

Фракционный CO₂-лазер: новая терапевтическая система для фотобиомодуляции ремоделирования кожи и продукции цитокинов при репарации

Fractional CO₂ laser: a new therapeutic system for photobiomodulation of skin remodeling and cytokine production in the course of tissue reparation

F. PRIGNANO, P. CAMPOLMI, P. BONAN, F. RICCERI, G. CANNAROZZO, M. TROIANO, T. LOTTI

об авторах: ▶

Department of Dermatological Sciences, Florence University, Florence, Italy

Восемнадцать женщинам добровольцам, имевшим признаки фотостарения, проведено омоложение кожи фракционным CO₂-лазером (SmartXide DOT, DEKA M.E.L.A., Флоренция, Италия) с использованием различных показателей плотности энергии (2,07, 2,77 и 4,15 Дж/см²). У всех испытуемых оценена клиническая эффективность применения указанных параметров лазерного излучения, а также иммуногистохимическим методом изучен цитокиновый профиль кожи в биоптатах, взятых до лечения, сразу после лечения и спустя 3 и 30 дней. В результате лечения значительно улучшилось состояние морщин и текстуры кожи, уменьшилась гиперпигментация, что свидетельствует о высокой эффективности применения фракционного CO₂-лазера для фотоомоложения кожи. Метод позволяет получить хорошие клинические результаты, характеризуется коротким реабилитационным периодом и отличным профилем безопасности. При иммуногистохимическом исследовании выявлена связь продукции цитокинов в коже с фазой реэпителизации и плотностью энергии лазерного облучения.

Ключевые слова: цитокины, фракционный CO₂-лазер, иммуногистохимические исследования, репарация тканей.

Eighteen female patients with the signs of photoageing underwent skin rejuvenation using a fractional CO₂ laser (SmartXide DOT, DEKA M.E.L.A., Florence, Italy) with varying energy density (2.07, 2.77 and 4.15 J/cm²). Clinical efficacy of the said laser irradiation parameters was assessed in all of the subjects, and the skin cytokine profile was studied by using the immunohistochemistry technique based on skin tissue samples taken prior to the treatment, right after the treatment and in 3 and 30 days. There were significant improvements in the wrinkle and skin texture condition, and hyperpigmentation was reduced as a result of the treatment, which proves the efficacy of using the fractional CO₂ laser for the skin photorejuvenation. The technique ensures good clinical results and is distinguished by a short rehabilitation period and excellent safety profile. In the course of the immunohistochemistry, a relation between the skin cytokine production, reepithelization and laser irradiation density was established.

Key words: cytokines, fractional CO₂ laser, immunohistochemistry, tissue reparation.

■ Применение аблятивных лазеров, таких как CO₂ и Er:YAG, остается «золотым» стандартом лазерного омоложения кожи, обеспечивающим хорошие клинические результаты при минимальном количестве процедур [1]. Однако при лечении данными лазерами, вызывающими вапоризацию эпидермиса и термическое повреждение дермы, наблюдается длительное заживление раневого дефекта и повышается риск разви-

тия таких явлений, как замедленная реэпителизация, стойкая эритема, гипопигментация кожи, а в некоторых случаях — формирование гипертрофических и келоидных рубцов [2].

С целью повышения эффективности процедур была разработана специальная лазерная система на основе CO₂-лазера для проведения микроабляционного фракционного омоложения кожи. Благодаря генера-

ции излучения с особой формой импульсов (названных Smart-Pulse, DEKA M.E.L.A., Флоренция, Италия) данная система позволяет создавать в коже микроскопические зоны абляции эпидермиса и локального повышения температуры в дерме в виде отдельных точек. При использовании фракционного лазера в отличие от воздействия традиционными аблятивными лазерами участки нормальной кожи вокруг зон воздействия пучков света остаются неповрежденными, а время заживления ран и риск образования рубцов минимизируются.

Изменения, выявляемые при аблятивной фракционной шлифовке CO₂-лазером при гистологическом и иммуноцитохимическом исследовании, зависят от экспериментальных условий, а также мощности излучения и времени экспозиции. Заживление тканей после хирургических вмешательств является хорошо изученным процессом, характеризующимся тремя последовательными фазами: воспалительной реакцией, клеточной пролиферацией, ведущей к восстановлению ткани, и ее ремоделированием. Важную роль в каждой из этих фаз играют различные клетки и растворимые факторы [3]. Однако восстановление повреждений кожи после шлифовки традиционным аблятивным CO₂-лазером, а также после процедуры фракционного фототермолиза имеет свои особенности.

Целью настоящего исследования явилось изучение продукции цитокинов, вовлеченных в раннюю и позднюю фазы заживления повреждения кожи (табл. 1), после воздействия фракционным CO₂-лазером (SmartXide DOT, DEKA M.E.L.A., Флоренция, Италия). Для оценки зависимости клинических результатов от различных параметров лазерного излучения (мощности, экспозиции и расстояния между пучками света) и вре-

мени высвобождения цитокинов в работе были поставлены две задачи:

1. Выяснить, по крайней мере частично, какие биологические изменения вызывает воздействие данной лазерной системы.
2. Оценить клинические результаты лечения фракционным CO₂-лазером при использовании трех различных показателей плотности энергии лазерного излучения (2,07, 2,77 и 4,15 Дж/см²); время экспозиции 1000 мкс и расстоянии между световыми столбиками 500 мкм (SmartXide DOT, DEKA M.E.L.A., Флоренция, Италия).

Материал и методы

В исследовании приняли участие 18 женщин-добровольцев европеоидной расы в возрасте от 50 до 60 лет, имевших признаки фотостарения кожи. У пациенток не было явных признаков каких-либо заболеваний. После одобрения протокола исследования местным этическим комитетом каждая из них дала письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Фотодокументация клинической картины проводилась с помощью цифровой системы (Anthology. Deka M.E.L.A.) перед первой процедурой, затем через 7 и 30 дней после. Фотографии стандартизировали, используя один и тот же фотоаппарат, одинаковые условия освещения и съемки, двойную вспышку и специальный держатель для подбородка с целью соблюдения фиксированного расстояния.

Всем наблюдавшимся женщинам были выполнены пункционные биопсии (2 мм) до лечения, сразу, а также через 3 и 30 дней после лечения фракционным CO₂-лазером (SmartXide Dot DEKA M.E.L.A.) при об-

ТАБЛИЦА 1

Цитокины, участвующие в процессе заживления повреждения кожи, и их основные функции

Цитокин	Основные функции
TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> • Стимулирует синтез матричных белков (таких как коллаген), подавляет продукцию протеаз, усиливает митогенез • Активирует хемотаксис макрофагов и гранулоцитов, а также высвобождение провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли-α
bFGF	<ul style="list-style-type: none"> • Активирует ангиогенез и митогенез • Стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток • Ингибирует синтез коллагена, способствует образованию коллагеновых волокон
EGF	<ul style="list-style-type: none"> • Активирует реэпителизацию (стимулирует пролиферацию кератиноцитов и пр.)
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Регулирует хемотаксис моноцитов, макрофагов и нейтрофилов • Является митогенным фактором для фибробластов и гладкомышечных клеток <i>in vitro</i> • Стимулирует продукцию фибробластами экстрацеллюлярного матрикса
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Регулирует васкулогенез и ангиогенез
Vimentin	<ul style="list-style-type: none"> • Белок фибробластов, вовлечен в продукцию матрикса и межклеточного вещества

Примечание. Здесь и в табл 2 и 3: TGF-β — трансформирующий фактор роста β; bFGF — основной фактор роста фибробластов; EGF — эндотелиальный фактор роста; PDGF — тромбоцитарный фактор роста; VEGF — сосудисто-эндотелиальный фактор роста; Vimentin — виментин.

работке с тремя различными показателями плотности энергии: 2,07, 2,77 и 4,15 Дж/см². Полученные биоптаты были использованы для проведения иммуногистохимических исследований с целью оценки экспрессии цитокинов в коже.

Оценка клинических результатов лечения

Клиническую оценку эффективности лечения проводили в соответствии с градациями: отсутствие эффекта, слабый, удовлетворительный, хороший и отличный эффект. Оценка проводилась по каждому из следующих параметров: уменьшение количества видимых мелких морщин, улучшение текстуры кожи и устранение неравномерной пигментации.

Иммуногистохимические исследования

Иммуногистохимические исследования были проведены в соответствии с протоколом, применявшимся ранее F. Prignano и соавт. по методу «щелочная фосфатаза — антищелочная фосфатаза» (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase method) [4] с целью определения экспрессии различных цитокинов в коже до лечения, сразу после него, а также через 3 и 30 дней после лечения лазером с плотностью энергии 2,07, 2,77 и 4,15 Дж/см².

В табл. 2 перечислены моноклональные антитела, которые использовались в исследовании в качестве первичных реагентов.

Полученные препараты изучали два исследователя (FP и FR) с помощью микроскопа ZEISS (Carl Zeiss SMT, Oberkochen, Германия). Экспрессию цитокинов оценивали в соответствии с градацией от 0 до 3: отсутствие экспрессии — 0, слабая, умеренная и интенсивная экспрессия — 1, 2 и 3 соответственно. В случаях, когда оценки исследователей различались, для выработки единого мнения стекла пересматривались повторно совместно. Полученные данные представляли в виде средней арифметической величины.

Результаты

Клинические результаты (уменьшение количества мелких морщин, улучшение текстуры кожи и устранение неравномерной пигментации кожи) оценивались

путем сравнения фотоизображений кожи, полученных до и после лечения (рис. 1 и 2).

Группу А составили 6 женщин, получавших процедуру обработки CO₂-лазером с плотностью энергии 2,07 Дж/см². Восстановительный период был коротким (2—4 дня), отмечен хороший эффект со стороны уменьшения количества видимых мелких морщин и улучшения текстуры кожи, удовлетворительный эффект — при оценке устранения неравномерной пигментации кожи.

В группу В вошли 6 женщин, получавших лечение с дозой облучения 2,77 Дж/см². В группе В заживление продолжалось несколько дольше (в течение 3—5 дней), чем в группе А, однако клинические результаты оказались лучше. Отличный эффект констатирован при оценке уменьшения количества видимых морщин, хороший эффект — при оценке улучшения текстуры кожи, удовлетворительный эффект — при оценке устранения неравномерной пигментации кожи.

Группу С составили 6 женщин, получавших лечение с дозой облучения 4,15 Дж/см². У этих женщин зарегистрированы наилучшие клинические результаты, проявлявшиеся очень хорошим эффектом «подтяжки» кожи. Установлен отличный эффект при оценке уменьшения количества видимых морщин, удовлетворительный эффект при оценке устранения неравномерной пигментации кожи. Однако в этой группе наблюдалось более длительное время восстановления повреждения кожи. Кроме того, отмечалась более выраженная болезненность кожи по сравнению с группами А и В.

Результаты иммуногистохимических исследований

Иммуногистохимическими исследованиями в коже женщин-добровольцев после лечения обнаружены изменения профиля факторов роста, зависевшие от используемых параметров плотности энергии лазерного излучения (2,07, 2,77, и 4,15 Дж/см²; рис. 3, 4).

Динамика экспрессии изучавшихся цитокинов и белка виментина (SIGMA-ALDRICH, Милан, Италия) представлена в табл. 3 и на рис. 5.

ТАБЛИЦА 2

Первичные моноклональные антитела

Антитела	Клон	Изотип	Код	Разведение	Фирма-производитель
TGF-β	1D11	IgG ₁ mouse	MAB1835	1:10	R&D Systems
EGF		IgG ₁ mouse	E2520	1:300	SIGMA-ALDRICH
VEGF	26503.11	IgG _{2b} mouse	V4758	1:20	SIGMA-ALDRICH
PDGF	35248	IgG ₁ mouse	MAB322	1:30	R&D Systems
bFGF	254625	IgG _{2a} mouse	MAB1206	1:10	R&D Systems
Vimentin	LN-6	Ig _M mouse	V 2258	1:200	SIGMA-ALDRICH

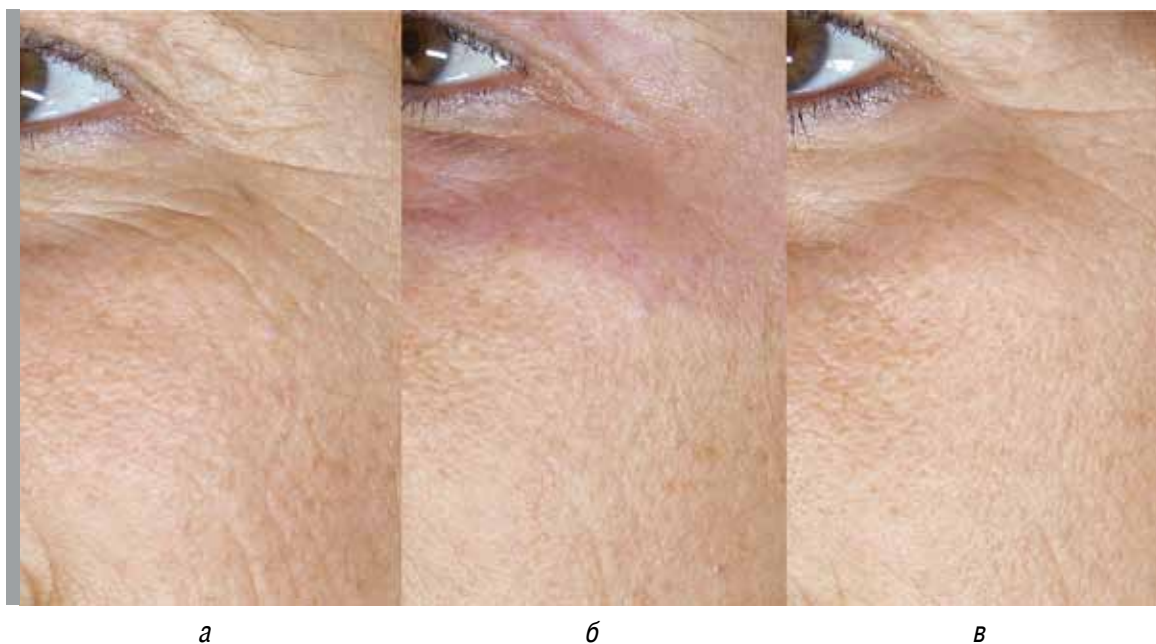


Рис. 1. Пациентка до процедуры (а), сразу после процедуры развивается отек (б), через 1 мес. после лечения отмечается уменьшение количества мелких морщин (в)



Рис. 2. До (а) и через 1 мес. после (б) процедуры

Обсуждение

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности фотобиомодуляции фракционным лазером ремоделирования кожи и продукции цитокинов при заживлении ее повреждения.

Факторы роста и цитокины (главным образом те, которые участвуют в заживлении ткани) играют многофункциональную и специфическую роль в процессах восстановления повреждения кожи. На ранней, воспалительной фазе заживления повреждения су-

ственную роль играют такие цитокины, как тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и эндотелиальный фактор роста (EGF). PDGF стимулирует хемотаксис моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, оказывает митогенное действие на фибробласты и гладкомышечные клетки *in vitro* [5], стимулирует продукцию фибробластами экстрацеллюлярного матрикса. Уровень PDGF в незаживающих ранах кожи значительно снижен по сравнению с ранами, созданными хирургическим путем, что подтверждает важную роль данного ростового фактора в нормальном заживлении повреждения кожи. С другой стороны, в гипертрофи-

ческих рубцах и келоидах обычно выявляется повышенная экспрессия PDGF [6].

EGF вовлечен во все этапы реэпителизации (пролиферацию кератиноцитов и др.) [7]. Основным фактором роста фибробластов (bFGF) стимулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [8, 9]. Трансформирующий фактор роста β (TGF- β) обладает способностью активировать после травмы или повреждения кожи хемотаксис макрофагов и гранулоцитов, а также высвобождение провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- α [10]. Сосудисто-эндотелиальный фак-

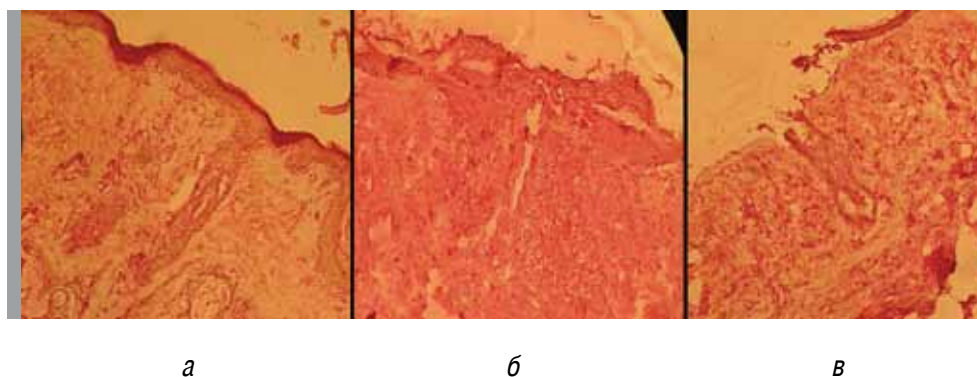


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами к EGF. x 150.

a — до лечения: EGF экспрессируется в слоях эпидермиса и частично в дерме; *б* — сразу после лечения лазером с плотностью энергии 2,07 Дж/см²: интенсивное окрашивание EGF в эпидермисе и дерме; *в* — через 3 дня после лечения лазером с плотностью энергии 2,07 Дж/см²: интенсивное окрашивание EGF в эпидермисе и дерме с полной реэпителизацией

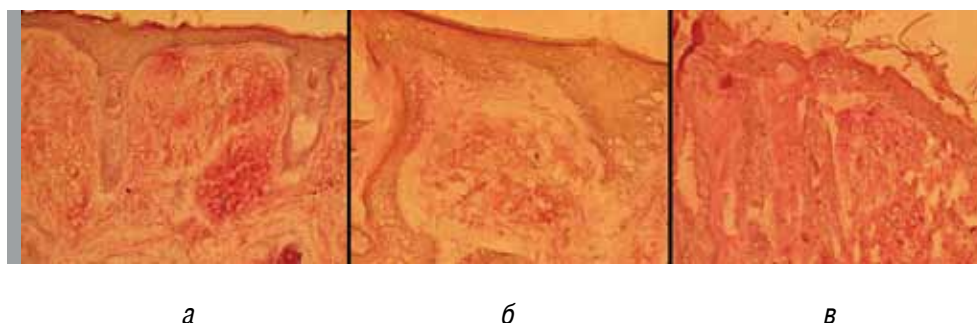


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами к PDGF.

a — до лечения: умеренно выраженная экспрессия PDGF в эпидермисе и дерме. x 150; *б* — сразу после лечения лазером с плотностью энергии 2,77 Дж/см²: положительная реакция с PDGF с большей интенсивностью в дерме вблизи с участками лазерной деструкции. x 250; *в* — через 3 дня после лечения лазером с дозой облучения 2,77 Дж/см²: отсутствие экспрессии PDGF в эпидермисе, умеренная экспрессия в дерме. x 150

ТАБЛИЦА 3

Результаты оценки экспрессии цитокинов в коже женщин-добровольцев до лечения, сразу после лечения, через 3 и 30 дней после лечения фракционным лазером при облучении дозами 2,07, 2,77 и 4,15 Дж/см²

Маркеры	До лечения	Плотность энергии, Дж/см ²								
		Сразу после лечения			Через 3 дня			Через 30 дней		
		2,07	2,77	4,15	2,07	2,77	4,15	2,07	2,77	4,15
EGF	1	3	2	0	3	1	0	1	3	0
bFGF	0	1	0	1	1	2	1	1	3	0
PDGF	1	2	1	1	2	2	2	1	2	0
VEGF	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0
TGF-β	0	1	0	0	2	3	0	1	1	0
Vimentin	1	3	0	0	3	2	0	1	1	0

Примечание. Экспрессия EGF+, bFGF+, PDGF+, VEGF+, TGF-β+ и Vimentin+ клеток определялась с помощью световой микроскопии; для ее оценки использован счет от 0 до 3: отсутствие экспрессии — 0 баллов, слабая, умеренная и интенсивная экспрессия — 1, 2 и 3 балла.

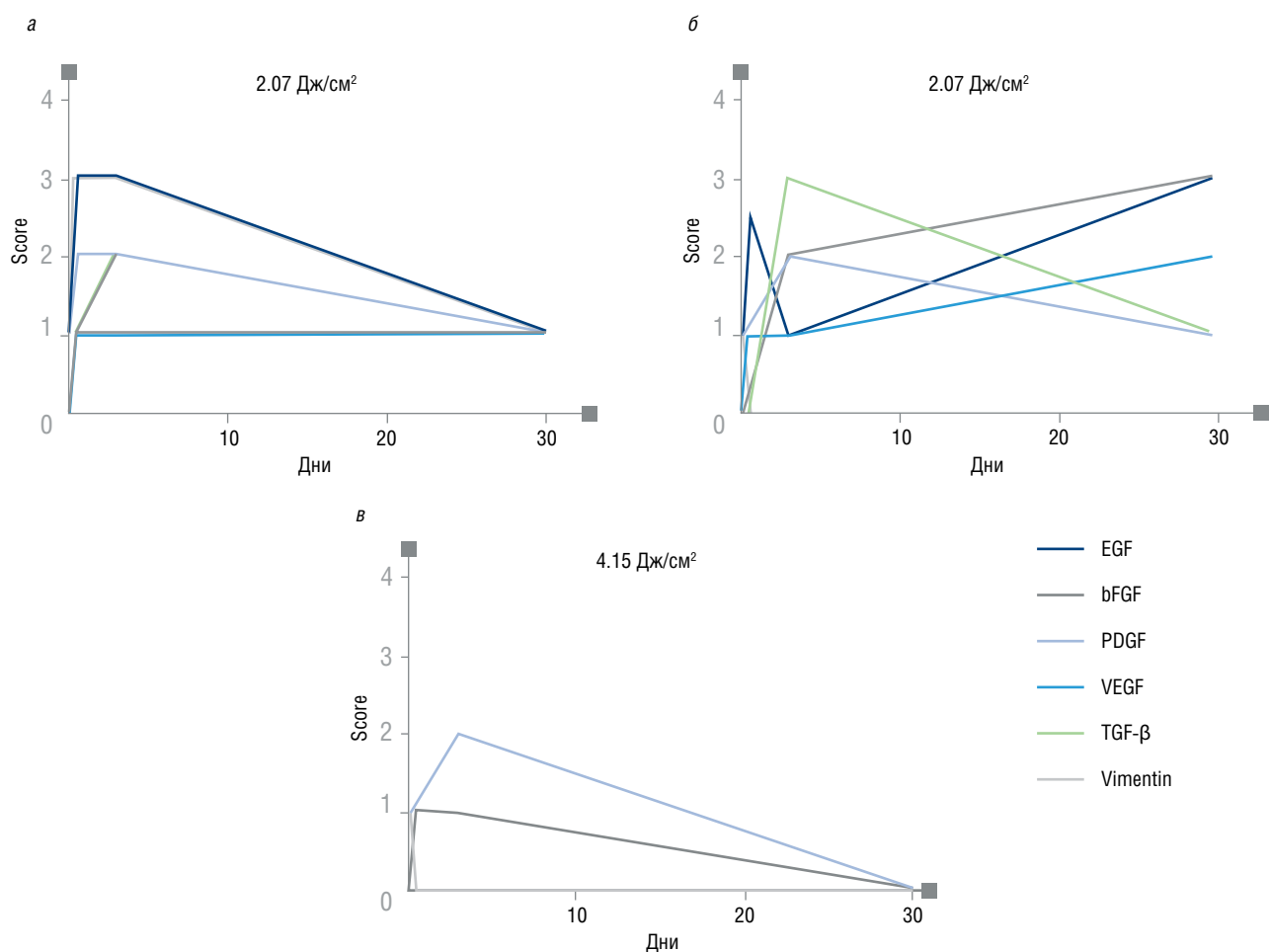


Рис. 5. Экспрессия цитокинов и белка виментина до лечения, сразу после лечения, через 3 и 30 дней после лечения лазером с различной плотностью энергии. Плотность энергии: а — 2,07 Дж/см²; б — 2,77 Дж/см²; в — 4,15 Дж/см²

тор роста (VEGF) вовлечен в регуляцию ангиогенеза в процессе заживления поврежденных тканей.

Результаты нашего исследования четко продемонстрировали, что секреция цитокинов под действием фракционного CO₂-лазера только отчасти схожа с таковой, наблюдаемой при обычной травме кожи. Обнаружено, что иммуногистохимическая реакция с EGF во всех случаях зависела от экспозиции и дозы лазерного излучения. Экспрессия в коже EGF и PDGF на ранней фазе заживления после лечения (как после облучения с плотностью энергии 2,07 Дж/см², так и после воздействия с плотностью энергии 2,77 Дж/см², но более выраженная при облучении плотностью энергии 2,07 Дж/см²) объясняется их специфическими функциями: PDGF является хемотаксическим фактором для большинства клеток дермы и повышено экспрессируется в травмированных тканях; EGF участвует в процессах репарации и может усиливать реэпителизацию.

Примечательно, что увеличенная экспрессия в дерме виментина (vimentin), считающегося «идеальным стимулятором» продукции PDGF (который в свою очередь активирует пролиферацию фибробластов) наблюдалась только после облучения в дозе 2,07 Дж/см². Виментин является белком цитоскелета фибробластов [4], а его экспрессия — маркером активности фибробластов и синтеза коллагена.

Облучение с плотностью энергии 4,15 Дж/см² было менее эффективным в модуляции секреторной активности изученных цитокинов и оказывало в большей мере супрессивное, а не модулирующее действие; через 30 дней после лечения указанной дозой ни один из цитокинов в коже не обнаруживался (см. табл. 3).

В биологических этапах реэпителизации после лазерного воздействия секреция TGF-β и bFGF отмечается в более поздние сроки, чем экспрессия PDGF. TGF-β выявлялся в наших исследованиях через 3 дня после лечения. Его основная функция заключается в стимуляции клеточной пролиферации и дифференцировки [11]. Он способен усиливать миграцию эпителиальных клеток из окружающих участков. Наиболее выраженная экспрессия TGF-β отмечалась именно в тот период (через 3 дня после воздействия), когда миграция эпителиальных клеток очень важна для восстановления «поврежденных» участков. Экспрессия bFGF также обусловлена его биологической функцией: индукцией пролиферации и миграции эндотелиальных клеток. Наличие обоих цитокинов необходимо для регулирования процессов заживления поврежденной ткани. TGF-β регулирует процесс синтеза фибро-

бластами коллагена; его избыточная продукция может привести (потенциально) к образованию плотных рубцов (экспрессия данного цитокина в гипертрофических рубцах и келоидах хорошо описана в литературе). Появление впоследствии в наших экспериментах bFGF наряду с постепенным уменьшением (с 3-го по 30-й день) уровня TGF-β свидетельствует о том, что нанесенные лазером повреждения «значительно более физиологичны», поскольку постоянный процесс заживления обеспечивает продукцию такого количества bFGF, которое необходимо для поддержания гомеостаза. EGF, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов, экспрессировался на разных этапах данного эксперимента. Выявление в коже EGF и VEGF на самой последней фазе заживления (через 30 дней после лечения) свидетельствует о восстановлении нормальной дифференцировки эпителиоцитов и неоангиогенеза. Их экспрессия ассоциировалась с уменьшенным уровнем TGF-β и стабильной экспрессией bFGF, что подтверждает формирование в коже физиологического рубцевания. Обнаружение в дерме Vimentin+ клеток свидетельствует о наличии в коже пула клеток, оставшихся неповрежденными и способных продуцировать матрикс и межклеточное вещество. Количество Vimentin+ клеток в коже зависело в основном от дозы облучения (см. табл. 3), однако мы пока не можем прокомментировать эти данные.

Таким образом, проведенными исследованиями показано, что в поврежденном участке кожи присутствуют многие факторы роста и цитокины. После облучения кожи лазером их экспрессия изменяется с течением времени. Состав и последовательная секреция этих сигнальных молекул чрезвычайно важны для достижения хорошего заживления повреждения кожи. Значимые биологические результаты можно получить при облучении кожи в дозах 2,0 Дж/см² и выше.

Оригинальность настоящей работы заключается в том, что в ней установлена связь между дозой лазерного облучения и высвобождением цитокинов в коже человека. Важным является также проведенное нами исследование влияния различных параметров лечения на биологический ответ, клиническую эффективность и время восстановления повреждения кожи.

В настоящее время исследования продолжают с использованием высоких доз излучения (в особенности дозы 4,15 Дж/см²) с целью изучения возможности достижения при этих параметрах наилучшего эффекта фотоомоложения кожи и оценки динамики продукции различных цитокинов. ■

Литература

1. Jih M.H., Kimyai-Asadi A. Fractional photothermolysis: a review and update. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27: 63—71.
2. Nanni C.A., Alster T.S. Complications of carbon dioxide laser resurfacing. An evaluation of 500 patients. *Dermatol Surg* 1998; 24: 315—320.
3. Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127 (3): 514—525. Review.
4. Prignano F., Domenici L., Gerlini G., Pimpinelli N., Romagnoli P. Human keratinocytes cultured without a feeder layer undergo progressive loss of differentiation markers. *Histol Histopathol* 1999; 14 (3): 797—803.
5. Heldin C.H., Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283—1316.
6. Pierce G.F., Tarpley J.E., Tseng J. et al. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 1995; 96: 1336—1350.
7. Stoscheck C.M., Nanney L.B., King L.E.Jr. Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing in rats. *Eur J Surg* 1992; 158: 327—331.
8. Johnson D.E., Williams L.T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multi-gene family. *Adv Cancer Res* 1993; 60: 1—41.
9. Chen C.H., Poucher S.M., Lu J., Henry P.D. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2: 33—43.
10. Ishida Y., Kondo T., Takayasu T., Iwakura Y., Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN γ and TGF- β in the skin wound-healing process. *J Immunol* 2004; 172: 1848—1855.
11. Manolis E.N., Kaklamanos I.G., Spanakis N. et al. Tissue concentration of transforming growth factor b1 and basic fibroblast growth factor in skin wounds created with a CO $_2$ laser and scalpel: a comparative experimental study, using an animal model of skin resurfacing. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 252—257.