

Применение HIFU-аппарата Ultight при фотостарении кожи

Аннотация

Актуальность. В последние годы высокоинтенсивный фокусированный ультразвук (High Intensity Focused Ultrasound, HIFU) широко используют для омоложения кожи. Однако эффективность применения этого метода при фотостарении остается недоказанной. В настоящем исследовании оценивали омоложение фотостареющей кожи мыши с помощью HIFU.

Методы. В исследовании использовали 60 мышей, которых разделили на 3 группы: первая (контрольная) включала животных с признаками естественного старения кожи ($n=20$), во второй животных подвергали воздействию ультрафиолетового излучения спектра В (УФ-В), в третьей после облучения УФ-В на кожу мышей воздействовали HIFU ($n=20$). При макроскопической оценке исследователи определяли выраженность морщин. Гистологическая оценка включала окрашивание гематоксилином и эозином, толуидиновым синим и трихромом по Массону. Для анализа экспрессии трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и матриксной металлопротеиназы-3 (MMP3) выполнено также иммуногистохимическое исследование. При количественной оценке результатов применяли программное обеспечение для визуализации.

Результаты. Данные макроскопической оценки в третьей группе, мыши которой получили процедуру HIFU, были аналогичны таковым в контрольной группе, что подтверждает эффект омоложения кожи, подвергшейся фотостарению. Результаты гистологического исследования при окрашивании гематоксилином и эозином свидетельствовали о статистически значимом уменьшении толщины кожи после HIFU-воздействия (60,12 ед. во второй группе по сравнению с 40,85 ед. в третьей группе, $p<0,05$). При окрашивании образцов третьей группы толуидиновым синим и трихромом по Массону наблюдали улучшение пространственной организации коллагена и статистически значимое увеличение его содержания по сравнению с тем, что было отмечено в образцах второй группы (272 879,88 ед. во второй группе и 533 805,78 в третьей группе, $p<0,05$). Про результатами иммуногистохимического анализа экспрессия TGF- β в третьей группе (2,46 ед.) была статистически значимо выше, чем во второй группе (0,59 ед.), тогда как экспрессия MMP3 в третьей группе оказалась статистически значимо ниже (99,18 ед.), чем во второй (559,83 ед.) ($p<0,05$).

Заключение. Применение процедуры HIFU обеспечивает эффект омоложения кожи, подвергшейся фотостарению. Ее проведение сопровождается такими преимуществами, как стимуляция синтеза коллагена и реорганизация его структуры за счет усиления экспрессии TGF- β и подавления экспрессии MMP3. Это первое исследование на животных, подтвердившее прямое влияние HIFU на процессы фотостарения, что может служить дополнительным доказательством целесообразности применения

Lee TJ, Kim D, Kim T, Pak CJ, Suh HP, Hong JP.

Rejuvenation of photoaged aged mouse skin using high-intensity focused ultrasound.

Перевод с английского под редакцией д.м.н.

С.В. Муракова. // *J Plast Reconstruct Aesthet Surg*. 2022;75(Issue 10):3859–3868. Doi.: 10.1016/j.bjps.2022.06.073.

данного агента для коррекции морфологических признаков старения кожи.

1 | ВВЕДЕНИЕ

В эпоху, когда забота о внешности стала одним из главных направлений массовой культуры, для омоложения кожи применяют различные антивозрастные аппаратные технологии – от лазерной коррекции, микронидлинга, дермабразии до ультразвукового лифтинга [1–3]. В последние годы было установлено, что использование высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (intensity focused ultrasound, HIFU) способствует уменьшению дряблости кожи лица и повышению ее упругости. Как следствие, технология получила широкое признание в качестве метода омоложения кожи [4–7].

Ультразвук используют в медицине уже несколько десятилетий, преимущественно в целях визуализации, однако разработка технологии HIFU позволила расширить область его терапевтического применения. Этот неинвазивный акустический метод основан на использовании пьезоэлектрического преобразователя, который обеспечивает пространственную фокусировку высокоэнергетических импульсов с минимальным повреждением тканей вне целевой зоны [8, 9]. Преобразователь генерирует ультразвуковые волны с частотой от 1 до 7 МГц. В дальнейшем звуковые волны, преобразованные в тепловую энергию, распространяются в тканях и сходятся в фокусной точке, вызывая коагуляционный некроз [8, 9].

Уже около 10 лет технологию HIFU применяют как неинвазивный метод лечения солидных опухолей. При использовании более высоких частот (например, 7 МГц) HIFU вызывает целенаправленное термическое повреждение дермы и поверхностной мышечно-апоневротической системы (SMAS), которое приводит к повышению упругости кожи [4, 5, 10–12]. Следовательно, технология HIFU обеспечивает регресс морфологических изменений, наблюдаемых при фотостарении кожи, и представляет собой неинвазивный метод коррекции с очень низкой частотой развития осложнений [13].

HIFU быстро завоевал популярность как эффективный метод лифтинга мягких тканей лица, повышения упругости кожи и контурной пластики тела, обусловленной эффектом липолиза [14–16]. Но несмотря на широкое применение HIFU для омоложения кожи, до сих пор ощущается недостаток экспериментальных исследований, посвященных

изучению механизмов его действия, особенно его влияния на кожу с признаками фотостарения.

Это первое исследование, в котором использовали мышиную модель фотоповреждения кожи ультрафиолетовым излучением спектра В и изучали воздействие HIFU на ткань, имитирующую стареющую кожу человека с признаками дерматогелиоза.

2 | МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. | Методика проведения эксперимента

При проведении исследования использовали самцов безволосых мышей линии SKH-1 в возрасте 8 недель, поскольку кожа этих голых мышей напоминает кожу человека толщиной от 0,025 до 0,008 мм [17]. В общей сложности 60 животных (с массой тела 25–30 г) были рандомизированы на три группы. Первую группу (n=20) с признаками естественного старения кожи использовали как контрольную: мыши этой группы получали плацебо. Во второй группе (n=20) кожу животных подвергали воздействию УФ-излучения спектра В (УФ-В). В третьей группе (n=20) после облучения УФ-В проводили процедуру HIFU. В этой группе кожу мышей сначала облучали УФ-В (для стимуляции процессов фотостарения), а затем на нее воздействовали HIFU мощностью 0,3 Дж в течение 21–42 секунд.

Окончательная оценка результатов у всех мышей была проведена на 16-й неделе. В течение всего эксперимента животных осматривали для выявления клинических симптомов инфекции, если у особи отмечали снижение массы тела более чем на 20%, эксперимент прекращали и проводили эвтаназию.

Для определения надлежащего режима и протокола процедуры были выполнены пилотные исследования, которые не описаны в настоящей статье. Экспертный совет по надзору за животными Медико-биологического исследовательского центра «Асан» утвердил протокол эксперимента, использованный в этом исследовании. Уход за грызунами осуществляли в соответствии с руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными.

2.2. | Протокол облучения УФ-В и применения HIFU

Мышей, которых должны были подвергнуть воздействию УФ-В, помещали в аппарат для ультрафиоле-

тового облучения. Длина волн, излучаемых источником УФ-В, составляла 302 нм. Животных облучали 3 раза в неделю на протяжении 10 недель в целях стимуляции процессов фотостарения и образования морщин на коже в области спины. Начальная доза облучения была равна 1 МЭД (минимальной эритемной дозе, 60 мДж/см²) на первой неделе и достигала 4 МЭД (240 мДж/см²) в период с 4-й по 10-ю недели, что обеспечивало развитие дерматогелиоза [18, 19].

Процедуру HIFU проводили на протяжении 6 недель на аппарате Ultight (Medicon, Южная Корея) в течение 5 дней подряд с последующим перерывом длительностью 2 дня. Частота ультразвуковых волн составляла 7 МГц, мощность – 0,3 Дж/сек, а общее количество энергии – 3,5 мВт/см² в сутки. В случаях, когда воздействие HIFU вызывало истончение кожи мышей, исследователи наносили слой увлажняющего геля толщиной 0,25 см во избежание слишком глубокого проникновения излучения и ожога кожи.

2.3. | Оценка

2.3.1. Макроскопическая оценка морщин

Морщины на коже исследовали с помощью оптического микроскопа ASW-300 (модель Olympus Vx-41, Olympus, Япония) во время ингаляционной анестезии животных изофлураном (2–5%-ным). Анализировали следующие характеристики: увлажненность и эластичность кожи, пористость, пигментацию, выработку кожного сала, чувствительность и образование морщин на 16-й неделе. Для количественной оценки таких показателей, как общая площадь морщин (с учетом их общей ширины), количество морщин, общая длина морщин и доля площади кожи, покрытой морщинами, использовали аппарат Visioline® VL 650 (EnviroDerm, Великобритания), разработанный для объективного анализа морщин и глубоких складок кожи [20].

2.3.2. Гистологический анализ

При гистологическом анализе образцы окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ), толуидиновым синим и трихромом по Массону, а также выполняли иммуногистохимическое (ИГХ) исследование. Окрашивание ГЭ использовали для определения

толщины эпидермиса и оценки общей структуры ткани. При окрашивании толуидиновым синим оценивали распределение и структуру коллагена, а метод трихром по Массону применяли для анализа изменения организации коллагеновых и эластических волокон [21, 22]. Иммуногистохимическое окрашивание использовали для оценки процессов старения путем визуализации MMP-3 (с помощью моноклональных антител). Дополнительно изучали усиление синтеза коллагена путем визуализации соответствующего цитокина TGF-β (трансформирующего фактора роста бета). Для количественной оценки результатов гистологического исследования в произвольных единицах использовали программное обеспечение Image J (Национальный институт здоровья, США).

2.3.3. Статистический анализ

При проведении всех видов статистического анализа применяли программный пакет STATA 15 (Stata Corp LLC, США). Статистическую значимость различий, наблюдаемых при сравнении средних значений в группах, оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после чего проводили вторичный анализ с использованием критерия Тьюки; различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

3 | РЕЗУЛЬТАТЫ

При завершении эксперимента на 16-й неделе в 1-й, 2-й и 3-й группах было 14, 12 и 11 животных соответственно.

3.1. | Макроскопическая оценка морщин

Макроскопическая оценка морфологии поверхности кожи свидетельствовала о явном увеличении количества и глубины морщин у животных второй группы, подвергшихся облучению УФ-В, по сравнению с тем, что наблюдали у животных контрольной группы (с естественными признаками старения) и животных третьей группы, которых подвергали воздействию УФ-В и HIFU (рис. 1). Во второй группе морщины были более глубокими и имели более толстые края, чем в контрольной. Еще одно различие заключалось в расстоянии между морщинами, которое во второй группе было существенно шире, чем в контрольной.

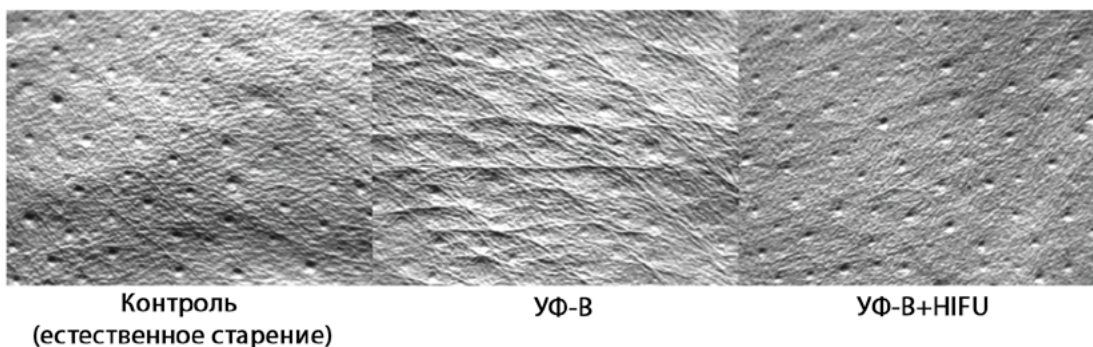


Рис. 1. Визуальная оценка морфологических изменений. Макроскопическое изображение поверхности репрезентативных образцов кожи. В контрольной группе морщины более мелкие, тогда как в группе животных, подвергнутых УФВ-облучению, морщины более глубокие и широкие



Рис. 2. Количественная оценка различных характеристик морщин

Количественную оценку различных характеристик морщин выполняли с помощью аппарата Visioline. На основании усредненных данных для каждой группы были построены соответствующие диаграммы (рис. 2). В группе животных, получавших процедуру HIFU, результаты аналогичны таковым в контрольной группе. Это подтверждает эффект омоложения кожи, подвергнутой фотостарению.

Как показано на рисунке 2, в третьей группе, где проводили облучение УФ-В и процедуру HIFU, значения всех параметров были ниже, чем во второй группе, где выполнили только облучение УФ-В, и в контрольной. Несмотря на то что в контрольной группе количество морщин было больше, чем во второй, общая площадь и длина морщин достигали

более высоких значений именно во второй группе. Это подтверждает визуальное наблюдение, где было отмечено, что во второй группе морщины более выражены. Наиболее гладкую текстуру кожи наблюдали у животных третьей группы, получивших и УФ-В, и HIFU.

3.2. Гистологический анализ

3.2.1. Окрашивание гематоксилином и эозином

Результаты окрашивания гематоксилином и эозином (метод окрашивания ГЭ использовали для оцен-

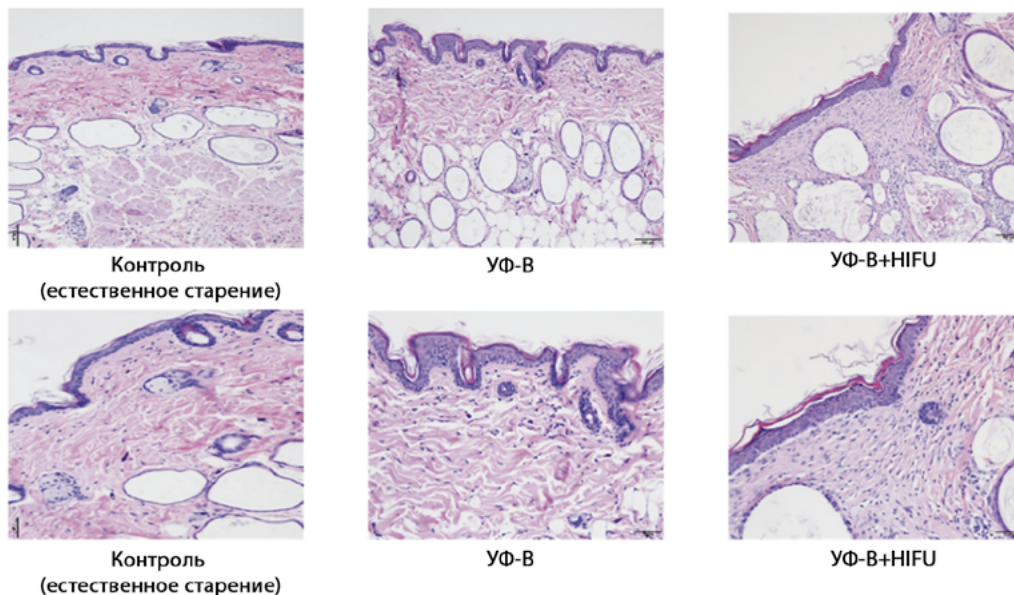


Рис. 3. Результаты окрашивания кожи безволосых мышей гематоксилином и эозином. Верхний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 100$). Нижний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 200$)

ки изменений структуры слоев кожи и толщины эпидермиса во всех исследуемых группах) свидетельствовали о том, что толщина эпидермиса у животных третьей группы, подвергнутых как облучению УФ-В, так и HIFU, была меньше, чем во второй группе, где мыши получали только облучение УФ-В. Кроме того, во второй группе эпидермальный слой был наиболее толстым и неровным (рис. 3).

Во всех группах были проведены измерения толщины эпидермального слоя с последующей статистической обработкой данных. Для этого был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого свидетельствовали о статистически

значимом различии средней толщины эпидермиса в исследуемых группах ($F=8,56$, $p<0,05$). В дальнейшем был выполнен вторичный анализ данных с использованием критерия Тьюки. Статистическая значимость различий подтверждена. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Средняя толщина эпидермиса во второй группе была наибольшей и составила 60,12 мк, что статистически значимо превышало показатели в контрольной (27,22 мк) и третьей (40,85 мк) группах. После воздействия HIFU на ткань, которую подвергли фотостарению, толщина кожи значимо уменьшилась.

ТАБЛ. 1. Результаты дисперсионного анализа толщины эпидермиса, полученных при окрашивании ГЭ

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦОВ, N	СРЕДНЯЯ ТОЛЩИНА ЭПИДЕРМИСА, МК	СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
Контрольная	14	27,22	7,089	$F=8,561$ $p=0,001$
УФ-В	12	60,12	26,61	
УФ-В + HIFU	11	40,85	23,41	

ТАБЛ. 2. Результаты анализа данных с использованием критерия Тьюки

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	РАЗЛИЧИЕ, ЕД.	СТАНДАРТНАЯ ОШИБКА	Т-КРИТЕРИЙ	ДОВЕРИТЕЛЬНЫЙ ИНТЕРВАЛ P
УФ-В / контрольная	32,89842	7,96	4,13	0,001
УФ-В + HIFU / контрольная	13,63609	8,15	1,67	0,230
УФ-В + HIFU / УФ-В	-19,26233	8,45	-2,28	0,072

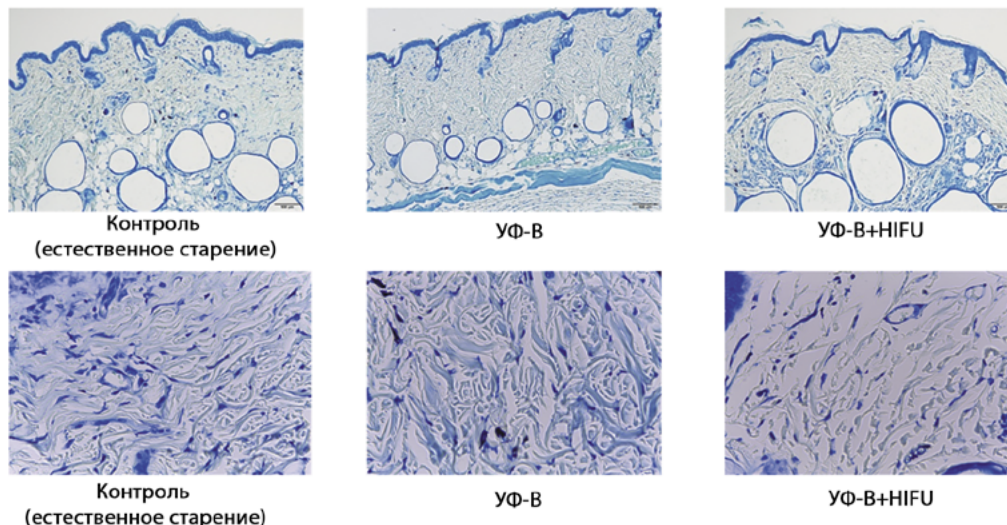


Рис. 4. Результаты окрашивания кожи безволосых мышей толуидиновым синим. Верхний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 100$). Нижний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 400$). Обратите внимание на неравномерное рыхлое расположение коллагеновых волокон в образах кожи мышей, получивших только облучение УФ-В, и улучшение этих показателей у мышей третьей группы после процедуры HIFU

3.2.2. Окрашивание толуидиновым синим

При гистологическом исследовании с окрашиванием толуидиновым синим (этот метод окрашивания использовали для оценки изменения структуры и пространственной организации коллагена дермы во всех исследуемых группах) в контрольной группе была выявлена хорошо организованная сеть волокон с плотными параллельно расположенными коллагеновыми фибриллами. Такую же организованную структуру из плотных параллельных волокон наблюдали у животных третьей группы, получивших УФ-В и HIFU, однако степень ее упорядоченности была несколько меньше, чем в первой группе. В то же время у мышей второй группы, которых подвергали только облучению УФ-В, структура волокон была очень неравномерной, с рыхлым расположением коллагеновых фибрилл, утративших параллельное направление (рис. 4).

3.2.3. Окрашивание трихромом по Массону

При исследовании образцов, окрашенных трихромом по Массону (данный метод окрашивания использовали для оценки изменений структуры и пространственной организации коллагена и эластана дермы во всех исследуемых группах), авторы

установили, что в коже мышей как контрольной, так и третьей группы коллаген присутствовал преимущественно в дерме, тогда как во второй группе наблюдали существенное уменьшение в дерме количества коллагена, окрашенного в синий цвет. Таким образом, содержание коллагена в коже мышей, подвергнутых воздействию и УФ, и HIFU, было схожим с тем, что отмечали в контрольной группе, что указывает на полученный эффект омоложения (рис. 5).

После окрашивания образцов трихромом по Массону провели количественную оценку образования коллагена. Для этого был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого указывали на статистически значимое различие среднего содержания коллагена в исследуемых группах ($F=7,754$, $p<0,05$). Далее был выполнен вторичный анализ данных с использованием критерия Тьюки. Статистическая значимость различий подтверждена (табл. 3, 4).

Согласно результатам статистической обработки данных, среднее содержание коллагена во второй группе, подвергшейся воздействию УФ-В, составило 272 879,88 ед. и было значимо ниже, чем в контрольной (453 921,27 ед.) и третьей (533 805,80 ед.) группах ($p<0,05$). Обратите внимание, что после воздействия HIFU содержание коллагена было статистически значимо больше, чем только после УФ-облучения.

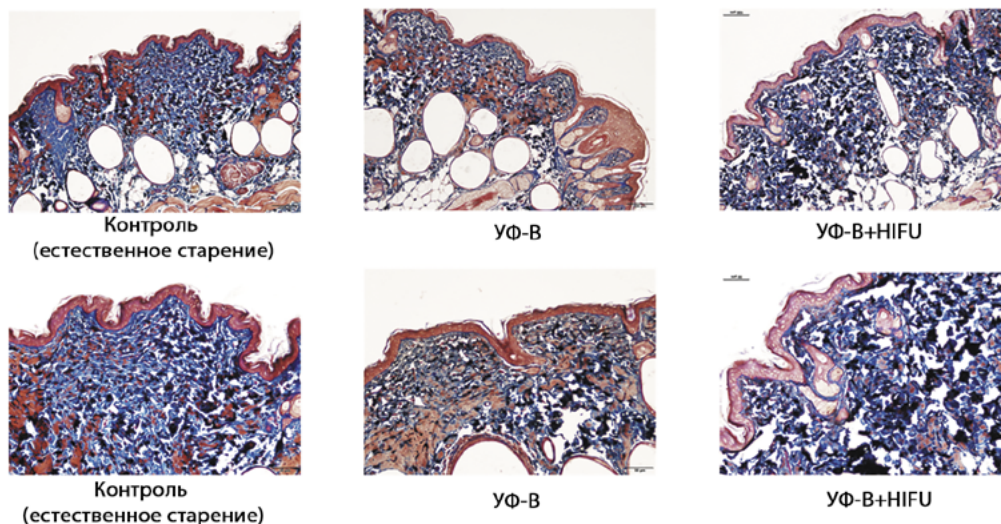


Рис. 5. Результаты окрашивания кожи безволосых мышей методом трихрома по Массону. Верхний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 100$). Нижний ряд: окрашивание репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 400$). Обратите внимание на увеличение плотности волокон коллагена после воздействия HIFU

ТАБЛ. 3. Результаты дисперсионного анализа содержания коллагена, полученные при окрашивании методом трихрома по Массону

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦОВ, n	СРЕДНЕЕ СОДЕРЖАНИЕ КОЛЛАГЕНА, ЕД.	СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
Контрольная	14	453 921,27	130 636,01	F=7,754 p=0,002
УФ-В	12	272 879,88	92 165,58	
УФ-В + HIFU	11	533 805,78	178 373,81	

ТАБЛ. 4. Результаты вторичного анализа с использованием критерия Тьюки

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	РАЗЛИЧИЕ	СТАНДАРТНАЯ ОШИБКА	Т-КРИТЕРИЙ	ДОВЕРИТЕЛЬНАЯ ВЕРОЯТНОСТЬ, P
УФ-В / контрольная	-181 041,4	64 696,78	-2,80	0,025
УФ-В + HIFU / контрольная	79 884,51	62 581,30	1,28	0,421
УФ-В + HIFU / УФ-В	260 925,9	67 655,86	3,86	0,002

3.2.4. Гистохимическое исследование

Наличие экспрессии TGF- β было подтверждено как в контрольной, так и в третьей (УФ-В + HIFU) группе, однако во второй группе, где мышей подвергли только облучению УФ-В, экспрессия этого цитокина была снижена (рис. 6). Экспрессия TGF- β в тканях, наблюдаемая при иммуногистохимическом окрашивании, позволяла оценить стимуляцию синтеза коллагена во всех исследуемых группах. Обратите внимание на усиленное окрашивание образца из третьей группы, где мыши получали процедуру HIFU,

по сравнению с более бледной окраской образца из второй группы, подвергшейся лишь облучению УФ-В.

Для осуществления количественной оценки был проведен однофакторный дисперсионный анализ, результаты которого выявили статистически значимое различие экспрессии TGF- β в исследуемых группах (F=9,040, p<0,05). В дальнейшем был выполнен вторичный анализ данных с использованием критерия Тьюки. Статистическая значимость различий подтверждена (табл. 5, 6).

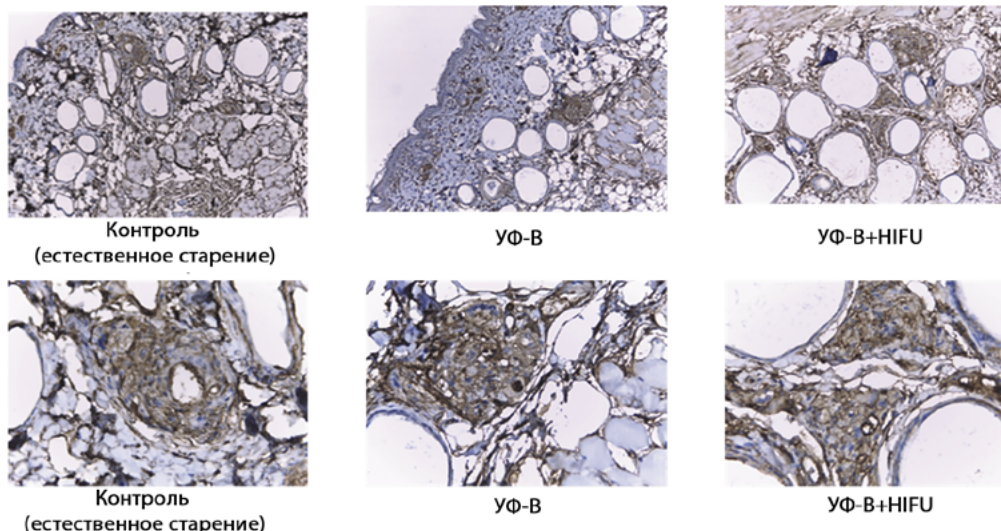


Рис. 6. Результаты иммуногистохимического исследования образцов кожи безволосых мышей. Верхний ряд: макрофотографии репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 100$). Нижний ряд: макрофотографии репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 400$). Более интенсивная окраска образцов говорит о более значительной экспрессии TGF- β

ТАБЛ. 5. Результаты дисперсионного анализа экспрессии TGF- β , полученные при иммуногистохимическом исследовании

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦОВ, n	СРЕДНЯЯ ВЕЛИЧИНА ЭКСПРЕССИИ TGF- β	СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
Контрольная	14	3,42	1,72	F=9,04 p=0,001
УФ-В	12	0,59	0,23	
УФ-В + HIFU	11	2,46	1,86	

ТАБЛ. 6. Результаты вторичного анализа с использованием критерия Тьюки

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	РАЗЛИЧИЕ	СТАНДАРТНАЯ ОШИБКА	T-КРИТЕРИЙ	ЗНАЧЕНИЕ P
УФ-В / контрольная	-2,84	0,68	-4,16	0,001
УФ-В + HIFU / контрольная	-0,97	0,68	-1,42	0,345
УФ-В + HIFU / УФ-В	1,87	0,66	2,81	0,024

Результаты количественной оценки подтвердили, что во второй группе после облучения УФ-В интенсивность экспрессии TGF- β (0,59 ед.) была статистически значимо меньше, чем в контрольной (3,42 ед.) и третьей группе (2,46 ед.). Значимое различие по этому показателю между первой и третьей группами отсутствовало (табл. 3), то есть в третьей группе экспрессия TGF- β также была значимо более выраженной, чем во второй.

Экспрессия MMP3, наблюдаемая в тканях при иммуногистохимическом окрашивании, позволяла оценить стимуляцию синтеза коллагена во всех исследуемых группах. Во второй группе, где мышей

подвергали облучению УФ-В, экспрессия этого цитокина, напротив, была более выраженной, чем в первой и третьей группах (рис. 7).

Интенсивность окраски образцов говорит о величине экспрессии MMP3; таким образом, можно видеть, что в образцах второй группы после облучения УФ-В экспрессия MMP3 увеличилась, а в образцах третьей группы после процедуры HIFU снизилась.

Об этом свидетельствуют также и результаты количественной оценки. Для ее осуществления был проведен однофакторный дисперсионный анализ, который показал статистически значимое раз-

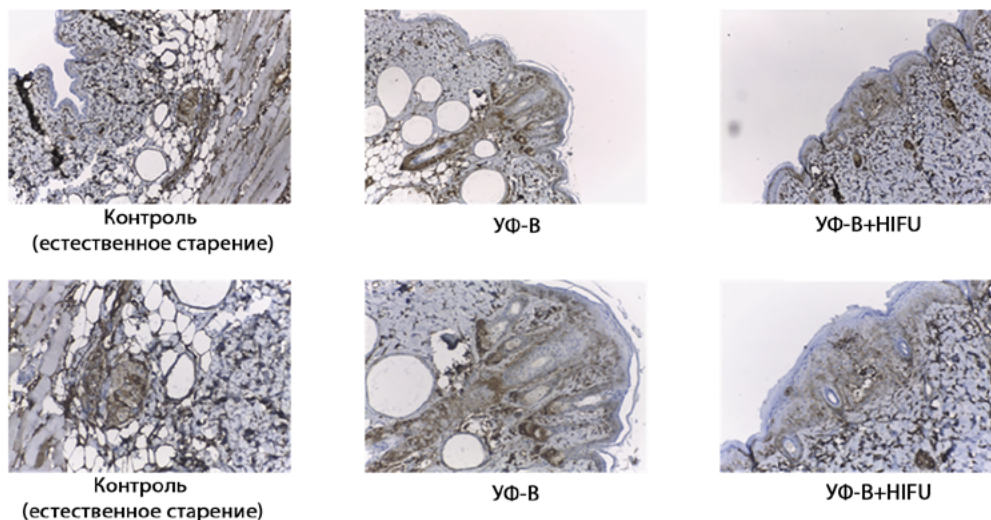


Рис. 7. Результаты оценки экспрессии MMP3 при иммуногистохимическом исследовании образцов кожи безволосых мышей. Верхний ряд: макрофотографии репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 100$). Нижний ряд: макрофотографии репрезентативных образцов кожи (ув. $\times 400$)

ТАБЛ. 7. Результаты дисперсионного анализа экспрессии MMP3, полученные при иммуногистохимическом исследовании

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	КОЛИЧЕСТВО ОБРАЗЦОВ, n	СРЕДНЯЯ ВЕЛИЧИНА ЭКСПРЕССИИ MMP3, ед.	СТАНДАРТНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ	СТАТИСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
Контрольная	14	77 031,43	23 271,62	F=4,406 p=0,021
УФ-В	12	559 830,78	773 044,29	
УФ-В + HIFU	11	99 180,89	27 935,72	

ТАБЛ. 8. Результаты вторичного анализа данных с использованием критерия Тьюки

ИССЛЕДУЕМАЯ ГРУППА	РАЗЛИЧИЕ	СТАНДАРТНАЯ ОШИБКА	T-КРИТЕРИЙ	ЗНАЧЕНИЕ P
УФ-В / контрольная	482 799,3	173 712,7	2,78	0,025
УФ-В + HIFU / контрольная	22 149,5	173 712,7	0,13	0,991
УФ-В + HIFU / УФ-В	-460 649,9	191 666,7	-2,40	0,058

личие экспрессии MMP3 в исследуемых группах ($F=4,0406$, $p<0,05$). Далее был выполнен вторичный анализ полученных данных с использованием критерия Тьюки. Статистическая значимость различий подтверждена (табл. 7, 8).

Средняя величина экспрессии MMP3 во второй группе (559 830,78 ед.) была статистически значимо больше, чем в контрольной (77 031,43 ед.) и в третьей (99 180,89 ед.). Значимого различия в уровне экспрессии MMP3 между первой и третьей группами не выявлено. Но в третьей группе экспрессия MMP3 была значимо менее выражена, чем во второй.

4 | ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что старение кожи обусловлено эндогенными и экзогенными факторами. Эндогенное, или хронобиологическое старение – неизбежный процесс, который приводит к постепенной атрофии дермы, снижению ее физиологической активности и появлению мелких морщин [23, 24]. Перечисленные изменения дополняются экзогенным старением в результате воздействия на кожу агрессивных факторов внешней среды. Важнейшая роль среди них принадлежит длительному ультрафиолетовому

облучению, которое приводит к так называемому фотостарению [18, 19]. Этот процесс сопровождается медленной дегенерацией соединительной ткани кожи. В частности, длительное воздействие ультрафиолетовых лучей вызывает повреждение белков внеклеточного матрикса дермы (таких, как коллаген и эластин) и гликозаминогликанов (ГАГ), что способствует углублению морщин, обвисанию кожи и снижению ее эластичности [18, 19]. Следовательно, реорганизацию этих структур и компонентов дермы можно считать основной целью омоложения кожи.

Установлено, что воздействие HIFU на дерму и фиброзно-фасциальные анатомические структуры обеспечивает регресс морфологических признаков старения кожи. При процедуре HIFU происходит мгновенное нагревание микроскопических участков подкожной ткани с образованием зон термической коагуляции в целевом слое. Выделяющееся тепло разрушает коллаген и запускает в дерме естественные механизмы неоколлагеногенеза без повреждения эпидермиса и прилежащих тканей [8, 11, 16, 25, 26]. Результаты настоящего исследования подтверждают, что применение HIFU способствовало омоложению кожи мышей, подвергнутой искусственному фотостарению, а также уменьшению выраженности морщин и складок за счет усиления синтеза коллагена и повышения эластичности кожи. Авторы анализировали изменение морфологии кожи после процедуры HIFU, выполнив как макроскопическое, так и гистологическое исследование.

При морфологическом исследовании образцов кожи животных в контрольной группе глубина морщин была наименьшей, а их количество – наибольшим. Во второй группе, где мышей подвергали облучению УФ-В, морщины были глубже и шире, а общая плотность морщин достигла самого высокого значения, и это позволяет считать УФВ-излучение наиболее важным фактором образования морщин и старения кожи. В группе, получившей процедуру HIFU, общая площадь, количество и длина морщин были наименьшими, что подтверждает эффективность коррекции как глубоких, так и мелких морщин. Результаты макроскопической оценки свидетельствовали об общем повышении упругости кожи и сглаживании рельефа морщин после воздействия HIFU.

Данные гистологического исследования, полученные при окрашивании ГЭ, подкрепляют результаты макроскопического исследования. Во второй группе после облучения УФ-В наблюдали чрезмерное утолщение эпидермиса и дермы, предполагающее формирование более глубоких морщин, тогда как в контрольной группе кожа была истонченной и



склонной к образованию более мелких морщин [27]. Применение HIFU способствовало статистически значимому уменьшению толщины эпидермиса и восстановлению структуры коллагена в дерме, что свидетельствует о регрессе морфологических признаков старения кожи, вызванных УФ-облучением.

При дополнительном исследовании образцов, окрашенных толуидиновым синим и трихромом по Массону, выяснили, что сеть коллагеновых волокон была хорошо организована и состояла из плотных, параллельно расположенных фибрилл как в контрольной, так и в третьей группе, где мыши получали и УФ-В, и HIFU. Однако в образцах второй группы коллаген располагался рыхло и неравномерно, а его содержание в дерме было статистически значимо меньшим, чем в образцах двух других групп. Таким образом, воздействие HIFU стимулирует регенерацию кожи, поврежденной УФВ-излучением, и способствует восстановлению пространственной структуры коллагена и усилению неоколлагеногенеза.

Разрушение коллагена и снижение его синтеза при фотостарении приводят к уменьшению прочности и упругости кожи [18]. Снижение содержания коллагена в дерме не только уменьшает эластичность кожи, но и препятствует механическому взаимодействию фибробластов с внеклеточным матриксом, что приводит к формированию порочного круга – снижению активности фибробластов и, как следствие, еще большему снижению количества коллагена в дерме [13, 28]. Подобное нарушение структуры и функций компонентов дермы спрово-

ждается появлением внешних признаков старения, таких как морщины и снижение эластичности кожи. Поэтому усиление синтеза коллагена и восстановление его структуры имеют критическое значение для ее омоложения.

В данном исследовании стимуляция неколлагенеза была дополнительно подтверждена результатами иммуногистохимического исследования с оценкой экспрессии TGF- β и MMP3 (с использованием моноклональных антител). TGF- β – цитокин, мощный индуктор накопления коллагена в тканях, а MMP3 участвует в разрушении белков внеклеточного матрикса (ВКМ), таких как коллаген [29–32].

Известно, что импульсы HIFU проходят через разные слои тканей в целевой области, оказывая воздействие на коллаген в дерме и SMAS [33]. В дерме HIFU способствует сокращению существующих и образованию новых коллагеновых волокон за счет стимуляции выработки TGF- β , как показано в этом исследовании, где подтвержденная экспрессия в контрольной и третьей группах была статистически значимо выше, чем во второй, животных которой подвергали только облучению УФ-В. Кроме того, под воздействием HIFU в целевых тканях образуются зоны термической коагуляции, в которых последние нагреваются до температуры 60–70°C, что оптимально для естественной регенерации коллагена [8, 16, 25, 34]. Этот контролируемый термический эффект стимулирует синтез коллагена *de novo* и способствует перестройке коллагенового каркаса дермы [9, 11, 15, 35], что подтверждают результаты гистологического анализа и в этом исследовании.

Таким образом, процедура HIFU косвенно усиливает образование коллагена, снижая экспрессию MMP3, которая разрушает белки внеклеточного матрикса, в том числе и коллаген, а UVB-излучение увеличивает экспрессию матриксных металлопротеиназ, играющих важную роль в морфологической деградации кожи [32, 36, 37]. Такой вывод подтверждает и проведенное нами исследование.

5 | ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение HIFU оказывает омолаживающее действие на кожу с признаками фотостарения. Ранее было установлено, что HIFU обладает способностью замедлять естественное старение кожи. В клинической практике эту процедуру применяют как один из методов стимуляции синтеза коллагена, уменьшения дряблости кожи, улучшения ее текстуры и

устранения мелких морщин. Дополнительные данные, полученные в этом исследовании образцов кожи, подвергшейся фотостарению, подтверждают, что HIFU обеспечивает описанные преимущества образования и перестройки коллагена за счет усиления экспрессии TGF- β и подавления активности MMP3. Таким образом, это первое исследование на животных, подтвердившее прямое влияние HIFU на процессы фотостарения, что еще раз подчеркивает целесообразность применения высокоинтенсивного фокусированного ультразвука для коррекции морфологических признаков старения кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jang JU, Kim SY, Yoon ES, et al. Comparison of the Effectiveness of Ablative and Non-Ablative Fractional Laser Treatments for Early Stage Thyroidectomy Scars. // *Arch Plast Surg*. 2016;43:575–81.
2. Kim SG, Kim EY, Kim YJ, et al. The Efficacy and Safety of Ablative Fractional Resurfacing Using a 2,940-Nm Er:YAG Laser for Traumatic Scars in the Early Posttraumatic Period. // *Arch Plast Surg*. 2012;39:232–7.
3. Rhie JW, Shim JS, Choi WS. A Pilot Study of Skin Resurfacing Using the 2,790-nm Erbium:YSGG Laser System. // *Arch Plast Surg*. 2015;42:52–8.
4. Juhasz M, Korta D, Mesinkovska NA. A Review of the Use of Ultrasound for Skin Tightening, Body Contouring and Cellulite Reduction in Dermatology. // *Dermatol Surg*. 2018;44:949–63.
5. Suh DH, Shin MK, Lee SJ, et al. Intense focused ultrasound tightening in Asian skin: clinical and pathologic results. // *Dermatol Surg*. 2011;37:1595–602.
6. Werschler WP, Werschler PS. Long-term Efficacy of Micro-focused Ultrasound with Visualization for Lifting and Tightening Lax Facial and Neck Skin Using a Customized Vectoring Treatment Method. // *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9:27–33.
7. Asiran Serdar Z, Aktas Karabay E, Tatliparmak A, et al. Efficacy of high-intensity focused ultrasound in facial and neck rejuvenation. // *J Cosmet Dermatol*. 2020;19:353–8.
8. Bachu VS, Kedda J, Suk I, et al. High-Intensity Focused Ultrasound: A Review of Mechanisms and Clinical Applications. // *Ann Biomed Eng*. 2021;49:1975–91.
9. Jenne JW, Preusser T, Gunther M. High-intensity focused ultrasound: principles, therapy guidance, simulations and applications. // *Z Med Phys*. 2012;22:311–22.
10. Henderson PW, Lewis GK, Shaikh N, et al. A portable high-intensity focused ultrasound device for noninvasive venous ablation. // *J Vasc Surg*. 2010;51:707–11.
11. Ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. // *Prog Biophys Mol Biol*. 2007;93:111–29.

12. Suh DH, Kim DH, Lim HK, et al. Intense focused ultrasound (IFUS) with a modified parameter on facial tightening: A study on its safety and efficacy. // *J Cosmet Laser Ther*, 2016;18:448–51.
13. Kim YS, Rhim H, Choi MJ, et al. High-intensity focused ultrasound therapy: an overview for radiologists. // *Korean J Radiol*, 2008;9:291–302.
14. Jewell ML, Baxter RA, Cox SE, et al. Randomized sham-controlled trial to evaluate the safety and effectiveness of a high-intensity focused ultrasound device for noninvasive body sculpting. // *Plast Reconstr Surg*, 2011;128:253–62.
15. Jewell ML, Desilets C, Smoller BR. Evaluation of a novel high-intensity focused ultrasound device: preclinical studies in a porcine model. // *Aesthet Surg J*, 2011;31:429–34.
16. Park H, Kim E, Kim J, et al. High-Intensity Focused Ultrasound for the Treatment of Wrinkles and Skin Laxity in Seven Different Facial Areas. // *Ann Dermatol*, 2015;27:688–93.
17. Kiss I, Chen S, Tramposch KM. The effect of high and low ultraviolet-B dose exposure on the degree of hairless mouse skin wrinkling. // *Photochem Photobiol*, 1991;53:109–12.
18. Ma W, Wlaschek M, Tancheva-Poor I, et al. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. // *Clin Exp Dermatol*, 2001;26:592–9.
19. Seite S, Zucchi H, Septier D, et al. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. // *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2006;20:980–7.
20. Amirkhani MA, Shoaie-Hassani A, Soleimani M, et al. Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study. // *Bioimpacts*, 2016;6:149–54.
21. Damodarasamy M, Vernon RB, Karres N, et al. Collagen extracts derived from young and aged mice demonstrate different structural properties and cellular effects in three-dimensional gels. // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010;65:209–18.
22. Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. // *Arch Histol Cytol*, 2002;65:109–26.
23. Bloom BS, Emer J, Goldberg DJ. Assessment of safety and efficacy of a bipolar fractionated radiofrequency device in the treatment of photodamaged skin. // *J Cosmet Laser Ther*, 2012;14:208–11.
24. Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. // *Cell Transplant*, 2018;27:729–38.
25. Brobst RW, Ferguson M, Perkins SW. Ulthera: initial and six month results. // *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2012;20:163–176, vi.
26. Haar GT, Coussios C. High intensity focused ultrasound: physical principles and devices. // *Int J Hyperthermia*, 2007;23:89–104.
27. Jackson R. Elderly and sun-affected skin. Distinguishing between changes caused by aging and changes caused by habitual exposure to sun. // *Can Fam Physician*, 2001;47:1236–43.
28. Makrantonaki E, Zouboulis CC. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. // *Ann NY Acad Sci*, 2007;1119:40–50.
29. Lijnen P, Petrov V. Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. // *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002;24:333–44.
30. Lin PS, Chang HH, Yeh CY, et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. // *J Formos Med Assoc*, 2017;116:351–8.
31. Manka SW, Bihan D, Farndale RW. Structural studies of the MMP-3 interaction with triple-helical collagen introduce new roles for the enzyme in tissue remodelling. // *Sci Rep*, 2019;9:18785.
32. Pittayapruerk P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. // *Int J Mol Sci*, 2016;17.
33. Shaw CJ, ter Haar GR, Rivens IH, et al. Pathophysiological mechanisms of high-intensity focused ultrasound-mediated vascular occlusion and relevance to non-invasive fetal surgery. // *J R Soc Interface*, 2014;11:20140029.
34. Fabi SG. Noninvasive skin tightening: focus on new ultrasound techniques. // *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2015;8:47–52.
35. Liu Y, Kon T, Li C, et al. High intensity focused ultrasound-induced gene activation in sublethally injured tumor cells in vitro. // *J Acoust Soc Am*, 2005;118:3328–36.
36. Quan T, Qin Z, Xia W, et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. // *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2009;14:20–4.
37. Kim J, Lee CW, Kim EK, et al. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. // *J Ethnopharmacol*, 2011;137:427–33.