Морфологическое обоснование клинической эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами, у мужчин, страдающих андрогенетической алопецией

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

²Кожно-венерологический диспансер № 4, Санкт-Петербург

Резюме. Представлено морфологическое обоснование клинической эффективности богатой тромбоцитами плазмы у 22 мужчин, страдающих андрогенетической алопецией I–IV стадии по шкале Норвуда – Гамильтона. Все пациенты получали инъекции богатой тромбоцитами плазмы, которую вводили интрадермально по 0,15 мл на одну инъекцию. Курс лечения состоял из 4 процедур с интервалом в 4 недели. Клиническую эффективность оценивали по динамике морфометрических показателей роста волос. Гистологическое исследование проводили на горизонтальных срезах (окраска гематоксилином и эозином), морфологию волос подсчитывали на четырех уровнях. Оценку морфометрических параметров роста волос проводили до лечения и через 4 месяца после начала него. Установлено, что терапия богатой тромбоцитами плазмой имеет выраженную клиническую эффективность, состоящую в достоверном ($p=0,00025$) увеличении плотности волос на 11% и среднего диаметра волос на 10% ($p=0,00766$), снижении доли vellus-волос на 14% ($p=0,00959$). При гистологическом исследовании увеличение плотности волос было достоверным ($p=0,0034$) на уровне луковиц волосяных фолликулов на 148% и на уровне потовых желез на 65% ($p=0,0326$), также наблюдалась тенденция к росту их числа на уровне сальных желез. Это сочеталось с достоверным ($p=0,0153$) снижением доли телогеновых волос на 47%. Таким образом, положительный клинический эффект терапии богатой тромбоцитами плазмой у мужчин, страдающих андрогенетической алопецией, обоснован достоверными морфофункциональными изменениями волосяных фолликулов.

Ключевые слова: андрогенетическая алопеция, интрадермальные инъекции богатой тромбоцитами плазмы, морфология волос, гистологическое исследование волос на горизонтальных срезах, фототрихограмма, анаген, телоген, веллус.

Введение. В последнее десятилетие богатая тромбоцитами плазма (БотП) широко применяется в лечении заболеваний волосистой части головы, сопровождающихся выпадением волос, – гнездной [8], рубцовой [14], а также андрогенетической алопеции (АГА) [6]. В лечении АГА применение БотП в виде монотерапии также представляется высокоэффективной методикой [2]. Z.J. Li et al. [5] указывают на то, что БотП способствует пролиферации и продолжительности жизни клеток дермального сосочка во время цикла роста волос в результате экспрессии фактора роста фибробластов и β -катенина вместе с активацией внеклеточной сигнал-опосредованной киназы и Akt-сигнального пути, продлевая фазу анагена. БотП увеличивает длительность существования клеток за счет ингибирования апоптоза, повышает уровень антиапоптотических белков Bcl-2, что клинически проявляется в снижении интенсивности выпадения волос (доли телогена). C.O. Uebel et al. [10] предполагают, что факторы роста, содержащиеся в тромбоцитах, связываются с чувствительными к ним рецепторами и активируют пролиферативную фазу волос, что дает возмож-

ность росту новых фолликулярных юнитов. M.A. Gkini et al. [3] провели систематический обзор 14 опубликованных исследований о применении БотП в лечении АГА, среди которых основными клиническими результатами являлось увеличение плотности и снижение выпадения волос. Однако при имеющихся положительных результатах влияния БотП на рост волос на моделях в пробирке и высокой клинической эффективности при лечении АГА ее эффекты на морфофункциональное состояние волосяных фолликулов (ВФ) отсутствуют.

Цель исследования. Морфологически обосновать клиническую эффективность БотП в лечении пациентов, страдающих АГА.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 22 пациента в возрасте от 20 до 43 лет (средний возраст $30,5 \pm 2,7$ лет). У 20 пациентов диагностирована II–IV степень тяжести АГА по шкале Hamilton – Norwood [4], у 2 пациентов – I степень. Средняя длительность заболевания составляла $3,3 \pm 0,91$ года.

Для получения БоТП у каждого пациента путем венепункции забирали 18 мл крови в 2 пробирки с антикоагулянтом. В качестве антикоагулянта использовался 3,8% цитрат натрия в соотношении 1:9. Проводили двукратное центрифугирование крови с использованием центрифуги «GT 416» фирмы «Glotech Co., Ltd» (Корея), имеющей горизонтальный ротор и режим «софт-старт». Первое центрифугирование проводили в течение 5 мин на скорости 1800 об/мин, после чего отделяли эритроцитарную массу. Плазма, содержащая лейкоцитарный и тромбоцитарный слои, подвергалась второму центрифугированию на скорости 2500 об/мин в течение 10 мин. В качестве БоТП использовали 2 мл нижней части супернатанта из каждой пробирки, отделение плазмы производили вручную. В качестве активатора применяли официальный раствор хлористого кальция в соотношении 1:20. Поверхность кожи головы обрабатывалась раствором хлоргексидина, местную анестезию не применяли. Полученную БоТП вводили в кожу волосистой части головы путем микроинъекций интрадермально, приблизительно по 0,15 мл на одну инъекцию. Процедуры проводили 1 раз в 4 недели, курс состоял из 4 процедур. От всех пациентов получено информированное согласие на обследование и лечение.

Клиническую эффективность терапии оценивали по динамике морфометрических показателей роста волос. Трихологическое исследование выполняли с помощью цифровой видеокамеры «Aramo S» фирмы «Aram NuvisCo., Ltd.» (Корея) и компьютерной программы TrichoSciencePro v1.3RUS. Плотность волос определяли на 1 см², долю vellusных и телогеновых волос – в %, средний диаметр всех волос – в мкм, соотношение волос в стадии телогена/анагена – как количество анагеновых волос на 1 телогеновый. Точки контроля были помечены татуажной меткой и находились в теменной зоне, приблизительно на 2 см ближе к центру от границы поредения волос.

Биоптаты кожи для гистологического исследования были получены от 11 пациентов до и после лечения. Биопсию кожи проводили под местной анестезией 1% раствором лидокаина с эпинефрином для достижения анальгезии и уменьшения кровотечения. Забор материала проводили панчем для биопсии диаметром 4 мм [11, 12]. Кусочки кожи фиксировали в 10% нейтральном формалине (pH 7,2), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по стандартной методике. При приготовлении срезов проводили один горизонтальный разрез на глубине около 1 мм ниже поверхности эпидермиса. Обе отрезанные стороны образца заливали в кассете, ориентируя срезанным краем в одну сторону. При приготовлении горизонтальных срезов по мере того, как микротом делал более глубокие срезы блока, они становились все более поверхностными с одного конца образца и более глубокими с другого. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфологический анализ включал оценку показателей на горизонтальных срезах и проводился на 4 уровнях: на уровне подкожной жировой клетчатки (ПЖК), потовых желез, сальных желез и устьев ВФ. Плотность волос оценивали на всех уровнях. Диаметр стержней волос, количество vellusных и миниатюризированных волос рассчитывали на уровне сальных желез ВФ. Vellusными считали волосы, диаметр стержня которых был равен толщине внутренней оболочки фолликула или меньше ее и составлял $\leq 0,03$ мм. Волосы в стадиях анагена, катагена и телогена подсчитывались на уровне сальных желез. К телогеновым относили волосы, у которых отсутствовала внутренняя оболочка или на стадии позднего телогена определялось нерегулярное скопление базалеоидных звездчатых клеток в форме островков с ядрами, расположенными по периферии. К волосам в фазе анагена относили волосы, характеризующиеся наличием внутренней оболочки корня волоса и отсутствием некроза клеток. Гистологическое исследование выполнялось с помощью сканирующей системы «3DHitech Pannoramic» и компьютерной программы Pannoramic Viewer 1.15.4 фирмы «3DHISTECH Ltd», (Венгрия).

Статистическая обработка и визуализация результатов осуществлялась при помощи программы Microsoft Office Excel (версия 15.0.50.31.1000, 2013) и стандартных средств языка программирования R (версия 3.4.37). Для отображения центра распределения использовалось среднееарифметическое с указанием доверительного интервала. Рассчитывали p-value – вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы (вероятность ошибки первого рода), значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым [1].

Результаты и их обсуждение. В ходе лечения пациентов БоТП отмечена выраженная клиническая эффективность, которая состояла в достоверном увеличении плотности волос ($\Delta 11\%$; $p = 0,00025$) и среднего диаметра волос ($\Delta 10\%$; $p = 0,00766$), а также в достоверном снижении доли vellusных волос ($\Delta 14\%$; $p = 0,00959$), таблица 1, рисунок 1.

Таблица 1
Динамика показателей фототрихологического исследования

Показатель	До лечения	После лечения	P-value
Плотность волос на 1 см ²	372,3 $\pm$ 49	413,3 $\pm$ 52,9	0,00025
Доля vellusных волос, %	50,6 $\pm$ 7,9	43,3 $\pm$ 8,2	0,00959
Средний диаметр всех волос, мкм	39,5 $\pm$ 3,8	43,3 $\pm$ 4,5	0,00766
Доля телогеновых волос, %	40,7 $\pm$ 7,18	36,3 $\pm$ 7,9	0,1448

Рис. 1. Фототрихограмма: а — до лечения; б — через 4 месяца после лечения, ув.×60

Рис. 2. Горизонтальный срез кожи на уровне ПЖК: а — до лечения; б — через 4 месяца после лечения. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×120

Рис. 3. Горизонтальный срез кожи на уровне сальных желез: а — до лечения, б — через 4 месяца после лечения. Окраска гематоксилином и эозином, ув. ×100

Клинически определяемое увеличение плотности волос сопровождалось достоверным увеличением количества ВФ на уровне ПЖК ($\Delta 148\%$; $p=0,0034$) и на уровне потовых желез ($\Delta 65\%$; $p=0,0326$), также наблюдалась тенденция к росту их числа на уровне сальных желез. Это может быть следствием перехода некоторого количества волос из состояния веллусных в состояние терминальных, которые имеют большую глубину залегания ВФ. Подтверждением этого является достоверное снижение доли

телогеновых волос ($\Delta -47\%$; $p=0,0153$), тенденция к увеличению количества волос в фазе анагена по отношению к количеству волос в стадии телогена (соотношение анаген/телоген, $\Delta 103\%$; $p=0,0562$), таблица 2, рисунок 2, 3.

Разница в клиническом и гистологическом исследованиях показателей доли веллуса и телогена может быть связана с малым объемом выборки и различием размера участка для клинической оценки и размером биоптата.

Таблица 2

Динамика показателей морфологического исследования

Показатель	До лечения	После лечения	P-value
Уровень луковицы ВФ (подкожной жировой клетчатки)			
Количество ВФ, М±m	49±36,8	121,3±37,2	0,0034
Уровень потовых желез			
Количество ВФ, М±m	93,4±34,1	154,5±56,8	0,0326
Уровень сальных желез			
Количество ВФ, М±m	157,1±43,1	197,2±36,3	0,0959
Доля vellusa, %, М±m	48,1±14	37,2±26	0,3286
Средний диаметр, мкм, М±m	30,1±4,1	38,7±10,7	0,0752
Доля телогена, %, М±m	30,4±8,8	16,2±9,6	0,0153
Количество анагена на один телоген, М±m	2,82±1,2	5,73±3,2	0,0562
Количество телогеновых волос, М±m	49,2±18,5	32,3±20,9	0,1355
Уровень устья ВФ			
Количество ВФ, М±m	209,3±36,5	207±21,6	0,8912

Полученные нами результаты согласуются с данными о молекулярных и биологических эффектах БоТП на ВФ, предположительно связанных с факторами роста, содержащимися в тромбоцитах. N. Takakura et al. [9] указывают на то, что сигналы тромбоцитарного фактора роста вовлечены в эпидермально-мезенхимальное взаимодействие, необходимое для формирования канала волос и роста мезенхимальной ткани. В 2001 г. K. Yano [13] обозначил фактор роста эндотелия сосудов, содержащийся в тромбоцитах, как важный медиатор роста ВФ и доказал, что анаген-ассоциированный ангиогенез способствует росту волос и увеличению фолликула в размерах. Также важную роль в развитии ВФ и поддержании цикла роста волос играет сигнальный путь Wnt/-catenin. Белок Wnt10b (канонический Wnt) способствует росту стержня волоса в культуре волосного фолликула и пролиферации клеток волосного матрикса. БоТП способствует формированию эпителия волос и дифференцировке стволовых клеток ВФ посредством повышающей регуляции β-катенина, сильно выраженной в области сосредоточения стволовых клеток ВФ («балдж»-зоне) [7]. Совокупность этих эффектов БоТП на ВФ клинически проявляется в увеличении плотности волос, увеличении их толщины и переходе из состояния vellusa в терминальное, а гистологически – в увеличении количества волос в более глубоких слоях кожи и снижении доли телогеновых волос.

Заключение. Положительный клинический эффект терапии БоТП у мужчин, страдающих АГА, обусловлен достоверными морфофункциональными изменениями волосных фолликулов. Данные эффекты БоТП на ВФ возможны при условии обратимости патоморфологических процессов и не являются специфичными для АГА, что делает актуальными даль-

нейшие исследования о возможном влиянии БоТП на экспрессию специфичных белков, запускающих патологические сигнальные пути.

Литература

1. Носовский, А.М. Статистика малых выборок в медицинских исследованиях / А.М. Носовский, [и др.] // Росс. мед. журн. – 2013. – № 6. – С. 57–60.
2. Cervelli, V. The Effect of Autologous Activated Platelet Rich Plasma Injection on Pattern Hair Loss: Clinical and Histomorphometric Evaluation / V. Cervelli [et al.] // Bio. Med. Research International. – 2014. – Article ID 760709. – 9 p.
3. Gkini, M.-A. Platelet-rich plasma as a potential treatment for noncicatricial alopecias / M.-A. Gkini [et al.] // Int. J. Trichology. – 2015. – № 7 (2). – P. 54–63.
4. Gupta, M. Classifications of Patterned Hair Loss: A Review / M. Gupta, V.J. Mysore // Cutan Aesthet Surg. – 2016. – № 9 (1). – P. 3–12.
5. Li, Z.J. Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth / Z.J. Li [et al.] // Dermatol Surg. – 2012. – № 38 (7). – P. 1040–1046.
6. Rubina, A. Randomized Placebo-Controlled, Double-Blind, Half-Head Study to Assess the Efficacy of Platelet-Rich Plasma on the Treatment of Androgenetic Alopecia / A. Rubina, G. Ramon // Dermatol Surg. – 2016. – № 42. – P. 491–497.
7. Sohn, K.C. Pitx2, a beta-catenin-regulated transcription factor, regulates the differentiation of outer root sheath cells cultured in vitro / K.C. Sohn [et al.] // J. Dermatol. Sci. – 2009. – № 54 (1). – P. 6–11.
8. Singh, S. Role of platelet-rich plasma in chronic alopecia areata: Our centre experience / S. Singh // Indian J. Plast. Surg. – 2015. – № 48 (1). – P. 57–59.
9. Takakura, N. Involvement of platelet-derived growth factor receptor-alpha in hair canal formation / N. Takakura [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 1996. – № 107 (5). – P. 770–777.
10. Uebel, C.O. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery / C.O. Uebel [et al.] // Plast and Rec Surg. – 2006. – № 118. – P. 1458–1467.
11. Whiting, D.A. Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia / D.A. Whiting // J. Am. Acad. Dermatol. – 1993. – № 28 (5). – P. 755–763.

12. Whiting, D. Hair Growth and Disorders. Histology of the Human Hair Follicle / D. Whiting [et al.] // Springer – Verlag Berlin, Heidelberg, 2008. – P. 107–123.
13. Yano, K. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis / K. Yano [et al.] // J. Clin. Invest. – 2001. – № 107 (4). – P. 409–417.
14. Bolanca, Z. Platelet-rich plasma as a novel treatment for lichen planopilaris / Z. Bolanca [et al.] // Dermatol. Ther. – 2016. – № 29. – P. 213–216.

E.E. Pakhomova, I.O. Smirnova, I.N. Telichko

Morphological substantiation of clinical efficacy of platelet rich plasma in males with androgenic alopecia

Abstract. Morphological substantiation of the clinical efficacy of platelets rich plasma was carried out in the treatment of 22 men with androgenetic alopecia from the 1st to the 4th stage according to the Norwood-Hamilton scale were included. All patients received intradermal injections of platelets rich plasma 0,15 ml per injection. The course of treatment consisted of 4 procedures with an interval of 4 weeks. Clinical efficacy was assessed by the dynamics of morphometric indices of hair growth. Histological examination was carried out on horizontal sections, stained with hematoxylin and eosin, the morphology of the hair was counted at four levels. Evaluation of morphometric growth parameters conducted before treatment and 4 months after the onset of it. It was established that the therapy of platelet-rich plasma has a pronounced clinical efficacy, consisting in a significant ($p=0,00025$) increase in hair density by 11% and average hair diameter by 10% ($p=0,00766$), a 14% decrease in the share of hair follicles ($p=0,00959$). Histologically, the increase in hair density was significant at the level of the bulb of the hair follicles by 148% ($p=0,0034$) and at the level of the sweat glands by 65% ($p=0,0326$), and also by the tendency to increase their number at the level of the sebaceous glands. This was combined with a significant decrease in the proportion of telogen hair at 47% ($p=0,0153$). Thus, the positive clinical effect of plasma-rich plasma therapy in men suffering from androgenetic alopecia is based on reliable morphofunctional changes in the hair follicles.

Key words: androgenetic alopecia, intradermal injections of platelet-rich plasma, morphology of hair, histological examination of hair on horizontal slices, phototrichogram, anagen, telogen, vellus.

Контактный телефон: +7-921-932-33-41; e-mail: spbclv@mail.ru