

КЛЕТочНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТИМУЛЯЦИИ КОЖИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ НИТЕЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИДИОКСАНОНА

М. Р. ОРАЗОВ¹, О. Н. СУЛАЕВА², Е. Ю. СТАРКОВА³

¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва

²Украинский научно-практический центр эндокринной хирургии, Киев

³Клиника эстетической медицины «Бьюти Эксперт», Москва

Сведения об авторах:

Оразов Мекан Рахимбердыевич – д.мед.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии медицинского факультета, Медицинского института Российского университета дружбы народов; отрасль специализации – акушерство и гинекология; пластическая хирургия; e-mail: omekan@mail.ru

Сулаева Оксана Николаевна– д.мед.н., профессор, заведующая отделом патологии Украинского научно-практического центра эндокринной хирургии, отрасль специализации – патологическая анатомия; патологическая физиология; e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com

Старкова Елена Юрьевна – пластический хирург клиники «Клиника эстетической медицины Бьюти Эксперт», e-mail: estarkova@mail.ru

Статья посвящена изучению клеточных и молекулярных механизмов стимуляции кожи после имплантации нитей на основе полидиоксанона.

Цель исследования: анализ влияния нитей на основе полидиоксанона, на процессы биореструктуризации дермы.

Дизайн: проспективное, независимое, плацебо-контролируемое исследование.

Материалы и методы: Проведено проспективное, независимое, плацебо-контролируемое клинко-морфологическое исследование в период 2015-2017 гг, в которое на условиях добровольного информированного согласия были включены 22 пациента (возраст 35-50 лет) с возраст ассоциированными изменениями кожи. Для оценки механизмов влияния нитей на основе полидиоксанона на ремоделирование дермы проведено общеморфологическое исследование биоптатов кожи при окраске гематоксилином и эозином, а также по методу ван Гизон. Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали методом иммуногистохимии (ИГХ).

Результаты исследования показали, что в основе морфогенетической перестройке кожи после имплантации нитей на основе полидиоксанона, лежит активация механизмов репарации. Данный процесс проявляется стимуляцией экспрессии VEGF, активацией ангиогенеза и реорганизацией сосудистого русла кожи. Кроме того, отмечен стимулирующий эффект нитей на основе полидиоксанона на клетки фибробластического ряда через активацию стромальной васкулярной фракции с последующим усилением продукции компонентов матрикса дермы. Следует отметить, что помимо активации неокколагенеза, ведущей к реструктуризации дермы и эпидермиса, введение нитей на основе полидиоксанона, оказывает позитивное влияние на баланс MMP/ТИМР, ограничивая механизмы деградации и способствуя накоплению матрикса соединительной ткани дермы.

Вывод: Таким образом, вышеизложенные результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что нитевая имплантация с использованием нитей на основе полидиоксанона оказывает плейотропный стимулирующий эффект на дерму.

Ключевые слова: нитевая имплантология, регенерация кожи, биостимуляция, тредлифтинг.

Актуальность проблемы.

Увеличение средней продолжительности жизни в развитых странах определило приоритетное развитие эстетической медицины, одним из направлений которой является предотвращение и коррекция возрастных изменений области лица и шеи.

Как известно, возрастные изменения лица и шеи включают комплекс проявлений, в том числе изменение пигментации кожи, появление складок, линий и морщин, утрату объема тканей, и как следствие – птоз, предопределяющие изменение размеров, 3D-вида и пропорций лица [1]. В основе этих возрастных проявлений лежит комплекс изменений всех структур лица, включая кожу, подкожную жировую клетчатку, мышцы лица, поверхностные и глубокие фасции, а также скелет лицевой части черепа[2].

Однако, ключевое значение в формировании эстетических проблем, связанных со старением, конечно играют возрастные изменения кожи.

Гистологические изменения включают изменения во всех слоях кожи. В первую очередь это отражается на структуре

эпидермиса, толщина которого уменьшается за счет ограничения пролиферации кератиноцитов. Кроме того, заметно сглаживается эпидермо-дермальная граница вследствие уменьшения размеров сосочков и выраженности сосочкового слоя дермы в целом, что ассоциировано с дезорганизацией микроциркуляторного русла, предопределяющей ограничение трофики эпидермиса и детерминирующей его прогрессирующие изменения [3, 4]. Значимые изменения происходят и в самой дерме. Одним из ключевых событий, обуславливающих старение кожи, ее дряблость и снижение механической прочности, является снижение синтеза компонентов матрикса дермы [4, 5].

Одним из способов коррекции возрастных изменений кожи является применение нитевого лифтинга. На сегодняшний день научная литература располагает рядом убедительных доказательств эффективности и безопасности технологии нитевого лифтинга [6, 7]. Ключевым вектором развития данного метода стал переход от не рассасывающихся нитей из полипропилена к биосовместимым абсорбируемым материалам. Это привело

к разработке и внедрению нитей на основе поли-L-молочной кислоты и полидиоксанона. Полидиоксанон (ПДО) – прочный синтетический монофиламентный материал, абсорбируемый в течение 4-6 месяцев (в зависимости от толщины). Они прочные, гибкие, упругие, гидрофобные. Разрушение полидиоксанона происходит путем гидролиза с образованием CO₂. ПДО-нити биосовместимы, не обладают антигенными и пирогенными свойствами, что во многом определяет безопасность их применения (нити утверждены к использованию FDA) [8, 9].

При этом следует отметить, что большинство исследований эффективности нитевой имплантации базируются на данных оценки удовлетворенности пациентов и субъективной оценки независимыми экспертами. Показано, что при абсорбции ПДО нити вызывают биореструктуризацию кожи, обеспечивая умеренный стимулирующий эффект и способствуя улучшению визуальных характеристик кожи. Однако за рамками исследований остаются патогенетические механизмы, объясняющие реструктурирующий эффект ПДО-нитей. На сегодня данные эффекты связывают исключительно с усилением продукции коллагена. Однако количество коллагена в дерме зависит от ряда факторов, включая количество фибробластов, их секреторную активность, скорость энзиматической деградации матрикса. Последняя во многом ассоциирована с воспалением и количеством лейкоцитов, рекрутированных в дерму при повреждении введении нитей. Кроме того, как мы знаем, характеристики кожи во многом определяются условиями ее трофики – количеством и проницаемостью сосудов. В данном аспекте, механизмы биостимулирующих эффектов нитей на основе полидиоксанона являются практически не изученными.

Целью данной работы стал морфологический анализ влияния нитей на основе полидиоксанона на процессы биореструктуризации дермы.

Материал и методы исследования

Проведено проспективное, независимое, плацебо-контролируемое клиническое исследование в период 2015-2017 гг, в которое на условиях добровольного информированного согласия были включены 22 пациенток с возраст ассоциированными изменениями кожи, в возрасте от 35 до 50 лет. Панч-биопсию проводили до и через 2 недели, 1,5 и 3 месяцев после имплантации нитей на основе полидиоксанона. Основную группу составили биоптаты, полученные из переднебоковой поверхности живота после имплантации нитей на основе полидиоксанона (ПДО) Lead Fine Lift с использованием иглы проводника. Для морфологического контроля использовали анализ результатов панч-биопсии у тех же пациенток, из аналогичных зон с контралатеральной стороны, который выполняли путем введения иглы проводника на аналогичную глубину и на протяженность без нитей с использованием в качестве плацебо физиологического раствора. Общеморфологическое исследование проводили при окраске гематоксилином и эозином. Для визуализации волокон матрикса использовали гистохимическое окрашивание биоптатов по методу ван Гизон.

Для оценки характера межклеточных коопераций различные линии клеток визуализировали при помощи иммуногистохимии (ИГХ) с использованием моноклональных антител к CD68, CD31, CD105, VEG, α-SMA, MMP1, MMP9 и TIMP1. С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1. Снимки выполняли на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ морфологии кожи, полученной путем панч-биопсии у пациенток с возрастными изменениями кожи до имплантации нитей на основе ПДО, продемонстрировал наличие типичных признаков старения. Помимо сглаженности эпидермо-дермальной границы и слабого развития сосочкового слоя дермы, обращали на себя внимание неравномерное кровенаполнение сосудов поверхностного и глубокого дермального сплетения, снижение количества фибробластов. Межклеточное вещество дермы характеризовалось снижением плотности коллагеновых волокон, их дезорганизацией, явлениями эластолиза. Эти явления были сопряжены с дисбалансом экспрессии MMP1 и MMP9 с одной стороны и TIMP1 с другой, что соответствует данным литературы, констатирующим превалирование деградации матрикса над синтетическими процессами [10, 11]. В дерме определялась умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация – преимущественно в периваскулярном регионе, отражающая провоспалительные изменения в коже с возрастными изменениями.

Анализ морфологии кожи через 2 недели после введения ПДО-нитей в сравнении с группой плацебо выявил ряд интересных фактов, отражающих реакцию кожи на повреждение вследствие пенетрации тканей и на сам имплантируемый материал. При анализе и интерпретации морфологических изменений в коже мы исходили из следующих известных фактов:

- 1) кожа представлена обновляющимися тканями с резервом стволовых клеток и высокой способностью к регенерации;
- 2) повреждение кожи запускает стереотипную морфогенетическую программу, аналогичную заживлению ран;
- 3) учитывая классическую хронологию процесса заживления, через 14 суток после повреждения имеет место завершение фазы репарации с последующей активацией ремоделирования дермы. По факту, в биоптатах основной группы было выявлено увеличение плотности расположения клеток сосочкового и сетчатого слоев дермы. Этом феномен был в первую очередь связан с перестройкой сосудистого русла кожи. В сосочковом слое дермы было отмечено увеличение плотности капилляров и умеренный интерстициальный отек. Последнее сопровождалось явлениями вакуолизации кератиноцитов. Хотя параллельно этому отмечалось увеличение площади эпидермо-дермального соединения и плотности клеток в базальном

слое эпидермиса, опосредованно отражающее усиление пролиферативных процессов. Аналогичная сосудистая реакция была выявлена и в глубоких отделах дермы. При этом вдоль сосудов поверхностного сосудистого сплетения и вокруг сосудов глубокого сосудистого сплетения отмечалось увеличение плотности клеток за счет умеренной инфильтрации.

Иммуногистохимический анализ выявил, что перестройка сосудистого русла в поверхностном и глубоком слоях дермы была связана с увеличением количества CD68-позитивных клеток, то есть макрофагов, более, чем в 3 раза ($p < 0,001$). Последние у пациентов после имплантации ПДО-нитей преобладали в периваскулярном регионе (рис. 1), и в отличие такового в группе сравнения, редко встречались в свободном виде в сетчатом слое дермы.

Параллельно этому в дерме определялось увеличение количества эндотелиоцитов (CD31+ клеток; $p < 0,01$). Причем развитие данной реакции было напрямую ассоциировано с повышением количества CD105+ активного эндотелия на 137% ($p < 0,001$) и усилением экспрессии VEGF (рис. 2). Характерно, что источником ангиогенных сигналов при введении ПДО-нитей, был как эпидермис кожи, так и клетки периваскулярной зоны дермы.

Выявленная ассоциация между клеточной реакцией в периваскулярном компартменте за счет макрофагов и стимуляцией

ангиогенеза, по сути, означает 2 факта: вероятно, увеличение количества макрофагов в дерме кожи через 14 суток происходит за счет M2-фенотипа макрофагов; макрофаги принимают участие в перестройке сосудистого русла кожи при тредлифтинге ПДО-нитей, являясь одним из источников продукции VEGF, стимулирующего ангиогенез.

Параллельно активации ангиогенеза было отмечено увеличение количества клеток, ответственных за репарацию дермы – миофибробластов ($p < 0,001$), которые определялись в виде свободных клеток, а также клеток, ассоциированными с сосудами микроциркуляторного русла дермы. Предполагается, что основным источником формирования репаративного пула клеток фибробластического ряда являются собственные дермальные предшественники, а именно - перициты. Вероятно, реструктуризация дермы при имплантации нитей на основе ПДО происходит за счет мобилизации собственных резервов кожи вследствие стимуляции стромальной васкулярной фракции предшественников.

Изучение морфологии кожи в панч-биоптатах через 1,5 и 3 мес после имплантации ПДО нитей показало наличие комплекса изменений, характеризующегося реструктуризацией как эпидермиса, так и дермы кожи. В эпидермисе отмечалось увеличение толщины за счет шиповатого слоя, углубление сопочков и гребешков, определяющее увеличение эпидермо-дер-

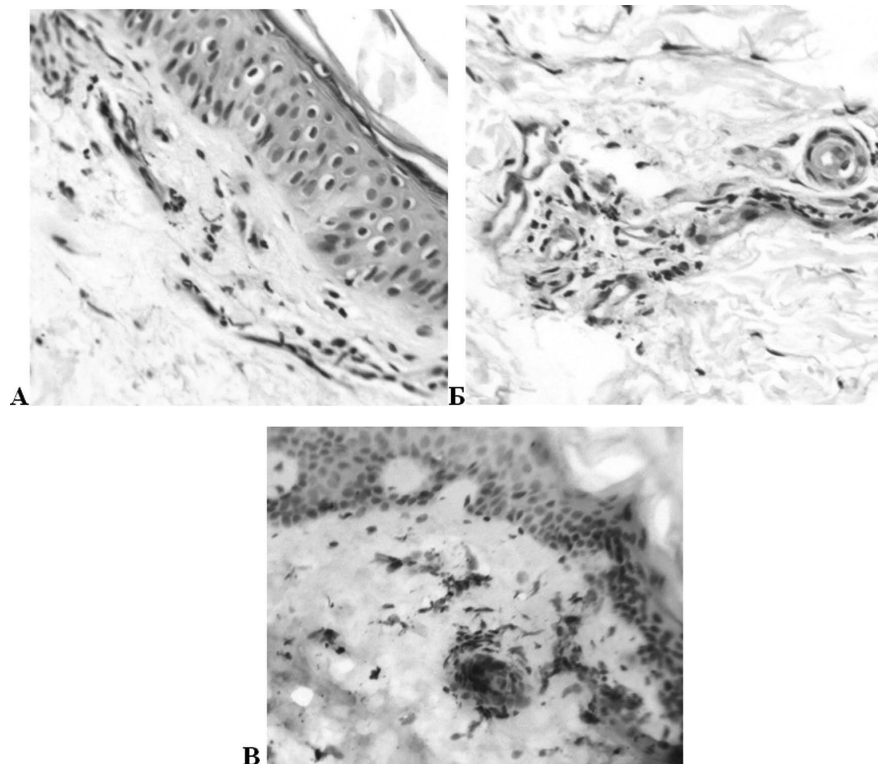


Рис. 1. Реакция кожи на введение ПДО нитей через 14 сут после вмешательства.

А и Б - Периваскулярная инфильтрация и умеренный отек в зонах поверхностного и глубокого сосудистого сплетения через 14 суток после введения нитей. Окраска гематоксилином и эозином. В - увеличение количества макрофагов. Иммуногистохимическое исследование с использованием МАТ к CD68. Ув. 200

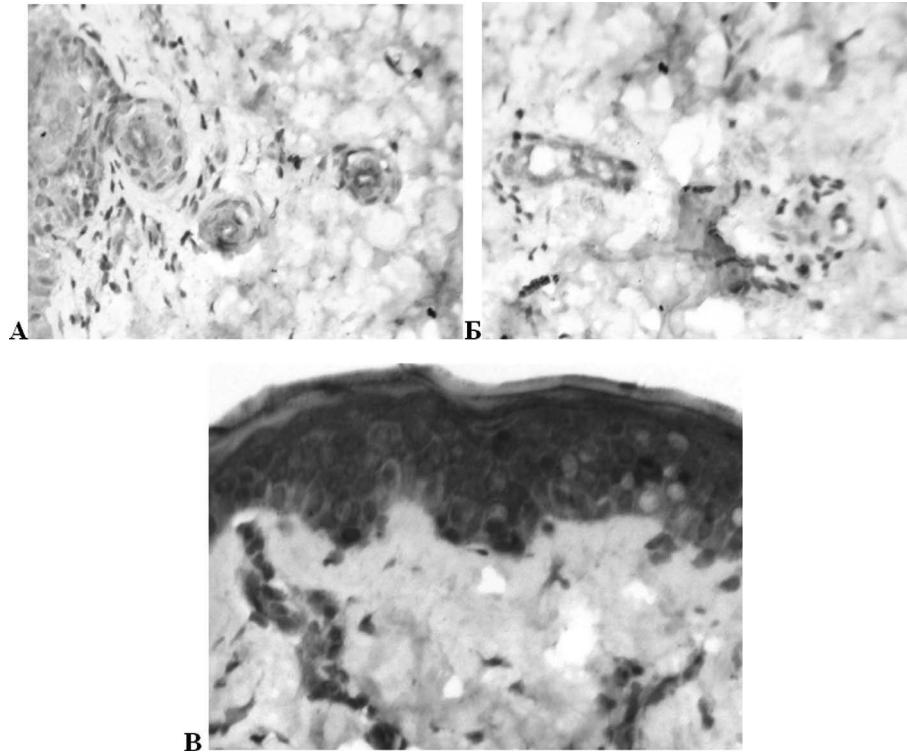


Рис. 2. Стимуляция ангиогенеза в поверхностных (А) и глубоких (Б) слоях дермы на фоне повышения экспрессии VEGF (В) через 14 суток после введения ПДО нитей у пациенток с возрастными изменениями кожи

мальной границы. Эти изменения были связаны с морфогенезом сосочкового слоя дермы, в котором отмечено увеличение плотности сосудов микроциркуляторного русла. Ситуация была противоположной в группе сравнения, где через 1,5 и 3 мес после введения плацебо активация эндотелия практически полностью нивелировалась.

Параллельно перестройке сосудистого русла дермы, отмечались признаки продолжающегося ремоделирования дермы. Об этом свидетельствовало сохранение реакции миофибробластов, хотя количество макрофагов существенно снижалось по сравнению с предыдущим сроком исследования ($P < 0,05$), хотя по-прежнему было выше исходного уровня.

Между тем, следует отметить сохранение экспрессии VEGF как в клетках эпидермиса, так и в клетках дермы. При этом распределение экспрессии данного фактора роста через 1,5 мес после имплантации отличалась от пространственного паттерна макрофагов и миофибробластов. α -SMA-иммунопозитивные клетки обнаруживались как в сосочковом, так и в сетчатом слое дермы, и по морфологическим характеристикам соответствовали фенотипу клеток фибробластического ряда. Это может свидетельствовать о роли миофибробластов в регуляции перестройки сосудистого русла кожи после нитевой имплантации.

Суммарный анализ клеточных популяций дермы через 1,5 и 3 мес после нитевой имплантации выявил позитивную тенденцию в сторону сохранения численности клеток фибробла-

стического ряда (показатель был в 2 раза выше, чем в группе сравнения) и ограничения пула макрофагов. Количество последних снизилось до $10,5 \pm 0,67$ (95% ДИ 9,22-11,78), что было практически в 2 раза ниже показателя в предыдущий срок исследования ($p < 0,01$). Такая смена клеточных популяций по сути отражает превалирование фазы репарации в дерме через 1,5 мес после введения ПДО нитей. Реорганизация сосудистого русла поверхностных и глубоких слоев дермы, а также реакция миофибробластов привели к существенной реструктуризации матрикса дермы, заметной уже через 1,5 мес после введения ПДО нитей и сохранялись и через 3 мес. Сосочковый слой дермы характеризовался увеличением плотности тонких коллагеновых волокон, организованных в упорядоченную сеть. В сетчатом слое максимальной перестройке были подвержены зоны вокруг введения нитей и в периваскулярных участках. Здесь на фоне сохранения толстых пучков коллагеновых волокон, появлялись зоны нежнофибрилярного матрикса, представленного сетью новообразованных коллагеновых волокон (рис. 4).

Такие структурные изменения матрикса были напрямую связаны с изменением характера контроля объема межклеточного вещества. так. Через 1,5 и 3 мес после введения ПДО-нитей отмечено умеренное ограничение экспрессии MMP-1 и MMP-9. При этом количество MMP-9-позитивных клеток снизилось на 34% по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p < 0,05$), хотя по-прежнему несколько превышало исходный показатель (на 10%). Такие клетки выявлялись исключительно

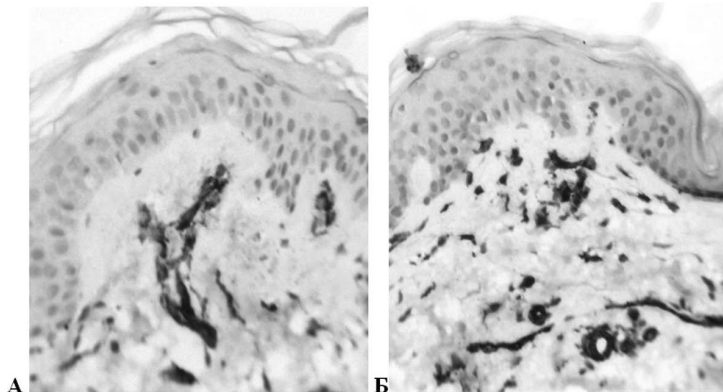


Рис. 3. Репаративные процессы в коже через 1,5 мес после введения ПДО-нитей
Примечание: Значительное количество сосудов (А - CD31) и миофибробластов (Б - α -SMA+ клетки, не связанные с сосудами), Ув. 200

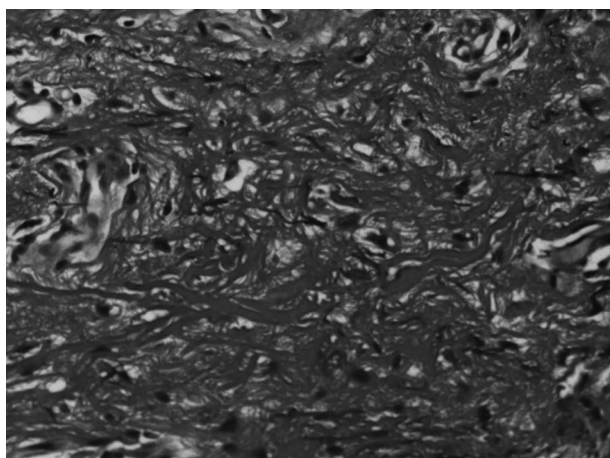


Рис. 4. Ремоделирование сетчатого слоя дермы за счет неокколлагеногенеза в периваскулярных зонах после тред-лифтинга. Окраска по методу ван Гизон. Ув. 400

в периваскулярном компартменте, что вероятно сопряжено с ролью данного фермента в ремоделировании сосудистого русла. Характерно, что при этом было обнаружено повышение экспрессии TIMP-1 ($p < 0,01$). Причем экспрессия тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 носила универсальный характер, и наблюдалась как в поверхностном, так и в глубоком слоях дермы. Важно также отметить, что в отличие от группы сравнения, экспрессия TIMP1 сохранялась не только через 1,5, но и через 3 мес после введения ПДО-нитей. Учитывая роль TIMP1 в накоплении матрикса, можно предположить, что именно изменение баланса MMP/TIMP1 при введении ПДО-нитей играет ведущую роль в реструктуризации межклеточного вещества дермы. Не менее важен и известный механизм активации экспрессии TIMP1. Как известно, активация данного ингибитора металлопротеиназ зависит от эффектов TGF β . Последний является важнейшим фиброгеном, мишенями которого являются клетки фибробластического ряда, а также противовоспалительным агентом, ограничивающим активность лейкоцитов,

макрофагов, также снижающим продукцию провоспалительных цитокинов.

Заключение

Таким образом, использование нитей на основе ПДО при возраст-ассоциированных изменениях кожи оказывает выраженный стимулирующий эффект на дерму. Следует заключить, что данный эффект сопряжен с включением реакции нескольких клеточных линий, включая макрофаги, эндотелий и миофибробласты. Ключевое значение в перестройке кожи при этом имеет активация макрофагов с параллельным повышением экспрессии VEGF, активацией ангиогенеза, а также стимуляцией клеток фибробластического ряда за счет мобилизации стромальной васкулярной фракции. Вместе с тем, следует отметить, что помимо активации неокколлагеногенеза, ведущей к реструктуризации дермы и эпидермиса, введение ПДО нитей оказывает позитивное влияние на баланс MMP/TIMP, ограничивая механизмы деградации и способствуя накоплению матрикса соединительной ткани дермы.

Список литературы

1. Агафонова С. Г. Морфофункциональные особенности кожи и подкожножировой клетчатки при гиноидной липодистрофии, разработка новых методов её коррекции: автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2012. С.3-5.
2. Адамян Р.Т., Липский К.Б., Литвицкая Т.П. Комплексный подход к омоложению мягких тканей лица // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2004. № 4. С. 12—14.
3. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Свистунов И.В. Функциональная морфология кожи. – 2014. – Д. – 128 с.
4. Завгородняя М.И., Макеева Л.В., Славчева О.С., Сулаева О.Н. Клеточные и молекулярные механизмы заживления ран. // *Морфология* – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 19-23.
5. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*. 2014;138:26-44.
6. Han S. A Prospective Evaluation of Outcomes for Midface Rejuvenation With Mesh Suspension Thread: "REBORN Lift" *Cosmet Dermatol* 15 (3), 254-259. 2016 Apr 18.
7. Dong Hye Suh. Outcomes of Polydioxanone Knotless Thread Lifting for Facial Rejuvenation. *Dermatol Surg* 41 (6), 720-725. 6 2015.
8. Savoia A. Outcomes in thread lift for facial rejuvenation: a study performed with happy lift™ revitalizing. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2014 Jun 17;4(1):103-14. Epub 2014 Jan 17.
9. Suh DH, Jang HW, Lee SJ, Lee WS, Ryu HJ. Outcomes of polydioxanone knotless thread lifting for facial rejuvenation. *Dermatol Surg*. 2015;41(6): 720-5.
10. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52(9): 24-35.
11. Waldera Lupa DM, Kalfalah F, Safferling K, Boukamp P, Poschmann G, Volpi E. Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *J Invest Dermatol*. 2015;135(8):1954-68.
12. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)." *Cell Signal*. 2012; 24(4):835-45.

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF STIMULATION OF THE SKIN AFTER IMPLANTATION OF THREADS BASED ON POLYDIOXANONE

M. P. ORAZOV¹, O. H. SULAEVA², E. Yu. STARKOVA³

¹*Federal State Autonomous educational institution Russian University of friendship of peoples, Moscow*

²*Ukrainian research and practical center of endocrine surgery, Ukraine, Kyiv*

³*Clinic of aesthetic medicine Beauty Expert, Moscow*

Information about the authors:

Orazov Mekan Rahimberdievich – MD, associate Professor in the Department of obstetrics and gynecology with course of Perinatology the medical faculty, Medical Institute of the Russian University of friendship of peoples; the industry of specialization is obstetrics and gynecology; plastic surgeon, e-mail: omekan@mail.ru

Sulaieva Oksana Nikolaevna - MD, PhD, professor, head of the Department of pathology of the Ukrainian Research and Practical center of Endocrine Surgery, the industry specialisation is pathological anatomy; pathophysiology, e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com

Starkova Elena Yurievna – plastic surgeon clinic "Clinic of aesthetic medicine beauty Expert". The industry of specialization is plastic surgeon, e-mail: estarkova@mail.ru

The article is devoted to assessment of cellular and molecular mechanisms of skin stimulation after implantation of polydioxanone threads.

The aim of the study: assessment of polydioxanone threads impact on the skin biostimulation.

Design: prospective, independent, placebo-controlled study.

Materials and methods: the authors performed a prospective, independent, placebo-controlled clinical and morphological study in the period 2015-2017, that enrolled 22 volunteers (35-50 years old) with age associated skin changes. General morphological examination of skin bioptates was performed on slides stained with hematoxylin and eosin, and by van Gieson method. To assess different cell lines after polydioxanone threads implantation the immunohistochemistry was used.

The results of study showed that polydioxanone threads stimulates several mechanisms of skin remodeling with activation of repair mechanisms. This process was manifested by angiogenesis through stimulation of VEGF expression and reorganization of the vascular bed of the skin and stimulation of the private reserve of fibroblasts lineage through the activation of the stromal vascular fraction. It should be noted that in addition to activation of neocollagenogenesis leading to the restructuring of the dermis and epidermis, polydioxanone threads implantation had a positive impact on the balance of MMP/TIMR, limiting degradation mechanisms and contributing to the accumulation matrix of the connective tissue of the dermis.

Conclusion: Thus, polydioxanone threads have pleiotropic stimulating effect on the dermis remodelling.

Key words: suture implantology, skin regeneration, biostimulation, thread liftingology.