

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНЪЕКЦИОННЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ В МОДЕЛИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У МЫШЕЙ

И.А. Демьяненко*, А.В. Шишкина, Ю.С. Хац, Н.В. Калмыкова

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
123098, Российская Федерация, Москва, ул. Гамалеи, 18

Проведено сравнительное исследование двух коммерчески доступных инъекционных имплантатов на основе микрочастиц различных биodeградируемых материалов (гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена) в модели подкожной имплантации у мышей. Показано, что в использованной экспериментальной модели оба имплантата эффективно замещали объём мягких тканей. Резорбция имплантатов сопровождалась умеренным хроническим воспалительным ответом. Имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция подвергался выраженному постинъекционному обводнению на 1-е сутки после введения, характеризовался более выраженной миграцией из точки инъекции и более ранним началом процесса замещения микрочастиц аутологичными волокнами коллагена, сопровождающего его биodeградацию. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена оказывал больший эффект лифтинга на кожу в месте введения, а также дольше сохранял эффект объёмной коррекции в течение 12 мес. эксперимента.

Ключевые слова: имплантат, дермальный филлер, аугментация, гидроксиапатит, коллаген

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Демьяненко И.А., Шишкина А.В., Хац Ю.С., Калмыкова Н.В. Сравнительное исследование инъекционных имплантатов на основе микрочастиц различных биodeградируемых материалов в модели подкожной имплантации у мышей. *Биомедицина*. 2022;18(2):63–76. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-63-76>

Поступила 10.02.2022

Принята после доработки 05.04.2022

Опубликована 10.06.2022

COMPARATIVE STUDY OF INJECTABLE IMPLANTS BASED ON MICROPARTICLES OF VARIOUS BIODEGRADABLE MATERIALS IN A MURINE MODEL OF SUBCUTANEOUS IMPLANTATION

Ilya A. Demyanenko*, Anna V. Shishkina, Yulia S. Hats, Nina V. Kalmykova

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary
Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya Str., 18

A comparative study of two commercially available injectable implants based on microparticles of various biodegradable materials (calcium hydroxyapatite and cross-linked collagen) was carried out using a murine model of subcutaneous implantation. The developed experimental model showed that both implants effectively replace the volume of soft tissues. Implant resorption was accompanied by a moderate chronic

inflammatory response. The implant based on calcium hydroxyapatite microparticles caused pronounced post-injection swelling at 1 day after administration and demonstrated a more pronounced migration from the injection point. For this implant, an earlier onset of the process of replacing microparticles with autologous collagen fibers, accompanying its biodegradation, was observed. The implant based on cross-linked collagen microparticles had a greater lifting effect at the injection site and retained a longer effect of skin augmentation lasting for 12 months.

Keywords: implant, dermal filler, augmentation, hydroxyapatite, collagen

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Demyanenko I.A., Shishkina A.V., Hats Y.S., Kalmykova N.V. Comparative Study of Injectable Implants Based on Microparticles of Various Biodegradable Materials in a Murine Model of Subcutaneous Implantation. *Journal Biomed.* 2022;18(2):63–76. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-63-76>

Submitted 10.02.2022

Revised 05.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Коррекция эстетических дефектов лица и тела, возникновение которых обусловлено возрастной или посттравматической потерей объёма мягких тканей, составляет значительную долю практики пластической хирургии и косметологии. Одним из наиболее распространённых методов восстановления утраченного объёма мягких тканей (аугментации) является проведение малоинвазивных процедур инъекционного введения т.н. «дермальных филлеров», представляющих собой вязкоупругие материалы, имплантируемые через иглу или канюлю шприца в корректируемый участок с целью придания ему дополнительного объёма [2, 19]. В настоящее время с данной целью широко применяют имплантаты на основе гелей, состоящих из стабилизированной (химически сшитой) гиалуроновой кислоты [7, 11]. Филлеры данного типа характеризуются хорошей биосовместимостью, а также отличным волюмизирующим действием. К их недостаткам относят часто возникающую гиперкоррекцию объёма тканей, вызванную избыточным набуханием геля гиалуроновой кислоты, а также низкую способность к стимуляции образования аутологичной соединительной ткани в области введения, замещающей утраченный

объём мягких тканей, в результате чего требуется проведение повторных процедур имплантации по мере биodeградации филлера.

Другим подходом к аугментации мягких тканей является введение инъекционных имплантатов, состоящих из микрочастиц биodeградируемого (гидроксипатит кальция, коллаген, поли-L-молочная кислота), реже — небiodeградируемого (полиметилметакрилат) биосовместимого материала [4, 9]. Для оптимизации реологических свойств микрочастицы в составе таких филлеров могут быть диспергированы в гелевом носителе. Непосредственно после инъекционного введения данные имплантаты механически восстанавливают объём тканей. По мере биodeградации микрочастицы стимулируют формирование вокруг них плотной волокнистой соединительной ткани, которая обеспечивает пролонгированное восполнение объёма в области имплантации филлера.

Несмотря на коммерческую доступность значительного числа различных инъекционных имплантатов для аугментации мягких тканей, к настоящему времени опубликовано небольшое количество сравнительных исследований, посвящённых изучению эффективности и биологических свойств филлеров как на лаборатор-

ных животных, так и при клинических испытаниях. В то же время практикующим специалистам для выбора оптимальной стратегии коррекции эстетических дефектов у отдельного пациента необходимо понимание различий в динамике волюмизирующего действия имплантатов, а также характера локальной реакции тканей на его введение на различных сроках биodeградации.

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование характера волюмизирующего действия инъекционных имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена, а также тканевых реакций, сопровождающих их нахождение в тканях в модели подкожной имплантации у мышей.

Материалы и методы

Объект исследования

В качестве объектов исследования использовали биodeградируемые инъекционные имплантаты на основе микрочастиц, имеющие регистрационные удостоверения изделий медицинского назначения, выданные Росздравнадзором Российской Федерации.

Объектом испытания 1 (ГАП) являлся инъекционный имплантат, состоящий из сферических микрочастиц гидроксиапатита кальция, суспендированных в гелевом носителе из стерильной воды для инъекций, глицерина и карбоксиметилцеллюлозы натрия. Производитель: «Мерц Норт Америка, Инк.» (США), регистрационное удостоверение на медицинское изделие № ФСЗ 2010/07887. Коммерческое наименование: «Имплантат инъекционный «Радисес» (Radiesse)».

Объектом испытания 2 (КОЛ) являлся инъекционный имплантат, состоящий из волокнистых микрочастиц коллагена, стабилизированного (сшитого)

водорастворимым карбодиимидом. Микрочастицы коллагена диспергированы в стерильном физ. р-ре хлорида натрия. Производитель: ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ» (Россия), регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2021/14722. Коммерческое наименование: «Имплантат инъекционный на основе коллагена COLLOST filler (КОЛЛОСТ филлер)».

Оба исследованных имплантата предупакованы в стерильные шприцы для инъекционного введения, имеют аналогичные показания к применению (проведение процедур аугментации мягких тканей) и метод имплантации (инъекционное подкожное или глубокое внутрикожное введение).

Выбор имплантатов для проведения эксперимента обусловлен различиями в составе, представляющими интерес с точки зрения сравнительного исследования, а также их популярностью среди пластических хирургов и косметологов.

Лабораторные животные

В работе использованы 60 самцов мышей линии BALB/c массой на момент начала исследования 25–31 г и возрастом 6 мес. Микробиологический статус животных — SPF. Источник получения: Научно-производственное подразделение ФИБХ РАН — питомник лабораторных животных «Пушино» (Московская обл.). Мышей содержали группами по 5 особей в клетках с площадью пола не менее 380 см² (тип Т2, «Tecniplast», Италия) на подстиле Lignocel («JRS», Германия) при контролируемых значениях температуры (20–26°C), влажности (30–70%), а также 12-часовом световом дне при искусственном освещении. Животные имели свободный неограниченный доступ к корму «Чара для содержания» («Ассортимент-агро», Россия) и стерильной деионизированной обратным осмосом воде. Все материалы, поступающие к животным, стерилизовали автоклавированием.

Обеспечение соблюдения принципов гуманного обращения с подопытными животными

Все планируемые манипуляции с подопытными животными, требования к условиям их кормления и содержания были оформлены в виде протокола (плана) исследования, который был одобрен комиссией по биоэтике. К работе с животными привлекались только обученные и квалифицированные сотрудники. Все манипуляции с животными были проведены только по процедурам, утверждённым в протоколе.

Схема эксперимента

В исследовании использовали модель подкожной инъекционной имплантации.

Перед началом эксперимента животных рандомизировали по массе тела. Мышей наркотизировали изофлураном, затем кожу и шерсть в местах введения образцов дезинфицировали антисептиком АХД 2000 («Лизоформ», Россия). Каждой мыши однократно вводили оба имплантата в две различные точки спины, расположенные симметрично от срединной линии тела, в объёме 250 мм³ на одну точку введения. Имплантацию проводили инъекционно через стерильные иглы калибра 26G. Мышей в равном количестве выводили из эксперимента путём ингаляционного воздействия углекислого газа через 1 сут., 1, 2, 3, 6 и 12 мес. после введения образцов (n=10 на временную точку). После проведения эвтаназии проводили забор тканей кожного лоскута в областях введения имплантатов для последующего макроскопического и гистологического исследования.

Макроскопическое исследование областей имплантации

Иссечённый кожный лоскут с имплантированным образцом подвергали цифровой макrofотосъёмке. На полученных фотоснимках качественно оценивали состояние окружающих тканей, форму и локализацию имплантата.

Для количественной оценки степени миграции материала имплантатов из точки инъекции, используя программное обеспечение ImageJ («NIH», США), на фотоснимках количественно определяли площадь распределения инъецированного материала в тканях кожного лоскута.

Для количественной характеристики волюмизирующего действия имплантатов:

1) определяли выраженность лифтинга кожи в областях инъекционного введения, измеряя максимальную толщину кожного лоскута штангенциркулем;

2) методом гидростатического взвешивания [10] определяли увеличение объёма мягких тканей кожного лоскута, вызванное введением имплантата. Для этого иссечённый кожный лоскут с имплантатом закрепляли на штативе при помощи серфина и проволоки, после чего погружали в расположенный на весах сосуд с физ. р-ром (0,9% NaCl) так, чтобы образец не касался стенок сосуда. Массу вытесненной образцом жидкости определяли по показаниям весов (AJH-220, «Vibra», Япония) с точностью $\pm 0,001$ мл. Объём вытесненной жидкости, соответствующий объёму образца, рассчитывали исходя из известной плотности физ. р-ра (1,0046 кг/м³). Из полученного значения вычитали значение объёма тканей кожи, прилегающих к имплантату, рассчитанное по калибровочным кривым зависимости объёма кожи от её площади. Калибровочные кривые были построены по данным, полученным в предварительном эксперименте, в котором использовали участки кожи, полученные от интактных животных той же линии, пола и возраста, иссечённые из областей спины, соответствующих зонам имплантации исследуемых образцов (толщина кожи интактных мышей и животных с имплантированным материалом не различалась). Площадь кожного лоскута определяли фотопланиметрически при помощи программы ImageJ («NIH»,

США) на цифровых фотоснимках, полученных после иссечения образцов.

Гистологическое исследование областей имплантации

Для проведения гистологического исследования иссечённые кожные лоскуты с имплантированным материалом фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. В связи с невозможностью получения гистологических срезов материала, содержащего твёрдые микрочастицы гидроксиапатита кальция, образцы предварительно подвергали декальцинации в 14%-ном р-ре ЭДТА в течение 30 сут. при комнатной температуре. Затем образцы обезжизняли и заливали в парафин по стандартной методике, после чего на ротационном микротоме RM2245 («Leica», Германия) готовили тонкие (3 мкм) гистологические срезы, которые монтировали на предметные стекла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также трёхцветной окраской по Массону. Полученные препараты подвергали микроскопическому анализу с помощью микроскопа AxioScore A1 («Zeiss», Германия). Микрофотографии получали при помощи цветной цифровой камеры высокого разрешения MRc.5 («Zeiss», Германия).

Морфометрический анализ препаратов

Для количественной характеристики тканевых реакций, сопровождающих нахождение и биodeградацию имплантатов в тканях, проводили морфометрическое исследование полученных препаратов. Измерения проводили на микрофотографиях с помощью программ для анализа изображений AxioVision 3.0 («Zeiss», Германия) и ImageJ («NIH», США). В рамках морфометрического анализа определяли:

- *Объёмную плотность аутологичных волокон коллагена в материале имплантата.* Трихромное окрашивание по методу Массона позволяет селективно выявлять на гистологических срезах аутологичные коллагеновые волокна за счёт их избира-

тельного окрашивания в синий цвет [7]. Основываясь на этом, в данном эксперименте на микрофотографиях гистологических препаратов, окрашенных по Массону, полученных на малом увеличении микроскопа (объектив 4×), подсчитывали долю площади имплантата, окрашенную в синий цвет. Для этого при помощи встроенных средств анализа программного обеспечения ImageJ выделяли область интереса, содержащую имплантированный материал, затем отфильтровывали все пиксели изображения, окрашенные в синий цвет, и определяли их суммарную площадь. Полученное значение относили к общей площади имплантата на срезе и выражали в процентах. Анализу подвергали всю суммарную площадь имплантата на трёх гистологических срезах одного образца.

- *Васкуляризацию материала имплантата, инфильтрацию нейтрофилами, гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГКИТ).* Анализ проводили полуколичественно (в баллах) на микрофотографиях гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных с использованием объектива 40×. Исследовали по 10 произвольно выбранных полей зрения на трёх гистологических срезах одного образца. Полученные данные усредняли. Для оценки васкуляризации использовали следующую балльную систему оценки: 1 балл — 1–3 профиля сосудов в поле зрения, 2 балла — 4–7 профилей сосудов в поле зрения, 3 балла — более 7 профилей сосудов в поле зрения, 4 балла — обширная полоса профилей сосудов, занимающая практически всё поле зрения. Для оценки инфильтрации клеточными формами (нейтрофилы, ГКИТ) применяли следующую балльную систему оценки: 1 балл — 1–5 клеток в поле зрения, 2 балла — 5–10 клеток в поле зрения, 3 балла — более 10 клеток в поле зрения, 4 балла — клетки образуют обильный инфильтрат, занимают практически всё поле зрения.

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения Excel («Microsoft», США) и Prism («Graph Pad», США). Для первичного анализа рассчитывали показатели описательной статистики: среднее, стандартное отклонение. Проверку нормальности распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро – Вилкса, гомоскедастичности — с использованием теста ранговой корреляции Спирмена. После этого данные подвергали двухфакторному дисперсионному анализу с последующими попарными сравнениями по Сидaku. Различия между экспериментальными группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Макроскопическое исследование

На первом этапе исследования качественно анализировали состояние имплантированного материала в тканях мышей. На 1-е сут. после введения имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) распределялся в тканях неравномерно, преимущественно тонким слоем (рис. 1). Наблюдалось сильное обводнение введённого материала, из-за чего при последующих манипуляциях, связанных с измерением объёма и помещением в гистологический фиксатор, он полностью терял структурную целостность и растекался. В связи с этим явилось невозможным проведение измерения его толщины, объёма, а также гистологического исследования на данном сроке. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена (КОЛ) выявлялся под кожей в виде единого скопления материала округлой или продолговатой формы (рис. 1). На более поздних временных точках эксперимента (1, 3, 6, 12 мес.) материал обоих имплантатов был покрыт тонкой соединительнотканной капсулой, в которой выявлялись сосуды, врастающие вглубь материала.

ГАП выявлялся под кожей преимущественно в виде вытянутых, неравномерно утолщённых «узловатых» тяжей (рис. 1), тогда как КОЛ сохранял округлую или слегка продолговатую форму на всех сроках эксперимента (рис. 1). Фотопланиметрическое исследование показало, что площадь распределения материала ГАП под кожей была в среднем более чем в 2 раза достоверно выше на 1-е сут. по сравнению с КОЛ, что отражает его более выраженную миграцию из точки инъекции. Данный характер различий между имплантатами сохранялся на последующих сроках 1–6 мес. В то же время на 12 мес. наблюдали противоположные статистически значимые отличия между образцами (табл. 1). Полученные данные явились отражением отличий в динамике изменения значений показателя между группами. Так, площадь материала КОЛ на протяжении всего эксперимента значительно не менялась, тогда как средняя площадь ГАП к 12 мес. уменьшилась примерно в 4 раза относительно исходной (табл. 1).

Далее оценивали способность имплантатов поддерживать толщину кожи (эффект лифтинга) в месте введения, а также их общее волюмизирующее действие. Максимальная толщина кожного лоскута в местах введения КОЛ была достоверно выше, нежели в группе ГАП на всех исследованных сроках (табл. 1). При этом в обеих группах происходило снижение среднего значения данного показателя в течение всего эксперимента (табл. 1). Измерение объёма методом гидростатического взвешивания показало, что средний волюмизирующий эффект обоих имплантатов через 1 мес. после введения более чем в 1,5 раза превосходил исходный объём инъектированных материалов (250 мм³). На последующих сроках значения объёма постепенно уменьшались (табл. 1). Волюмизирующее действие образцов КОЛ на 6 и 12 мес. статистически значимо превышало таковое у образцов ГАП (табл. 1), что явилось от-

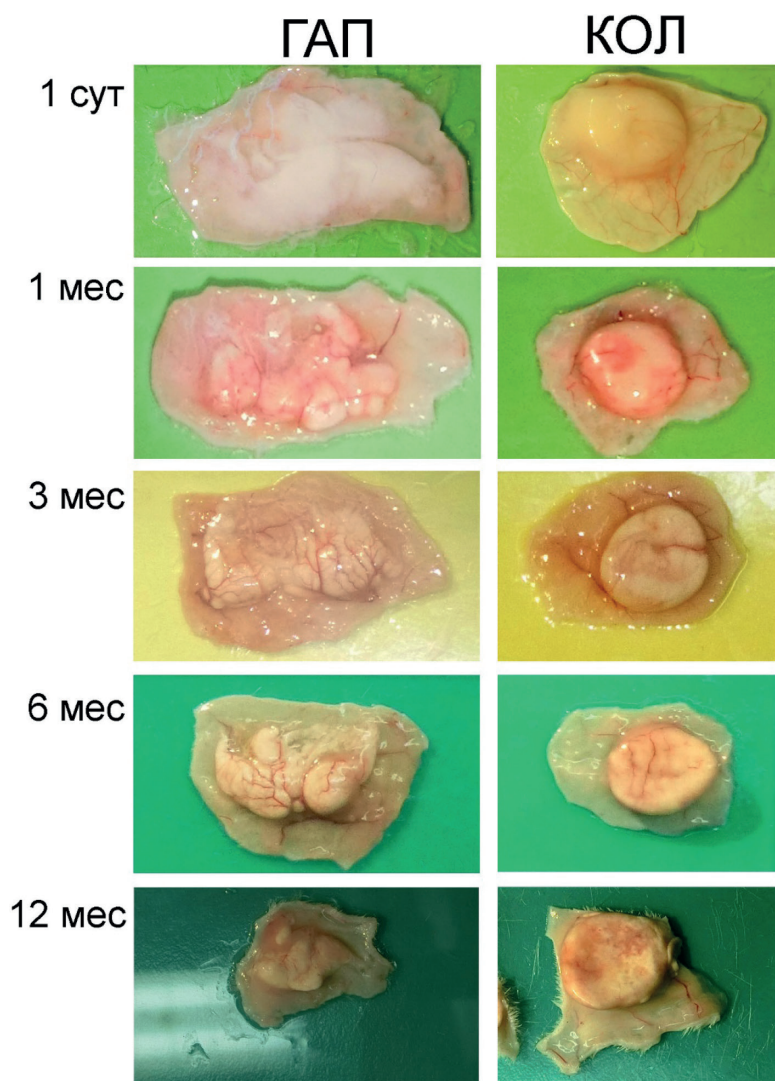


Рис. 1. Репрезентативные макрофотоснимки кожных лоскутов, иссечённых из области инъекционного введения имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ).
Fig. 1. Representative macrophotographs of skin flaps excised from the injection site of implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL).

ражением процесса менее выраженного сокращения измеряемого объёма в данной экспериментальной группе.

Гистологическое исследование

Для оценки тканевых реакций, сопровождающих имплантацию образцов, на следующем этапе работы проводили гистоло-

гическое исследование. Данные для группы ГАП на 1-е сут. эксперимента получены не были вследствие «растекания» значительно обводнённого материала имплантата. Образцы КОЛ на 1-е сут. после введения на гистологических срезах были представлены волокнистым базофильным материа-

Таблица 1. Количественные показатели, полученные при макроскопическом исследовании областей введения имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ). Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение

Table 1. Quantitative results of a macroscopic study of the injection sites of implants based on calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL) microparticles. Data are presented as the arithmetic mean \pm standard deviation

Показатель	Имплантат	1 сут.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Площадь имплантата под кожей, мкм ²	ГАП	245 \pm 69	212 \pm 88	187 \pm 85	193 \pm 71	62 \pm 43
	КОЛ	92 \pm 27*	114 \pm 30*	100 \pm 62*	114 \pm 47*	117 \pm 34*
Толщина кожного лоскута в области имплантации, мм	ГАП	2,62 \pm 1,13	2,03 \pm 0,59	1,75 \pm 0,67	1,86 \pm 0,86	1,61 \pm 0,95
	КОЛ	4,26 \pm 0,79*	3,81 \pm 0,74*	3,65 \pm 1,57*	3,46 \pm 1,47*	2,82 \pm 0,98*
Увеличение объема тканей, вызванное имплантатом, мм ³	ГАП	НД	392 \pm 145	218 \pm 85	133 \pm 40	82 \pm 109
	КОЛ	226 \pm 60	464 \pm 60	375 \pm 155	266 \pm 186*	213 \pm 88*

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ГАП на том же экспериментальном сроке; НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Note: * — $p < 0.05$ compared with HAP experimental group at the same time point; ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

лом, располагающимся под тканями кожного лоскута (рис. 2).

Волокна материала были разнонаправленны, окрашивались по Массону в красный цвет. На периферии введённого материала присутствовали клетки воспалительного инфильтрата, преимущественно нейтрофилы и небольшое число макрофагов. На сроке 1 мес. материал ГАП на срезах выявлялся в виде преимущественно округлых неокрашенных «пустот», соответствующих локализации сферических микрочастиц гидроксиапатита кальция до проведения декальцинации (рис. 2). Материал по периферии был покрыт коллагеновыми волокнами новообразованной соединительной ткани, проникающими в отдельных участках вглубь материала и оплетающими микрочастицы. Между микрочастицами обнаруживались многочисленные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), а также макрофаги. В толще материала между микрочастицами располагались кровеносные сосуды разного размера с эритроцитами в просвете. В свою очередь, образцы КОЛ на сроке 1 мес. также были покрыты новообразованной соединительной тканью, которая проникала в периферические отделы материала и оплетала его волокна. По периферии образцов на срезах

выявлялись макрофаги, единичные микрососуды и фибробласты. Вокруг отдельных волокон материала присутствовали ГКИТ. На последующих экспериментальных сроках (3, 6 и 12 мес.) как образцы ГАП, так и образцы КОЛ были окружены слоем плотно уложенных коллагеновых волокон с небольшим количеством фибробластов. Новообразованная соединительная ткань проникала между микрочастицами практически во всю толщу образцов обеих экспериментальных групп. На микрочастицах выявлялись многочисленные ГКИТ, а между ними — кровеносные сосуды различного размера. По мере увеличения срока после имплантации образцов на срезах визуально увеличивалась площадь, занимаемая новообразованными коллагеновыми волокнами, сопровождаемая сокращением количества непосредственно микрочастиц материала, что является следствием биodeградации имплантата с замещением микрочастиц новообразованной соединительной тканью (рис. 2).

Морфометрический анализ полученных гистологических препаратов показал, что начиная с 1 мес. происходило увеличение объёмной плотности новообразованных волокон коллагена в материале обоих имплантатов, достигающей величины

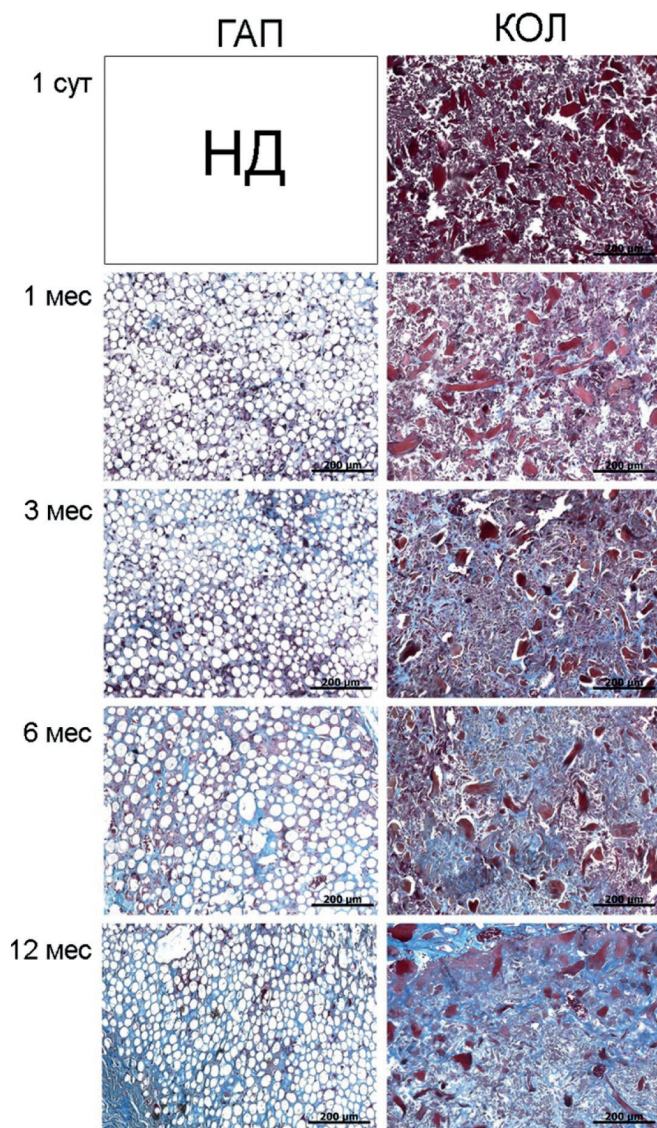


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии центральной области материала имплантатов на основе микро-частиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ) на поперечных гистологических срезах иссечённых кожных лоскутов. Трихромное окрашивание по Массону. Новообразованные аутологичные волокна коллагена окрашены в голубой цвет. Округлые неокрашенные области на микрофотографиях образцов ГАП соответствуют местам нахождения сферических микрочастиц до проведения декальцинации. Микро-частицы КОЛ окрашены в красный цвет. НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Fig. 2. Representative microphotographs of the central region of the implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and stabilized collagen (COL) on transverse histological sections of excised skin grafts. Masson's trichrome stain. The newly formed autologous collagen fibers are colored blue. Rounded uncolored areas in microphotographs of HAP samples correspond to the locations of spherical microparticles prior to decalcification. COL microparticles are colored red. ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

Таблица 2. Количественные и полуколичественные показатели, полученные при морфометрическом исследовании гистологических срезов имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ). Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение

Table 2. Quantitative and semi-quantitative results of a morphometric study of histological sections of implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL). Data are presented as the arithmetic mean \pm standard deviation

Показатель	Имплантат	1 сут.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Объёмная плотность аутологичных волокон коллагена в имплантате, %	ГАП	НД	32,7 \pm 14,6	45,5 \pm 15,5	46,1 \pm 14,8	60,9 \pm 17,1
	КОЛ	0,0 \pm 0,0	11,2 \pm 5,8*	48,8 \pm 23,2	54,1 \pm 17,5	60,9 \pm 9,5
Васкуляризация имплантатов, средний балл	ГАП	НД	2,10 \pm 0,88	2,17 \pm 0,98	2,88 \pm 0,35	2,75 \pm 0,71
	КОЛ	0,00 \pm 0,00	0,89 \pm 0,33*	1,67 \pm 1,32	2,22 \pm 1,20	2,43 \pm 0,53
Инфильтрация имплантата нейтрофилами, средний балл	ГАП	НД	0,70 \pm 0,33	0,50 \pm 0,50	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	КОЛ	1,50 \pm 0,53	1,00 \pm 0,50	0,67 \pm 0,37	0,44 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00
Инфильтрация имплантата ГКИТ, средний балл	ГАП	НД	2,20 \pm 0,92	2,33 \pm 0,82	2,75 \pm 0,46	2,75 \pm 0,71
	КОЛ	0,00 \pm 0,00	0,44 \pm 0,24*	1,33 \pm 1,22	2,00 \pm 1,32	1,57 \pm 1,27

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ГАП на том же экспериментальном сроке; НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Note: * — $p < 0.05$ compared with HAP experimental group at the same time point; ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

в чуть более 60% к окончанию эксперимента (табл. 2). На сроке 1 мес. было выявлено более чем трёхкратное статистически значимое увеличение данного показателя в группе ГАП по сравнению с КОЛ. Однако к 3 мес. эксперимента различия между имплантатами по степени замещения имплантированного материала аутологичным коллагеном на срезах нивелировались (табл. 2). Полуколичественная морфометрическая оценка васкуляризации имплантатов показала, что динамика изменения количества сосудов в образцах обеих экспериментальных групп напоминала динамику изменения объёмной плотности коллагена (табл. 2). Так, сосуды выявлялись в имплантированном материале, начиная с 1 мес., достигая наибольшего количества (2–3 балла) в интервале 6–12 мес. Средняя оценка васкуляризации ГАП через 1 мес. после введения была более чем в два раза выше по сравнению с КОЛ, различия были статистически значимы. На сроках 3–12 мес. отличия между группами выявлены не были.

Оценка клеточных реакций не выявила различий между имплантатами по величине нейтрофильной инфильтрации, характери-

зующей выраженность острого воспаления в области имплантации [5, 14]. Ожидается, она была наибольшей в острый период на 1-е сут. после введения (данные получены только для КОЛ), достигая средней величины в 1,5 балла по полуколичественной шкале оценки (табл. 2). На последующих сроках нейтрофильная инфильтрация была незначительна и не достигала средней величины в 1 балл, на сроке 12 мес. — полностью отсутствовала (табл. 2). Далее подсчитывали степень инфильтрации имплантатов ГКИТ, как показатель хронического воспалительного ответа [17, 21]. Полуколичественный анализ показал, что в материале ГАП средняя величина данного показателя варьировала между 2 и 3 баллами на сроках 1–12 мес. (табл. 2). В свою очередь, на сроке 1 мес. средняя оценка инфильтрации ГКИТ материала КОЛ была значительно (более чем в 4 раза) ниже, чем у ГАП. На последующих экспериментальных точках (3–12 мес.) средние значения данного показателя в группе КОЛ были также ниже, однако различия не достигали уровня статистической значимости (табл. 2).

Обсуждение результатов

Инъекционное введение имплантатов, структурной основой которых являются микрочастицы биосовместимых материалов, считается одним из достаточно распространённых способов проведения аугментации мягких тканей. В литературе применительно к подобным медицинским изделиям часто используют термин «стимуляторы коллагена» [1, 4, 8], подчёркивая тем самым их способность восстанавливать объём за счёт стимуляции формирования волокнистой соединительной ткани, основным компонентом которой являются пучки волокон коллагена. В настоящей работе исследовали популярные коммерчески доступные инъекционные имплантаты на основе микрочастиц биodeградируемых материалов различной химической природы — гидроксиапатита кальция (ГАП) и коллагена, стабилизированного водорастворимым карбодиимидом (КОЛ). Гистологическое исследование подтвердило, что материал обоих имплантатов стимулировал образование аутологичной соединительной ткани, которая замещала его по мере биodeградации. При этом данный процесс на экспериментальном сроке 1 мес. происходил более интенсивно в имплантате ГАП. Вероятно, полученные данные отражают то, что инициация новообразования соединительной ткани в области введения ГАП происходила несколько раньше, нежели в КОЛ, что может быть обусловлено различиями в физико-химических свойствах материалов и/или структурой микрочастиц. Образование коллагена, как правило, сопровождается процессом формирования сосудов, обеспечивающих питание и газообмен формирующейся соединительной ткани [22]. Динамика васкуляризации имплантатов, выявленная в эксперименте, хорошо совпадала с динамикой замещения их материала аутологичным коллагеном.

Нахождение образцов в тканях не сопровождалось признаками острого воспаления,

за исключением срока 1 сут., что, очевидно, неспецифически обусловлено частичной травматизацией тканей, вызванной непосредственно процедурой имплантации. В то же время на последующих сроках имплантаты обоих типов характеризовались наличием умеренного хронического воспалительного ответа с присутствием ГКИТ, который в норме, как правило, сопровождает процесс биodeградации резорбируемых материалов [6, 21]. Ранее данное явление уже было описано для различных имплантатов на основе микрочастиц [3, 13, 16, 18]. Что интересно, характер различий между имплантатами на сроке 1 мес. по показателям объёмной плотности коллагена и васкуляризации совпадал с таковым по показателю инфильтрации ГКИТ (табл. 2). На основании этого мы предполагаем, что процесс стимуляции формирования аутологичной соединительной ткани под воздействием имплантатов на основе микрочастиц может быть обусловлен факторами, выделяемыми клетками воспалительного инфильтрата, осуществляющими резорбцию материала. Для проверки этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Для количественной характеристики волонизирующего действия имплантатов измеряли их способность увеличивать толщину кожного лоскута, а также объём мягких тканей в месте инъекций. Было показано, что введение КОЛ эффективнее увеличивает толщину кожного лоскута по сравнению с ГАП на всех исследованных сроках. Сопоставление полученного результата со значениями показателя площади распределения материала под кожей (табл. 1), а также с качественными данными макроскопического исследования (рис. 1) позволяет заключить, что наблюдаемый эффект в основном обусловлен различной выраженностью постинъекционной миграции материала из точки введения. Так, материал КОЛ распределялся на значительно

меньшей площади, сохранял единую форму на протяжении всего периода испытаний, что позволило ему осуществлять более выраженный лифтинг кожи за счёт волномизации в районе точки введения. В то же время ГАП, мигрируя из зоны введения, располагался в тканях более тонким слоем, что физически ограничивало его способность к увеличению измеряемой максимальной толщины кожи.

Ранее измерение толщины кожного лоскута после инъекционного введения было предложено как один из показателей оценки эффективности действия дермальных филлеров *in vivo* на лабораторных животных [12]. Однако данный метод не оценивает непосредственно эффект объёмной коррекции, вызванный введением имплантата. В связи с этим для прямой оценки волномизирующего действия мы применили метод гидростатического взвешивания, который успешно применяется в другой экспериментальной модели [10]. Было выявлено, что наибольшее увеличение объёма тканей, вызванное введением имплантатов, наблюдалось на 1 мес. эксперимента. При этом значения данного показателя более чем в 1,5 раза превышали исходный объём имплантированных материалов (250 мм³). Наблюдаемый эффект может быть объяснён тем, что в значение измеряемой величины, помимо непосредственно объёма имплантированного материала, может вносить свой вклад и объём новообразованной соединительной ткани, формирующейся по его периферии на данном экспериментальном сроке. Также возможно, что механическое воздействие на окружающие ткани введённых инъекционных имплантатов стимулирует увеличение количества тканевой жидкости, оказывая таким образом влияние на измеряемый объём. На дальнейших точках (3–12 мес.) происходило снижение показателя объёмной коррекции в областях введения обоих имплантатов, что, вероятно, обусловлено биодеградацией введённых

материалов. Объём материала ГАП снижался быстрее в динамике эксперимента, нежели материал КОЛ. Выявленные различия могут быть обусловлены различной скоростью резорбции микрочастиц вследствие отличий в их химическом составе и структуре.

К сожалению, при анализе образцов, полученных на 1-е сут., после введения ГАП мы не смогли провести волнометрические измерения и гистологическое исследование, что было обусловлено сильным обводнением введённого материала. Данный имплантат, помимо микрочастиц гидроксиапатита кальция, содержит гелевый носитель на основе глицерина и карбоксиметилцеллюлозы. Мы предполагаем, что эффект избыточного набухания введённого материала, наблюдаемый в эксперименте, обусловлен притягиванием большого количества молекул воды из тканевой жидкости карбоксиметилцеллюлозой, являющейся полиэлектролитом. По мере рассасывания гелевого носителя отёчность введённых образцов пропадала на сроке 1 мес. В то же время обводнение материала ГАП на ранних сроках после введения, по-видимому, приводило к его менее равномерному распределению под кожей, нежели КОЛ, не содержащего в составе гелевый носитель. Что интересно, избыточный постинъекционный отёк области введения ранее был описан как одно из возможных нежелательных явлений при клиническом применении ГАП [15]. В связи с вышеизложенным, возможность набухания имплантата на ранних сроках после введения должна приниматься во внимание практикующими специалистами при проведении процедур с его использованием.

Настоящее исследование проведено на модели подкожной имплантации у мышей. Известно, что кожа лабораторных грызунов характеризуется высокой подвижностью относительно подлежащих тканей [23]. Кроме того, инъецированный под кожу

спины грызунов материал не подвергается значительным компрессионным деформациям. В связи с этим мы полагаем, что данные, полученные в проведенном эксперименте, будут наиболее релевантны и будут наилучшим образом отражать свойства имплантатов при их введении в области кожных покровов человека, обладающие сходными характеристиками, такие как зоны нижней трети лица (носогубные складки, «линии марионетки», «линии улыбки») и тыльная поверхность кистей рук [20].

Выводы

Результаты проведенного сравнительного исследования подтвердили способность имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена эффективно замещать объём мягких тканей как за счёт прямого аугментирующего действия введённого материала, так и за счёт стимуляции новообразова-

ния аутологичной соединительной ткани. Резорбция имплантатов сопровождалась умеренным хроническим воспалительным ответом, что характерно для биodeградирующих материалов. Имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция подвергался выраженному постинъекционному обводнению на 1-е сут. после введения, что, вероятно, связано с наличием в его составе гелевого носителя, и распределялся подкожно на большей площади относительно точки введения. Также материал данного имплантата характеризовался более ранним началом процесса замещения микрочастиц аутологичными волокнами коллагена, сопровождающего его биodeградацию. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена оказывал больший эффект лифтинга кожи в месте введения, а также дольше сохранял эффект объёмной коррекции в течение 12 мес. эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Abuaf O.K., Yildiz H., Baloglu H., Bilgili M.E., Simsek H.A., Dogan B. Histologic evidence of new collagen formulation using platelet rich plasma in skin rejuvenation: A prospective controlled clinical study. *Ann. Dermatol.* 2016;28(6):718–724. DOI: 10.5021/ad.2016.28.6.718.
2. Ballin A.C., Brandt F.S., Cazzaniga A. Dermal fillers: An update. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2015;16(4):271–283. DOI: 10.1007/s40257-015-0135-7.
3. Berlin A.L., Hussain M., Goldberg D.J. Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: A histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol. Surg.* 2008;34 Suppl 1:S64–S67. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x.
4. Breithaupt A., Fitzgerald R. Collagen stimulators: Poly-L-lactic acid and calcium hydroxyl apatite. *Facial. Plast. Surg. Clin. North. Am.* 2015;23(4):459–469. DOI: 10.1016/j.fsc.2015.07.007.
5. Broggini N., McManus L.M., Hermann J.S., Medina R., Schenk R.K., Buser D., Cochran D.L. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J. Dent. Res.* 2006;85(5):473–478. DOI: 10.1177/154405910608500515.
6. Chen H., Agrawal D.K., Thankam F.G. Biomaterials-driven sterile inflammation. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2022;28(1):22–34. DOI: 10.1089/ten.TEB.2020.0253.
7. Cheng L., Sun X., Tang M., Jin R., Cui W., Zhang Y. An update review on recent skin fillers. *Plast. Aesthet. Res.* 2016;3:92–99. DOI: 10.20517/2347-9264.2015.124.
8. de Melo F., Nicolau P., Piovano L., Lin S., Baptista-Fernandes T., King M., Camporese A., Hong K., Khattar M.M., Christen M. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face and hands with the new generation polycaprolactone-based collagen stimulator (Ellansé®). *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2017;10:431–440. DOI: 10.2147/CCID.S145195.
9. Eppley B., Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: Clinical overview. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;118(4):E98–E106. DOI: 10.1097/01.prs.0000232436.91409.30.
10. Fereidoni M., Ahmadiani A., Semnanian S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2000;43(1):11–14. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00089-7.
11. Gold M.H. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clin. Interv. Aging.* 2007;2(3):369–376. DOI: 10.2147/cia.s1244.
12. Hee C.K., Shumate G.T., Narurkar V., Bernardin A., Messina D.J. Rheological properties and *in vivo* performance characteristics of soft tissue fillers. *Dermatol.*

- Surg.* 2015;41 Suppl 1:S373–S381. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000536.
13. Holzapfel A.M., Mangat D.S., Barron D.S. Soft-tissue augmentation with calcium hydroxylapatite: Histological analysis. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2008;10(5):335–338. DOI: 10.1001/archfaci.10.5.335.
 14. Jhunjunwala S., Aresta-DaSilva S., Tang K., Alvarez D., Webber M.J., Tang B.C., Lavin D.M., Veiseth O., Doloff J.C., Bose S., Vegas A., Ma M., Sahay G., Chiu A., Bader A., Langan E., Siebert S., Li J., Greiner D.L., Newburger P.E., von Andrian U.H., Langer R., Anderson D.G. Neutrophil responses to sterile implant materials. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137550. DOI: 10.1371/journal.pone.0137550.
 15. Kadouch J.A. Calcium hydroxylapatite: A review on safety and complications. *J. Cosmet. Dermatol.* 2017;16(2):152–161. DOI: 10.1111/jocd.12326.
 16. Lemperele G., Morhenn V., Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast. Surg.* 2003;27(5):354–366. DOI: 10.1007/s00266-003-3022-1.
 17. Lucke S., Walschus U., Hoene A., Schnabelrauch M., Nebe J.B., Finke B., Schlosser M. The in vivo inflammatory and foreign body giant cell response against different poly(L-lactide-co-D/L-lactide) implants is primarily determined by material morphology rather than surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.* 2018;106(10):2726–2734. DOI: 10.1002/jbm.a.36500.
 18. Marmur E.S., Phelps R., Goldberg D.J. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2004;6(4):223–226. DOI: 10.1080/147641704100003048.
 19. Narins R.S., Bowman P.H. Injectable skin fillers. *Clin. Plast. Surg.* 2005;32(2):151–162. DOI: 10.1016/j.cps.2004.12.002.
 20. Pierre S., Liew S., Bernardin A. Basics of dermal filler rheology. *Dermatol. Surg.* 2015;41 Suppl 1:S120–S126. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000334.
 21. Sheikh Z., Brooks P.J., Barzilay O., Fine N., Glogauer M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials (Basel).* 2015;8(9):5671–5701. DOI: 10.3390/ma8095269.
 22. Tonnesen M.G., Feng X., Clark R.A.F. Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2000;5(1):40–46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.
 23. Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Longaker M.T., Gurtner G.C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:969618. DOI: 10.1155/2011/969618.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Илья Александрович Демьяненко*, к.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;
e-mail: ilya871@rambler.ru

Анна Владимировна Шишкина, к.х.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Юлия Самуиловна Хац, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Нина Владимировна Калмыкова, к.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Ilya A. Demyanenko, Cand. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ilya871@rambler.ru

Anna V. Shishkina, Cand. Sci. (Chem.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

Yulia S. Hats, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

Nina V. Kalmykova, Cand. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author