



Алла Зорина

кандидат медицинских наук, главный специалист по применению клеточных технологий Института стволовых клеток человека, Москва



Вадим Зорин

кандидат биологических наук, руководитель отдела регенеративной медицины Института стволовых клеток человека, Москва

# Регенераторный потенциал кожи

Определение и применение в косметологической практике.

## Старение кожи и инволюционные изменения дермы

В основе процессов, развивающихся в коже при старении, лежат фундаментальные изменения, связанные с основной клеточной популяцией дермы — фибробластами: их количеством, морфологией, пролиферативным потенциалом, функциональной активностью<sup>[1-4]</sup>. Они не только поддерживают гомеостаз межклеточного матрикса дермы, обеспечивая его ремоделирование и обновление (за счет деградации «отработанных» и синтеза новых компонентов дермы — коллагена, эластина и основного вещества), но также играют значительную роль в поддержании физиологического состояния других слоев кожи, представляя собой ключевое звено в ее биологии<sup>[1]</sup>.

Исследование J. Varani и соавт. [2006] показало, что у старых людей, по сравнению с молодыми, общее количество фибробластов в коже меньше в среднем на 35%<sup>[2]</sup>. По данным G. Fisher и соавт. [2002], продукция коллагена в коже старых людей в среднем снижена на 75%<sup>[4]</sup>. Естественное следствие этих процессов — уменьшение толщины кожи, снижение ее упругости и эластичности, образование морщин.

Таким образом, процесс возрастных изменений кожи сводится к уменьшению в ней численности популяции фибробластов и снижению их пролиферативной и биосинтетической активности, что закономерно проявляется в уменьшении количественного и качественного состава межклеточного матрикса дермы. В этой связи становится совершенно очевидным, что именно дермальные фибробласты представляют собой основную точку приложения терапевтического воздействия при коррекции возрастных изменений кожи.

Целью применения целого ряда методов современной косметологии (мезотерапии, биоревитализации, пилингов, фракционного фототермолиза, радиоволновой терапии, дермабразии и др.) является стимуляция функциональной активности дермальных фибробластов. И реализуется эта цель в том числе через повреждение кожной ткани.

Перед проведением травмирующей процедуры необходимо ответить на важный вопрос, который определит успех воздействия и позволит минимизировать риски развития нежелательных явлений. А именно: воздействие какой интенсивности для кожи конкретного человека будет наиболее оптимальным с точки зрения достижения желательного эффекта и безопасности?

Ответить на этот вопрос можно посредством определения регенераторных и пролиферативных возможностей главной клеточной популяции кожи — фибробластов. К настоящему времени Институтом стволовых клеток человека (ИСКЧ) разработана технология «Паспорт кожи®» (основанная на методике клонирования стромальных клеток-предшественников, разработанной А. Я. Фриденштейном и соавт. в 1970-м<sup>[5]</sup>), позволяющая оценить эффективность колониеобразования фибробластов кожи (ЭКОФ) *in vitro* и степень пролиферации составляющих колоний клеток. Технология, защищенная как российским, так и международным патентами, дает возможность с высокой степенью достоверности определить регенераторный и пролиферативный потенциалы популяции фибробластов кожи человека, на основании которых можно сделать заключение о регенераторном потенциале кожи конкретного пациента<sup>[6, 7]</sup>.

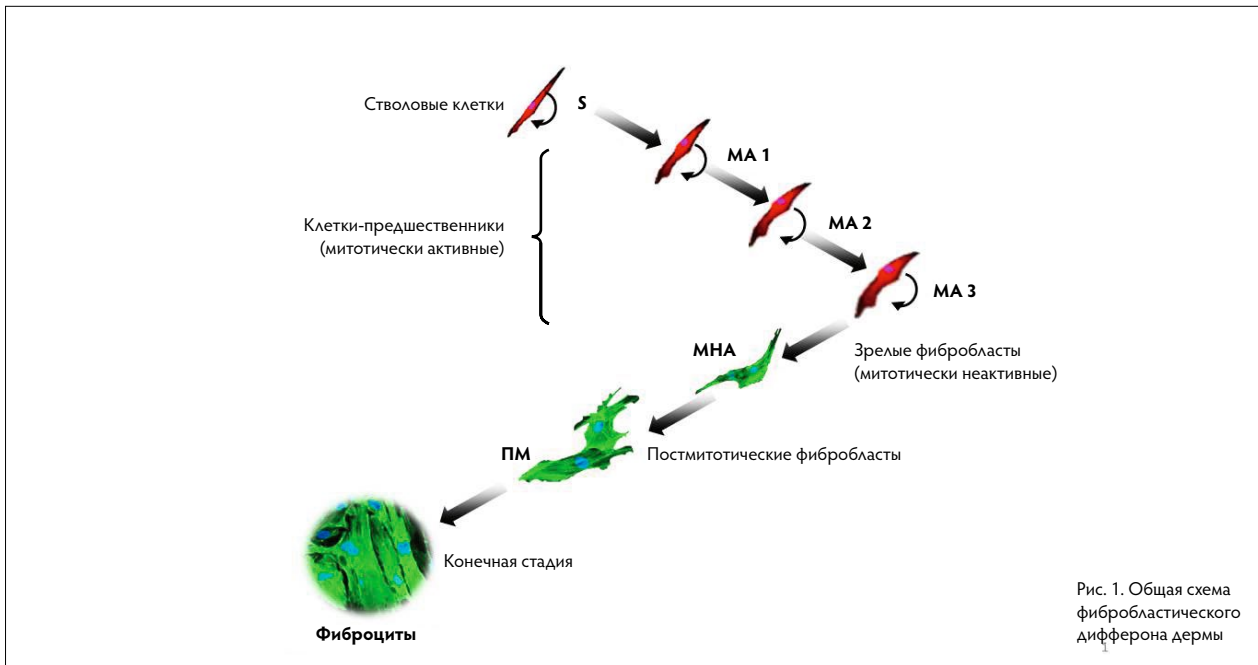


Рис. 1. Общая схема фибробластического дифференцирования дермы

## Определение регенераторного потенциала популяции фибробластов кожи

Известно, что фибробласты — гетерогенная клеточная популяция, включающая весь фибробластический дифференцион<sup>[Рис. 1]</sup>: от мультипотентной мезенхимальной стволовой клетки, прогениторных клеток (клеток — предшественниц фибробластов) и дифференцированных (зрелых) фибробластов до конечно дифференцированного фиброцита.

Это означает, что в дерме каждого человека присутствуют **стволовые/прогениторные клетки, основная задача которых — поддержание клеточной популяции ткани**<sup>[8]</sup>. Обнаружить эти клетки можно в культуре, наблюдая процесс образования колоний — клонов, состоящих из 50 и более клеток<sup>[Рис. 2]</sup>, каждый из которых представляет собой потомство одной стволовой/прогениторной клетки. Для этого используется клональный анализ — специфический метод определения эффективности колониеобразования фибробластов (ЭКОФ), который заключается в следующем.

Из 4 мм биоптата кожи пациента в специализированной лаборатории ИСКЧ получают первичную культуру фибробластов, из которой берут (произвольно) строго определенное количество клеток. Данные клетки эксплантируют (высевают) в чашки Петри и культивируют при строго определенных (и всегда одинаковых) условиях. Спустя 14 дней, используя специальную компьютерную программу, проводят подсчет образовавшихся колоний и определяют величину ЭКОФ, которая представляет собой отношение выросших колоний (клеточных клонов, состоящих из 50 и более клеток) к числу эксплантированных клеток<sup>[6, 7]</sup>.

**Величина ЭКОФ, как показали результаты клонального анализа культур дермальных фибробластов, не зависит от возраста — это индивидуальный для каждого человека параметр**<sup>[9, 10, 11]</sup>. ЭКОФ характеризуется довольно высокими значениями, составляя в среднем  $45,0 \pm 9,5\%$ <sup>[12, 13]</sup>. Определив величину ЭКОФ и пересчитав ее на массу биоптата, можно получить представление о содержании в коже каждого человека стволовых/прогениторных клеток. Благодаря функционированию последних и осуществляется восстановление/ремоделирование

дермы. На основании значений ЭКОФ можно сделать заключение об индивидуальном регенераторном потенциале дермы, то есть о способности популяции фибробластов кожи конкретного человека поддерживать гомеостаз ткани и восстанавливать ее при повреждении.

При этом, чем выше ЭКОФ, тем больше в коже клеток — предшественниц фибробластов, а значит, больше дифференцированных (зрелых) функционально активных фибробластов, следовательно, выше регенераторный потенциал ткани; и наоборот, чем меньше ЭКОФ, тем ниже регенераторный потенциал кожной ткани. Регенераторный потенциал коррелирует со способностью ткани к восстановлению после повреждения. Он генетически детерминирован и не зависит от возраста<sup>[9, 10, 11]</sup>.

## Определение пролиферативного потенциала популяции фибробластов кожи

Наряду с исследованием регенераторных возможностей дермальных фибробластов пациента косметологу важно знать, каков их пролиферативный потенциал — количество делений, которое клетки могут пройти до своей гибели. Его определяют по процентному соотношению долей плотных, диффузных и смешанных колоний в культуре фибробластов кожи пациентов<sup>[6, 7, 14, 15]</sup> [Рис. 3].

**С возрастом в популяции фибробластов кожи уменьшается численность клеток, снижается их биосинтетическая активность, нарушается баланс между процессами синтеза и деградации межклеточного матрикса дермы.**

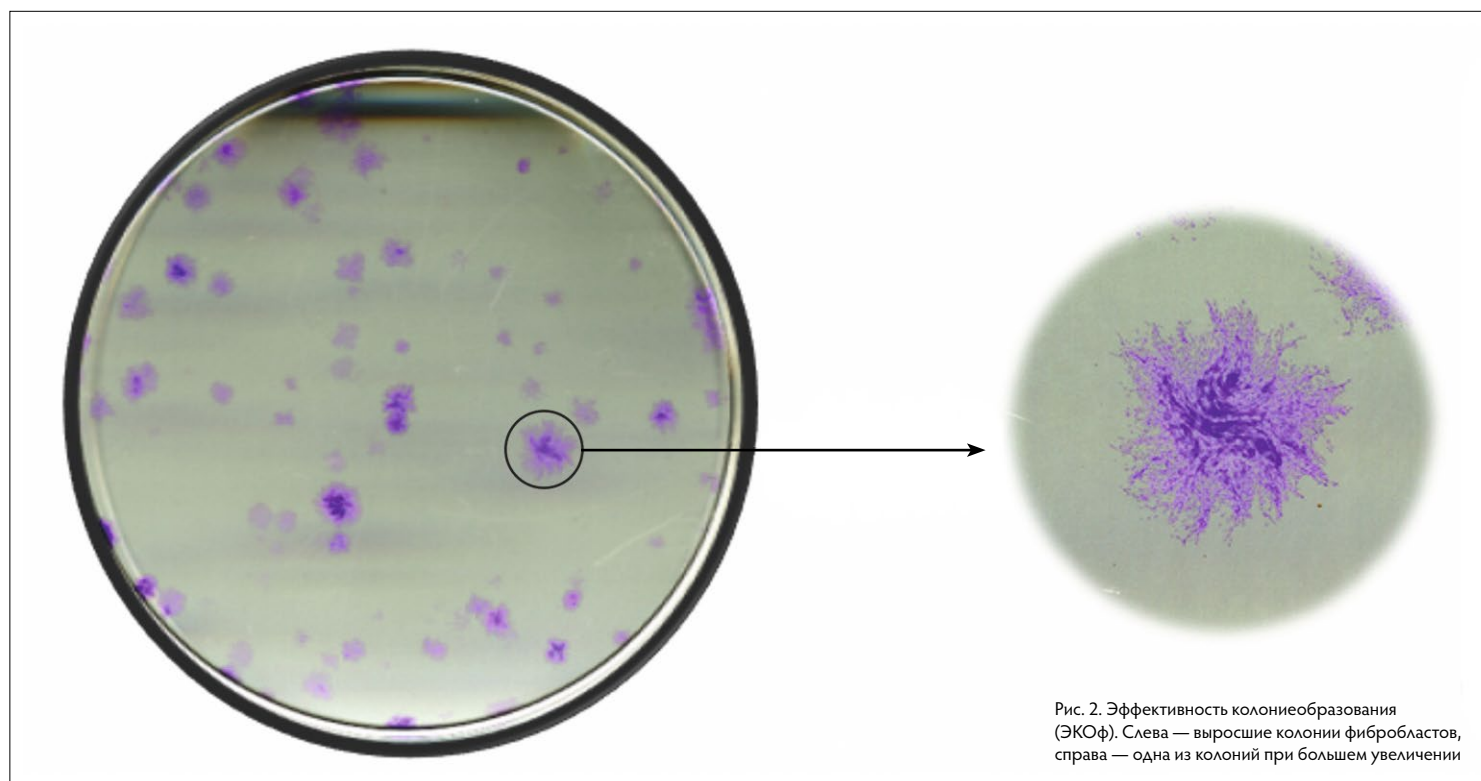


Рис. 2. Эффективность колониеобразования (ЭКОФ). Слева — выросшие колонии фибробластов, справа — одна из колоний при большем увеличении

Очевидно, чем выше пролиферативный потенциал клеток, составляющих данную ткань, тем больше в ней митотически активных клеток и, следовательно, тем быстрее будут осуществляться регенеративные процессы.

Известно, что прогениторные клетки дермы (согласно результатам исследования их цитоморфологии, пролиферативного потенциала и способности синтезировать специфические цитокины/факторы роста) разделяют на три типа клеточных популяций: МФI, МФII и МФIII (МФ — митотически активные фибробласты)<sup>[16]</sup>. При этом клеточный пул МФI обладает самым высоким пролиферативным потенциалом, его клетки проходят около 25–30 клеточных делений перед дифференцировкой в клеточную популяцию МФII. В свою очередь, клетки пула МФII до перехода в пул МФIII совершают около 15–20 делений,

а клетки пула МФIII перед дифференцировкой в ПМФ (постмитотические фибробласты) осуществляют всего около 5–8 делений. Соответственно, в культуре митотически активные фибробласты образуют три вида колоний<sup>[Рис. 1]</sup>:

1. **плотные**, состоящие из сотен и даже тысяч фибробластов (что, по всей видимости, соответствует стадии дифференцировки МА1);
2. **диффузные**, состоящие из 50–100 клеток (что, видимо, соответствует стадии дифференцировки МА3);
3. **смешанные**, состоящие из фибробластов, находящихся на стадиях дифференцировки МА1 и МА3.

По количественному соотношению клеточных колоний разных типов в культуре (используя формулу, выведенную Е. Б. Владимирской с соавт.<sup>[15]</sup> для стромальных клеток-предшественников) и составляют заключение о пролиферативном потенциале фибробластов кожи каждого пациента. При этом чем больше в культуре плотных колоний, тем выше у пациента пролиферативный потенциал популяции дермальных фибробластов. И, соответственно, чем больше в культуре диффузных колоний, тем ниже пролиферативный потенциал популяции фибробластов кожи пациента.

### Возможности косметологического ремоделирования дермы

Современные косметологические методы, позволяющие ремоделировать микроструктуру дермы, можно разделить на две группы:

1. к первой относятся технологии, которые оказывают **стимулирующее воздействие на резидентные (то есть имеющиеся в дерме) фибробласты**, например лазерные и радиоволновые технологии, инъекции PRP-плазмы, обогащенной тромбоцитами, и пр.;
2. ко второй — методы из области регенеративной медицины, основная цель которых — **восполнение уменьшающейся с возрастом клеточной популяции дермы за счет привнесения функционально активных фибробластов (SPRS®-терапия)**.

**Учитывая индивидуальные показатели регенераторного потенциала популяции дермальных фибробластов, свидетельствующие о содержании в коже клеток — предшественников фибробластов, — и показатели их пролиферативного потенциала, свидетельствующие о скорости осуществления регенеративных процессов в кожной ткани, можно сделать заключение о регенераторном потенциале кожи для каждого пациента.**

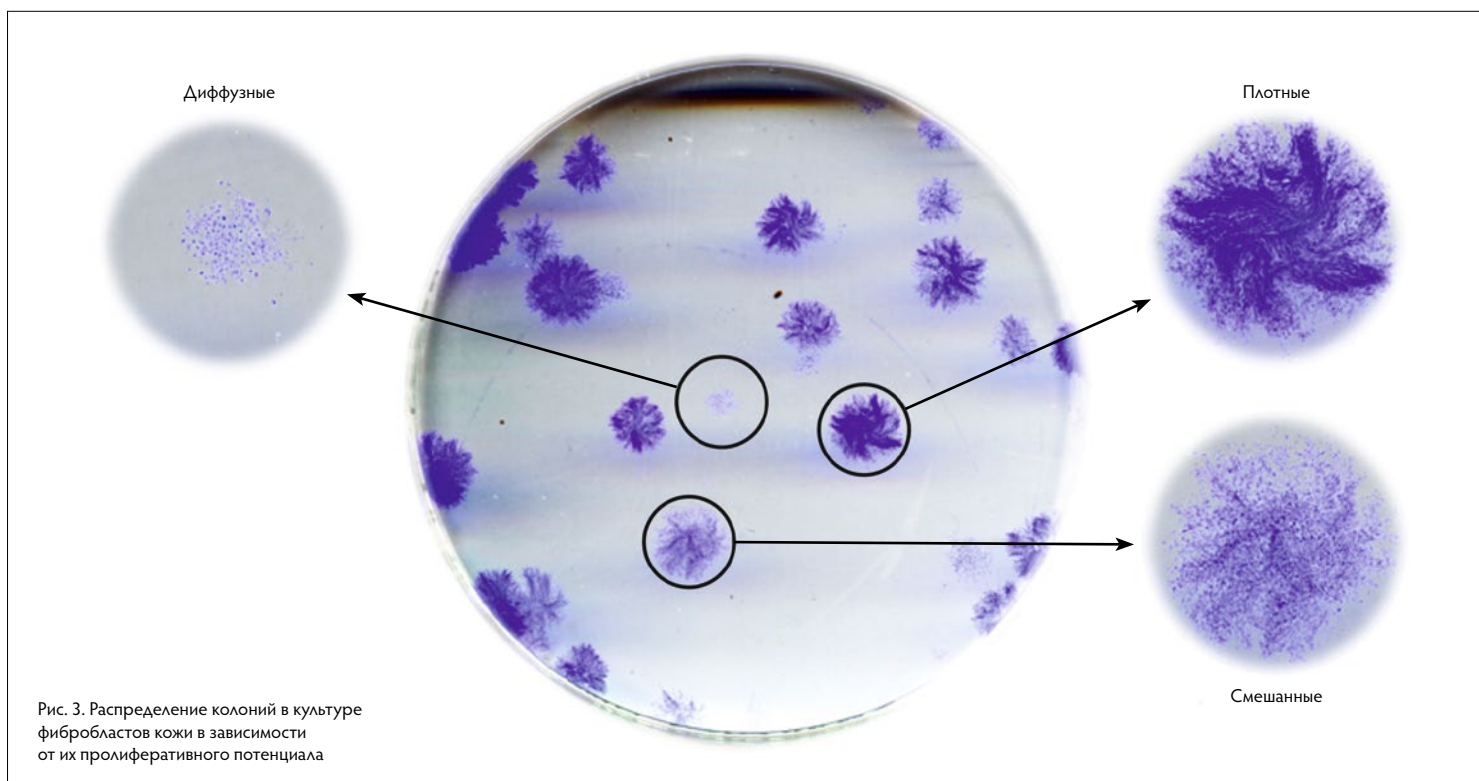


Рис. 3. Распределение колоний в культуре фибробластов кожи в зависимости от их пролиферативного потенциала

Соответственно, разнообразие современных методов эстетической коррекции ставит перед каждым врачом, практикующим в этой области медицины, ряд актуальных вопросов, связанных с проведением тех или иных процедур у конкретного пациента:

1. какие процедуры ему показаны?
2. как часто следует их проводить?
3. каковы безопасные параметры их использования именно в его случае (например, аппаратных процедур — лазерных или радиоволновых)?
4. с какого возраста ему можно рекомендовать проведение вмешательств по эстетическим показаниям? и пр.

Сегодня, на наш взгляд, ответить на эти вопросы с большей точностью можно, если учитывать индивидуальные показатели регенераторного и пролиферативного потенциалов кожи, полученные при помощи оригинальной технологии «Паспорт кожи®», основанной на методике клонирования фибробластов.

К примеру, при низких показателях этих параметров проводить любые косметологические процедуры нужно с определенной осторожностью, чтобы не истощить и без того малый пул клеток — предшественниц фибробластов. Таким пациентам, прежде чем применять какие-либо воздействия на кожу, необходимо провести курс SPRS-терапии, чтобы восполнить дефицит функционально активных клеток дермы. В то же время, если у пациента показатели регенераторного/пролиферативного потенциалов высокие или соответствуют норме, можно использовать (согласно инструкции) любые косметологические методы.

## Заключение

Учет регенераторного потенциала кожи конкретного пациента не только позволит избежать осложнений, возможных при косметологических вмешательствах, но и может стать гарантом эффективности индивидуальной программы коррекции возрастных изменений. ○

## Литература

1. Sorrell M., Caplan A.I., Fibroblasts — a diverse population at the center of it all. *International Review of Cell and Molecular biology*. 2009, v. 276, 161–214.
2. 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, Vol. 168, № 6, 1861–1868.
3. Fisher G., Varani J. and Voorhees J. Looking older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. *Arch Dermatol*. 2008, 144, 5, 666–672.
4. Fisher G., Kang S., Varani J. et al. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002, 138, 1462–1467.
5. Фриденштейн А.Я. Клонирование стромальных клеток-предшественников // *Методы культивирования клеток*. Ленинград, «Наука». 1988. С. 257–265.
6. Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р., Копнин П.Б. Способ диагностики состояния кожи пациента (варианты). Патент на изобретение RU 2466680, 2012.
7. Zorin V.L., Zorina A.I., Cherkasov V.R., Kopnin P.B. «Diagnostic method for connective tissue and its application» (US 8.790.890 B2–29.07.14).
8. Bayreuther K., Francz P.I., Rodemann H.P. Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Arch Gerontol Geriatr* 1992; 15 (1): 47–74.
9. Ryan J., Ostrow D., Breakfurd A. Gerson E. et al. // A comparison of the proliferative and replicative life span kinetics of cell cultures derived from mono zygotic twins. *In vitro*. 1981.17.1. P. 20–27.
10. Schneider E., Smith J. The relationship of in vitro studies to in vitro human aging. *International review of cytology*. 1981. 69. P. 261–270.
11. Терехов С.М. Клональный анализ при изучении наследственной патологии/Диссер. На соиск. канд. мед. наук. 1984. 120 с.
12. Зорин В.Л., Зорина А.И., Копнин П.Б., Черкасов В.Р. и др. Качественная и количественная оценка состояния кожи лица после применения аутологичных дермальных фибробластов // *Вестник эстетической медицины*. Том 10, № 2, 2011. С. 16–26.
13. Zorin V., Zorina A., Cherkasov V., Deev R., Kopnin P., Isaev A. Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal fibroblasts administration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014 Dec 19. doi: 10.1002/term. 1976. [Epub ahead of print]
14. Лебединская О.В., Горская Ю.Ф., Куралесова А.И. морфологическая характеристика колоний стромальных клеток-предшественников в культурах гетеротопных трансплантатов костного мозга и селезенки мышей разного возраста. *Морфология: научно-теоретический мед. журнал*. 2004. Т. 126. № 6. С. 46–49.
15. Владимирская Е.В., Кошель И.В. Стромальные фибробласты нормального костного мозга у детей. *Гематология и трансфузиология*. 1990. 1:3–5.
16. Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.O. et al. Diversity of fibroblasts — a review on implications for skin tissue engineering cells tissues organs. *Cells Tissues Organs* 2008; 187: 165–76.