

Влияние поверхностных пилингов производными салициловой кислоты на процессы пролиферации и дифференцировки в коже

Т.Н. Королькова¹, А.В. Балашова¹, Е.В. Зиновьев²

¹Кафедра косметологии (зав. — проф. Т.Н. Королькова) ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург; ²ГУЗ Ленинградская областная клиническая больница, поселок Токсово, Ленинградская область

Проведено исследование влияния пилингов β-липогидроксисалициловой кислотой (ЛГК) и салициловой кислотой (СК) на экспрессию клетками кожи тканевых маркеров пролиферации и дифференцировки. У 5 добровольцев, проходивших лечение в ожоговом стационаре по поводу рубцов кожи, сформировавшихся после перенесенных ожогов различных участков кожи, выполнили процедуры пилинга в заушных областях: с правой стороны препаратом ЛГК, с левой стороны препаратом СК. Затем у 2 пациентов через 1 нед, у 1 пациента через 10 сут и у 2 пациентов через 2 нед после выполнения пилингов взяли биоптаты. Контролем служили биоптаты интактной кожи заднебоковой поверхности шеи. Иммуногистохимическим методом изучали экспрессию маркеров — проапоптотического белка p53, антиапоптотического белка Bcl-2, маркера пролиферирующих клеток Ki-67 и коллагена 4-го типа. Пилинги ЛГК и СК отличаются по воздействию на эпидермис и дерму. Пилинг СК в большей степени способствует активации регенераторных процессов как в эпидермисе, так и в дерме, что может отражать его более выраженное действие на кожу.

Ключевые слова: пилинг; β-липогидроксисалициловая кислота; салициловая кислота; иммуногистохимия; пролиферация; апоптоз.

EFFECTS OF SURFACE PEELING BY SALICYLIC ACID DERIVATIVES ON PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION PROCESSES IN THE SKIN

T.N. Korolkova¹, A.V. Balashova¹, E.V. Zinovyev²

¹I.M.Metchnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia; ²Leningrad Regional Clinical Hospital, Toxovo, Leningrad Region, Russia

The effects of peeling by β-lipohydroxysalicylic acid (LHA) and salicylic acid (SA) on the expression of tissue markers of proliferation and differentiation in skin cells were studied. Peeling in the retro-auricular regions: on the right side by LHA, on the left by SA was carried out in 5 volunteers treated in burn wards for skin cicatrices formed after previous burns of various skin areas. Biopsy specimens were collected after 1 week in 2 patients, after 10 days in 1 patient, and after 2 weeks in 2 patients. Intact skin biopsy specimens from the retrolateral surface of the neck served as control. The expression of the following markers was studied by the immunohistochemical method: p53 proapoptotic protein, Bcl-2 antiapoptotic protein, Ki-67 proliferating cell marker, and collagen 4. Peeling by LHA and SA differed by their effects on the epidermis and derma. The SA peeling more intensely stimulated the regenerative processes in the epidermis and derma, which could reflect its more pronounced effect on the skin.

Key words: peeling; β-lipohydroxysalicylic acid; salicylic acid; immunohistochemistry; proliferation; apoptosis.

Наиболее безопасными принято считать поверхностные пилинги на основе α-гидроксикислот вследствие их малой травматичности и быстрого восстановления кожи [1]. В ответ на химический ожог кожи развивается воспалительная реакция, которая по биологической сущности является защитной реакцией организма. Одним из последствий воспаления является удаление нежизнеспособных тканей и восстановление поврежденных клеток. Особенности воспалительной реакции кожи определяются характером повреждающего агента [2, 3]. В отличие от пилингов на основе α-гидроксикислот у пилингов, содержащих β-гидроксикислоты, не установлено стимулирующее действие на синтез коллагена, воз-

можно, это объясняется отсутствием воспалительной реакции как главного инициатора синтеза коллагена [4].

Салициловая (2-гидроксибензойная) кислота — СК [C₆H₄(OH)COOH] представляет соединение из класса β-гидроксикислот, кристаллическое вещество, слаборастворимое в воде, хорошо растворимое в этаноле и эфире (подобно фенолу и резорцину). Благодаря фенольной группе СК действует как кератолитик, т. е. денатурирует белки, что облегчает α-гидроксикислотам и другим активным компонентам прохождение через роговой слой [5]. К достоинствам СК можно отнести безопасность применения у пациентов с любым фототипом [6]; легкую и равномерную пенетрацию в кожу и наличие свое-

Сведения об авторах:

Королькова Татьяна Николаевна — доктор мед. наук, профессор (tnkor@mail.ru); Балашова Анна Викторовна — кандидат мед. наук (anna191177@list.ru); Зиновьев Евгений Владимирович — доктор мед. наук, профессор (evz@list.ru).

Характеристика использованных моноклональных антител

Таблица 1

Антитело	Производитель	Мишень
Anti-p53	"Bio Genex", США	Белок p53, маркер апоптоза
Anti-Bcl-2	"Bio Genex", США	Белок Bcl-2, антиапоптотический фактор
Anti-Ki-67	"Bio Genex", США	Антиген активно пролиферирующих клеток
Anti-collagen IV	"Biocare Medical", США	Основной коллаген базальных мембран

образного индикатора равномерности нанесения раствора — появление после его высыхания белого налета на поверхности кожи, представляющего собой кристаллы СК [7]. Получены хорошие результаты при ее использовании для лечения акне, хлоазм, гиперпигментаций, коррекции грубого микрорельефа и фотоповреждений кожи [8]. С.Н. Ахтямов [4] считает, что 10—30% растворы СК можно использовать для выполнения поверхностных пилингов, приводящих к эксфолиации рогового слоя эпидермиса. Недостатком пилинга СК является ограниченная глубина воздействия.

Поскольку липофильные свойства СК весьма слабые, ее проникновение в толщу эпидермиса ограничено, в связи с чем ведется поиск новых форм этого препарата, обладающих улучшенной проникающей способностью.

С8-β-липогидроксикислота — ЛГК (2-гидрокси-5-октаноилбензойная кислота) является липидным производным СК и отличается липофильностью и довольно большой молекулярной массой (дополнительная С8-жирно-кислотная цепь). Она относительно медленно проникает в кожу, аккумулируясь в липидной прослойке рогового слоя и "разрыхляя" ее, с чем связано ее выраженное отшелушивающее действие. Дополнительно ЛГК обладает антимикробным, фунгицидным, противовоспалительным и антикомедонным свойством, что в совокупности делает данное вещество эффективным компонентом пилингов и препаратов для лечения акне [5, 9].

Материалы и методы

Для изучения влияния химических пилингов на эпидермис и дерму были подобраны 5 добровольцев, подписавших индивидуальное согласие на проведение исследования. Все добровольцы получали лечение в ожоговом стационаре по поводу рубцов

кожи, сформировавшихся после перенесенных ожогов. Нанесение пилинга ЛГК проводили в правой, а СК — в левой заушных областях. Затем у 2 пациентов через 1 нед, у 1 — через 10 сут и у 2 — через 2 нед после выполнения пилингов взяли биоптаты кожи. Контролем служили биоптаты кожи заднебоковой поверхности шеи, на которую химические пилинги не наносили.

Для изучения реакции кожи на химический пилинг выполнено иммуногистохимическое исследование.

1-й этап. Фиксация кожи и приготовление срезов. Биоптаты кожи вымачивали в салфетке, пропитанной 0,9% раствором хлорида натрия (NaCl), затем монтировали на блоки и замораживали в холодильнике при температуре -40°C. Изготавливали

криостатные срезы толщиной 5 мкм так, чтобы плоскость сечения проходила вертикально, монтировали на предметные стекла, высушивали на воздухе, затем фиксировали в течение 5 мин в 96% этаноле. При необходимости срезы хранили при температуре -20°C.

2-й этап. Иммуногистохимическое исследование. Определение экспрессии клеточных маркеров проводили методом непрямой иммуногистохимии. Характеристика моноклональных антител к исследуемым маркерам показана в табл. 1. Срезы отмывали в 0,9% NaCl в течение 15 мин. Гасили неспецифическую активность тканевых пероксидаз 3% раствором перекиси водорода, затем с целью устранения возможного неспецифического окрашивания срезы инкубировали с универсальным блокирующим реагентом Power Block ("Bio Genex", США), представляющим забуференный раствор казеина, в разведении 1:10. Затем, не промывая, срезы инкубировали с моноклональными мышиными антителами к исследуемым маркерам. Контрольные срезы инкубировали без добавления первых антител. После первой инкубации проводили отмывки в буфере 10 мин. Затем срезы инкубировали с реактивом Super Enhancer ("Bio Genex", США) (вторые антимишнные биотинилированные антитела) в течение 30 мин, потом — с реактивом Polymer-HRP ("Bio Genex", США) (конъюгат с пероксидазой) 30 мин, после чего следовала трехкратная промывка. Далее проводили окрашивание срезов раствором диаминобензидина из набора ("Bio Genex", США), разведение препарата осуществляли по инструкции производителя. Окрашивали 5—15 мин, затем промывали дистиллированной водой, ядра докрашивали гематоксилином Carrazzi. Положительную экспрессию маркеров отмечали по появлению коричневой окраски на фоне неспецифической голубой окраски ядер.

Гистологические препараты фотографировали с увеличением 640, при этом увеличение светового микроскопа составляло 40, а увеличение фотокамеры — 16. По отдельности производили съемку эпидермиса и дермы. Обзорные фотографии препаратов производили при увеличении 160.

Затем фотографии обрабатывали с помощью программы Морфология 5.0, где выделяли области скопления белка — им-

Изменение оптической плотности экспрессируемых иммуногистохимических маркеров в эпидермисе до и после химических пилингов

Таблица 2

Показатель	Интактная кожа	После пилинга			
		β-липогидроксикислотой		30% салициловой кислотой	
		через 1 нед	через 2 нед	через 1 нед	через 2 нед
p53	0,392 ± 0,005	0,326 ± 0,004*	0,402 ± 0,004	0,43 ± 0,006*	0,687 ± 0,011*
Bcl-2	0,346 ± 0,004	0,286 ± 0,005*	0,524 ± 0,008*	0,412 ± 0,007*	0,473 ± 0,005*
Ki-67	0,481 ± 0,013	0,481 ± 0,012	0,542 ± 0,03	0,585 ± 0,005*	0,589 ± 0,008*
Коллаген 4-го типа	0,866 ± 0,013	0,611 ± 0,012*	0,679 ± 0,017*	0,477 ± 0,005*	0,457 ± 0,011*

Примечание. Здесь и в табл. 3: * — $p < 0,05$ — статистически значимые различия показателей относительно показателей интактной кожи.

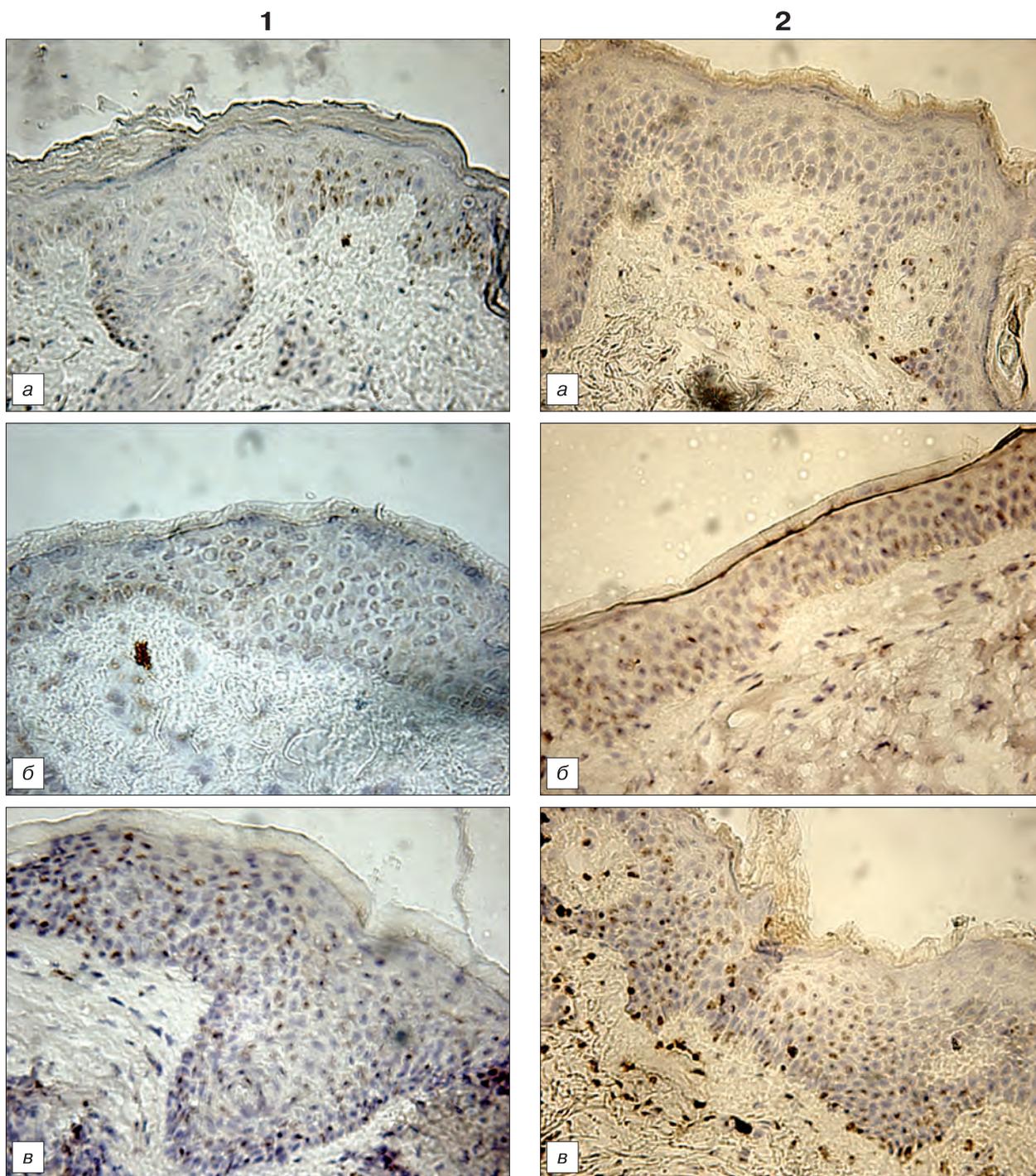


Рис. 1. Иммуногистохимическая картина экспрессии маркера p53 в эпидермисе: интактная кожа (а), после пилинга ЛГК (1) и СК (2) через 1 нед (б) и через 2 нед (в). Окраска гематоксилином. Ув. 640.

Таблица 3

Изменение оптической плотности экспрессируемых иммуногистохимических маркеров в дерме до и после химических пилингов

Показатель	Интактная кожа	После пилинга			
		β-липогидроксикислотой		30% салициловой кислотой	
		через 1 нед	через 2 нед	через 1 нед	через 2 нед
p53	0,695 ± 0,01	0,409 ± 0,004*	0,478 ± 0,005*	0,487 ± 0,003*	0,663 ± 0,009
Bcl-2	0,639 ± 0,013	0,345 ± 0,004*	0,68 ± 0,005*	0,42 ± 0,004*	0,515 ± 0,002*
Ki-67	0,59 ± 1,017	0,487 ± 0,009*	0,59 ± 0,016	0,689 ± 0,005*	0,63 ± 0,012
Коллаген 4-го типа	0,957 ± 0,021	0,502 ± 0,007*	0,468 ± 0,006*	0,44 ± 0,009*	0,432 ± 0,006*

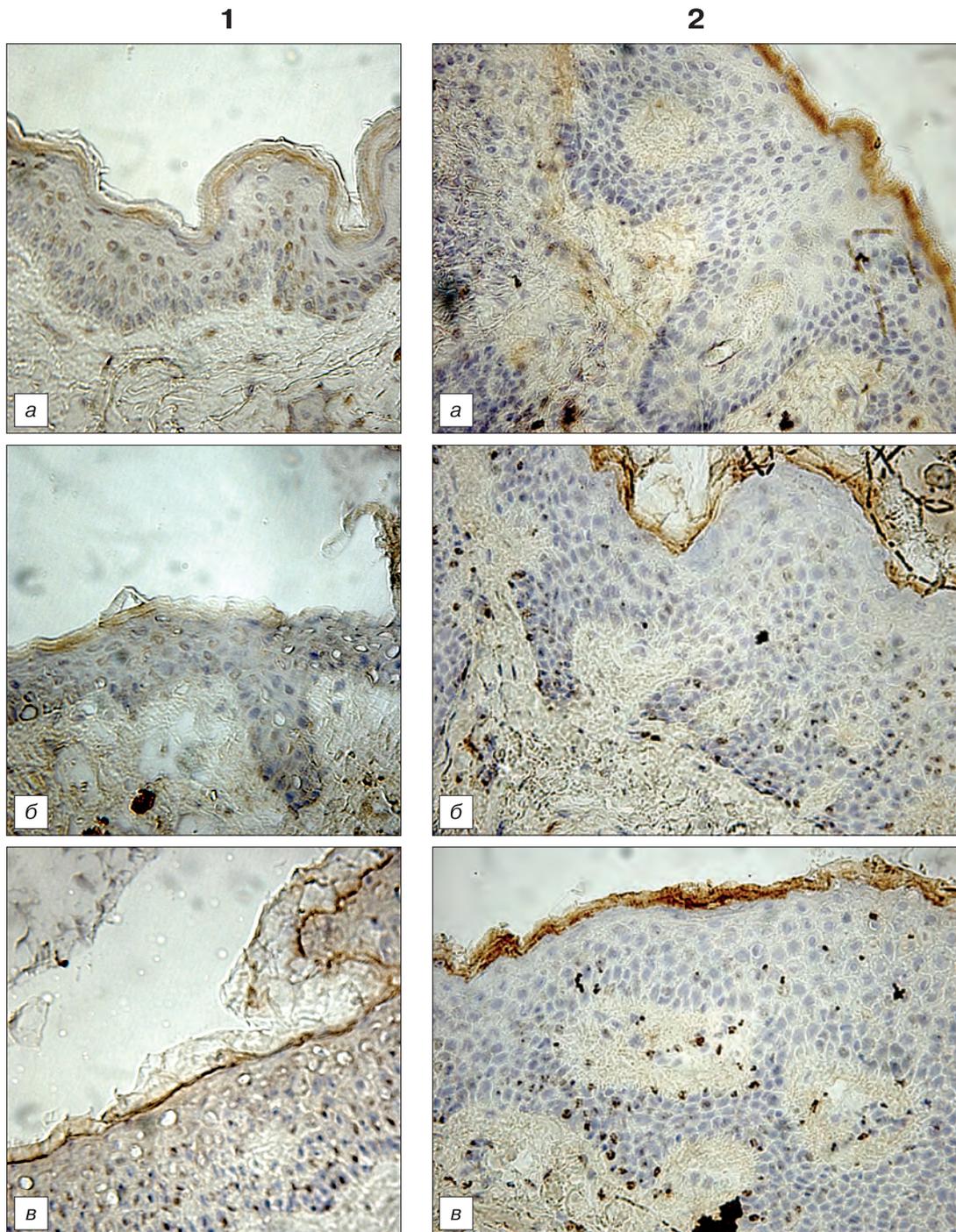


Рис. 2. Иммуногистохимическая картина экспрессии маркера Vcl-2 в эпидермисе: intactная кожа (а), после пилинга ЛЖК (1) и СК (2) через 1 нед (б) и через 2 нед (в). Окраска гематоксилином. Ув. 640.

муногистохимического маркера и подсчитывали их оптическую плотность. Для каждого маркера использовали от 3 до 5 срезов кожи, в которых изучали и подсчитывали от 3 до 5 полей зрения. В каждом поле зрения находилось около 30—60 специфически окрашенных объектов. Таким образом, для получения среднего значения оптической плотности специфической окраски каждого маркера использовали выборки из 270—1500 значений каждого показателя. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6,0.

Результаты и обсуждение

Результаты измерений показателей оптической плотности экспрессируемых белков — иммуногистохимических маркеров в эпидермисе 4 пациентов представлены

в табл. 2. Данные о пациенте, у которого исследование проведено через 10 сут после пилинга, в таблицу не включали. Как видно из табл. 2, в эпидермисе под воздействием пилинга ЛЖК через 1 нед происходило снижение оптической плотности маркера p53 на 17% ($p < 0,05$) и ее полное восстановление через 2 нед после процедуры, в то время как пилинг СК приводил к возрастанию этого показателя на 10% через 1 нед ($p < 0,05$) и на 78% через 2 нед ($p < 0,05$). При пилинге ЛЖК происходило также снижение оптической плотности маркера Vcl-2 на 17% через 1 нед ($p < 0,05$) и ее повышение на 51% через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры, в то время как пилинг СК приводил к возрастанию этого показате-

ля на 19% через 1 нед ($p < 0,05$) и на 36% через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры.

Оптическая плотность маркера Ki-67 через 1 нед после процедуры пилинга ЛГК ($p > 0,05$) соответствовала показателю интактной кожи, а через 2 нед после пилинга отмечалось ее повышение на 13% ($p > 0,05$). Пилинг СК приводил к возрастанию этого показателя на 22% через 1 нед ($p < 0,05$), который сохранялся и через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры. Уровень экспрессии маркера Ki-67 через 10 дней после пилинга ЛГК снижается, а после пилинга СК повышается на короткий период времени.

Показатель оптической плотности маркера коллагена 4-го типа, расположенного в базальной мембране, через 1 нед после пилинга ЛГК снизился на 29% ($p < 0,05$), а затем отмечалось его медленное повышение на 7% через 2 нед после процедуры ($p < 0,05$), в то время как пилинг СК приводил к более выраженному снижению этого показателя на 45% через 1 нед ($p < 0,05$), через 2 нед после процедуры данный показатель практически сохранялся на этом уровне ($p < 0,05$).

Результаты измерений показателей оптической плотности экспрессируемых белков — иммуногистохимических маркеров в дерме представлены в **табл. 3**. В дерме под воздействием пилинга ЛГК происходило снижение оптической плотности маркера p53 на 41% ($p < 0,05$) через 1 нед и ее повышение на 10% ($p < 0,05$) через 2 нед после процедуры. Пилинг СК приводил к снижению этого показателя на 30% через 1 нед ($p < 0,05$) с последующим повышением его на 15% через 2 нед ($p > 0,05$) после процедуры. Под воздействием пилинга ЛГК в дерме происходило также снижение оптической плотности маркера Vcl-2 на 46% ($p < 0,05$) через 1 нед и ее повышение на 52% через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры. Пилинг СК также приводил к снижению этого показателя на 44% через 1 нед ($p < 0,05$), через 2 нед экспрессия этого маркера стала возрастать, но не достигла исходных значений (на 19% меньше исходного; $p < 0,05$). Оптическая плотность маркера Ki-67 снижалась под воздействием пилинга ЛГК на 17% через 1 нед ($p < 0,05$) и восстанавливалась до исходных значений через 2 нед после процедуры. Пилинг СК приводил к возрастанию этого показателя на 17% через 1 нед ($p < 0,05$) с последующим снижением на 7% через 2 нед ($p > 0,05$) после процедуры.

Под воздействием пилинга с ЛГК (см. **табл. 3**) оптическая плотность маркера коллагена 4-го типа, расположенного в базальных мембранах придатков кожи, через 1 нед снижалась на 48% ($p < 0,05$) и на 51% через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры. При пилинге СК данный показатель снижался на 54% через 1 нед ($p < 0,05$) и практически сохранялся на прежнем уровне через 2 нед ($p < 0,05$) после процедуры.

Сравнивая результаты воздействия каждого пилинга на эпидермис (см. **табл. 2**) и дерму (см. **табл. 3**), можно отметить, что при воздействии пилинга ЛГК на эпидермис отмечается снижение экспрессии маркеров p53 и Vcl-2 через 1 нед и ее восстановление через 2 нед после процедуры, причем показатель Vcl-2 возрастает в большей степени. В дерме обнаруживается сходная тенденция, но с меньшей выраженностью степени экспрессии. Полученные результаты могут свидетельствовать о повреждающем действии ЛГК после процедуры, с последующим началом восстановительных процессов. Повышающаяся экспрессия маркера p53 может свидетельствовать о степени выбраковки поврежденных клеток, а опережающий экспрессию p53 рост маркера Vcl-2 обеспечивает выживание активно пролиферирующих клеток. Более активная динамика исследу-

емых показателей наблюдалась в эпидермисе. На рис. 1 и 2 представлена иммуногистохимическая картина биоптатов кожи, демонстрирующая динамику экспрессии маркеров p53 и Vcl-2 в эпидермисе и дерме.

Таким образом, пилинги ЛГК и СК отличаются по своему воздействию на эпидермис и дерму. Пилинг СК в большей степени способствует активации регенераторных процессов как в эпидермисе, так и в дерме, что может отражать его более выраженное действие на кожу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахтямов С.Н., Бутов Ю.С. Практическая дерматокосметология: Учебное пособие. М.: Медицина; 2003: 194—204.
2. Черноух А.М., Фролов Е.П., ред. Кожа. Строение, функция, общая патология и терапия. М.: Медицина; 1982.
3. Королькова Т.Н. Патогенез местных изменений при химических пилингах. Сборник статей НПО врачей косметологов. Вып. 9. СПб.; 2008: 29—37.
4. Ахтямов С.Н. Салициловая кислота. В кн.: Ахтямов С.Н., ред. Эстетическая медицина: Химический пилинг. Справочное руководство. М.: New Line Cosmetology; 2005: 142—4.
5. Эрнандес Е.И., Пономарев И.В., Ключарева С.В. Современные пилинги: химический пилинг, лазерная шлифовка, механическая дермабразия, плазменная шлифовка. М.: Косметика и медицина; 2011.
6. Grimes P.E. The safety and efficacy of Salicylic acid chemical peels in darker racial ethnic groups. *Dermatol. Surg.* 1999; 25(1): 18—22.
7. Rubin M.G., Dover J.S., Alam M., eds. Chemical Peels. Elsevier Saunders; 2006.
8. Kliqman D., Kliqman A.M. Salicylic acid peels for treatment of photoaging. *J. Dermatol. Surg.* 1998; 24(3): 325—8.
9. Курбасова Е., Лащинина Е. Мир гидроксикислот. *Les Nouvelles Esthetiques.* 2010; 1: 26—35.

Поступила 19.04.13

REFERENCES

1. Akhtyamov S.N., Butov Yu.S. Practical dermatocosmetology: textbook (Prakticheskaya dermatokosmetologiya. Moskva: Meditsine; 2003: 194—204. (in Russian)
2. Chernoukh A.M., Frolov E. P., eds. Skin. Structure, function, general pathology and therapy (Kozha. Stroenie, funkciya, obshhaya patologiya i terapiya). Moskva: Meditsine; 1982. (in Russian)
3. Korolkova T.N. Pathogenesis of local changes in chemical peeling. Collection of articles NGO doctors of cosmetology (Patogenez mestnykh izmeneniy pri khimicheskikh pilingah. Sbornik statey SPA vrachey kosmetologov). Iss. 9. St.Petersburg; 2008: 29—37. (in Russian)
4. Akhtyamov S.N. Salicylic acid. In: Akhtyamov S.N., ed. Aesthetic medicine: Chemical peeling. Reference manual. (Salicilovaya kislota. In: Ahtyamov S.N., red. Esteticheskaya meditsina: Khimicheskii piling. Spravochnoe rukovodstvo). Moskva: New Line Cosmetology; 2005: 142—4. (in Russian)
5. Ernandez E.I., Ponomarev I.V., Klyuchareva S.V. Modern peelings: chemical peeling, laser polishing, mechanical dermabrasion, plasma polishing (Sovremennyye pilingi: khimicheskii piling, lazer-naya shlifovka, mekhanicheskaya dermabraziya, plazmennaya shlifovka). Moskva: Cosmetics and meditsine; 2011. (in Russian)
6. Grimes P.E. The safety and efficacy of Salicylic acid chemical peels in darker racial ethnic groups. *Dermatol. Surg.* 1999; 25(1): 18—22.
7. Rubin M.G., Dover J.S., Alam M., eds. Chemical Peels. Elsevier Saunders; 2006.
8. Kliqman D., Kliqman A.M. Salicylic acid peels for treatment of photoaging. *J. Dermatol. Surg.* 1998; 24(3): 325—8.
9. Kurbasova E., Lashhinina E. World hydroxyacids (Mir gidroksikislot). *Les Nouvelles Esthetiques.* 2010; 1: 26—35. (in Russian)