

ОБЛИК

Бесконечная жизнь кожи. Биоревитализанты



18+

esthetic guide №1 (29) февраль 2019



Алла Зорина

к. м. н., врач-биохимик,
Москва.



Вадим Зорин

к. б. н., врач-биофизик,
Москва.

@doc_zorin

Фибробласты. Восстановление кожи

В этой статье поговорим о *функции дермальных фибробластов в коже*, процессе их старения, а также о методе обновления и стимуляции регенерации кожи путём введения аутологичных фибробластов.

Введение

Роль дермальных фибробластов (ДФ) в обновлении кожи трудно переоценить, поскольку они являются основным клеточным компонентом соединительнотканной основы кожи, обеспечивающим её гомеостаз и морфофункциональную организацию [1–3]. Очевидна актуальность этой темы для регенеративной (репаративной) косметологии, задача которой — омоложение кожи путём активации естественных процессов её восстановления.

Функции дермальных фибробластов

Из всех функций ДФ наибольшее внимание специалистов в области эстетической медицины и дерматологии сосредоточено на продуцировании этими клетками компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) дермы: коллагена, эластина, протеогликанов, особенно гиалуроновой кислоты (ГК), и структурных гликопротеинов. Повышенный интерес именно к этой функции ДФ понятен: названные компоненты ВКМ формируют и поддерживают структуру кожи, обеспечивая её упругость и прочность [4]. Причём ДФ не только синтезируют эти вещества, но и обеспечивают их катаболизм путём прямого фагоцитоза «отработанных» фрагментов фибрилл

коллагена и эластина, секретируют коллагеназы, гиалуронидазы и прочих ферментов [1].

Другая, и не менее значимая для кожи, активность ДФ оставалась до недавнего времени несколько на обочине поля зрения врачей-практиков, однако сегодня она тоже становится объектом пристального внимания клиницистов. Речь идёт о целом ряде важнейших функций фибробластов. Так, продуцируя коллаген IV типа и ламинин, они влияют на формирование базальной мембраны [5, 6]. Фибробласты формируют строму, которая не только служит каркасом (опорой) для эпителия, но и регулирует структурную организацию и функционирование эпителиальных клеток [1, 2, 5]. Они вырабатывают и выделяют факторы клеточного роста (KGF-1 — фактор роста кератиноцитов, GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста), иммунорегуляторные интерлейкины IL-6, IL-8. За счёт секреции факторов роста и интерлейкинов и непосредственного взаимодействия с эпителиальными клетками ДФ играют ключевую роль в регуляции эпидермального морфогенеза. Их паракринная активность служит основой для поддержания гомеостаза стволовых кератиноцитов.

Дермальные фибробласты секретируют факторы, влияющие на дифференцировку лимфоцитов, и факторы, регулирующие численность, миграцию и функции гранулоцитов и макрофагов, обеспечивая тем самым поддержание иммунитета кожи [1, 7].

Вырабатывая множество проангиогенных факторов, которые индуцируют дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, ДФ способствуют образованию и стабилизации сосудов [1, 8].

**Резидентные клетки
ткани** — образующиеся и постоянно
пребывающие в этой ткани.

Они принимают участие в процессах нейроэндокринной регуляции кожи. Синтезируют биологически активные пептиды: гормоны, биогенные амины, нейропептиды и нейротрансмиттеры, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринной системах, экспрессируют рецепторы андрогенов и эстрогенов, посредством которых осуществляется влияние этих гормонов на кожу человека [9].

Фибробласты, взаимодействуя с различными резидентными клетками: эпидермальными, эндотелиальными, нервными, жировыми, гемопоэтическими [1, 2], участвуют практически во всех кожных процессах, в том числе — физиопатологических [3, 4].

Таким образом, ДФ представляют собой центральное звено в биологии кожи: они поддерживают не только гомеостаз ВКМ дермы, обеспечивая её ремоделирование и обновление, но и физиологическое состояние других слоёв и структур кожи.

Инволюция дермальных фибробластов

По мере старения организма растёт число ДФ, в которых происходят возрастзависимые изменения, связанные преимущественно с непрерывным накоплением повреждений [2, 10, 11]. Такие ДФ обозначают как «стареющие», или сенесцентные фибробласты (ДФст). Снижается их способность к ремоделированию и организации ВКМ, так как уменьшается синтез и секреция ими основных компонентов ВКМ. Нарушается эпидермальный гомеостаз из-за негативных изменений в паракринных механизмах, связывающих эпидермис и папиллярный слой дермы [12]. В популяции ДФст происходит увеличение секреции богатого цистеином ангиогенного индуктора — белка 61 (Cyr61, или CCN1), стимулирующего продукцию провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ (MMPs). CCN1 и MMPs поддерживают старение клетки путём негативной регуляции гомеостаза коллагена и увеличения его деградации [13].

Постепенно баланс между синтезом и деградацией коллагена нарушается в пользу последней. Повреждённый коллагеновый каркас ВКМ уже не может удерживать фибробласты в растянутом состоянии, свойственном молодым клеткам. Происходит своего рода коллапс фибробластов, что приводит к нарушению их функций.

В процессе инволюции уменьшается численность фибробластов. Снижается и биосинтетическая активность этих клеток, нарушается баланс между синтезом и деградацией ВКМ дермы. В среднем, у пожилых/старых людей, по сравнению с молодыми, общее количество ДФ меньше на 35% [14], продукция коллагена в коже снижена на 75% [15], причём содержание коллагена уменьшается приблизительно на 1% в год [16].

Все сенесцентные изменения в популяции ДФ приводят к постепенному и значительному снижению способности кожи к регенерации и обновлению. Как при этом меняется статус кожи? Уменьшается её толщина, снижается упругость и эластичность, появляются морщины, заломы, птоз тканей — кожа стареет.

Очевидно, что именно ДФ должны быть основной «мишенью» омолаживающих кожу косметологических методов. Так оно и есть: все современные терапевтические воздействия в целях коррекции возрастных изменений кожи — инъекционные, включая PRP-терапию, аппаратные (лазерные, радиочастотные, ультразвуковые) — направлены прежде всего на стимуляцию функциональной

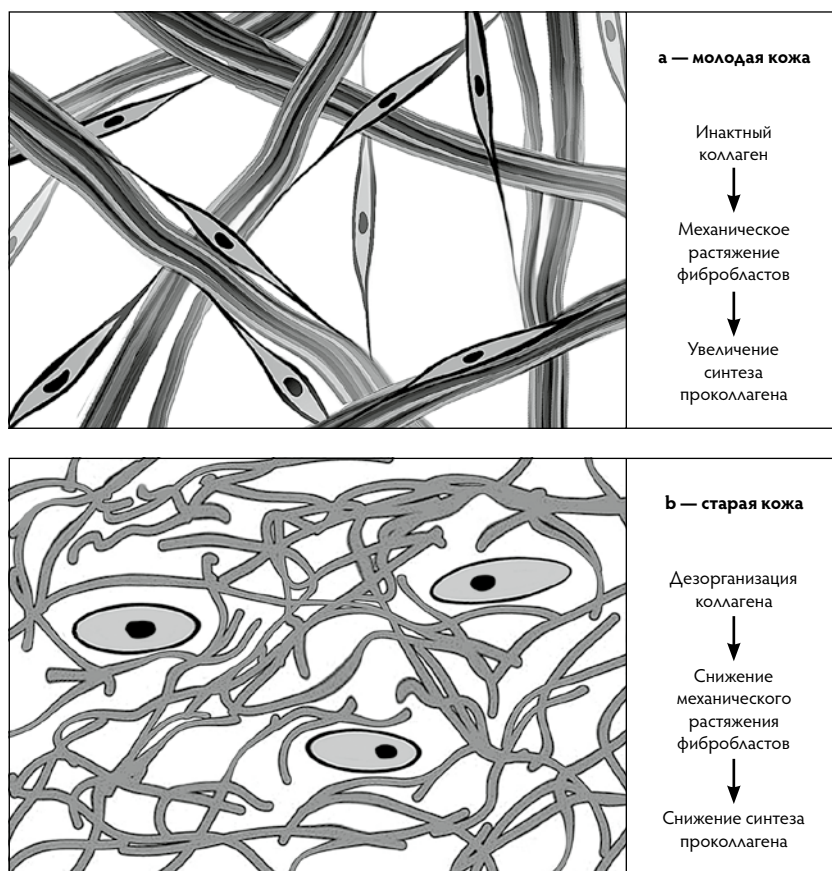


Рис. 1. Взаиморасположение фибробластов и коллагеновых волокон: **а** — в коже молодых людей (18–29 лет); **б** — в коже людей старшего возраста (старше 80 лет) (Varani J., et al. 2006, с изм. [14]).

активности ДФ, как пролиферативной, так и биосинтетической. Особое место в этом ряду занимает применение аутологических (собственных) дермальных фибробластов, или SPRS-терапия.

SPRS-терапия как метод оздоровления и обновления кожи

SPRS-терапия (SPRS — от англ. Service for Personal Regeneration of Skin — персонализированный комплекс лечебно-диагностических процедур для восстановления кожи) — метод регенеративной медицины (РУ ФС №2009/308 от 21.07.2010) [17]. Его применение позволяет восполнить уменьшившуюся с возрастом популяцию ДФ за счёт введенных в кожу специализированных молодых и функционально активных клеток. Трансплантируются собственные фибробласты кожи пациента, поэтому они полноценно приживаются, интегрируются с резидентной клеточной популяцией и живут «по законам» дермы [18–20]. После трансплантации их биосинтетическая активность сохраняется не менее года, причём без какой-либо до-

Сенесценция — это состояние, при котором клетки с накопленными повреждениями ДНК и истощением механизмов её восстановления перестают делиться, теряют способность к ремоделированию и организации ВКМ.

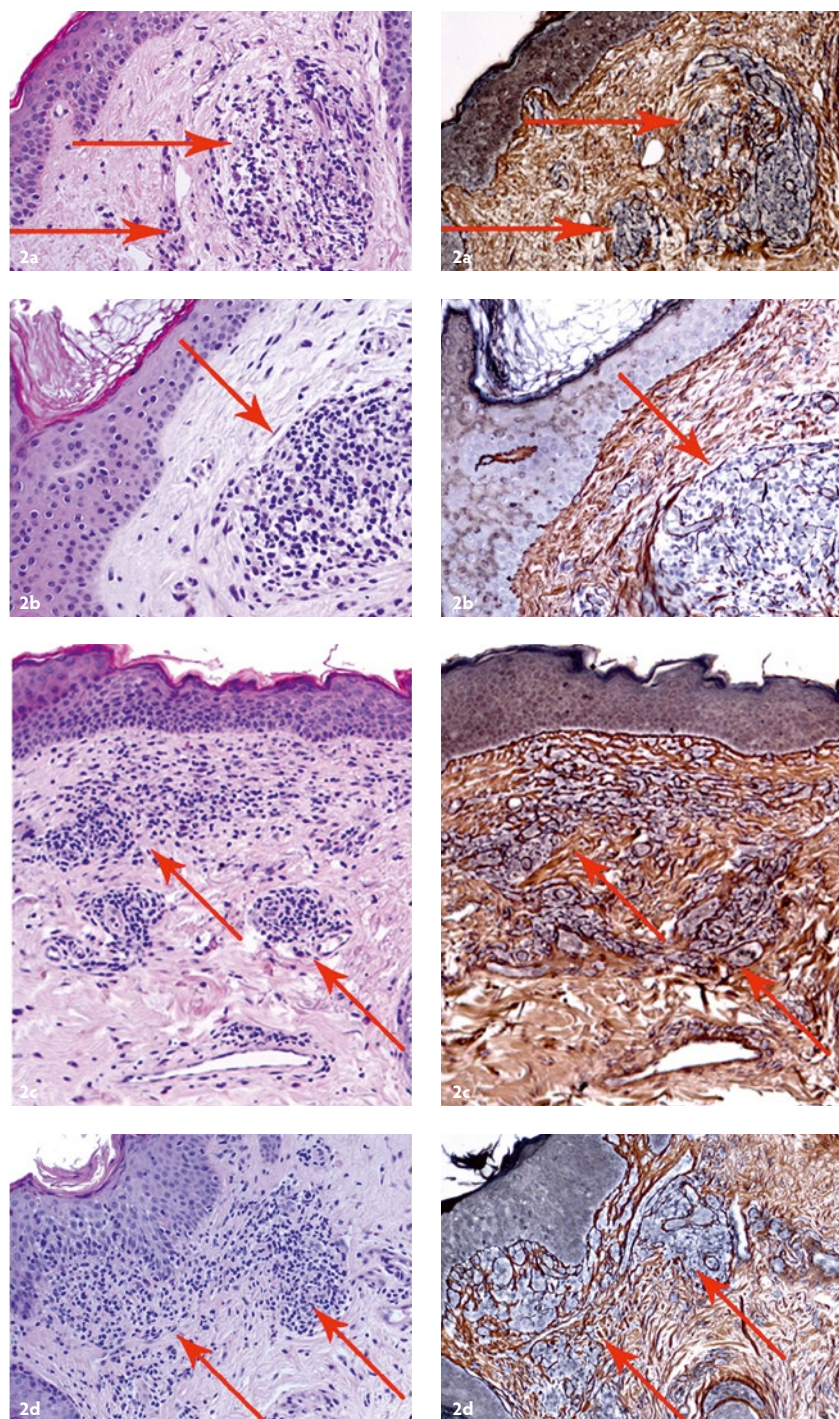


Рис. 2. Кожа после применения аутоДФ: **а** — через 1 месяц, **б** — через 3 месяца, **с** — через 6 месяцев, **д** — через 12 месяцев. Стрелками указаны группы введенных культивированных аутоДФ. Левая колонка — окраска гематоксилином и эозином, правая колонка — импрегнация нитратом серебра. Ув. $\times 200$. Препараты и микрофотографии Р.В. Деева.

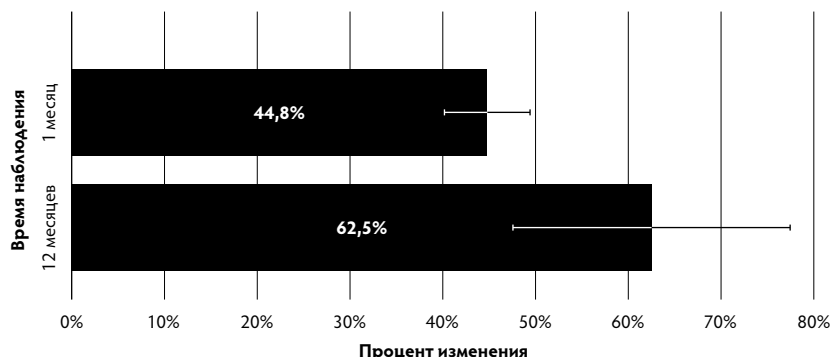


Рис. 3. Относительное изменение толщины кожи после применения аутоДФ (по результатам гистологических исследований).

полнительной стимуляции. Как результат, увеличивается синтез коллагена и других компонентов ВКМ, благодаря чему происходит ремоделирование микроструктуры дермы, увеличение её толщины, уменьшение количества и глубины морщин.

Описание технологии

В специализированной лаборатории Института стволовых клеток человека, соответствующей международным стандартам GMP*, из 4 мм биоптата кожи пациента получают клеточный препарат, содержащий культивированные аутологичные ДФ (аутоДФ). На этапах клеточного процессинга происходит отбор и стимуляция только функционально активных ДФ, которые, несмотря на старение организма, сохраняют высокую способность к делению и синтезу важных для кожи компонентов. Дело в том, что пролиферативный потенциал всей популяции дермальных фибробластов взрослого человека в течение всей его жизни остаётся на довольно высоком уровне — благодаря наличию в фибробластическом диффероне стволовых/прогениторных клеток. Это клетки-предшественницы, которые отвечают за обновление клеточной популяции дермы. Как показали исследования *in vitro*, первичные культуры, полученные даже от очень пожилых людей (95 лет), содержат до 14 % митотически активных фибробластов [21].

Данный факт подтверждается и нашими экспериментами: культуры фибробластов дермы, полученные от пациентов 18–82 лет, характеризуются довольно высокой эффективностью колониеобразования ($45.0 \pm 9.5\%$) [22], независимо от возраста донора. Это даёт возможность из небольшого биоптата кожи любого взрослого человека получить необходимое для проведения терапии количество функционально активных клеток.

После трансплантации культивированных аутоДФ в дерму их биосинтетическая активность сохраняется. В своей работе мы вводили полученный клеточный материал одновременно и в кожу лица, и в кожу за ушной раковиной, откуда затем проводили забор биоптата для гистологического изучения. Наши исследования показали:

- трансплантированные аутоДФ синтезировали компоненты ВКМ дермы на протяжении как минимум 12 месяцев [Рис. 2];
- трансплантированные аутоДФ присутствовали в дерме небольшими группами, без признаков митотической активности, то есть без признаков деления клеток (следовательно, риск развития каких-либо гиперпластических процессов при их использовании отсутствует);
- образовались новые коллагеновые волокна;
- толщина дермы увеличилась в среднем на $62,5 \pm 13,6\%$ ($p=0,028$) в течение первых 12 месяцев после применения аутоДФ [Рис. 3].

Через 24 месяца после применения аутоДФ в дерме также регистрировали отдельные группы фибробластоподобных клеток [Рис. 4], продуцирующих коллагеновые волокна. Однако признаков созревания (утолщения) коллагена не наблюдали, из чего следует, что через два года после трансплантации аутоДФ интенсивность их синтетической активности (по сравнению с таковой в течение первого года после трансплантации) была снижена. Скорее всего, это связано с уровнем физиологических потребностей дермы (известно, что для обеспечения её

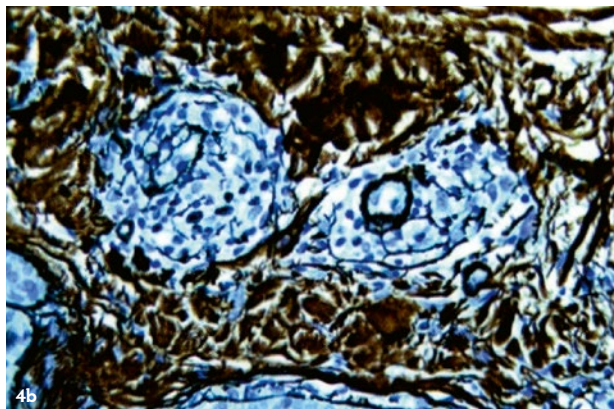
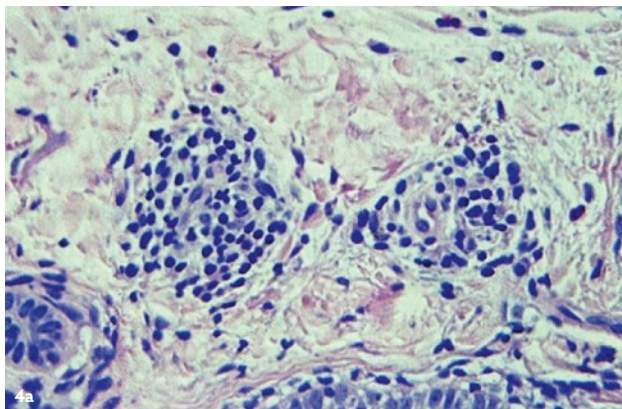


Рис. 4. Кожа пациента М. (54 г.) после применения аутоДФ через 24 месяца. Левая колонка — окраска гематоксилином и эозином, правая колонка — импрегнация нитратом серебра. Ув. ×200. Препараты и микрофотографии Р. В. Деева.

физиологического состояния достаточно незначительной функциональной активности фибробластов)^[23]. По всей видимости, трансплантированные аутоДФ полноценно интегрировались с дермой, стали естественной составляющей её основной клеточной популяции — фибробластического дифферона — и находятся под контролем микроокружения.

Выводы гистологического исследования:

- введенные аутоДФ сохраняют свою жизнеспособность в дерме;
- они располагаются в дерме преимущественно группами;
- их функционирование не приводит к неблагоприятным последствиям, клетки пролиферативно не активны;
- на всех сроках наблюдения в дерме регистрируются признаки увеличения её объёма и процесс синтеза молодых коллагеновых волокон.

Выявленная на гистологическом уровне положительная динамика изменений кожи после применения аутоДФ полностью соответствует клинической картине. Уже через 10–14 дней после окончания курса SPRS-терапии отмечается повышение упругости кожи, уменьшение её рельефности (уменьшение выраженности морщин), улучшение цвета и контуров лица. Эффект имеет нарастающий характер. Так, если через месяц после инъекции на «хорошо» и «отлично» клинический результат оценили 88% пациентов, то уже через три месяца и позже — 100%. Врачи-исследователи через месяц определили результат как «хороший» и «отличный» у 86% пациентов, через три месяца и позже — у 100% пациентов. Положительные, прогрессирующие со временем (на протяжении как минимум 12 месяцев) изменения состояния кожи подтверждены нами и с помощью инструментальных методов исследования^[19].

Заключение

Инновационная технология — SPRS-терапия, основанная на принципах регенеративной медицины, — позволяет восстанавливать утраченные с возрастом структуру и функции дермы за счёт уникального биологического механизма собственных коллагенообразующих клеток кожи пациента.

SPRS-терапия используется в отечественной эстетической медицине более восьми лет, зафиксировано более 1000 клинических наблюдений пациентов, из которых более 80% повторно (два и более раз), пролечив одну область кожи, обращались в клиники для лечения этим методом кожи других областей.

Для врачебной практики важно, что SPRS-терапия является не только самостоятельным эффективным методом ремоделирования дермы, но и хорошей базой

для применения других косметологических вмешательств, направленных на стимуляцию синтетической активности фибробластов, что позволяет в течение длительного времени поддерживать кожу пациента в хорошем состоянии. ○

Литература

1. Sorrell J. M., Caplan A. I. Fibroblasts — a diverse population at the center of it all. // *Int. Rev. Cell. Molec. Biol.*, 2009, 276: 161–214.
2. Orioli D., Dellambra E. Epigenetic Regulation of Skin Cells in Natural Aging and Premature Aging Diseases. // *Cells*, 2018, 7, 268: 1–30.
3. Srirama G., Bigliardi P. L., Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. Review. // *Eur. J. Cell. Biol.*, 2015, XXX: 1–30.
4. Murphree R. W. Impairments in Skin Integrity. // *Nurs. Clin. N. Am.*, 2017, 52: 405–417.
5. Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C., et al. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. // *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126: 971–9.
6. Lee D., Cho K. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three dimensional culture systems. // *Arch. Dermatol. Res.*, 2005, 296: 296–302.
7. Haniffa M., Collin M., Buckley C., et al. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? // *Haematologica*, 2009, 94 (2): 258–63.
8. Sorrell J. M., Baber M., Caplan A. I. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. // *Cell. Tissue. Res.*, 2003, 327: 499–510.
9. Смирнова И. О., Кветной И. М., Князькин И. В. и др., «Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры её старения», СПб., «Деан», 2005. С. 285.
10. Tigges J., Krutmann J., Fritsche E., et al. The hallmarks of fibroblast ageing. // *Mech. Ageing. Dev.*, 2014, 138: 26–44.
11. Wang A., Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. // *Frontiers in Genetics*. 2018, 9: 1–14.
12. Krutmann J., Boulou A., Sore G., et al. The skin aging exposome. // *J. Dermatol. Sci.*, 2017, 85: 152–161.
13. Quan T., Qin Z., Voorhees J. J., Fisher G. J. Cysteine-rich protein 61 (CCN1) mediates replicative senescence associated aberrant collagen homeostasis in human skin fibroblasts. // *J. Cell. Biochem.*, 2012, 113: 3011–18.
14. Varani J., Dame M., Rittie L., et al. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. // *AJP*, 2006, 168 (6): 1861–8.
15. Fisher G., Kang S., Varani J., et al. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. // *Arch. Dermatol.*, 2002, 138: 1462–7.
16. Angel P., Szabowski A., Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. // *Oncogene*, 2001, 20: 2413–23.
17. Исаев А. А., Приходько А. В., Зорин В. Л. 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 г.
18. Zorin V., Zorina A., Cherkasov V., et al. Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal fibroblasts administration. // *J. Tissue. Eng. Regen. Med.*, 2014, DOI: 10.1002/term.1976.
19. Зорина А. И., Зорин В. Л., Черкасов В. Р., Исаев А. А. «Метод коррекции возрастных изменений кожи с применением аутологичных дермальных фибробластов», «Клиническая дерматология и венерология», 2013, № 3. С. 30–37.
20. Weiss R. A., Weiss M. A., Beasley K. L., Munavalli G. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. // *Dermatol. Surg.*, 2007, 33 (3): 263–8.
21. Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. «Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации», «Онтогенез», 1995, т. 26, № 1. С. 22–37.
22. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. и др. «Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов», «Вестник эстетической медицины», 2011, т. 10, № 2. С. 16–26.
23. Омеляненко Н. П., Слуцкий Л. И. «Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия)», монография под ред. Миронова С. П., Москва, «Известия», 2009, т. 1. С. 47.