

Экспериментальные подходы к обоснованию применения клеточных композиций на основе фибробластов в дерматокосметологии

О.С. Озерская, В.В. Щеголев

1-й Военно-морской клинический госпиталь, Санкт-Петербург

Experimental approaches to prove the usage of fibroblast-based cellular compositions in dermatocosmetology

O.S. Ozerskaya, V.V. Shchegolev

The 1st Naval Medical-clinical hospital, Saint-Petersburg

Интерес к применению культуры различных клеток кожи с лечебными целями существует уже более 60 лет. Основной клеткой эпидермиса является кератиноцит, а основной клеткой дермы — фибробласт. Морфо-функциональные особенности кожи в основном зависят от состояния дермы. В связи с этим, особый интерес для восстановления кожи и улучшения ее внешнего вида представляют фибробласты. В статье приведены литературные данные и результаты собственных исследований, показывающие эффективность мезотерапии дистрофических и деструктивных процессов дермы суспензией аллогенных фибробластов.

Ключевые слова: дерма, культура клеток, фибробласты, мезотерапия.

The curative usage of skin different cell cultures have been of interest for more than 60 years. The principal cells of epidermis are keratinocytes, in the dermis they are fibroblasts. Morphofunctional characteristics of the skin depend mainly upon the derma health. Thereby fibroblasts are of particular importance to regenerate the skin and its appearance. The article deals with the literature reports and the results of our investigations showing the efficacy of mesotherapy of dystrophic and destructive processes in derma with a suspension of allogenic fibroblasts.

Key words: derma, cell culture, fibroblasts, mesotherapy.

Известно, что качество жизни людей во многом зависит от их внешнего вида. Признаки старения зачастую являются барьером, который не дает чувствовать себя достаточно комфортно в социуме, в профессиональной и личной жизни. По поводу возрастных изменений кожи к дерматокосметологам обращается большое количество пациентов. Они предъявляют жалобы на морщины, складки, изменение овала лица, снижение тургора кожи не только лица, но и различных участков тела. В арсенале методов специалистов эстетической медицины за последнее время появилось большое количество различных технологий и средств, которые позволяют улучшить внешний вид таким пациентам. Весь комплекс косметологических процедур, проводимых пациентам геронтокосметологического профиля часто называют термином «ревитализация кожи».

Все основные составляющие дермы являются продуктами синтеза фибробластов. Кроме того, фибробласты синтезируют различные биологически активные вещества: цитокины, факторы роста, информационные молекулы, без которых нарушается нормальное функционирование кожи. Таким образом, мысль применять для ревитализации кожи живые фибробласты вытекает из возможности коррекции возрастных изменений кожи продуктами их жизнедеятельности.

Интерес к трансплантации фибробластов и биоискусственного заменителя кожи пришел в дерматокосметологию из комбустиологии. У истоков этого направления стояли J. Rheiwald, H. Green (1975), которые доказали возможность лечения пациентов с обширными ожогами клеточной культурой кератиноцитов [1]. Перспективность метода заключалась в возможности из небольшого кусочка кожи выделять и культивировать многослойные пласты кератиноцитов, позволяющие быстро закрыть раневые поверхности большой площади. Благодаря этому появлялась возможность быстро восстанавливать гомеостазис организма и спасать жизни тяжело обожженным [1–5]. Однако, сложность и дороговизна получения многослойных пластов кератиноцитов,

стимулировала исследователей к изучению культивированных фибробластов, которые при пересадке на раневые поверхности дают эффект, во многом схожий с результатам пересадки кератиноцитов, но являются гораздо более простым и дешевым клеточным материалом [6–8]. Для лечения глубоких ожогов в 1983 году E. Bell и соавт. предложили «дермальный эквивалент» (аналог живой дермы, искусственно созданный из коллагена и фибробластов) [9]. Дальнейшее развитие клеточных технологий привело к появлению отдельных клинических опытов по применению пересадки клеток при витилиго, невусах, буллезном эпидермолизе, лечении хронических язв, различного вида рубцов, при удалении татуировок [10–13].

Исследования отечественных ученых, во главе с профессором Д.С. Саркисовым, легли в основу направления в клеточных биотехнологиях, связанного с фибробластами [14]. Впервые было предложено использовать 3-дневную культуру аллогенных фибробластов для закрытия раневых поверхностей у пациентов с ожогами.

Таким образом, накопленные экспериментальные и клинические данные позволили нам приступить к планированию и проведению собственного исследования.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на крысах линии Вистар. Для получения культуры нормальных фибробластов были использованы фрагменты кожи. Эксплантацию фибробластов кожи осуществляли по методу R.I. Frechney [15]. Иссеченный участок кожи стерилизовали 70% этанолом, вырезали блок 1 мм³ и помещали его в чашку Петри диаметром 6 см (Falcon, UK). Затем добавляли каплю ростовой среды DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЭСКРС) (Биолот, Россия) и разрезали блок на 5–10 фрагментов стерильным скальпелем. Распределяли несколько кусочков по поверхности чашки и каждый покрывали каплей ростовой среды. Инкубировали при 37°C в течение ночи.



Далее добавляли в чашку Петри 3 мл полной среды (DMEM, 10% ЭСКРС, 50 мкг/мл гентамицина (Invitrogen, США)) и продолжали культивирование в CO₂-инкубаторе (Juane, France) при 37°C, 5% CO₂ и 100%-ной влажности. Рост и миграция фибробластов из фрагментов кожи происходил в течение недели.

По достижении монослоя фибробласты кожи пересеивали с помощью 0,25% водного раствора трипсина (Биолот, Россия). По получении необходимого числа клеток, культуру суспендировали; для однократного внутрикожного введения использовали 1,5×10⁶ клеток в 0,5 мл ростовой среды. Контрольным крысам вводился внутрикожно физиологический раствор, объемом 0,5 мл. Перед введением у крыс выбривалась кожа на спине, площадью около 6 см².

Результаты и обсуждение

Уже на третий день в центральной части выбритой зоны у крыс с введением фибробластов было заметно усиление роста шерсти, что значимо отличалось от животных контрольной серии, у которых признаков роста шерсти не отмечалось до 5-х суток. На седьмой день у экспериментальной группы крыс, в центральной зоне, куда производилось введение фибробластов, четко выделялся участок активного роста шерсти. В контроле выбритая поверхность имела разновысокий (до 1 мм) покров отрастающей шерсти.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rheiwald J., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cells* 1975; 6(4): 331–44.
2. Липшиц Р.У., Звягинцева Т.В. Межклеточные взаимодействия в раневом процессе. *Клин. аспекты теорет. мед.* 1999; 4(120–3).
3. Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. М.: Наука, 1995.
4. Gallico G., O'Connor N., Compton C. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 1984; 16(311): 448–51.
5. Hefton J., Finkelstein J., Madden M. et al. Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. *Lancet* 1993; 2(8347): 428–30.
6. Туманов В.П. Десятилетний опыт использования культуры клеток человеческой кожи для лечения термических ожогов. *Арх. патол.* 1999; 4: 5–9.
7. Туманов В.П. Способ получения трансплантата из культивированных фибробластов человека для лечения ожоженных. Новые методы лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи. *Междунар. симп. Тула*, 1996: 11.
8. Малахов С.Ф., Васильев А.В., Терских В.В. и др. Перспективы биотехнологических методов восстановления кожных покровов. Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи. *Междунар. симп. Тула*, 1996: 6–7.

В случае с пересадкой клеток кожи (кератиноцитов и фибробластов), ревитализирующему действию подвергается кожа и ее придатки. Предполагается, что пересаженные клетки вырабатывают большее количество коллагена, эластана, ферментов, гликозаминогликанов, биологически активных молекул, что и приводит к повышению прочности, гидратации и васкуляризации дермы, улучшению тургора и цвета кожи, что в эксперименте проявляется ускоренным ростом шерсти. Улучшение трофики и нивелирование гипоксии в зонах образования рубцов за счет новообразования сосудов, а также активизации собственной антиоксидантной системы являются морфологической основой этих положительных изменений [16, 17].

Таким образом, проведенный нами простой эксперимент показал, что применение культуры фибробластов позволяет оптимизировать обменные процессы в дерме. Полученные результаты позволяют планировать развернутое экспериментальное исследование с целью фундаментального обоснования метода мезотерапии его последующего клинического применения в дерматологии и косметологии с целью получения эстетически приемлемых результатов лечения больных с гипотрофическими рубцами, гипотрофиями посттравматического и остаточного генеза после перенесенных дерматозов; уменьшения морщин, кожных складок, стрий; улучшения морфологических характеристик кожи с возрастными изменениями за счет нормализации структуры дермы и эпидермиса.

9. Bell E., Sher S., Hull B. et al. The reconstitution of living skin. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81(1): 2–10.
10. Озерская О.С. Патогенетическое обоснование новых методов терапии рубцов. Дисс. ...докт. мед наук, 2002.
11. Озерская О.С. Способ устранения косметических дефектов кожного покрова. Патент № 2000106582/14.
12. Oh C.-K., Jung-Hoon C., Jae-Young L. et al. Treatment of vitiligo with suction epidermal grafting by the use of an ultrapuls CO₂ laser with a computerized pattern generator. *J. Dermatol. Surg.* 2001; 27(6): 565–8.
13. Kumagai N., Fukushi S., Matsuzaki K. et al. Treatment of nevus ota with autologous-cultured epithelium grafting combined with dermabrasion. *Ann. Plast. Surg.* 1995; 34(2): 180–97.
14. Саркисов Д.С., Алексеев А.А. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожного покрова. *Вестн. РАМН* 1994; 7: 6–11.
15. Freshney R.I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. N.-Y. – Chichester: Wiley&Sons, 2000.
16. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюл. эксп. биол. мед.* 2000; 130(8): 203–6.
17. Ballaun C., Weniger W., Uthman A. et al. Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 104(1): 7–10.

Поступила 14.02.2008