

Жирнова Н.С., Любовцева Л.А, Гурьянова Е.А., Мулендеев С.В.  
Чувашский государственный университет, клиника «Санитас» г. Чебоксары

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГИСТАМИНА В СТРУКТУРАХ КОЖИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

В статье показан анализ поведения препарата стабилизированной гиалуроновой кислоты при внутридермальном введении в ткани лица и его влияние на механизмы регуляции и биоаминсо-державшие структуры кожи в течение разных промежутков времени. Полученные данные необходимо учитывать при отборе пациентов на контурную пластику, при профилактике осложнений в постинъекционном периоде.

### Введение

В последние годы получены убедительные данные о том, что кожа является активным нейроэндокринным органом. Клетки эпидермиса и дермы при определенных условиях способны вырабатывать гормоны и нейропептиды, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринной системах [5]. Очевидно, что старение кожи (хронологическое и индуцированное ультрафиолетовым облучением) сопровождается значимыми изменениями локальных нейроэндокринных взаимодействий [6]. Однако, их изучению уделяется пока недостаточное внимание. Между тем, интерес к этим вопросам возрастает в связи с тем, что люди стараются приостановить процесс старения и выглядеть моложе своего биологического возраста. Соответственно, бурными темпами начинается развиваться косметология, предлагая все новые и новые методики для коррекции возрастных атрофических изменений мягких тканей лица и тела. Одним из таких методов является контурная пластика с применением инъекционных материалов на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты. Такого рода материалы должны быть безопасными, эффективными и отвечать ряду требований: биосовместимость, отсутствие антигенных свойств, отсутствие пирогенности, токсичности, не провоцировать воспалительные процессы, обладать достаточной длительностью действия, но быть биорезорбируемыми [2, 7]. Идеальными для этого являются гели на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты неживотного происхождения - «Рестилайн», «Суджидерм», «Джувидерм» и другие (в дальнейшем – ГСГК).

По данным литературы известно, что местную регуляторную функцию органов выполняют биогенные амины [3, 1, 4], являясь или менеджерами, или осуществляя дистантную передачу информации на клеточные рецепторы через передатчики цАМФ или цГАМФ. Спектр биологических эффектов биогенных аминов весьма обширен. Они регулируют большое число процессов, происходящих в организме, поэтому нарушение синтеза и секреции биогенных аминов может сказаться на состоянии кожи лица и обменных процессах в ней, вызывая досрочное старение кожи.

Ранее было установлено, что морфологическим субстратом, создающим биоаминное обеспечение структур кожи, кроме нервных волокон, являются тучные и гранулярные люминесцирующие клетки (ГЛК). Спектрофлуориметрически в обоих видах клеток обнаружены гистамин, катехоламины и серотонин [3, 1]. При люминесцентно-гистохимическом исследовании, а также при проведении микроспектрального анализа было выяснено, что ГЛК образуют скопления, окруженные соединительнотканной долькой, с различным числом гранул. Они располагаются как в толще дермы, около волосяных фолликулов, так и на границе сетчатого слоя дермы и гиподермы. Аргентафинность ГЛК, наличие в них биоаминов, положительная реакция на моноаминоксидазу позволили исследователям причислить их к клеткам APUD-системы [3,5]. Люминесцирующие тучные клетки по расположению и строению можно разделить на 3 группы: 1-я – мелкие клетки овальной или вытянутой формы, расположенные под эпителием в сосочковом слое дермы и имеющие слитное свечение.

Они имеют небольшую концентрацию гистамина; 2-я – клетки с крупными гранулами разных размеров, желтого цвета, расположенные в прослойках соединительной ткани, около волосяных фолликулов, около сосудов; 3-я – крупные клетки с высоким содержанием гистамина, с крупными, хорошо заметными гранулами, расположенные на границе сетчатого слоя дермы и гиподермы.

Анализ мировой научной литературы по данной проблеме показал отсутствие комплексных исследований механизмов регуляции синтеза и инактивации биогенных аминов при введении ГСГК [7]. Неизвестно, позволяет ли улучшение упруго-эластических свойств кожи за счет увеличения внутридермальной концентрации гиалуроновой кислоты затормозить процессы старения, изменяя обменные процессы в основных структурах кожи. Практически не изучено, повышается ли аллергический фон окружающих тканей в зонах введения ГСГК, возникает ли кратковременное асептическое воспаление.

В связи с этим, исследование морфофункциональной организации кожи и биогенных аминов в структурах кожи в области век и околоушной области после введения ГСГК, а также сравнение этих параметров с нормой и показателями в интактных зонах являются актуальными и позволяют осуществить оценку влияния ГСГК.

Целью настоящего исследования явилось изучение поведения препарата стабилизированной гиалуроновой кислоты при внутридермальном введении в ткани лица, его влияние на механизмы регуляции и биоаминсодержащие структуры кожи век на разных промежутках времени.

#### **Материал и методы исследования**

Материалом для исследования явилась кожа женщин в возрасте 35-50 лет, взятая для изучения во время пластических операций на верхних веках (блефаропластики) после получения предварительного согласия пациентов.

Препарат на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты «Рестилайн» (Q-MED, Швеция, рег. удост. Минздрава ФС № 2005\1308 от 13.09.2005г.) вводился после

местной накожной анестезии однократно в среднюю часть дермы иглой №30 длиной 14 мм из расчета 0,1 мл/см линейной техникой: на обратном ходе иглы гель заполнял туннель. Введение производилось в область правого верхнего века, левое верхнее веко оставалось интактным.

Забор образцов кожи для исследования производился во время операций под местной анестезией 2% раствором лидокаина и внутривенным введением фентанила. Размер исследуемых фрагментов- 0,2x0,5 см из области верхнего века. Материал брался у пациенток одновременно с левой интактной стороны, и с правой, экспериментальной, захватывая ткань с ранее введенным в нее ГСГК «Рестилайн».

Первую группу – контрольную – составлял материал из левого интактного века, в которое ГСГК не вводился.

Вторая группа – материал из правого века через 6 часов, на 1, 2, 3, 10 сутки после введения ГСГК.

Из ткани готовили криостатные и парафиновые срезы, которые окрашивали гистохимическими методами.

**1. Люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Евена, Роста [8]** для выявления тканевого гистамина. Метод определения гистамина в тканях основан на реакции паров ортофталевого альдегида с гистамином, в ходе которой образуется флюоресцирующее соединение производных имидазолилэтиламина. При исследовании срезов под люминесцентным микроскопом образовавшийся комплексный продукт дает при большом содержании гистамина желтое свечение, при среднем – зеленое, малом – голубое.

**2. Количественно концентрации Г** в структурах кожи оценивались с помощью **цитоспектрофлуориметрии** осуществляемой на люминесцентном микроскопе с применением микрофлуориметрической насадки ФМЭЛ-1А. Наблюдение велось на вольтметре при напряжении 800 вольт с зондом 0,5. Для определения Г использовали интерференционный фильтр 7 с длиной волны 515 нм, для КА – использовали фильтр «б» с длиной волны 480 нм, для С – «8» с длиной волны 525 нм. Замер интенсивности свечения про-

изводился в единицах флуоресценции (условные единицы (у. е.) по шкале регистрирующего прибора-усилителя).

3. Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по программе «Статистика» на персональном компьютере с привлечением пакета программ Microsoft office (Word и Excel). В работе приводятся следующие показатели:  $M$  – средняя арифметическая величина;  $m$  – ошибка средней арифметической величины. Статистическую достоверность определяли непараметрическими методами.

4. Гепарин и гликозаминогликаны определяли путем окраски препарата **полихромным толудиновым синим по А. Унна** [7]. Структуры, имеющие синее окрашивание, содержат малосульфатированный гепарин, эта окраска называется ортохромной. Среднесульфатированный гепарин окрашивается в фиолетовый цвет, и эта окраска называется бета-метахроматичной.

4 – 5 сульфатированный гепарин встречается в тучных клетках человека, имеет сиреневую окраску, называемую гамма-метахроматичной.

5. Представление о количественном распределении, тучных и гранулярных клеток дает **метод подсчета их в 5 полях зрения** микроскопа при увеличении об. 90, ок. 10. Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента ( $t$ ).

### **Результаты исследования**

Люминесцентно-гистохимическое исследование показало, что основными гистаминсодержащими структурами кожи человека в области наружной трети верхнего века являются эпителий, волосяные фолликулы, нервные волокна, эластические волокна сетчатого слоя, а также гранулярные люминесцирующие клетки (макрофаги и АПУД-клетки) и тучные клетки.

При исследовании эпителия кожи человека в области верхнего века можно заметить, что здесь, в отличие от кожи в щечной области, базальная мембрана сглажена, число эпителиальных слоев уменьшено. Наиболее интенсивно темно-оранжевым цветом люминесцирует эпителий, где гистамин в

наибольшем количестве содержится в базальном слое. Под базальной мембраной в небольшом числе содержатся слабо светящиеся мелкие, ветвистые, имеющие вытянутую форму тучные клетки, расположенные в виде цепочки под эпителием, параллельно базальной мембране. Содержание гистамина в сосочковом и сетчатом слоях дермы незначительно, распределение его неравномерное. Остальные структуры сосочкового слоя люминесцируют очень слабо, кроме тучных клеток.

В сетчатом слое люминесцируют ядра фибробластов, эластические волокна. Тучные клетки расположены группами до 5-7 клеток в поле зрения при малом увеличении. Вместе с тучными клетками находятся ГЛК в виде скоплений.

Через 6 часов после введения ГСГК содержание гистамина в эпителии кожи повысилось не только в области введения, но и в интактном левом веке. В области введения ГСГК в эпителии его содержание увеличилось в 2, 2 раза по сравнению с нормой. Под базальной мембраной также обнаруживаются тучные клетки, но число их при определении данным методом уменьшилось. Появляются большие пространства, люминесцирующие едва заметным темно-оранжевым цветом, располагающиеся между сосочковым и сетчатым слоем. Предположительно, так люминесцирует ГСГК.

Число цельных тучных клеток в сетчатом слое дермы уменьшилось, произошла их дегрануляция. Очень ярко люминесцируют ГЛК, образующие скопления, разделенные прослойками соединительной ткани. Число клеток в одном скоплении насчитывает до 40 и более. Содержание гистамина в волосяных луковицах повысилось более чем в 3 раза (табл. 1) и не только в области введения ГСГК, но и на интактной стороне. Здесь же выявлялись волосяные луковицы, которые не содержат гистамин. В тучных клетках гистамин определяется около потовых и сальных желез и в гиподерме.

Через 1 сутки после введения ГСГК содержание гистамина в эпителии кожи в области правого, экспериментального, века снизилось (табл. 1). Базальная мембрана

имеет прерывистый ход. Толщина эпителия увеличилась в 1,5 раза. Между сетчатым и сосочковым слоями определяются нелюминесцирующие пространства, заполненные однородной массой. Число ТК под базальной мембраной не увеличилось по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В коже интактного левого века численность этих клеток полностью восстановилась. В сетчатом слое увеличилось число люминесцирующих ядер фибробластов, эластические волокна увеличились в размерах и количественно, содержание гистамина выросло в них в 1,7 раз.

Через 3 суток содержание гистамина в эпителии сравнимо с параметрами, наблюдаемыми через 1 сутки после введения ГСГК. Увеличилось число тучных клеток под эпителием с одновременной их дегрануляцией и увеличением гистамина в этой зоне. В сетчатом и сосочковом перестали выявляться ГЛК. В области введения ГСГК содержание гистамина еще больше увеличилось в ядрах тучных клеток. Число тучных клеток в сетчатом слое резко снизилось, определяются оголившиеся ядра этих клеток с единичны-

ми люминесцирующими гранулами в виде разреженного «облачка». Потовые железы увеличиваются в размерах, около них повышается число ТК.

Содержание гистамина в коже век через 10 суток после введения ГСГК практически восстановилось. Толщина эпителия в месте введения препарата увеличилась в 2 раза. Наблюдается врастание соединительной ткани в эпителий. Увеличилась масса эластических волокон и число фибробластов. Эластические волокна могут располагаться почти под углом в 90 градусов и иметь штопорообразный ход. Цельные тучные клетки не определяются, а определяются их ядра, которые имеют повышенное свечение. ГЛК не выявляются, за исключением потовых желез и периферической части волосяных фолликулов, где клетки единичны.

Таким образом, кожа век имеет сглаженную базальную мембрану, по которой проходят к эпителиальным клеткам адренергические нервные волокна; в два раза тоньше слой эпителия, чем на других участках лица [4]; небольшое число ГЛК, имеющих вдвое меньшие размеры; большое число тучных

Таблица 2. Количественные показатели содержания гистамина в структурах кожи век в у.е. после введения ГСГК, (M±m)

Структуры кожи		Норма	6 часов	1 сутки	3 суток	10 суток
Эпителий	Без ГСГК	10,2±1,2	21,4±1,9	5,6±0,3	8,5±0,8	7,1±0,6
	С ГСГК		24,2±1,8	6,6±0,6	6,1±0,6	9,5±0,8
Сосочковый слой	Без ГСГК	4,1±0,3	3,8±0,4	4,2±0,4	4,8±0,4	5,5±0,6
	С ГСГК		4,1±0,4	6,4±0,6	5,5±0,4	7,1±0,6
Сетчатый слой	Без ГСГК	8,4±0,7	14,6±1,5	10,4±1,2	7,2±0,8	8,3±0,8
	С ГСГК		12,2±1,1	13,5±1,4	14,4±1,5	15,5±1,3
Гиподерма	Без ГСГК	4,1±0,4	4,2±0,3	5,4±0,4	6,2±0,6	5,7±0,4
	С ГСГК		3,1±0,2	6,3±0,5	8,1±0,8	4,9±0,4
Волосяной фолликул	Без ГСГК	12,1±1,3	16,3±2,0	10,6±1,1	10,3±1,3	10,3±0,8
	С ГСГК		25,5±3,0	14,7±1,5	9,7±1,1	8,2±1,0
Тучные клетки под эпителием	Без ГСГК	14,6±1,3	7,2±0,8	14,5±1,5	14,4±1,3	12,4±1,1
	С ГСГК		9,1±0,8	9,3±0,9	20,9±1,9	18,6±1,6
Тучные клетки в сетчатом слое	Без ГСГК	14,4±1,2	12,5±1,3	14,7±1,3	16,3±1,7	
	С ГСГК		14,3±1,5	20,3±2,1	33,4±3,4	40,8±4,5
ГЛК в сетчатом слое	Без ГСГК	12,3±1,1				
	С ГСГК					
Тучные клетки около сальных желез	Без ГСГК	16,4±1,3				
	С ГСГК		23,1±2,4	16,5±1,7	10,7±0,8	10,2±0,8

клеток, находящихся около всех структур кожи; значительно меньшее число волосяных луковиц, часть из которых не содержит гистамин, хорошо выраженный слой гиподермы, часть клеток которого также не содержит гистамин.

Результаты исследования срезов кожи при окраске толуидиновым синим по Унна свидетельствуют о том, что после введения ГСГК в популяции тучных клеток отмечаются существенные изменения. Через 6 часов после введения значительно увеличивается абсолютное число гамма-метахроматичных ТК, лежащих около сосудов и свободно в сетчатом слое – соответственно в 2 и в 1,54 раза, и уменьшается число ТК, расположенных около волосяных фолликулов – в 1,5 раз по сравнению с интактным веком. Через 1 сут. число гамма-метахроматичных ТК резко возрастает в околососудистой и околوفолликулярной областях – в 3,8 и 2,25 раза соответственно по сравнению с интактным веком, усиливается дегрануляция ТК, появляются белоксодержащие ТК. Через 2 суток происходит резкое увеличение числа ТК с образованием мелких ортохромных клеток и дегрануляция хорошо сульфатированных клеток путем тотального распада. Кроме того, около сосудов определяются клетки воспалительного характера – моноциты и макрофаги. Через 3 суток происходит снижение числа ТК около всех структурных образований за исключением гиподермы. Наблюдается увеличение числа окрашенных волосяных фолликулов. Через

10 суток изменения в тучноклеточной популяции нивелируются.

Таким образом, введение ГСГК вызывает качественные и количественные изменения в коже век. Под его влиянием происходят существенные изменения люминесцентно-гистохимических характеристик и гистаминного обеспечения структур кожи в ранние сроки после введения, которые не исчезают в определенных структурах кожи и через 10 суток (рис. 1).

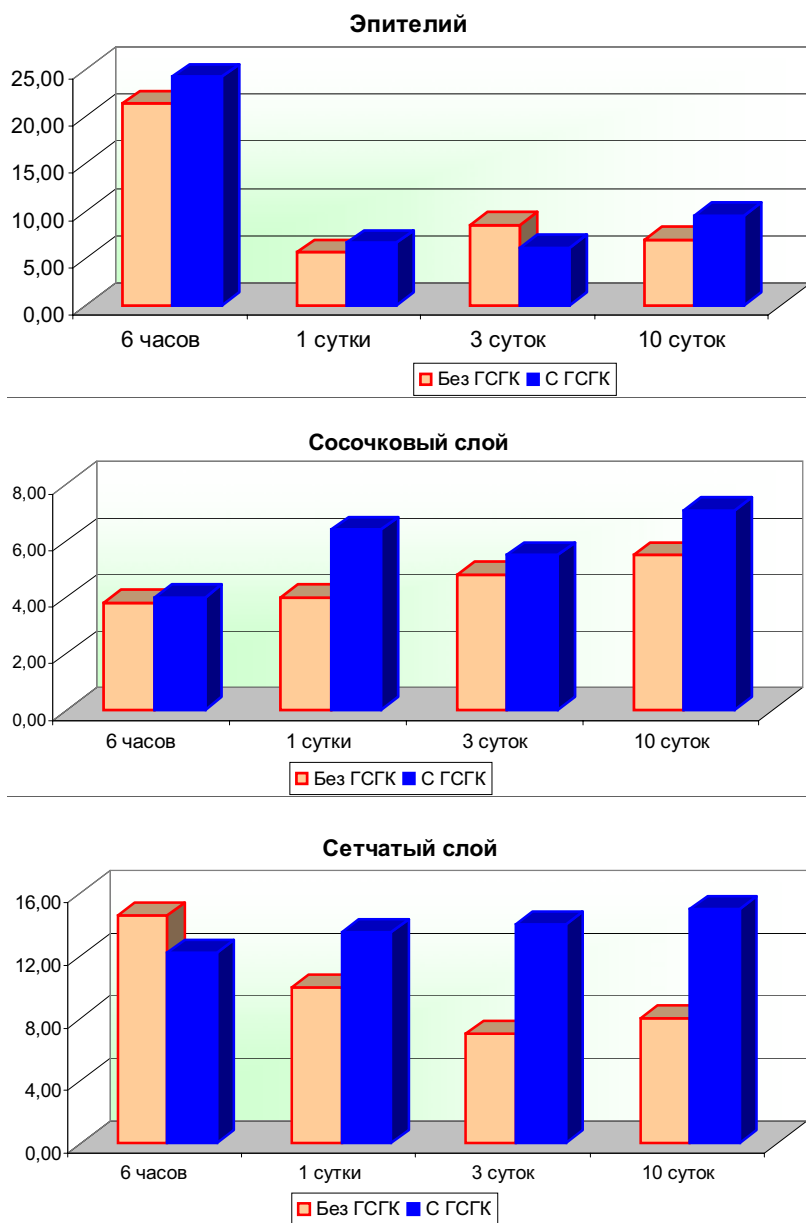


Рисунок 1. Динамика показателей содержания гистамина в структурах кожи век в у.е. после введения ГСГК

**Выводы**

1. Кожа века отличается содержанием небольшого количества ГЛК, размерами вдвое меньше стандартных, большим количеством тучных клеток, находящихся около всех структур кожи, значительно меньшим числом волосяных луковиц, часть из которых не содержат амины, хорошо выраженным слоем гиподермы, часть клеток которого также не содержит амины.

2. Введение геля стабилизированной гиалуроновой кислоты «Рестилайн» вызывает увеличение содержания гистамина во всех структурах кожи в течение первых двух-трех

суток после инъекции. Наблюдается накопление гистамина в неактивных волосяных фолликулах, изменение формы потовых желез к десятым суткам после введения препарата.

3. Увеличивается популяция тучных клеток в подэпителиальном слое, около волосяных фолликулов, около сальных и потовых желез, в гиподерме. Происходит ускоренное созревание гепарина и досрочная дегрануляция тучных клеток, что можно считать нормальной защитной реакцией организма на введение гелей гиалуроновой кислоты.

---

**Список использованной литературы:**

1. Гурьянова Е.А. Любовцева Л.А., Дубинин С.В., Захаров Д.А. Люминесцентно-гистохимический метод исследования точек акупунктуры у человека. // Нижегородский медицинский журнал. Нижний Новгород, 2002 г.- С. 44-47.
2. Костина Г., Радаева И. Использование гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии // Косметика и медицина, 1999.- №2.- С. 53-57.
3. Любовцева Л.А. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминсодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов. – Чебоксары, 1993. – 96 с.
4. Ноздрин В.И., Барашкова С. А., Семченко В.В. Кожа и ее производные. Учебное пособие // Омск: Омская гос.мед.академия. 2005.
5. Смирнова И.О., Кветной И.М., Князькин И.В., Данилов С.И. Нейромолекулярная иннервация кожи и молекулярные маркеры ее старения // СПб: ДЕАН, 2005.- 210 с.
6. Ярилин А.А. Изменения в иммунной системе при старении // Эстетическая медицина, 2003.- №2.- С. 203-214
7. Bosniak S., Cantisano-Zilkha M. Restylane and Perlane: A six year clinical experience // Operative Techniques in Oculoplastic, Orbital, and Reconstructive Surgery. - 2003. - 4(2). – P. 89-93
8. Cross S.A., Even S.W., Rost F.W. A study of methods available for cytochemical localization of histamine by fluorescence induced with o-phthalaldehyde or acetaldehyde // J. Histochem. – 1971. – v. 3. – N 6. – P. 471–476.

**Статья рекомендована к публикации 04.05.07**