

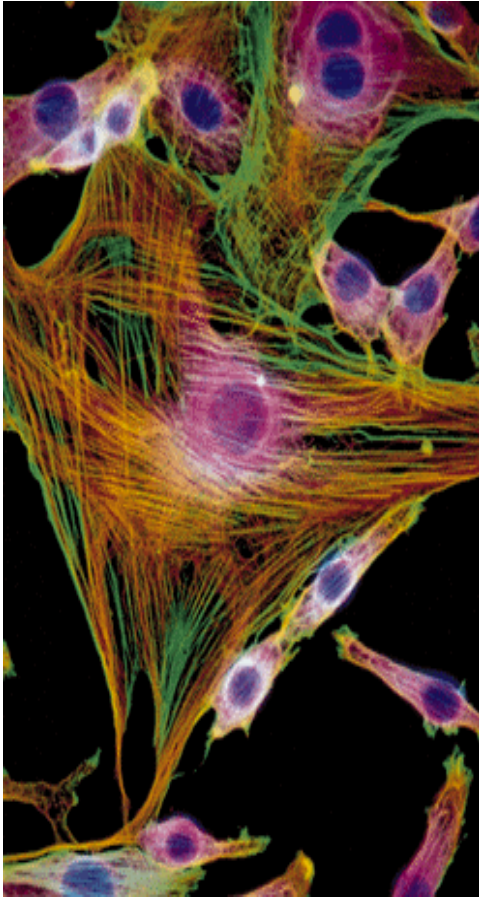
Стволовые клетки в эстетической медицине вчера, сегодня, завтра

проф. Фисталь Э.Я., проф. Попандопуло А.Г., Меркулов Д.С.

Донецк

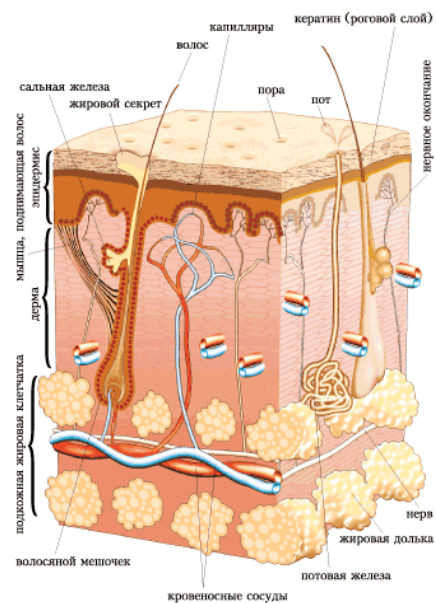
29.04.2020

Роль фибробластов в кожном метаболизме



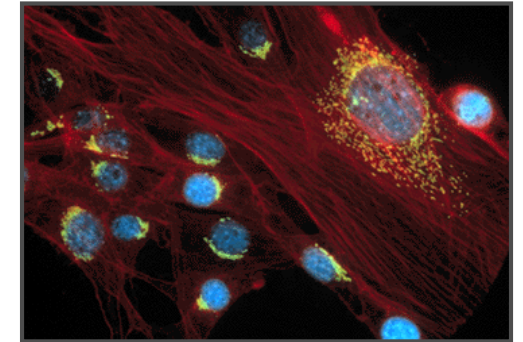
- Фибробласты – основные клетки соединительной ткани кожи
- Синтез и секреция факторов роста клеток (EGF, FGF, TGF, KGF)
- Синтез компонентов внеклеточного матрикса (коллаген, эластин, ГАГ, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат)
- Синтез и секреция различных ферментов, метаболизирующих внеклеточный матрикс

Старение кожи



- Потеря упругости и эластичности кожи, образование морщин
- Неравномерность старения различных участков кожи
- Уменьшение количества и активности фибробластов кожи
- Пересадка фибробластов как метод омоложения кожи

Методы терапии фибробластами



Использование
чужих
(аллогенных)
фибробластов

Использование
собственных
(аутологичных)
фибробластов

**Заместительная
Клеточная
Терапия**

Привлекательность применения аутологичных (собственных) фибробластов для косметолога

- **Используются собственные клетки пациента**
- **Однократное взятие биопсии**
- **Небольшой дискомфорт в процессе применения для пациента**
- **Сохранение эффекта в течение длительного времени**
- **Простота применения**
- **Небольшое число процедур, необходимое для получения эффекта**
- **Отсутствие осложнений и побочных эффектов**

Каким образом доставить пересаживаемые клетки в нужное место?

- Простота применения аутологичных фибробластов – используется внутридермальное введение с помощью шприца

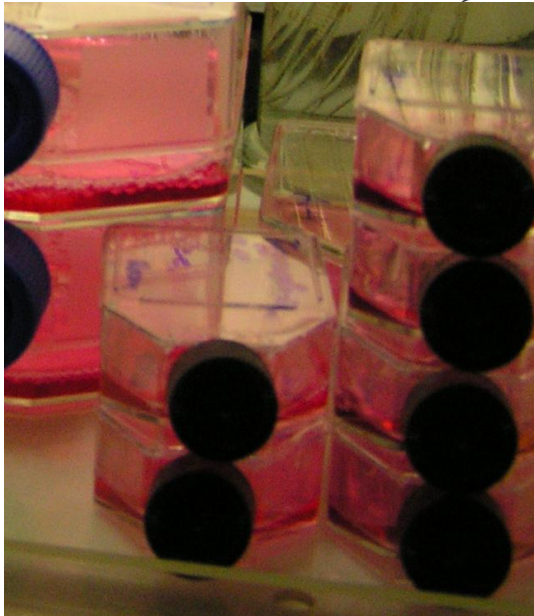


Мировой опыт применения аутологичных фибробластов в косметологии

- ***Аутологичные фибробласты применяют для коррекции морщин, атрофических рубцов, атрофических участков кожи, нарушений структуры кожи (Босс и др., 2000 год)***
- ***В США к 2000 году пролечено 1450 пациентов, сделано около 4800 инъекций***

Результат применения аутологических фибробластов

Аутологичные фибробласты



- Замедляется старение кожи
- Улучшается цвет кожного покрова
- Разглаживаются глубокие и исчезают мелкие морщины
- Повышается упругость и эластичность соединительной ткани кожи

Результат применения аутологичных фибробластов (Isolagen)

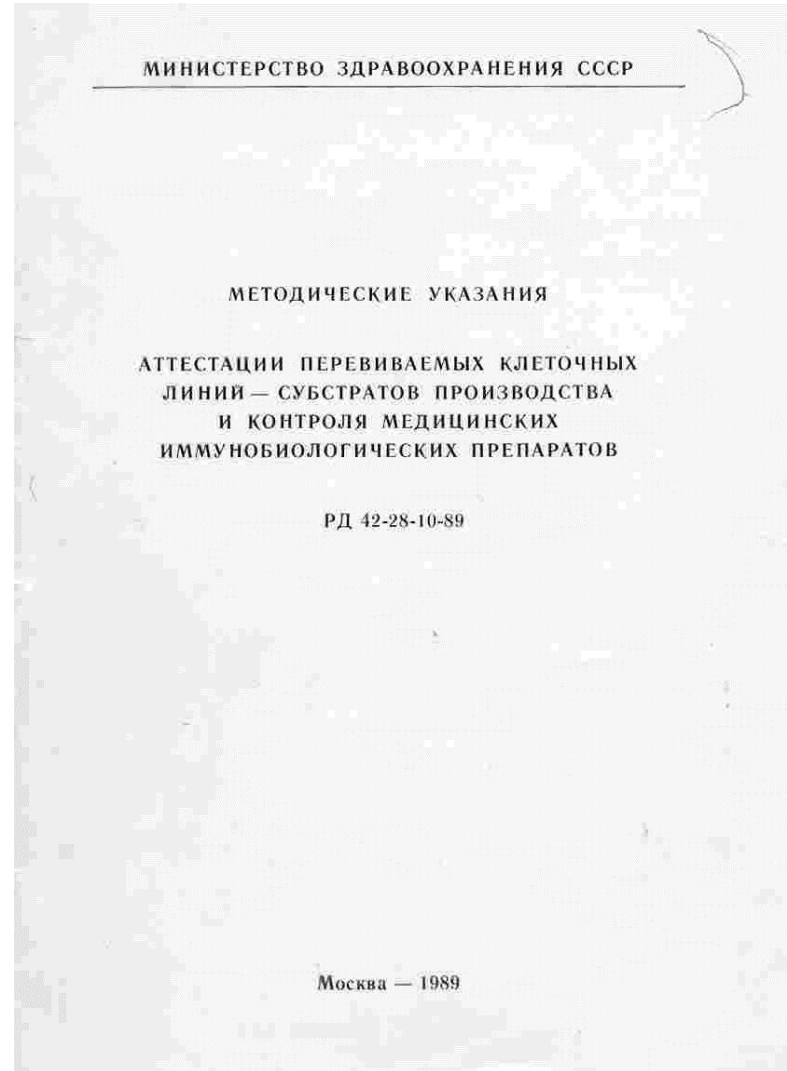


До пересадки

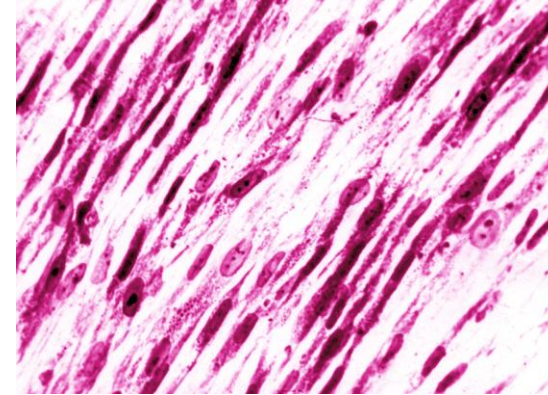
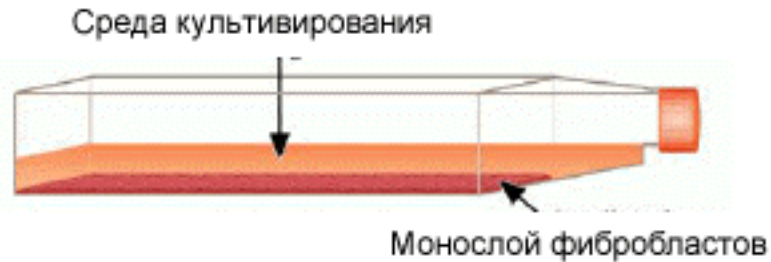


После пересадки

Нормативная документация по фибробластам в России



Процесс культивирования фибробластов

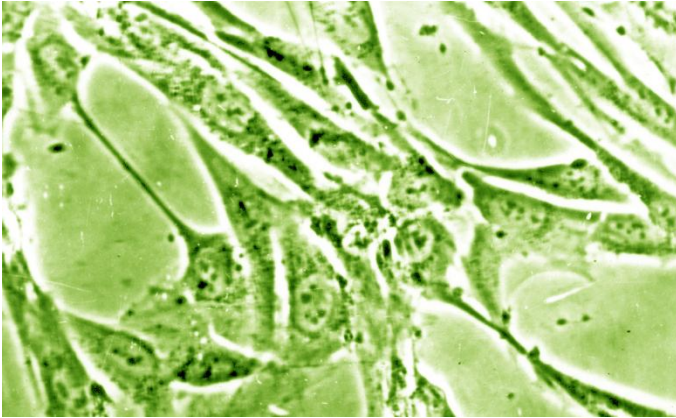


- Исходный материал для получения культуры фибробластов - биопсия кожи пациентов в области предплечья, плеча или за ушной раковиной.
- Методика получения культуры фибробластов
 - *Обработка биопсийного материала ЭДТА, трипсином и коллагеназой,*
 - *Центрифугирование и отмывание от ферментов*
 - *Инкубация клеток в условиях насыщенной влажности при 37`C с 3-5% CO2*
 - *Пересев клеток после образования сплошного монослоя (5-6 пассажей)*
 - *Среда, используемая при культивировании:*
 - *90% ДМЕМ*
 - *10% эмбриональная телячья сыворотка*

Проблема сохранения свойств фибробластов при культивировании вне организма

- Основные свойства фибробластов сохраняются при культивировании вне организма

Свойства культивируемых фибробластов



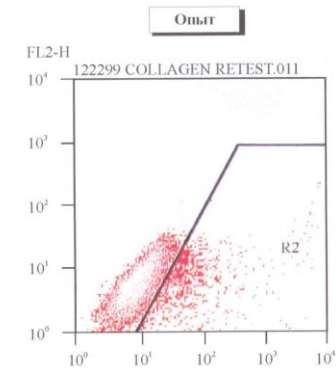
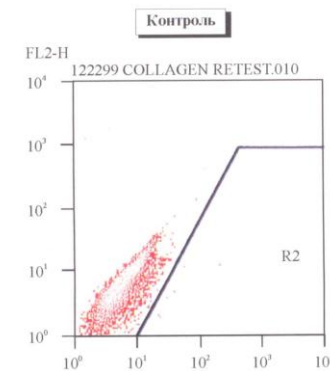
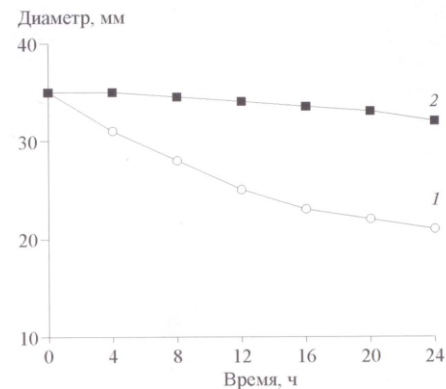
Нормальные
фибробласты в культуре

- **Сохраняют диплоидный кариотип в течении жизни**
- **Имеют ограниченную продолжительность жизни**
- **Обладают свойством контактного торможения делений и требуют прикрепления к субстрату для пролиферации**
- **Отсутствие онкогенных потенций**

Безопасность аутологичных фибробластов (Келлер и др., 2000 год)



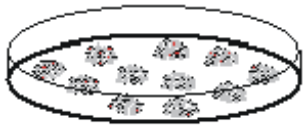
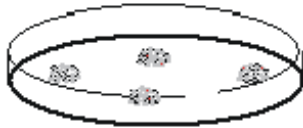
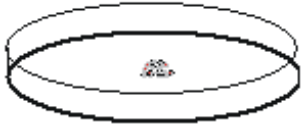
- Значительный эффект при коррекции рубцов и носогубных складок через 7 и 12 мес
- Нормальная сократительная способность фибробластов в отношении коллагена
- Активный синтез коллагена I типа после культивирования *in vitro* в течение 6 пассажей
- Отсутствие опухолей у бестимусных мышей через 2 мес после введения 40 млн клеток



Процесс клонирования фибробластов

- **Жизнеспособность и пролиферативные потенции фибробластов**

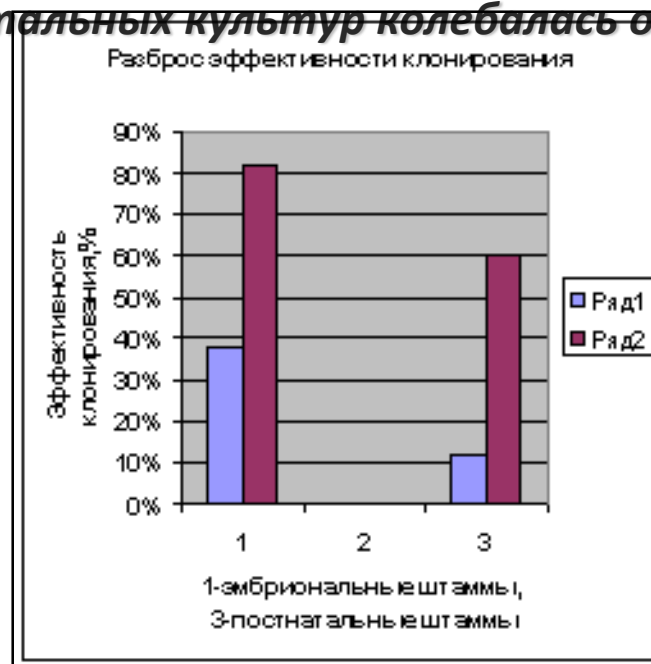
определяли с помощью клонирования



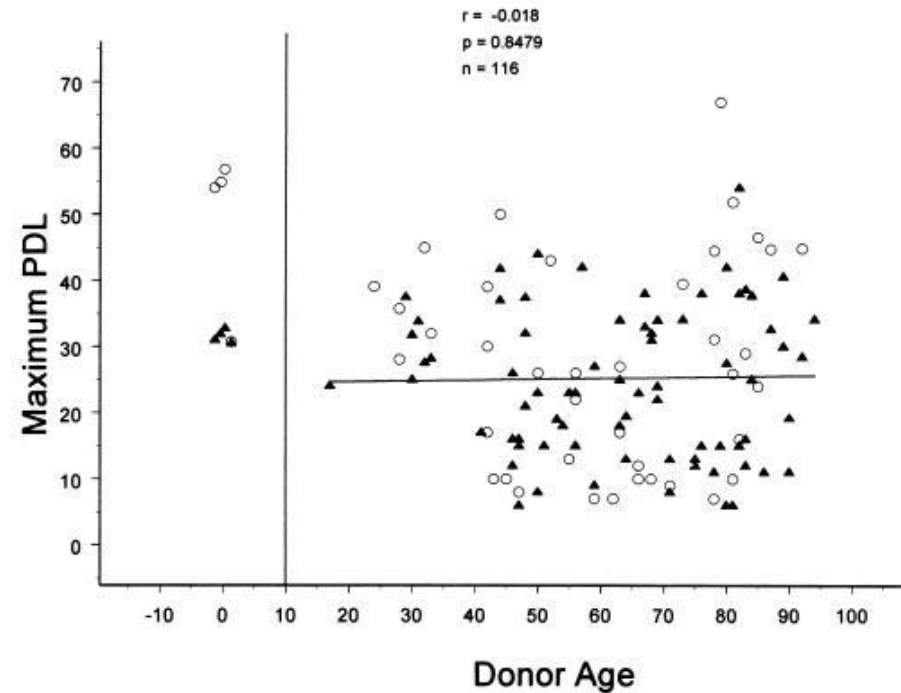
- *Среда, используемая при культивировании:*
 - 90% ДМЕМ
 - 10% эмбриональная телячья сыворотка
- *Трипсинизация клеток с помощью версена и трипсина при 4°C*
- *Взвесь клеток разводили и высевали на пластиковые чашки Петри (диаметр 40мм.)*
- *Инкубация клеток в условиях насыщенной влажности при 37°C с 3-5% CO₂*
- *Число колоний определяли на 14-18 сутки*
- *Эффективность клонирования определялась как отношение числа колоний к числу посеянных клеток*
- *В качестве контроля использовали штаммы фибробластов, полученные из кожи 8-12-недельных эмбрионов*

Эффективность клонирования фибробластов

- **Эффективность клонирования (способность образовывать колонии из 16 и более клеток) для**
 - 1. эмбриональных культур колебалась от 38 до 82 %**
 - 2. постнатальных культур колебалась от 12 до 60 %**



Репликативные потенции фибробластов и возраст доноров



- ***Зависимость пролиферативного потенциала клеток от возраста донора (Cristofalo V.J. et al, 1998). Кружки – доноры женского пола, треугольники – доноры мужского пола***

Отдаленные результаты применения аутофибробластов (Босс и др., 2000 год)

Параметр	Число пациентов	Результаты через 12 мес.	Результаты через 36-48 мес.
Субъективная удовлетворенность результатами, в % от общего числа пациентов	94	92%	70%
Уровень коррекции по 10-балльной шкале	56	7,8	6,5

Клинические испытания аутофибробластов (США, 2004 год)

- Принимают участие 154 пациента в возрасте 25-65 лет
- Мужчин 10% и женщин 90%
- 107 человек коррекция морщин (27 плацебо)
- 47 человек коррекция рубцов (14 плацебо)
- 3 инъекции по 20 млн клеток с интервалом 3-6 недель
- Оценка результатов через 1, 2, 4, 6 месяцев

Результаты III стадии клинических испытаний в США (октябрь 2004 года)

Время после терапии, мес.	Улучшение состояния кожи на 2 и более балла, в % от общего числа пациентов	Достоверность результатов по критерию Фишера
1	57	-
2	79,6	<0,0001
4	77,1	<0,0001
6	81,6	<0,0001

Мировой опыт

• **Доктор Арнольд Клейн (США):** «Лечение морщин с помощью аутологичных фибробластов является наименее трудоемким и наиболее эффективным методом коррекции морщин в моей клинической практике... Этот метод представляется для меня единственным, эффективно убирающим рубцовые изменения после угревой сыпи». По данным А.Клейна эффективность метода достигает 95%.



До пересадки



После пересадки клеток

Эффективность инъекций аутологичных фибробластов (Ватсон и др., 1999 год)

- Наблюдались 10 пациентов 24-69 лет с морщинами и атрофией кожи
 - Делали фотографии и силиконовые слепки участков кожи
 - Топография кожи с помощью оптической профилометрии
 - Контрольная инъекция фибробластов в заушную область
-
- Субъективное улучшение от 60 до 90%
 - Объективное уменьшение размеров морщин от 10 до 85%
 - Увеличение плотности и толщины дермального слоя в контрольной биопсии

Дозировка вводимых аутофибробластов (мировой опыт)

- *3-5 процедур с интервалом 3-6 недель*
- *Количество вводимого препарата 1-1,5 мл*
- *Концентрация клеток от 20 до 40 млн на мл*
- *100 мкл препарата на 1 см для линейных морщин или 50 мкл препарата на 0,5 кв. см кожи*

Оценка жизнеспособности клеток в готовых препаратах

- Жизнеспособность клеток в суспензии, приготовленной на стерильном физиологическом растворе, определяли путем высевания суспензии через различные сроки хранения при 4'С и подсчета живых клеток по их способности прикрепляться к стеклу и давать колонии



Оценка жизнеспособности клеток в готовых препаратах (собственные данные)

- **Жизнеспособность культивируемых клеток в различные сроки после приготовления препаратов**

Время хранения препаратов при 4`С	% жизнеспособных клеток
24	90
48	50
72	<10

Оценка жизнеспособности клеток в готовых препаратах (данные Босса с соавт.2000 год)

- **Жизнеспособность клеток в различные сроки после приготовления препаратов**

Время хранения препаратов при 4`С	% жизнеспособных клеток
24	95
48	85
72	65

Таким образом, суммируя данные литературы, можно сделать вывод, что при условии функциональной сохранности собственные фибробласты являются оптимальным средством коррекции дефектов мягких тканей лица, поскольку полностью исключается риск иммунных реакций, и пересаженные живые фибробласты будут длительное время продуцировать коллаген в тех местах, где он необходим.

Совместимость аутофибробластов с другими методами коррекции дефектов кожи
(Босс и др. 2000 год)

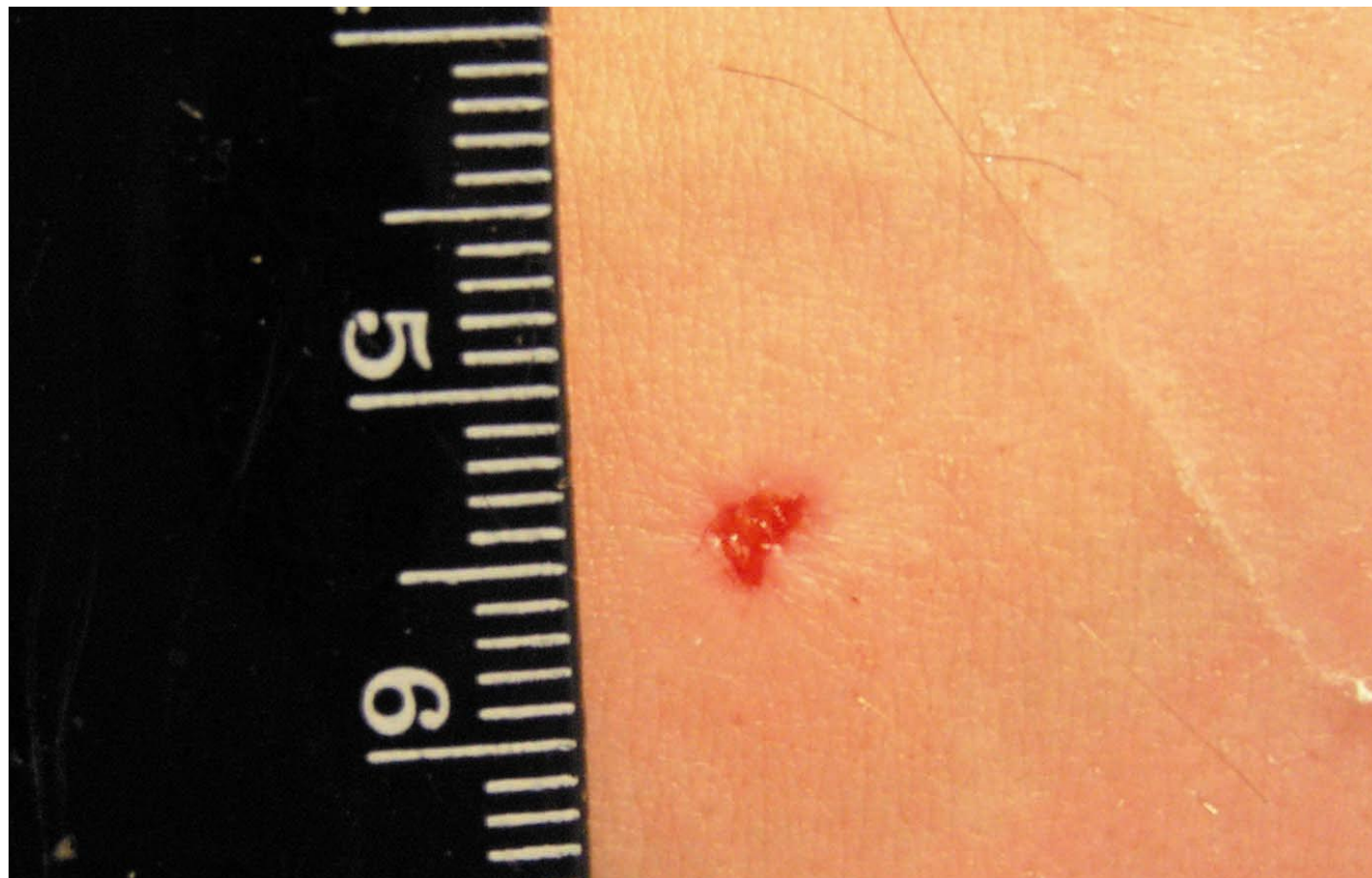
Дефект	Лечение
Дефекты эпидермиса	Пилинги (гликолевая к-та), аскорбиновая к-та, поверхностная лазерная шлифовка
Мелкие морщины	Аутофибробласты как монотерапия или в сочетании с глубоким пилингом или лазерной шлифовкой
Глубокие морщины	Аутофибробласты как монотерапия или в сочетании с инъекционными препаратами коллагена как альтернатива липофилингу
Динамические морщины	Ботокс в сочетании с аутофибробластами
Шрамы (постакне, травма)	Аутофибробласты как монотерапия или в сочетании с лазерной шлифовкой и пилингами

Сочетание аутологичных фибробластов с Рестилайном (Юн и др., 2003 год)

- Бестимусным мышам вводили Рестилайн или Рестилайн, смешанный с культивированными фибробластами кожи человека
 - Рестилайн рассасывался на 50% за 4 месяца наблюдений
 - Рестилайн с фибробластами рассасывался на 10% за 4 мес.
 - Иммуногистохимически показан синтез человеческого коллагена фибробластами в течение 4 мес наблюдений
- Делается вывод о возможности применения фибробластов в сочетании с Рестилайном для получения быстрого и долговременного эффекта

Получение исходного материала биопсия кожи (собственные данные)

Исходный материал для получения культуры фибробластов -
биопсия кожи пациентов в области предплечья, плеча или за ушной
раковиной (На фото след от биопсии через 7 дней после процедуры)



Процедура введения клеток (собственные данные)



Процедура введения клеток



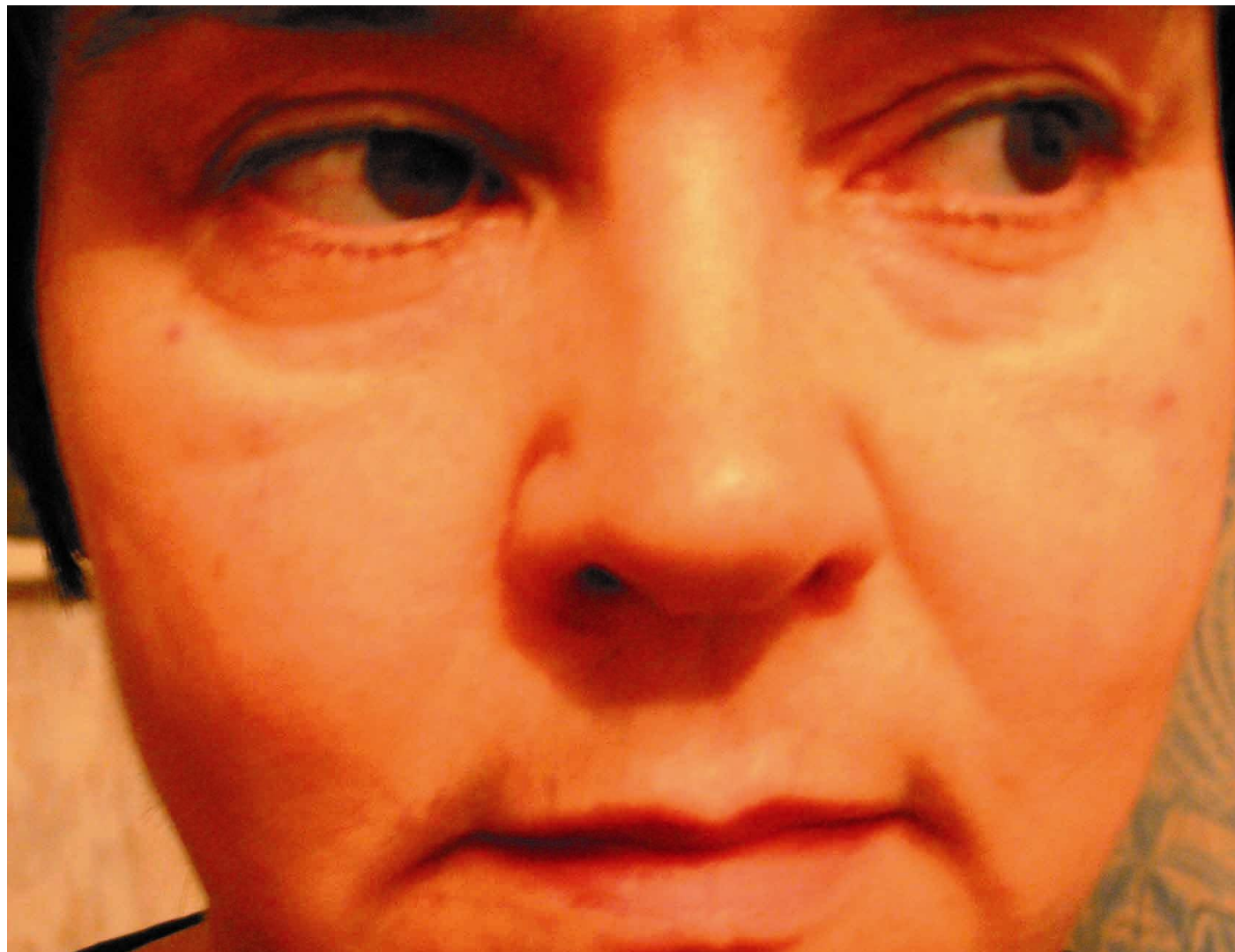
Процедура введения клеток



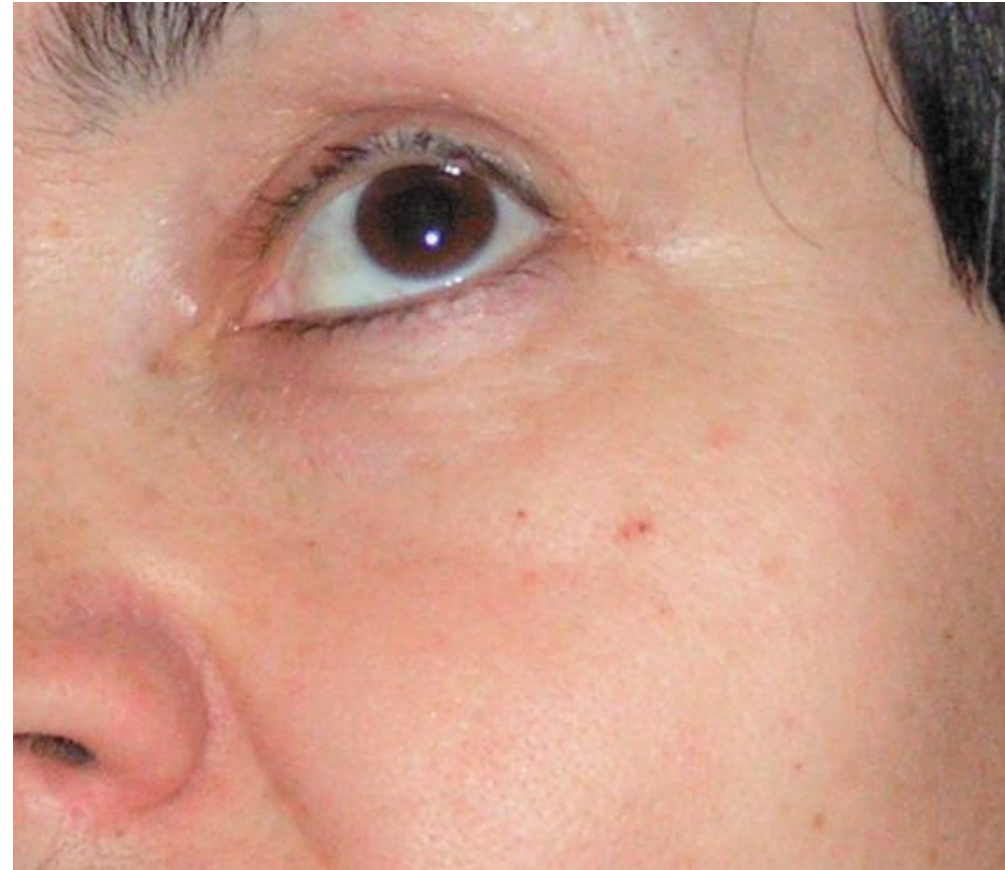
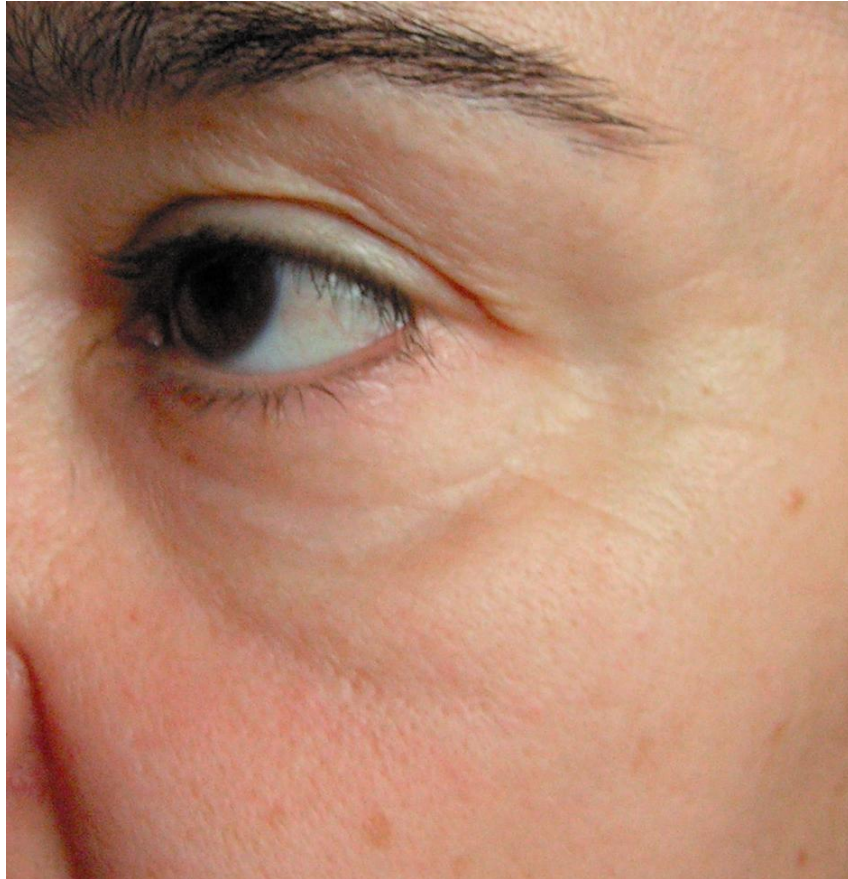
Процедура введения клеток



Через 2 часа после введения фибробластов



До процедуры и через 3 месяца после введения фибробластов



Результаты коррекции мимических морщин лобной области (собственные данные)



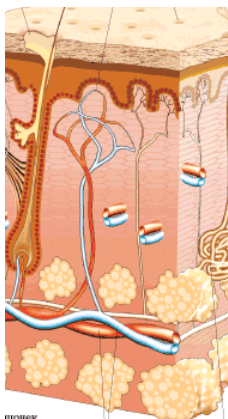
До процедуры

Через 1 месяц

Обсуждение результатов

При культивировании аутологичных фибробластов от взрослых доноров *in vitro* может происходить реактивация или «омоложение» клеток в культуре, что обуславливает эффект пересадки

Первичная культура



Рабочая культура



Пересадка реактивированных клеток

Перспективы развития технологии аутологичных фибробластов

- ***Выяснение механизмов стимулирующего действия аутофибробластов***
- ***Оптимизация схемы терапии и дозы вводимых клеток***
- ***Оценка влияния состояния организма (возраст, гормональный статус и др.) на результаты пересадки аутофибробластов***
- ***Использование новых клеточных инструментов (аутологичные фибробласты жировой ткани) для коррекции дефектов кожи.***