

Астахова М.И.<sup>1</sup>, Астахова Л.В.<sup>1</sup>, Гиниатуллин Р.У.<sup>1</sup>, Головнева Е.С.<sup>2</sup>, Игнатьева Е.Н.<sup>1</sup>, Кудрина М.Г.<sup>1</sup>

## Влияние высокоинтенсивного лазерного излучения дальнего инфракрасного диапазона на состав коллагенового матрикса нормотрофических кожных рубцов (экспериментальное исследование)

1 - ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск; 2 - ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Челябинск

Astakhova M.I., Astakhova L.V., Giniatullin R.U., Golovneva E.S., Ignatieva E.N., Kudrina M.G.

### Influence of high-intensity CO<sub>2</sub> laser irradiation on collagen matrix composition of normotrophic skin scars (experimental study)

#### Резюме

Проведено экспериментальное исследование на 25-ти лабораторных крысах, которым после моделирования нормотрофических кожных рубцов выполняли процедуру лазерной дермабразии излучением углекислого лазера мощностью 50 Вт в суперимпульсном режиме с соотношением импульс – пауза 0,5:100 мс и диаметром пятна 0,5 мм. Проводили морфологическое, иммуногистохимическое морфометрическое исследование гистологических срезов кожи. Установлено, что однократное воздействие излучением CO<sub>2</sub> лазера в указанных режимах приводит к образованию в ранние сроки преимущественно коллагена III типа, а затем и коллагена I типа в соотношениях, приближающихся к показателям интактной кожи.

**Ключевые слова:** углекислый лазер, нормотрофический кожный рубец, коллаген I и III типа.

#### Summary

The experiment was carried out in 25 laboratory rats. After modeling of normotrophic cutaneous scars, the procedure of laser dermabrasion with 50 Watt carbon dioxide laser was performed in superpulse mode with impulse-pause ratio of 0,5:100 ms and 500 μm spot diameter. Morphological, immunohistochemical and morphometric examination of skin histological sections were performed. A single exposure to CO<sub>2</sub> laser radiation in this mode resulted in the early formation of mainly type III collagen and then type I collagen in ratios approaching to the intact skin.

**Keywords.** Carbon dioxide laser, normotrophic cutaneous scar, collagen type I and III

#### Введение

Среди многочисленных методов коррекции рубцовых изменений кожи большинством исследователей наиболее эффективными в настоящее время признаны способы местного воздействия на рубцовую ткань [1, 2, 3]. Механическая дермабразия, глубокие и срединные химические пилинги, вызывающие эпидермолиз и последующее ремоделирование дермы, до сих пор остаются «золотым стандартом» среди широкого арсенала методов локальной коррекции рубцовых изменений кожи. В то же время среди врачей и пациентов все большую популярность приобретают способы абляционной лазерной коррекции рубцов, выполняемые как в виде лазерной дермабразии, так и фракционного фототермолиза. Это связано с особенностью действия CO<sub>2</sub> лазера в режиме абляции: лазерное излучение дальнего инфракрасного диапазона интенсивно поглощается молекулами ткане-

вой воды, что приводит к очень быстрому разогреву ткани и взрывному испарению воды вместе с фрагментами тканевых структур с образованием абляционного кратера. Вместе с перегретым материалом из ткани удаляется и большая часть тепловой энергии, что гарантирует минимальное термическое повреждение вне зоны абляции [4].

Общим свойством заживления ран кожи под воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения, как было показано в наших работах ранее [5], является укороченная и слабо выраженная экссудативная фаза воспалительной реакции, гиперплазия и усиленная дегрануляция тучных клеток, активная пролиферация макрофагов и фибробластов, ускоренное развитие полноценной грануляционной ткани и ранняя реэпителизация.

Качество внеклеточного матрикса кожи, представленного в основном коллагеновыми волокнами играет важную

роль в эстетическом виде рубцовой ткани. В то же время в современной литературе встречаются лишь единичные публикации, где представлены исследования соотношения I и III типов коллагена в возрастной коже после фракционного фототермолиза [6].

**Целью** данного исследования явилось изучение динамики процессов ремоделирования нормотрофических кожных рубцов после процедуры лазерной дермабразии в эксперименте.

## Материалы и методы

Эксперимент проведен на 20 беспородных лабораторных крысах обоего пола, разделенных на 4 группы по срокам исследования, по 5 особей в каждой группе. Все манипуляции на животных выполнялись в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964г (с изменениями и дополнениями на 2008г) и приказа № 755 МЗ СССР «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием лабораторных животных» от 12.08.1977. На первом этапе эксперимента крысам моделировали кожный рубец. Для этого животным под общим обезболиванием препаратом «Золетил» (VirbacSanteAnimale, Франция) в паравертебральных областях спины симметрично иссекали кожные лоскуты размерами 3х3 см. Края полученной раны фиксировали к мышцам одиночными узловыми швами. Полное рубцевание кожных дефектов происходило в течение месяца. Затем этим же животным под общим обезболиванием по описанной выше методике выполняли процедуру лазерной дермабразии рубцовой ткани. При этом рубцы в правой паравертебральной области были опытными, а левые – служили контролем. В качестве интактного контроля были взяты кусочки кожи из паравертебральных областей спины пяти крыс, не подвергавшихся никаким воздействиям.

Использовали лазер на углекислом газе с длиной волны 10,6 мкм (лазерный аппарат «Ланцет-2», г.Тула, Россия), в суперимпульсном режиме «Медимпульс» с соотношением импульс – пауза 0,5:100 мс, мощностью импульса 50 Вт и диаметром пятна 0,5 мм. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 7-е, 14-е и 45 сутки (по 5 особей на каждый срок исследования). Кусочки кожи фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили по спиртам возрастающей плотности и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином для обзорной микроскопии, пикрофуксином по методу Ван – Гизон для выявления коллагеновых волокон. Иммуногистохимическими методами выявляли коллаген □ и □□□ типа с использованием антител Biorbyt antirat (США) и системы иммунопероксидазного метода.

Гистологические препараты изучали на микроскопе LEICA DMRXA (Германия). С помощью цифровой видеокамеры LEICA DFC 290 (Германия), сопряженной с ПК получали изображения микропрепаратов в формате графических файлов \*.TIFF в цветовом пространстве RGB, которые служили объектами морфометрических исследований. Для морфометрических исследований использовали программу анализа изображений ImageScore M (Германия). Статисти-

ческая обработка цифровых данных производилась методом вариационной статистики с определением среднего квадратичного отклонения ( $\sigma$ ), средней ошибки сравниваемых величин ( $m_1$ ,  $m_2$ ), коэффициента достоверности ( $t$ ) и доверительной вероятности ( $P$ ) с помощью программы Excel 8.0 из пакета Microsoft Office'2000. Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В препаратах кожи контрольной стороны у всех животных определялись зрелые эпителизированные нормотрофические рубцы. Эпидермис был покрыт тонким роговым слоем и имел хорошо видимое разделение по слоям. В нескольких полях зрения сосочки дермы были сглажены, практически отсутствовали (рис. 1, А - рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.). В поверхностных, средних и глубоких слоях дермы на этом уровне внеклеточный матрикс был представлен коллагеновыми волокнами, ориентированными преимущественно параллельно поверхности кожи и имеющими интенсивное красно - малиновое окрашивание пикрофуксином по Ван – Гизон (рис 1, Б). В клеточном составе преобладали зрелые формы фибробластов. Встречались небольшие очажки круглоклеточной инфильтрации и единичные макрофаги. Сосуды всех слоев кожи полнокровны, выстланы эндотелием. Встречались немногочисленные производные кожи, представленные волосными фолликулами и сальными железами.

В опытной группе через 1 сутки после лазерной дермабразии на участке, занимающем несколько полей зрения, определялся локальный очаг некроза эпидермиса и сосочкового слоя дермы, отграниченный от интактных тканей узким валом из нейтрофильных лейкоцитов (рис.2, А). В средних и глубоких слоях дермы выявлялось паретическое венозное и капиллярное полнокровие, умеренный отек межклеточной ткани и некоторое набухание коллагеновых волокон (рис. 2, Б).

Через 7 суток после лазерной дермабразии происходила полная эпителизация ожоговой поверхности. При этом толщина эпидермиса была больше, чем в контралатеральном рубце за счет увеличения объемов клеток эпидермиса во всех его слоях (рис. 3, В, Г).

В поверхностных слоях дермы определялось паретическое венозное и капиллярное полнокровие и очаговая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (рис. 3, А). Коллагеновые волокна в субэпидермальном слое дермы были тонкими, интенсивно окрашенными пикрофуксином в малиновый цвет, дисконкомплексованными, извитыми, ориентированными преимущественно поверхности кожи. На этом сроке в кожном рубце опытной группы преобладали коллагеновые волокна III типа (рис. 3, Б). Тонкие тяжи этих волокон располагались вертикально, проникая между клетками базального слоя эпидермиса и вплетаясь в базальную мембрану. Коллагеновые волокна I типа локализовались преимущественно в средних слоях дермы, вокруг волосных фолликулов и сальных желез.

В сетчатом слое дермы так же преобладали коллагеновые волокна III типа. Они были расположены преимуще-

**Таблица 1. Процентное соотношение коллагена и типа в кожных рубцах после однократной процедуры лазерной дермабразии в сравнении с контрольными значениями и показателями интактной кожи (M±m).**

Возраст исследования	В 1 тип (%)		В 3 тип (%)	
	ЭГТ	контроль	ЭГТ	контроль
сутки	.75±2,68*	.20±1,76*	.87±2,05*	.22±3,07#
сутки	.04±1,97*	.47±2,61	.54±1,66	.17±2,53#
сутки	.10±2,44	.60±1,64*	.26±1,97	.63±2,29#
интактная кожа	.56±2,68		.55±3,60	

Примечание: \* - значение показателя достоверно меньше, чем в интактной коже (P<0,05);  
# значение показателя достоверно больше, чем в интактной коже (P<0,05).

шественно параллельно поверхности кожи, переплетались между собой и с коллагеновыми волокнами I типа, образуя своеобразный сетчатый рисунок.

Через 14 суток после процедуры лазерной шлифовки рубца в коже опытной стороны определялся зрелый эпителизованный рубец. Эпидермис во всех полях зрения был покрыт тонким роговым слоем и имел отчетливую стратификацию. Толщина эпидермиса опытной стороны визуальнo была больше контрольной.

В сосочковом и сетчатом слоях дермы были видны полнокровные сосуды всех калибров, резко снизилось количество клеток нейтрофильно-лимфоцитарного ряда. В клеточном составе преобладали юные формы фибробластов, в небольшом количестве встречались макрофаги (рис. 4, А).

Коллагеновые волокна в каждом рубце опытной группы на этом сроке были упакованы более компактно по сравнению с 7-ми сутками исследования, толщина отдельных волокон увеличивалась. По-прежнему преобладали коллагеновые волокна III типа, но отмечалось и увеличение количества волокон I типа (рис. 4, Б, В, Г).

Через 45 суток в опытной группе во всех случаях выявлялся зрелый эпителизованный рубец. В клеточном составе преобладали зрелые веретеновидные фибробласты, количество сосудов по сравнению с предыдущим сроком исследования несколько уменьшалось. Коллагеновые волокна были сложены в компактные извитые пучки, ориентированные преимущественно параллельно поверхности кожи. В ячейках «сети» коллагеновых волокон ретикулярного слоя дермы лежали капилляры, клеточные элементы и производные кожи – волосяные фолликулы и сальные железы. Коллагеновые волокна I и III типа и сосочковом и сетчатом слоях дермы на этом сроке выявлялись примерно в одинаковом количестве.

Морфометрическое исследование показало, что в интактной коже крыс преобладал коллаген I типа (табл.1). В нормотрофических кожных рубцах контрольной группы на всех сроках исследования преобладал коллаген III типа. После выполнения процедуры лазерной дермабразии мы наблюдали кратковременное превалирование коллагена III типа по отношению к коллагену I типа на сроке 7 суток, с последующим увеличением содержания в рубце коллагена I типа к 14 суткам после лазерного воздействия. На сроке 45 суток количество коллагена I и III типов было приблизительно одинаковым (табл.1).

Таким образом, однократное абляционное воздействие излучения углекислого лазера на кожный рубец приводило к формированию лазерного ожога, а индуцированные им

процессы воспалительно-репаративной реакции вызывали в ранние сроки активацию реакции микроциркуляторного русла, заключающуюся в картине выраженного венозного и капиллярного полнокровия, сохраняющегося вплоть до 7-х суток опыта. Ряд авторов считает, что дефицит капилляров в рубцовой ткани зачастую приводит к формированию гипертрофических и келоидных рубцов [7, 8]. Кроме того, раннее появление макрофагов в лазерных ранах способствует синхронному росту капилляров и фибробластов и дифференцировке фибробластов за счет выделения ряда цитокинов [9]. Этот процесс мы наблюдали в опытных рубцах, где, в отличие от контроля, увеличивалось содержание коллагена I типа, хотя и не достигало значений, присущих интактной коже, тогда как в контрольных рубцах на сроке всех сроков исследования преобладал коллаген III типа.

### Заключение

В заключение можно отметить, что особенностью аблятивного воздействия на нормотрофические кожные рубцы высокоинтенсивного лазерного излучения дальнего инфракрасного диапазона, генерируемого СО2лазером, является запуск процессов репарации лазерного ожога, сопровождающийся полноценным фибриллогенезом с образованием в ранние сроки преимущественно коллагена III типа, а затем и коллагена I типа в соотношениях, приближающихся к показателям интактной кожи.

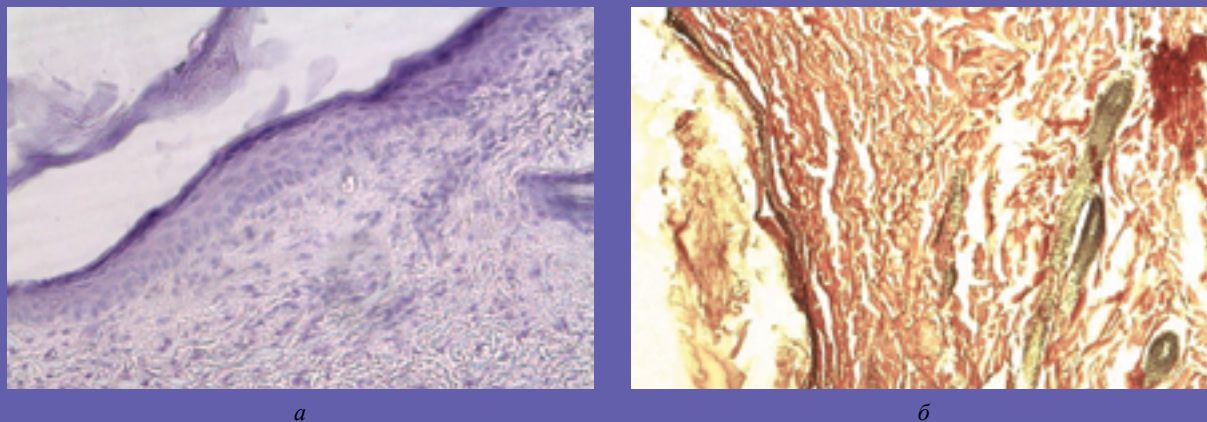
*Астахова М.И.* младший научный сотрудник клинического отдела ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; *Астахова Л.В.* к.м.н., руководитель отдела поисковых исследований ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; *Гиниятуллин Р.У.* д.м.н., профессор, зам. директора по научно работе ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; *Головнева Е.С.* д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Челябинск; *Игнатьева Е.Н.* к.б.н., старший научный сотрудник физического отдела ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; *Кудрина М.Г.* научный сотрудник клинического отдела ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку: Астахова Мария Ильинична, [astaria87@mail.ru](mailto:astaria87@mail.ru), +7(351)7412368, 454026, г. Челябинск, пр. Победы, 287

**Литература:**

1. Карапетян Г.Э. Лечение гипертрофических и келоидных рубцов// Г.Э. Карапетян, Р.А. Пахомова, Л.В. Кочетова, Н.С. Соловьева, Ю.А. Назарьянц, Е.С. Василена, Н.М. Маркелова, М.Н. Кузнецов, В.А. Арапова, Г.Н. Гуликян//Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3-1. – С. 70-73.
2. Кожевников В.А. Пирогеналотерапия в комплексном лечении келоидных рубцов лазером/ В.А. Кожевников, А.А. Осипов, Ю.В. Тен// Хирургия. – 1991. – № 8. – С. 151–152.
3. Шафранов В.В. Возможности использования СВЧ-криодеструкции в дерматокосметологии для лечения келоидных рубцов у детей / В.В. Шафранов, Н.Г. Короткий, А.В. Таганов и др.//Детская хирургия. – 2000. – № 1. – С. 35–37.
4. Скобелкин О.К. Применение лазерных хирургических аппаратов «Ланцет» в медицинской практике: пособие для врачей / О.К. Скобелкин, В.И. Козлов, А.В. Гейниц.- Москва.- 2000-128 С.
5. Астахова Л.В. Влияние высокоэнергетического лазерного излучения на динамику репаративных процессов в аутодермальном трансплантате после лазерной сварки/Л.В. Астахова, Р.У. Гиниятуллин, Е.Н.Игнатьева//Лазерные новости.- 2000.-Вып. 1.- С. 50-51.
6. Карабут М.М. Применение фракционного фототермолиза в клинической практике. Обзор литературы./М.М. Карабут, Н.Д. Гладкова, Ф.И. Фельштейн, Е.Б. Киселева, Ю.В. Фомина, А.А. Мураев//Современные технологии в медицине.- 2010.- №4.- С. - 115-121.
7. Борхунова Е.Н. Келоидные рубцы: морфологическая характеристика и особенности патогенеза/Е.Н. Борхунова, В.В. Шафранов, А.В. Таганов//Пластическая хирургия и косметология.-2011 (3).- С.500-512.
8. Kisher C.W. The microvessels in hypertrophic scar, keloids and related lesions: a review./J. SubmicroscCytolPathol. -1992; 24(2):281-296.
9. Головнева Е.С. Неоангиогенез как универсальный ответ тканей на высокоинтенсивное лазерное воздействие/Е.С. Головнева, Г.К.Попов//В сборнике: Лазерные технологии в медицине. Челябинск.- 2001.- С.- 108-112.

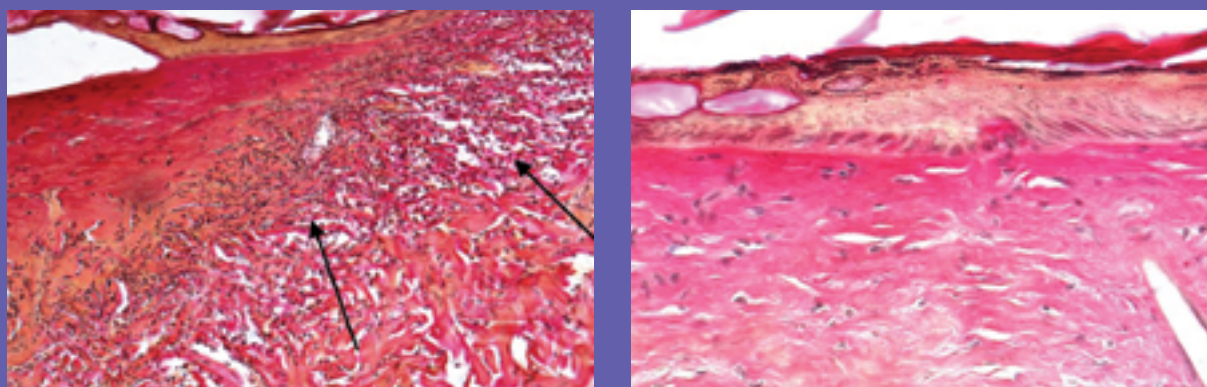
Астахова М.И., Астахова Л.В., Гиниятуллин Р.У., Головнева Е.С., Игнатьева Е.Н., Кудрина М.Г.

**Влияние высокоинтенсивного лазерного излучения дальнего инфракрасного диапазона на состав коллагенового матрикса нормотрофических кожных рубцов (экспериментальное исследование)**

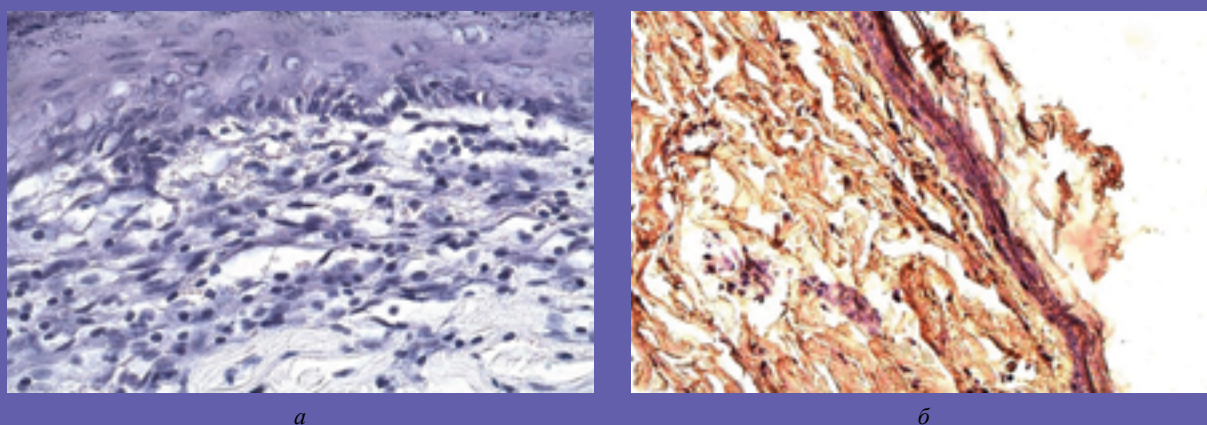


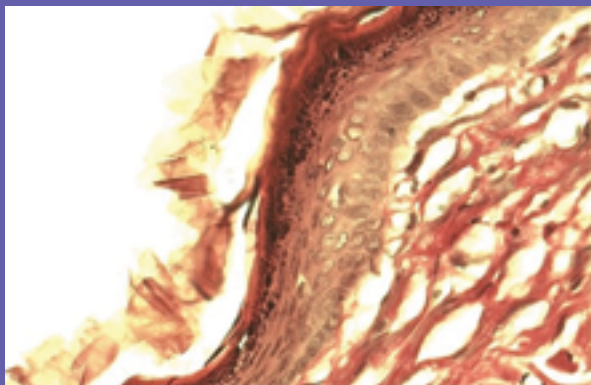
**Рисунок 1. Контрольный рубец.**

А – эпителизированный нормотрофический рубец; сглаженность сосочков дермы, в клеточном составе преобладают зрелые фибробласты. Окраска: гематоксилин-эозин, ув.х400; Б – коллагеновые волокна красно-малинового цвета сложены в компактные пучки, ориентированные параллельно поверхности кожи. Окраска: пикрофуксин по методу Ван-Гизон, ув.х50.

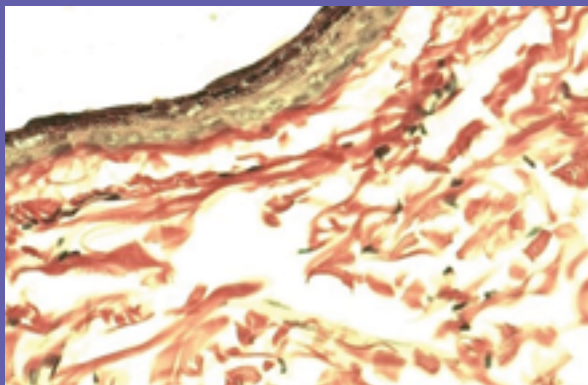


**Рисунок 2. Рисунок 1. Морфологические изменения в рубцовой ткани через 7 суток после лазерной дермabrasии. А – опытная группа: локальный очаг некроза эпидермиса и поверхностных слоев дермы с перифокальным нейтрофильным валом (стрелки), ув.х50; Б – опытная группа: набухание коллагеновых волокон в сосочковом слое дермы на границе с очагом некроза, ув.х400. Окраска – пикрофуксин по методу Ван-Гизон.**



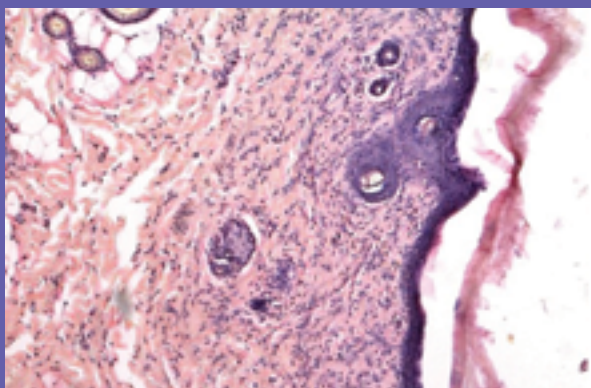


а

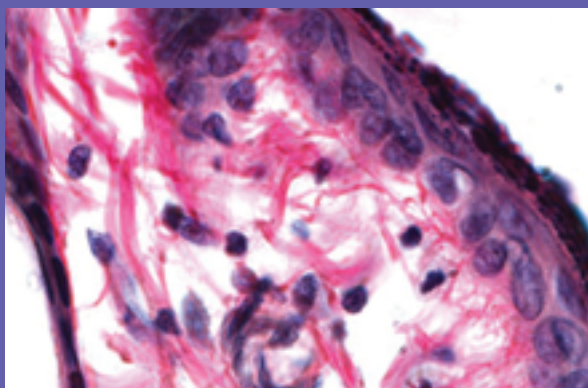


б

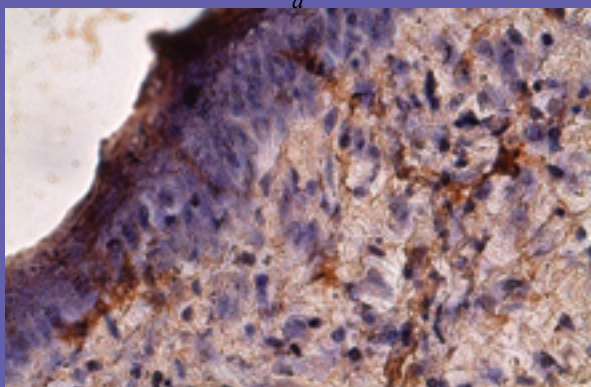
**Рисунок 3. Морфологические изменения в рубцовой ткани через 7 суток после лазерной дермабразии.**  
**А** – опытная группа: полная эпителизация ожоговой поверхности, очаги нейтрофильно-лимфоцитарной и макрофагальной инфильтрации в сосочковом слое дермы, здесь же – большое количество полнокровных капилляров (стрелки). Окраска: гематоксилин – эозин, увх400; **Б** – опытная группа: коллагеновые волокна III типа в сосочковом слое дермы, ИГХ – пероксидазный метод, увх200; **В** – опытная группа: коллагеновые волокна сосочкового слоя дермы складываются в пучки, ориентированные параллельно поверхности кожи. Пласт эпителия имеет большую толщину, чем на рис Г. Окраска пикрофуксином по методу Ван-Гизон, увх400; **Г** – контрольная группа: эпителизированный рубец с более тонкими коллагеновыми волокнами, чем на рис В. Окраска пикрофуксином по методу Ван-Гизон, увх400



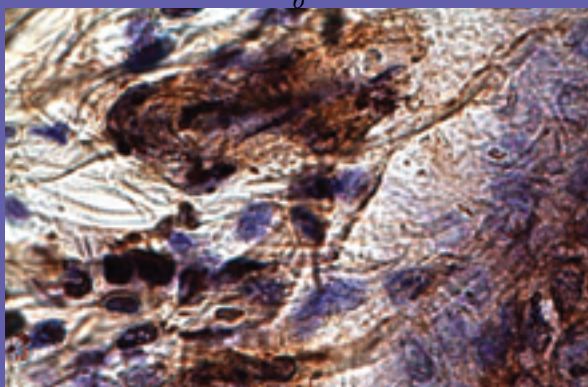
а



б

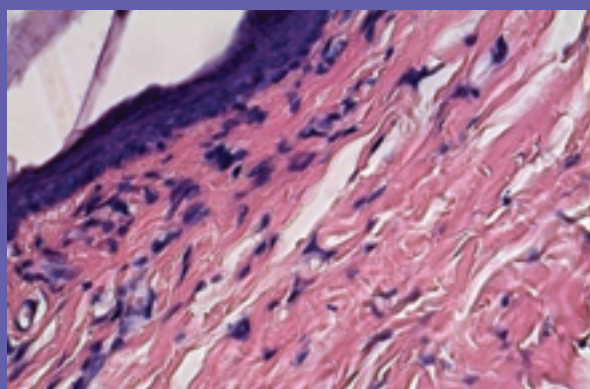


в

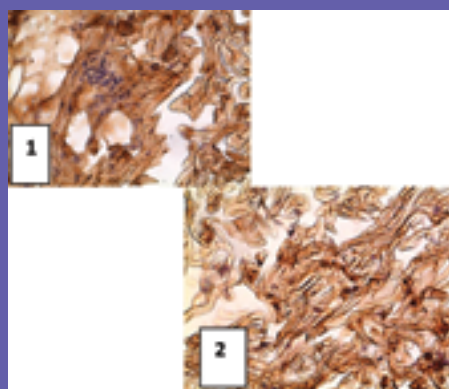


г

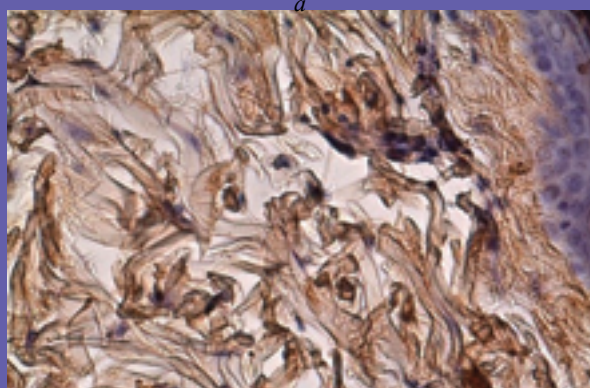
**Рисунок 4. Морфологические изменения в рубцовой ткани через 14 суток после лазерной дермабразии.**  
**А** – опытная группа: общий вид рубца. Окраска: гематоксилин-эозин, ув.х50; **Б** – тонкие коллагеновые волокна влетают в базальную мембрану. Окраска: пикрофуксин по методу Ван-Гизон, ув.х1000, МИ; **В** – коллагеновые волокна I типа в сосочковом слое дермы. Окраска ИГХ – пероксидазным методом, ув.х400; **Г** – фибробласты сосочкового слоя дермы вырабатывают коллагеновые волокна III типа. Окраска ИГХ – пероксидазным методом, ув.х400.



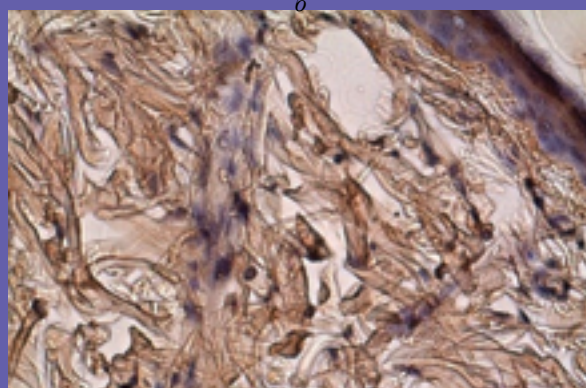
*a*



*б*



*в*



*г*

**Рисунок 5. Морфологические изменения в рубцовой ткани через 45 суток после лазерной дермабразии.**

**А – опытная группа: общий вид нормотрофического рубца. Окраска: гематоксилин-эозин, ув.х200;**

**Б – интактная кожа: 1 – коллагеновые волокна I типа, 2 – коллагеновые волокна III типа. Окраска ИГХ – пероксидазным методом, ув.х400;**

**В – опытная группа: коллагеновые волокна I типа в сосочковом слое дермы. Окраска ИГХ – пероксидазным методом, ув.х400;**

**Г – опытная группа: коллагеновые волокна III типа в сосочковом слое дермы. Окраска ИГХ – пероксидазным методом, ув.х400.**