

皮膚に対する体外衝撃波療法の効果:実験的研究

Thayná Melo de Lima Morais¹ & Patricia Froes Meyer² & Liliane Santos de Vasconcellos² & Julio Costa e Silva² & Ito Ferreira e Andrade² & Vinicius Alves Freire de Farias² & Igor Candido da Silva² & Roberta Marinho Falcão Gondim Araújo³ & Rodrigo Marcel Valentim da Silva³ & Esteban Fortuny Pacheco⁴ & Ciro Dantas Soares¹

投稿日:2018年05月07日/受理日:2018年08月07日

©Springer-Verlag London Ltd., Springer Nature 2018の一部

抄録

体外衝撃波療法(ESWT)は、その複数の生物学的特性に関して詳細に研究されてきており、美容的処置で広範に適用されているが、表皮および真皮に対するその影響についてはほとんどわかっていない。本研究では、ESWTの影響に関する組織学的かつ免疫組織化学的な試験をラット皮膚に行った。45匹の雌ラットを、1~2回のESWTセッションで治療し、治療後1、7、14および21日目に犠牲死させた。サンプルを組織学的処理した後、形態測定解析により、表皮、真皮および皮下脂肪組織の厚さを評価した。免疫組織化学的反応も、以下の抗体に対して実施した:塩基性線維芽細胞成長因子(FGF2)、そのレセプター(FGFR1)、および α -平滑筋アクチン。スライドをスキャンし、デジタル評価し、微小血管密度(MVD)および免疫組織化学的染色のデジタルスコアを求めた。その結果、ESWTによって、無治療対照群と比較してコラーゲン量、MVD、表皮および真皮の厚さが増加することがわかった。表皮および真皮では、FGF2がESWT治療群で過剰に発現する一方、FGFR1は2回のESWTセッションで21日間治療した群に限り増加した。ESWT治療群の皮下脂肪組織の厚さも減少した。結論として、ESWTは新膠原形成および新血管形成を誘発し、特に2回セッション治療群において、FGF2の発現を上方制御する。さらに、ESWTで治療した皮膚のFGF2の過剰な発現は、その作用機序の鍵となる役割であるように思われる。

キーワード: 体外衝撃波療法、繊維芽細胞成長因子2、コラーゲン、炎症細胞

Thayná Melo de Lima Morais and Liliane Santos de Vasconcellos contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2612-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ciro Dantas Soares
ciro.dss@gmail.com; c162617@g.unicamp.br

¹ Oral Pathology Section, Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Av. Limeira 901, Piracicaba, SP 1314-903, Brazil

² Physiotherapy Department, Potiguar University, Natal, Brazil

³ Medicine Department, Potiguar University, Natal, Brazil

⁴ Physiotherapy Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

緒言

美容的処置は、美容皮膚科学/皮膚科的診療に利用される共通手段である[1]。現在では、非侵襲性の若返り療法は、新膠原形成および皮膚への十分な血液供給を行うために広く採用されている。結果として、こうした療法により、真皮細胞および血管の増殖および修復と、細胞外基質調節とを促進することができる[2]。したがって、新膠原形成および新血管形成に対する生物学的刺激となる複数の成長因子が研究されてきた[3, 4]。ラジオ波療法によって、塩基性線維芽細胞成長因子(FGF2)およびそのレセプター(FGFR1)の刺激および活性化によってラット皮膚上の生物学的現象が調節されることは既に証明されている[5]。FGF2は、主にその血管形成的および分裂促進的特性により認識されている多機能成長因子である[6~8]。FGF2は、形態形成、炎症、腫瘍形成、および組織修復に関して詳細に研究されてきたが、美容的処置時の生物学的活性に関して注目した研究はほとんどない。しかしながら、FGF2は重要な皮膚刺激因子であり、

実験モデルからでは、膠原線維の沈着および成熟に影響することが明らかになっている[9, 10]。FGF 経路の活性化は、それらの 4 つのレセプター(FGFR1~4)との結合に依存する[11]。したがって、FGFR1 が FGF2 に最も親和性が高いレセプターであることが証明された[12]。このため、著者らは FGF2 および FGFR1 の共発現が異なる組織での高い活性化と関連する可能性があると仮定する。

体外衝撃波療法 (ESWT) は、主に修復過程を調節することによって、その複数の生物学的特性に関して詳細に研究されてきた[13]。この療法の原理は、立体的に反響する一連の高振幅音波を発生させることができる機器の使用にある。以前の研究から、ESWT が血管形成を促進し、炎症性反応を抑えるという報告がある[14-16]が、これらの生物学的事象の原因となる分子機序は、十分に理解されていない。

証拠ベースの美容的皮膚科診療の最近の提案に基づき[17]、本研究では、皮膚における FGF2 および FGFR1 の発現調節に対する ESWT の影響を調査することを目的とする。さらに、新血管形成およびコラーゲン沈着も評価を行った。

材料および方法

倫理的配慮

本研究に適用される実験プロトコルは、「The Animal Experimentation Code of Ethics」と「The Brazilian College of Animal Experimentation guidelines」に従った。承認は、Potiguar University (Natal, RN, Brazil)の施設内倫理審査委員会から与えられた(CEP/UNP、登録番号 002/2017)。

被検体および治療プロトコル

45 匹の雌ラットを今回の研究のために無作為に選択し、表 1 に定めるように、確立された治療法および実験期間に従って 6 群に分けた。実験期間中、被検体には自由裁量で水および食物が与えられ、光(12 時間ごとに明暗を切り替えるサイクル)、換気、および温度(24°C)を制御した環境で維持された。

体外衝撃波療法

ESWT を麻酔をかけずに行い、Storz Duolith SD1 装置(STORZ MEDICAL AG, Switzerland)を使用して 48 時間ごとに 1~2 回の治療セッションを行った。設定値は、0.13 mJ/mm² の平均エネルギー粒子束密度で、500 インパルス(圧力:2 バール、1 秒あたり 4 回)であった。

表 1 実験群、ESWT プロトコルおよび実験期間(安楽死)

群	治療(ESWT)	実験期間(安楽死)
対照(n=15)	治療なし	1、7、14 および 21 日
G1(n=6)	1 セッション	1 日
G2(n=6)	1 セッション	7 日*
G3(n=6)	2 セッション*	7 日*
G4(n=6)	2 セッション*	14 日*
G5(n=6)	2 セッション*	21 日*

* 1 回目の ESWT セッションから 48 時間の間隔を空けた。

形態解析

連続した 5 μ m 切片を HE、ピクロシリウスレッドおよびマッソントリクロームで染色した。2 人の訓練された病理学者が、各被検体の振幅の高い 10 か所を考慮して、定量的形態解析を実施した。皮下脂肪層、表皮、および真皮の厚さとコラーゲン量を、Leica Application Suite・バージョン 2.8.1 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)というソフトウェアを使用して測定した。炎症細胞については、手作業で計数した。

I 型、III 型および総コラーゲン量を、以下のように評価した:

総コラーゲン量は、マッソントリクローム染色されたスライドについて評価したが、この際、式(総コラーゲン量=青色染色面積÷全解析面積×100)を用いて、全解析面積で割った青色染色面積を考慮した。コラーゲン量については、百分率で表現した。

III 型コラーゲン量は、ピクロシリウスレッドで染色したスライドについて評価し分極下で解析したが、この際、式(III 型コラーゲン量=緑色染色面積÷全解析表面積×100)を用いて、緑色染色面積を考慮した。また、コラーゲン量の百分率については、同式を使用して

求めた。I型コラーゲン量については、式(I型コラーゲン量=緑色染色面積÷全解析面積×100)を使用して評価した。データについては、百分率で表現した。

免疫組織化学アッセイ

パラフィンを埋め込んだ3 μm切片をクエン酸ナトリウム緩衝液(10 mm、pH 6.0)を使用して抗原を回復させ、FGF2(ポリクローナル抗体、希釈 1:50、Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、FGFR1(ポリクローナル抗体、希釈 1:50、Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、および平滑筋アクチン(クローン 1A4、希釈 1:400、Dako, Carpinteria, CA, USA)に対する一次抗体と共に、製業者指定のプロトコルに従って培養した。二次抗体(EnVision FLEX Systems; Dako, Carpinteria, CA, USA)については30分間実施し、ジアミノベンジジン(DAB)を使用して染色した。最後に、スライドをカラッチのヘマトキシリンを使用して対比染色剤で着色してから取り付けた。

免疫組織化学的解析

スライドは、Aperio Scanscope CS Slide Scanner(Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA)で高解像度画像に取り込んでスキャンし、Pixel Count V9 アルゴリズムソフトウェア(Aperio Technologies Inc)を使用して、すべての抗体について免疫発現スコア確立のためにデジタル的に評価した。スコアの範囲は、既に述べたとおり100~300であった[18]。微小血管密度(MVD)は以下の入力パラメータを使用して、Microvessel Analysis V1 ソフトウェア(Aperio Technologies Inc)によって得られた:モード、不完全な欠陥を含む;血管タイプモード、不規則な/長い血管;フィルタリング/平滑化レベル、2;濃染色閾値、200;、薄染色閾値、210;領域接合パラメータ、7;、血管完成パラメータ、7;最低血管面積閾値、0;最大血管面積閾値、200,000;最大血管壁厚さ、10;クリアな領域の強度、240。MVDについては、(血管/mm²)の単位で表現し、以下の通りにスコアした:(1)血管非検出、(2)5まで、(3)10まで、(4)10以上。

統計解析

まず、データに正常性試験(コルモゴロフ-スミルノフおよびシャピロ-ウィルク検定)を行った。クラスカル-ウォリスの検定を、組織形態計測的解析およびMVDで使用される平均得点を比較するために使用した。次に、双方向分散分析を、免疫組織化学染色の平均を比較するために実行した。これらの解析において、対照群は解析されたマーカーの発現が有意ではなかったため、含まれていない。対照動物に対しては陰性であるか、非常に低かった。P<0.05を有意であると見なした。

結果:

ESWTは、表皮肥厚化および細胞増殖を誘発する

図1は、ESWTで治療された皮膚の表皮および真皮の形態的变化を示す。全体として、形態解析から、皮膚は治療の有無に関係なく表皮および真皮が正常な様子であることがわかる(図1a)。表皮は、3~5の層のケラチン生成細胞を含み、正常に思われたが、若干の変化が治療群で観察され、表皮過形成、層数増加、アcantosisを伴い、一般的でない細長く、厚い下向きの表皮突出が見られた。表皮は対照群よりもG2、G3、G4 および G5 群で厚く(図1b)、G3が最高であった(P<0.0001)。

真皮は対照群と比較して、ESWTで治療したすべての群で有意に厚かった(図1c、P<0.0001)。1セッションのESWTを行ったG1群を除いて、対照群との違いはなかった。真皮の肥厚化に加えて、炎症細胞、真皮繊維芽細胞およびその他の間質細胞の数の増加が認められた(図1d)。刺激的事象に関しては、単核細胞定量分析を実施したところ、ESWT治療群は対照群より有意に炎症細胞数が多かった(P<0.0001)。これは、治療の24時間後および7日後により明確であった。

対照群よりも大きいコラーゲン密度がESWT治療の皮膚上で確認された

図1 組織学的解析と組織形態計測の解析。a ESWT 治療群は繊維芽細胞の上皮の厚さがより厚く、数が多く、真皮に炎症細胞がある。I型膠原線維(オレンジ)の数も増加していることが観察された。b 上皮厚さ; 対照との統計的有意差*, G1との統計的有意差*, G3との統計的有意差*, 分散分析, $P < 0.0001$ 。c 真皮厚さ; 対照との統計的有意差*, G1との統計的有意差*, 分散分析, $P < 0.0001$ 。d 炎症細胞の平均値; 対照群との統計的有意差*, G1との統計的有意差**, G2との統計的有意差*, 分散分析, $P < 0.0001$ 。

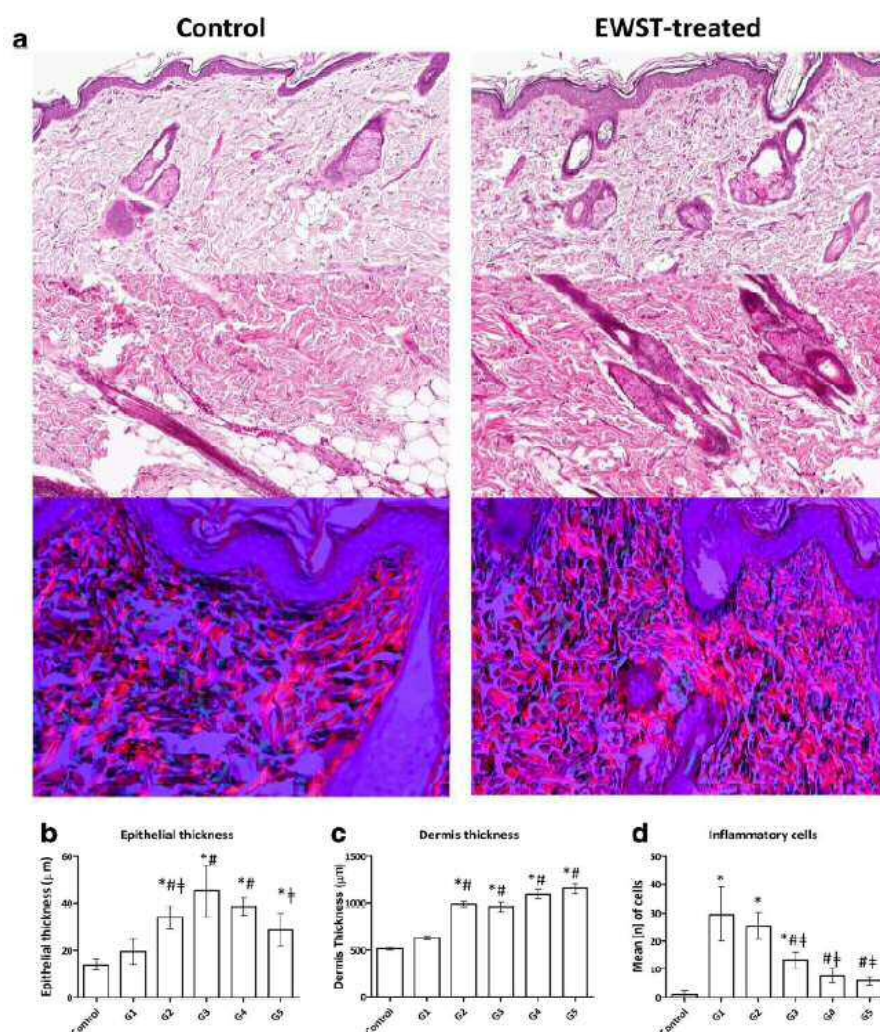


表2 ESWT 治療後の I 型およびIII型コラーゲン量および皮膚組織の皮下脂肪層の厚さ

	対照	G1	G2	G3	G4	G5
I型コラーゲン	78.24% ^a	79.78% ^a	88.32% ^b	89.56% ^b	88.92% ^b	88.02% ^b
III型コラーゲン	21.76% ^a	20.22% ^a	11.68% ^b	10.44% ^b	11.08% ^b	11.98% ^b
皮下脂肪層の厚さ	266.7 μm ^a	227.5 μm ^a	126.3 μm ^b	118.1μm ^b	150.4μm ^b	132.4μm ^b

異なる文字が平均値については、群に有意な違いがあることを示す。3 解析すべてに関して、P 値は、 < 0.0001 であった(双方向分散分析)。

コラーゲン量は、対照群よりも ESWT 治療皮膚群のほうが有意に高かった。結果を表 2 にまとめた。I 型コラーゲン量が、無治療対照群および 1 セッションの ESWT しか行わなかった G1 よりも多かったのは、G3、G4 および G5 の群であった ($P < 0.0001$)。皮下脂肪層の減少も観察された(図 1a、赤い矢印および表 2)。皮下脂肪層の厚さは、G3、G4 および G5 で有意に減少した ($P < 0.0001$)。

ESWT は FGF-FGFR1 経路活性化と関連し、新血管形成を誘発する

図 2 および 3 は、ESWT 治療皮膚の FGF2 および FGFR1 発現を示す代表的な画像である。対照群の皮膚上では、FGF2 および FGFR1 はわずかに発現したか、認められなかった。FGF2 の細胞質発現は、G1、G2 および G5 群よりも、G3 群の皮膚の表皮の全層で多いことが証明された。これらの最後の群では、FGF2 を発現する個々の細胞のパターンが観察された。繊維芽細胞、内皮、および毛包幹細胞などの真皮細胞は、G3、G4 および G5 で FGF2 がより多く発現した(図 2)。

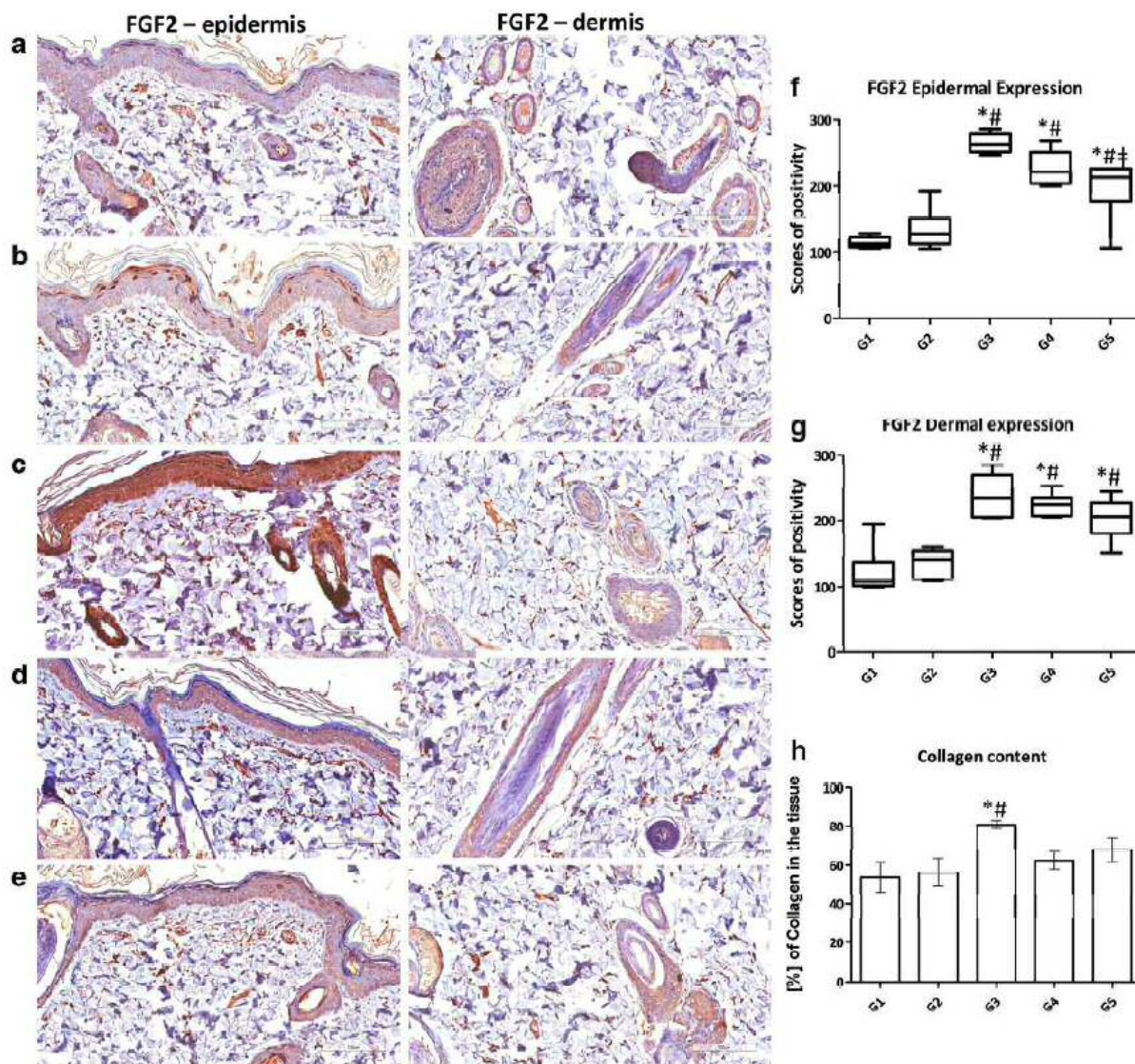


図2 ESWT 治療群の FGF2 免疫発現。a G1。b G2。c G3。d G4。e G5。f FGF2 表皮発現を示すグラフ図; G1 との統計的有意差*, G2 との統計的有意差*, G3 との統計的有意差*, 分散分析、 $P < 0.0001$ 。g FGF2 真皮発現を示すグラフ図; G1 との統計的有意差*, G2 との統計的有意差*, 分散分析、 $P < 0.0001$ 。h 総コラーゲン量の平均、マソントリクローム染色によって定量化した。G1 との統計的有意差*, G2 との統計的有意差*, 分散分析、 $P = 0.0221$

総コラーゲン量は、その他の群に比較して、G3 で有意に増加した ($P = 0.0221$)。表皮でも真皮でも、FGFR1 は各群で等しく発現した (図 3)。

G5 だけは、表皮に他の群より有意に高い FGFR1 発現を示した ($P = 0.0239$)。MVD は、G1 および G2 群よりも G3 および G4 で有意に高かった ($P = 0.0003$)。

考察

美容的処置は、皮膚代謝および炎症性反応を高める目的で広く利用されている [1, 2]。ただし、そのような

過程を誘導する生物学的機序は、ほとんど知られておらず、安全な代謝刺激手技確立のための研究が大いに推奨される [3, 4]。体外衝撃波療法 (ESWT) は、真皮細胞および表皮細胞を含む各種の細胞タイプの代謝活性を改善する能力があることが認識されている [13-16]。ESWT が腱骨接合部の成長因子レベルを改善し、結果的に、新血管形成を改善することが既に明らかになっている [14]。ただし、こうした過程に関連する分子機序は、依然として調査されている。ESWT の経時的影響を理解することを目的として、治療した組織の逐次分析を実施した。

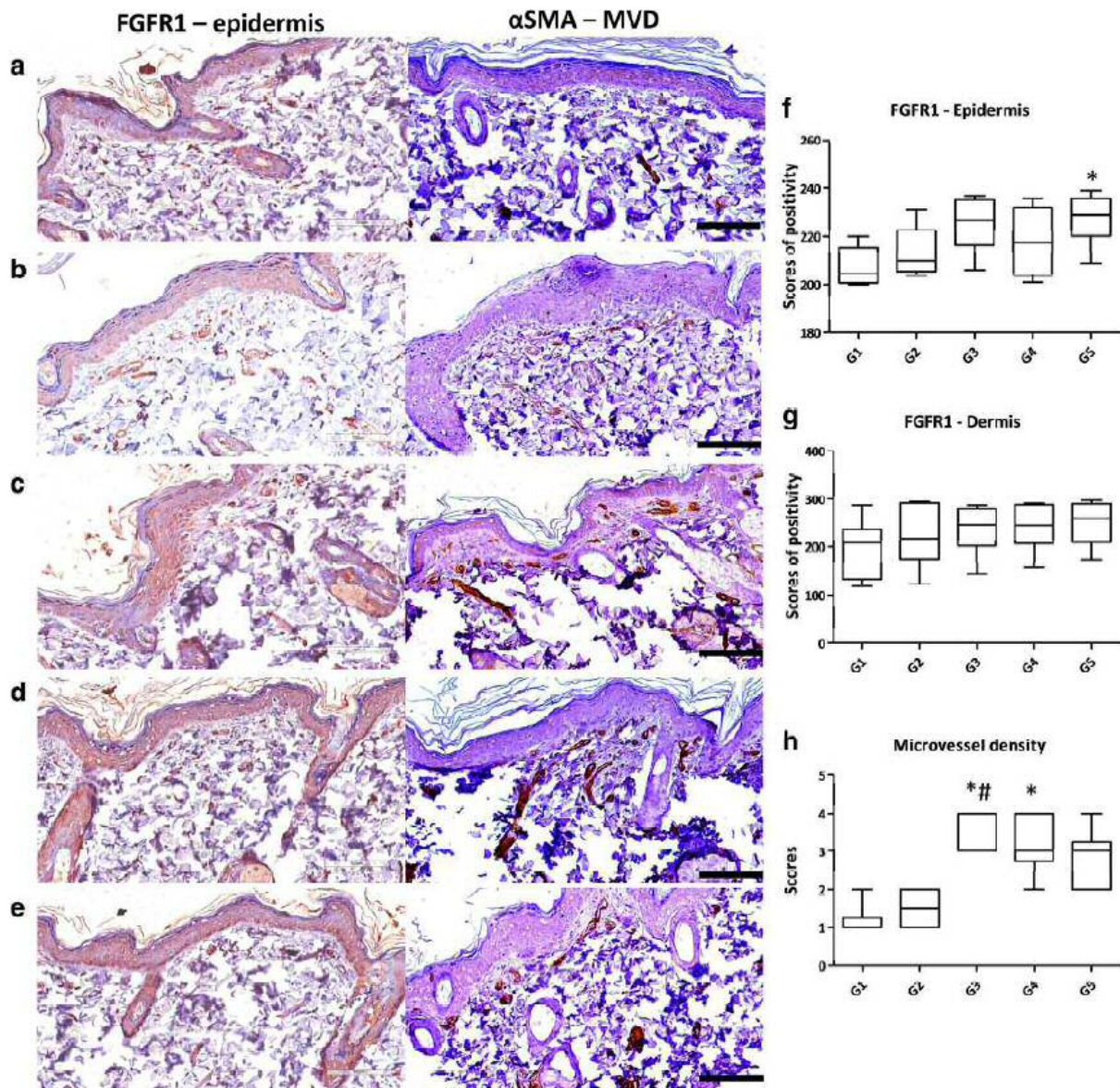


図3 ESWT 治療群において、血管を α -平滑筋アクチンに対して陽性に見出すことによって評価される FGFR1 免疫発現および微小血管密度 (MVD)。a G1。b G2。c G3。d G4。e G5。f FGFR1 表皮発現を示すグラフ図; G1 との統計的有意差*, 分散分析, $P = 0.0239$ 。g FGFR1 真皮発現を示すグラフ図; 統計的有意差なし, 分散分析, $P = 0.5078$ 。h MVD の得点。G1 との統計的有意差*, G2 との統計的有意差*, クラスカル-ウォリスの検定, $P = 0.0003$ 。

被検体は 5 群に分けられて 1 回または 2 回の ESWT セッションが行われ、治療後 1、7、14 および 21 日目の組織病理学的解析を行うために皮膚を除去した。このため、ESWT の経時的影響を解析することが可能であった。全体として、著者らはすべての被検体が ESWT から生き残り、副作用が見られないことを確認した。ESWT によって、ラット皮膚の表皮および真皮に若干の軽度の変化が生じた。ESWT を 1 回適用して治療したときはこの事象は非常にとらえ難く、ESWT を 2 回適用したときに最も関連した生物学的事象が明ら

かになり、線量依存効果が目立った。これは、セラライト[19]および in vitro(試験管内)研究[20]に関する以前の臨床研究と一致する[20]。

治療群で観察される表皮および真皮の厚さがより厚いことから、この刺激性効果が線量依存的であることが明らかになり、結果的に、若返り目的による療法として ESWT の使用を正当化している。確かに、著者らの研究グループは、以前に RF 療法[5]という治療の刺激的効果の結果として、表皮および真皮が厚くなる既知の若返り技法を証明した。Rosso ら [21]は、ESWT お

よび結果的にコラーゲン沈着刺激の機械的効果に関する文献を修正した。同著者は、ESWT は、繊維芽細胞および I 型コラーゲン沈着の結果的な増加を含めて、細胞増殖を引き起こす療法であると結論付けている。また、Vetrano ら.[22]は、ESWT によって、培養ヒト腱細胞の細胞増殖および I 型コラーゲン沈着が増加することを証明した。

分極を伴う光学顕微鏡検査下でピクロシリウスレッド染色を解析すると、高複屈折の厚い膠原繊維(オレンジ-赤)と薄い(黄緑色)膠原線維の視覚化が可能だった。このため、本研究において、ESWT 治療皮膚の I 型コラーゲンの定量化実施した。ESWT 治療皮膚では、I 型コラーゲン量がより多いことが観察されており、既に述べた研究を裏付けている。ESWT の結果として、著者らは、臨床診療において皮膚面の改善を促進し、老化および皮膚の弛緩徴候を予防することができることを期待している。こうした効果は、未治療と治療済みの動物に微細な違いがあるために予想される。

ESWT 治療によって I 型コラーゲンのレベルが調節されたが、マッソントリクローム染色によって評価される総コラーゲン量は変化がなかった。G3 だけは、その他の群に比較的に総コラーゲン量が有意に増加した。実際、いくつかの研究では、ESWT によって繊維芽細胞増殖を誘発し、I 型および III コラーゲンの遺伝子発現を変えることができることが証明されている[23、24]。これは、新膠原形成よりもコラーゲン再構築指数のほうが高いことから説明できるかもしれないが、これらの特有の問題を明確にするために、さらなる研究が推奨される。

血管由来の成長因子は、新血管形成の刺激因子に作用するので、真皮供給にとって重要である[2]。これらの因子の中で、FGF2 が関連皮膚成長因子と認められた[6、7]。Wang ら.[25]は、ESWT によって、血管内皮成長因子(VEGF)および内皮一酸化窒素シンターゼ(eNOS)を含む血管由来マーカーが過剰に発現し、ラット腱骨接合部の修復時に内皮細胞増殖がより高まるように誘発される可能性があることを証明している。また、その他の研究によれば、ESWT によって創

傷治癒中に VEGF が多く発現をするように誘発されることが示されている。ラット皮膚に ESWT を 2 回適用したときに、MVD と炎症性浸潤が増大し、細胞増殖が刺激されたことから、これらの所見は以前の研究を広く裏付けるものである。本研究は、ESWT によって FGF2 過剰発現が誘発されることを証明し、上腹部皮膚弁[26]、リンパ浮腫[27]および骨修復[28]の各ラットモデルで FGF2 アップレギュレーションを示した以前の研究を実証した。異なる動物モデルで得られるこれらの結果は、将来の臨床研究の根拠となり、さらに詳細な所見が出される可能性が生まれる。これらの以前の実験的研究に基づき[20、25、28]、著者らは、0.13 mJ/mm² の平均エネルギー粒子束密度で 500 インパルス(圧力:2 バール、1 秒に 4 回)の設定を選択した。臨床診療では、局所的に血流量が増加するために、充血が ESWT の結果として適用の部位に生じる可能性がある。

若返り手技に関して、ESWT は脂肪、限局性肥満症および皮膚軟弱の治療のために利用された事がある[29、30]。今回の研究では、著者らは、ESWT が安全な療法であり若返りのアプローチとして適応させることができるという追加の証拠を提示した。レーザーベースの若返り手技に関して、最も共通する治療は、二酸化炭素(CO₂)あるいは Er:YAG レーザーによるアブレイティブな表面再建である。効果の機序は、真皮下層の熱損傷のように、ESWT を使用したときに観察される生体影響と非常によく似ている。表皮は痛まず、コラーゲン産生が生じる[31-33]。ただし、さらなる研究により、これらの関連した側面を明確にするよう試みることが、大いに推奨される。

したがって、本研究は、ESWT が表皮および真皮の FGF2 活性およびその FGFR1 リガンドを調節し、結果的に、新膠原形成および新血管形成を促進することを示唆する。ESWT は、皮下脂肪層減少のための代替手段にもなりうることも言及されている。このため、今回の研究は、ラットの皮膚に関する ESWT の生体的影響について、今までにないデータを提供するものであり、こうした臨床研究のデータの確認は、大いに推奨される。

資金提供: 本試験は、科学的であり、Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq)の研究奨学制度(以下の番号で登録: 145722/2013-9、101367/2014-7 および 117277/2014-2、C.D.S.)と、C.D.S.に対する博士研究奨学制度のための FAPESP (São Paulo Research Foundation) (#2015/25905-1)から資金提供を受けた。

倫理基準の遵守

この実験的なプロトコルは、Animal Experimentation Code of Ethics と Brazilian College of Animal Experimentation のガイドラインに従っており、Ethics Committee of Potiguar University, Laureate International Universities (プロトコル番号: 002/2017) によって正式に承認された。

利害対立

著者らは、利害対立は存在しないと断言する。

インフォームドコンセント

該当なし。この記事は、ヒトを参加者として一切研究に含まない。

参照

1. Nobile V, Michelotti A, Cestone E (2016) A home-based eyebrows lifting effect using a novel device that emits electrostatic pulses containing RF energy, resulting in high frequency, low level dermal microcurrent pulsations: double blind, randomized clinical study of efficacy and safety. *J Cosmet Laser Ther* 18:234–238. <https://doi.org/10.3109/14764172.2016.1156704>
2. Widgerow AD, Fabi SG, Palestine RF et al (2016) Extracellular matrix modulation: optimizing skin care and rejuvenation procedures. *J Drugs Dermatol* 15:s63–s71
3. Fitzpatrick RE, Rostan EF (2003) Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther* 5:25–34
4. Sclafani AP, McCormick SA (2012) Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. *Arch Facial Plast Surg* 14:132–136. <https://doi.org/10.1001/archfacial.2011.784>
5. Meyer PF, de Oliveira P, Silva FKBA et al (2017) Radiofrequency treatment induces fibroblast growth factor 2 expression and subsequently promotes neocollagenesis and neoangiogenesis in the skin tissue. *Lasers Med Sci* 32:1727–1736. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2238-2>
6. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18:26–45. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0292>
7. Nugent MA, Iozzo RV (2000) Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32:115–120. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00123-5)
8. Cross MJ, Claesson-Welsh L (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22:201–207. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X)
9. Dantas Filho AM, Aguiar JL, Rocha LR, Azevedo IM, Ramalho E, Medeiros AC (2007) Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. *Acta Cir Bras* 22:64–71. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502007000700013>
10. Makino T, Jinnin M, Muchemwa FC et al (2009) Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways. *Br J Dermatol* 162:717–723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09581.x>
11. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA et al (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 6:743–750. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00073-3)
12. Yan D, Chen D, Cool SM et al (2011) Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 13:R130. <https://doi.org/10.1186/ar3441>
13. Mittermayr R, Antonic V, Hartinger J et al (2012) Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: technology, mechanisms, and clinical efficacy. *Wound Repair Regen* 20:456–465. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00796.x>
14. Kuo Y-R, Wu W-S, Hsieh Y-L et al (2007) Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *J Surg Res* 143:385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.12.552>
15. Schaden W, Thiele R, Köppl C et al (2007) Shock wave therapy for acute and chronic soft tissue wounds: a feasibility study. *J Surg Res* 143:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.01.009>
16. Birgin E, Gebhardt C, Hetjens S et al (2018) Extracorporeal shock wave therapy enhances receptor for advanced glycosylated end-product-dependent flap survival and angiogenesis. *Ann Plast Surg*. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001279>
17. Goh C (2009) The need for evidence-based aesthetic dermatology practice. *J Cutan Aesthet Surg* 2:65–71. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.58518>
18. Soares CD, Borges CF, Sena-Filho M et al (2017) Prognostic significance of cyclooxygenase 2 and phosphorylated Akt1 overexpression in primary nonmetastatic and metastatic cutaneous melanomas. *Melanoma Res* 27:448–456. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000368>
19. Knobloch K, Kraemer R (2015) Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for the treatment of cellulite – a current metaanalysis. *Int J Surg* 24:210–217. <https://doi.org/10.1016/J.IJSU.2015.07.644>
20. Zhang X, Yan X, Wang C et al (2014) The dose-effect relationship in extracorporeal shock wave therapy: the optimal parameter for extracorporeal shock wave therapy. *J Surg Res* 186:484–492. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.08.013>
21. Rosso F, Bonasia DE, Marmotti A et al (2015) Mechanical stimulation (pulsed electromagnetic fields “PEMF” and extracorporeal shock wave therapy “ESWT”) and tendon regeneration: a possible alternative. *Front Aging Neurosci* 7:211. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00211>
22. Vetrano M, d’Alessandro F, Torrisi MR et al (2011) Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:2159–2168. <https://doi.org/10.1007/s00167-011-1534-9>
23. Frairia R, Berta L (2011) Biological effects of extracorporeal shock waves on fibroblasts. a review. *Muscles Ligaments Tendons J* 1:138–147

24. Kuo Y-R, Wang C-T, Wang F-S et al (2009) Extracorporeal shock wave treatment modulates skin fibroblast recruitment and leukocyte infiltration for enhancing extended skin-flap survival. *Wound Repair Regen* 17:80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00444.x>
25. Wang C-J (2003) An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders. *Chang Gung Med J* 26:220–232
26. Meirer R, Brunner A, Deibl M et al (2007) Shock wave therapy reduces necrotic flap zones and induces VEGF expression in animal epigastric skin flap model. *J Reconstr Microsurg* 23:231–236. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981506>
27. Serizawa F, Ito K, Matsubara M et al (2011) Extracorporeal shock wave therapy induces therapeutic lymphangiogenesis in a rat model of secondary lymphoedema. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 42:254–260. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2011.02.029>
28. Hausdorf J, Sievers B, Schmitt-Sody M et al (2011) Stimulation of bone growth factor synthesis in human osteoblasts and fibroblasts after extracorporeal shock wave application. *Arch Orthop Trauma Surg* 131:303–309. <https://doi.org/10.1007/s00402-010-1166-4>
29. Adatto MA, Adatto-Neilson R, Novak P (2011) Body shaping with acoustic wave therapy AWT(®)/EPAT(®): randomized, controlled study on 14 subjects. *J Cosmet Laser Ther* 13:291–296. <https://doi.org/10.3109/14764172.2011.630089>
30. Knobloch K, Joest B, Vogt PM (2010) Cellulite and extracorporeal shockwave therapy (CelluShock-2009)—a randomized trial. *BMC Womens Health* 10:29. <https://doi.org/10.1186/1472-6874-10-29>
31. Hruza GJ, Dover JS (1996) Laser skin resurfacing. *Arch Dermatol* 132(4):451–455
32. Rostan EF (2005) Laser treatment of photodamaged skin. *Facial Plast Surg* 21(2):99–109
33. Tao L, Wu J, Qian H (2015) Intense pulsed light, near infrared pulsed light, and fractional laser combination therapy for skin rejuvenation in Asian subjects: a prospective multi-center study in China. *Lasers Med Sci* 30(7):1977–1983. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1792-8>