

Сфокусированное монополярное радиочастотное воздействие, вызывающее апоптоз: исследование на примере модели свиньи

Дэвид МакДэниэль^a, Клаус Фритц^{b,c}, Алена Маховцова^{d,e} и Ян Бернарди^f

^aИнститут антивозрастной медицины МакДэниэля, Вирджиния-Бич, Вирджиния

^bЦентр дерматологии и лазерной косметологии, Ландау, Германия

^cУниверситет Оснабрюка — Департамент здравоохранения

^dУниверситетская больница Мотол, Департамент дерматологии и венерологии, Прага, Чешская Республика

^eДепартамент профессиональной медицины, 1-й медицинский факультет Карлова университета, Прага, Чешская Республика

^fНаучно-исследовательский институт ветеринарной медицины, Брно, Чешская Республика

АННОТАЦИЯ

Предпосылки: целью данного исследования была демонстрация воздействия монополярного, сфокусированного радиочастотного (RF) аппарата со встроенной системой охлаждения на подкожные структуры кожи. В частности, исследование заключалось в том, чтобы доказать, что монополярные радиочастоты при наличии системы охлаждения могут вызывать избирательный нагрев жировой ткани, способствуя разрушению адипоцитов и программированной гибели клеток (апоптозу) подкожного жирового слоя.

Методы: аппарат неинвазивного монополярного радиочастотного воздействия с системой охлаждения (Exilis Elite, BTL Industries, Framingham, MA) использовался для уменьшения жировых отложений на примере модели свиньи. Исследование проводилось на модели 3 вьетнамских свиней в сертифицированном ветеринарном учреждении. Процедура проводилась на области размерами 20 × 10 см. Продолжительность процедуры составляла 11 минут 30 секунд. Образцы биопсии были взяты до первой процедуры, через час после каждой процедуры, а также через 8 и 20 часов после каждой процедуры. Программированная гибель клеток (апоптоз) контролировалась с использованием метода TUNEL. Температуру измеряли на поверхности кожи с помощью инфракрасного тепловизора со встроенным ИК-термометром, внутренний зонд помещался на различную глубину подкожного слоя. Внутреннее положение зонда контролировалась с помощью диагностического ультразвукового исследования.

Результаты: температура обработанной жировой ткани была более высокой по сравнению с температурой поверхности кожи. Среднее значение градиента температуры составляло 3,1 °С. Благодаря градиенту температуры на поверхности кожи изменений отмечено не было, в подкожных слоях, напротив, проявлялись значительные изменения. Метод TUNEL способствовал сильному апоптозу жировых клеток после каждой процедуры. Индекс апоптоза увеличился с 7% перед первой процедурой в среднем до 53,4%, 39,6%, 40,2% и 44,7% соответственно для каждой последующей процедуры. Во время трехмесячного периода последующего наблюдения апоптотический индекс снизился до 11,7%. Гистология, биохимический анализ образцов крови и гематологическое исследование показали, что в обработанной области воспаление отсутствовало.

Заключение: Исследование на примере модели свиньи показало, что использование монополярного, сфокусированного радиочастотного аппарата может вызывать усиленный процесс апоптоза. Данные демонстрируют, что аппарат монополярного сфокусированного радиочастотного воздействия может использоваться для сокращения жировых отложений и формирования контуров тела.

J Drugs Dermatol. 2014; 13 (11): 1336–1340.

ВВЕДЕНИЕ

Спрос на безопасные и эффективные аппараты для неинвазивного формирования контуров тела и сокращения жировых отложений неизменно повышается в течение последнего десятилетия. Было разработано множество технологий для воздействия на адипоциты, например ультразвук, радиочастоты, а также различные аппараты с охлаждением и световым воздействием.^{1,2,5}

В данном исследовании мы оценили способность монополярного сфокусированного радиочастотного аппарата вызывать апоптоз в подкожной жировой клетчатке. Аппарат обеспечивает равномерный нагрев на контролируемой глубине подкожной клетчатки благодаря регулируемой встроенной системе охлаждения. Клиническое применение является безопасным и эффективным, обеспечивая максимальную мощность и скорость высокочастотных радиоволн и используя ряд аппаратных и программных элементов безопасности.

МЕТОДЫ

Данное исследование проводилось в ветеринарной клинике и лаборатории, сертифицированной по принципам надлежащей

лабораторной практики (GLP). Уход за животными осуществлялся в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, и в соответствии с Законом о защите животных от жестокого обращения. Протокол исследования был одобрен Комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) и Комитетом по защите животных Министерства сельского хозяйства Чешской Республики. Используемые процедуры соответствуют установленным принципам и сводят к минимуму или полностью исключают причинение животным боли, страданий или дискомфорта. В случаях, когда применяемые процедуры вызывали у животных более сильную и более длительную боль (дольше минуты), животные получали соответствующие анальгетические препараты или анестетики. Во время анестезии контролировались жизненные функции и восприятие боли у исследуемых животных, для того чтобы обеспечить полное отсутствие чувствительности при проведении болезненных процедур, а также соответствующий процесс восстановления. Количество животных, отобранных для проведения данного исследования, считается минимально необходимым (принципы ОЭСР) для соответствия научным и нормативным требованиям к исследованиям такого типа.

Обоснование формата исследования: свиньи являются наиболее подходящей моделью животных для данного исследования, т. к. существует сходство между кожными и подкожными структурами человека и свиньи. Также среди анатомических сходств с человеком можно перечислить морфологию почек, структуру глаз, кожи и развитие зубов. Свиньи также являются одними из немногих животных, которые могут страдать ожирением.^{7,8} 3 исследуемых животных были размещены в отдельных помещениях, где за ними постоянно осуществлялся контроль при помощи камер. В помещении поддерживалась температура 20 °С. Ежедневно проводилась уборка помещений и прилегающей территории. Два раза в неделю обеззараживались продовольственные корма. В периоды адаптации и исследования животных кормили злаковыми диетическими кормами для крупного рогатого скота (CDP) в количестве 25 г на килограмм веса тела CDP, рассчитанном для каждого животного на день. В течение всего периода исследования также контролировалось качество потребляемой животными воды. Адаптационный период составлял 13 дней. Во время адаптации или исследования никакие профилактические или терапевтические процедуры не требовались. В исследовании принимали участие только животные с хорошим состоянием здоровья.⁶

«Индукция гибели адипоцитов через апоптоз становится многообещающей методикой, используемой в профилактике и сокращении избыточных жировых отложений. Благодаря данному механизму происходит разрушение адипоцитов, что приводит к уменьшению содержания жира».

Процедура обработки: в районе живота определялась область (20 × 10 см) кожи исследуемого животного и помечалась маркером (см. рис. 1).

Лечение проводилось 4 раза с перерывом в неделю между процедурами. Изначально были установлены параметры 95 Вт с охлаждением насадки аппликатора, установленным на 10 °С (см. рисунок 10). Требуемая температура кожи составляла 42,5 °С, минимальный уровень температуры экспозиции составлял 39 °С, максимальный уровень температуры экспозиции — 43 °С. Температура поверхности измерялась непрерывно, а выходная мощность регулировалась в соответствии с температурным измерением. Внутренняя температура ткани периодически измерялась термическим зондом во время экспозиции. Анестезию вводили во время каждой процедуры и во время биопсии. Образцы крови принимались до первой процедуры, после каждой процедуры и после 3 месяцев последующего наблюдения. Образцы тканей для метода TUNEL брались с обработанной области перед первой процедурой, после каждой процедуры (по 3 образца после каждой процедуры — через час после сеанса, через 8 часов после сеанса и через 20 часов после сеанса), а также после 3 месяцев последующего наблюдения. (Расположение и краткое описание образцов см. на рисунке 2: Место биопсии в области обработки.) Гистологические образцы кожи, печени, почек и легких были взяты после окончания периода восстановления.

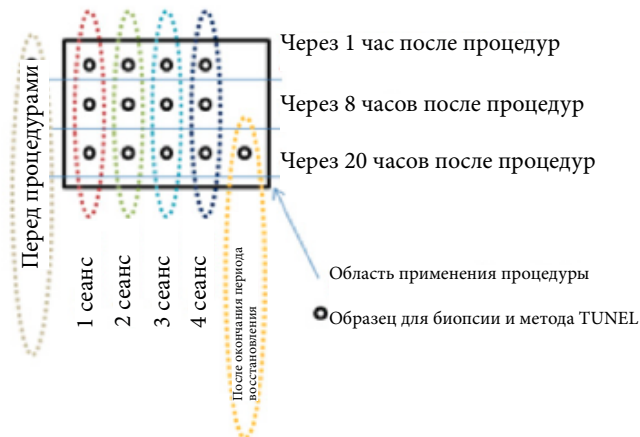
Клинические наблюдения

По всем животным раз в день отслеживались клинические признаки, заболеваемость, а также смертность в период адаптации и в течение периода проведения процедур. Отмечалось возникновение любых симптомов, продолжительность их проявления и степень тяжести. Исследование включало в себя отслеживание изменений кожи, глаз и слизистых оболочек, дыхательной и кровеносной системы, вегетативной и центральной нервной системы,

РИСУНОК 1. Область применения



РИСУНОК 2. Место биопсии в области обработки



соматомоторной активности и поведения, изменений в походке, позе и реакции на процедуры, а также наличие клонических или тонических сокращений и стереотипов.

Клинические процедуры

Температуру поверхностных структур во время каждой процедуры отслеживали с помощью инфракрасного тепловизора. Использовался тепловизор типа FLUKE Ti32. (FLUKE Corp., Эверетт, Вашингтон). Температуру кожных и подкожных слоев ткани измеряли с помощью 8-канального игольчатого термометра Т-зонда TC-08 производства Pico Technology Limited, Великобритании, находящегося под контролем USG Mindray M5Vet. Для каждой процедуры фиксировались выходная мощность и другие настройки.

Сохранение образцов

Образцы полной крови немедленно оценивались, центрифугированные сыворотки глубоко замораживались, а биопсии и гистологические образцы кожи, печени, почек и легких помещались в раствор формальдегида и далее заливались парафином для дальнейших исследований. Для стереологического анализа образцы фиксировали в 3% глутаральдегиде в 0,1 М каодилатном буфере с уровнем pH 7,2 и содержанием сахаразы 7%.

РИСУНОК 3. Термический зонд, вставленный в подкожную ткань



Гистологическое исследование

Образцы тканей были подвергнуты фиксации 10% нейтральным буферным формалином (4% формальдегид в фосфатном буферном растворе) для сохранения, обработки (дегидратации) тканей, очистки и инфильтрации ткани парафиновым воском, помещения образца в куб и наконец, секционирования на микротоме для помещения на предметное стекло микроскопа. Далее образцы окрашивали гематоксилин-эозином.

Мониторинг гибели клеток

Для апоптоза (программированной гибели клеток) зафиксированные в формальдегиде и помещенные в парафин образцы ткани анализировали с помощью метода TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК, то есть визуализируя фрагментацию ДНК с помощью набора TUNEL (набор для выявления апоптоза) S7100, Scintilla. Результаты оценивали и высчитывали в процентах от окрашенных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Апоптотический индекс

Апоптотический индекс описывает процент окрашенных клеток в образцах, которые были отмечены как апоптотические клетки. Описанный метод TUNEL выявляет апоптотические клетки путем изменения цвета ядра в образце гистологии. Клетки с коричневым ядром указывают на апоптоз, тогда как клетки с синим ядром являются жизнеспособными (см. рис. 4).

До процедур средний индекс апоптоза составлял 7,0%. Индекс апоптоза достигал среднего уровня в 53,4%, 39,6%, 40,2% и 44,7% соответственно, во время четырех последовательных процедур, в образцах тканей, взятых через 1, 8 и 20 часов после процедуры. Во время трехмесячного периода последующего наблюдения среднее значение индекса снизилось до 11,7%. Среднее, минимальное и максимальное значения апоптотического индекса за две недели до процедур, во время каждой процедуры и в течение трехмесячного периода последующего наблюдения показаны в таблицах 1 и 5.

РИСУНОК 4. Апоптотическое ядро адипоцитов (А) окрашено в коричневый цвет (В), другие ядра — голубого цвета (С) (400×)

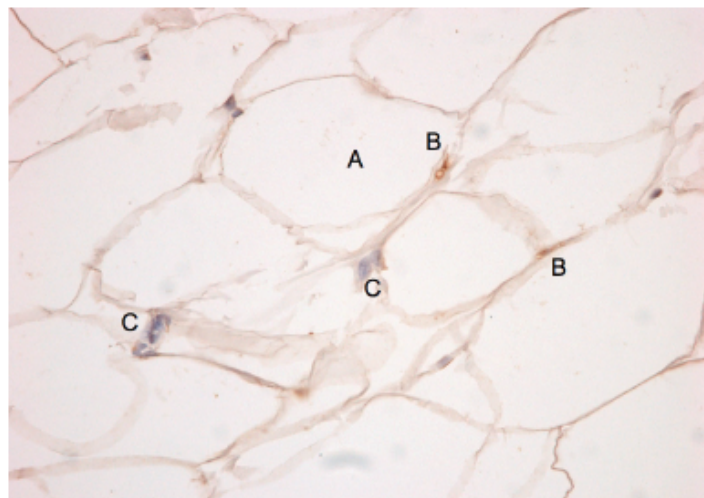


РИСУНОК 5. График среднего апоптотического индекса

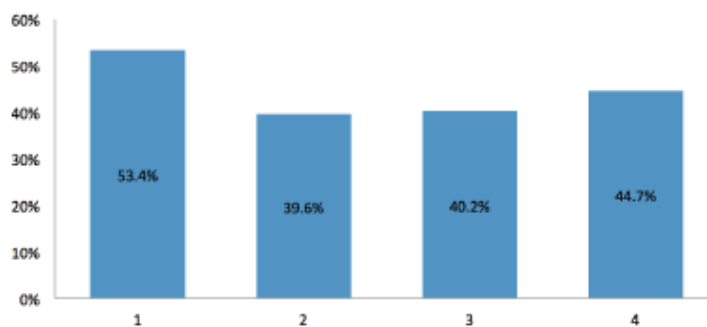


ТАБЛИЦА 1.

Значения апоптотического индекса (%) за две недели до процедур, во время каждой процедуры, и во время трехмесячного периода последующего наблюдения

| Процедура | Измерения (n) | Среднее значение апоптоза (%) | Минимум | Максимум | Среднее отклонение |
|------------------------|---------------|-------------------------------|---------|----------|--------------------|
| 2 недели спустя | 3 | 7,00 | 4,00 | 10,00 | 3,00 |
| 1 | 9 | 53,44 | 34,00 | 64,00 | 9,72 |
| 2 | 9 | 39,56 | 27,00 | 50,00 | 6,46 |
| 3 | 9 | 40,22 | 17,00 | 57,00 | 14,32 |
| 4 | 9 | 44,67 | 32,00 | 60,00 | 11,32 |
| Последующее наблюдение | 3 | 11,67 | 5,00 | 18,00 | 6,51 |

Значения апоптотического индекса в процентах для конкретных животных приведены в таблице 2 и на рисунке 6

РИСУНОК 6. График значений апоптотического индекса (в %) для конкретных животных

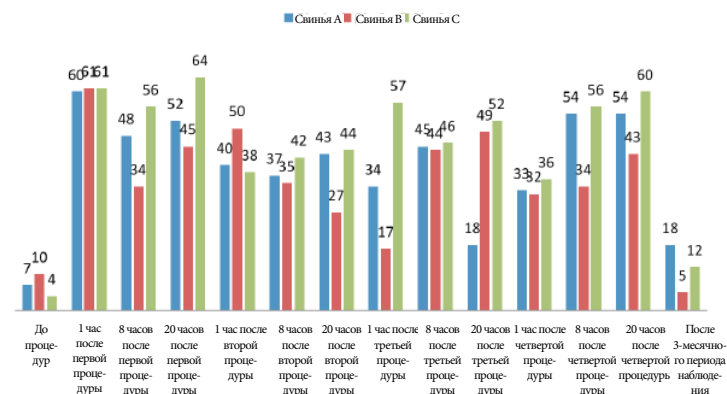


РИСУНОК 7. Гистологические образцы

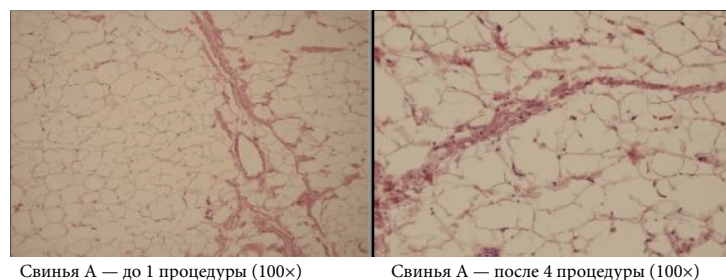


РИСУНОК 8. Проверка положения теплового зонда с использованием ультразвукового измерения

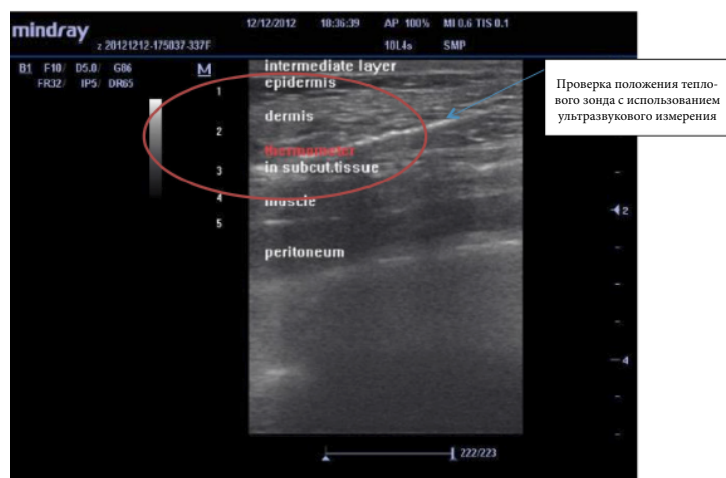


ТАБЛИЦА 2.

| Тест TUNEL | | | | | | | |
|-------------------------|----------|-------------|----|----|----|----|------------------------|
| Время после лечения (ч) | Животное | 2 недели до | 1 | 2 | 3 | 4 | Последующее наблюдение |
| 1 | A | 7 | 60 | 40 | 34 | 33 | 18 |
| 1 | B | 10 | 61 | 50 | 17 | 32 | 5 |
| 1 | C | 4 | 61 | 38 | 57 | 36 | 12 |
| 8 | A | | 48 | 37 | 45 | 54 | |
| 8 | B | | 34 | 35 | 44 | 34 | |
| 8 | C | | 56 | 42 | 46 | 56 | |
| 20 | A | | 52 | 43 | 18 | 54 | |
| 20 | B | | 45 | 27 | 49 | 43 | |
| 20 | C | | 64 | 44 | 52 | 60 | |

Последующее наблюдение

После каждой процедуры не было отмечено значительных различий в апоптотическом индексе у животных, т. е. во время процедур не было существенных подъемов и спадов средних значений. Сравнение значений до процедур и сразу после них (вплоть до 20 часов после последней процедуры) показало статистически значимые результаты почти для всех процедур при $p \leq 0,05$, а в некоторых случаях близко к $p \leq 0,01$.

Гистология

В образцах гистологии была отмечена фрагментация фиброзной ткани в кожных и подкожных структурах. На следующих изображениях показаны стенки адипоцитов, не подвергавшихся воздействию, и разложившиеся или разрушенные после 4 процедуры клеточные стенки.

Измерение теплового профиля

Температуру подкожных слоев измеряли с использованием 8-канального игольчатого термометра Т-зонда, вставленного

на максимальную глубину 3 см в ткани. Расположение зонда контролировалось с помощью диагностического ультразвука. Результаты измерения температуры на поверхности и на глубине ткани отображены на рисунке 9: График результатов измерения температуры кожи и жировой клетчатки в различные периоды времени.

Измерения подтвердили, что во время процедуры жировая ткань нагревалась сильнее, чем кожа. Температурный градиент жировой клетчатки и поверхности кожи увеличивался с течением времени до насыщения. Средний температурный градиент (с 2:30 до 11:30 мин) составлял 3,1 °C. Максимальная температура кожи составляла 43,0 °C, а максимальная температура жировой ткани — 45,6 °C.

РИСУНОК 9. График результатов измерения температуры кожи и жировой клетчатки в различные периоды времени

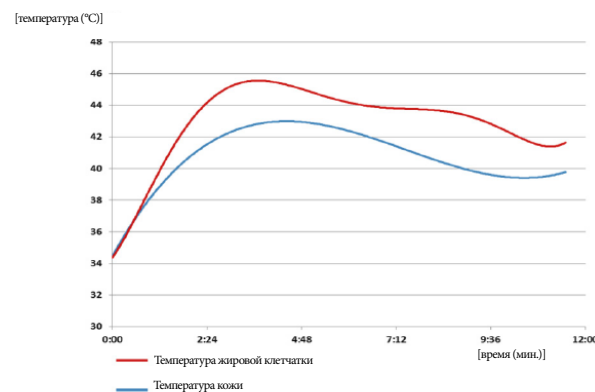
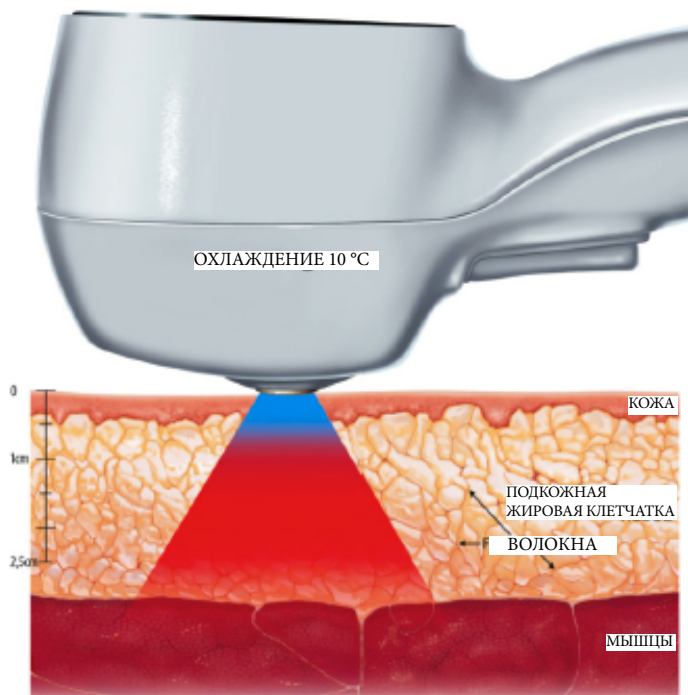


РИСУНОК 10. Охлаждение при соответствующей глубине проникновения тепла



Результаты гистологии

Для гистопатологических исследований у трех свиней были взяты образцы кожи из обработанной области, из печени, почек и легких. При патологическом обследовании во внутренних органах не было отмечено никаких аномалий. Гистологическое, гематологическое и биохимическое исследования крови показали, что в обработанной области признаки воспаления отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Апоптоз является главным механизмом регуляции гибели клеток в тканях. Индукция гибели адипоцитов через апоптоз становится многообещающей методикой, используемой в профилактике и сокращении избыточных жировых отложений. Благодаря данному механизму происходит разрушение адипоцитов, что приводит к уменьшению содержания жира.⁹

Цель данного исследования заключалась в том, чтобы продемонстрировать воздействие монополярного, сфокусированного радиочастотного (RF) аппарата со встроенной системой охлаждения на кожные и подкожные структуры кожи на примере модели свиньи. Многократно проведенные процедуры, при которых воздействие осуществлялось на кожную и подкожную ткани, продемонстрировали процесс апоптоза в жировой ткани. Апоптотический индекс увеличился с 7% до начала лечения до 53,4%, 39,6%, 40,2% и 44,7% в среднем после каждой из четырех процедур соответственно. Температурный градиент (разница в значениях температур кожной ткани и жировой клетчатки) в среднем был равным 3,1 градуса Цельсия, что подтверждает тот факт, что температура подкожной ткани была более высокой по сравнению с температурой поверхно-

сти кожи. Лабораторный, гистологический или патологический анализы не выявили каких-либо рисков для безопасности либо побочных эффектов.

Заключение: результаты данного исследования подтверждают гипотезу о том, что сфокусированное монополярное радиочастотное воздействие посредством тепловой активации может индуцировать апоптоз в жировой ткани. Основываясь на результатах данного предварительного клинического исследования, проведенного на модели животных, можно утверждать, что клинические исследования на человеческой модели, связанные с процедурами по формированию контуров тела, а также профилактикой избыточных жировых отложений, являются оправданными.

ДЛЯ ИНФОРМАЦИИ

Авторы данного исследования не имеют какого-либо конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiss R, Weiss M, Beasley K, Vrba J, Bernardy J. Operator Independent Focused High Frequency ISM Band for Fat Reduction: Porcine Model. *Lasers Surg Med.* 2013; 45(4):235-239.
2. Zelickson B, Egbert BM, Preciado J, Allison J, Springer K, Rhoades RW et al. Cryolipolysis for noninvasive fat cell destruction: initial results from a pig model. *Dermatol Surg.* 2009; 35(10):1462-1470.
3. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4):495-516.
4. Baisch H, Bollmann H, Bornkessel S. Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. *Cell Prolif.* 1999; 32(5):303-319.
5. Franco W, Kothare A, Ronan SJ, Grekin RC, McCalmont TH. Hyperthermic injury to adipocyte cells by selective heating of subcutaneous fat with a novel radiofrequency device: feasibility studies. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(5):361-370.
6. Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol.* 1978; 7:39-52.
7. Toedebusch RG, Roberts MD, Wells KD, Company JM, et al. Unique transcriptomic signature of omental adipose tissue in Ossabaw swine: a model of childhood obesity. *Physiol Genomics.* 2014 May 15; 46(10):362-75.
8. Sauerwein H, Bendixen E, Restelli L, Ceciliani F. The adipose tissue in farm animals: a proteomic approach. *Curr Protein Pept Sci.* 2014 Mar; 15(2):146-55.
9. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011; 121:2094-2101.

АВТОР

Врач Дэвид МакДэниэль

E-mail:.....dhm@drmcddaniel.com