

ИТОГИ ШЕСТИЛЕТНИХ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДЕФЕКТОВ КОЖИ

Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Малишевская Е.Г.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздрава России
ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
Россия, Екатеринбург

Контактный e-mail: larim@mail.ru

Успехи развития эстетической медицины свидетельствует о том, что радикальное решение проблемы коррекции возрастных изменений лежит в области применения клеточных технологий для заместительной терапии.

Накопленные данные ставят генетически идентичные реципиенту аутогенные клетки в число исключительно возможных для практического использования, поскольку последние позволяют достигнуть стабильного улучшения состояния кожи посредством радикального обновления дермы за счет новообразования волокон и межклеточного вещества.

В тоже время генетически чужеродные фибробласты обычно вызывают такую же типовую реакцию отторжения, как и клетки других типов.

В течение последних 6 лет в Лаборатории молекулярных медицинских технологий Уральской госакадемии с привлечением баз косметологических салонов и лечебно-профилактических учреждений г. Екатеринбурга проводилось масштабное исследование применения аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. Работа выполнялась согласно приказа Министерства здравоохранения и социального развития РФ «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий» от 31.12.2004 г. № 346, лицензии Минздрава РФ, разрешающей осуществление клинических исследований лекарственных средств от 13.03.2001 г. №166 и в соответствии с решением Этического комитета и Ученого совета Уральской госакадемии Росздрава, утвердившего программу научно-исследовательских работ и протоколы доклинических и клинических испытаний клеточных технологий.

Эксперименты осуществлялись с учетом международных норм GLP (Кодекс правил для лабораторных исследований) и GCP (Кодекс правил для клинических испытаний).

Цель исследования — обоснование и разработка метода коррекции изменений кожи с помощью собственных (аутогенных) фибробластов кожи пациента, культивированных *in vitro*.

Изучение использования аутологичных культивируемых дермальных фибробластов проводилось на доклиническом и клиническом этапах.

При выполнении доклинического этапа работы были отработаны вопросы выделения, культивирования клеток, определены места взятия эксплантата, создана система контроля инфекционной и онкобезопасности клеточного материала, оценена степень риска введения аутологичных фибробластов пациентам [3-5].

Полученные результаты позволили 6 лет назад приступить к клиническим испытаниям.

Материалы и методы

Кожный эксплантат площадью 10 мм² получали с ягодичной области под проводниковой анестезией. Клетки после снятия с флакона или разморозки во всех случаях восьмикратно отмывали центрифугированием (150 g; 10 мин; 4 °C) с удалением супернатанта. Жизнеспособность и пролиферативная активность клеток перед введением составляла не менее 95%. Суспензию клеток, отмывых на 0,9% растворе NaCl, разогревали до 37 °C непосредственно перед введением.

Выбор зоны введения клеток для терапевтической коррекции кожи осуществлялся самим пациентом на основании

субъективного определения наиболее проблемной области лица и согласовывался с врачом-косметологом.

Количество вводимых клеток варьировало в зависимости от объема проблемной зоны и составляло в среднем от 3 x 10⁶ до 15 x 10⁶. Разовый объем вводимого препарата - 1-3 мл. Клетки вводили пациентам методом «папулы» для крупных морщин, обкалывания мелких морщин или равномерно на площадь проблемной зоны с помощью микроинъекций; введение повторялось 2 - 4 раза с 7 - 10-дневными перерывами.

Допущенные к испытанию пациенты в возрасте 43-67 лет имели признаки естественного увядания кожи лица или косметические дефекты. Противопоказаний для взятия эксплантата и применения данной технологии выявлено не было. Всего в испытаниях участвовали 83 пациента. 38 пациентов были удалены из анализируемой выборки в связи с проведением повторного курса клеточной терапии по поводу коррекции кожи других областей тела (кисти рук, передняя брюшная стенка, зона декольте, колени - 36 испытуемых) и повторении курса введения клеток область лица через 12-18 месяцев (22 пациента).

Культуры аутофибробластов проходили все этапы контроля. Отводов от трансплантации аутофибробластов по превышению контрольных лабораторных показателей у допущенных к испытаниям не зарегистрировано.

Изменения кожи после трансплантации отслеживались в динамике на протяжении 72 месяцев. Степень внешней косметической коррекции оценивалась как специалистами, так и самими испытуемыми. Все пациенты с периодичностью в 3 месяца заполняли специальную анкету, в которой отмечали степень положительной динамики, побочные эффекты, их выраженность и продолжительность.

Испытуемые оценивали общую степень своей удовлетворенности косметическим эффектом по 10-балльной шкале. Полная, с субъективной точки зрения пациента, ликвидация признаков старения кожи в зоне введения клеток оценивалась 10 баллами.

Экспертная оценка производилась по аналогичной шкале двумя специалистами с усреднением результатов на завершающем этапе испытания.

Ультразвуковое сканирование кожи выполнялось на УЗ-сканере DUB (TPM, Германия) до введения клеток и спустя 6 месяцев.

Результаты и их обсуждение

После трансплантации аутофибробластов все пациенты отмечали появление легкого покраснения, слабого зуда, а также кровоизлияний в эпидермис (у 2 пациентов) при попадании иглой в микрососуды во время введения. У 81 испытуемого признаки покраснения бесследно исчезали в течение первых суток, у одной пациентки покраснение сохранялось до двух суток.

Все испытуемые после введения аутофибробластов отмечали положительный косметический эффект в проблемной области, заключавшийся в уменьшении выраженности крупных и мелких морщин, кожных дефектов, а также в общем оздоровлении кожи лица в области трансплантации фибробластов.

Каждые 3 месяца в течении 6 лет по 10-балльной шкале отмечали степень удовлетворенности эффектом после вве-

дения. Оценка испытуемым степени выраженности эффекта в большинстве случаев совпала с мнением экспертов.

Отслеживалась стойкая динамика положительного косметологического эффекта с течением времени (рис. 1). Наибольшая его выраженность наблюдалась к 15 — 18 месяцам после терапии. Примечательно, что 38 пациентов за годы наблюдений обратились повторно, а 20 — более 2 раз с целью косметической коррекции других зон тела. Коррекция проводилась с использованием «персональных» клеточных линий, хранящихся в жидком азоте. Пациенты, получившие дополнительные курсы терапии, были исключены из анализируемой выборки.

В процессе доклинического этапа зависимость функциональных параметров клеток от возраста донора нами не была установлена. Это свидетельствует о сохранении в закрытых участках кожи клеток-предшественников фибробластов с высоким пролиферативным потенциалом, способным обеспечить эффективное клонирование клеток. Это заключение согласуется с результатами других исследователей, в частности Cristofalo V.J., не выявившего корреляционной взаимосвязи между возрастом донора и продолжительностью жизни фибробластов в культуре [9]. Тем самым подтверждается возможность применения аутогенных культур фибробластов с закрытых участков кожи пожилых пациентов для трансплантации в зоны с утратой активных клеток. Полученные данные продемонстрировали возможность не стимулированного факторами роста наращивания функционально активной клеточной массы, достаточной для коррекции возрастных изменений кожи на максимальной площади.

Практическое применение культур клеток для омоложения кожи в косметологии с использованием аутогенных фибробластов началось сравнительно недавно. Некоторым исключением можно считать американских патентообладателей технологий их применения, выполнивших несколько тысяч пересадок аутофибробластов пациентам и проследивших сохранение положительного эффекта на состояние кожи пациентов в течение 3-4 лет после пересадки [6,7].

Клинические исследования предусматривали двойные слепые плацебоконтролируемые испытания, которые проводились в нескольких центрах на территории США и Европы с охватом в общей сложности 1450 человек. Субъективная удовлетворенность пациентов оценивалась дважды: через 12 месяцев после лечения и через 36 — 48 месяцев. В эти сроки фиксировалась удовлетворенность результатом — от 92% до 70% соответственно и продолжительное прогрессирующее улучшение состояния кожи в течение одного-двух лет у 88% пациентов.

Помимо результативности технологии оценивалась ее безопасность. Возникновение побочных эффектов было отмечено в 0,27% случаев, при этом испытуемые предъявляли жалобы на гиперемию и отечность в области введения клеток.

Зарегистрированные побочные эффекты не вызвали системных последствий и осложнений и практически всегда исчезали в течение 72 часов (3 суток).

Из всех испытуемых (1450 человек) только у 2 пациентов побочные эффекты самопроизвольно не проходили в течение 7 — 10 суток, после чего бесследно исчезли. Анализ данных американских исследователей служит убедительным доказательством эффективности технологии трансплантации аутофибробластов с целью коррекции изменений кожи лица и подтверждает безопасность данной технологии. Технология была одобрена Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) и разрешена к применению.

Стойкий клинический эффект наблюдали пользователи запатентованной W. K. Boss технологии, в частности Г. Келлер, вводящий аутогенные фибробласты кожи пациен-

там в возрасте 37 — 61 года, а также G.S. Chernoff, проследивший результаты применения аутофибробластов у 104 пациентов с эффективностью коррекции изменений кожи от 30 до 75% [1, 8].

Полученные нами результаты продемонстрировали более выраженный эффект клеточной терапии аутогенными культивируемыми клетками полученными с ягодичной области.

В качестве возможного объяснения длительного положительного эффекта обычно приводятся сведения о том, что при культивировании многих клеток *in vitro* происходит их возврат в состояние, близкое к свойствам клеток-предшественников. Скорее всего, речь может идти о давно известном свойстве культивируемых клеток приобретать высокую чувствительность к гуморальным факторам, содержащимся в том числе и в эмбриональной сыворотке, и даже о «дедифференцировке», возможность которой широко обсуждается среди «культуральщиков» [2]. Однако, по нашим данным, в культуре происходит отбор и стимуляция юных клеток, сохранивших высокие потенции к делению и росту, и вытеснение из культуры маложизнеспособных клеток, имеющих ограниченную способность к пролиферации. Важной составляющей успешности применения технологии в нашем исследовании явилась область эксплантации клеток — ягодичная область, клетки которой, в отличие от клеток заушной складки [6-8], обладают комплексом уникальных свойств [3-5].

При пересадке в кожу пациента культура клеток локально заселяет дерму и синтезирует компоненты внеклеточного матрикса и факторы роста, необходимые для поддержания всех слоев кожи пациента в лучшем состоянии. Это находит подтверждение в исследованиях M. Freedland, свидетельствующих о том, что трансплантированные фибробласты, стимулированные цитокинами, отвечают активным синтезом коллагена и неколлагеновых белков [10].

Положительный клинический эффект применения препаратов фибробластов у пациентов в возрасте 43 — 65 лет указывает на сохранение восстановительного потенциала аутофибробластов, что позволяет использовать их для коррекции изменений кожи. Предстоящие исследования в этом направлении должны быть нацелены на оптимизацию схем терапии, количества вводимых фибробластов и установление отдаленных результатов.

Таким образом, шестилетние клинические испытания метода трансплантации аутогенных фибробластов для коррекции изменений кожи продемонстрировали положительные результаты, что открывает возможности для его практического применения в терапевтической косметологии.

Литература

1. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомб Ю., Тофт К., Ласк Г., Ре-вазова Е. Сохранность инъекцируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюл. эксп. биол. мед. — 2000. — 130(8). — С. 203 — 206.
2. Кеннон В., Резенблот А. Повышение чувствительности де-нервированных структур. — М., 1951. — 262 с. Методические указания РД 42-28-10-89. — Минздрав СССР. — М., 1989.
3. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И., Измайлов И.Х., Медведева С.Ю., Костюкова С.В., Куликов Е.С., Ястребов А.П. Применение аутогенных фибробластов для коррекции возрастных изменений кожи // Вестник Уральской медицинской академической науки. - Екатеринбург, 2005, №4. С. 59-65.
4. Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С. Отчет о трехлетних испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи //Ж-л Вестник Уральской медицинской академической науки. Екатеринбург, 2008 №4. С. 63-70.

5. Makeev O.G., Ulybin A.I., Zubanov P.S., Malishevskaya E.G.. Использование аутологичных культивируемых дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи. //Вестник эстетической медицины. 2008, №2, С. 4-19.

6. Boss W.K. Jr. Autologous dermal fibroblasts for the repair of skin and soft tissue defects // United States Patent 5, 665, 372. — September 9. — 1997.

7. Boss W.K. Jr. Use of autologous undifferentiated mesenchymal cells for the repair of skin and soft tissue defects // United States Patent 5, 858, 390. — January 12. — 1999.

8. Boss W.K., Usal H., Chernoff G.S., Lask G.P., Fodor P.B. Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery // Clinics in Plastic Surgery. — 2000. — V. 27. — №4. — P. 613 — 626.

9. Cristofalo V.J. et al. Proc. Nad. Acad. Sci. USA. — 1998. — 95 (18). — P. 10614—10619.

10. Freedland M. et al. Ann Plast Surg. — 1995. — 35 (3). — P. 290 — 296.

REPORT ABOUT SIX-YEAR CLINICAL RESEARCH OF AUTOLOGOUS DERMAL FIBROBLASTS FOR CORRECTION SKIN DEFECTS

Makeev O.G., Ulybin A.L., Zubanov P.S., Malishevskaya E. G.

We have established and used autologous fibroblast cultures for correction skin age changings. Patients with age 43 — 60 were observed for 36 months. There were found positive effects — disappearance of small wrinkles, reduction of rough wrinkles, improvement of general skin appearance. Our technique supports sustained multiplication of human fibroblasts for a long time period, and they retained the capacity to grow in vivo when returned to the patient. Conclusion: autologous fibroblast culturing provides a suitable method for repairing skin defects among aged patients.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОГО СОМАТОТРОПИНА, ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ МЕСТНЫХ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ОДНОКОНЦЕВОЙ КОЛОСТОМИИ

Малахов В.В., Дегтярёв Ю.Г.

ВО Белорусский государственный медицинский университет
Кафедра детской хирургии,
ГНУ «Институт физиологии НАН РБ»
Республика Беларусь, г. Минск

Контактный e-mail: malahov.v.v.1987@mail.ru

Многоэтапные схемы хирургического лечения, включающие временную или постоянную колостомию, стали стандартным подходом в хирургическом лечении многих urgentных и специфических заболеваний толстой кишки. Одной из наиболее важных проблем являются послеоперационные гнойно-септические осложнения, которые развиваются в 10,5 - 44,4% случаев [1]. В исследовании V.J.A. Salles [8] показано, что данные осложнения могут быть связаны с угнетением клеточного иммунитета в участках кожного покрова прилегающих к колостоме. В ряде исследований [4,5,7] отмечено положительное влияние соматотропина на свойства кишки при колостомии и звенья клеточного иммунитета.

Материалы и методы исследования

В данном исследовании мы использовали разработанную нами модель одноконцевой колостомы для белых лабораторных крыс [2].

Для экспериментальной части исследования нами было отобрано 20 самцов белой крысы возрастом 4 месяца, массой от 360 до 390 гр. Животных разделили на 2 группы по 10 крыс:

- 1) Группа А - контроль;
- 2) Группа В - вводился генно-инженерный СТГ подкожно из расчёта 2,25 МЕ/кг [3] в течении 7 послеоперационных дней.

За животными в течении 14 суток производили систематическое наблюдение с фиксацией результатов каждые 7 дней. Были выбраны следующие критерии наблюдения: наличие внешних признаков гнойно-септического воспаления в зоне вокруг колостомы и послеоперационной раны, температура ядра тела, уровень лейкоцитов в ОАК (кровь забиралась на 1,7,14 послеоперационные сутки), КОЕ E.coli в мазке кожи вокруг стомы (выполнялся на 3-е послеоперационные сутки).

При появлении гнойно-септических осложнений лечение сводилось к местной обработке гнойной раны. Статистическая обработка проводилась программой Windows Statistica 6.0

Результаты и их обсуждение:

1. Данные о частоте местных гнойно-септических осложнений в группах А и В за период наблюдения представлены в таблице 1

Таблица 1

Частота местных гнойно-септических осложнений в группах А и В

Группа	1-е послеоперационные сутки	7-е послеоперационные сутки	14-е послеоперационные сутки
А	0 особей (0%)	5 особей (50%)	4 особи (40%)
В	0 особей (0%)	1 особь (10%)	0 особей (0%)

2. Данные о температуре ядра тела и динамике уровня лейкоцитов представлена за период наблюдения представлены в таблицах 2,3

Таблица 2

Температура ядра тела в группах А и В (p<0,001)

Группа	1-е послеоперационные сутки	7-е послеоперационные сутки	14-е послеоперационные сутки
А	40,38± 0,8°C	40,85± 1°C	38,5± 0,3°C
В	40,42± 1,1°C	38,48± 0,36°C	38,29± 0,23°C

Нормотермией ядра тела у крыс считается T°= 38-39 °C[7]

Таблица 3

Динамика уровня лейкоцитов в ОАК в группах А и В (p<0,001)