трактоваться как показатель их функциональной нестабильности, и в условиях кислотного гидролиза освобождается меньшее число реактивных групп, взаимодействующих с реактивом Шиффа. Наиболее низкий показатель оказался характерным для ядер клеток базального слоя после инъекции препарата «радиесс» ($46,3 \pm 2,14$ усл. ед.).

Средняя оптическая плотность ядер клеток шиповатого слоя при введении двух сравниваемых

филлеров совпадает, и эти показатели составляют $42,4 \pm 4,6$ усл. ед. для люминеры и $41,05 \pm 1,67$ усл. ед. для радиесса. По сравнению с контролем средняя оптическая плотность в препаратах, окрашенных на ДНК, снижается. Однако в этих условиях происходит увеличение числа клеточных рядов за счет митотической активности клеток герминативного компартмента.

Итак, морфометрия ядер клеток базального и шиповатого слоев спустя 2 недели после введения филлеров показывает, что статистически значимые различия выявляются для ядер клеток базального слоя, и связаны они с увеличением диаметра ядер по их максимальному показателю. Интересно, что индекс ядерной симметрии для этих филлеров представляется несколько повышенным в случае использования препарата «люминера», относительно препарата «радиесс» этот показатель не отличался от контроля (таблица).

Морфология ядер дифференцированных слоев эпидермиса спустя 16 недель после введения филлера показала, что на участке инъекции препарата «радиесс» в зоне базального слоя диаметр ядер колебался от $17,3 \pm 0,82$ усл. ед. до $11,3 \pm 0,39$ усл. ед. Соотношение названных величин, интерпретируемое как индекс ядерной симметрии, соответствует $1,54 \pm 0,08$ усл. ед. Ядра клеток базального слоя характеризуются относительно низкой оптической плотностью.

Для ядер клеток шиповатого слоя различий их диаметров от контроля не установлено, но их ядра обладают низкой оптической плотностью ($p < 0,001$).

Морфометрические параметры ядер клеток эпидермиса спустя 2 недели

| Объект исследования | d_{\max} | d_{\min} | Индекс ядерной симметрии | Средняя оптическая плотность |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Контроль: | | | | |
| базальный | $12,7 \pm 0,47$ | $11,14 \pm 0,40$ | $1,17 \pm 0,04$ | $90,7 \pm 4,39$ |
| шиповатый | $17,7 \pm 0,76$ | $13,67 \pm 0,56$ | $1,27 \pm 0,41$ | $74,0 \pm 3,21$ |
| Люминера: | | | | |
| базальный | $15,4 \pm 0,48$ $P < 0,001$ | $12,14 \pm 0,56$ $P > 0,05$ | $1,38 \pm 1,10$ $P > 0,05$ | $57,92 \pm 6,35$ $P < 0,01$ |
| шиповатый | $21,0 \pm 1,18$ $P < 0,05$ | $5,56 \pm 0,91$ $P > 0,05$ | $1,40 \pm 0,08$ $P > 0,05$ | $42,4 \pm 4,60$ $P < 0,01$ |
| Радиесс: | | | | |
| базальный | $20,5 \pm 0,87$ $P < 0,001$ | $18,10 \pm 0,67$ $P < 0,001$ | $1,19 \pm 0,11$ $P > 0,05$ | $46,3 \pm 2,14$ $P < 0,01$ |
| шиповатый | $21,33 \pm 0,88$ $P < 0,01$ | $18,33 \pm 0,49$ $P < 0,001$ | $1,25 \pm 0,01$ $P > 0,05$ | $41,05 \pm 1,67$ $P < 0,01$ |

Примечания: d_{\max} – средний максимальный диаметр ядер; d_{\min} – средний минимальный диаметр ядер; P – достоверность отличия от контроля.

Изучение ядер эпидермиса в зоне введения препарата «люминера» спустя 16 недель после введения позволило выявить факт изменения средней оптической плотности, которая для ядер базального слоя составила $78,5 \pm 5,32$ усл. ед., но по сравнению с контролем различие было статистически недостоверным, а для ядер клеток шиповатого слоя при показателе оптической плотности $63,2 \pm 3,71$ усл. ед. различие статистически значимо ($p < 0,01$).

Морфометрия толщины эпидермиса спустя 16 недель после использования филлеров показала, что при введении препарата «радиесс» толщина эпидермиса в среднем составляет $277 \pm 10,8$ усл. ед., а для препарата «люминера» – $230 \pm 7,06$ усл. ед. И в первом, и во втором случаях можно говорить об увеличении общей толщины эпидермального пласта, поскольку в контроле она в среднем составила $146 \pm 3,46$ усл. ед. и отличалась от результатов эксперимента с достаточно высокой статистической достоверностью ($p < 0,001$).

Таким образом, введение филлеров меняет морфологический статус эпидермиса по пути увеличения числа клеток в составе герминативного компартмента, а также увеличивает число клеточных рядов в зернистом слое, что можно рассматривать как результат изменения функционального статуса ДНК ядер. При этом первая ответная реакция регистрируется на 4-й неделе эксперимента и связана с активацией хроматина ядер клеток базального слоя. К концу эксперимента отмечается активация клеток зернистого слоя, о чем свидетельствует высокая степень их грануляции. Интерес к клеткам шиповатого и зернистого слоев связан с тем, что в них синтезируются гетерогенные смеси барьерных липидов, а также липопротектирующие ферменты (гликофинголипиды, фосфолипиды, церамиды). Содержимое ламеллярных телец и гранул кератогиалина используется для формирования эпидермаль-

ного водного барьера, а также обеспечения его гомеостаза. Эти вещества отвечают за скорость отторжения роговых чешуек и антимикробный статус кожи.

Таким образом, использование филлеров, в состав которых входят кристаллы гидроксиапатита, приводит к активации герминативного компартмента и, следовательно, к утолщению всего эпидермиса. С другой стороны, под влиянием этих препаратов происходит активация темпа синтеза клетками зернистого слоя одного из наиболее активных компонентов защитного барьера белка, обладающего катионным зарядом (филлагрина), что и обеспечивает более высокий статус резистентности эпидермису.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beer K., John M., Cohen J. Evaluation of injectable CaHA for the treatment of mid-face volume loss // J. drugs dermatol. – 2008. – V. 7 (4). – P. 359–366
2. Lizzul P., Narurkar V. The role of calcium hydroxylapatite (Radiesse) in nonsurgical aesthetic rejuvenation // J. drugs dermatol. – 2010. – V. 9 (5). – P. 446–450.
3. Jacovella P. Use of calcium hydroxylapatite (radiesse) for facial augmentation. Clinical interventions in aging. – 2008. – P. 161–174; Hevia O. Correction of lowerface with calcium hydroxylapatite // Dermatol. surg. – 2009. – V. 35. – P. 1487–1494.
4. Busso M., Moers-Carpi M., Storck R., Ogilvie P., Ogilvie A. Multicenter, randomized trial assessing the effectiveness and safety of calcium hydroxylapatite for hand rejuvenation // Dermatol. surg. – 2010. – V. 36. – P. 790–797.
5. Marmur E., Phelps R., Goldberg D. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler // J. cosmet. laser ther. – 2004. – V. 6. – P. 223–226.
6. Pearce A. Histochemistry. Theoretical and applied. – London, 1968. – 561 p.

Поступила 13.05.2015

С. А. ПАВЛИЩУК, А. В. РОМАШ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ВТОРОГО ТИПА

Кафедра терапии № 1 ФПК и ППС государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. E-mail: corpus@ksma.ru

Представлен обзор литературы по эффективности антиагрегантной профилактики и терапии микро- и макроангиопатий при сахарном диабете второго типа.

Ключевые слова: сахарный диабет, тромбоциты, антиагрегантная терапия.