

Метод коррекции возрастных изменений кожи с применением аутологичных дермальных фибробластов

А.И. ЗОРИНА¹, В.Л. ЗОРИН, В.Р. ЧЕРКАСОВ, А.А. ИСАЕВ

Институт стволовых клеток человека, Москва

A method for correction of age-related skin changes by using autologous dermal fibroblasts

A.I. ZORINA, V.L. ZORIN, V.R. CHERKASOV, A.A. ISAEV

Institute of Human Stem Cells, Moscow

Цель исследования — получение дополнительных результатов о длительности клинического эффекта, биосинтетической активности трансплантированных фибробластов и механизмах качественных/количественных изменений, происходящих в коже человека после применения данного метода. В исследовании приняли участие 17 пациентов в возрасте 45—65 лет с возрастными изменениями кожи лица (наличием морщин, снижением упругости кожи). Срок наблюдения составил 2 года.

Ключевые слова: возрастные изменения кожи, методы коррекции, аутологичные дермальные фибробласты (аутоДФ).

The study was undertaken to obtain additional data on the duration of the clinical effect and biosynthetic activity of grafted fibroblasts and the mechanisms of qualitative/quantitative changes occurring in the human skin after the application of the method. Seventeen patients aged 45—65 years with age-related facial skin changes (wrinkles, reduced skin turgor) participated in the study. The follow-up period was 2 years.

Key words: age-related facial skin changes, correction methods, autologous dermal fibroblasts.

Дермальные фибробласты (ДФ) представляют собой основной клеточный компонент соединительнотканной основы кожи, обеспечивающий ее гомеостаз и морфофункциональную организацию.

Фибробласты выполняют в коже ряд разнообразных и сложных функций: контролируют состав и структуру компонентов межклеточного матрикса дермы (коллагена, эластина, протеогликанов и структурных гликопротеинов), причем в их функцию входит не только продукция этих веществ, но и их катаболизм путем прямого фагоцитоза фибрилл или секреции коллагеназы, катепсинов и гиалуронидазы [1]. Формируемая фибробластами строма образует физический каркас, служащий опорой для эпителия, а также играет регуляторную роль в определении структуры и функции эпителиальных клеток [2]. За счет секреции факторов роста, таких как фактор роста кератиноцитов, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста, интерлейкин 6 и 8, и непосредственного взаимодействия с эпителиальными клетками фибробласты играют ключевую роль в регуляции эпидермального морфогенеза. Продуцируя коллаген IV типа и ламинин, они влияют на формирование ба-

зальной мембраны [3—5]. Фибробласты секретируют факторы, влияющие на дифференцировку лимфоцитов, регулирующие численность, миграцию и функции гранулоцитов и макрофагов, тем самым играя важную роль в поддержании иммунитета кожи [1, 6, 7].

Фибробласты дермы активно участвуют в ангиогенезе: продуцируют многие проангиогенные факторы (VEGFs, FGFs, TGF- β_1 , HGF/SF и ангиопоэтин-1), которые индуцируют дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, способствуют образованию и стабилизации сосудов [8, 9]. Они участвуют в процессах нейроэндокринной регуляции кожи: синтезируют биологически активные пептиды — гормоны, биогенные амины, нейропептиды и неротрансмиттеры, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринной системах, пролактин, идентичный гипоталамическому, гормон роста, 17- β -эстрадиол; экспрессируют рецепторы андрогенов и эстрогенов, посредством которых осуществляется влияние этих гормонов на кожу человека [10—14].

Таким образом, ДФ не только поддерживают гомеостаз межклеточного матрикса дермы, обеспечи-

вая его ремоделирование и обновление, но также играют значительную роль в поддержании физиологического состояния других слоев кожи.

По мере старения в популяции фибробластов кожи уменьшается численность клеток (по данным J. Varani и соавт. [15], в коже старых людей фибробластов в среднем на 35% меньше, чем в коже молодых), снижается их биосинтетическая активность (по данным G. Fisher и соавт. [16], продукция коллагена в коже старых людей в среднем снижена на 75%), нарушается баланс между процессами синтеза и деградации межклеточного матрикса дермы. Следствием этих процессов, проявляющимся с возрастом, становятся изменение статуса кожи, уменьшение толщины кожи, снижение ее упругости и эластичности, образование морщин.

Имеющиеся данные позволяют заключить, что процесс возрастных изменений кожи сводится к уменьшению численности популяции фибробластов и снижению их пролиферативной/синтетической активности, что закономерно проявляется в уменьшении количественного и качественного состава межклеточного матрикса дермы. В связи с этим очевидно, что именно ДФ представляют собой основной эффектор и точку приложения терапевтического воздействия при коррекции возрастных изменений кожи.

В настоящее время для коррекции возрастных изменений кожи используют ряд методов (мезотерапию, биоревитализацию, пилинги, фракционный фототермолиз, радиоволновую терапию, дермабразию и др.), основной целью которых является стимуляция функциональной (как пролиферативной, так и биосинтетической) активности ДФ. Особое место в этом ряду занимает метод регенеративной медицины, основанный на применении культивированных аутологичных ДФ (аутоДФ). Его особенность заключается в том, что он позволяет восполнить уменьшившуюся с возрастом популяцию фибробластов привнесением в кожу специализированных функционально активных клеток.

В 1994 г. американские ученые [17] установили, что введение в кожу аутоДФ способствует эффективной коррекции морщин. Американские и российские ученые [18–21] провели ряд клинических исследований, результаты которых подтвердили эффективность и безопасность применения аутоДФ в эстетической медицине, благодаря чему в настоящее время данная технология получила мировое признание. Так, в 2010 г. в России ОАО «Институт стволовых клеток человека» получил разрешение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения на применение данной технологии для коррекции возрастных и рубцовых изменений кожи [22] (технология «SPRS-терапия» — service for personal regeneration of skin). В США в 2011 г. FDA выдал разрешение компании «Fibrocell Science» на приме-

нение аутоДФ для коррекции морщин в области носогубных складок (технология LAVIV, azfidel-T) [23].

Описание технологии

Из 3–5 мм биоптата кожи пациента в специализированной лаборатории, соответствующей международным стандартам GMP, получают клеточный препарат, содержащий культивированные аутоДФ. Препарат содержит 15×10^6 функционально активных фибробластов в 1 мл физиологического раствора для инъекций. Курс терапии кожи состоит из 2 процедур с интервалом 1 мес, непосредственно перед проведением каждой из которых полученную клеточную суспензию (SPRS-препарат) при строго контролируемых условиях доставляют в косметологическую клинику. АутоДФ вводят интрадермально — в папиллярный слой дермы туннельным способом, с помощью игл для мезотерапии (30 G, 13 мм), что позволяет равномерно с адекватной плотностью на всем участке кожи, требующей коррекции, пополнить пул резидентных фибробластов функционально активными клетками [17, 18, 20, 24]. При этом отмечается стимуляция активности самих резидентных фибробластов [25].

Имунофенотипический анализ культур аутоДФ выявил отсутствие в них гемопоэтических (CD34–, CD45–) и эпителиальных (цитокератинов 14, 15, 16, 19) маркеров (рис. 1, а) и наличие маркеров, подтверждающих мезенхимное происхождение применяемых клеток (CD73+, CD90+, CD105+, виментин; рис. 1, б).

Независимо от возраста (нами проанализированы культуры аутоДФ пациентов 18–72 лет) отмечена высокая экспрессия основных белков, продуцируемых аутоДФ, — коллагенов (I и III типа) и эластина (рис. 2).

В процессе клеточного взаимодействия осуществляется отбор и стимуляция только функционально активных фибробластов, сохранивших высокую способность к делению и синтезу важных для кожи компонентов. Это происходит из-за наличия в коже стволовых/прогениторных клеток, благодаря которым, как показали исследования *in vitro*, пролиферативный потенциал популяции дермальных фибробластов взрослого человека в течение всей его жизни остается на высоком уровне: первичные культуры, полученные от очень старых людей (95 лет), содержат до 14% митотически активных фибробластов [26]. Данный факт подтверждается и результатами наших исследований: полученные культуры фибробластов дермы от пациентов 18–72 лет характеризуются довольно высокой эффективностью колониеобразования ($45,0 \pm 9,5\%$) [20], величина которой практически не зависит от возраста пациента. Это позволяет из небольшого биоптата кожи взрослого человека, независимо от его возраста,

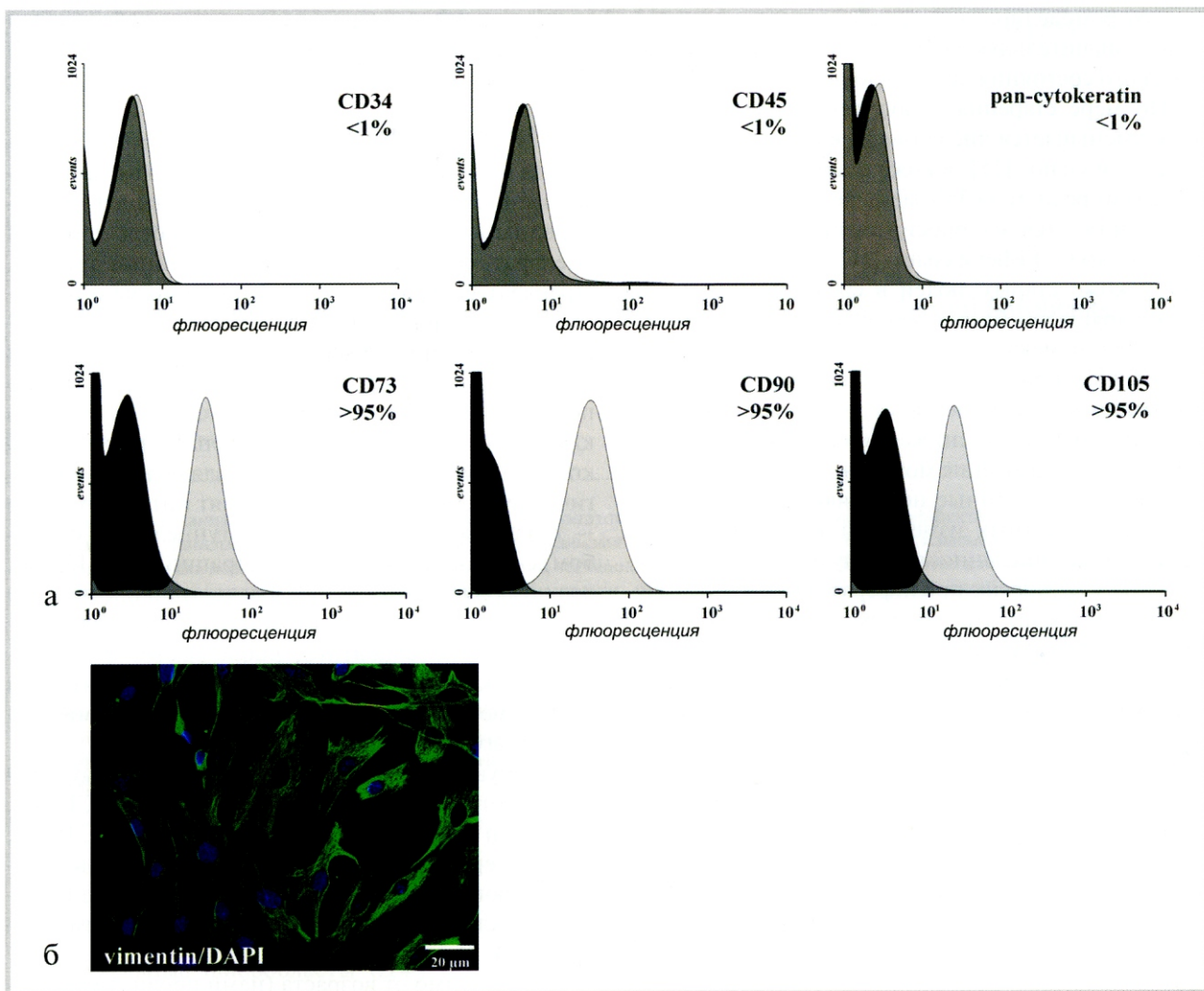


Рис. 1. Иммунофенотип фибробластов кожи: результаты проточной цитометрии (а) и флюоресцентной микроскопии (б).

получить необходимое для проведения терапии количество функционально активных клеток.

После трансплантации культивированных аутоДФ в дерму их биосинтетическая активность сохраняется. Так, результаты проведенных нами гистологических исследований (одновременно с введением в кожу лица клеточный материал вводили в кожу за ушной раковиной для последующего проведения биопсии с целью гистологического исследования) свидетельствуют о пролонгированной биосинтетической активности трансплантированных аутоДФ (не менее 12 мес), выражающейся в синтезе компонентов межклеточного матрикса (рис. 3).

Трансплантированные аутоДФ регистрировали в дерме небольшими группами, без признаков митотической активности, что свидетельствует об отсутствии риска развития гиперпластических процессов при использовании данных клеток. Отмечены новообразованные коллагеновые волокна, и в течение первых 12 мес после применения аутоДФ толщина

дермы в среднем увеличилась на $62,5 \pm 13,6\%$ ($p=0,028$; рис. 4).

Через 24 мес после применения аутоДФ в дерме также регистрируются отдельные скопления фибробластоподобных клеток (рис. 5).

В то же время в связи с длительным сроком «экспозиции» достоверно утверждать, что это все те же трансплантированные культивированные фибробласты, сложно. Однако морфология данных скоплений фибробластов аналогична таковой на более ранних сроках исследования срезов кожи после введения аутоДФ, в то время как в интактной коже подобные клеточные кластеры не встречаются. Данный факт с высокой долей вероятности позволяет утверждать, что это — группы трансплантированных аутоДФ. Также нельзя исключить, что эти клетки могут представлять собой «новые» фибробласты, пришедшие на замену погибших в силу естественных причин трансплантированных фибробластов (в частности, истощения лимита Хейфлика). В дан-

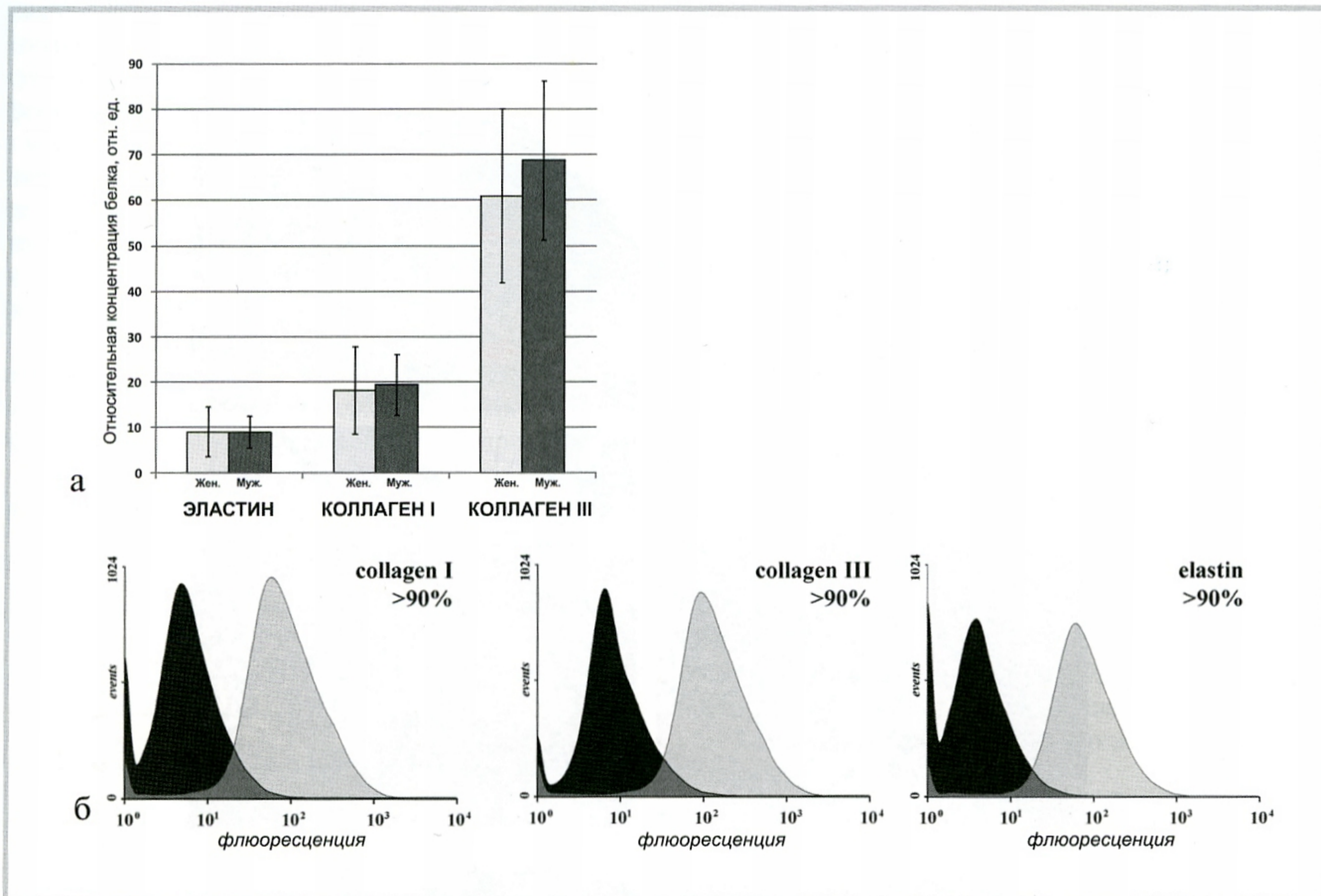


Рис. 2. Количественные (а) и качественные (б) параметры белков, экспрессируемых фибробластами кожи.

ных группах фибробластов также регистрируется продукция коллагеновых волокон, но без признаков созревания (утолщения) коллагена. Это может свидетельствовать о том, что через 2 года после трансплантации аутоДФ интенсивность их синтетической активности (по сравнению с таковой в течение 1-го года после трансплантации) снижена, и это, вероятно, связано с уровнем физиологических потребностей дермы (известно, что в физиологическом состоянии фибробласты обладают незначительной функциональной активностью [27]). По-видимому, трансплантированные аутоДФ полноценно интегрировались в дерму, стали естественной составляющей ее клеточной популяции и находятся под контролем микроокружения.

Согласно результатам морфологических исследований, можно достоверно утверждать, что на протяжении всего срока наблюдения (24 мес) патологических изменений (гиперпластических процессов, склероза и др.) в структуре дермы и эпидермиса не наблюдалось.

При иммуногистохимической оценке состояния кожи после проведения курса SPRS-терапии установлено, что пересаженные клетки не пролиферировали и не претерпевали нежелательной дифференцировки (например, в миофибробласты). Это

было доказано с помощью антител к Ki-67 и гладкомышечному актину (α SMA), что, в свою очередь, нивелирует минимальный теоретический риск избыточного разрастания пересаженных клеток или формирования фиброзной ткани. Во всех исследованных препаратах повышенного количества фагоцитов в дерме не обнаружено. В их количестве в областях инъекции и рядом лежащих тканях статистически значимой разницы не выявлено.

На основании результатов гистологического исследования был сделан вывод о том, что введенные клетки сохраняют свою жизнеспособность в дерме и при этом располагаются преимущественно группами. Их функционирование не приводит к неблагоприятным последствиям (трансформации, избыточному образованию коллагена и др.), клетки пролиферативно не активны. На всех сроках наблюдения в дерме регистрировались признаки увеличения ее объема (не связанные с воспалением или лимфогенным застоем) и синтеза молодых коллагеновых волокон.

Выявленная положительная динамика изменений кожи после применения аутоДФ на гистологическом уровне полностью соответствует клинической картине. Так, улучшение состояния кожи лица, заключающееся в повышении упругости кожи,

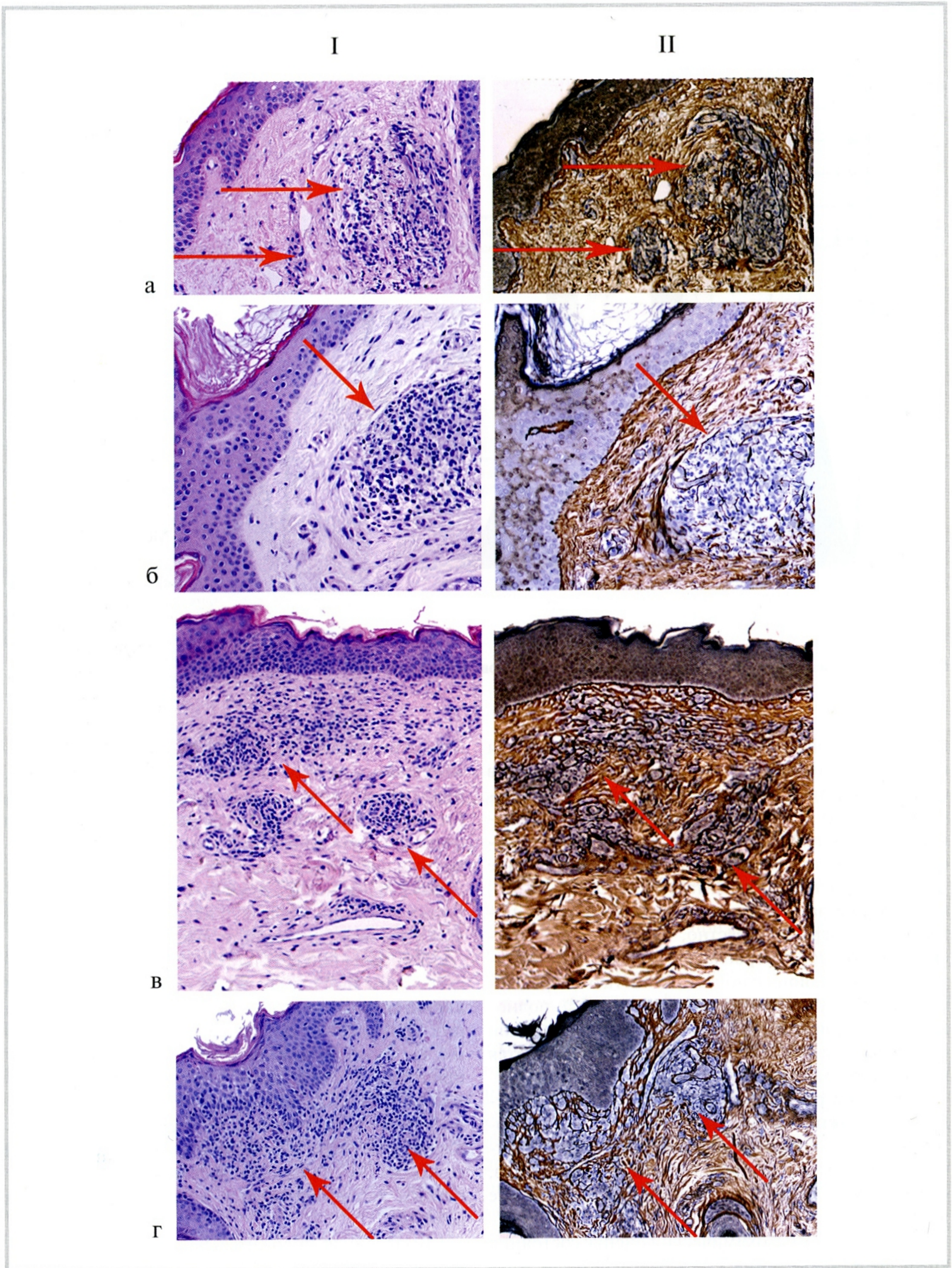


Рис. 3. Состояние кожи через 1 (а), 3 (б), 6 (в) и 12 (г) мес после применения аутоДФ (×200).

Препараты и микрофотографии Р.В. Деева.

Стрелки — группы введенных культивированных аутоДФ. I — окрашивание гематоксилином и эозином; II — импрегнация нитратом серебра.

уменьшении ее рельефности, улучшении цвета и контуров лица, пациенты отметили уже через 10–14 сут после окончания курса клеточной терапии. Эффект имел нарастающий характер. Так, если через 1 мес после инъекции на «хорошо» и «отлично» клинический результат оценили 88% пациентов, то через 3 мес и более — 100%. В соответствии с такой же шкалой врач-исследователь через 1 мес на «хорошо» и «отлично» оценил результат у 86% пациентов, а через 3 мес и более — у всех пациентов (рис. 6).

Положительные, прогрессирующие со временем (на протяжении, как минимум, 12 мес) изменения состояния кожи подтверждены нами и с помощью инструментальных методов исследования.

Так, при исследовании эластичности кожи лица (рис. 7) выявлено, что после интрадермального вве-

дения аутоДФ на протяжении 12 мес наблюдается прогрессирующее повышение показателей во всех зонах измерения. При этом максимальное увеличение эластичности кожи отмечено в периорбитальной области, где через 6 мес она превысила исходное значение на $24,0 \pm 8,7\%$, после чего сохранялась практически на этом же уровне в течение 12 мес наблюдения. Через 24 мес после трансплантации аутоДФ в этой области отмечено некоторое уменьшение эластичности кожи, но ее показатели оставались достоверно выше исходных величин, что указывает на сохранение клинического эффекта и через 2 года после применения аутоДФ. В щечной и околоушной областях также отмечено улучшение показателей на всех сроках наблюдения.

Измерения, проведенные с помощью фотометрической системы VISIA, свидетельствуют о прогрессирующем улучшении текстуры кожи лица после применения аутоДФ (рис. 8): через 1 мес в среднем на 11%, через 6 мес — на 27%, через 12 мес — на 29% (максимальное значение). К завершению срока наблюдений (24 мес) отмечена слабая, статистически незначимая тенденция к снижению значения показателя.

Также наблюдалось снижение выраженности пигментных пятен, достигшее максимальных показателей через 6–12 мес (около 28% случаев). Механизм данного процесса до конца не изучен. Возможно, это связано с паракринным эффектом и/или эффектом непосредственного взаимодействия трансплантированных аутоДФ с резидентными фибробластами, содержащими пигменты меланин и липофусцин. Результаты экспериментальных исследований зарубежных авторов [28], на трехмерной модели кожи продемонстрировавших способность ДФ человека снижать ее пигментацию, подтверждают полученные нами данные.

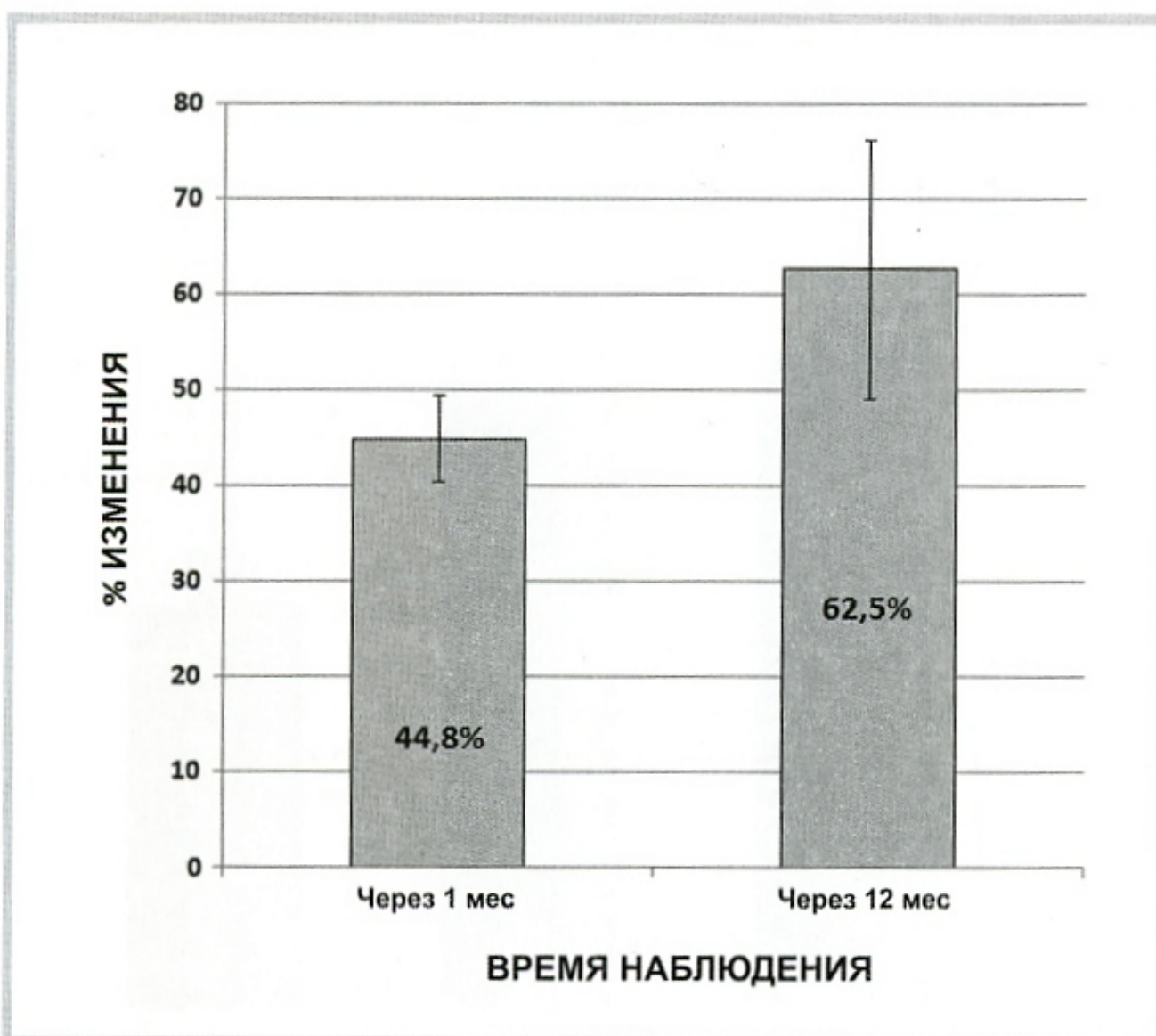


Рис. 4. Динамика толщины кожи после применения аутоДФ (по результатам гистологических исследований).

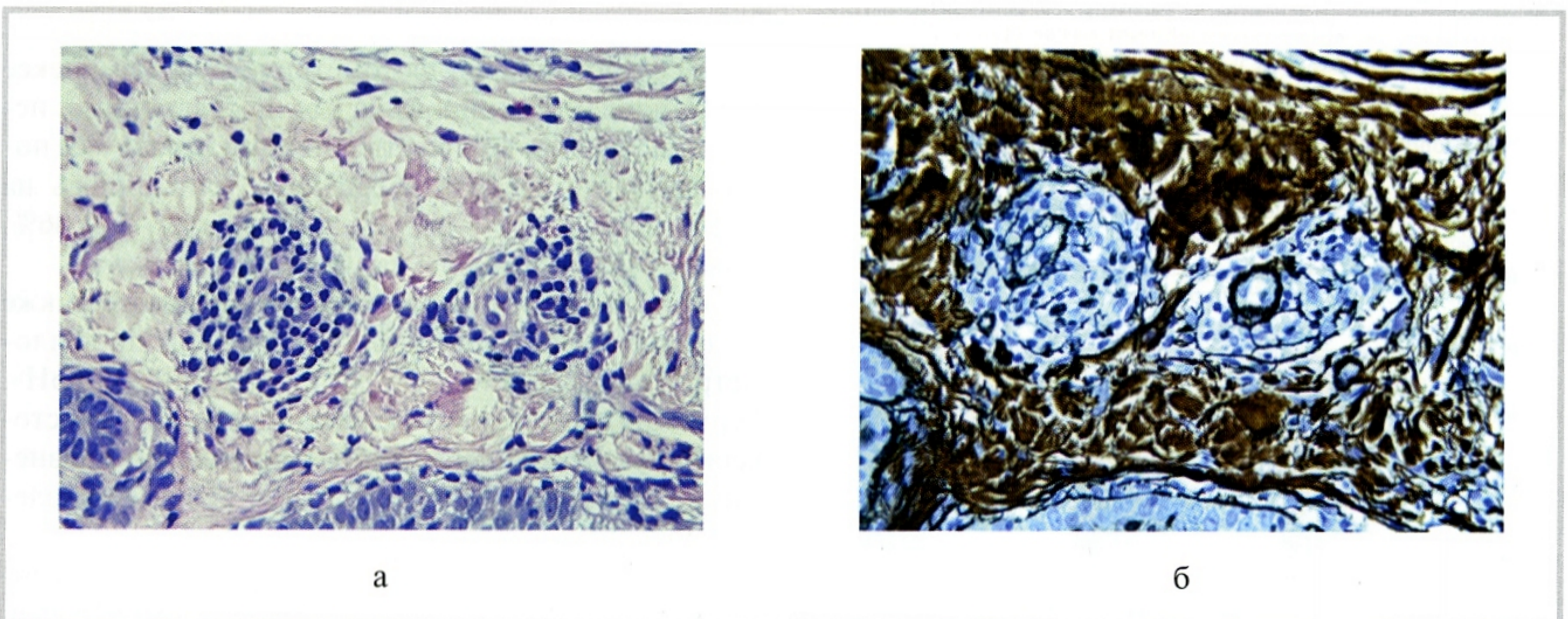


Рис. 5. Пациент М. (54 года): 24 мес после применения аутоДФ (×200).

Препараты и микрофотографии Р.В. Деева.

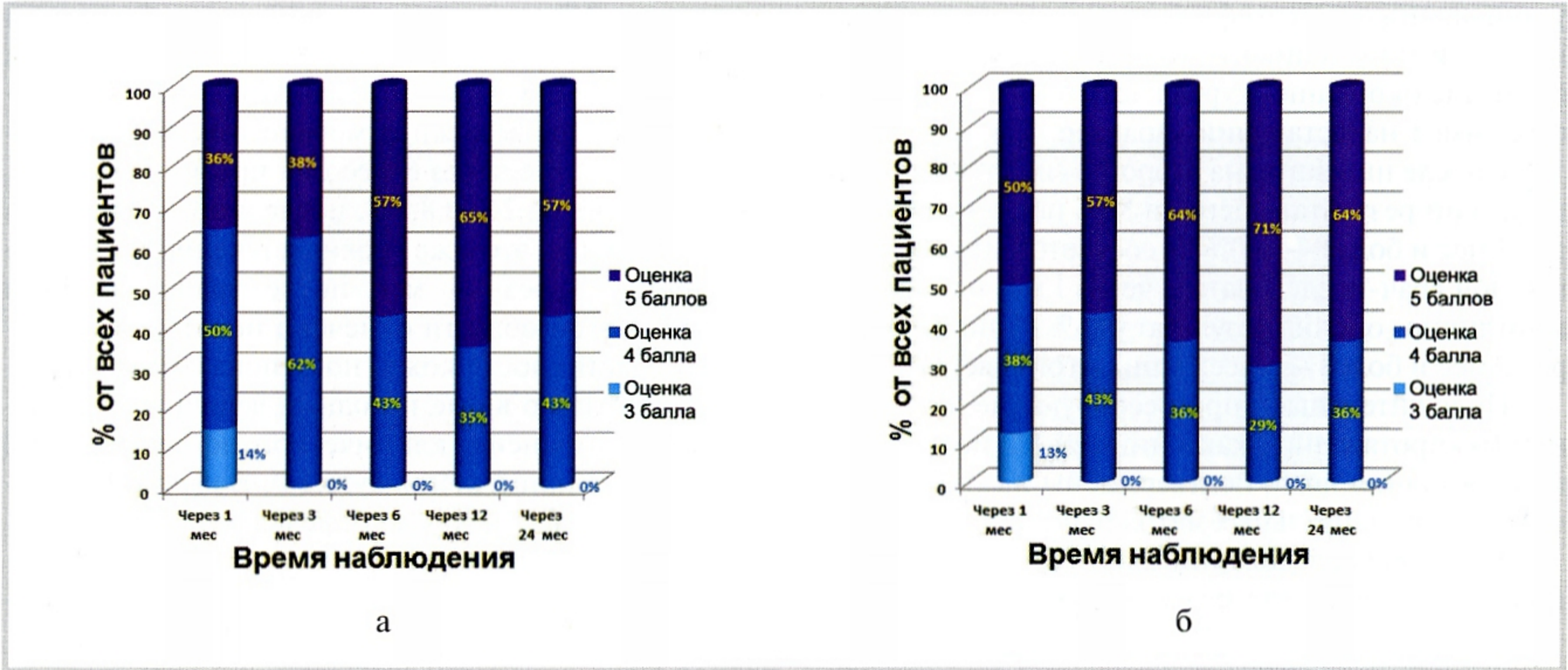


Рис. 6. Визуальная оценка состояния кожи (по 5-бальной шкале): оценка врача-исследователя (а) и пациентов (б).

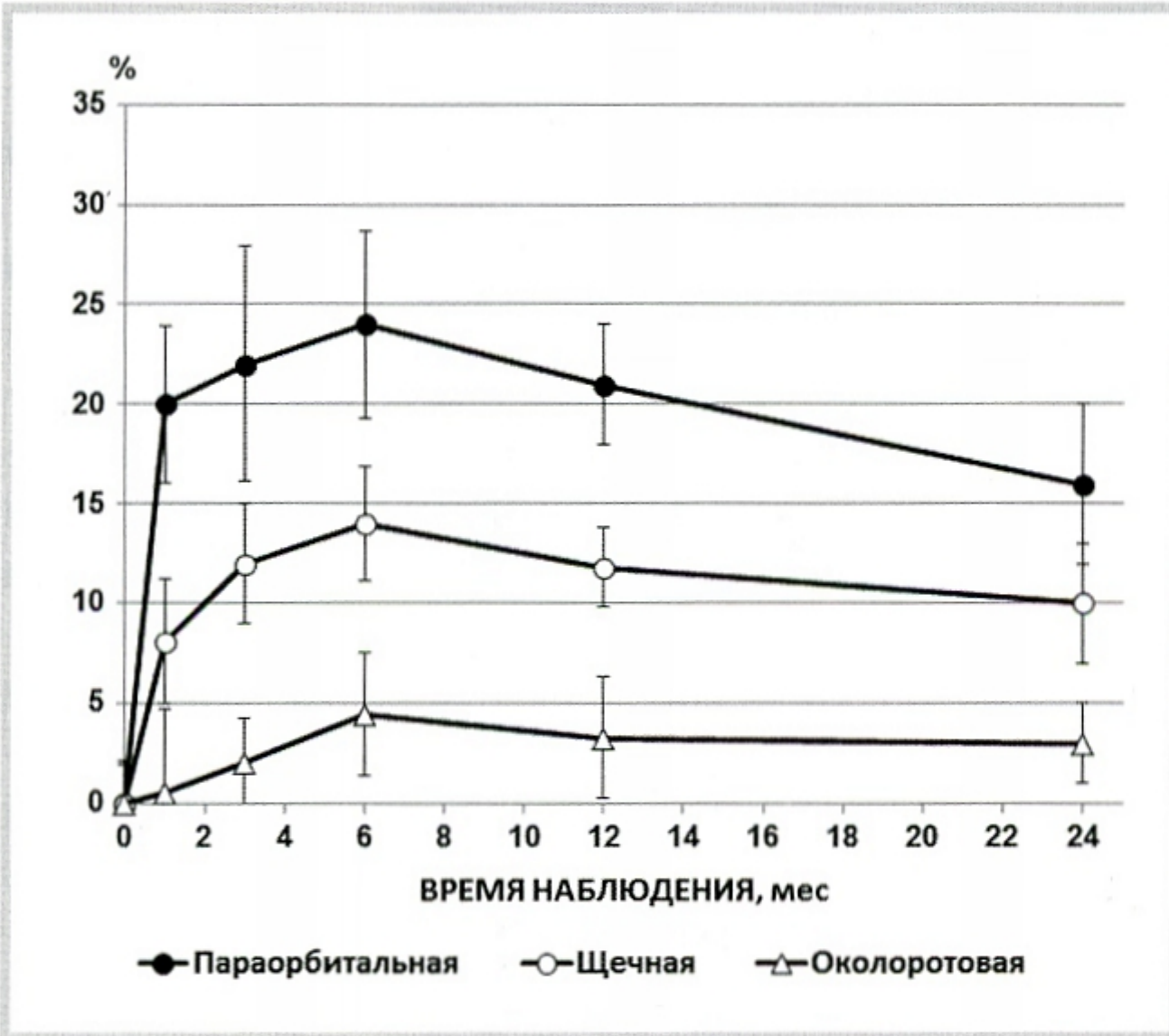


Рис. 7. Эластичность кожи через 1, 3, 6, 12 и 24 мес после введения аутофибробластов дермы (параметр R2, gross elasticity).

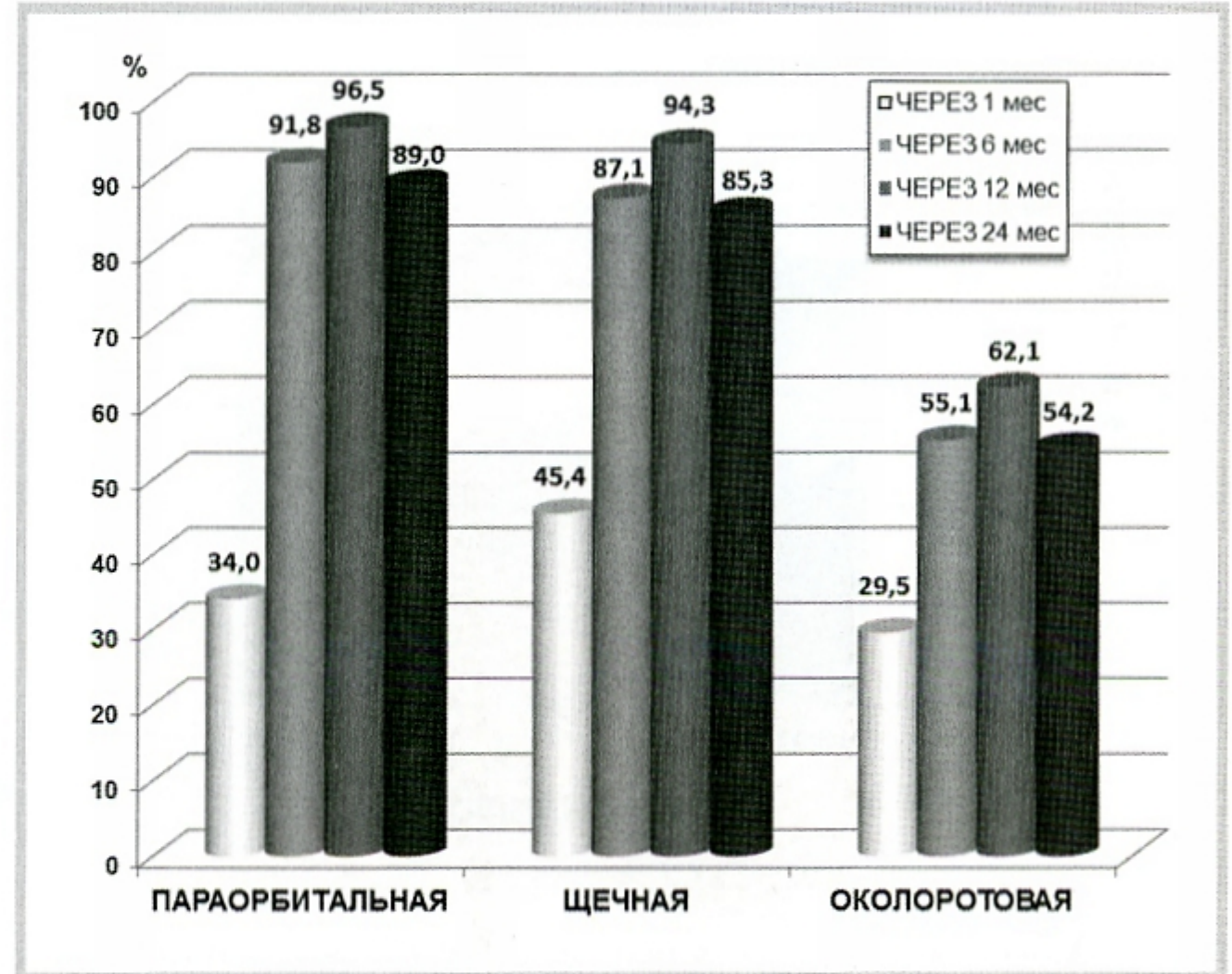


Рис. 9. Динамика глубины морщин через 1, 3, 6, 12 и 24 мес после введения аутоДФ (исследования на аппарате Primos).

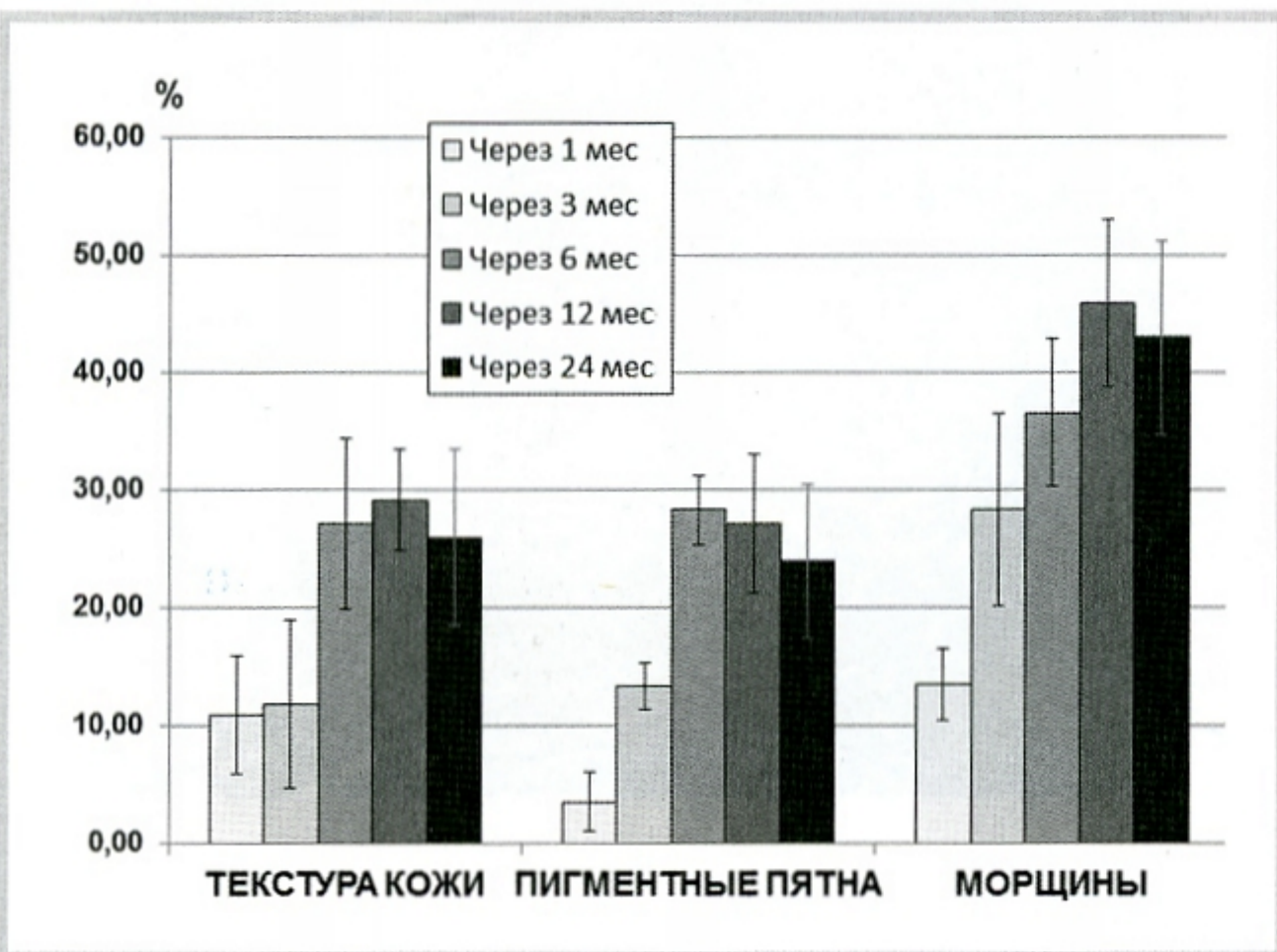


Рис. 8. Динамика характеристик кожи: результаты измерений на фотометрическом комплексе VISIA.

Исследования на фотометрическом комплексе VISIA продемонстрировали, что по сравнению с исходным уровнем количество морщин через 1 мес после введения аутоДФ в среднем уменьшилось на 13,5%, через 6 мес — на 32%, через 12 мес — на 46%, через 24 мес — на 43%.

Отмеченная положительная тенденция также была выявлена с помощью оптической профилометрии (аппарат PRIMOS, «GF Messtechnik GmbH», Германия), которая продемонстрировала достоверное уменьшение глубины морщин по сравнению с исходным уровнем на всем сроке наблюдений (рис. 9).

При этом менее выраженное уменьшение глубины морщин, отмеченное в околоротовой области, по-видимому, связано с анатомической особенностью этой зоны, в частности с наличием активной,

плотно прилегающей к коже, круговой мышцы рта, которая способна оказывать значительное влияние на микрорельеф кожи лица.

Изменения, выявленные нами в коже после интрадермального введения аутоДФ с помощью инструментальных и морфологических исследований (увеличение толщины, эластичности и упругости кожи, уменьшение количества и глубины морщин), свидетельствуют о том, что после трансплантации культивированные аутоДФ полноценно интегрируются в дерму, их биосинтетическая активность сохраняется в течение как минимум 12 мес. В результате происходит ремоделирование микроструктуры дермы, выражающееся в увеличении содержания в ней коллагеновых волокон, гидратации кожи и толщины дермы. Клинический эффект имеет нарастающий в течение года характер и сохраняется не менее 2 лет. Полученные нами результаты согласуются с данными исследований, проведенных американской компанией «Fibrocell Science», которые также продемонстрировали достоверное уменьшение количества морщин и увеличение толщины кожи после применения аутоДФ [18].

ЛИТЕРАТУРА

1. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М: Медицина 1981; 312.
2. Иванов А.А., Гладских О.П., Кузнецова А.В., Данилова Т.И. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии. Мол мед 2005; 2: 16—20.
3. Chang H., Chi J.T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D., Brown P.O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 20: 12877—12882.
4. Lee D., Cho K. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in threedimensional culture systems. Arch Dermatol Res 2005; 296: 296—302.
5. Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C., Sok J., Asselineau D., Bernerd F. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. J Invest Dermatol 2006; 126: 971—979.
6. Korn J.H. Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblast. Cell Immunol 1981; 63: 2: 374—384.
7. Haniffa M., Collin M., Buckley C., Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? Haematologica 2009; 94: 2: 258—263.
8. Sorrel J., Baber M., Caplan A. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. Cell Tissue Res 2003; 327: 499—510.
9. Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts — a diverse population at the center of it all. Int Rev Cell Mol Biol 2009; 276: 161—214.
10. Besedovsky H.O. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr Rev 1996; 17: 64—102.
11. Richards R.G., Hartman S.M. Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. J Invest Dermatol 1996; 106: 6: 1250—1255.
12. Wu H., Devi R., Malarkey W.B. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system — a clinical research center study. J Clin Endocrinol Metabol 1996; 81: 3: 1278—1282.
13. Ashcroft G.S., Greenwell-Wild T., Horan M.A., Wahl S.M., Ferguson M.W. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. Am J Pathol 1999; 155: 4: 1137—1146.
14. Смирнова И.О., Кветной И.М., Князькин И.В. и др. Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры ее старения. СПб: Деан 2005.
15. Varani J., Dame M., Rittie L., Fligel S.E., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J. 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.
16. Fisher G., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J.J. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol 2002; 138: 11: 1462—1467.
17. Boss W.K. Jr, Usal H., Chernoff G., Keller G.S., Lask G.P., Fodor P.B. Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. Clin Plast Surg 2000; 27: 4: 613—626.
18. 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—268.
19. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г. Использование аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. Вестн эстет мед 2008; 7: 2: 72—78.
20. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов. Вестн эстет мед 2011; 10: 2: 16—26.
21. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. Аутологичные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи. Эстет мед 2011; 10: 2: 3—9.
22. 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 21.07.10.
23. <http://www.fibrocellscience.com>
24. Зорин В., Зорина А., Черкасов В. и др. Применение аутологичных дермальных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи лица. Результаты годичных исследований. Эстет мед 2012; 11: 2: 171—182.
25. 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. Руководство для врачей. Под ред. В.А. Ткачука. М: Литтерра 2009; 222—233.
26. Байрейтер К., Франц П., Родеман Х. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации. Онтогенез 1995; 26: 1: 22—37.
27. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. В кн.: Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). М: Известия 2009; 1: 47.
28. Cario-Andre M., Pain C., Gauthier Y., Casoli V., Taieb A. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation. Pigment Cell Res 2006; 19: 5: 434—442.