

Даний винахід відноситься до косметичного використання електромагнітного випромінювання. Косметична обробка передбачає зменшення або пом'якшення, видалення або зменшення зморщок або тонких ліній, особливо (але не винятково) зморщок обличчя чи шиї та інших ознак старіння. Даний винахід також передбачає використання електромагнітного випромінювання для загального омолодження шкіри, уповільнення ознак старіння і поліпшення пружності шкіри, відтінку та зовнішнього вигляду шкіри. Відповідно до даного винаходу пропонується також спосіб обробки шкіри, який дозволяє забезпечити зменшення або пом'якшення, уповільнення або реверсування видимих ознак старіння та поліпшення краси шкіри, і пристрій, що дозволяє здійснювати такі косметичні обробки.

У молодій шкірі колаген, що перебуває безпосередньо під поверхнею шкіри, утворює організовану решітку з доброю пружністю і гнучкістю. Коли жінки проходять через менопаузу, а чоловіки старіють, ті й інші зіштовхуються зі збільшенням зморщуватості шкіри і зменшенням її товщини. У ході старіння, колаген змінює свою структуру, що негативно впливає на косметичний зовнішній вигляд шкіри. Зміни в колагені можуть бути також прискорені тривалим впливом УФ променів сонця. Мільйони фунтів витрачають щорічно англієць на покупку косметичної продукції, причому можна вважати, що середня англієцька жінка витрачає біля 800 фунтів на рік на купівлю косметики і засобів догляду за шкірою.

Вже відоме використання хімічного пілінгу (відшелушування) або косметичних препаратів, зазвичай у вигляді кремів, для запобігання або пом'якшення зморщок і у якості засобів проти старіння. Такі препарати можуть містити синтетичні речовини або продукти рослинного та/або тваринного походження. Композиції наносять локально і зазвичай на регулярній основі, щоб максимально підвищити їхню ефективність. Однак свідчення того, що навіть постійне використання таких композицій призводить до пом'якшення видимих ознак старіння, є обмеженими.

В якості альтернативи використанню косметичних препаратів і хірургічних підтяжок вже відоме використання джерела електромагнітного випромінювання низького рівня, що дозволяє досягти фотохімічних реакцій у шкірі, які зазвичай називають біостимуляцією. Біостимуляція заснована на концепції посилення реплікації та синтезу, що призводить до підвищення утворення колагену, поліпшення стимуляції фібробласта або до підвищення синтезу ДНК. Світлова енергія поглинається в цитохромах (гістогематині) і порфірині усередині клітинної мітохондрії і клітинні мембрани виробляють невелику кількість синглетного кисню. Зазвичай, пацієнти потребують від 4 до 6 сеансів лікування у випадку гострих станів і від 6 до 8 сеансів у випадку хронічних станів. Цей тип лікування є тривалим і дорогим.

Починаючи з дев'яностих років для очищення поверхні шкіри й видалення зморщок почали використовувати лазери. Видалення зморщок являє собою, агресивну технологію, при якій шар за шаром видаляють тканину, проникають у дерму й ефективно індукують опік другого ступеня. Тепло, що вводиться у дерму, скорочує колаген і стягає шкіру. Лазер індукує денатурацію колагену в дермі й утворення поперекових зв'язків, що призводить до виникнення ефекту стягування шкіри, в результаті чого зменшуються або видаляються зморшки. Цей спосіб називається термолізом і теплове нагрівання тканин є необхідною умовою терапії, причому можна вважати, що термічний поріг для термолізу становить близько 70°C. Однак при традиційній обробці лазером виникає проблема, пов'язана з тим, що пацієнт може одержати опіки і тому мати протягом декількох тижнів після лікування мокнучу шкіру, струпи й почервоніння шкіри. Крім того, є повідомлення про високий ступінь гіперпігментації після видалення зморщок за допомогою CO₂ лазера.

В зв'язку з викладеним, існує необхідність в альтернативному, ефективному й безпечному способі, який дозволить забезпечити зменшення або пом'якшення, видалення або убавлення зморщок або тонких ліній, омолодження шкіри, уповільнення ознак старіння й поліпшення пружності шкіри, відтінку та зовнішнього вигляду шкіри і, у цілому, поліпшення краси шкіри.

Відповідно до першого аспекту даного винаходу пропонується спосіб косметичної обробки поверхневої області шкіри ссавців, який передбачає опромінення шкіри за допомогою джерела розбіжного електромагнітного випромінювання (з довжиною хвилі) від 900 нм до 1500 нм.

Використаний тут термін "косметична обробка" містить у собі зменшення або пом'якшення, видалення або убавлення зморщок або тонких ліній, омолодження шкіри, уповільнення або реверсування видимих ознак старіння, поліпшення пружності шкіри, відтінку, текстури й зовнішнього вигляду шкіри, і, у цілому, поліпшення краси шкіри.

Використаний тут термін "шкіра" включає в себе самий верхній епідерміс, базальний шар і дерму обличчя, грудей, рук, сідниць, стегон, живота або шиї.

У всьому тексті опису винаходу й формули винаходу, слова "містить у собі" й "містить" і похідні від них, такі як, наприклад "який містить", означають "містить у собі, але без обмеження", і не призначені для того, щоб виключати (і не виключають) використання часток, добавок, компонентів, цілих чисел або операцій.

У всьому тексті опису винаходу й формули винаходу, однина містить у собі множину, якщо тільки інше спеціально не зазначено в контексті. Зокрема, використану в описі винаходу одинину варто розуміти як і можливість множини, якщо тільки інше не мається на увазі, виходячи з контексту.

Слід розуміти, що будь-які ознаки, цілі числа, характеристики, сполуки, хімічні компоненти або групи, описані стосовно до конкретного аспекту, варіанту або прикладу винаходу, можуть застосовуватися у будь-якому іншому описаному тут аспекті, варіанті або прикладі винаходу, якщо тільки немає несумісності з ним.

Переважно, кут розбіжності світла становить від 10° до 50°. Під розбіжністю світла розуміють, що електромагнітне випромінювання, яке випромінюється електромагнітним джерелом, має половинний кут розбіжності, що становить щонайменше 5°. Переважно, розбіжне електромагнітне випромінювання має половинний кут розбіжності в діапазоні від 15° до 25°.

Таким чином, варто мати на увазі, що спосіб відповідно до даного винаходу не передбачає використання лазерів у якості джерела електромагнітного випромінювання.

Автори даного винаходу виявили, що електромагнітне випромінювання з низькою інтенсивністю і з вузькою шириною смуги пропускання (переважно, орієнтовно від 10 нм до 120 нм, переважніше, близько 50 нм) є ефективним при косметичній обробці шкіри. Можна припускати, що електромагнітне випромінювання впливає на шкіру за рахунок проходження енергії через клітинні компоненти/органели та ферменти, викликаючи (але без обмеження) індукований синтез оксиду азоту (iNOS). Молекула води, що має певний

діапазон пропускання довжин хвиль електромагнітного випромінювання, утворює безліч піків пропускання. Ці піки пропускання пов'язані із кращим діапазоном довжин хвиль терапевтичного електромагнітного випромінювання відповідно до даного винаходу і, отже, підсилюють роль молекули води в загальному механізмі дії.

Переважно, довжина хвилі електромагнітного випромінювання концентрована навколо однієї або декількох специфічних довжин хвиль, обраних із групи, яка включає 940 нм, 950 нм, 1040 нм, 1060 нм, 1072 нм та 1267 нм.

Проведене авторами дослідження показало, що довжини хвиль, концентровані навколо зазначених вище довжин хвиль, а особливо навколо єдиної обмеженої ширини смуги пропускання світла, концентрованої на довжині хвилі 1072 нм або 1267 нм, є особливо ефективними для зменшення довжини та площі зморшки. Варто мати на увазі, що ці дві довжини хвилі відповідають довжинам хвиль пікового випромінювання профілю пропускання світла молекулою води, так що можна вважати, що механізм дії пов'язаний з водою і, можливо, з клітинними мембранами.

Проведене авторами дослідження також показало, що довжини хвиль 1072 нм і 880 нм викликають протилежну дію на життєздатність лімфоцитів *ex vivo* (у живому організмі), причому перша довжина хвилі є захисною, а остання довжина хвилі є цитотоксичною. Більш того, є свідчення того, що 1072 нм захищає від УФ - опосередкованої лімфотоксичності.

Переважно, електромагнітне випромінювання є безперервним або пульсуючим (імпульсним).

Переважно, коли електромагнітне випромінювання є безперервним, його інтенсивність становить щонайменше від 500 мкВт/см² і до 500 мВт/см².

Переважно, коли електромагнітне випромінювання є пульсуючим, його інтенсивність (потужність) становить щонайменше 500 мкВт/см² у піку, а середня інтенсивність становить до 500 мВт/см². Середня інтенсивність дорівнює піковій інтенсивності, помноженій на пропорцію повного часу, протягом якого діє випромінювання. Наприклад, якщо пікова інтенсивність дорівнює 500 мкВт/см² і тривалість імпульсу становить 10 мкс при частоті проходження імпульсів 600 Гц, то тоді середня інтенсивність дорівнює 30 мкВт/см².

Відомі раніше методики, засновані на термічному нагріванні, вказують у якості нижньої межі потужність у 0.5 Вт/см², у той час як відповідно до даного винаходу пропонується уникати будь-яких теплових ефектів і працювати нижче цього рівня.

Переважно, коли електромагнітне випромінювання є пульсуючим, його середня інтенсивність лежить у діапазоні 50-100 мкВт/см².

Автори даного винаходу виявили, що придатний діапазон потужностей, прикладених до шкіри, становить від 500 мкВт/см² у піку до 500 мВт/см² у безперервному режимі. Зазвичай використовують 20 мВт/см², прикладених до шкіри, однак варто мати на увазі, що це значення залежить від того, наскільки гладким або м'язистим є пацієнт і наскільки глибокою є зморшка.

Переважно, коли електромагнітне випромінювання є пульсуючим, його прикладають протягом періодів (тривалості імпульсів), які складають щонайменше 10-15 мкс, і переважно прикладають з частотою/частотою проходження імпульсів у діапазоні 300-900 Гц, а бажаніше, з частотою/ частотою проходження імпульсів близько 600 Гц.

Проведене авторами дослідження показало, що електромагнітне випромінювання може бути як когерентним, так і некогерентним, тому що клінічні результати не залежать від цього параметра.

Переважно, електромагнітне випромінювання прикладають до ураженої області щонайменше на 30 секунд і до декількох хвилин. Типовий час експонування становить близько 3 хвилин, однак для більш глибоких зморшок цей час збільшують відповідно до індивідуальної товщини шару жиру, при цьому час експонування може досягати 10 хвилин.

Варто мати на увазі, що джерело живлення для пристрою електромагнітного випромінювання повинне мати потужність, що перевищує необхідну інтенсивність, яка створює клінічний ефект, тому що нами було виявлено, що орієнтовно 99% прикладеної терапевтичної кількості світла губиться при проходженні через поверхню шкіри в ході лікування. Таким чином, інтенсивність прикладеного випромінювання необхідно регулювати при проведенні лікування.

З наведеного вище стає зрозумілим, що електромагнітне випромінювання може бути спрямоване на задане місце безперервно або у вигляді імпульсів. Основна перевага імпульсного режиму полягає в ефективному використанні потужності, при цьому можна прикладати набагато більшу потужність у піку, що поліпшує косметичний ефект.

Переважно, терапевтичне джерело електромагнітного випромінювання містить засіб зменшення кількості навколишнього випромінювання, що могло б впливати на ділянку лікування.

Переважно, джерело електромагнітного випромінювання являє собою світловипромінюючий діод. Випромінюванням від такого джерела можна управляти електрично або випромінювання можна підводити до аплікатора за допомогою волоконно-оптичної системи.

Переважно, джерело випромінювання являє собою р-п перехід, що дозволяє випускати випромінювання з довжиною хвилі, концентрованої на або біля однієї або декількох зазначених вище довжин хвиль. Єдиний світлодіодний вузол може мати безліч орієнтованих р-п переходів. Діоди інфрачервоного випромінювання можуть бути використані так, щоб не тільки випускати випромінювання на специфічній частоті, але й створювати розбіжний пучок з високою інтенсивністю. Розбіжний пучок світла також може бути отриманий від випромінюючих світло полімерів.

Відповідно до даного винаходу пропонується спосіб косметичної обробки шкіри з використанням розбіжного електромагнітного випромінювання, що має довжину хвилі в діапазоні від видимого випромінювання до інфрачервоного випромінювання, і концентроване навколо довжин хвиль 940 нм, 950 нм, 1040 нм, 1060 нм, 1072 нм або 1267 нм. Електромагнітне випромінювання прикладають із низькою інтенсивністю, так що не утворюється ніяке термічне ушкодження або нагрівання шкіри або будь-якої іншої тканини або органу, розташованого поблизу від зони обробки. Таким чином, спосіб відповідно до даного винаходу відрізняється від відомих раніше способів, так як він не є тепловим і виключає термоліз. Крім того, даний винахід не має відношення до біостимуляції, тому що концепція посиленої реплікації й синтезу

позитивно виключається. Справді, автори даного винаходу виявили, що довжини хвиль, використані відповідно до даного винаходу, специфічно гальмують синтез ДНК, гальмують утворення колагену й гальмують реплікацію фібробласту. Отримані авторами даного винаходу результати показують, що бажаний ефект досягається за рахунок того, що якість сполучної тканини між клітинами дивним образом поліпшується, скоріше за рахунок гальмування виробництва колагену, ніж за рахунок підвищення щільності колагену, як у відомих раніше способах.

У відповідності із другим аспектом даного винаходу, пропонується спосіб поліпшення пружних властивостей поверхневої області шкіри ссавців, що передбачає опромінення шкіри за допомогою джерела розбіжного електромагнітного випромінювання (з довжиною хвилі) від 900 нм до 1500 нм.

При використанні способу відповідно до даного винаходу автори виявили, що волокна еластину стають менш фрагментованими й більш однорідними, в результаті чого поліпшуються пружні властивості шкіри. Наприклад, при проведенні обробки шкіри грудей автори виявили, що не тільки поліпшується пружність шкіри, але поліпшується також і відтінок шкіри. Автори даного винаходу виявили також, що спосіб відповідно до даного винаходу поліпшує здатність до відтворення клітин.

Відповідно до третього аспекту даного винаходу пропонується спосіб зменшення площі поверхні й об'єму тканини поверхневої області шкіри ссавців, що передбачає опромінення шкіри за допомогою джерела розбіжного електромагнітного випромінювання (з довжиною хвилі) від 900 нм до 1500 нм.

Результати, отримані за допомогою способу відповідно до даного винаходу, показують, що за рахунок зменшення об'єму шкіри над очима й під очима, можна зменшити обвислість по боках обличчя. Таким чином, було показано, що зменшення площі поверхні шкіри й об'єму тканини, разом з поліпшенням пружних властивостей, забезпечує бажані косметичні ефекти.

Варто мати на увазі, що, відповідно до четвертого аспекту, спосіб відповідно до даного винаходу може бути також використаний для запобігання, зниження чи реверсування ушкодження шкіри, викликаного УФ випромінюванням або фотохімічним старінням.

Відповідно до п'ятого аспекту даного винаходу, пропонується використання розбіжного електромагнітного випромінювання (з довжиною хвилі) від 900 нм до 1500 нм для косметичної обробки області поверхневої шкіри.

Переважно, другий, третій, четвертий і п'ятий аспекти даного винаходу додатково включають в себе будь-яку одну або декілька характеристик описаного вище першого аспекту даного винаходу.

Було показано, що світлова терапія, як з використанням лазера, так і СІД, має клінічний ефект у різних терапевтичних галузях. Була проведена оцінка впливів світла, концентрованого навколо довжин хвиль 1072 нм й 880 нм, з використанням протоколів єдиного й множинного опромінення, на свіжоприготовані лімфоцити людини, стимульовані за допомогою фітогемагglутиніну (РНА). Кількість життєздатних клітин істотно підвищується після опромінення довжиною хвилі 1072 нм й істотно знижується після опромінення довжиною хвилі 880 нм, у порівнянні з контрольними пробами без обробки, після щоденного одиничного опромінення протягом п'яти днів. Крім того, кількість клітин істотно підвищується після попередньої обробки довжиною хвилі 1072 нм і впливу УФА, у порівнянні із кількістю клітин після впливу УФ А, без зазначеної попередньої обробки. Клітини, опромінені двічі, на третій день після збору клітин, при різних діапазонах хвиль, з підтвердженням на п'ятий день, показують підвищення відсотка життєздатних клітин після впливу довжини хвилі 1072 нм, і опромінення із чергуванням довжин хвиль 1072 нм й 1268 нм, і зниження відсотка життєздатних клітин після впливу тільки опромінення 880 нм. Ці спостереження привели авторів даного винаходу до припущення про те, що світло, концентроване навколо довжини хвилі 1072 нм, може бути корисний в *ex vivo* способі поліпшення здатності до відтворення імунних клітин.

У відповідності до шостого аспекту даного винаходу, пропонується *ex vivo* спосіб поліпшення здатності до відтворення імунних клітин, що передбачає здійснення впливу на периферійні кров'яні мононуклеарні клітини за допомогою розбіжного електромагнітного випромінювання з вузькою шириною смуги пропускання, концентрованого навколо довжини хвилі 1072 нм.

Переважно, периферичні кров'яні мононуклеарні клітини являють собою лімфоцити.

Переважно, периферичні кров'яні мононуклеарні клітини стимулюють фітогемагglутиніном (РНА).

Варто мати на увазі, що клітини можуть бути потім повторно введені індивідові, від якого вони були отримані, щоб зміцнити його імунну систему.

Відповідно до ще одного аспекту даного винаходу, пропонується портативний випромінюючий світло (світловипромінюючий) пристрій для косметичної обробки шкіри, причому пристрій містить живлячий засіб для подання потужності на випромінюючий світло засіб, що створює розбіжне електромагнітне випромінювання (з довжиною хвилі) від 900 нм до 1500 нм, гнучку або фасонну панель, крізь яку проходить світло, і корпус, до якого прикріплена гнучка або фасонна панель, так що пристрій може охоплювати частину тіла, яка потребує косметичної обробки.

Переважно живлячий засіб являє собою батарею або електричну мережу.

Переважно пристрій, що випромінює світло, являє собою світлодіод (СІД) або, бажаніше, безліч світлодіодів. Варто мати на увазі, що пристрій відповідно до даного винаходу не є лазерним пристроєм.

Переважно, пристрій може також містити щонайменше один або кілька р-п переходів, що створюють випромінювання з довжиною хвилі, концентрованої на або навколо однієї або декількох специфічних довжин хвиль, обраних із групи, у яку входять 940 нм, 950 нм, 1040 нм, 1060 нм, 1072 нм й 1267 нм.

Далі винахід буде описано з посиланням на креслення.

На Фіг. 1 показаний вид зверху (1А), збоку (1В) і поперековий переріз (1С і 1D) одного із пристроїв для практичного здійснення способу відповідно до даного винаходу.

На Фіг. 2 показаний вид збоку альтернативного пристрою для практичного здійснення способу відповідно до даного винаходу.

На Фіг. 3 показаний вид спереду, на Фіг. 4 показаний вид збоку й на Фіг. 5 показаний вид ззаду ще одного альтернативного пристрою для практичного здійснення способу відповідно до даного винаходу.

На Фіг. 6, у колонках 1 й 2 показані % життєздатності клітин РНА бластів після одиничної 3 хвилинної обробки ІR1072 на третій день і п'ятий день, раніше перевірки апоптозу на п'ятий день. Було зроблено порівняння даних з відповідними контрольними пробами, причому аналіз був проведений з використанням

аналізу варіантів ANOVA, у якому $*p < 0.05$.

У колонках 3, 4 й 5 показані % життєздатності клітин PHA бластів після багатьох 5х3 хв. обробок IR1072 & IR880 на третій день і п'ятий день, раніше перевірки життєздатності клітин на п'ятий день. Було зроблене порівняння даних з відповідними контрольними пробами на п'ятий день, причому аналіз був проведений з використанням аналізу варіантів ANOVA, у якому $**p < 0.01$.

На Фіг. 7 показаний % життєздатності клітин PHA бластів після щоденної одиничної 3 хвилинної обробки (опромінення) за допомогою IR1072 або IR880. Життєздатність клітин була визначена з використанням набору Annexin V для визначення апоптозу. Було проведено аналіз даних для IR1072 та їхнє порівняння з відповідними даними для IR880, з використанням аналізу варіантів ANOVA, причому істотні розходження були виявлені на 1, 3, 4 й 5 дні, $*p < 0.01$, при цьому тренд є значимим на другий день.

На Фіг. 8 показані PHA бласти, які були попередньо оброблені за допомогою опромінення 4х3 хв на третій день, і 1х3 хв на четвертий день, за допомогою IR1072, після чого клітини були інкубовані на 4 години, раніше УФА впливу протягом 40 хв. Потім було проведено аналіз проб на життєздатність клітин. Було проведено порівняння отриманих даних із пробами тільки УФ А впливу, без попередньої обробки, з використанням аналізу варіантів ANOVA, де $**p < 0.01$.

На Фіг. 9 показаний ефект впливу різних діапазонів хвиль на PHA бласти, з обробкою на третій день 2х3 хвилини і аналізом. Було проведено порівняння отриманих даних з контрольними пробами, з використанням множинного аналізу варіантів ANOVA, де $**p < 0.01$.

На Фіг. 10 показаний Western Blot (вестерн-блоттинг), де можна бачити вплив ІЧ обробки на рівні експресії протеїну iNOS PHA бластів, при щоденному впливі 1х3 хв ІЧ випромінювання IR1072 або IR880, причому на третій і п'ятий день був проведений аналіз експресії протеїну iNOS з використанням кількісного імуноблотування селективним анти-iNOS антитілом (Autogen Bioclear, Великобританія) (імуноблоти були знову відправлені в пробу й стандартизовані за допомогою антитіла бета-актин (Sigma, Великобританія). Лінія 1, контрольні клітини (п'ятий день); лінія 2, оброблені IR1072 клітини (п'ятий день); лінія 3, оброблені IR880 клітини (п'ятий день). Було проведено порівняння отриманих даних з контрольними пробами з використанням множинного аналізу варіантів ANOVA з рівнем значимості, встановленим на $p < 0.01$.

На Фіг. 11А показані результати впливу після 2 місяців щоденної обробки 1072 нм, причому на Фіг. 11В показаний той же самий пацієнт до початку обробки, а на Фіг. 11С показане накладання зображень до обробки й після одного місяця обробки того самого пацієнта, з використанням 1072 нм.

На Фіг. 12 схематично показаний протокол аналізу людей.

На Фіг. 13А показаний стан до обробки, а на Фіг. 13В показаний результат багатьох обробок і зменшення мішків під очима.

На Фіг. 14А, В і С показані різні індивіди, що пройшли обробку відповідно до протоколу Фіг. 12.

Існує кілька продуктів, які вважають ефективними при обробці ліній і зморшок з використанням нетеплового світла в діапазоні синьої, жовтої або червоної довжин хвиль. Автори даного винаходу зробили спробу ідентифікувати будь-які фізіологічні відгуки, які залежать від довжини хвилі. Використані довжини хвиль лежать у діапазоні від 660 нм до 1268 нм, причому були досліджені різні обмежені смуги пропускання, як ізольовано, так і у комбінації. Автори даного винаходу виявили, що одинична обмежена смуга пропускання світла, концентрована на 1072 нм, впливає на лімфоцити людини. Було показано, що ця довжина хвилі світла захищає лімфоцити людини від шкідливого впливу УФ випромінювання, що викликає фотохімічне старіння.

Бажаним пристроєм для практичної реалізації способу відповідно до даного винаходу є портативний випромінюючий світло пристрій 1, який може отримувати живлення від батареї або від мережі. Пристрій відповідає контурам 2 підлягаючих обробці ділянок обличчя, очей, рук, стегон або грудей.

На Фіг. 1 показаний вид зверху (1А), збоку (1В) і поперечний переріз (1С і 1D) портативного ручного випромінюючого світла пристрою, що має звичайну форму ока. Інфрачервоне випромінювання проходить через прозору панель 3 на підлягаючу обробці шкіру. Джерело живлення з'єднане із пристроєм в ділянці 4 і пристрій утримується на місці за допомогою корпусу 5. Панель 3 є злегка ввігнутою, щоб відповідати контурам підлягаючій обробці області й уникнути зайвого тиску на око, коли панель входить у контакт із орбітою ока. Простір 6 містить керуючу електроніку, що управляє інтенсивністю й тривалістю циклу обробки. Тут міститься також СІД 7. На Фіг. 2 показаний альтернативний варіант пристрою, призначеного для установки на більш широку ділянку шкіри.

З посиланням на Фіг. 3-5 далі буде описаний другий варіант джерела випромінювання відповідно до даного винаходу, яке має багато панелей для випромінювання вузьких смуг довжин хвиль. У цьому випадку, багато панелей 7 встановлені поруч одна з одною на петлях 8, які, у свою чергу, з'єднані із кронштейном 9 за допомогою важелів 10 й 11.

Пристрій виконаний так, що панелі можуть рухатися одна відносно одної, а кронштейн можна регулювати для зміни напрямку опромінення. Кронштейн може стояти на підлозі або може бути прикріплений до крісла або ліжка.

Передня стінка кожної панелі 7 є прозорою, а за нею встановлена матриця випромінюючих пристроїв 12.

Як і в описаних тут раніше варіантах пристрою, цей варіант містить керуючу електроніку, що обмежує час прикладання випромінювання, контролює навколишнє випромінювання й подає сигнал тривоги, коли перевищено граничний рівень навколишнього випромінювання.

Пристрої, відповідні до даного винаходу, можуть бути використані для косметичного зниження целюліту, що вражає сідниці й ноги, і для поліпшення відтінку шкіри грудей, а також для обробки всього обличчя.

Методики й матеріали

Готування клітин

Гепаринована цільна кров була отримана від здорових добровольців і периферичні кров'яні одноядерні клітини (PBMC) були виділені з неї з використанням приладу Lymphoprep (фірма Axis-Shield Pic AS, Осло, Норвегія) і центрифуговані при 400Xg протягом 25 хв. Від клітин PBMC був відділений міжфазовий (граничний) шар і вони були промиті двічі в RPMI без L-глутаміну (Gibco™) і знову переведені в суспензію в

RPMIcm (промивання RPMI+10% по обсягу сироватки Fetal Calf Serum+1% пеніциліну/стрептоміцину+1% L-глутаміну). Потім щільність клітин була відрегульована на рівні 1×10^5 клітин на мілілітр за допомогою RPMIcm. Після цього 100 мкл PIA (Lectin¹, фірма Sigma) додали до клітин, щоб одержати PHA бласти (фітобласти). Клітини були інкубовані при 37°C у 5% CO₂.

Схема експерименту

Були використані 5 наступних протоколів експерименту:

1. PHA бласти були піддані впливу інфрачервоного випромінювання IR1072 на третій, четвертий і п'ятий день після збору клітин. З використанням 35 мм чашок Петрі, всі клітини піддавалися одиничній 3 хвилинній обробці інфрачервоним випромінюванням. Після щоденних обробок, індивідуальні репліковані проби клітин на п'ятий день були проаналізовані на % життєздатних клітин.

2. PHA бласти були піддані впливу IR1072 & IR880 на третій і п'ятий день при обробках 5х3 хвилини, і були проаналізовані на п'ятий день. Життєздатність клітин й iNOS експресія були визначені після обробки на п'ятий день.

3. PHA бласти були піддані щоденному впливу одиничної трихвилинної дози IR1072 й IR880, починаючи з першого дня. Після щоденного опромінення, клітини були проаналізовані на % життєздатних клітин.

4. PHA бласти на третій день були піддані обробці 4х3 хвилини за допомогою IR1072 і на четвертий день були піддані одиничній трихвилинній обробці. Потім клітини залишили на 4 години, після чого їх піддали впливу УФ А протягом 40 хвилин, після чого була визначена життєздатність клітин.

5. Клітини були інкубовані до третього дня в пробірках для культури клітин тканин і потім були піддані впливу різних діапазонів хвиль при обробці 2х3 хвилини на третій день. Використовували довжини хвиль IR660 нм, IR880 нм, IR950 нм, IR1267 нм, IR1072 нм, що чергуються з IR1268 нм, IR1072 й IR1267 нм, при тривалості імпульсів 1 мкс для IR1072 нм й 7 мкс для IR1072 нм. Відразу після опромінення, клітини було проаналізовано на % життєздатних клітин.

При здійсненні всіх протоколів важливо, щоб у всіх чашках підтримувалася кімнатна температура протягом всіх ІЧ і контрольних обробок.

Набір Annexin V для визначення апоптозу

Життєздатність клітин була визначена з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V Apoptosis Detection kit (фірма Autogen Bioclear, Великобританія). Апоптоз може бути виявлений за зміною положення фосфатиділ серину (PS) у клітинній мембрані. В не апоптотичних клітинах, більшість PS молекул локалізовані у внутрішньому шарі плазматичної мембрани, однак незабаром після індукування апоптозу PS перерозподіляється в зовнішній шар мембрани. Відкритий PS легко може бути виявлений за допомогою набору Annexin V. Клітини, що мають зв'язок з Annexin V, набувають зеленого забарвлення в плазматичній мембрані. Клітини, які втратили цілісність мембрани, набувають червоного забарвлення (PI) у всій цитоплазмі та ореолу зеленого забарвлення на поверхні клітин (у плазматичній мембрані). Клітини в кількості 1×10^5 - 1×10^6 на чашку промивали й знову вводили в суспензію в буферному розчині Assay Binding Buffer. 5 мкл Annexin V й 10 мкл Propidium Iodide (PI) додавали до клітин, до інкубування при кімнатній температурі в темряві, протягом 15-30 хв. Клітини спостерігали через подвійний фільтр для FITC & родамину, з використанням флуоресцентної мікроскопи і бленди для підрахунку, за допомогою щонайменше двох лаборантів.

Вестерн-блоттинг

Відталі суспензії гранул клітин були гомогенізовані на льоді за допомогою гомогенізатора Dounce. Рівні протеїну в клітинній суспензії були визначені за допомогою аналізу Lowry Assay, з використанням альбуміну коров'ячої сироватки у якості стандарту. Рівні протеїну регулювали так, щоб 10 мкг протеїну завантажувалося в кожен канал. Був здійснений стандартний електрофорез із використанням 6% поліакриламідного гелю. Після проведення електрофорезу, протеїн перенесли на мембрану з нітроцелюлози (NC) на 2.5 години, при 50V. NC мембрана була блокована 5% нежирним порошковим молоком у сольовому буферному розчині 1xTris (TBS), що містить 0.2% Tween 20 (фірма Sigma, Великобританія), на 1 годину при кімнатній температурі. Після цього, NC мембрана була інкубована первинним антитілом iNOS (розчин 1:2500) протягом ночі при 4°C. Потім NC мембрана була промита 4х10 хвилин за допомогою промивного буфера (2.5% нежирне порошкове молоко і 0.2% Tween 20 в TBS) і інкубована anti-rabbit зв'язаним пероксидазою хрому вторинним антитілом (розчин 1:2000) протягом 1 години. Після цього NC мембрана була промита 4х10 хвилин за допомогою промивного буфера. Смуги протеїну з NC були візуалізовані з використанням субстрату 68 mM люмінолу, 1.25 mM p-курамової кислоти й 30% пероксиду водню. Імуноблот був експонований в Hyperfilm™ протягом 3 хвилин у касеті для плівки, і потім проявлений і фіксований при кімнатній температурі. Смуги протеїну були кількісно проаналізовані з використанням денситометру ImageQuant® у лінійному діапазоні плівки, щоб визначити відносну експресію iNOS. Було проведено порівняння значень оптичної щільності (стандартизованих бета-актином) з використанням множинного аналізу варіантів ANOVA, з рівнем значимості $p < 0.05$. Дані були отримані для $n=3$ індивідуальних повторних експериментів.

Статистика

Апоптоз вимірювали з використанням % життєздатних клітин, тобто:

% життєздатних клітин = $[(\text{число життєздатних клітин})/(\text{число всіх клітин})] \times 100$

Дані виражені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD).

Порівняння між контрольними й обробленими клітинами було проведено з використанням множинного аналізу варіантів ANOVA і виражене як середнє значення $\pm$ SD, з довірчим інтервалом 95%. Статистичний аналіз був проведений з використанням Prism 3.2.

Джерела світла

Обидва джерела випромінювання 880 нм й 1072 нм мають багатомодове випромінювання із шириною смуги пропускання менше ніж 50 нм, у безперервному режимі з потужністю оптичного випромінювання 5 мВт/см².

Досліди на людях

Використовували довжини хвиль у діапазоні від 660 нм до 1268 нм, причому досліджували різні

обмежені смуги пропускання, як ізольовано, так і у комбінації.

40 добровольців набирали з людей у віці від 45 до 65 років, усього 38 жінок, 2 чоловіків. Кожного індивіда фотографували з використанням фіксованого освітлення й на фіксованій відстані. Робили такі знімки: ліворуч від центра обличчя; праворуч від центра обличчя; лівий профіль обличчя; і правий профіль обличчя. Використання постійної відстані та освітлення полегшує проведення порівняння між знімками до і після опромінення.

Коли робили знімки після опромінення, намагалися забезпечити, щоб очі були відкриті так само широко, як і на знімку до опромінення. Це дозволяє робити порівняння складок шкіри над очима й мішків під очима. Учасників експерименту спеціально просили не посміхатися й утримувати нейтральний вираз обличчя при проведенні зйомок. Кожному учасникові видавали активний пристрій і просили робити обробку області шкіри навколо очей протягом часу близько 30 хвилин щодня (15 хвилин на кожне око). Шкіру навколо очей вибрали тому, що вона є більш мобільною і легше демонструє поліпшення пружності шкіри.

Приклад 1

У діапазоні протоколів обробка за допомогою IR1072 створює стійкий захисний ефект, що підвищує життєздатність РНА бласту. На відміну від цього, IR 880 є стійко цитотоксичним у порівнянні з контрольними клітинами й клітинами, обробленими IR1072.

Після опромінення IR1072, % життєздатних клітин істотно збільшується на п'ятий день ($p < 0.05$), у порівнянні з контрольними даними, як при одиничній обробці, так і при множинній 5x3 хвилинній обробці на третій і п'ятий день (Фіг. 6). У наступному протоколі клітини опромінювали 5x3 хвилини за допомогою IR1072 й IR880, причому % життєздатних клітин істотно зменшився на п'ятий день ($p < 0.01$) після обробки за допомогою IR880, у порівнянні із клітинами, обробленими за допомогою IR1072 (Фіг. 6). Протокол щоденної обробки викликає істотне зменшення % життєздатних клітин, у випадку обробки клітин за допомогою IR880 протягом восьми днів [перший день ($p < 0.01$), третій день ($p < 0.01$), четвертий день ($p < 0.05$), п'ятий день ($p < 0.05$) і восьмий день ($p < 0.05$)], у порівнянні із клітинами, опроміненими за допомогою IR1072 (Фіг. 7), у паралельних експериментах. Після попередньої обробки за допомогою IR1072 і наступного впливу УФ А, % життєздатних клітин, що залишилися, буде істотно вище ($p < 0.01$) у порівнянні із клітинами, обробленими тільки за допомогою УФ А (Фіг. 8). Після опромінення різними довжинами хвиль, клітини після впливу IR880 знову показують істотне зниження % життєздатних клітин ($p < 0.01$), у той час як % життєздатних клітин буде істотно вище після обробки за допомогою IR1072 ($p < 0.01$) і після обробки із чергуванням IR1072/IR1268 ($p < 0.01$) при порівнянні з необробленими контрольними клітинами (Фіг. 9). Всі інші перевірені довжини хвиль й умови експерименту не роблять істотного впливу на життєздатність клітин.

Незважаючи на те, що довжини хвиль у діапазоні 855-905 нм можуть стимулювати проліферацію фібробласта, автори даного винаходу виявили, що випромінювання в цьому діапазоні є лімфотоксичним. Цитоксичні й захисні впливи на клітини є швидкими, так як аналіз проводили при впливі ІЧ випромінюванням протягом 2 годин, обидві ці дії є тривалими й спостерігаються щонайменше через 2 дні після проведених обробок. Проведені авторами даного винаходу дослідження чітко показують, що випромінювання в діапазоні 1050 нм-1100 нм поліпшує життєздатність клітин, як після одиничного, так і після множинного протоколів обробки. Підтримка життєздатності лімфоцитів у присутності несприятливих чинників має важливе значення, тому що бактеріальні ендо- і екзо-токсини являють собою лейкоцитоксичні чинники, дія яких може бути знижена за рахунок опромінення збуджених клітин випромінюванням 1072 нм $\pm$ 25 нм. Давно відомо, що інфрачервоне випромінювання має захисну дію проти УФ А, однак точний діапазон довжин хвиль був невідомий. Отримані результати показують, що довжина хвилі 1072 нм $\pm$ 25 нм робить захист від шкідливого впливу УФ А.

Приклад 2

Було показано, що оксид азоту є потенційним інгібітором апоптозу для клітин різних типів. NO дифундує дуже швидко як через воду, так і через клітинні мембрани, і iNOS робиться більш швидко й ефективно, чим eNOS й pNOS. iNOS може функціонувати без підвищення рівнів внутрішньоклітинного кальцію і його активність швидко впливає на імунні клітини, наприклад, на первинно активовані моноцити й макрофаги, після впливу цитокінів і мікробних продуктів.

Для виявлення потенційного механізму, що пояснює тривалу цитопротекцію, викликану впливом IR1072, було здійснено кількісне імуноблотування для дослідження експресії iNOS у порівнянні з контрольними клітинами й впливом IR880 нм. Після попередньої обробки за допомогою IR1072 істотне підвищення в 4.9 $\pm$ 2.1 рази ($p < 0.05$) імуноактивності iNOS було виявлено на п'ятий день, у порівнянні з контрольними клітинами. На відміну від цього, не спостерігалось істотного підвищення імуноактивності iNOS після впливу IR880 (усього в 2.1 $\pm$ 2.2 рази) на п'ятий день ($p > 0.05$), при проведенні паралельних досліджень (Фіг. 10).

Біохімічно, отримані результати показують, що iNOS був перерегульований залежним від довжини хвилі чином, у порівнянні з контрольними пробами без обробки. Можна вважати, що NO діє як інгібітор апоптозу, за допомогою двох окремих механізмів: насамперед, за рахунок cGMP-залежного механізму, у якому NO діє на рівні активування протеази виду caspase-3 або вище по ходу цієї події, щоб запобігти активуванню протеази; по-друге, NO також гальмує активність протеази виду caspase-3 за рахунок S-нітросилації ферменту. Пригнічення активності протеази виду caspase-3 дозволяє врятувати клітини від запрограмованої смерті.

Приклад 3

Після обробки шкіри обличчя й шкіри навколо очей джерелом випромінювання спостерігається зниження глибини, довжини й площі зморшок, а також зменшення площі поверхні шкіри над очима й зменшення мішків під очима. Для зниження до мінімуму артефакту, була використана постійна світлова коробка. Це полегшує підтримання постійної відстані об'єктива фотоапарата від пацієнта й постійної експозиції. Пацієнтів просили дивитися в одну точку й утримувати підборіддя у фіксованому положенні, коли ніс торкається струни, щоб забезпечити мінімальну розбіжність між знімками. Потім пацієнтам давали джерело випромінювання для самостійного проведення опромінення щонайменше раз удень, а переважно два рази вдень. Після закінчення місяця ще раз робили знімки, а потім ще раз через 2 місяці. При проведенні зйомки важливо, щоб на обличчі зберігався той самий нейтральний вираз, а очі були відкриті на

ту саму величину (ширину), причому погляд повинен бути спрямований в ту саму точку усередині світлової коробки; це дозволяє робити пряме порівняння стану шкіри над очима. Усього робили 4 знімки, а саме, ліворуч від центра обличчя; праворуч від центра обличчя; лівий профіль обличчя; і правий профіль обличчя. Це полегшує проведення прямого порівняння мішків під очима, довжини й глибини зморшок. Зморшки, які розташовані не у вертикальній або в горизонтальній площинах, не аналізували, тому що невеликий поворот може створювати штучне розходження. Спостерігали також поліпшення тонуся тканин і м'язового тонуся в різних частинах тіла після проведення електромагнітної косметичної обробки. Результати свідчать про якісне поліпшення й зниження видимих ознак старіння, про зменшення надлишкової шкіри повік очей, про підтримку тонуся лицьової тканини й, отже, про підтримку носогубних складок, що зберігають молодість, і контурів обличчя.

Спосіб відповідно до даного винаходу дозволяє поліпшувати текстуру й контури шкіри, у результаті чого шкіра виглядає більше гладкою. Ці ефекти можуть зберігатися на період від одного до трьох місяців після припинення обробки, і дозволяють здійснювати реверсування видимих ознак старіння, у деяких випадках до 10 років.

Коли випромінювання впливає на стегна й сідниці, спостерігається істотне зниження ознак целюліту й зменшення ступеня обвислості сідниць під дією сили тяжіння.

З посиланням на Фіг. 11А показаний результат після 2 місяців щоденної обробки з використанням IR 1072 нм, у порівнянні зі станом до обробки, показаним на Фіг. 11В, для того самого пацієнта. На Фіг. 11С показане накладення знімків до обробки й через 1 місяць після щоденної обробки з використанням IR 1072 нм для того самого пацієнта. Можна робити безпосереднє порівняння складок шкіри над повіками очей через 1 місяць після обробки, тому що верхнє повіко перетинає роговицю в тім же самому місці й відбиття світла від роговиці ідентичні в контрольному й робочому тестах (Фіг. 11С). Можна бачити, що провисання верхнього повіка зменшується після обробки. Провисання додатково знижується після 2 місяців обробки (Фіг. 11).

Приклад 4

На Фіг. 13А показаний профіль із однієї сторони обличчя пацієнта до обробки, а на Фіг. 13В показаний профіль обличчя цього ж пацієнта після обробки. Цей пацієнт мав легко ідентифікуєме пігментоване ураження нижче корнеальної кайми. Була проведена лінія перпендикулярно до чорної маркерної лінії і було проведено наступні виміри:

	Фіг. 13А	Фіг. 13В
1. Кінчик носа:	34.2 мм	38.3 мм
2. Від лінії до пігментованого ураження:	20.3 мм	28.6 мм
3. Від лінії до мішка (7 мм нижче повіка)	18 мм	23.2 мм

Було зроблене підстроювання, викликана варіацією шкали (відстанню до носа), для відстані від лінії до пігментованого ураження: $(38.3/34.2) \times 20.3 = 22.7$ мм і для відстані від лінії до мішка: $(38.3/34.2) \times 18 = 20.2$ мм.

Скориговані результати

	До	Після
Від ліній до пігментованого ураження	22.7 мм	28.6 мм
Від лінії до мішка	20.2 мм	23.2 мм

З використанням описаної методики був проведений вимір зменшення мішків під очима для 8 добровольців. В 7 було виявлене зменшення розмірів мішків під очима.

Приклад 5

При забезпеченні однакового розкриття очей, частина зображення ока на знімку до обробки (Фіг. 14А) була вирізана й суміщена (Фіг. 14С) із зображенням ока на знімку після обробки (Фіг. 14В). Легко можна бачити поліпшення якості шкіри.

Проведені зміни розміру мішків і виміру старечої в'ялої шкіри виключають варіабельність, властиву простій оцінці зморшок навколо очей.

	Зморшки	Мішки під очима	В'яла шкіра над очима
Поліпшення	n=18	n=6	n=14
Без поліпшення	n=2	n=1	n=2
	p=0.0004	p=0.1	p=0.004

19 з 20 учасників експерименту вважають, що терапія з використанням випромінювання 1072 нм була ефективною, $p=0.00004$.

Базові знімки, які можуть бути використані як засіб контролю даних наведеного косметичного випробування, демонструють ефективність способу і пристрою відповідно до даного винаходу. Щоденна обробка призвела до того, що більшість учасників експерименту набули більш молодого зовнішнього вигляду.

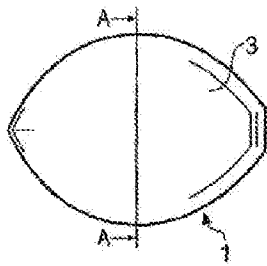


FIG. 1A

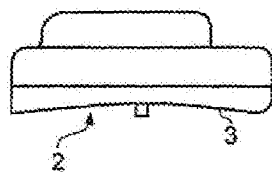
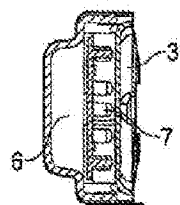


FIG. 1B



P03P13

FIG. 1C

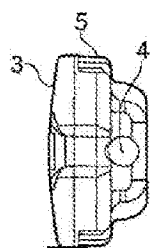


FIG. 1D

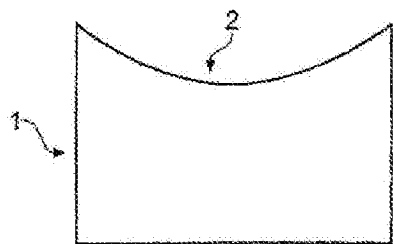
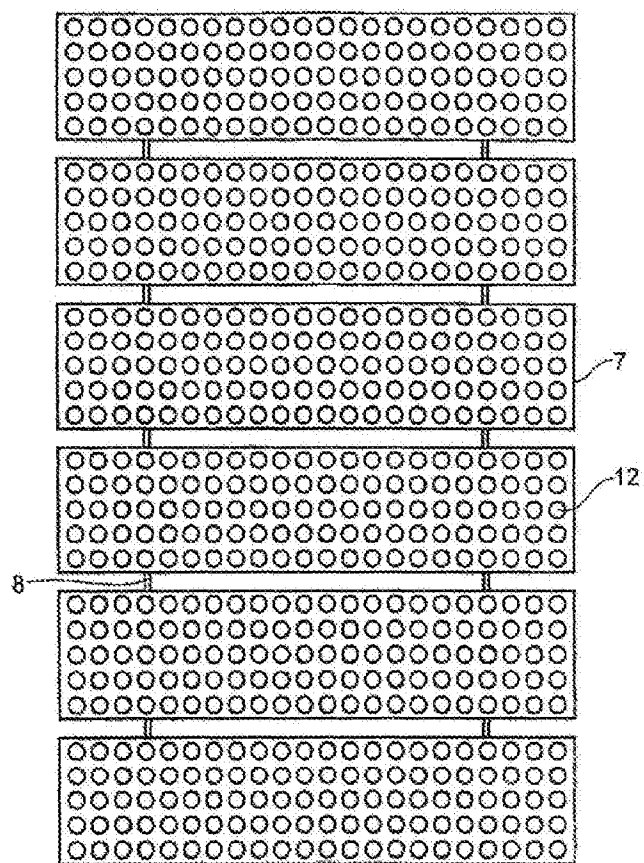
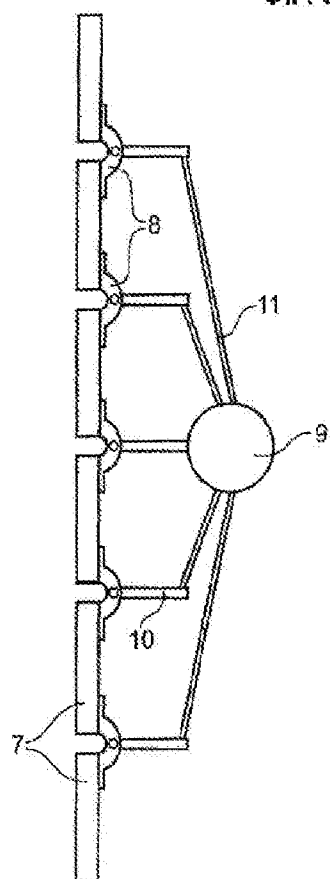


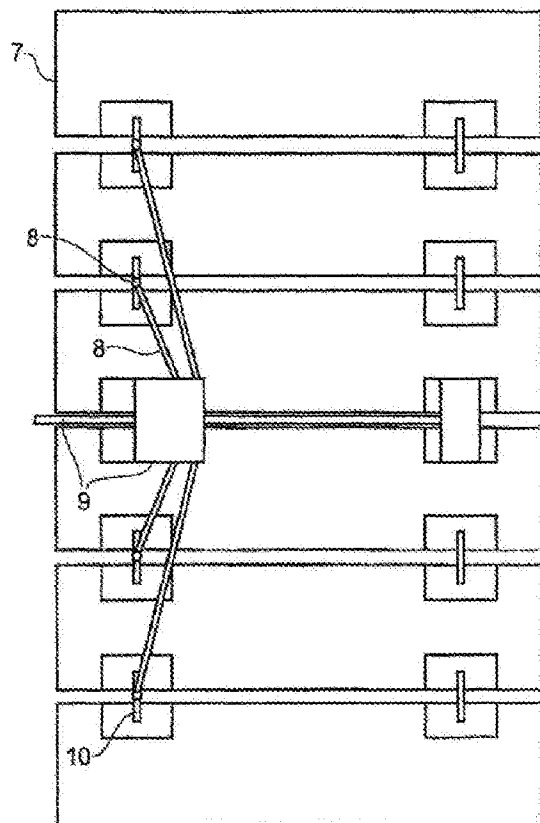
FIG. 2



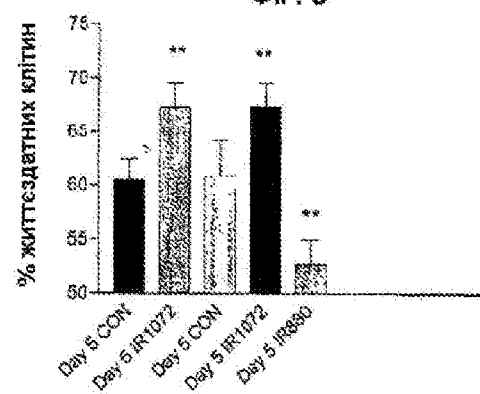
ФИГ. 3



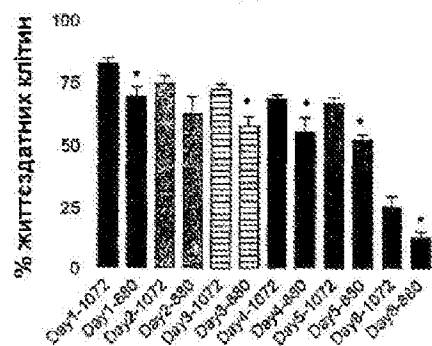
ФИГ. 4



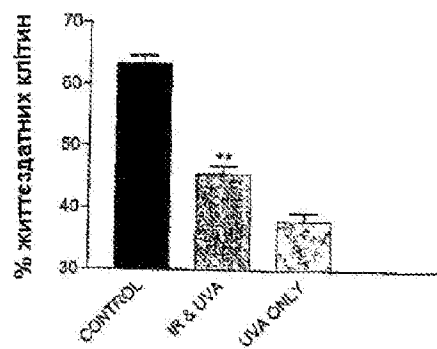
ФІГ. 5



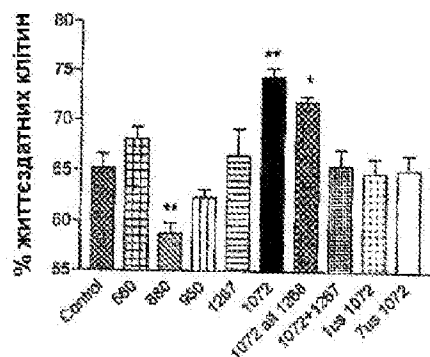
ФІГ. 6



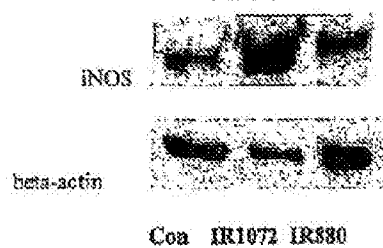
ФІГ. 7



ФІГ. 8



ФІГ. 9



ФІГ. 10

ФІГ. 11A

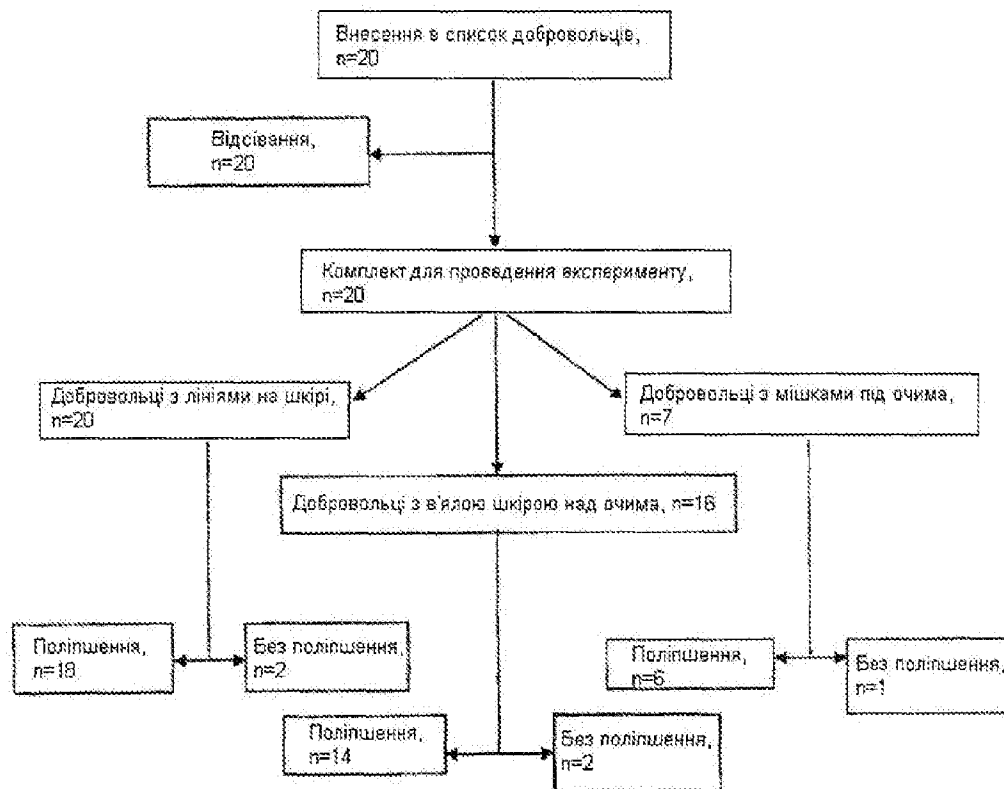


ФІГ. 11B



ФІГ. 11C



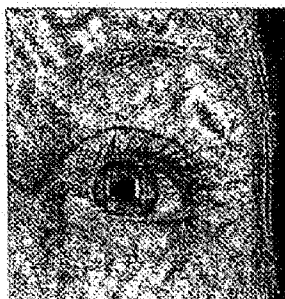


ФІГ. 12

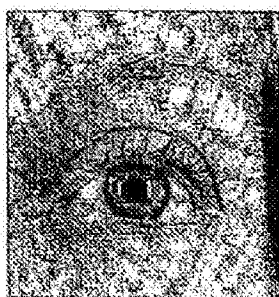


ФІГ. 13А

ФІГ. 13В



ФІГ. 14А



ФІГ. 14В



ФІГ. 14С