

А.Г. Галеева¹, Ф.Х. Камилов¹, О.М. Капулер², Г.В. Шумихина³
**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
 ЖИВОТНЫХ В ОБЛАСТИ ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
 ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГИАЛУРОНАНА**

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

²ЗАО «Косметологическая лечебница», г. Уфа

³ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия»

Минздрава России, г. Ижевск

В последние годы инъекционные и косметологические средства на основе гиалуронана нашли широкое применение. Спектр исследований биологических функций и механизмов действия гиалуронана и его фрагментов расширяется, однако имеющиеся данные об их фармакологических эффектах касаются в основном визуализируемых клинических результатов.

Целью исследования явилась оценка гистологических изменений ткани кожи экспериментальных животных при внутривнутридермальном введении препарата нативного высокомолекулярного гиалуронана. Препарат вводили внутривнутридермально мезотерапевтической техникой самкам крыс зрелого возраста. С помощью гистологических методов исследования кожи в области инъекции (окраска гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Маллори, по Хейлу и импрегнация серебра по Футу) показано, что в первые дни развивается невыраженный воспалительный ответ ткани с отёком и диффузной инфильтрацией клеточными элементами, преимущественно макрофагами. В последующие дни (7-, 21-е сутки) обнаруживаются пролиферация фибробластических клеток, усиление биосинтеза коллагена и гликозаминогликанов.

Ключевые слова: гиалуронан, внутривнутридермальное введение, гистологическая структура кожи, пролиферация фибробластов, биосинтез коллагена.

A.G. Galeeva, F.Kh. Kamilov, O.M. Kapuler, G.V. Shumikhina
**MORPHOLOGICAL CHANGES OF SKIN OF EXPERIMENTAL ANIMALS
 IN THE AREA OF INTRADERMAL INJECTION
 OF HIGH-MOLECULAR HYALURONAN**

In recent years hyaluronan-based injectable and cosmetological products have been widely used. The spectrum of investigation of biological functions and mechanisms of action of hyaluronan and its fragments is widening, but existing evidence about their pharmacological properties refer mainly to visualized clinical results.

The study aimed to evaluate histological changes of tissue of skin at experimental animals during intradermal injection of native high-molecular hyaluronan. It was intradermally injected by mesotherapy technique to females of mature rats. It is shown by histological methods of skin research in the area of injection (coloring by a hematoxylin and eosine, according to Van-Gizona, Mallori, Hale and a silver impregnation according to Foote) that in the first days we can observe not expressed inflammatory tissue reaction with edema and diffuse infiltration by cellular elements, mainly macrophages. The next days (the 7th, 21st days) showed proliferation of fibroblastic cells, increase of biosynthesis of collagen and glycosaminoglycan.

Key words: hyaluronan, intradermal injection, histological structure of skin, proliferation of fibroblasts, collagen biosynthesis.

Гиалуронан (гиалуроновая кислота) с протеогликанами и гликопротеинами составляет основное вещество экстрацеллюлярного матрикса, которое обеспечивает его биохимические функции, образуя высокогидрофильную среду, и является своеобразной интегрирующей субстанцией [10]. Гиалуронан участвует в формировании сети коллагеновых волокон, адгезии клеток соединительной ткани и матрикса, образует перицеллюлярный слой, влияет на миграцию, апоптоз клеток, пролиферацию фибробластов и эндотелиальных клеток, обладает противовоспалительными свойствами и способствует регенерации тканей [12-15].

Важное значение гиалуронан имеет для состояния кожи, в которой обнаруживается около 50% общего его содержания в организме [5]. С возрастом содержание гиалуронана в коже подвергается перераспределению со значительным снижением в дерме [14,16], что является одной из причин клинических про-

явлений инволюционных изменений кожи. Старение кожи сопровождается снижением количества фибробластов, угнетением их пролиферативных свойств и функциональной активности [3].

Уникальные физико-химические свойства, физиологическая роль и биосовместимость гиалуронана привлекли внимание специалистов эстетической медицины, в результате инъекционные и косметологические средства на его основе нашли широкое применение [2,12,15]. Спектр исследований биологических функций и механизмов действия гиалуронана и его фрагментов расширяется, однако имеющиеся данные об их фармакологических эффектах касаются в основном визуализируемых клинических результатов.

Цель исследования – оценить гистологические изменения ткани кожи экспериментальных животных при внутривнутридермальном введении препарата нативного высокомолекулярного гиалуронана.

Материал и методы

Исследования проведены на 30 самках белых крыс зрелого возраста (11-12 месяцев) массой 280-320 г. При проведении опытов были соблюдены международные требования этических норм и рекомендации по гуманному отношению к животным, используемым в экспериментальных и других научных целях (приказ Минздравсоцразвития РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Животным опытной группы под лёгким эфирным наркозом внутридермально вводили мезотерапевтической техникой препарат «Juvederm hydrate™» (Франция), содержащий 13,5 мг геля гиалуронана с молекулярной массой 1 млн Да и 9 мг маннитола в 1 мл фосфатного буфера pH 7,2, крысам контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор. Инъекции производили из расчета 0,06 мл на 100 г массы на боковые поверхности туловища животных (площадь 3×3 см) после предварительного удаления шерсти. Животных выводили из опыта мгновенной декапитацией под лёгким эфирным наркозом на 2-, 4-, 7-, 21- и 37-е сутки.

Кусочки ткани кожи фиксировали в 10% нейтральном формалине, осуществляли стандартную проводку и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-6 микрон (микротом LEICA 4RM 2145, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, по Маллори [1], для выявления аргирофильных волокон импрегнировали солями серебра по Футу [1], для выявления гликозаминогликанов проводили качественную реакцию по Хейлу [4].

Визуализацию и фотографирование препаратов проводили с использованием микроскопа LEICA DM-5000B (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Результаты и обсуждение

В коже крыс контрольной области, где внутридермально методом мезотерапии вводился физиологический раствор, на 2-е сутки наблюдали признаки выраженного отёка тканей: набухание и разрыхление коллагеновых волокон, расширение межпучковых пространств (рис. 1). На 4-е сутки отёк ткани по степени выраженности несколько снижался. В некоторых участках по ходу вкола инъекционной иглы выявлялись клеточные инфильтраты, которые отражали воспалительную реакцию ткани на травму. На 7-е сутки после введения физиологического раствора и в

дальнейшие сроки эксперимента гистологическая структура кожи крыс контрольной группы приближалась к норме, а признаков регенерации в ней не наблюдалось (рис.2).

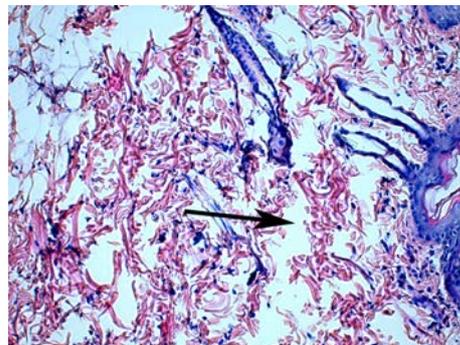


Рис. 1. Структура кожи крыс контрольной группы на 7-е сутки после введения физиологического раствора. Выраженный отек тканей (↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.×100

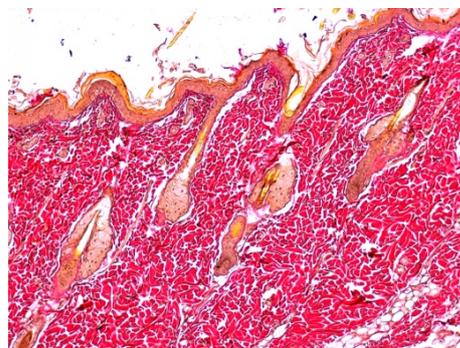


Рис. 2. Структура кожи крыс контрольной группы на 21-е сутки после введения физиологического раствора. Окраска по Ван-Гизону. Увел.×100

При гистохимической реакции по Хейлу гликозаминогликаны специфично в виде синего окрашивания определялись в основном веществе дермы кожи между коллагеновыми волокнами (рис.3).

При внутридермальном введении препарата гиалуроновой кислоты на 2-е сутки в тканях выявлялись признаки слабовыраженного отека, а между коллагеновыми волокнами дермы и в гиподерме определялась диффузная клеточная инфильтрация, большинство клеток составляли макрофаги (рис. 4).

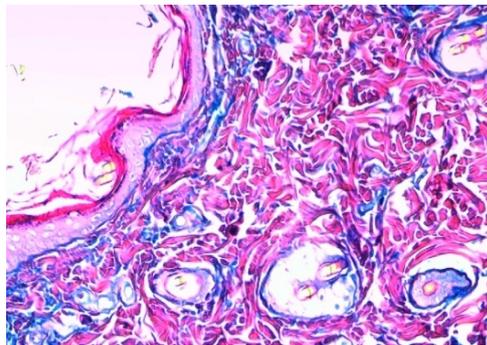


Рис. 3. Структура кожи крыс контрольной группы на 21-е сутки после введения физиологического раствора. Слабоположительная реакция (синее окрашивание) по Хейлу на гликозаминогликаны. Докраска эозином. Увел.×200

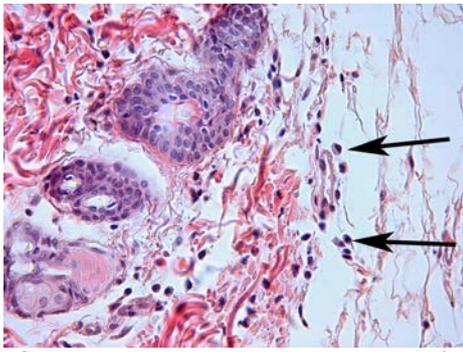
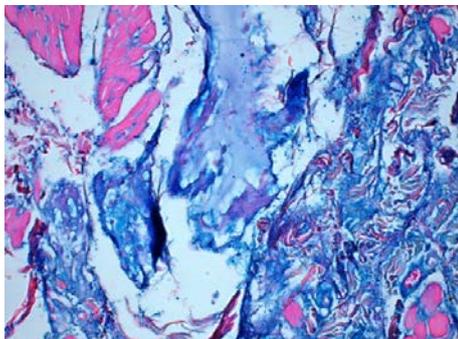
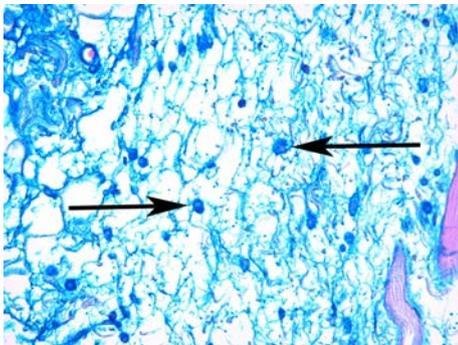


Рис. 4. Структура кожи крыс опытной группы на 2-е сутки после введения гиалуронана. Диффузная инфильтрация тканей макрофагами (↑). Окраска гематоксилином и эозином. Увел.×400

На 4-е сутки эксперимента отёк тканей определялся преимущественно в гиподерме. Гиалуронан диффузно пропитывал дермальный слой и верхние слои гиподермы, выявляясь в виде интенсивного синего окрашивания при проведении гистохимической реакции по Хейлу (рис. 5А). Макрофагальная реакция несколько усиливалась. Крупные, диффузно рассеянные в тканях фагоцитарные макрофаги определялись между волокнистыми пучками дермальной пластинки и в гиподерме. В цитоплазме фагоцитарных макрофагов после реакции по Хейлу синим цветом визуализировался гель гиалуронана (рис. 5Б).



А



Б

Рис. 5. Структура кожи крыс опытной группы на 4-е сутки после введения гиалуронана: А – гликозаминогликаны (синее окрашивание) в гиподерме. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.×200; Б – гликозаминогликаны (синее окрашивание) в цитоплазме макрофагов (↑). Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.×400

На 7-е сутки у животных опытной группы диффузное пропитывание тканей препара-

том гиалуроновой кислоты не определялось, что свидетельствует о его рассасывании. Однако количество инфильтрирующих клеток не снижалось. Местами выявлялись признаки слабовыраженного отёка. Под эпидермисом в сосочковом слое наблюдалось увеличение числа фибробластических клеток (рис.6).

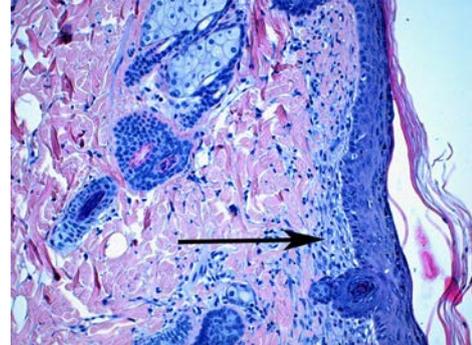


Рис. 6. Структура кожи крыс опытной группы на 7-е сутки после введения гиалуронана. Увеличение количества фибробластических клеток (↑) под слоем эпидермиса. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.×200

На 21-е сутки после введения препарата гиалуронана под эпидермисом определялись протяженные зоны регенерации с признаками формирования новых коллагеновых волокон (рис. 7).

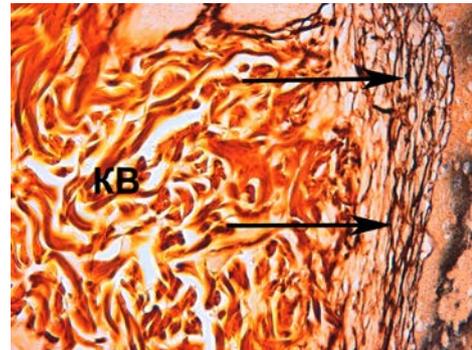


Рис. 7. Структура кожи крыс опытной группы на 21-е сутки после введения гиалуронана. Новообразованные коллагеновые волокна (↑) под эпидермисом. KB – зрелые коллагеновые волокна. Импрегнация по Футу. Увел.×400

В тканях обнаруживалось большое количество гистиоцитов и фибробластов. При проведении гистохимической реакции по Хейлу интенсивно в синий цвет прокрашивалась зона регенерации кожи непосредственно под эпидермисом, что свидетельствует о высоком содержании гликозаминогликанов (рис. 8).

На 37-е сутки эксперимента гистологическая структура кожи крыс в области введения препарата гиалуронана соответствовала норме. Под эпидермисом в сосочковом слое дермы под большим увеличением микроскопа продолжало определяться значительное количество новообразованных тонких коллагеновых волокон (рис. 9).

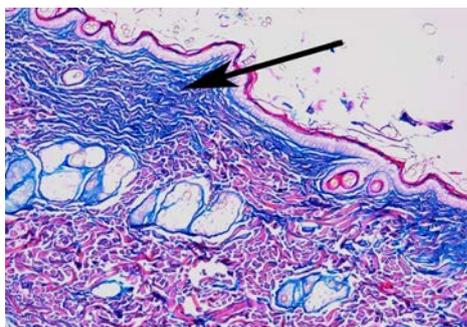


Рис. 8. Структура кожи крыс опытной группы на 21-е сутки после введения гиалуронана. Положительная реакция в зоне регенерации дермы (↑) под эпидермисом. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.×200

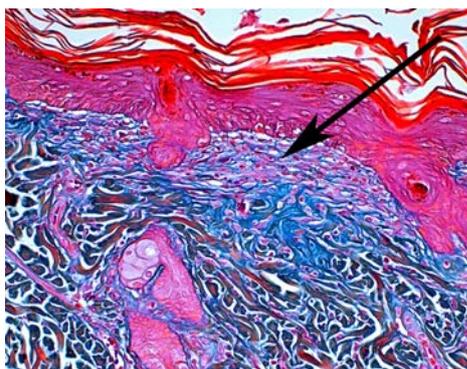


Рис. 9. Структура кожи крыс опытной группы на 37-е сутки после введения гиалуронана. Тонкие новообразованные коллагеновые волокна (↑) под эпидермисом. Окраска по Маллори. Увел.×200

В отдельных участках новообразованная ткань уплотнялась, коллагеновые волокна утолщались и между ними выявлялось множество тонкостенных кровеносных сосудов.

Результаты гистологических исследований показывают, что гиалуронан обладает биосовместимостью и после внутридермального введения не вызывает выраженных воспалительных процессов в коже. В первые дни после введения обнаруживаются явления отёка, признаки дезорганизации ткани и диффузная инфильтрация клеточными элементами, представленными в основном фагоцитами. Обычно при выраженном воспалении в тканях выявляются большие плотные скопления мак-

рофагов и лимфоцитов [6,11]. В течение 7 дней основная масса введенного гиалуронана фагоцитируется макрофагами и к 21-м суткам практически не обнаруживается в дерме кожи. Активированные макрофаги при этом выполняют защитную, трофическую и репаративную функции [7,11]. Известно, что макрофаги продуцируют цитокины (интерлейкины, хемокины и др.), факторы роста, воздействуя паракринно и аутокринно, регулируют межклеточные взаимодействия при воспалении и регенерации, а также, используя действие гидролитических ферментов на компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани, стимулируют его обновление. О слабой воспалительной реакции кожи, которая сопровождается умеренной нейтрофильной инфильтрацией, сменяющейся в динамике на лимфоцитарно-макрофагальную, при интрадермальном введении экспериментальным животным нативной гиалуроновой кислоты и её модифицированных форм сообщают и другие авторы [8].

Полученные результаты показывают, что при внутридермальном введении высокомолекулярного гиалуронана в коже экспериментальных животных на 7-21-е сутки эксперимента происходят усиление пролиферативных процессов и активация биосинтетической функции фибробластов с продукцией новообразованных коллагеновых структур и гликозаминогликанов, что характерно для молодой незрелой ткани при её регенерации [9].

Заключение

Внутридермальное введение нативного высокомолекулярного гиалуронана крысам зрелого возраста стимулирует в коже в области инъекции процессы пролиферации фибробластов и активирует их биосинтетические функции. В механизмах фармакологических эффектов экзогенно введенного гиалуронана ведущую роль играют активированные макрофаги.

Сведения об авторах статьи:

Галеева Айгуль Гафуровна – аспирант кафедры биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: galeevmt@mail.ru.

Камилов Феликс Хусанович – д.м.н., профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел. 8(347)272-66-07. E-mail: bro-raops@yandex.ru.

Капулер Ольга Марселевна – д.м.н., заместитель главного врача по лечебной работе ЗАО «Косметологическая лечебница». Адрес: 450000, г. Уфа, ул. Комсомольская, 37. Тел./факс: 8(347)278-83-87.

Шумихина Галина Васильевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России. Адрес: 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281. E-mail: shum18@rambler.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304с.
2. Галлямова, Ю.А. Структурные и функциональные параметры кожи лица до и после внутридермального введения гиалуроновой кислоты / Ю.А. Галлямова, О.А. Барнинова // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 2. – С.52-56.
3. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека / А.Г. Гунин [и др.] // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С.43-47.
4. Кононский А.И. Гистохимия. – Киев: Вища школа, 1976. – 278 с.
5. Кошевенко, Ю.Н. Кожа человека: в 2-х томах. Т.1. Структура, физиология и предназначение функциональных элементов кожного органа человека. – М.: Медицина, 2006. – 300 с.

6. Лебедева, А.И. Экспериментальное моделирование хронического воспаления и фиброза / А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина // Биомедицина. – 2013. – Т.1, № 4. – С.114-123.
7. Маянский, Д.Н. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 464 с.
8. Михайлова, Н.П. Морфологическое исследование результатов подкожного введения гелей гиалуроновой кислоты / Н.П. Михайлова, А.Б. Шехтер, Т.Г. Руденко // Мезотерапия. – 2013. – № 24. – С.6-16.
9. Идентификация гликозаминогликанов в соединительной ткани при имплантации различных биоматериалов / Л.А. Мусина [и др.] // Морфологические ведомости. – 2006. – № 1-2 (приложение 1). – С.194-196.
10. Онищенко, К. Внеклеточный матрикс / Онищенко К. // Эстетическая медицина. – 2008. – Т. 7, № 4. – С.449-456.
11. Серов, В.В. Воспаление / В.В. Серов, В.С. Пауков. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
12. Чайковская, Е.А. Гиалуроновая кислота и её фрагменты. Биологические функции в ракурсе фармакотерапии / Е.А. Чайковская, А.А. Шарова // Инъекционные методы и композиции. – 2012. – № 1. – С. 9-16.
13. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments / F.L. Ferguson [et al.] // Int.J. Pharm. – 2011. – Vol.420, № 1. – P. 84-92.
14. Hyaluronan oligosaccharides promote excision wound healing through enhanced angiogenesis / F. Gao [et al.] // Matrix. Biol. – 2010. – Vol.29, № 2. – P. 107-116.
15. Robert L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications / L. Robert // Pathol. Biol. (Paris). – 2015. – Vol.63 (1). – P.32-34.