

# Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи

## 1 ВВЕДЕНИЕ

Применение аутологичных дермальных фибробластов – единственный в современной дерматологии и терапевтической косметологии метод регенеративной медицины, который не только эффективно корректирует визуальные дефекты кожи, но и благодаря естественному биологическому механизму реорганизует ее микроструктуру. Данный метод совместим со всеми методами эстетической медицины и может служить базовым средством для их более эффективного применения.

В настоящее время технология находится на пороге широкого внедрения в клиническую практику эстетической медицины, что стало возможным благодаря накопленному клиническому опыту и знаниям о биологии дермальных фибробластов, непосредственно обеспечивающих гомеостаз кожи.

## 2 ФИБРОБЛАСТЫ И ИХ РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КЛЕТКИ

**Фибробласты** – клетки мезенхимного происхождения – основной клеточный компонент дермы

**А. Зорина**, кандидат медицинских наук, главный врач,

**В. Зорин**, кандидат биологических наук, руководитель отдела,

**В. Черкасов**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией клеточных технологий,

Институт стволовых клеток человека, отдел регенеративной медицины, Москва, Россия

(рис.1). *In vivo* они характеризуются пластичностью и разнообразием форм – могут иметь овальную, полигональную, веретеновидную и другие формы в зависимости от их функционального состояния [1]. *In vitro* дермальные фибробласты характеризуются способностью прикрепляться к поверхности культуральной посуды, легко культивироваться и длительно сохранять в культуре пролиферативные потенции [2, 3].

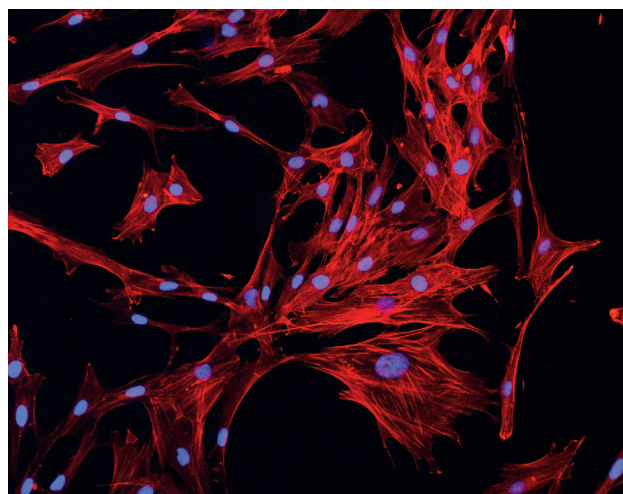


Рис. 1. Культура дермальных фибробластов человека. Флуоресцентная микроскопия, увеличение 200× (конъюгат TRITC-фаллоидин, специфично связывающий F-формы цитоскелета фибробластов; окраска ядер клеток – DAPI)

Основная функция фибробластов – продукция, организация и обновление межклеточного матрикса дермы (табл. 1) [4]. Они контролируют состав и структуру матрикса путем регулируемого по принципу обратной связи синтеза коллагена, эластина и основного вещества, а также путем участия в разрушении этих компонентов [5]. Биосинтетические потенции

## Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи

▶ фибробластов чрезвычайно велики: одна зрелая клетка в активном состоянии способна произвести до 3,5 млн макромолекул коллагена в сутки [1].

В культуре дермальные фибробласты также обладают способностью активно синтезировать компоненты межклеточного матрикса, включая коллаген и эластин [6–8]. Так, данные проточной цитометрии показали, что культивируемые дермальные фибробласты способны продуцировать большое количество коллагена I типа (интенсивность флюоресценции составила 8,49 усл.ед. против 0,09 усл.ед. в контроле) [6]. После трансплантации в кожу биосинтетические потенции культивированных клеток сохраняются и они активно продуцируют коллаген и другие компоненты межклеточного матрикса [9–12].

Благодаря способности активно и в течение длительного времени синтезировать компоненты межклеточного матрикса культивированные дермальные фибробласты могут эффективно корректировать дефекты кожи: уменьшать количество и глубину морщин, увеличивать толщину, упругость и эластичность кожи, улучшать ее текстуру [6, 7, 13–28]. При этом показано, что аутологичные дермальные фибробласты, полученные даже от пациентов 60-летнего возраста, не теряют своей способности делиться и продуцировать коллаген [6]. Более того, немецкие ученые обнаружили, что пролиферативный потенциал дермальных фибробластов взрослого человека в течение всей его жизни остается на довольно высоком уровне – первичные культуры, полученные даже от очень пожилых людей (95 лет), содержат до 14% митотически активных фибробластов [29]. Это означает, что в дерме человека содержится разнородная популяция фибробластов, в которой наряду со зрелыми синтетически активными клетками находятся митотически активные клетки, так называемые клетки предшественники фибробластов, благодаря которым из небольшого биоптата кожи (размером 2–5 мм) на ранних пассажах можно получить значительное количество функционально активных фибробластов [11, 12]. По всей види-

**ТАБЛ. 1. КОМПОНЕНТЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ ДЕРМАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ ЧЕЛОВЕКА (ZOUVOULIS С. ET AL., 2008 [4], ДОПОЛНЕНО АВТОРАМИ)**

| <i>Класс веществ</i>                 | <i>Основные представители</i>   |
|--------------------------------------|---|
| <i>Коллаген</i>                      | <i>Тип I, III, IV, V, VI, VII</i>   |
| <i>Гликопротеины</i>                 | <i>Фибронектин, фибулины, тромбоспондины, ламинины, тенасцины</i>                           |
| <i>Гликозаминогликаны</i>            | <i>Гиалуроновая кислота, гепарансульфат, хондроитинсульфат</i>                              |
| <i>Протеогликаны</i>                 | <i>Версикан, декорин, бигликан</i>  |
| <i>Белки, модифицирующие матрикс</i> | <i>Матриксные металлопротеиназы, тканевой ингибитор металлопротеиназ</i>                    |
| <i>Цитокины</i>                      | <i>IL-1, 6, 10, TNF<math>\beta</math></i>   |
| <i>Факторы роста</i>                 | <i>TGF<math>\alpha</math>, CSF-1, GM-CSF, PDGF, bFGF, IGF-1,2, NGF, KGF, HGF, SCF, VEGF</i> |
| <i>Хемокины</i>                      | <i>IL-8, MCP-1, GRO-1, MIP-1,2, RANTES, ENA-78</i>  |
| <i>Медиаторы воспаления</i>          | <i>Фосфолипаза-A2, PGE2, простаглицлин, HETE, PAF, NO</i>                                   |

мости, клетки предшественники фибробластов, находящиеся в дерме в состоянии покоя, при культивировании *ex vivo* начинают делиться и дифференцируются в функциональноактивные клетки, которые после трансплантации в дерму быстро синтезируют компоненты межклеточного матрикса.

В ходе многочисленных доклинических исследований было показано отсутствие у культивированных дермальных фибробластов человека онкогенных свойств [6, 7, 9].

## 3 ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Впервые аутологичные фибробласты кожи в медицинской практике (для коррекции морщин и рубцов постакне) применили в 1994 году ученые компании Isolagen, доказавшие безопасность и клиническую эффективность метода [13, 14, 28]. В 1997 году технология была запа-

тентована [30] и к 1999 году проведены первые многоцентровые двойные слепые плацебо-контролируемые клинические исследования [14, 15, 28]. Клинический эффект выражался в значительном уменьшении рельефности и утолщении дермального слоя кожи, увеличении в нем числа фибробластов и плотности коллагена. При этом эффект имел нарастающий по времени характер и сохранялся до 7 лет после лечения [28]. В 2003–2008 годах компания Isolagen успешно провела три фазы многоцентровых рандомизированных слепых плацебо-контролируемых клинических исследований FDA и в настоящее время находится на стадии получения лицензии на применение данной технологии для коррекции морщин, в частности носогубных складок.

Что касается коммерческого применения метода, то в США в 1995–1999 годах было пролечено более 1000 пациентов, в Великобритании за 2002–2007 годы – более 6000, в Австралии и Новой Зеландии за 2003–2004 годы – 4027 пациентов [28]. В США коммерческое применение Isolagen-терапии сейчас приостановлено в ожидании лицензии FDA, но решение по ней будет принято в 2011 году. В Европе данная технология успешно применяется, в частности, в швейцарских косметологических клиниках под брендом Estegen.

Применение аутологичных дермальных фибробластов в дерматологии и эстетической медицине признано перспективным и российскими специалистами [7–12, 19–24, 26]. Так, на базе Самарского государственного медицин-

ского университета проведены клинические исследования применения аутологичных дермальных фибробластов для коррекции атрофических рубцов кожи на лице [22]. Результаты исследований показали, что интрадермальное введение аутологичных дермальных фибробластов у пациентов с атрофическими рубцами постакне позволяет значительно (на 67%) улучшить результаты лечения по сравнению с традиционной терапией. У пациентов с «молодыми» (до 1 года) атрофическими рубцами отмечено улучшение результатов на 71%.

В клиническом исследовании, проведенном на базах Уральской государственной медицинской академии, Среднеуральского научного центра РАМН и Института медицинских клеточных технологий, участвовали, 45 пациентов в возрасте 43–60 лет [23]. После интрадермального введения аутологичных дермальных фибробластов у пациентов наблюдалось исчезновение мелких и уменьшение выраженности глубоких морщин, повышение тургора кожи и увеличение ее толщины. Эффект носил нарастающий характер, достигая максимума через 15 месяцев после введения клеток, и сохранялся не менее двух лет.

Клинические исследования в рамках межотраслевой программы «Новые клеточные технологии – медицине», проведенные на базе РГМУ и Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН и включившие 68 пациентов в возрасте 30–65 лет с признаками возрастных изменений кожи, также показали, что после введения аутологичных фибробластов

**ТАБЛ. 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОФИЦИАЛЬНО ПРОВЕДЕННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ**

| Организация  | Количество пациентов | Дефект кожи    | Безопасность | Клинический эффект |
|--|----------------------|----------------|--------------|--------------------|
| ISOLAGEN (США)   | 7000                 | Морщины, рубцы | +            | +                  |
|  | 107                  | постакне       | +            | +                  |
| ГМУ, Самара  | 61                   | Рубцы постакне | +            | +                  |
| УРАЛЬСКАЯ ГМА  | 45                   | Морщины        | +            | +                  |
| РГМУ и ИБХ им. В.Н. Ореховича РАМН                         | 68                   | Морщины        | +            | +                  |
| Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова | 12(?)                | Морщины        | +            | +                  |
| ИСКЧ, Москва   | 17                   | Морщины        | +            | +                  |

## Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи

► улучшается состояние кожи лица – увеличивается ее толщина и эластичность, улучшается микроциркуляция крови [9].

Таким образом, все клинические испытания, проведенные как зарубежными, так и российскими исследователями, показали безопасность и клиническую эффективность применения аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых изменений кожи (табл. 2).

### 4 СОБСТВЕННЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

В июле 2010 года Институт стволовых клеток человека (ИСКЧ) получил разрешение Росздравнадзора на применение запатентованной медицинской технологии по использованию аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи [31–33]. Суть технологии заключается в том, что у пациента из заушной области (наименее подверженной воздействию ультрафиолетовых лучей) берут биоптат кожи диаметром 3–5 мм, из которого впоследствии получают необходимое количество дермальных фибробластов. В косметологиче-

ской клинике полученные фибробласты вводятся пациенту интрадермально тоннельным способом в те области лица и тела, которые требуют коррекции.

Дополнительные клинические исследования по применению аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи (цель которых – выяснение механизмов качественных и количественных изменений, происходящих в коже после применения клеток), проведенные ИСКЧ при участии ряда московских медицинских организаций, продемонстрировали, что клинический эффект имеет выраженный и нарастающий во времени характер [11, 12]. Так, анализ данных, полученных через 1, 3 и 6 месяцев после процедуры, показал, что у всех пациентов (17 человек в возрасте 45–65 лет с признаками возрастных изменений кожи лица) отмечалось прогрессирующее увеличение эластичности кожи лица (в частности, в параорбитальной области достигающее 25% по сравнению с исходным уровнем), улучшение текстуры кожи лица (через 6 месяцев – на 27% по сравнению с исходным уровнем), включая прогрессирующее снижение выраженности пигментных пятен, уменьшение глубины морщин (в параорбитальной области достигающее 92%) (рис. 2), усиление активности тканевого кровотока и гемодинамических механизмов его регуляции (рис. 3).

Гистологические исследования, проведенные до и после применения аутологичных дермальных фибробластов, выявили: через месяц после введения трансплантированные клетки без признаков митотической активности визу-

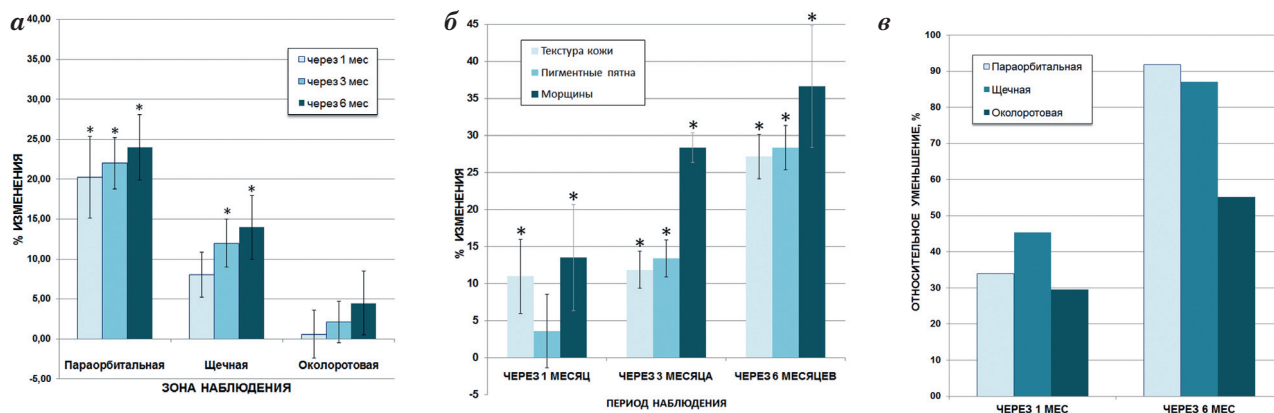


Рис. 2. Относительное изменение показателей кожи лица через 1, 3 и 6 месяцев после введения аутологичных фибробластов: эластичность (а); количество морщин и выраженность гиперпигментации (б); глубина морщин (в). Здесь и далее: \* – статистически значимые отличия от исходного состояния ( $p=0,05$ )

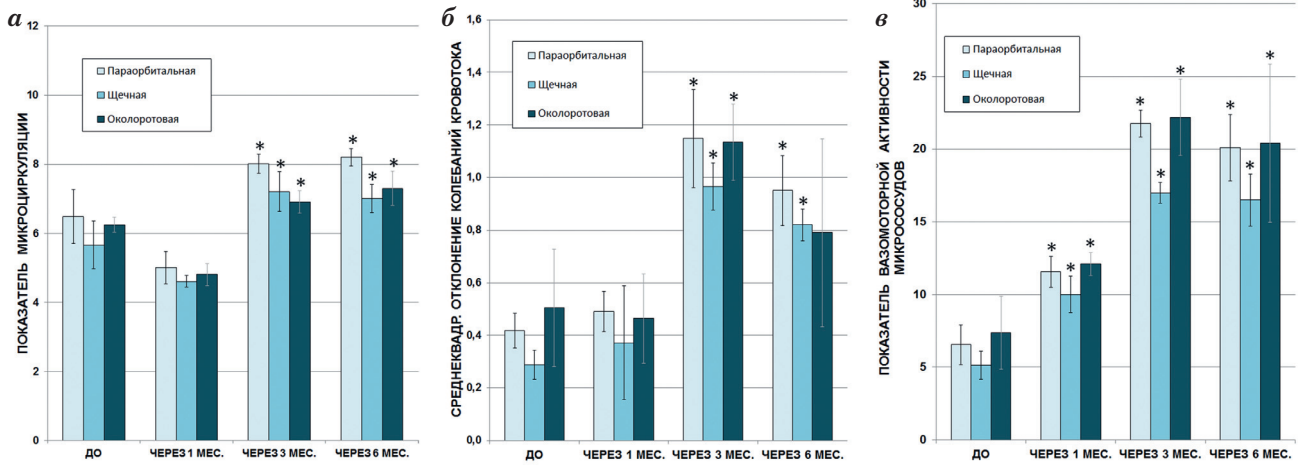


Рис. 3. Изменение показателей лазерной доплеровской флоуметрии в различных зонах лица: уровень кровотока (а); интенсивность кровотока (б); вазомоторная активность сосудов,  $Kv$  (в)

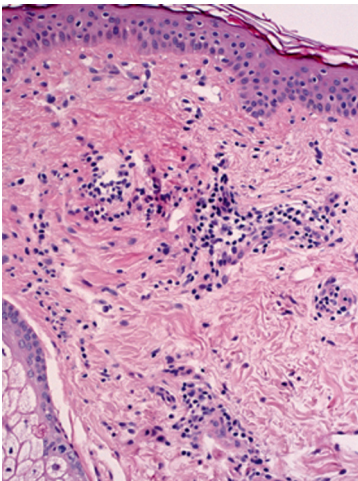


Рис. 4. Группа трансплантированных клеток без признаков митотической активности через месяц после их введения в дерму (увеличение 200×, окраска гематоксилином, эозином)

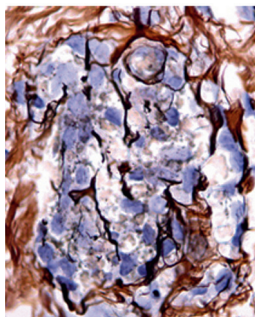


Рис. 5. Участки активного коллагеногенеза в дерме, наблюдаемые через месяц после введения в нее аутологичных фибробластов (увеличение 400×, импрегнация нитратом серебра по Гордону, увеличение 1000×)

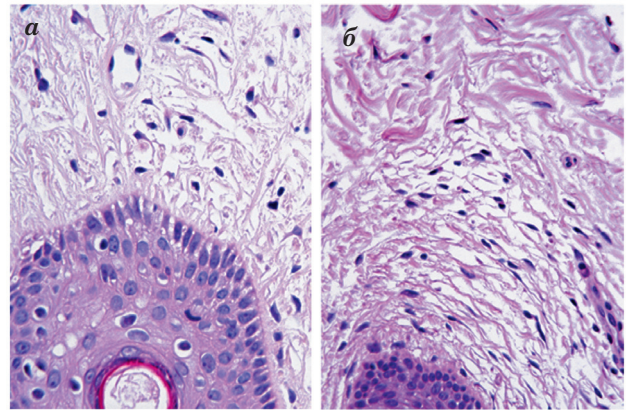


Рис. 6. Увеличение степени гидратации и объема дермы до (а) и через месяц после (б) введения фибробластов (окраска гематоксилином, эозином, увеличение 200×)

ализируются в дерме небольшими группами (рис. 4), четко определяются новообразованные коллагеновые волокна (рис. 5), наблюдается увеличение объема и степени гидратации дермы (рис. 6).

Через 3 и 6 месяцев после процедуры выявленная тенденция сохраняется. При этом все участвующие в исследовании пациенты без исключения удовлетворены полученным клиническим результатом (рис. 7).

Таким образом, проводимое в течение 6 месяцев комплексное клиничко-инструментальное и морфологическое исследование показало, что применение аутологичных дермальных фибро-

## Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи

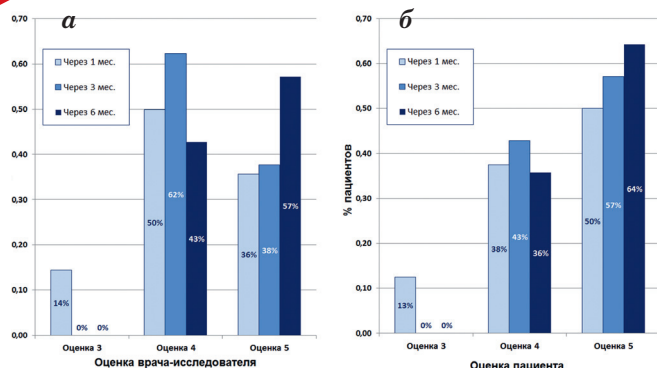


Рис. 7. Визуальная оценка состояния кожи (по 5-балльной шкале): мнение врача-исследователя (а); мнение пациента (б)

бластов способствует увеличению толщины кожи и повышению ее упругости, уменьшению количества и глубины морщин, улучшению текстуры кожи. В частности, нами было выявлено, что наблюдаемое улучшение состояния кожи сопровождается существенными изменениями в микроструктуре дермы, усилением активности гемодинамических механизмов регуляции тканевого кровотока, увеличением объема и гидратации межклеточного матрикса, увеличением количества новообразованного коллагена. Учитывая, что период полного распада зрелого коллагена кожи составляет около 30 лет [34], можно ожидать, что наблюдаемый клинический эффект будет достаточно длительным. Это согласуется и с выводами ряда американских исследователей о том, что культивированные аутологичные дермальные фибробласты человека представляют собой безопасную живую коллагенообразующую систему, которая способна обеспечить эффективную коррекцию возрастных изменений кожи в течение длительного времени [14–16, 18, 29].

### Литература

1. Омеляненко НП, Слуцкий ЛИ. В кн.: Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Под ред. С. П. Миронова. Т. 1. – М.: Известия, 2009;69–70.

2. Chang H, Chi J-T, Dudoit S, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*, 2002;99(20):12877–12882.
3. Haniffa M, Collin M, Buckley C, et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? *Haematologica*, 2009;94(2):258–263.
4. Zouboulis C, Adjaye J, Akamatsu H, et al. Human skin stem cells and the ageing process. *Experimental gerontology*, 2008;43:986–997.
5. Жукова О, Потехаев Н, Стенько А, Бурдина А. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клиническая дерматология и венерология*, 2009;(3):4–9.
6. Келлер Г, Себастиан Дж, Лакомбе Ю и др. Сохранность инжецируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюл эксп биол мед*, 2000;130(8J)203–206.
7. Рубина К и др. Аутофибробласты: эстетические перспективы. *Kosmetik international*, 2008;(1):73–75.
8. Сысоева ВЮ, Рубина КА, Калинина НИ и др. Аутологичные фибробласты дермы: перспективы применения в медицине. В кн.: Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. Руководство для врачей. Под ред. Ткачука ВА. – М.: Литтерра, 2009. С. 222–233.
9. Бурунова В, Мантурова Н, Смирнова Г и др. Клеточные технологии в ревитализации кожи лица. *Русский медицинский журнал*, 2009;17(17):1058.
10. Туманов ВП и др. Исследование эффективности использования культивированных аутофибробластов в системе anti-age. *Новости клинической цитологии России*, 2008;(3–4).
11. Зорина А, Зорин В, Черкасов В и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов человека для коррекции возрастных изменений кожи. *Сб. тез. X Международного конгресса по эстетической медицине им. Е. Лапутина*. – М., 2011. С. 85–86.
12. Зорина А, Зорин В, Черкасов В и др. Комплексная клинко-инструментально-лабораторная оценка кожи человека при возрастных ее изменениях после применения аутологичных дермальных фибробластов. *Сб. тез. Санкт-Петербургского конгресса по косметологии и эстетической медицине «Невские берега»*. – Пб, 2011.
13. Boss WK, Marko O. Isolagen. In: *Tissue Augmentation in Clinical Practice*. Klein AW. Ed. – New York: Marcel Dekker Inc., 1998:335–347.
14. Watson D, Keller GS, Lacombe V, et al. Autologous Fibroblasts for Treatment of Facial Rhytids and Dermal Depressions. A Pilot Study. *Arch Facial Plast Surg*, 1999;(1):165–170.

15. Mentz H, Ruiz A, Patronella C, et al. Use of cultured autologous fibroblasts for facial rejuvenation. Annual Meeting of American Society of Plastic Surgeons. Philadelphia, Pennsylvania, October 12, 2004.
16. Boss WK, Hakan U, Chernoff G, et al. Autologous Cultured Fibroblasts as Cellular Therapy in Plastic Surgery. *Clinics of Plastic Surgery*, 2000;27(4):613–626.
17. Boss WK., Hakan U, Fedor PB, Chernoff G. Autologous cultured fibroblast: protein repair system. *Ann Plast Surg*, 2000;44:536–542.
18. Weiss RA, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg*, 2007;33(3):263–268.
19. Зорина АИ, Зорин ВЛ, Терехов СМ. Применение аутологичных фибробластов в эстетической медицине. Тезисы докладов Международной конференции «Клеточная и тканевая трансплантация». – Алушта, 2004.
20. Зорина АИ, Зорин ВЛ. Омоложение кожи лица и тела посредством аутологических фибробластов. Тезисы докладов Международной конференции «Anti-age терапия – область медицины будущего». – М., 2004.
21. Зорина АИ, Зорин ВЛ, Мясников АЛ, Серебрянский ОЮ. Аутологичные фибробласты в косметологии. Доклад на VI Международном конгрессе эстетической медицины. Москва, сентябрь 2006 г.
22. Золотовицкая НН. Экспериментально-клиническая оценка эффективности применения культуры фибробластов. В сб.: Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия. Ежегодник Российской ассоциации клинических анатомов в составе ВНОАГЭ. Приложение к журналу «Морфологические ведомости», 2006;6:68–73.
23. Макеев ОГ, Улыбин АИ, Зубанов ПС, Малишевская ЕГ. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. *Вестник эстетической медицины*, 2008;7(2):72–78.
24. Макеев ОГ, Улыбин АИ, Зубанов ПС, Малишевская ЕГ. Отчет о трехлетних клинических испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. *Вестник Уральской медицинской академической науки*, 2008;6:63–70.
25. Palmer MA, Lowe N. Human Dermal Fibroblasts for Regeneration and Rejuvenation: A Practical Guide. *Advances in Aesthetic Cellular Rejuvenation*, 2008;3:1–16.
26. Смирнова ГО, Жидких СЮ, Паф ВИ и соавт. Клеточные технологии в коррекции возрастных изменений кожи лица, лечении ран и трофических язв. Результаты клинических исследований. В сб.: Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества. Тез. докл. – М.: Посольство Великобритании, 2007.
27. Озерская ОС, Щеголев ВВ. Экспериментальные подходы к обоснованию применения клеточных композиций на основе фибробластов для дерматокосметологии. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2008;III(2):66–67.
28. Трейси. ISOLAGEN – face-лифтинг будущего. Каталог IV Международного симпозиума по эстетической медицине. – М., 2005. С. 36.
29. Briefing Document. Advisory Committee Materials: Available for Public Release. Isolagen Therapy TM (Laviv TM). *Autologous Cell Therapy*, 2009.
30. Байрейтер К, Франц П, Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. *Онтогенез*, 1995;26(1):22–37.
31. Boss W. Use of autologous dermal fibroblast for the repair of skin and soft tissue defects. *Isolagen Technologies, Inc., United States Patent WO 1997/004720*.
32. Зорин ВЛ и др. Биотрансплантат и способ коррекции дефектов мягких тканей. Способ получения биотрансплантата. Патент на изобретение № 2281776 от 29.08.2005.
33. Исаев АА, Приходько АВ, Зорин ВЛ и др. Медицинская технология: «Забор, транспортировка, выделение, культивирование, криоконсервирование, хранение и использование аутологичных фибробластов для коррекции возрастных и рубцовых изменений кожи». ФС№2009/308 от 21 июля 2010.
34. Fisher G, Varani J, Voorhees J. Looking older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol*, 2008;144(5):666–672.