

# Molecular changes during skin aging and wound healing after fractional ablative photothermolysis

Doris Helbig and Uwe Paasch

*Department for Dermatology, Venerology and Allergology, University of Leipzig, Leipzig, Germany*

Photo-damaged skin is characterized by major alterations of the extracellular matrix and collagen network, leading to clinically obvious signs of skin aging. UV radiation increases the levels of matrix metalloproteinase (MMP) 1, which initiates the cleavage of fibrillar collagen types I and III. The developing collagen fragments are further degraded by MMPs 2 and 9. Various ablative, non-ablative, thermal and non-thermal rejuvenation modalities have been tested for their capacity to reverse epidermal and dermal signs of photo- and chronological-aging. Light and laser therapies are among the most effective treatment options for skin rejuvenation. Conventional laser therapy treats entire surface areas by selective photothermolysis or ablation. Recently, intervention with a fractional ablative laser leads to fast wound healing, and hence, a substantial amount of the target skin area is left untreated.

It is not known if the efficacy of a particular ablative skin rejuvenation treatment depends on the extent of micro-wounding and/or the amount of heat produced. The underlying molecular changes are not fully understood but have been postulated to be induced by time-dependent changes in heat shock proteins, transforming growth factor  $\beta$ , MMPs, hyaluronic acid synthetases, hyaluronidases and HA, among others.

**Key words:** skin aging – fractionated laser skin rejuvenation therapy – heat shock protein 70 – transforming growth factor  $\beta$  – matrix metalloproteinases

© 2011 John Wiley & Sons A/S

Accepted for publication 30 October 2010

THE DEMAND for minimally invasive treatments to preserve or improve skin smoothness and tonicity is increasing. Traditional ablative laser therapies with CO<sub>2</sub>- or Er: YAG-lasers are highly effective for the repair of rhytides and photo-aged skin. These treatments remove the entire epidermis, allowing for its complete regeneration and extensive remodeling (1, 2). However, ablative resurfacing requires significant downtime and may involve persistent erythema, hypo- or hyperpigmentation, infection or scarring (1). Healing after non-ablative resurfacing techniques takes less downtime, but seems to be less effective even if several treatment sessions are applied. Recently, fractional ablative laser (AFP) intervention, primarily using a 1550 nm fractionated erbium glass fiber laser, has been introduced to further reduce downtime and side effects (2). This device emits light in a pixilated fashion onto the skin, producing an array of microthermal zones (MTZs) in the dermis (3) with depths of 300–400  $\mu$ m (2, 4). It has been postulated that columns of cellular debris are

eliminated by trans-epidermal elimination and remodeling due to inflammation (4, 5). Ablative skin resurfacing by fractionated CO<sub>2</sub>- or Er: YAG-lasers ablates the epidermal compartment as well as parts of the dermal compartment, depending on the amount of energy applied (6). Using this technique, controlled collateral dermal heating is achieved near the microscopic ablation zones (MAZs). The controlled thermal stress to the epidermis and the dermal compartment is followed by a wound healing response ultimately leading to re-epithelization and dermal remodeling (5). With the greater degree of injury compared with non-ablative devices, a greater and prolonged effect on induction of new collagen and remodeling is assumed (5, 7). The question remains as to whether or not removing volume via ablation is ultimately the most effective way to erase a surface rhytid. Moreover, the depth of collagen remodeling needed for rhytides is still under debate. As to the different ablative devices on the market, they all offer significant differences in their depths of penetration. Another

unanswered question with these new technologies is whether the depth of ablation or the depth of thermal damage is the most important parameter.

The up-regulation of heat shock proteins (HSP70) seems to be one of the initial underlying molecular changes, in addition to altered regulation of other molecules such as transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), matrix metalloproteinases (MMPs), hyaluronic acid synthetases (HAS), hyaluronidases (Hyals) and hyaluronic acid (HA) (5, 8–11).

### Intrinsic and Extrinsic Skin Aging

Both intrinsic and extrinsic influences are involved in the process of skin aging. Intrinsic structural changes occur as a natural consequence of aging and are genetically determined, whereas extrinsic factors are, to varying degrees, controllable and include exposure to sunlight, pollution or nicotine, repetitive muscle movements like squinting or frowning and miscellaneous lifestyle components such as nutrition, sleeping position and overall health (12).

Intrinsic aging is characterized by smooth, thinned skin with exaggerated expression lines and the occurrence of benign neoplasms such as seborrheic keratoses and cherry angiomas. Histological changes include a flattening of the rete ridges, with reduced surface contact between the epidermis and dermis, which results in a reduced exchange of nutrients and metabolites between the two skin layers. The natural process of aging contributes to the generation of reactive oxygen species (ROS) that stimulate the inflammatory process in the skin, activating transcription factors that regulate the proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM). An interlinked network of enzymes that convert ROS to harmless water and oxygen molecules regulates the antioxidant defense system, which is reduced in the skin of aging individuals (13).

In addition, aging is significantly different at distinct anatomical sites within one individual (14, 15) and is influenced by hormonal changes, primarily in estrogen and testosterone (16–18).

Extrinsically aged skin is characterized by signs such as wrinkles, dyspigmented lesions, teleangiectasia and loss of elasticity (19–21). Histological analysis of photo-damaged skin shows major modifications in the dermis, including alterations of the ECM (22) and the formation of

solar elastosis (20, 23, 24). UV light exposure initiates a flurry of molecular and cellular responses in which UVA, penetrating into the dermis, is responsible for most chronic skin damage. Several MMPs (25–27), serine proteases (e.g., neutrophil elastase), fibroblast elastase (28), free radicals, ROS and xeroderma pigmentosum factor are induced and subsequently degrade or damage dermal collagen and ECM components like HA, leading to epidermal invagination representing the beginning of wrinkles (29–32). Additionally, UV light causes the depletion of cellular and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) and activates the neuroendocrine system leading to immunosuppression and the release of neuroendocrine mediators. At the cellular level, UV irradiation triggers cytokine production (33), induces the surface expression of adhesion molecules (34) and affects cellular mitosis, apoptosis and necrosis (35). MMP 1 initiates the cleavage of fibrillar collagen types I and III in the dermis, which are then further degraded by MMP 2 and 9 (36). The simultaneous expression of MMP 2, MMP 3 and MMP 9 results in the degradation of non-collagenous components of the dermal ECM, including basement membrane glycoproteins and proteoglycans. In aged skin, MMPs may already exist in a more active state because of the decreased levels of tissue inhibitors of MMPs (37). Furthermore, acute UVB irradiation leads to a slight reduction in HA levels within the first hours, followed by not only an increase in HA in the epidermis and dermis but also intensified HA turnover in the dermis (38). Interestingly, there is an increase in HA production after a single, moderate dose of UVB (via HASs 2 and 3), while high and repeated doses of UVB are inhibitory (39). Consequently, UV-aged skin contains lower levels of HA compared with young skin (40).

Additional acute effects of UV irradiation include direct effects on keratinocytes such as the induction of several interleukins (ILs) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) leading to the infiltration of the skin with phagocytic cells, which themselves secrete these cytokines (41). IL-1 and TNF- $\alpha$  increase the rate of degradation of proteoglycans and inhibit proteoglycan biosynthesis. By contrast, TGF- $\beta$  and insulin-like growth factor 1 have the opposite effect, and thus, induce proteoglycan synthesis (42). Prostaglandins and other inflammatory mediators such as histamine and leukotrienes (43) as well as granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor are also increased in response to UV (44). Such pro-inflammatory mediators increase the permeability of capillaries, leading to infiltration and activation of neutrophils and other phagocytic cells into the skin. ROS are primarily produced by phagocytic cells and polynuclear lymphocytes, leading to oxidative damage to cellular proteins, lipids, carbohydrates and DNA (45). One of the primary events in ROS-mediated inflammation is the activation of transcription factors. Nuclear factor  $\kappa$  B and activator protein 1 are transcription factors that play a role in the regulation of the expression of a variety of genes involved in immunological and inflammatory responses, including genes that encode cytokines, matrix-degrading metalloproteases, adhesion molecules and regulators of cell growth, differentiation and cell death (46). The free radical-induced peroxidation of membrane lipids contributes to increased phospholipase A activity, leading in turn to greater production of prostaglandins (47). Phagocytic cells further stimulate keratinocytes to synthesize and secrete elafin, an inhibitor of human neutrophil elastase, which eventually limits the damage caused by the inflammatory neutrophils (48).

### **Molecular Mechanisms of Wound Healing After Thermal or Non-Thermal, Ablative and Non-Ablative Skin Rejuvenation Treatments**

There are various wound-inducing skin rejuvenation devices that lead to epidermal and dermal remodeling. Traditional ablative laser ablates the entire epidermis and parts of the dermis, inducing extensive skin remodeling with significant downtime (1, 2). AFP and non-ablative laser intervention is effective and leads to faster wound healing, although a substantial amount of the target skin area is left untreated. Ablative skin resurfacing with a fractionated CO<sub>2</sub>- or Er:YAG-laser induces controlled collateral dermal heating next to MAZs (49). The spatially controlled thermal stress to the epidermis and dermal compartment is followed by a wound-healing response ultimately leading to re-epithelization and dermal remodeling (3–7).

Subsequently, different non-ablative lasers and light sources have been developed for skin rejuvenation with the aim of reducing side effects

and downtime. They affect the wound-healing cascade by thermal or photothermolytic injury, with little or no damage to the surrounding tissue. Thermal but non-ablative photorejuvenation typically involves a confined, selective thermal injury to the papillary and upper reticular dermis, which contains the majority of solar elastosis in photo-damaged skin, without any epidermal damage leading to fibroblast activation and the synthesis of new collagen (50–52). Microneedle devices aim for only microwounding without any selectivity. Currently, it is not known whether the efficacy of a particular skin rejuvenation treatment depends on the extent of microwounding, with or without epidermal damage and heat. The underlying molecular changes to the epidermis and dermis are not fully understood, but different factors such as HSP70 and HSP47, TGF- $\beta$ , MMPs, HAS, Hyals and HA have been postulated to play significant roles (5, 8–11).

Different laser treatments increase the expression of HSP70 within the epidermis around the 'microscopic thermal injury zones' (2–48 h after therapy) and within dermal structures, particularly around blood vessels, hair follicles and sebaceous glands (815 nm diode laser; 1.5 W, 3 s pulse duration, fluence of 145 J/cm<sup>2</sup> (9, 53) or a non-ablative fractional 1500 nm diode laser system; 5 mJ/MTZ, 1600 MTZs/cm<sup>2</sup>) (4). Using our skin explant model, we have shown that HSP70 is up-regulated by a fractionated ablative thermal CO<sub>2</sub>-laser treatment (10,600 nm; 50, 64, 100 or 300 mJ at 100–200 ablation zones/cm<sup>2</sup>), non-ablative but thermal Er:glass laser treatment (1540 nm; 1 Hz repetition rate, 30 J/cm<sup>2</sup> fluence) as well as by non-thermal surgical treatments. However, HSP70 does not seem to play a significant role in the induction of skin remodeling induced by photomodulation (LEDA SCR red light: 635 nm, 40–120 W/cm<sup>2</sup>, 40–120 J/cm<sup>2</sup>; LEDA SCR yellow light: 585 nm, 16–35 W/cm<sup>2</sup>, 20–100 J/cm<sup>2</sup>) or microneedle device intervention (250 microwounds/cm<sup>2</sup>). The AFP treatment performed by a CO<sub>2</sub>-laser led to a marked up-regulation (shown by immunohistochemistry) at 1 h, peaking between 1 and 24 h post-treatment, and a significant decline within the following 7 days without significant differences between the various energies used. Maximal HSP70 expression was lower and reached later after Er:glass laser intervention or surgical incisions compared with AFP treatment (107, 108).

Immunohistochemical investigations of HSP70 (HSP72 and HSP73) and HSP72 after CO<sub>2</sub>-AFP in a human *in vivo* study setting, for which day 1 was not investigated, showed the highest epidermal HSP70 and HSP72 expression 3–14 days post-intervention (54). HSPs are stress proteins and tend to be up-regulated in all cell types if exposed to thermal or other forms of physical and chemical stress (55–58). They enhance the ability of cells to deal with the resultant accumulation of abnormally folded proteins, either facilitating the refolding of damaged proteins or participating in the synthesis of new proteins to replace those that are irreparably damaged. Therefore, they are fundamentally involved in cell reparation and the wound-healing process (59, 60). HSP73 is synthesized constitutively, whereas the synthesis of HSP72 is usually restricted to cells experiencing stress. HSP47 expression has been found to be localized to the endoplasmic reticulum of fibroblasts, where it interacts essentially with the synthesis and transport of the pro- $\alpha$ 1(I) and pro- $\alpha$ 2(I) chains of procollagen I (61). HSP47 expression is up-regulated 4–7 days post-laser intervention and persists for 3 months (5, 54, 62), leading to increased procollagen and collagen I and III deposition (63–65). Type I and type III procollagen messenger RNAs were also up-regulated, peaking 21 days after treatment and remaining elevated for at least 6 months (64). Type III collagen is the predominant collagen in the granulation tissue of healing wounds (66). As healing advances, a more rigid type I collagen is laid down, while the amount of type III collagen diminishes (67). In our human clinical study, skin remodeling uniformly started with regrowth of the epidermal compartment, followed by partial to complete replacement of the MAZ on day 14 by newly synthesized condensed procollagen III, depending on the energy applied. In addition, from day 3–14, the number of macrophages and giant cells surrounding the MAZ increased depending on the energy applied. The number of macrophages and giant cells involved in the replacement of necrotic zones may determine whether wound healing is efficient or delayed and limits the dermal ablation and remodeling depth (54). Macrophages as well as fibroblasts themselves secrete activating cytokines and growth factors (68–71).

Among such growth factors, TGF- $\beta$  has long been believed to be the most critical in the

process of tissue remodeling (7, 72, 73). A few studies have shown induction or activation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 by different non-ablative laser regimens (8, 74) 2 days after laser irradiation, while TGF- $\beta$ 3 expression was increased after 14 days, concomitant with an increased inflammatory infiltrate. TGF- $\beta$ 1 mRNA levels rose acutely within 3 days after CO<sub>2</sub>-laser resurfacing and remained elevated for at least 28 days (64). Using our skin explant model as well as the human clinical study, TGF- $\beta$  expression was similar to that of HSP70 and was highest 1 h to 3 days following AFP. Furthermore, intra-dermally injected TGF- $\beta$  induced HSP70 independently of laser therapy, serving as a positive control (107, 108). TGF- $\beta$  increases the synthesis of matrix constituents like fibronectin (75, 76) and collagen (77), myofibroblast transformation (73, 78), immunomodulation, angiogenesis and the heat shock response (79). Upon TGF- $\beta$  binding to its receptor at the cell surface, cytoplasmic transmitters (Smad2 or Smad3) are phosphorylated and then form a heterodimer with a common Smad (Smad4). This heterodimer translocates to the cell nucleus, binds to a gene promoter and regulates TGF- $\beta$ -dependent gene expression (80, 81). The TGF- $\beta$  signal is further modulated by various cytokines such as TNF- $\alpha$ , which blocks the TGF- $\beta$ /Smad signal via activation of c-Jun N-terminal kinase, antagonizing the TGF- $\beta$ 1-induced up-regulation of type I and III collagen as well as fibronectin in fibroblasts (82–84). Increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels were initially observed during the first 3 days after treatment, declining sharply between days 6 and 8 post-treatment (64).

The mRNA message for MMP1, an enzyme that catalyzes the first step of collagen degradation, was elevated beginning within 3 days, peaking on day 7 and declining during the second week after CO<sub>2</sub>-laser treatment. A similar pattern was seen in the rise of MMP3 mRNA, coding for an enzyme that degrades partially degraded collagen and other matrix proteins such as proteoglycans and elastin. MMP3 message levels rose rather quickly between days 2 and 7 and then sharply declined the subsequent week. Although MMP9 mRNA levels also peaked at day 6 after treatment, its level remained elevated (near peak levels) for at least 28 days after resurfacing, in contrast to MMP1 and MMP3, suggesting residual degradation of MMP1-generated collagen fragments (64). Levels

of MMP13 mRNA rose in a comparatively delayed fashion, peaking on day 14 post-treatment and subsequently declining during the following 2-week period but remaining somewhat elevated 28 days after resurfacing. Evidence suggests that MMP13 is involved in the remodeling of newly synthesized collagen, which occurs in the later stages of wound healing (85).

HA, also called hyaluronan, is a high-molecular-weight carbohydrate polymer (HMW-HA: 600–1000 kDa) that is an integral part of the extracellular epidermal and dermal matrix (86). There is a constant balance between its synthesis and degradation, with a dermal turn-over rate of approximately 1–2 days. There exist three subtypes of HA-synthesizing enzymes in human skin (HAS1–3) as well as three degrading enzymes (Hyal1–3). HA is taken up by dermal fibroblasts via the main HA receptor CD44 followed by enzymatic degradation by Hyals within lysosomes. Hyal-1 disintegrates HA into smaller HA fragments, and Hyal-2 generates HA fragments of 10–20 kDa (86, 87). New HA is synthesized by HASs. HA subtypes differ regarding their position in dermal compartments and in their sizes. HAS-1 and -2 produce saccharides of 200–400 kDa, and HAS-3 produces saccharides of 40–250 kDa (88). HAS and Hyals showed slight changes, altering HA synthesis, after fractionated thermo-ablative Er:YAG-laser therapy. Concomitantly, an increase in the HA content of the skin could be detected by immunohistochemistry.

## Conclusion and Outlook

Although the underlying molecular changes induced by different ablative and non-ablative as well as thermal and non-thermal skin rejuvenation treatments are not fully understood, there are investigations suggesting important roles for HSP70 and HSP47, TGF- $\beta$ , different MMPs, HAS, hyals and HA, among other molecules. In future studies, it would be of interest to further quantify these parameters following different laser treatments under different conditions. Such research could lead to optimization of treatment protocols due to a better understanding of these molecular changes, and potentially, the ability to influence them. The particular device and level of ablation and thermal damage needed to stimulate maximal neocollagenesis remain to be determined.

The pulse duration seems to be one of the most decisive parameters for achieving good clinical results. With longer pulse durations, more heat is imparted to the skin. Shorter pulse durations deliver less energy and, therefore, less heat. Too much heat can lead to scarring.

Other factors investigated in wound healing studies may be of interest during laser skin rejuvenation treatments. Among these,  $\beta$ -catenin, a key component in the canonical Wnt signaling pathway, is activated during wound healing or in response to irradiation. It forms a transcriptionally active complex with members of the T-cell factor family, increasing the size and number of fibroblasts and inducing the expression of target genes encoding for extracellular structural proteins (89, 90). Its levels showed a positive correlation with the tensile strength of a wound and the expression levels of type I collagen in the skin (91) (Fig. 1).

Tenascin is an ECM protein induced by epidermal proliferation in hyperproliferative skin diseases such as psoriasis (92–94) as well as during wound healing (94). It has been speculated that tenascin enhances keratinocyte migration by functioning as a substrate adhesion molecule in the development and regeneration of epidermal and adnexal structures (95–97). Tenascin is structurally distinct from other ECM glycoproteins, and its expression is subject to different control mechanisms (93, 98), although there is cDNA homology to fibronectin, fibrinogen and epidermal growth factor (99). In normal human skin, tenascin can be detected discontinuously in the papillary dermis beneath the basal lamina and adjacent to the basement membranes (93, 100). Increased and continuous expression of tenascin can be observed 48 h after tape-stripping or UVB exposure, with levels remaining elevated for 14 days (92, 101) (Fig. 1).

Paralleling dermal remodeling, re-epithelization begins within hours after skin injury to cover the tissue defect and re-establish barrier function (102). After injury, keratinocytes at the wound margins become migratory, displaying changes in cell–cell and cell–matrix adhesion and cytoskeletal reorganization as they extend over the wound bed (103, 104). Migratory keratinocytes modify the terminal differentiation program, as illustrated by a decrease in expression of the differentiation associated keratins 1 and 10 and de novo production of the injury-associated keratins 6, 16 and 17 (103, 104). The changes at

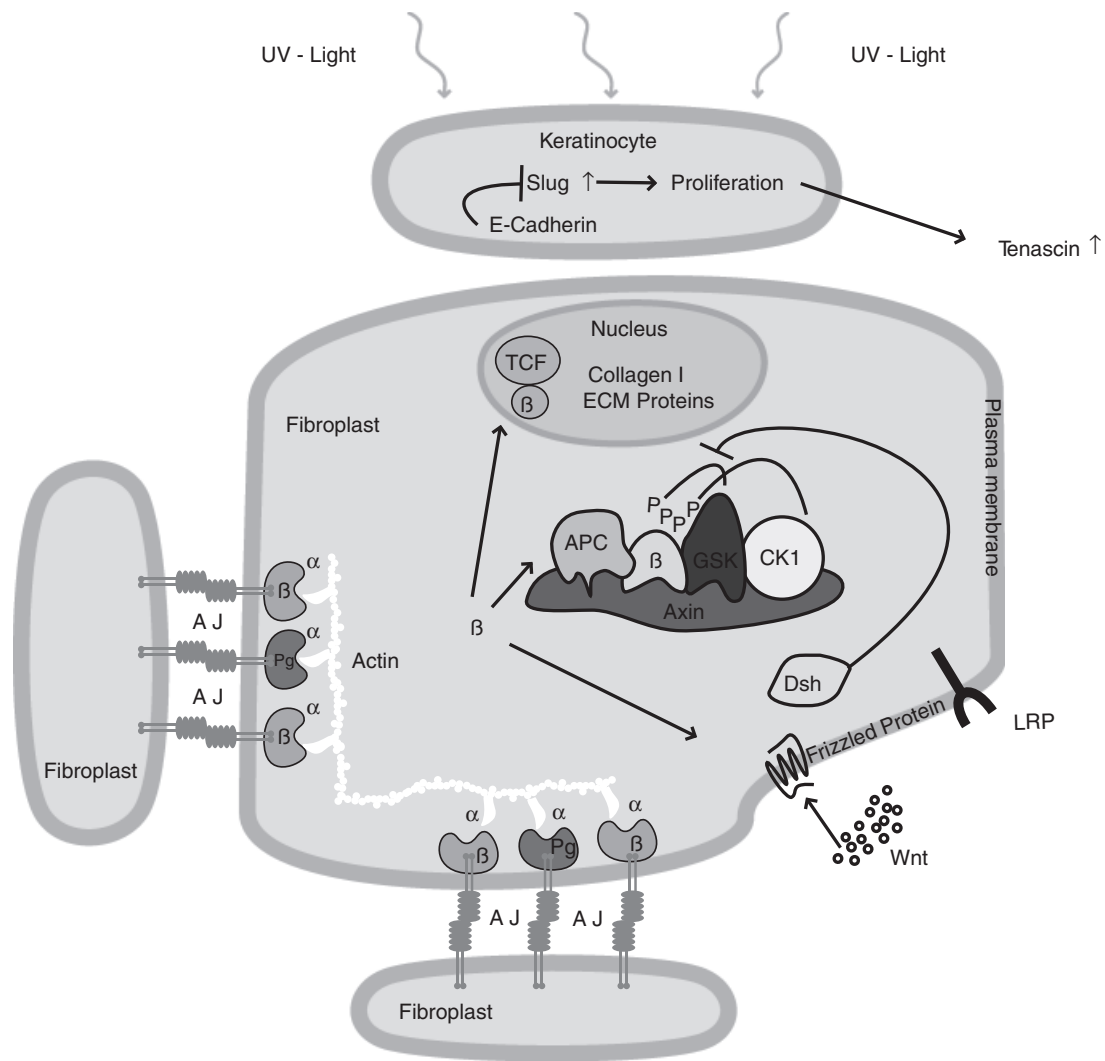


Fig. 1. The roles of  $\beta$ -catenin and tenascin during wound healing and irradiation:  $\beta$ -catenin ( $\beta$ ) and plakoglobin (Pg) bind to the cytoplasmic domain of cadherin transmembrane adhesion receptors and, via  $\alpha$ -catenin ( $\alpha$ ), associate with the actin cytoskeleton to form an adherens junction (AJ). When the Wnt signaling pathway is inactive, the cytoplasmic pool of  $\beta$ -catenin is targeted for degradation by a molecular complex including Adenomatous polyposis coli protein (APC) and Axin and the kinases casein kinase 1 (CK1) and glycogen synthase kinase 3 (GSK), which phosphorylate  $\beta$ -catenin (PPPP). The binding of Wnt to Frizzled (Frz) and its co-receptor LRP activates Wnt signaling. This induces Dishevelled (Dsh)-mediated inhibition of  $\beta$ -catenin phosphorylation by GSK, thereby blocking  $\beta$ -catenin degradation and its accumulation and complexing with T-cell factor (TCF) in the nucleus. The  $\beta$ -catenin-TCF complex transactivates target genes such as those encoding collagen I and extracellular matrix proteins (ECM). Slug expression is elevated in keratinocytes at wound margins, leading to cell spreading and desmosomal disruption and subsequent wound re-epithelization.

healing wound margins resemble certain aspects of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) that occurs during embryonic development and tumor metastasis (105). The process of EMT is characterized by loss of intercellular adhesion mediated by adherens junctions and desmosomes, loss of polarity, increased secretion of ECM-degrading proteinases, a shift from keratin to vimentin intermediate filaments and enhanced cell motility. Transcription factors of the Snail family are known regulators of EMT in develop-

ment, and there is evidence that the Snail transcription factor Slug (Snai2) modulates EMT-like processes in keratinocytes, including keratinocyte migration and wound healing (105). Slug expression at excisional wound margins *in vivo* and *in vitro* is maximal at 72 h after wounding, repressing the expression of E-cadherin and keratin 8 (106).

In order to quantitatively and qualitatively analyze the cytokine profiles of keratinocytes and fibroblasts, we aim to investigate keratinocyte

and fibroblast cell cultures after light experiments. The results from these *in vitro* studies will be used

for further skin explant model experiments and subsequent *in vivo* wound healing studies.

## References

- Biesman BS. Fractional ablative skin resurfacing: complications. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 177–178.
- Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med* 2004; 34: 426–438.
- Farkas JP, Richardson JA, Hoopman J, Brown SA, Kenkel JM. Micro-island damage with a nonablative 1540-nm Er: glass fractional laser device in human skin. *J Cosmet Dermatol* 2009; 8: 119–126.
- Laubach HJ, Tannous Z, Anderson RR, Manstein D. Skin responses to fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 142–149.
- Hantash BM, Bedi VP, Kapadia B, Rahman Z, Jiang K, Tanner H, Chan KF, Zachary CB. *In vivo* histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 96–107.
- Bodendorf MO, Grunewald S, Wetzig T, Simon JC, Paasch U. Fractional laser skin therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7: 301–308.
- Geronemus RG. Fractional photothermolysis: current and future applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 169–176.
- Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF- $\beta$ 1 by low-power laser *in vitro* correlates with increased TGF- $\beta$ 1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 866–874.
- Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol* 2001; 144: 260–266.
- Wilmink GJ, Opalenik SR, Beckham JT, Abraham AA, Nanney LB, Mahadevan-Jansen A, Davidson JM, Jansen ED. Molecular imaging-assisted optimization of hsp70 expression during laser-induced thermal preconditioning for wound repair enhancement. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 205–216.
- Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 2000; 6: 391–407.
- Bergfeld WF. The aging skin. *Int J Fertil Womens Med* 1997; 42: 57–66.
- Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1212–1217.
- Elias PM. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 1996; 5: 191–201.
- Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Technol* 2006; 12: 145–154.
- Wespes E, Schulman CC. Male andropause: myth, reality, and treatment. *Int J Impot Res* 2002; 14 (Suppl 1): S93–S98.
- Brincat MP, Baron YM, Galea R. Estrogens and the skin. *Climacteric* 2005; 8: 110–123.
- Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 555–568.
- Griffiths CE. The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 1992; 127 (Suppl 41): 37–42.
- Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol* 1994; 131: 641–648.
- Glogau RG. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin* 1997; 15: 555–559.
- Mitchell RE. Chronic solar dermatosis: a light and electron microscopic study of the dermis. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 203–220.
- Kligman LH. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* 1989; 5: 235–251.
- Bernstein EF, Chen YQ, Kopp JB, Fisher L, Brown DB, Hahn PJ, Robey FA, Lakkakorpi J, Uitto J. Long-term skin exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 209–218.
- Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 43–48.
- Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, Kang S, Voorhees JJ. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 219–226.
- Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996; 379: 335–339.
- Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Tsuji N, Suzuki Y, Fujimura T, Imokawa G. Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 671–677.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337: 1419–1428.
- Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M, Asai J. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 39–44.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 31–43.
- Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res* 2005; 571: 107–120.
- Takashima A, Bergstresser PR. Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 397–400.
- Krutmann J, Grewe M. Involvement of cytokines, DNA damage, and

- reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 675–705.
35. Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, Donawho CK, Kripke ML, Fidler IJ. Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 864–872.
  36. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6: 199–213.
  37. Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol* 1997; 183: 169–176.
  38. Averbek M, Gebhardt CA, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer CC, Sleeman JP, Simon JC. Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 687–697.
  39. Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, Takahashi T, Takagaki K. Up-regulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* 2008; 471: 85–93.
  40. Sudel KM, Venzke K, Mielke H et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 581–587.
  41. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 397–403.
  42. Tiedemann K, Malmstrom A, Westergren-Thorsson G. Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separate and synergistic effects. *Matrix Biol* 1997; 15: 469–478.
  43. Gonzalez S, Pathak MA. Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polypodium leucotomos. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1996; 12: 45–56.
  44. Schwarz T, Luger TA. Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production. *J Photochem Photobiol B* 1989; 4: 1–13.
  45. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *Int J Cosmet Sci* 2005; 27: 17–34.
  46. Abeyama K, Eng W, Jester JV, Vink AA, Edelbaum D, Cockerell CJ, Bergstresser PR, Takashima A. A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest* 2000; 105: 1751–1759.
  47. Haratake A, Uchida Y, Mimura K, Elias PM, Holleran WM. Intrinsically aged epidermis displays diminished UVB-induced alterations in barrier function associated with decreased proliferation. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 319–323.
  48. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S. Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion in vitro. *Br J Dermatol* 2000; 143: 728–732.
  49. Tannous Z. Fractional resurfacing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 480–486.
  50. Trelles MA, Allones I, Velez M. Non-ablative facial skin photorejuvenation with an intense pulsed light system and adjunctive epidermal care. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 104–111.
  51. Goldberg DJ, Sarradet D, Hussain M, Krishdul A, Phelps R. Clinical, histologic, and ultrastructural changes after nonablative treatment with a 595-nm flashlamp-pumped pulsed dye laser: comparison of varying settings. *Dermatol Surg* 2004; 30: 979–982.
  52. Fatemi A, Weiss MA, Weiss RA. Short-term histologic effects of non-ablative resurfacing: results with a dynamically cooled millisecond-domain 1320 nm Nd:YAG laser. *Dermatol Surg* 2002; 28: 172–176.
  53. Capon A, Souil E, Gauthier B, Sumian C, Bachelet M, Buys B, Polla BS, Mordon S. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med* 2001; 28: 168–175.
  54. Helbig D, Bodendorf MO, Grunewald S, Kendler M, Simon JC, Paasch U. Immunohistochemical investigation of wound healing in response to fractional photothermolysis. *J Biomed Opt* 2009; 14: 064044.
  55. O'Connell-Rodwell CE, Shriver D, Simanovskii DM et al. A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *FASEB J* 2004; 18: 264–271.
  56. Maytin EV, Wimberly JM, Anderson RR. Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 635–642.
  57. O'Connell-Rodwell CE, Mackanos MA, Simanovskii D, Cao YA, Bachmann MH, Schwettman HA, Contag CH. In vivo analysis of heat-shock-protein-70 induction following pulsed laser irradiation in a transgenic reporter mouse. *J Biomed Opt* 2008; 13: 030501.
  58. Wilkink GJ, Opalenik SR, Beckham JT, Davidson JM, Jansen ED. Assessing laser-tissue damage with bioluminescent imaging. *J Biomed Opt* 2006; 11: 041114.
  59. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1291–1301.
  60. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattala M, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 1995; 95: 926–933.
  61. Ishida Y, Kubota H, Yamamoto A, Kitamura A, Bachinger HP, Nagata K. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2346–2355.
  62. Hantash BM, Bedi VP, Chan KF, Zachary CB. Ex vivo histological characterization of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 87–95.
  63. Liu H, Dang Y, Wang Z, Chai X, Ren Q. Laser induced collagen remodeling: a comparative study in vivo on mouse model. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 13–19.
  64. Orringer JS, Kang S, Johnson TM, Karimipour DJ, Hamilton T, Hammerberg C, Voorhees JJ, Fisher GJ. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1326–1332.
  65. Prieto VG, Diwan AH, Shea CR, Zhang P, Sadick NS. Effects of intense pulsed light and the 1,064 nm Nd:YAG laser on sun-damaged human skin: histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol Surg* 2005; 31: 522–525.



66. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 1980; 43: 47–51.
67. Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A. Changes in the nature of the collagen during development and resorption of granulation tissue. *Biochim Biophys Acta* 1973; 328: 383–390.
68. Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ. IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 561–568.
69. Haisa M, Okochi H, Grotendorst GR. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 560–563.
70. Kumar S, Millis AJ, Baglioni C. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4683–4687.
71. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am J Pathol* 2006; 168: 670–684.
72. Leask A, Denton CP, Abraham DJ. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1–6.
73. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103–111.
74. Tuli SS, Liu R, Chen C, Blalock TD, Goldstein M, Schultz GS. Immunohistochemical localization of EGF, TGF-alpha, TGF-beta, and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Curr Eye Res* 2006; 31: 709–719.
75. Latvala T, Tervo K, Mustonen R, Tervo T. Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy: a 12 month study. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 65–69.
76. Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM. TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. *J Cell Physiol* 1997; 170: 69–80.
77. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J* 1996; 41: 188–192.
78. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol* 1990; 137: 171–178.
79. Takenaka IM, Hightower LE. Transforming growth factor-beta 1 rapidly induces Hsp70 and Hsp90 molecular chaperones in cultured chicken embryo cells. *J Cell Physiol* 1992; 152: 568–577.
80. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 260–266.
81. Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 902–914.
82. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220–15225.
83. Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 1585–1593.
84. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2645–2655.
85. Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 96–101.
86. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 2002; 21: 25–29.
87. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2-less active, but more versatile? *Matrix Biol* 2001; 20: 509–514.
88. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002; 277: 4581–4584.
89. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296: 1644–1646.
90. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007; 102: 820–828.
91. Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA. Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation. *Am J Pathol* 2009; 174: 248–255.
92. Schalkwijk J, Steijlen PM, van Vlijmen-Willems IM, Oosterling B, Mackie EJ, Verstraeten AA. Tenascin expression in human dermis is related to epidermal proliferation. *Am J Pathol* 1991; 139: 1143–1150.
93. Schalkwijk J, Van VI, Oosterling B, Perret C, Koopman R, Van den Born J, Mackie EJ. Tenascin expression in hyperproliferative skin diseases. *Br J Dermatol* 1991; 124: 13–20.
94. Lightner VA. Tenascin: does it play a role in epidermal morphogenesis and homeostasis? *J Invest Dermatol* 1994; 102: 273–277.
95. Joshi P, Chung CY, Aukhil I, Erickson HP. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci* 1993; 106 (Part 1): 389–400.
96. Aukhil I, Joshi P, Yan Y, Erickson HP. Cell- and heparin-binding domains of the hexabrachion arm identified by tenascin expression proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 2542–2553.
97. Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 1991; 115: 1127–1136.
98. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 1988; 107: 2757–2767.
99. Jones FS, Burgoon MP, Hoffman S, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. A cDNA clone for cytotactin contains sequences similar to epidermal growth factor-like repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2186–2190.
100. Lightner VA, Gumkowski F, Bigner DD, Erickson HP. Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy. *J Cell Biol* 1989; 108: 2483–2493.

101. van der Vleuten CJ, Kroot EJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC. The immunohistochemical effects of a single challenge with an intermediate dose of ultraviolet B on normal human skin. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 510–516.
102. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelialization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005; 304: 274–286.
103. DePianto D, Coulombe PA. Intermediate filaments and tissue repair. *Exp Cell Res* 2004; 301: 68–76.
104. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 219–230.
105. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, Hudson LG. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005; 202: 858–866.
106. Tripathi MK, Misra S, Chaudhuri G. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 508–515.
107. Helbig D, Moebius A, Simon JC, Paasch U. Nonablative skin rejuvenation devices and the role of heat shock protein 70: results of a human skin explant model. *J Biomed. Opt.* 2010; 15: 038002.
108. Helbig D, Bodendorf M, Anderegg U., Simon JC., Paasch U. Human skin explant model to study molecular changes in response to fractional photothermolysis: spatio-temporal expression of HSP70. *Medical laser application* 2010; 25: 173–180.

Address:  
Uwe Paasch  
Department for Dermatology, Venerology  
and Allergology  
University of Leipzig  
Philipp-Rosenthal-Str  
23 04103 Leipzig  
Germany  
e-mail: uwe.paasch@medizin.uni-leipzig.de

## **Изменения, возникающие на молекулярном уровне при старении кожи и во время заживления ран после фракционного абляционного фототермолизиса**

Doris Helbig and Uwe Paasch

*Кафедра дерматологии, венерологии и аллергологии, Лейпцигский университет, Лейпциг, Германия*

Фотоповрежденная кожа характеризуется значительными перестройками внеклеточного матрикса и коллагеновой сетки, приводящими к очевидным клиническим признакам старения. УФ излучение увеличивает уровень матричной металлопротеиназы (ММП) 1, которая инициирует расщепление фибриллярного коллагена типа I и III. ММП2 и ММП3 в дальнейшем разрушают образующиеся фрагменты коллагена. Различные абляционные, неабляционные, термальные и нетермальные методы омоложения были протестированы на предмет их способности обращать вспять эпидермальные и дермальные признаки фото- и возрастного старения. Световая и лазерная терапии – одни из самых эффективных способов омоложения кожи. Стандартная лазерная терапия лечит всю обрабатываемую поверхность посредством селективного фототермолизиса или абляции. Недавнее внедрение фракционных абляционных лазеров привело к более быстрому заживлению ран и к тому, что существенное количество кожи целевой области остается необработанной. Пока что неизвестно, зависит ли эффективность такой частичной абляционной обработки кожи от степени микротравмирования и/или от количества вырабатываемого тепла. Основные молекулярные изменения еще не до конца изучены, но предполагается, что они индуцируются динамическими изменениями белков теплового шока, трансформирующего фактора роста  $\beta$ , ММП, гиалуронат-синтаза, гиалуронидаз и гиалуроновой кислоты, среди прочих.

Ключевые слова: старение кожи, фракционное лазерное омоложение кожи, белок теплового шока 70, трансформирующий фактор роста  $\beta$ , матричные металлопротеиназы.

© 2011 John Wiley & Sons A/S Accepted for publication 30 October 2010

Потребность в разработке как можно менее инвазивного лечения для сохранения и улучшения гладкости и тонуса кожи все время возрастает. Традиционная абляционная лазерная терапия углекислотным ( $\text{CO}_2$ ) лазером или эрбиевым лазером на иттрий-алюминиевом гранате (Er:YAG лазер) высоко эффективна для лечения морщин и кожи, претерпевшей фотостарение. Такое лечение удаляет весь эпидермис, приводя к его полной регенерации и широкомасштабному ремоделированию (1, 2). Однако абляционная шлифовка требует значительного времени реабилитации и может вызвать длительную эритему, гипо- и гиперпигментацию, инфекцию или образование рубцов (1). Заживление после неабляционной шлифовки требует меньше времени, но оказывается менее эффективным даже в случае прохождения нескольких сеансов лечения. Недавнее внедрение фракционных абляционных лазеров (AFR), первым из которых был лазер на эрбиевом стекле с длиной волны 1550 нм, позволило сократить время реабилитации и побочные эффекты (2). Испускаемый этими

приборами свет падает на кожу в виде мозаичного сигнала, который продуцирует в слое дермы множество микротермальных зон (MTZ) глубиной 300-400 мкм (2, 4). Было установлено, что столбики клеточного дебриса удаляются путем трансэпидермальной элиминации, после чего, благодаря воспалению, происходит ремоделирование (4, 5). Абляционная шлифовка кожи фракционным  $\text{CO}_2$  или Er:YAG лазером подвергает абляции как эпидермальный компартмент, так и часть дермального компартмента, в зависимости от значения энергии излучения (6). При использовании этих устройств рядом с микроскопическими зонами абляции (MAZ) происходит контролируемое коллатеральное нагревание дермы. Контролируемый температурный стресс эпидермального и дермального компартментов приводит к усиленному заживлению ран и, в конечном итоге, к ре-эпителизации и ремоделированию дермы (5). Наряду с более значительной степенью повреждений наблюдается более значительный и пролонгированный эффект индукции синтеза

нового коллагена и ремоделирования, по сравнению с неабляционными приборами (5,7). Остается невыясненным вопрос, является ли удаление материала кожи путем абляции наиболее эффективным способом разглаживания поверхностных морщин. Кроме того, до сих пор обсуждается необходимая глубина ремоделирования коллагена. Все абляционные приборы, представленные на рынке, имеют существенные отличия по глубине проникновения излучения. Также не получен пока что ответ на вопрос, является ли глубина абляции или глубина термального повреждения самым существенным параметром терапии.

Активация белков теплового шока (HSP70), по всей видимости, является одним первичных базовых изменений, происходящих на молекулярном уровне, помимо изменений регуляции других молекул, таких как трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), матричные металлопротеиназы (ММР), гиалуронат-синтетазы (HAS), гиалуронидазы (Hyal) и гиалуроновая кислота (HA) (5, 8–11).

### **Внутреннее и внешнее старение кожи**

Процесс старения кожи обусловлен как внутренними, так и внешними факторами. Внутренние структурные изменения являются естественным следствием старения и обусловлены генетическими особенностями. Внешние факторы, включающие воздействие солнечных лучей, загрязнение окружающей среды, курение, повторяющиеся движения лицевых мышц, например, зажмуривание и нахмуривание, такие составляющие образа жизни, как питание, поза сна, общее состояние здоровья, в различной степени контролируемы.

Внутреннее старение характеризуется гладкой истонченной кожей с выраженными мимическими морщинками и появлением таких доброкачественных новообразований, как себорейный кератоз и вишневая ангиома. Гистологические изменения заключаются в уплощении эпидермальных гребней, ослаблении поверхностных контактов между эпидермисом и дермой, что приводит к ухудшению обмена питательными веществами и метаболитами между двумя слоями кожи. Естественный процесс старения способствует генерации активных форм кислорода (ROS), что, в свою очередь, стимулирует процесс воспаления в коже, активируя транскрипционные факторы, которые регулируют протеолитическое расщепление внеклеточного матрикса (ЕСМ). Взаимосвязанная сеть ферментов, которые преобразуют АФК в безопасные для клеток молекулы воды и кислорода, входят в состав системы

антиоксидантной защиты, которая ослабевает по мере старения организма (13).

Кроме того, скорость процесса старения различных анатомических структур в пределах одного организма неодинакова и зависит от гормонального фона, в частности, от уровня эстрогена и тестостерона (16-18).

Внешнее старение кожи характеризуется такими признаками, как морщины, диспигментация, телеангиэктазия и потеря эластичности (19-21). Гистологический анализ фотоповрежденной кожи показывает значительные изменения в дерме, включая перестройку ЕСМ (22) и формирование солнечного эластога (20, 23, 24). Облучение УФ-А, который проникает внутрь дермы, инициирует лавину молекулярных и клеточных ответов, тем самым являясь причиной большинства хронических повреждений кожи. Индуцируемые ММР (25-27), сериновые протеазы (например, эластаза нейтрофилов), эластаза фибробластов (28), свободные радикалы, АФК и фактор пигментной ксеродермы приводят к деградации или повреждают дермальный коллаген и компоненты ЕСМ, например HA, способствуя инвагинации эпидермиса, являющейся первым этапом образования морщин (29-32). Кроме того, УФ лучи являются причиной истощения клеточных и ферментативных антиоксидантов (супероксиддисмутаза и каталаза) и активируют нейроэндокринную систему, приводя к иммуносупрессии и высвобождению нейроэндокринных медиаторов. На клеточном уровне УФ-облучение запускает продукцию цитокинов (33), индуцирует поверхностную экспрессию адгезионных молекул (34) и воздействует на такие клеточные процессы, как митоз, апоптоз и некроз (35). ММР 1 инициирует расщепление фибриллярного коллагена типа I и III в дерме, который в дальнейшем разрушается ММР 2 и 9 (36). Одновременная экспрессия ММР 2, ММР 3 и ММР 9 приводит к деградации неколлагеновых компонентов ЕСМ дермы, включая гликопротеины и протеогликаны базальной мембраны. В старой коже ММР уже присутствуют в более активном состоянии, поскольку уровень тканевых ингибиторов ММР в такой коже снижен (37). Более того, острое облучение УФ-В приводит в первые часы к легкому снижению уровня HA, а затем к его увеличению и активному обновлению в дерме (38). Интересно, что такое увеличение продукции HA происходит только после единичного облучения УФ-В в умеренной дозе (при участии HAS 2 и 3), в то время как высокие повторяющиеся дозы УФ-В ингибируют этот процесс (39). Вследствие этого, кожа,

постаревшая в результате УФ-облучения, содержит меньше НА, чем молодая кожа (40).

Дополнительный острый эффект УФ-облучения включает прямые воздействия на кератиноциты, такие как индукция некоторых интерлейкинов (IL) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), приводящие к инфильтрации кожи фагоцитами, которые сами по себе секретируют эти цитокины (41). IL-1 и TNF- $\alpha$  увеличивают скорость деградации протеоглиганов и ингибируют их биосинтез. TGF- $\beta$  и инсулиноподобный фактор роста 1 оказывают противоположный эффект, индуцируя синтез протеогликанов (42). Уровень простагландинов и других медиаторов воспаления, таких как гистамин и лейкотриены (43), а также гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора также возрастает в ответ на УФ-облучение (44). Эти провоспалительные медиаторы увеличивают проницаемость капилляров, приводя к инфильтрации и активации нейтрофилов и других фагоцитирующих клеток в коже. ROS продуцируются, главным образом, фагоцитами и многоядерными лимфоцитами и являются причиной окислительных повреждений клеточных белков, жиров, углеводов и ДНК (45). Одним из первичных событий ROS-опосредованного воспаления является активация транскрипционных факторов. Ядерный фактор  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) и активаторный белок 1 (AP-1) – транскрипционные факторы, которые играют роль в регуляции экспрессии разнообразных генов, вовлеченных в иммунные и воспалительные ответы, включая гены, кодирующие цитокины, матрикс-деградирующие металлопротеазы, адгезионные молекулы, регуляторы клеточного роста, дифференцировки и клеточной гибели (46). Индуцируемое свободными радикалами перекисное окисление липидов способствует увеличению активности фосфолипазы А, что, в свою очередь, приводит к усиленной продукции простагландинов (47). Фагоциты в дальнейшем стимулируют синтез и секрецию кератиноцитами элафина - ингибитора эластазы нейтрофилов человека, который впоследствии ограничивает повреждения, вызванные нейтрофилами (48).

#### **Молекулярные механизмы заживления ран после термальной, нетермальной, абляционной и неабляционной процедуры омоложения кожи**

Существует множество приборов для омоложения, которые за счет ранения кожи приводят к ремоделированию эпидермиса и дермы. Традиционные абляционные лазеры

подвергают абляции весь эпидермис и часть дермы, индуцируя широкомасштабное ремоделирование кожи, требующее значительного времени реабилитации (1, 2). Внедрение AFP и неабляционных лазеров привело к более быстрому заживлению ран, хотя при этом существенное количество кожи целевой области остается необработанной. Абляционная шлифовка кожи фракционным CO<sub>2</sub> или Er:YAG лазером индуцирует контролируемое коллатеральное нагревание дермы рядом с MAZ (49). Контролируемый в пространстве температурный стресс эпидермального и дермального компартментов приводит к усиленному заживлению ран и, в конечном итоге, к ре-эпителизации и ремоделированию дермы (3-7).

В дальнейшем для омоложения кожи с целью ослабления побочных эффектов и укорочения времени реабилитации были созданы различные неабляционные лазеры и источники светового излучения. Они воздействуют на процесс заживления раны посредством термального и фототермолитического повреждения, которое не травмирует или почти не травмирует окружающие ткани. Тепловое неабляционное фотоомоложение обычно заключается в ограниченном, выборочном термальном повреждении сосочкового и ретикулярного слоя дермы без ущерба для эпидермиса, которое приводит к активации фибробластов и синтезу нового коллагена (50-52). Приборы для микроигловой терапии вызывают неселективное микротравмирование. В настоящее время остается неизвестным, зависит ли эффективность конкретного метода омоложения кожи от степени микротравмирования, сопровождаемого или не сопровождаемого повреждением и нагреванием эпидермиса. Основные молекулярные изменения, происходящие в эпидермисе и дерме, до конца не выяснены, но доказано, что значительную роль играют такие факторы, как HSP70 и HSP47, TGF- $\beta$ , MMP, HAS, Hyals и HA (5, 8-11).

Лечение различными лазерами усиливает экспрессию белка HSP70 в эпидермисе вокруг микроскопических зон термального повреждения (через 2-48 часов после процедуры) и в структурах дермы, в частности, вокруг кровеносных сосудов, волосяных фолликулов и сальных желез (диодный лазер: 815 нм, 1,5 Вт, длительность импульса 3 с, поток энергии 145 Дж/см<sup>2</sup> (9, 53) или неабляционный фракционный диодный лазер: 1500 нм, энергия 5 мДж/MTZ, 1600 MTZs/см<sup>2</sup>) (4). Используя эксплантационную модель, мы показали, что белок HSP70 активируется при лечении фракционным

абляционным термальным CO<sub>2</sub> лазером (10600 нм; 50, 64, 100 или 300 мДж; 100-200 абляционных зон/см<sup>2</sup>), неабляционным термальным лазером на эрбиевом стекле (1540 нм; частота следования импульсов 1 Гц, поток энергии 30 Дж/см<sup>2</sup>), нетермальном хирургическом лечении. Однако, по всей видимости, HSP70 не играет значительной роли в ремоделировании кожи, индуцированного фотомодуляцией (LEDA SCR: красный свет 635 нм, 40-120 Вт/см<sup>2</sup>, 40-120 Дж/см<sup>2</sup>, LEDA SCR: желтый свет 585 нм, 16-35 Вт/см<sup>2</sup>, 20-100 Дж/см<sup>2</sup>) или использованием прибора для микроигловой терапии (250 микротравм/см<sup>2</sup>). AFP лечение CO<sub>2</sub> лазером приводил к выраженной активации HSP70 (показано иммуногистохимически) через 1 ч, с максимумом в промежутке времени между 1 и 24 часами после лечения, и значительному снижению в течение последующих 7 дней, вне зависимости от значения используемой энергии. При лечении неабляционным термальным лазером на эрбиевом стекле или хирургическом лечении максимальный уровень экспрессии был ниже и достигался позже по сравнению с AFP лечением (107, 108). Иммуногистохимические исследования белков HSP70 (HSP72 и HSP73) и HSP72 пациентов *in vivo* после AFP лечения CO<sub>2</sub> лазером показали, что самый высокий уровень экспрессии HSP70 и HSP72 в эпидермисе наблюдается на 3-14-й день после вмешательства (54). Белки теплового шока HSP – это стрессовые белки, которые активируются во всех типах клеток, подвергшихся тепловому или другим видам физического и химического стресса (55-58). Они усиливают способность клеток бороться с накоплением неправильно свернутых белков, одновременно с этим облегчая рефолдинг поврежденных белков или участвуя в синтезе новых белков с целью замещения безнадежно испорченных. Таким образом, белки HSP вовлечены в фундаментальные процессы клеточной репарации и в процесс заживления ран (59, 60). Белок HSP73 синтезируется постоянно, в то время как синтез белка HSP72, как правило, происходит только в стрессовой ситуации. Белок HSP47 локализуется в эндоплазматическом ретикулуме фибробластов, где он, главным образом, участвует в процессе синтеза и транспорта про- $\alpha$ 1(I) и про- $\alpha$ 2(I) цепей проколлагена I (61). Экспрессия HSP47 усиливается к 4-7-му дню после лазерного лечения и остается постоянной в течение 3-х месяцев (5, 54, 62), способствуя, тем самым, усиленному накоплению проколлагена и коллагена I и III типов (63-65). Уровень мРНК проколлагена I и III типов также повышается, достигая максимума к 21 дню после лечения и

оставаясь повышенным в течение, как минимум, 6 месяцев (64). В грануляционной ткани заживающей раны преобладает коллаген III типа (66). По мере заживления накапливается более жесткий коллаген I типа, в то время как количество коллагена III типа снижается (67). В нашем клиническом исследовании ремоделирование кожи всегда начиналось с восстановления эпидермального компартмента с частичной или полной (в зависимости от значения приложенной энергии) заменой MAZ к 14 дню посредством вновь синтезированного конденсированного проколлагена III. К 3-14-му дню количество макрофагов и гигантских клеток вокруг MAZ возрастает также в зависимости от значения приложенной энергии. Число макрофагов и гигантских клеток, вовлеченных в замещение зоны некроза, определяет будет ли заживление ран эффективным или затяжным, а также устанавливает предел абляции дермы и глубины ремоделирования (54). Макрофаги, так же как и фибробласты сами по себе секретируют активирующие цитокины и ростовые факторы (68-71).

Среди таких факторов роста можно назвать фактор TGF- $\beta$ , который долгое время считался наиболее важным в процессе ремоделирования тканей (7, 72, 73). Некоторые исследования показали индукцию или активацию TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 при различных видах неабляционного лазерного лечения (8, 74) через 2 дня после облучения, в то время как экспрессия TGF- $\beta$ 3 возрастает через 14 дней, сопровождая образование воспалительного инфильтрата. Уровень мРНК TGF- $\beta$ 1 резко возрастает в течение 3-х дней после шлифовки CO<sub>2</sub> лазером и остается повышенным в течение, как минимум, 28 дней (64). При изучении эксплантационной модели и в ходе клинических исследований мы показали, что экспрессия TGF- $\beta$  аналогична экспрессии HSP70 и достигает максимального значения в промежутке времени между 1 ч и 3 днями после AFP. Более того, инъекция TGF- $\beta$  в дерму индуцирует HSP70 независимо от лазерной терапии, выполняя функцию положительного контроля (107, 108). TGF- $\beta$  способствует синтезу таких компонентов матрикса, как фибронектин (75, 76) и коллаген (77), трансформации миофибробластов (73, 78), иммуномодуляции, ангиогенезу и реакции теплового шока (79). После связывания TGF- $\beta$  со своим рецептором на поверхности клетки происходит фосфорилирование цитоплазматических медиаторов (Smad2 или Smad3) и образование гетеродимерного комплекса с общим медиатором Smad4. Этот гетеродимер перемещается в клеточное ядро, связывается с промоторами генов

и осуществляет TGF- $\beta$ -зависимую регуляцию генной экспрессии (80, 81). Различные цитокины, например, TNF- $\alpha$ , блокируют сигнальный путь TGF- $\beta$ /Smad путем активации c-Jun N-концевой киназы, выступая, тем самым, антагонистом TGF- $\beta$ 1, который активирует коллаген I и III типа и фибронектин в фибробластах (82-84). Повышенный уровень мРНК TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  наблюдается в течение первых 3-х дней после лечения, а затем на 6-8-й день он резко снижается (64).

Уровень мРНК MMP1, фермента, катализирующего первый этап расщепления коллагена, повышался в первые 3 дня после терапии CO<sub>2</sub> лазером, достигая максимума к 7-му дню и снижаясь в течение 2-х последующих недель. Аналогичную динамику имел уровень мРНК MMP3, кодирующей фермент, который расщепляет частично расщепленный коллаген и другие белки матрикса, такие как протеогликаны и эластин. Уровень мРНК MMP3 быстро возрастал на 2-7-й день и затем резко падал в течение последующей недели. Хотя уровень мРНК MMP9 также возрастал к 6-му дню после лечения, в отличие от MMP1 и MMP3, он оставался повышенным (около максимального значения) в течение, как минимум, 28 дней после шлифовки, участвуя в остаточной деградации фрагментов коллагена, образовавшихся при действии MMP1 (64). Уровень мРНК MMP13 возрастает в замедленном темпе, достигая максимума к 14-му дню после лечения и снижаясь в течение последующих 2-х недель, оставаясь еще слегка повышенным на 28-й день после шлифовки. Существуют доказательства, что MMP13 вовлечен в ремоделирование вновь синтезирующегося коллагена, которое происходит на поздних стадиях заживления ран (85).

HA, также называемая гиалуронатом, - это высокомолекулярный углеводный полимер (600-1000 кДа), который является неотъемлемой частью внеклеточного матрикса эпидермиса и дермы (86). Существует устойчивый баланс между его синтезом и деградацией. Скорость его обмена в дерме составляет 1-2 дня. В коже человека существует три типа фермента, синтезирующих HA (HAS1-3), и три типа фермента, расщепляющих HA (Hyal1-3). Фибробласты дермы поглощают HA при ее связывании со своим основным рецептором CD44, после чего происходит деградация HA в лизосомах. Hyal-1 расщепляет HA на более мелкие фрагменты, Hyal-2 - на фрагменты массой 10-20 кДа (86, 87). Новые молекулы HA синтезируются ферментами HAS. Молекулы HA делятся на подтипы, в зависимости от их

локализации в дермальном компартменте и их размера. HAS-1 и HAS-2 продуцируют сахараиды массой 200-400 кДа, HAS-3 - массой 40-250 кДа (88). После лечения фракционным абляционным Er:YAG лазером наблюдаются небольшие изменения уровня HAS и Hyal, что приводит к изменению синтеза HA. Рост содержания HA в коже может быть определен иммуногистохимически.

### **Заключение и перспективы**

Хотя основные молекулярные изменения, возникающие в ответ на абляционное и неабляционное, а также термальное и нетермальное омоложение кожи до конца еще не выяснены, исследования показывают, что важную роль в таких изменениях играют HSP70 и HSP47, TGF- $\beta$ , различные MMP, HAS, Hyals и HA. В дальнейшем было бы интересно изучить, к каким молекулярным изменениям приводят различные режимы лазерного лечения. Такое исследование способствовало бы оптимизации протокола лечения, благодаря лучшему пониманию молекулярных изменений, и возможности влиять на них. Также необходимо определить, какой прибор, уровень абляции и термального повреждения будут максимально стимулировать неоколлагенез.

Кажется, что для достижения хорошего клинического эффекта продолжительность импульса является самым решающим параметром. При более длительном импульсе коже передается больше тепла, при более коротком - меньше. Слишком сильное нагревание может вызвать образование рубцов.

Изучение других факторов, влияющих на процесс заживления раны, также может быть полезным для развития лазерного омоложения кожи. Одним из таких факторов является  $\beta$ -катенин - ключевой компонент сигнального пути Wnt, который активируется при заживлении раны или в ответ на облучение. Он формирует транскрипционно активный комплекс с членами семейства факторов T-клеток, увеличивая размер и число фибробластов и запуская экспрессию генов-мишеней, кодирующих внеклеточные структурные белки (89, 90). Их уровень имеет положительную корреляцию с пределом прочности раны и уровнем экспрессии коллагена I типа в коже (91) (Рис. 1).

Тенасцин - это белок внеклеточного матрикса, который индуцируется при пролиферации эпидермиса во время гиперпролиферативных болезней кожи, таких как псориаз (92-94), а также во время заживления ран (94). Были сделаны предположения, что тенасцин усиливает миграцию кератиноцитов, выступая в

качестве молекулы, прилипающей к субстрату, при развитии и регенерации эпидермальных и аднексальных структур (95-97). Тенасцин отличается по структуре от других гликопротеинов ЕСМ, хотя наблюдается гомология между его кДНК и кДНК фибронектина, фибриногена и эпидермального фактора роста (99). Экспрессия тенасцина регулируется при помощи различных механизмов (93, 98). В нормальной человеческой коже он может быть обнаружен в сосочковом слое дермы под базальной пластинкой и рядом с базальной мембраной (93, 100). Усиленная и продолжительная экспрессия тенасцина наблюдается через 48 часов после соскоба липкой лентой или УФ-В-облучения. Такой повышенный уровень экспрессии сохраняется в течение 14 дней (92, 101) (Рис. 1).

Через несколько часов после повреждения параллельно с ремоделированием дермы начинается ре-эпителизация, которая необходима для закрывания дефектов тканей и восстановления барьерной функции (102). После повреждения изменяются межклеточные и клеточно-матричные взаимодействия, происходит реорганизация цитоскелета, вследствие чего кератиноциты на краю раны становятся подвижными и распластываются по поверхности раны (103, 104). Изменения, происходящие на краю заживающей раны, напоминают некоторые

особенности эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ), который происходит во время эмбрионального развития и во время метастазирования злокачественных опухолей (105). Процесс ЕМТ характеризуется потерей межклеточной адгезии, опосредованной адгезионными контактами и десмосомами, потерей полярности, увеличением секреции протеиназ, деградирующих компоненты ЕМС, заменой кератиновых промежуточных филаментов на виментиновые и усилением клеточной подвижности. Транскрипционные факторы семейства Snail известны как регуляторы ЕМТ во время развития. Существуют доказательства, что транскрипционный фактор Slug (Snail2) модулирует ЕМТ-подобные процессы в кератиноцитах, включая их миграцию и заживление ран (105). Экспрессия фактора Slug на краю раны *in vivo* и *in vitro* достигает максимального значения через 72 часа после ранения, подавляя при этом экспрессию Е-кадгерина и кератина 8 (106).

Мы исследуем клеточные культуры кератиноцитов и фибробластов после облучения с целью количественного и качественного анализа их цитокинового профиля. Результаты этих *in vitro* исследований могут быть использованы в дальнейшем при экспериментах на эксплантационной модели и для исследований заживления ран *in vivo*.



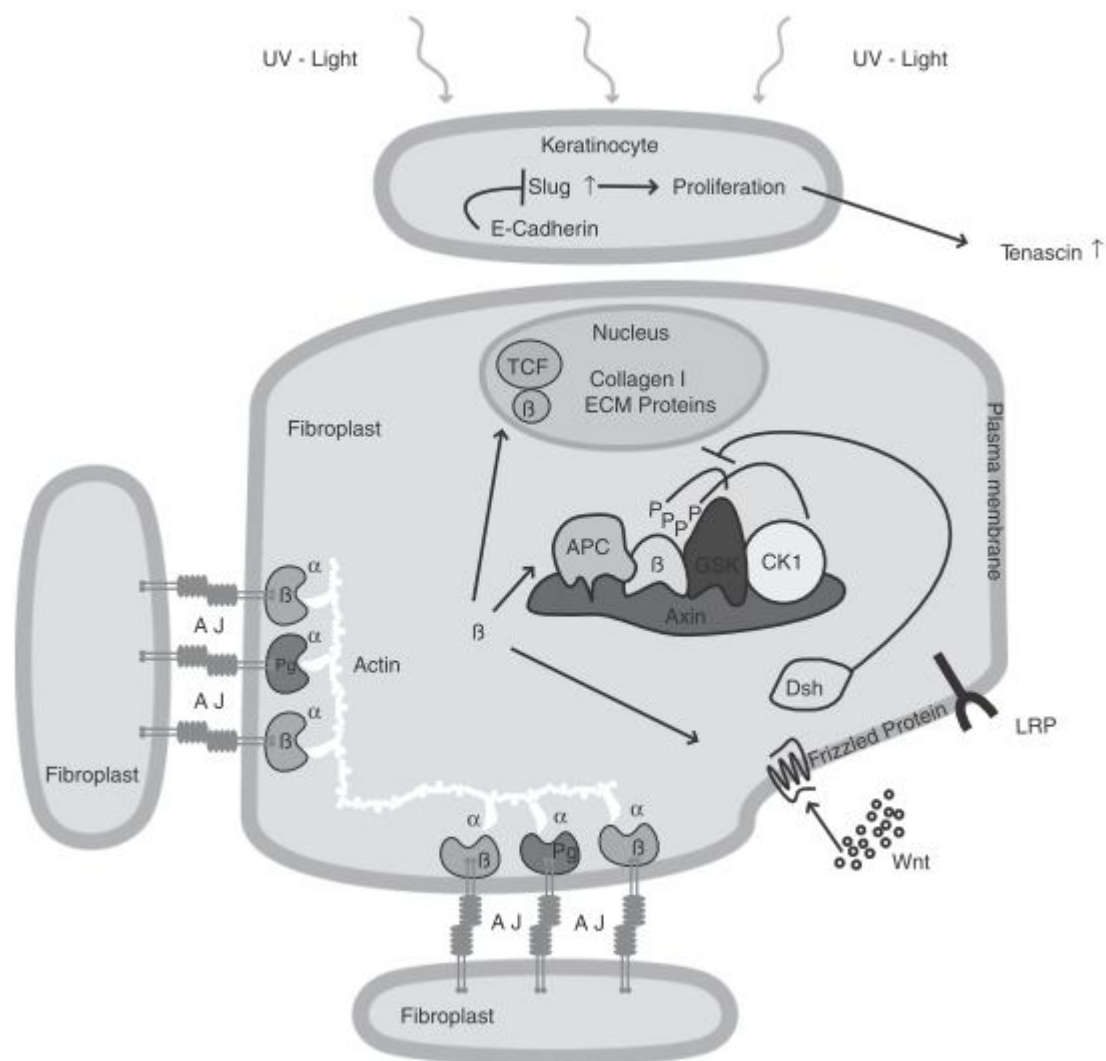


Рис. 1. Роль  $\beta$ -катенина и тенасцина в процессе заживления раны и при облучении:  $\beta$ -катенин ( $\beta$ ) и плакоглобин (Pg) связывается с цитоплазматическим доменом трансмембранного кадгеринового рецептора адгезии и посредством  $\alpha$ -катенина ( $\alpha$ ) связывается с актиновым цитоскелетом, формируя адгезионные контакты (AJ). Когда сигнальный путь Wnt неактивен, цитоплазматический пул  $\beta$ -катенина деградирует при помощи молекулярного комплекса, включающего белок аденоматозного полипоза (APC), аксин, а также киназу 1 (CK1) и киназу гликоген синтазы 3 (GSK), которые фосфорилируют  $\beta$ -катенин (PPPP). Связывание Wnt с Frizzled рецептором (Frz) и его корецептором LRP активирует сигнальный путь Wnt. Это индуцирует Dishevelled (Dsh)-опосредованное ингибирование фосфорилирования  $\beta$ -катенина GSK, тем самым блокируя деградацию  $\beta$ -катенина и способствуя его накоплению и формированию в ядре комплексов с фактором Т-клеток (TCF). Эти комплексы активируют гены-мишени, которые кодируют коллаген I типа и белки внеклеточного матрикса (ECM). Медленное усиление экспрессии генов в кератиноцитах у края раны приводит к распластыванию клеток, разрушению десмосом и последующей реэпителизации раны.

## Список литературы

1. Biesman BS. Fractional ablative skin resurfacing: complications. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 177–178.
2. Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med* 2004; 34: 426–438.
3. Farkas JP, Richardson JA, Hoopman J, Brown SA, Kenkel JM. Microisland damage with a nonablative 1540-nm Er: glass fractional laser device in human skin. *J Cosmet Dermatol* 2009; 8: 119–126.
4. Laubach HJ, Tannous Z, Anderson RR, Manstein D. Skin responses to fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 142–149.
5. Hantash BM, Bedi VP, Kapadia B, Rahman Z, Jiang K, Tanner H, Chan KF, Zachary CB. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 96–107.
6. Bodendorf MO, Grunewald S, Wetzig T, Simon JC, Paasch U. Fractional laser skin therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; 7: 301–308.
7. Geronemus RG. Fractional photothermolysis: current and future applications. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 169–176.
8. Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen* 2007; 15: 866–874.
9. Souil E, Capon A, Mordon S, DinhXuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol* 2001; 144: 260–266.
10. Wilmink GJ, Opalenik SR, Beckham JT, Abraham AA, Nanney LB, Mahadevan-Jansen A, Davidson JM, Jansen ED. Molecular imaging-assisted optimization of hsp70 expression during laser-induced thermal preconditioning for wound repair enhancement. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 205–216.
11. Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 2000; 6: 391–407.
12. Bergfeld WF. The aging skin. *Int J Fertil Womens Med* 1997; 42: 57–66.
13. Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1212–1217.
14. Elias PM. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 1996; 5: 191–201.
15. Waller JM, Maibach HI. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res Technol* 2006; 12: 145–154.
16. Wespes E, Schulman CC. Male andropause: myth, reality, and treatment. *Int J Impot Res* 2002; 14 (Suppl 1): S93–S98.
17. Brincat MP, Baron YM, Galea R. Estrogens and the skin. *Climacteric* 2005; 8: 110–123.
18. Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 555–568.
19. Griffiths CE. The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 1992; 127 (Suppl 41): 37–42.
20. Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M, Imokawa G. Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol* 1994; 131: 641–648.
21. Glogau RG. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin* 1997; 15: 555–559.
22. Mitchell RE. Chronic solar dermatosis: a light and electron microscopic study of the dermis. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 203–220.
23. Kligman LH. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* 1989; 5: 235–251.
24. Bernstein EF, Chen YQ, Kopp JB, Fisher L, Brown DB, Hahn PJ, Robey FA, Lakkakorpi J, Uitto J. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 209–218.
25. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 43–48.
26. Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, Kang S, Voorhees JJ. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 219–226.
27. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996; 379: 335–339.
28. Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, Tsuji N, Suzuki Y, Fujimura T, Imokawa G. Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 671–677.
29. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 1997; 337: 1419–1428.
30. Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M, Asai J. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 39–44.
31. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 31–43.
32. Halliday GM. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutat Res* 2005; 571: 107–120.
33. Takashima A, Bergstresser PR. Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 397–400.
34. Krutmann J, Grewe M. Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 67S–70S.
35. Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, Donawho CK, Kripke ML, Fidler IJ. Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 864–872.
36. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6: 199–213.
37. Ashcroft GS, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA. *J Pathol* 1997; 183: 169–176.
38. Averbeck M, Gebhardt CA, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer CC, Sleeman JP, Simon JC. Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB

- irradiation. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 687–697.
39. Kakizaki I, Itano N, Kimata K, Hanada K, Kon A, Yamaguchi M, Takahashi T, Takagaki K. Upregulation of hyaluronan synthase genes in cultured human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *Arch Biochem Biophys* 2008; 471: 85–93.
  40. Sudel KM, Venzke K, Mielke H et al. Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 581–587.
  41. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 397–403.
  42. Tiedemann K, Malmstrom A, Westergren-Thorsson G. Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separate and synergistic effects. *Matrix Biol* 1997; 15: 469–478.
  43. Gonzalez S, Pathak MA. Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by polydodium leucotomos. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1996; 12: 45–56.
  44. Schwarz T, Luger TA. Effect of UV irradiation on epidermal cell cytokine production. *J Photochem Photobiol B* 1989; 4: 1–13.
  45. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *Int J Cosmet Sci* 2005; 27: 17–34.
  46. Abeyama K, Eng W, Jester JV, Vink AA, Edelbaum D, Cockerell CJ, Bergstresser PR, Takashima A. A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest* 2000; 105: 1751–1759.
  47. Haratake A, Uchida Y, Mimura K, Elias PM, Holleran WM. Intrinsically aged epidermis displays diminished UVB-induced alterations in barrier function associated with decreased proliferation. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 319–323.
  48. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S. Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion in vitro. *Br J Dermatol* 2000; 143: 728–732.
  49. Tannous Z. Fractional resurfacing. *Clin Dermatol* 2007; 25: 480–486.
  50. Trelles MA, Allones I, Velez M. Nonablative facial skin photorejuvenation with an intense pulsed light system and adjunctive epidermal care. *Lasers Med Sci* 2003; 18: 104–111.
  51. Goldberg DJ, Sarradet D, Hussain M, Krishtul A, Phelps R. Clinical, histologic, and ultrastructural changes after nonablative treatment with a 595-nm flashlamp-pumped pulsed dye laser: comparison of varying settings. *Dermatol Surg* 2004; 30: 979–982.
  52. Fatemi A, Weiss MA, Weiss RA. Short-term histologic effects of nonablative resurfacing: results with a dynamically cooled millisecond-domain 1320 nm Nd:YAG laser. *Dermatol Surg* 2002; 28: 172–176.
  53. Capon A, Souil E, Gauthier B, Sumian C, Bachelet M, Buys B, Polla BS, Mordon S. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med* 2001; 28: 168–175.
  54. Helbig D, Bodendorf MO, Grunewald S, Kandler M, Simon JC, Paasch U. Immunohistochemical investigation of wound healing in response to fractional photothermolysis. *J Biomed Opt* 2009; 14: 064044.
  55. O'Connell-Rodwell CE, Shriver D, Simanovskii DM et al. A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *FASEB J* 2004; 18: 264–271.
  56. Maytin EV, Wimberly JM, Anderson RR. Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 635–642.
  57. O'Connell-Rodwell CE, Mackanos MA, Simanovskii D, Cao YA, Bachmann MH, Schwetman HA, Contag CH. In vivo analysis of heat-shockprotein-70 induction following pulsed laser irradiation in a transgenic reporter mouse. *J Biomed Opt* 2008; 13: 030501.
  58. Wilmink GJ, Opalenik SR, Beckham JT, Davidson JM, Jansen ED. Assessing laser-tissue damage with bioluminescent imaging. *J Biomed Opt* 2006; 11: 041114.
  59. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1291–1301.
  60. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 1995; 95: 926–933.
  61. Ishida Y, Kubota H, Yamamoto A, Kitamura A, Bachinger HP, Nagata K. Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2346–2355.
  62. Hantash BM, Bedi VP, Chan KF, Zachary CB. Ex vivo histological characterization of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 87–95.
  63. Liu H, Dang Y, Wang Z, Chai X, Ren Q. Laser induced collagen remodeling: a comparative study in vivo on mouse model. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 13–19.
  64. Orringer JS, Kang S, Johnson TM, Karimipour DJ, Hamilton T, Hammerberg C, Voorhees JJ, Fisher GJ. Connective tissue remodeling induced by carbon dioxide laser resurfacing of photodamaged human skin. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1326–1332.
  65. Prieto VG, Diwan AH, Shea CR, Zhang P, Sadick NS. Effects of intense pulsed light and the 1,064 nm Nd: YAG laser on sun-damaged human skin: histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol Surg* 2005; 31: 522–525.
  66. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 1980; 43: 47–51.
  67. Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A. Changes in the nature of the collagen during development and resorption of granulation tissue. *Biochim Biophys Acta* 1973; 328: 383–390.
  68. Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ. IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 561–568.
  69. Haisa M, Okochi H, Grotendorst GR. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 560–563.
  70. Kumar S, Millis AJ, Baglioni C. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4683–4687.
  71. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am J Pathol* 2006; 168: 670–684.
  72. Leask A, Denton CP, Abraham DJ. Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1–6.
  73. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming

- growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103–111.
74. Tuli SS, Liu R, Chen C, Blalock TD, Goldstein M, Schultz GS. Immunohistochemical localization of EGF, TGF-alpha, TGF-beta, and their receptors in rat corneas during healing of excimer laser ablation. *Curr Eye Res* 2006; 31: 709–719.
75. Latvala T, Tervo K, Mustonen R, Tervo T. Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy: a 12 month study. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 65–69.
76. Clark RA, McCoy GA, Folkvord JM, McPherson JM. TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrixdependent event. *J Cell Physiol* 1997; 170: 69–80.
77. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J* 1996; 41: 188–192.
78. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, Martin PM. Heliumneon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol* 1990; 137: 171–178.
79. Takenaka IM, Hightower LE. Transforming growth factor-beta 1 rapidly induces Hsp70 and Hsp90 molecular chaperones in cultured chicken embryo cells. *J Cell Physiol* 1992; 152: 568–577.
80. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 260–266.
81. Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 902–914.
82. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220–15225.
83. Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A. A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven SMAD3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 1585–1593.
84. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2645–2655.
85. Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, Saarialho-Kere U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 96–101.
86. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 2002; 21: 25–29.
87. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2-less active, but more versatile? *Matrix Biol* 2001; 20: 509–514.
88. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002; 277: 4581–4584.
89. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296: 1644–1646.
90. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007; 102: 820–828.
91. Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA. Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation. *Am J Pathol* 2009; 174: 248–255.
92. Schalkwijk J, Steijlen PM, van Vlijmen-Willems IM, Oosterling B, Mackie EJ, Verstraeten AA. Tenascin expression in human dermis is related to epidermal proliferation. *Am J Pathol* 1991; 139: 1143–1150.
93. Schalkwijk J, Van VI, Oosterling B, Perret C, Koopman R, Van den Born J, Mackie EJ. Tenascin expression in hyperproliferative skin diseases. *Br J Dermatol* 1991; 124: 13–20.
94. Lightner VA. Tenascin: does it play a role in epidermal morphogenesis and homeostasis? *J Invest Dermatol* 1994; 102: 273–277.
95. Joshi P, Chung CY, Aukhil I, Erickson HP. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci* 1993; 106 (Part 1): 389–400.
96. Aukhil I, Joshi P, Yan Y, Erickson HP. Cell- and heparin-binding domains of the hexabrachion arm identified by tenascin expression proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 2542–2553.
97. Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. *J Cell Biol* 1991; 115: 1127–1136.
98. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 1988; 107: 2757–2767.
99. Jones FS, Burgoon MP, Hoffman S, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. A cDNA clone for cytactin contains sequences similar to epidermal growth factor-like repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2186–2190.
100. Lightner VA, Gumkowski F, Bigner DD, Erickson HP. Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy. *J Cell Biol* 1989; 108: 2483–2493.
101. van der Vleuten CJ, Kroot EJ, de Jong EM, van de Kerkhof PC. The immunohistochemical effects of a single challenge with an intermediate dose of ultraviolet B on normal human skin. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 510–516.
102. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005; 304: 274–286.
103. DePianto D, Coulombe PA. Intermediate filaments and tissue repair. *Exp Cell Res* 2004; 301: 68–76.
104. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 219–230.
105. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, Hudson LG. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005; 202: 858–866.
106. Tripathi MK, Misra S, Chaudhuri G. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 508–515.
107. Helbig D, Moebius A, Simon JC, Paasch U. Nonablative skin rejuvenation devices and the role of heat shock protein 70: results of a human skin explant model. *J. Biomed. Opt.* 2010; 15: 038002.
108. Helbig D, Bodendorf M, Anderegg U., Simon JC., Paasch U. Human skin explant model to study molecular changes in response to fractional photothermolysis: spatio-temporal expression of HSP70. *Medical laser application* 2010; 25: 173–180.

