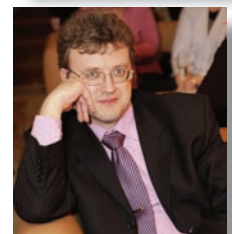
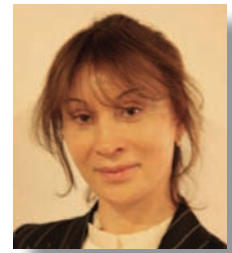


# Старение кожи и SPRS-терапия

Алла Зорина, Вадим Зорин, Владимир Черкасов

doc\_zorin@pisem.net



Об авторах:

**Зорина Алла Ивановна**, врач-биохимик, к.м.н., сотрудник Института стволовых клеток человека

**Зорин Вадим Леонидович**, врач-биофизик, к.б.н., сотрудник Института стволовых клеток человека, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза, РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

**Черкасов Владимир Рюрикович**, к.х.н., сотрудник Института стволовых клеток человека

В настоящее время в арсенале эстетической медицины наряду с множеством современных методов, направленных на ремоделирование кожи и ее структурное «омоложение», таких, как радиоволновое воздействие, фотоомоложение, лазерные технологии и др., появился инновационный метод из области регенеративной медицины — SPRS-терапия (от англ. Service for Personal Regeneration of Skin). В основе метода лежит применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных и других структурных изменений кожи.

Каким же образом дермальные аутофибробласты способствуют коррекции дефектов кожи и какова их связь с процессами старения?

## КАК МЕНЯЕТСЯ КОЖА ПРИ СТАРЕНИИ

Старение кожи, как и организма в целом, представляет собой сложный биологический процесс, в котором участвует множество факторов, включая генетические, эпигенетические и факторы окружающей среды, наиболее значимым из которых является ультрафиолетовое облучение (УФО) [1–4].

Выделяют два основных типа старения кожи — внутреннее (или хронологическое) и внешнее (или фотостарение). Каждый из них имеет свои клинико-морфологические особенности. Стареющая, но не подвергавшаяся длительному воздействию солнечных лучей кожа характеризуется истончением, снижением эластичности и упругости, бледностью, наличием тонких поверхностных морщин (таблица 1) [5]. При фотостарении, которое может наблюдаться еще до появления

признаков хронологического старения, кожа утолщается, грубеет, становится более сухой, в ней формируются глубокие морщины, появляются сосудистые звездочки и пигментные пятна [6] (таблица 2). В отличие от хронологического старения, представляющего собой генетически детерминированный процесс, фотостарение напрямую зависит от степени воздействия УФО и генетически предопределенной степени пигментации кожи [7, 8] и его зачастую рассматривают как ускоренный процесс хронологического старения [2]. Кожа открытых областей (лица, шеи, рук) подвергается воздействию окружающей среды, и происходящие в ней деструктивные процессы, вызванные, в частности, УФО, накладываются на процессы хронологического старения и тем самым ускоряют его развитие [9].

Несмотря на разную этиологию, оба типа старения имеют общие фундаментальные молекулярные механизмы, ассоциированные с нарушением гомеостаза коллагена — основного структурного компонента кожи, составляющего 90% ее сухой массы [2, 4, 7, 10, 11]. Продукция коллагена у старых людей (80 лет и старше) по сравнению с кожей молодых людей (18–29 лет) снижается примерно на 75% [12], а уровень деградации коллагена (как и при фотостарении) повышается на 75% [7]. Причем наблюдается параллельное снижение содержания коллагена I и III типов, уменьшение соотношения количества III типа коллагена к коллагену I типа, коррелирующее с возрастом человека [13]. Однократное воздействие УФО на кожу в средних дозах (до ее легкого покраснения) приводит к снижению продукции коллагена на 80% [14]. При этом возврат к норме наблюдается в течение 48–72 часов. При таком же, но повторяющемся воздействии УФО подавля-

Таблица 1. Морфофункциональные изменения в коже при хронологическом старении (по Zouboulis С., Makrantonaki E., 2010)

Признаки	Изменение функции
<b>ЭПИДЕРМИС</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Уменьшение общей толщины на 10–50%</li> <li>Атрофия шиповатого слоя</li> <li>Увеличение гетерогенности кератиноцитов по форме и размерам</li> <li>Уменьшение в размерах и уплощение клеток базального слоя</li> </ul>	Повышение «уязвимости» кожи, склонность к повреждению
<ul style="list-style-type: none"> <li>Снижение митотической активности базальных кератиноцитов</li> <li>Увеличение продолжительности клеточного цикла и миграционного времени</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Снижение скорости десквамации</li> <li>Замедление заживления ран</li> </ul>
Снижение процессов обновления липидов	Ухудшение барьерной функции
Уплотнение дермоэпидермального соединения	Снижение контактной поверхности, увеличение риска разрыва при механических воздействиях
Снижение количества и гетерогенность меланоцитов	Появление седины, пятнистого амеланозиса, лентиго
Снижение количества клеток Лангерганса	Снижение иммунитета кожи
<b>ДЕРМА</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Уменьшение толщины</li> <li>Снижение количества фибробластов</li> <li>Атрофия межклеточного матрикса</li> </ul>	Снижение прочности, упругости, эластичности кожи
<ul style="list-style-type: none"> <li>Снижение числа и дезинтеграция коллагеновых и эластиновых волокон</li> <li>Отложение амилоида</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Активизация деформационных процессов</li> <li>Образование морщин</li> </ul>
Уменьшение числа и размеров кровеносных сосудов	<ul style="list-style-type: none"> <li>Снижение васкулярной реактивности кожи</li> <li>Нарушение терморегуляции</li> <li>Нарушение питания</li> </ul>
Уменьшение придатков кожи (сальных, потовых и апокриновых желез)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Снижение продукции кожного сала и пота</li> <li>Нарушение реэпителизации ран</li> </ul>
Уменьшение количества нервных окончаний	Нарушение сенсорных функций
<b>ГИПОДЕРМА</b>	
Уменьшение количества жира	Уменьшение термоизоляции и выработки энергии

ние продукции коллагена продолжает оставаться на низком уровне в течение длительного времени. При длительном УФ-облучении данные изменения в коже становятся необратимыми и приводят к нарушению опорного каркаса кожи и служат одной из основных причин образования морщин [1, 2, 15–17].

В фотоповрежденных областях общие для обоих типов старения кожи признаки усиливаются специфическими изменениями в ответ на УФО, в частности, массивным эластозом [18]. В фотоповрежденной коже наблю-

Таблица 2. Морфологические изменения кожи при фотостарении (по Zouboulis С., Makrantonaki E., 2010, дополненная авторами)

Признаки	Изменение функции
<b>ЭПИДЕРМИС</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Увеличение толщины эпидермиса при хронической солнечной инсоляции</li> <li>Истончение рогового слоя</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Повышение «уязвимости» кожи, склонность к повреждению</li> <li>Сухость кожи</li> </ul>
Нарушение пролиферации, дифференцировки и апоптоза кератиноцитов	Ксероз, гиперкератоз
Снижение процессов обновления липидов	Ухудшение барьерной функции
Уплотнение дермоэпидермального соединения	Снижение контактной поверхности, увеличение риска разрыва при механических воздействиях
Нарушение гомеостаза меланоцитов	Лентиго
Снижение количества клеток Лангерганса	Снижение иммунитета кожи
<b>ДЕРМА</b>	
Аккумуляция аномальных эластиновых волокон (эластоз)	Снижение эластичности кожи
Неупорядоченное распределение коллагеновых волокон (снижение анизотропии), дегградация коллагена	Снижение упругости и прочности кожи, образование морщин
Повышение уровня дисфункциональных гликозаминогликанов и протеогликанов	Дегидратация (обезвоживание) кожи, снижение ее тургора
Увелические количества мастоцитов и нейтрофилов	Хронический воспалительный процесс (субклиническое воспаление)
Значительная регрессия и дезорганизация кровеносных сосудов, увеличение толщины стенок посткапиллярных венул, артериальных/венозных капилляров	Снижение васкулярной реактивности кожи, нарушение терморегуляции и питания

дается 4-кратное увеличение продукции эластина и значительное снижение экспрессии фибриллина-1 и входящих с ним в состав микрофибрилл гликопротеинов MAGP-1 и MGP-4. Как следствие, наблюдается формирование неполноценных укороченных эластиновых волокон. Одновременно с этим усиливается экспрессия версикана — протеогликана, который в значительном количестве откладывается на образовавшемся аномальном эластиновом материале [15, 19]. Эта массивная аккумуляция эластоидных масс в верхнем и среднем слоях дермы наряду с повышенной дегградацией коллагена является главным патогистологическим признаком фотостарения кожи [11].

Следует отметить, что хронологическое старение может усугубляться нарушением эндокринного статуса организма, в частности, изменением уровней половых гормонов [20]. У женщин этот процесс охарактеризован как менопаузальное старение. Известно, что кожа, являясь эстрогенчувствительным органом, негативно реагирует на развивающийся с возрастом дефицит эстрогена, что

сопровождается истончением эпидермиса (вследствие снижения пролиферации базальных кератиноцитов), истончением дермы (за счет уменьшения содержания в ней коллагеновых и эластиновых волокон, гликозаминогликанов и протеогликанов) [21]. Так, показано, что в первые пять лет после периода менопаузы количество коллагена в коже уменьшается примерно на 30% [22].

### «Вклад» ДЕРМАЛЬНОГО СЛОЯ В ОБЩЕЕ СТАРЕНИЕ КОЖИ

Старение затрагивает все слои кожи. Отсюда следует, что коррекция возрастных изменений должна быть комплексной, т. е. направленной на разные «мишени» — кожные слои, клетки, биохимические реакции и т. п. Понятно, что для этого потребуются разные методы воздействия. С другой стороны, мы знаем, что клетки кожи активно контактируют друг с другом, поэтому, воздействуя на одно клеточное звено напрямую, можно косвенно повлиять и на другие. Что же может быть такой «универсальной мишенью»?

Надо признать, что 100%-го ответа на этот вопрос пока нет. Но сегодня у нас есть результаты множества лабораторных и клинических исследований, свидетельствующих о ключевой роли дермального слоя и его основных клеток — фибробластов — в возрастных изменениях, происходящих в коже.

При старении меняются число, морфология, пролиферативный потенциал, функциональная активность фибробластов [1, 2, 7, 12]. И если при хронологическом старении характерным является изменение и пролиферативной, и биосинтетической активности фибробластов дермы, то при фотостарении «страдает» преимущественно биосинтетическая функция [15, 21].

Фибробласты дермы — это гетерогенная клеточная популяция, включающая весь фибробластический дифферон от стволовой стромальной клетки (мультипотентной мезенхимной стволовой клетки), прогениторных клеток (клеток – предшественниц фибробластов) до конечно дифференцированного фиброцита (рис. 1) [1]. Фибробласты контролируют состав и структуру межклеточного матрикса (МКМ) путем регулируемого по принципу обратной связи синтеза коллагена, эластина и основного вещества, а также путем участия в разрушении этих компонентов [23]. Соответственно нарушение физиологического баланса в этой клеточной популяции приводит к значительным изменениям как в микро-, так и макроструктуре кожи.

#### Фибробласты с «фенотипом старения»

По мере старения в структуре фибробластического дифферона кожи происходит уменьшение численности клеток: общее количество фибробластов в коже людей в возрасте от 80 лет и старше снижено в среднем на 35% по сравнению с людьми в возрасте 18–29 лет [12].

Есть предположение, что причиной возрастного уменьшения численности популяции фибробластов дермы является ослабление про-



Рис. 1. Общая схема фибробластического дифферона дермы

цесса мобилизации стволовых клеток или уменьшение числа стволовых клеток, способных отвечать на стимулирующие к пролиферации сигналы [24], а это неизбежно приводит к снижению количества дифференцированных клеток [25]. Возмещение утраченных клеток у пожилых людей происходит лишь частично [18].

По данным многочисленных исследований, другой причиной популяции фибробластов дермы является снижение их пролиферативного потенциала, а также апоптоз (программированная гибель клетки, играющая ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза) [15, 18, 26–28]. Данные изменения в клеточной популяции, по всей видимости, являются итогом реализации генетической программы, определяющей стабильность генома и динамику экспрессии различных генов на разных стадиях онтогенеза [18]. Так, с возрастом в фибробластах отмечается активация гена TP53, контролирующего репликативное старение клеток [29]. Кодированный этим геном специфический транскрипционный фактор — белок p53, получая сигналы о повреждении генетического аппарата клетки, индуцирует как остановку клеточного цикла (для репарации генома), так и апоптоз, что приводит к уменьшению численности популяции фибробластов в коже.

С возрастом происходят изменения и в цитофизиологии фибробластов. Так, наблюдается увеличение линейных размеров фибробластов, повышение содержания белков цитоскелета и их уплотнение, увеличивается удельное содержание микротрубочек и их организационных центров, промежуточных филаментов, образующих фибриллярные структуры в виде слоев и тяжей [10]. Выявленные изменения цитоскелета фибробластов могут способствовать нарушению миграционных способностей, нарушению их фокальных контактов с коллагеновым МКМ, что приводит к снижению пролиферативной и биосинтетической активности клеток [30–32].

*Нарушение экспрессии генов приводит к развитию значительных изменений в дермальных фибробластах, и эти изменения настолько серьезны, что приводят к полной перестройке физиологии клеток, итогом которой и является формирование популяции клеток с «фенотипом старения».*

Фибробласты человека имеют ограниченную продолжительность жизни [26, 31, 33–37]. Так, при культивировании *in vitro* фибробласты пожилых доноров, по сравнению с молодыми, подвергаются более быстрому старению, один из основных показателей которого — снижение скорости удвоения культуры [31]. Наблюдается также отставание и в числе клеточных делений: фибробласты молодых доноров характеризуются большим количеством митозов (в 2 раза), благодаря чему одна клетка (и таких клеток — 60%) способна образовать колонию в 256 и более фибробластов, а в случае пожилых доноров — лишь 2% клеток формируют колонии подобного объема [31, 37]. Это свидетельствует о том, что фибробласты после прохождения определенного количества делений (лимит Хейфлика) теряют способность к пролиферации и вступают в период клеточного старения [35]. При завершении репликативного жизненного пути наблюдается остановка роста клеток в G1 фазе, что сопровождается их неспособностью реагировать на физиологические митогены переходом в фазу синтеза ДНК (S1). Фенотип таких неспособных к делению фибробластов получил название «фенотип старения» [27]. Наряду с необратимой остановкой роста подобные клетки характеризуются нарушением дифференцировочных функций [38], резистентностью к апоптозу [27], изменением морфологии и биосинтетической активности [39]. Выявлено, что в такой возрастзависимой редукции пролиферации фибробластов и соответственно старении клеток ведущую роль играют генетические факторы. В частности, наряду с активацией гена TP53 наблюдается селективная репрессия ряда рост-регулирующих генов, экспрессия которых важна для перехода клетки из фазы G1 в S1 — *c-fos*-*proto-oncogene* [40], *Id-1*, *Id-2* компонентов транскрипционного фактора E2F [41]. В то же время экспрессия генов, кодирующих негативные регуляторы роста p21 и p16 (ингибиторы циклин-зависимых протеинкиназ), значительно повышена [42].

По мнению многих исследователей, одним из основных механизмов, вызывающих репликативное старение фибробластов (не экспрессирующих, как и остальные соматические клетки, фермент теломеразу), является укорочение длины теломер — концевых отделов хромосом [36, 43, 44]. Теломеры представляют собой повторяющиеся последовательности шести пар оснований TTAGGG, необходимых для поддержания целостности генома клетки [43]. Длина теломер фибробластов кожи человека с каждым делением клетки уменьшается приблизительно на 150 оснований [45], что способствует ограничению числа клеточных делений, составляющих в среднем  $50 \pm 10$  [35]. Полагают, что укорочение длины теломер действует подобно митотическим часам, отсчитывающим количество клеточных делений [36].

Критическое укорочение длины теломер приводит к активации субтеломерных генов, которые, в свою очередь, инициируют ответ клетки на повреждение ДНК — остановку клеточного цикла, фенотип старения клетки или ее апоптоз (в зависимости от физиологического состояния клетки) [12, 45–47]. Определяющую роль в этом процессе играет транскрипционный фактор p53, регулирующий клеточный цикл. Каким именно образом p53 влияет на процесс старения — через запуск апоптоза, остановку репарации клетки или через все вышеупомянутые механизмы, пока остается не известным. Несомнен-

но одно — клеточное старение связано с функционированием белка p53, образное название которого — *guardian of the genome*, «хранитель генома» [48]. Известно, что в процессе старения активность p53 значительно возрастает (в фибробластах молодых людей данный белок содержится практически в следовых количествах [49]). Так, в культуре фибробластов дермы, характеризующейся «фенотипом старения», обнаружено почти 10-кратное увеличение экспрессии p53 [46].

Помимо уменьшения длины теломер, необратимую остановку клеточного цикла могут инициировать и другие повреждения ДНК, вызываемые как внешними (УФО, генотоксические вещества), так и внутренними (репликативные ошибки, спонтанные точечные мутации и др.) причинами [39, 46]. Одним из основных факторов, запускающим данные процессы, является окислительный стресс, играющий важную роль в развитии обоих типов старения кожи [50]. Окислительный стресс определяется аккумуляцией активных форм кислорода (АФК) и снижением антиоксидантной активности клеток [50–52]. Подтверждением наличия взаимосвязи между внутриклеточными активными формами кислорода (АФК) и старением клеток служат эксперименты, в которых повышение в культуре концентрации перекиси водорода вызывает быструю остановку пролиферации клеток [53], а также индукцию преждевременного старения фибробластов, выделенных из кожи молодых людей [36]. Выявлено, что дермальные фибробласты пожилых людей, по сравнению с молодыми, проявляют большую чувствительность к окислительному стрессу.

При хронологическом старении основным источником АФК (в отличие от фотостарения, при котором АФК образуются в результате воздействия на кожу УФО) являются митохондрии клеток, в которых эти соединения образуются в результате аэробных энергетических процессов [54]. АФК, повреждая ядерную ДНК, вызывают индукцию сигнальных путей, приводящую к необратимой остановке клеточного цикла, фенотипу старения клетки и (или) апоптозу [53]. Данные соединения способны оказывать также и непосредственное влияние на органеллы клетки, в частности, вызывать модификацию клеточных белков [54], что способствует снижению клеточных функций и окислению клеточной мембраны, приводящую к снижению эффективности трансмембранного транспорта и повреждению трансмембранных сигнальных путей [15].

**Следовательно, ключевыми молекулярными механизмами старения популяции фибробластов дермы, а соответственно и старения кожи могут служить прохождение клетками определенного количества делений и активация генов-онкосупрессоров, центральную роль в которой играют сигнальные пути ответа на повреждение ДНК, инициирующие остановку клеточного цикла, старение клеток и (или) апоптоз.**

#### Деградация межклеточного матрикса дермы

Патофизиология процесса старения кожи, заключающаяся в нарушении регуляции множества механизмов поддержания структурной целостности соединительной ткани, может быть сведена к изменениям в популяции фибробластов дермы, снижению их пролиферативной и биосинтетической активности, что закономерно приводит к редукции количественного и качественного состава

МКМ дермы [18]. Прежде всего эти изменения затрагивают основной структурный белок дермы — коллаген [52].

По мнению ведущих исследователей, нарушение гомеостаза коллагенового каркаса является отличительной характеристикой кожи при обоих типах старения [2, 12]. В основе этих изменений лежит молекулярный механизм активации в фибробластах транскрипционного фактора AP-1 (транскрипционного комплекса, включающего белки c-fos- и c-jun-семейств), который является центральным индуктором нарушения гомеостаза коллагена в коже и представляет собой ключевое звено в патогенезе обоих типов старения (рис. 2) [7]. AP-1, регулируя гены, кодирующие специфические ферменты — матриксразрушающие металлопротеиназы MMP-1, MMP-3 и MMP-9, индуцирует повышение их экспрессии [18, 55]. Как следствие, происходит деградация (фрагментация) матриксного коллагена дермы [50]. Одновременно с этим активация AP-1 сопровождается снижением синтеза проколлагенов I и III типов (за счет блокировки эффектов трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ , способствующего биосинтезу коллагена) [7]. Так, в фибробластах кожи пожилых людей, по сравнению с молодыми, выявлено значительное снижение экспрес-

*Нарушение гомеостаза коллагенового каркаса является отличительной характеристикой кожи при обоих типах старения.*

сии генов проколлагена, повышение экспрессии генов металлопротеиназ [51]. При фотоповреждении данный процесс усугубляется еще и вследствие непосредственной активации AP-1 ультрафиолетовыми лучами [7].

В результате с возрастом (к 80 годам по сравнению с 18–29 годами) наблюдается:

- снижение продукции коллагена (в среднем в 3 раза) [12];
- повышение уровня фрагментированного коллагена (в среднем также в 3 раза) [7];
- изменение структуры коллагена — он становится значительно более жестким и более беспорядочно ориентированным [56].

Этот существенный для кожи процесс еще более усугубляется необратимой модификацией коллагенов за счет образования в них новых поперечных связей, роль которых выполняют так называемые AGEs-продукты (Advanced Glycosylation End-products — продукты неферментативных реакций гликозилирования между восстановленными сахарами и аминокетонами долгоживущих белков — коллагенов), накапливающиеся с возрастом в МКМ [18].

Состояние коллагенового матрикса в свою очередь оказывает значительное влияние на функции фибробластов [2]. В частности, показано, что физические свойства коллагеновых волокон оказывают непосредственное влияние на функциональную активность фибробластов дермы [57]. Известно, что интегрины (гетеродимерные трансмембранные белки), находящиеся на поверхности фибробластов, группируясь, образуют комплексы фокальной адгезии (фокальные контакты) между фибробластами и окружающим их коллагеновым матриксом [7, 18]. Формирование этих комплексов приводит к активации каскада внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих метаболизм фибробластов, включая баланс между процессами синтеза коллагена и его деградацией матриксными металлопротеиназами [2]. Фокальные контакты ответственны за образование непосредственной связи между цитоскелетом клеток и коллагеновыми волокнами, обеспечивая между ними динамическое механическое натяжение. Благодаря последнему фибробласты имеют возможность находиться в растянутом состоянии, которое является обязательным условием для их метаболической и пролиферативной активности (рис. 3) [11]. Наблюдающаяся же в процессе старения (как хронологического, так и фотостарения) фрагментация коллагена приводит к нарушению целостности коллагенового матрикса, что сопровождается нарушением фокальных контактов между матриксом и фибробластами. Последнее лишает клетки возможности растягиваться, приводя к так называемому «коллапсу» [2], что соответственно сопровождается нарушением их функций, в частности, подавлением синтеза коллагена и увеличением продукции металлопротеиназ. Исследования по измерению механической силы, создаваемой фибробластами, проведенные в трехмерной коллагеновой камере, подтверждают, что снижение синтеза коллагена и повышение продукции металлопротеиназ могут наблюдаться вследствие уменьшения механического растяжения клеток [58].



Рис. 2. Схема основных сигнальных путей, участвующих в процессе нарушения гомеостаза коллагена

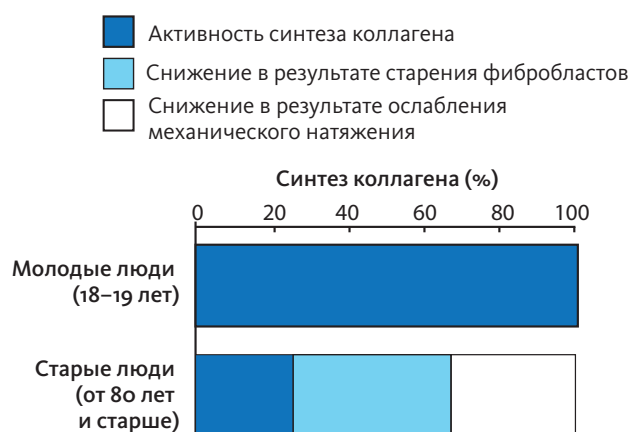
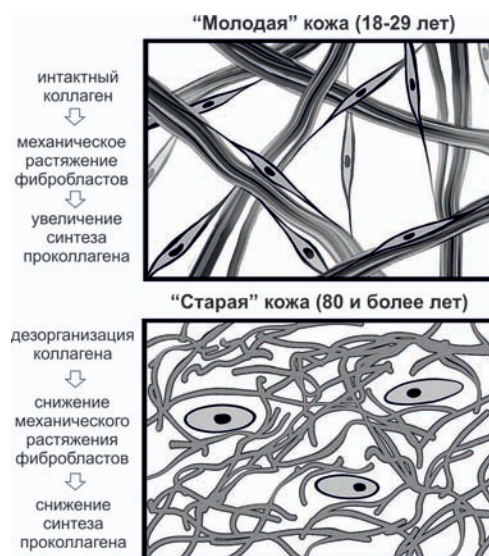


Рис. 3. Взаиморасположение фибробластов и коллагеновых волокон в дерме [12]: А — в «молодой» коже (18-29 лет); Б — в «старой» коже (более 80 лет)



## ПРИМЕНЕНИЕ SPRS-ТЕРАПИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЖИ

Наблюдающиеся при старении изменения кожи непосредственно связаны с ее основным клеточным компонентом — фибробластами и синтезируемым ими межклеточным матриксом. Причем взаимоотношения между фибробластами и окружающим их матриксом настолько многосторонни, что, по мнению Н.П. Омеляненко (2009), их следует рассматривать не как взаимодействие, а как взаимозависимость [18]. Понимание молекулярных механизмов и патофизиологии процессов, происходящих в коже при старении, дает возможность целенаправленно использовать существующие в эстетической медицине методы и соответственно эффективно и безопасно корректировать сопровождающие старение структурные дефекты кожи.

Одним из таких методов является внутрикожная трансплантация дермальных аутологических фибробластов, которые, ремоделируя микроструктуру дермы посредством увеличения количества функционально активных клеток и образования новых коллагеновых волокон, позволяют эффективно корректировать возрастные изменения кожи.

### История метода

Впервые аутологичные дермальные фибробласты в эстетической медицине (для коррекции морщин и рубцов-постакне) применили в 1994 году ученые компании Isolagen (ныне Fibrocell), продемонстрировав эффективную коррекцию дефектов кожи за счет увеличения ее толщины и снижения ее рельефности [59]. Успешно проведя 3 фазы многоцентровых слепых рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследований, в июне 2011 года компания Fibrocell получила лицензию FDA на применение данной технологии для коррекции морщин [60]. В России применение дермальных ауто-

фибробластов было официально разрешено с июля 2010 года [61], и в январе 2011 года технология выведена на российский рынок эстетической медицины Институтом стволовых клеток человека под названием «SPRS-терапия».

### Суть технологии SPRS-терапия

Из биоптата кожи пациента (из-за ушной раковины, диаметром 3-5 мм) в специальных лабораторных условиях (класса GMP) получают клеточный препарат, содержащий культивированные дермальные аутологичные фибробласты.

Наличие в популяции фибробластов кожи прогениторных клеток (клеток-предшественниц фибробластов) позволяет, независимо от возраста пациента, получить необходимое для терапии количество функционально-активных клеток. Прогениторные клетки пула дермальных фибробластов (см. рис. 1) обладают достаточно высоким пролиферативным потенциалом — первичные культуры, полученные даже от очень пожилых людей (95 лет), содержат до 14% митотически активных фибробластов [62]. С увеличением возраста в популяции дермальных фибробластов, находящихся под контролем генетических и эпигенетических факторов, отмечается снижение пролиферативного потенциала [15, 18, 26, 27]. В условиях же *in vitro* этот контроль, по всей видимости, нивелируется (или ослабевает) и наблюдается активация пролиферативной активности клеток — предшественниц фибробластов [62]. Данному процессу в немалой степени способствуют и ростовые факторы/цитокины, входящие в состав стандартной питательной среды, используемой при культивировании фибробластов [63]. В результате в условиях *in vitro* из небольшого биоптата кожи можно получить необходимое для проведения эффективной клеточной терапии количество функционально-активных клеток. В культуре дермальные аутофибробласты обладают способностью активно синтезировать компоненты межклеточного матрикса, включая коллаген, эластин, гликозаминогликаны, факторы роста [64-66].



Рис. 4. Алгоритм интрадермального введения клеточного материала

Полученный клеточный препарат (при строго контролируемых условиях) доставляют в косметологическую клинику, где пациенту проводят курс терапии, состоящий из двух процедур с интервалом месяц. Клеточный материал вводят по специальной методике (интрадермально — в папиллярный слой дермы, туннельным способом, с помощью игл для мезотерапии (30G, 13 мм)), что позволяет равномерно с адекватной плотностью во всей области кожи, требующей коррекции, пополнить пул резидентных фибробластов функционально активными клетками [59, 67] (рис. 4).

#### Результаты лабораторных и клинических исследований

После трансплантации в кожу биосинтетические потенции культивированных клеток сохраняются (рис. 5) и клетки активно и в течение длительного времени (не менее 12 месяцев) продуцируют компоненты межклеточного матрикса дермы [64, 65, 67]. При этом отмечается стимуляция активности и самих резидентных фибробластов [66]. В результате наблюдается ремоделирование микроструктуры кожи: увеличиваются содержание коллагеновых и эластиновых волокон (рис. 6, 7), гидратация и объем дермы (рис. 8), усиливается эпидермальный морфогенез [66, 67]. Визуально данные изменения в микроструктуре дермы проявляются увеличением толщины, упругости и эластичности кожи, уменьшением количества и глубины морщин, улучшением цвета и контуров лица [59, 64, 65, 67].

#### Заключение

Таким образом, применение аутологичных дермальных фибробластов позволяет малоинвазивным способом за счет биологических механизмов собственных клеток, ремоделируя микроструктуру дермы, эффективно корректировать возрастные дефекты кожи.

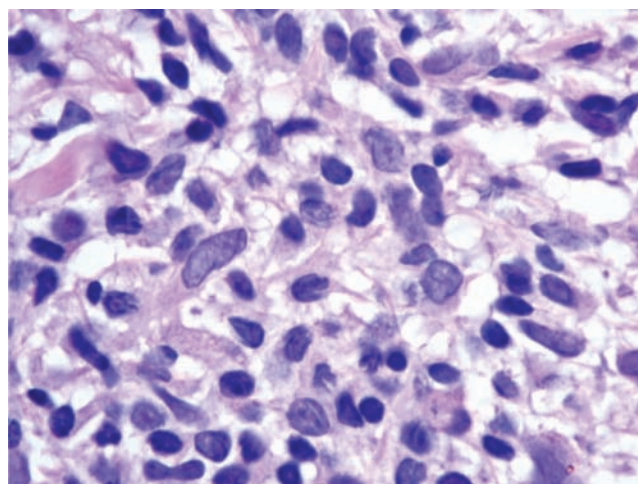


Рис. 5. Трансплантированные дермальные АФ (пациент М) и вновь синтезированные компоненты МКМ (через 1 месяц после применения). Окраска: гематоксилин, эозин. Ув. х1000

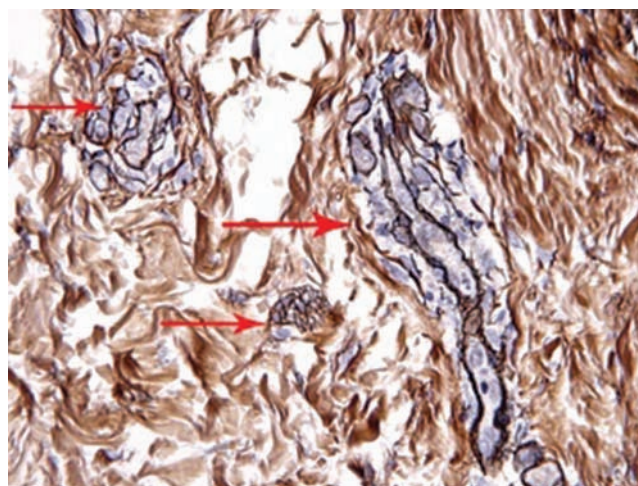


Рис. 6. Участки активного коллагеногенеза в дерме (пациент С) через 1 месяц после интрадермального введения аутологичных фибробластов. Стрелками отмечены новообразованные коллагеновые волокна. Импрегнация нитратом серебра по Гордону, ув. х 40

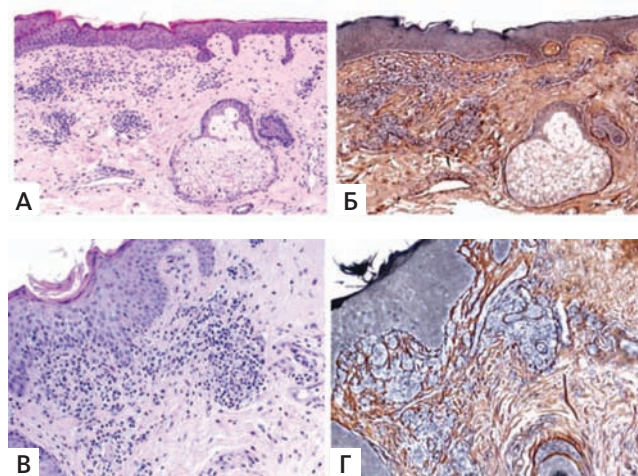


Рис. 7. Группы трансплантированных аутофибробластов через 6 (А, В) и 12 (В, Г) месяцев. Формирование молодых коллагеновых волокон. Окраска: А, В — гематоксилин, эозин; Б, Г — импрегнация нитратом серебра. Увеличение: А, Б — х100; В, Г — х 200

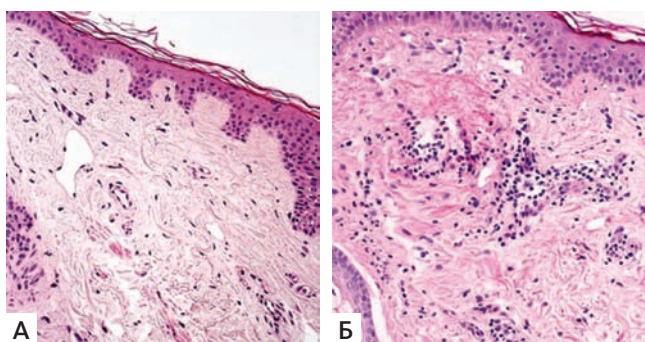


Рис. 8. Увеличение объема и гидратации дермы (пациент М): А — до и Б — через 1 месяц после введения интрадермального введения аутологичных фибробластов. Окраска: гематоксилин, эозин, ув. х 200

## ЛИТЕРАТУРА

- Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009; 276: 161–214.
- Fisher G., Varani J., Voorhees J. Looking older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol*. 2008; 144(5): 666–672.
- Capri M, Salvioli S, Sevini F., et al. The genetics of human longevity. *Ann New York Acad Sci*. 2006; 1067: 252–263.
- Fisher G., Voorhees J. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J*. 1996; 10: 1002–1013.
- Хертель Б. Молекулярные и клеточные механизмы естественного старения и фотостарения (стрессорные факторы, защитный механизм). *Косметика и медицина*. 2000; 4: 5–17.
- Zhong J., Hua N., Xiong X., et al. A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF- $\beta$ /Smad and p38 MAPK signaling pathway. *Med Hypotheses*. 2011; 76(3): 343–346.
- Fisher G., Kang S., Varani J., et al. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002; 138: 1462–1467.
- Miyamura Y., et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*. 2007; 20: 1–13.
- Varani J., Schuger L., Dame M., et al. Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest. Dermatol*. 2004; 122: 1471–1479.
- Reed M.J., Ferrara N.S., Vernon R.B. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech. Ageing Dev*. 2001; 122(11): 1203–1220.
- Varani J., Warner R., Gharaee-Kermani M., et al. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol*. 2000; 114: 480–486.
- 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. *Am J Pathol*. 2006; 168(6): 1861–1868.
- Смирнова И.О. Функциональная морфология старения кожи. *Успехи геронтологии*. 2004; 13: 44–45.
- Fisher G. The pathophysiology of photoaging of the skin. *Cutis* 2005; 75 (2 Suppl): 5–8.
- Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Develop* 2002; 123: 801–810.
- Quan E., Qin Z., Shao Y. et al. Retinoids suppress cysteine-rich protein 61 (CCN1), a negative regulator of collagen homeostasis, in skin equivalent cultures and aged human skin in vivo. *Exp Dermatol*. 2011; 20(7): 572–576.

**SPRS**  
ТЕРАПИЯ

Инновации в эстетической медицине

[www.sprs-therapy.ru](http://www.sprs-therapy.ru)

**Естественное восстановление кожи**



**SPRS-терапия -**

уникальный комплекс  
диагностических и лечебных  
процедур для восстановления  
структуры и функций кожи  
с признаками возрастных  
и других изменений,  
основанный на применении  
собственных клеток кожи -  
фибробластов.

ОАО "Институт Стволовых Клеток Человека"  
Лицензия ФС-99-01-005845, разрешение ФС 2009/398

Имеются противопоказания. Необходима консультация специалистов.



17. Varani, J., Fisher, G.J., Kang, S., Voorhees, J. Molecular mechanisms of intrinsic skin ageing and retinoid induced repair and reversal. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1998; 3(1): 57–60.
18. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. В книге: Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М.: Известия, 2009; 1: 69–70.
19. Makarantonaki E. and Zouboulis C. Molecular mechanisms of skin aging state of the art *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1119: 40–50.
20. Турова Е. Интегрированный подход к теориям старения. Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2007; 5: 51–53.
21. Аравийская Е.Р. Изменения в перименопаузе: принципы современной комплексной коррекции. *Клин дерм и вен.* 2007; 2: 97–100.
22. Brinca M. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* 2000; 35(2): 107–117.
23. Жукова О., Потехаев Н., Стенько А., Бурдина А. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клиническая дерматология и венерология.* 2009; 3: 4–9.
24. Zouboulis C., Adjaye J., Akamatsu H., et al. Human skin stem cells and the ageing process. *Experimental gerontology.* 2008; 43: 986–997.
25. Sharpless N., DePinho R. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8(9): 703–713.
26. Cristofalo V.J., Pignolo R.J. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* 1993; 73: 617–638.
27. Wang, E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 1995; 55: 2284–2292.
28. Lane D.P. Worrying about p53. *Curr Biol.* 1992; 2(11): 581–583.
29. Смирнова И.О., Кветной И.М., Князькин И.В. Нейроиммуно-эндокринология кожи и молекулярные маркеры ее старения: Монография. 2005, «Деан», 288 с.
30. Schulz C., Wetze F., Kueper T., et al. Stiffening of Human Skin Fibroblasts with Age. *Biophys J.* 2010; 99: 2434–2442.
31. Schneider E.L., Mitsui Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *PNAS USA* 1976; 73(10): 3584–3588.
32. Soukupova M., Holecova E. The latent period of explanted organs of newborn, adult and senile rats. *Exp. Cell Res.* 1964; 33: 361–367.
33. Cristofalo V., et al. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation (cell proliferation/cell senescence/aging). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 95: 10614–10619.
34. Daniel C.W. Aging of cells during serial propagation in vivo. *Adv. Gerontol. Res.* 1972; 4: 167–199.
35. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965; 37: 614–636.
36. Makpol S., Abidin A., Sairin K. et al. Tocotrienol prevents oxidative stress-induced telomere shortening in human fibroblasts derived from different aged individuals. *Oxidat Med Cell Longev* 2010; 3(1): 35–43.
37. Smith J.R., Pereira-Smith O.M., Schneider E.L. Colony size distributions as a measure of in vivo and in vitro aging. *PNAS USA* 1978; 75(3): 1353–1356.
38. Campisi J. Replicative senescence: an old wives tale. *Cell* 1996; 84: 497.
39. Jun J., Lau L. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology.* 2010; 12(7): 676–685.
40. Sesadri T., Campisi J. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 1990; 247: 205–209.
41. Hara E., Yamaguchi T., Nojima H., et al. Id related genes encoding helix loop helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2139–2145.
42. Hara, E., Uzman, J.A., Dimri, G.P., et al. The helix-loop-helix protein Id-1 and retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts. *Dev. Genet.* 1996; 18: 161–172.
43. Buckingham E., Klingelutz A. The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol* 2011; 20: 297–302.
44. Sugimoto M., Yamashita R., Ueda M. Telomere length of the skin in association with chronological aging and photoaging. *J. of dermatological Science.* 2006; 43: 43–47.
45. Kosmadaki M., Gilchrist B. The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron* 2004; 35: 155–159.
46. Vaziri H., Benchimol S. from telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss / DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 1996; 31: 295–301.
47. Deng Y., Chan S., Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(6): 450–458.
48. Vazquez A., Bond E., Levine A., et al. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008, 7(12): 979–987.
49. Tao W., Levine A.J. p19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(12): 6937–6941.
50. Kohl E., Steinbauer J., Landthaler M., Szeimies R.-M. Skin ageing. *J EADV* 2011; 25(8): 873–884.
51. Han K.-H., et al. Alteration of the TGF- $\beta$ /SMAD pathway in intrinsically and UV-induced skin aging. *Mech Ageing Develop* 2005; 126: 560.
52. Zouboulis C., Makrantonaki E. Clinical aspect and molecular diagnostics of skin aging. *Clin in Dermatol* 2011; 29: 3–14.
53. Chen Q., Bartolomeo J., Campisi J., et al. Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J.* 1998; 332: 43–50.
54. Balaban R., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120(4): 483–495.
55. Situm M., Buljan M., Cavka V., Bulat V., Krolo I., Mihić L.L. Skin changes in the elderly people – how strong is the influence of the UV radiation on skin aging? *Coll Antropol.* 2010; 34 (Suppl 2): 9–13.
56. Lavker R., Zheng P., Dong G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol.* 1987; 88: 44–51.
57. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003; 13(5): 264–269.
58. Delvoe P., Wiliquet P., Leveque J.-L., et al. Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol.* 1991; 97: 898–902.
59. Weiss R.A., et al. Autologous cultured fibroblast injection for facial contour deformities: a prospective, placebo-controlled, Phase III clinical trial. *Dermatol Surg.* 2007; 33 (3): 263–268.
60. [http://www.fibrocellscience.com/media/2011/2011\\_06\\_22.htm](http://www.fibrocellscience.com/media/2011/2011_06_22.htm)
61. 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.
62. Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. *Онтогенез* 1995; 26(1): 22–37.
63. Kuznetsov S., Mankani M., Bianco P., Robey P. Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Res* 2009; 2: 83–94.
64. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъекцируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюл. эксп. биол. мед.* 2000; 130(8): 203–206.
65. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. *Вест эст мед.* 2008, 7(2): 72–78.
66. Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Калинина Н.И. и др. Аутологичные фибробласты дермы: перспективы применения в медицине. В кн.: Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. Под ред. В.А. Ткачука. Руководство для врачей. М.: Литтерра, 2009; с. 222–233.
67. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов. *Вест эст мед.* 2011; 10(2): 16–26.
68. Zhao Y., al. Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell Transplant* 2008; 17: 775.