

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ РУБЦОВ КОЖИ С ПОМОЩЬЮ ФОТОТЕРМОЛИЗА И ФИЛЛЕРА

А.В. Самцов, докт. мед. наук, профессор, А.М. Иванов, докт. мед. наук, профессор, А.А. Шарова, канд. мед. наук, Е.Н. Лучина, канд. мед. наук

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

E-mail: levistraus@mail.ru

Изучены структурные изменения в коже при лечении рубцов с помощью комбинированного метода фракционного фототермолиза и применения филлера — препарата стабилизированной гиалуроновой кислоты, стимулирующего запуск процессов образования коллагенонеогенеза. В основе выявленных изменений — улучшение микроциркуляции и трофики тканей в результате расширения просвета сосудов, уменьшения выраженности продуктивного васкулита, нормализация проницаемости сосудистой стенки, увеличение числа фибробластов и усиление их функциональной активности.

Неаблятивные и аблятивные методы моделирования (шлифовка) кожи в настоящее время широко используются для восстановления кожи, подвергающейся процессам фотостарения [5, 8]. Аблятивная шлифовка с использованием CO₂- или эрбиевого лазера приводит к полному удалению эпидермального слоя [4]. Применяя фракционный лазер, удается избежать нагрева тканей, окружающих зону воздействия, что отличает его от традиционных импульсных лазеров, работающих в средней инфракрасной области спектра, и абляционных лазеров. Таким образом, при использовании фракционного лазера можно минимизировать риск необратимого термического повреждения дермы, ухудшающего процесс рубцевания.

Залогом высокой эффективности ведения пациентов с рубцами является комплексное лечение, подразумевающее правильное сочетание патогенетически обоснованных методов применения современных технологий. Поэтому весьма актуально сочетанное воздействие на кожу методов фракционного фототермолиза (ФФ) и филлера (Ф).

Цель исследования — изучение структурных изменений, лежащих в основе клинической эффективности комплексного метода ФФ и Ф при лечении рубцов кожи.

ФФ, впервые предложенный Манштейном, — новая концепция омоложения кожи, сочетающая в себе эффективность аблятивных методик и безопасность неаблятивных.

Длина волны лазерного луча (1500 нм), используемого при ФФ, соответствует ближнему инфракрасному диапазону. При этом поглощение лазерного излучения происходит в основном водной тканью, что приводит к образованию плотной сети микроскопических термических повреждений в эпидермальном и дермальном слоях (микротермальные лечебные зоны — МЛЗ); их плотность составляет, как правило, 1000–2000 зон на 1 см².

При комплексном лечении наряду с ФФ использовали инъекции рубца препаратом стабилизированной гиалуроновой кислоты (Ф), стимулирующим запуск процессов образования коллагенонеогенеза. Исследовали реакцию эпидермального и дермального слоев кожи, пораженной постакне рубцами, при комплексном воздействии ФФ и Ф.

В исследовании участвовали 12 соматически здоровых добровольцев, имевших атрофические, нормотрофические и гипотрофические рубцы в области плеч и спины вследствие перенесенного акне. Возраст обследуемых — 24–64 года (средний возраст — 38±13 лет). У пациентов был различный тип кожи (II–VI по шкале Фитцпатрика).

После воздействия лазера и введения Ф производилась биопсия. Для оценки эффективности лечения рубцов использовали участок кожи размером 8×8 мм. Перед процедурой поверхность кожи не охлаждали, анестезию не проводили. Биопсию делали для оценки реакции кожи на ФФ и Ф, образцы отбирали через 1 ч (только для ФФ); через 1, 3, 5, 7 сут и 3 мес — для комплексного лечения. У каждого пациента брали не более 4 образцов, включая контрольный.

Для ФФ использовали фракционный эрбиевый лазер (длина волны излучения — 1500 нм), в процессе облучения на кожных покровах пациентов формировалась четко определяемая сеть микроповреждений с расстоянием 250 мкм между центрами отдельных МЛЗ, что согласуется со значением 1600 МЛЗ на 1 см². Энергию лазера поддерживали на постоянном значении — 5 мДж на МЛЗ.

Ключевые слова:
рубцы кожи, гистологические изменения кожи, фототермолиз, коллаген, филлеры

Key words:
skin scars, skin histological changes, photothermolysis, collagen, fillers

Рис. 1. Горизонтальный срез дермально-эпидермального соединения. Потеря отражающей способности (белые звездочки) в области МЛЗ. 1 час после ФФ. Окр. гематоксилином и эозином ($\times 200$)

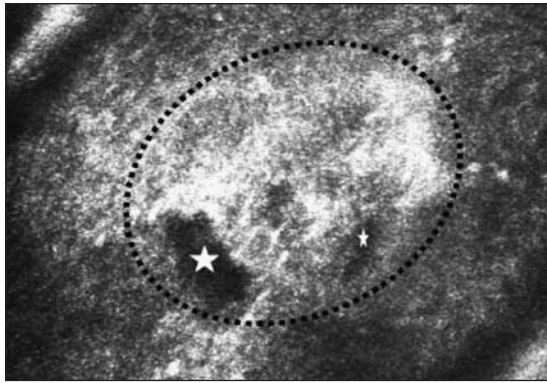


Рис. 2. Горизонтальный срез дермально-эпидермального соединения. 1 час после ФФ. Окр. гематоксилином и эозином ($\times 200$)

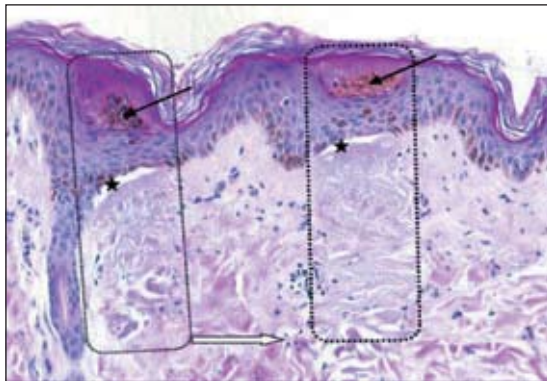
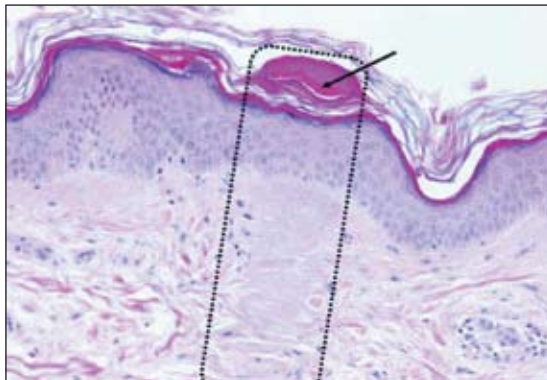


Рис. 3. Горизонтальный срез дермально-эпидермального соединения. 7 сут после ФФ и БС. Окр. гематоксилином и эозином ($\times 200$)



Ф на основе гиалуроновой кислоты представляет собой стерильный вязкоупорный прозрачный бесцветный изотоничный гель, в состав которого входит перекрестношитый гиалуронат натрия биоферментного и 20 мг/мл фосфатного буфера (pH 7) на 1 мл.

Визуализацию поверхности кожи, обработанную лазером и Ф, проводили с использованием конфокального микроскопа (Vivascope 1000®, Lucid-Tech, Inc., Henrietta) [5, 9]. Зоны воздействия лазера анализировали в непрерывном режиме в течение определенного времени (до 6 ч) после ФФ, осуществляя горизонтальное картирование. Было выполнено 4–6 снимков в аксиальной проекции *stratum corneum*, эпидермиса и верхней части сосочкового и сетчатого слоев дермы. Все снимки изучали индивидуально.

Участки кожи фиксировали 10% формалином и заключали в парафин. Для гистоло-

гического анализа срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван Гизона. Отдельно готовили замороженные срезы образцов для изучения жизнеспособности, применяя тетразолиевый синий по методу J.H. Chung и соавт. (1996) [1]. Иммуногистохимически выявляли пролиферирующие клетки с использованием ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA. Выявляли также миофибробласты с помощью гладкомышечного актина α -SMA, оценивали образование коллагена типа III и белков теплового шока HSP (BioGenex, USA). Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартным методам.

Исследования показали, что сразу после ФФ дермальный слой в МЛЗ пациентов полностью терял отражающие свойства. Вместе с тем отражающая способность эпидермальной части МЛЗ дополнительно повысилась после введения Ф. Установлено повышение отражающих свойств рогового слоя после проведенного лечения. При конфокальной микроскопии *in vivo* через 6 ч после ФФ было установлено, что субэпидермальная зона в области дермально-эпидермального соединения потеряла отражающие свойства.

Изучение биоптатов кожи, взятых через 1 ч после ФФ, не выявило каких-либо структурных изменений в роговом слое (рис. 1). Отмечены различные зоны термального повреждения в эпидермисе и дерме, располагающиеся столбиками и обозначаемые как микротермальные зоны. В эпидермальной области повреждается главным образом нижняя часть, что ведет к разрыву контакта между дермой и эпидермисом и образованию субэпидермальных щелей. Однако воспалительной инфильтрации в зонах, прилегающих к МЛЗ, не отмечалось. Сосуды, расположенные внутри отдельных МЛЗ, подверглись коагуляции под действием лазерного излучения, при этом кровотечений в окружающие ткани не выявлено.

Термически разрушенные сосуды в МЛЗ обнаружены при гистологическом исследовании спустя 1 ч после ФФ (рис. 2). Выявлены микроскопические эпидермальные некротические остатки (МЭНО), которые, по-видимому, отражают процесс элиминации термически поврежденных кератиноцитов, что является следствием миграции неповрежденных кератиноцитов, расположенных на границе раневой поверхности.

Дермальная часть МЛЗ спустя 1 сут не была изменена, коллаген термически модифицирован, окрашивание ядер – недостаточное интенсивное. В периваскулярной зоне че-

Препарат стабилизированной гиалуроновой кислоты (филлер) стимулирует запуск процессов образования коллагенонеогенеза

рез 1 сут начинается формирование слабовыраженного воспалительного инфильтрата.

По данным исследования, на 3-и сутки МЭНО были вытеснены из эпидермиса и оказались между эпидермисом и роговым слоем. Установлено, что в эпидермисе присутствуют клетки дискератоциты; наблюдается спонгиоз (межклеточный отек). При этом уменьшилось количество субэпидермальных щелей, обнаруживались только остаточные щели. Тем не менее хорошо различались отдельные пучки гомогенизированного коллагена в дермальном слое.

На 5-е сутки после проведения ФФ и Ф в дермальном слое МЛЗ видимых изменений обнаружено не было, тем не менее гистохимическое исследование показало существенные морфологические изменения в эпидермальном слое. МЭНО были расположены в роговом слое. Дискератоцитов в эпидермисе было немного, спонгиоз выражен слабо. Остаточных субэпидермальных щелей не найдено. В дермальном слое все еще присутствовали гомогенизированные участки, в которых обнаруживалось минимальное количество лимфоцитарного воспалительного инфильтрата, главным образом — в периваскулярных зонах.

Спустя 7 сут после проведения ФФ и Ф в роговом слое выявлялись МЭНО либо отшелушивались. В эпидермисе не наблюдалось дискератоза и спонгиоза. В области эпидермально-дермального соединения остаточные щели не обнаруживались. В то же время в дермальной части МЛЗ еще можно видеть плохо различимые пучки термически модифицированного коллагена (рис. 3). В остальной структуре эпидермиса была в норме; толщина эпидермального слоя — нормальная или слегка повышена; рисунок выростов в сторону дермы соответствовал норме. Выраженность воспалительной инфильтрации снизилась; обнаруживались эпизодические очаги образования новых сосудов, прилегающие к МЛЗ или проникающие непосредственно в них.

Спустя 3 мес гистохимическое исследование не выявило признаков дермального фиброза. Не было также обнаружено остаточных пучков модифицированного коллагена и признаков воспалительной инфильтрации.

Стандартный способ окрашивания гематоксилином и эозином не позволяет различить МЛЗ. Изучение препаратов, окрашенных по Ван Гизону, не выявило никаких различий по количеству и расположению эластичных волокон в образцах, отобранных в разные сроки после ФФ и Ф. Регулярный характерный рисунок эластичных волокон, напоминающий

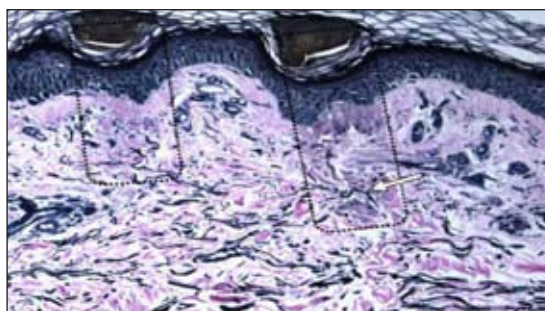


Рис. 4. Выявление эластичности в дерме пациентов после применения ФФ и БС. Окр. по Ван Гизону (x200)

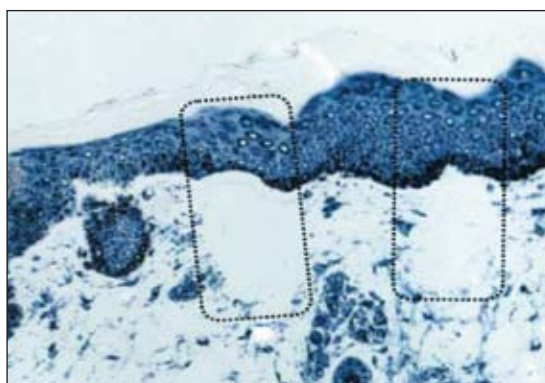


Рис. 5. Горизонтальный срез дермально-эпидермального соединения. 1 сут после ФФ и БС. Окр. тетразолиевым синим (x200)

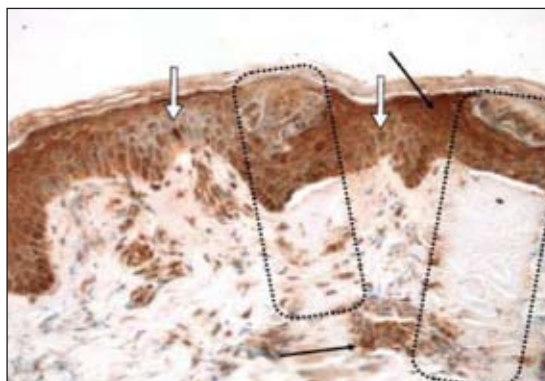


Рис. 6. Выявление белка теплового шока HSP 70 через 1 сут у пациентов после ФФ и БС (x 200)

подсвечник, сохранялся после проведенных процедур постоянно (рис. 4).

Окраска тканей с помощью тетразолиевое синего показала, что жизнеспособность эпидермальных и дермальных клеток через 1 ч после ФФ была потеряна (рис. 5). Однако спустя 1 сут после воздействия лазерного излучения в коже обнаруживался целостный слой жизнеспособных клеток, покрывающий участки дермы с потерянной жизнеспособностью. В дальнейшем на 3-и — 7-е сутки после проведенных процедур эти зоны становились менее различимыми. Через 3 мес наблюдалось равномерное окрашивание не только эпидермиса, но и дермы, что свидетельствовало о полном восстановлении жизнеспособности.

Через 1 ч после ФФ повышенной экспрессии HSP-70 в тканях дермы обнаружено не было. Такого рода экспрессия выявлялась спустя 1 сут после воздействия лазера и инъектирования зоны воздействия Ф (рис. 6). В образцах, полученных через 1 сут после ФФ,

Фракционный фототермолиз — единственный на сегодняшний день метод, стимулирующий процесс относительно быстрого восстановления эпидермиса

Рис. 7. Выявление коллагена типа III у пациентов после ФФ и БС (×200).

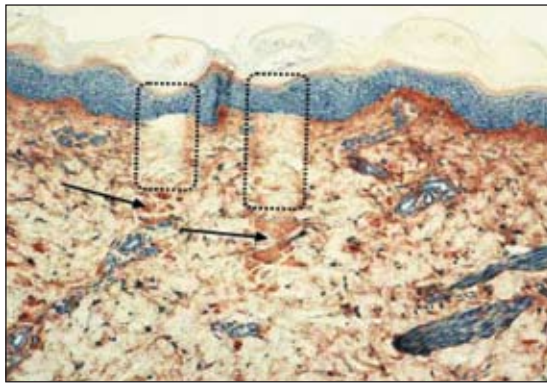
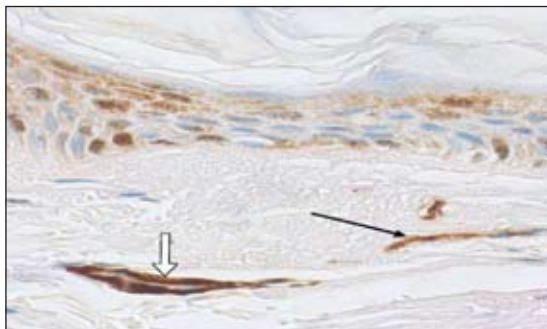


Рис. 8. Окраска на гладкомышечный актин α-SMA (×200)



был обнаружен повышенный уровень HSP-70 в эпидермисе, особенно – в расположенных под МЭНО участках. Экспрессия этого белка в дерме была стойко повышена в зонах, непосредственно прилегающих к МЛЗ, при этом в самих МЛЗ на уровне дермы повышенной экспрессии HSP-70 не наблюдали. Через 3 сут и впоследствии уровень экспрессии этого белка не повышался.

Как показало гистохимическое исследование на содержание коллагена типа III, через 1 ч после ФФ, коллаген этого типа в дермальной части МЛЗ полностью потерял способность к иммуногистохимическому окрашиванию, что может свидетельствовать о его термической модификации (рис. 7). С 1-х до 7-х суток после воздействия ФФ и Ф интенсивность окрашивания коллагена типа III увеличилась, причем наиболее интенсивно окрашивались участки, прилегающие к МЛЗ, еще более была выражена окраска участков, расположенных под МЛЗ. Через 3 мес после ФФ и Ф гистохимических признаков изменений коллагена типа III выявлено не было.

На 7-е сутки после ФФ и Ф была выявлена повышенная интенсивность окрашивания на гладкомышечный актин-α в очагах образования новых сосудов в дерме рядом с МЛЗ (рис. 8). Эти очаги частично инфильтрируют непосредственно в дермальный слой МЛЗ. В этот период также обнаруживались миофибробласты, т.е. фибробласты, содержащие актин.

Исследование с применением конфокальной микроскопии показало потерю отра-

жающей способности субэпидермального слоя после проведенного комплексного лечения. Результаты микроскопии подтверждают образование субэпидермальных щелей, обнаруженных с помощью гистологических методов исследования. Следовательно, образование такого рода щелей происходит в условиях *in vivo* и не является артефактом, возникающим при подготовке гистологических срезов. По-видимому, выявленные изменения связаны с термической денатурацией коллагена, приводящей к изменению его оптических свойств.

Очевидно, образование МЭНО и их миграция через эпидермальный слой в течение периода наблюдения после воздействия представляют собой важнейший результат изменения эпидермиса под влиянием ФФ. МЭНО образуются в процессе элиминации некротизированных эпидермальных клеток и обнаруживаются уже через 24 ч после воздействия лазерного излучения. Однако в течение столь непродолжительного времени невозможно определить, насколько велик вклад некротических дермальных остатков в образование МЭНО.

Показано, что спустя 1 сут МЭНО располагаются в эпидермисе непосредственно под слоем гранулярных клеток. В это же время пациенты отмечают после процедуры клинический эффект – бронзовый оттенок кожи вследствие высокого содержания меланина в МЭНО. В ходе исследования выявлено, что через 3 сут МЭНО мигрируют через эпидермис и располагаются непосредственно под роговым слоем. Клинически это проявляется в виде шелушения кожи, отмечаемого большинством пациентов на 3-и сутки после ФФ и Ф. Шелушение кожи, связанное с элиминацией МЭНО, усиливается на 5–7-е сутки, когда МЭНО располагаются уже внутри и на поверхности рогового слоя.

На 7-е сутки после ФФ и Ф структура эпидермиса полностью нормализуется: отсутствуют остаточный дискератоз, спонгиоз и субэпидермальные щели. Поэтому в большинстве случаев рекомендуется использовать ФФ с интервалом не менее 1 нед, что необходимо для полноценного восстановления эпидермиса.

Реконструкцию коллагена, его повторный синтез после неаблятивной и аблятивной шлифовки принято считать основным механизмом, ответственным за уменьшение количества морщин и улучшение текстуры кожи. В ряде исследований с использованием окрашивания орсеином или гематоксилином и эозином показано формирование коллагена после неаблятивной шлифовки [3, 7].

Эффективность метода фракционного фототермолиза с применением филлеров гиалуроновой кислоты подтверждена в ходе клинического исследования

Однако судить о процессах коллагенообразования в тканях по наличию коллагена в биоптатах, окрашенных гематоксилином и эозином, трудно. Полная неспособность дермальной части МЛЗ к иммуногистохимическому окрашиванию на выявление коллагена типа III через 1 ч после ФФ свидетельствует о его термальной денатурации. В дальнейшем интенсивность окрашивания на выявление коллагена типа III вокруг и особенно под МЛЗ повышается в течение 7 сут после предполагаемого воздействия.

Как известно, следствие сублетального термального стресса — экспрессия белков теплового шока HSP-70, так называемого шаперона. Функция последнего заключается в стабилизации третичной структуры частично денатурированных в стрессовых условиях белков. Кроме того, HSP-70 способствует индукции экспрессии факторов роста (например, трансформирующего фактора роста-β, ключевого элемента в процессе заживления ран и образовании соединительной ткани — фиброгенезе) [3]. Мы не наблюдали экспрессии HSP-70 в дермальной части МЛЗ, поскольку в этой зоне не было живых клеток. Однако в зонах, прилегающих к дермальному

слою МЛЗ, экспрессия HSP-70 была повышена, что свидетельствует о сублетальном уровне термического стресса для фибробластов в этих зонах.

Окрашивание с целью выявления гладкомышечного актина-α продемонстрировало наличие миофибробластов, что свидетельствует о заживлении поврежденных участков дермы [3]. Так как эти клетки играют важнейшую роль в механизме стягивания ран, то они могут также стимулировать и процесс подтяжки кожи. Возможно, после образования МЛЗ запускаются процессы восстановления поврежденных участков, включающие в себя синтез и реконструкцию коллагена в дерме.

Согласно полученным результатам, ФФ — единственный на сегодняшний день метод, стимулирующий процесс относительно быстрого восстановления эпидермиса (на 7-е сутки после начала лечения). В течение 3 мес наблюдается обновление термически поврежденного коллагена без признаков дермального фиброза. На основании вышеизложенного можно рекомендовать применение ФФ в лечении постакне рубцов как эффективный и патогенетически обоснованный метод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chung J.H., Koh W.S., Youn J.L. Histological responses of port wine stains in brown skin after 578 nm copper vapor laser treatment // *Laser Surg. Med.* – 1996; 18: 358–366.
2. Fournier N., Dahan S., Barneon G. et al. Nonablative remodeling: Clinical, histologic, ultrasound imaging, and profilometric evaluation of a 1540 nm Er:Glass laser // *Dermatol. Surg.* – 2001; 27: 779–806.
3. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases // *J. Pathol.* – 2003; 200: 500–503.
4. Goldberg D.J., Whitworth J. Laser skin resurfacing with the Q-switched Nd:YAG laser // *Dermatol. Surg.* – 1997; 23: 903–906.
5. Gonzalez S., Gonzalez E., White W.M. et al. Allergic contact dermatitis: Correlation of in vivo confocal imaging to routine histology // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1999; 40: 708–713.
6. Herne K.B., Zachary C.B. New facial rejuvenation techniques // *Semin. Cutan. Med. Surg.* – 2000; 19: 221–231.
7. Lee M.W. Combination 532-nm and 1064-nm lasers for noninvasive skin rejuvenation and toning // *Arch. Dermatol.* – 2003; 139: 1265–1276.
8. Manstein D., Herron G.S., Sink R.K. et al. Fractional photothermolysis: A new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury // *Lasers Surg. Med.* – 2004; 34: 426–438.
9. Rajadhyaksha M., Gonzalez S., Zavislan J.M. et al. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation and comparison with histology // *J. Invest. Dermatol.* – 1999; 113: 293–303.

SUMMARY

EFFICIENCY OF COMBINATION THERAPY FOR SKIN SCARS BY PHOTOTHERMOLYSIS AND FILLER

Professor A.V. Samtsov, MD; Professor A.M. Ivanov, MD;

A.A. Sharova, Can. Med. Sci.; E.N. Luchina, Can. Med. Sci.

S.M. Kirov Military Medical Academy

Structural changes in the skin were studied in the treatment of its scars by a combination of fractional photothermolysis and filler, a stabilized hyaluronic acid preparation that triggered collagen neogenesis. The bases for found changes were improved microcirculation and tissue trophism due to the dilated vascular lumen, reduced productive vasculitis, normalized vascular wall permeability, larger numbers of fibroblasts, and their enhanced functional activity.