

ОБЛИК

Дело тонкое. Интимная зона

**CENSORED**



18+

esthetic guide №1 (24) февраль 2018

## Nicola Zerbinati

department of Surgical and Morphological Sciences, University of Insubria, Varese, Italy.

## Edoardo D'Este

dermatology Department Centro Medico Polispecialistico, Pavia, Italy.

## Roberto Mocchi

UB-Care S.r.l. Spin off University of Pavia, Pavia, Italy.

## Raffaele Rauso

department of Plastic Reconstructive Surgery, University of Foggia, Italy.

## Alberto Calligaro

department of Public Health, Experimental and Forensic Medicine, Unit of Histology and Embryology, University of Pavia, Italy.

## Примечание:

статья опубликована в Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents. Vol. 31, no. 2 (S2), 87–90 (2017).  
Перевод на русский язык доктора Ивана Юрченко.

## Pablo González-Isaza

department of Obstetrics and Gynecology, Urogynecology Unit, Head Chief Hospital Universitario San Jorge, Pereira, Colombia.

## Sabrina Sommatì

UB-Care S.r.l. Spin off University of Pavia, Pavia, Italy.

## Mario Cherubino

department of Biotechnology and Science of Life University of Insubria, Varese, Italy.

## Cristina Maccario

UB-Care S.r.l. Spin off University of Pavia, Pavia, Italy.

# Больше коллагена!

Оценка продукции коллагена человеческими фибробластами *in vitro* после обработки гиалуроновой кислотой, стабилизированной полимером полиэтиленгликоля с микромолекулами гидроксиапатита кальция в низкой концентрации.

## Введение

Neauvia Stimulate® представляет собой биосовместимый инъекционный филлер на основе гиалуроновой кислоты (ГК) (26 мг/мл), перекрестно связанной с 1% гидроксиапатита кальция (ГАК). Продукт предназначен для аугментации мягких тканей лица, восполняет объём и запускает процессы неоколлагеногенеза, улучшая качество кожи. Целью настоящего исследования явилась оценка возможной модуляции синтеза коллагена после обработки продуктом человеческих фибробластов, культивируемых *in vitro* (Lot. 160517-26-1/2 PEG). Несмотря на то, что предложенная экспериментальная модель является системой *in vitro*, она позволяет получить информацию, необходимую для прогнозирования возможной активности продукта при последующем его применении *in vivo*. Фибробласты человека (клетки PEU) инкубировали в течение 24 часов с продуктом в возрастающих концентрациях, контролем служили необработанные клетки. Модуляцию синтеза коллагена оценивали с использованием специального колориметрического набора (Sircol, Soluble Collagen Assay Kit). Увеличение продукции коллагена на 37,62% и 97,39% при применении продукта в концентрациях 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл соответственно было статистически значимым (значения \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем (необработанными клетками). Авторы пришли к заключению, что применение гидрогеля гиалуроновой кислоты в концентрации 26 мг/мл, стабилизированной ПЭГ (полиэтиленгликолем) с гидроксиапатитом кальция в низких концентрациях (1%), предопределяет статистически значимый прирост неоколлагеногенеза.

Neauvia Stimulate® (MatexLab SA, Lugano, CH) содержит чистую гиалуроновую кислоту пробиотического происхождения (*Bacillus Subtilis*), стабилизированную ПЭГ (полиэтиленгликолем) и микромолекулами (10–12 мкм) гидроксиапатита кальция в низкой концентрации (1%). Продукт можно считать «гибридным» филлером (полностью биосовместимым и биодegradуемым) с эффектом волюмизации, характерным для филлеров на основе полимеризованной гиалуроновой кислоты (ГК)<sup>[1, 2, 3]</sup>, а также со свойствами стимуляции неоколлагеногенеза. Последнее достигается благодаря воздействию гидроксиапатита кальция, который стимулирует выработку коллагена<sup>[4, 5, 6, 9]</sup>.

## Материалы и методы

### Подготовка образцов

Гидрогель гиалуроновой кислоты в концентрации 26 мг/мл, стабилизированной ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG), взвешивали и растворяли в концентрации 5 мг/мл в полной среде, содержащей минимально необходимую среду (MEM) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1 ммоль глутамина и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). В качестве положительного контроля использовали лаурилсульфат натрия (SLS), хорошо известное цитотоксическое вещество, и работали с ним так же, как и с исследуемым продуктом.

### Культуры клеток

Фибробласты — это клетки соединительной ткани, синтезирующие компоненты внеклеточного матрикса.

### Полиэтиленгликоль (ПЭГ, PEG).

В зависимости от средней молекулярной массы полимера — вязкая жидкость, гелеобразное или твёрдое вещество. Структурная формула имеет следующий вид:  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$

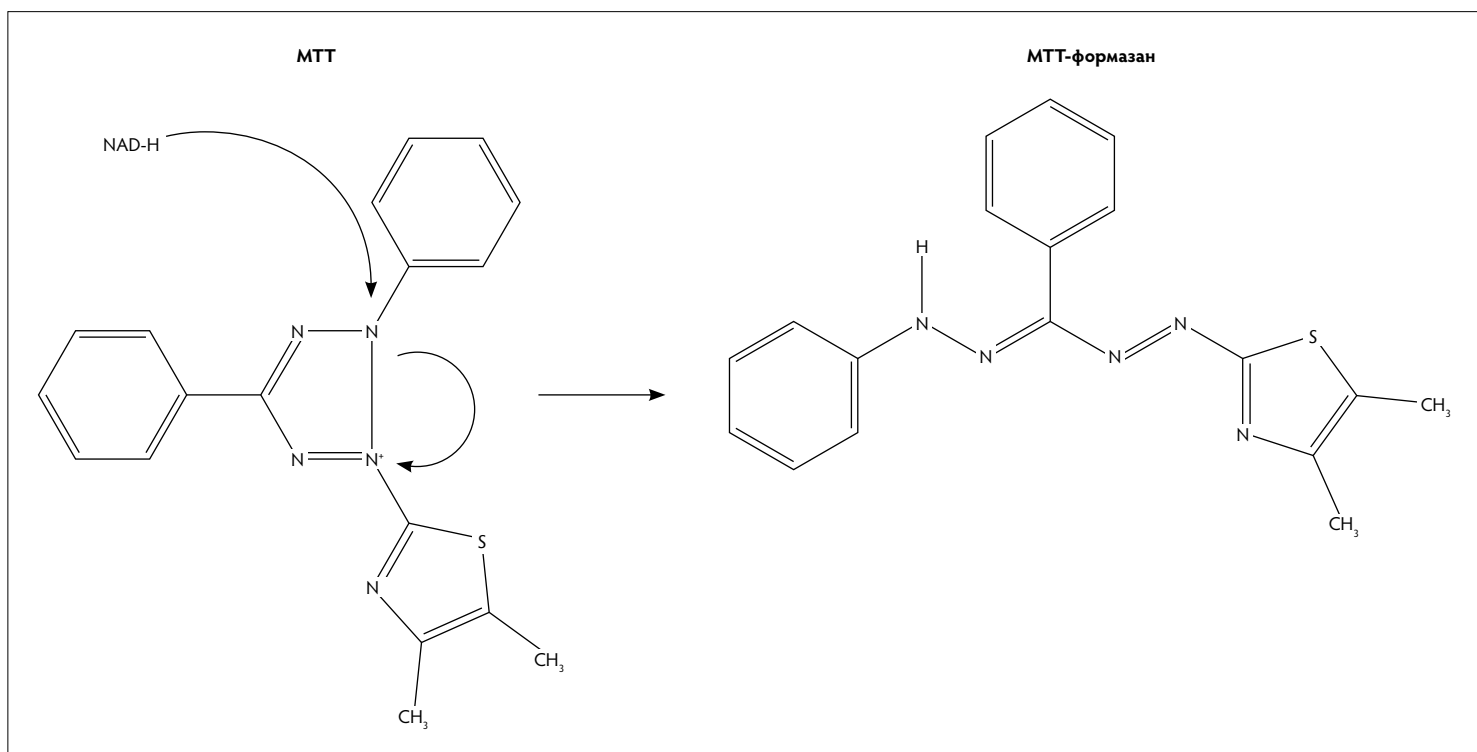


Рис. 1. Восстановление МТТ формазаном. Реакция катализируется сукцинатдегидрогеназой.

В исследовании использовали обычные эмбриональные фибробласты — клеточную линию человека (РЕU, код BS CL 97). Клеточную линию выращивали в условиях полной стерильности и поддерживали путём инкубации при 37° с 5%-ой углекислотой (СО).

#### Анализ цитотоксичности (тест МТТ)

МТТ-тест — это колориметрический анализ цитотоксичности, используемый для изучения пролиферации и жизнеспособности клеток на основании оценки эффективности работы митохондрий. В МТТ-тесте определяется уровень тетразолиевой соли, поскольку её содержание уменьшается вблизи митохондриальной дегидрогеназы при метаболической активности клеток. Восстановление МТТ приводит к образованию кристаллов формазана [Рис. 1], нерастворимых в культуральной среде, но растворимых в ДМСО, что придаёт типичный фиолетовый цвет митохондриям жизнеспособных клеток. И наоборот, поскольку в страдающих или мёртвых клетках активные митохондрии отсутствуют, уровень МТТ не снижается, что даёт менее интенсивный фиолетовый цвет [7]. Считается, что МТТ подходит для идентификации нецитотоксических концентраций гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) благодаря прямой связи между клеточным дыханием и жизнеспособностью клеток.

При подготовке к проведению анализа клетки РЕU гомогенно высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 1,5×10<sup>4</sup> клетки на лунку и инкубировали при 37° в увлажнённой атмосфере 5% СО<sub>2</sub>. Через 24 часа клетки обрабатывали продуктом в концентрациях от 5 мг/мл до 0,039 мг/мл в серийном разведении 1:2 (для каждой из 8-ми различных концентраций проводили 6 параллельных анализов). Клетки, обработанные SLS, использовали в качестве положительного контроля (Ctrl+, начальная концентрация 5 мг/мл в полной среде).

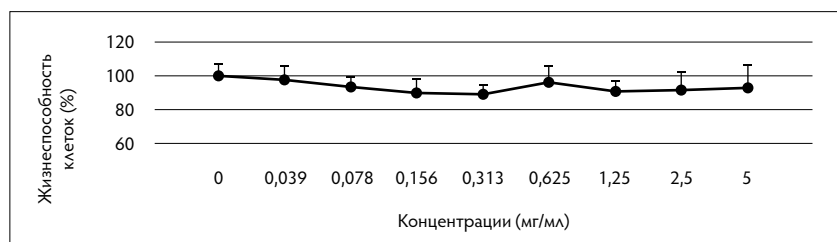
Культуры инкубировали в течение 24 часов. Затем к клеткам РЕU добавляли 10 мкл МТТ (5 мг/мл в PBS)

при 37° в течение 2 часов. Затем среду удаляли и добавляли к клеткам 100 мкл ДМСО. После этого измеряли оптическую плотность на длине волны 570 нм с использованием считывателя — микропланшета (Tecan Sunrise). Жизнеспособность клеток рассчитывали путём измерения разницы оптической плотности каждой из восьми концентраций тестируемого продукта по сравнению с контрольным образцом (необработанные клетки) [8].

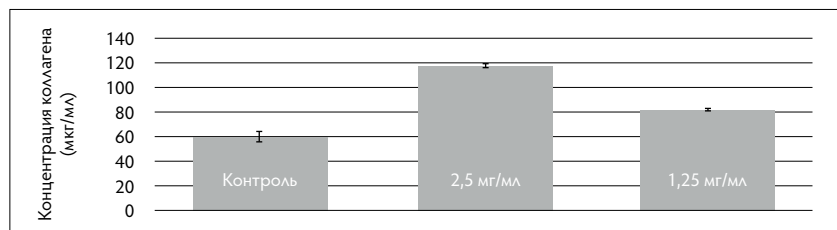
#### Оценка синтеза коллагена

Способность гидрогеля гиалуроновой кислоты в концентрации 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) модулировать продукцию коллагена фибробластами человека (клетки РЕU) оценивали после их обработки исследуемым продуктом в течение 24 часов с использованием колориметрического набора (Sircol, Soluble Collagen Assay Kit). При подготовке исследования клетки высевали гомогенно в 24-луночные планшеты с плотностью 8×10<sup>4</sup> клетки на лунку и инкубировали при 37° в увлажнённой атмосфере 5% СО<sub>2</sub>.

Через 48 часов выбрали две из тестируемых концентраций продукта, 1,25 и 2,5 мг/мл, которые продемонстрировали отсутствие цитотоксичности и максимальную растворимость (МТТ-тест). В качестве контроля использовали необработанные клетки (Ctrl). По окончании инкубации 200 мкл трис-НСl, рН 7,4, содержащего полиэтиленгликоль, добавляли к извлечённому супернатанту — для выделения и концентрирования коллагена, затем образцы хранили в течение ночи при температуре от 0° до 4°. Далее образцы центрифугировали при 12000 об/мин и инкубировали в течение 10-ти минут с красителем Sircol, связывающимся с коллагеном. За это время образовывался комплекс коллагена и красителя и осаждался из растворимого несвязанного красителя. Наконец, после этапа центрифугирования (12000 об/мин в течение 10-ти минут) добавляли реагент, содержащий гидроксид натрия 0,5м, способный растворять осадок коллагена; 200 мкл образца затем переносили в 96-луночный планшет для считывания спектрофотометрической оптической плотности на длине волны 555 нм.



**Рис. 2.** График жизнеспособности клеток, полученный после 24-часовой обработки клеток PEU продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты в концентрации 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG).



**Рис. 3.** Графическое представление содержания коллагена в клетках PEU, измеренного после обработки продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) в концентрациях 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл, в сравнении с контролем (необработанные клетки). Показатели \*p ≤ 0,05 и \*\*p ≤ 0,01 расценивали как статистически значимые при сравнении с контролем (необработанные клетки).

Гидрогель гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG)	Биообразец (мг/мл)
100.00 ± 7.77	0
97.34 ± 8.70	0.039
93.56 ± 6.31	0.078
90.49 ± 7.72	0.156
89.22 ± 6.38	0.313
95.71 ± 10.02	0.625
90.88 ± 7.00	1.25
91.76 ± 10.91	2.5
92.68 ± 13.64	5

**Таб. 1.** Процентное изменение (среднее ± стандартные отклонения) жизнеспособности клеток через 24 часа после обработки продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG).

## Результаты и обсуждение

Результаты измерения синтеза коллагена в клетках PEU после обработки продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) представлены в таблицах и диаграммах, в сравнении с контрольными образцами. Данные представлены как среднее ± стандартные отклонения (SD) как минимум двух независимых экспериментов, проведенных по отдельности.

### Оценка жизнеспособности клеток

В течение 24 часов клетки PEU инкубировали и обрабатывали продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ в 8-ми различных концентрациях (Lot. 160517-26-1/2 PEG) вместе с соответствующим положительным контролем для определения концентрации продукта, которая далее будет применяться в следующем исследовании. На рисунке 2 показаны результаты теста на цитотоксичность. Можно отметить, что продукт гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) не проявлял цитотоксической активности во всех протестированных концентрациях.

В таблице 1 приведены измеренные данные, выраженные в процентах по сравнению с контролем (необработанные клетки), для каждой изучаемой концентрации продукта. Можно отметить, что при всех исследованных концентрациях продукт гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) не проявлял цитотоксической активности; для дальнейших исследований были выбраны концентрации 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл на основании их максимальной растворимости в культуральной среде.

### Оценка синтеза коллагена

Клетки PEU обрабатывали (инкубация в течение 24 часов) двумя различными концентрациями продукта гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) (2,5 мг/мл и 1,25 мг/мл) с целью изучения возможной модуляции уровней коллагена. На рисунке 3 показана обработка клеток PEU продуктом гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) в концентрациях 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл. Полученные результаты показывают, что обе концентрации предопределяют увеличение уровня синтезированного коллагена на 37,62% и 97,39% соответственно после 24-часовой обработки клеток PEU по сравнению с контролем (Ctrl, необработанные клетки).

## Заключение

Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, позволяют прийти к заключению, что продукт гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) вызвал статистически значимое увеличение продукции коллагена после обработки фибробластов человека продуктом в двух концентрациях при оценке после 24-часовой инкубации. В частности, продукт гидрогеля гиалуроновой кислоты 26 мг/мл с ПЭГ (Lot. 160517-26-1/2 PEG) определяет статистически значимое увеличение продукции коллагена на 37,62% и 97,39% после обработки продуктом в концентрации 1,25 мг/мл и 2,5 мг/мл соответственно. ○

## Литература

- Larsen N. E., Leshchiner E., Poliak C. T., Balasz E. A., Piacquadro E. Evaluation of Hylan B (hylan gel) as soft tissue dermal implants. Proc Mat Res Soc (Spring Meeting, San Francisco, CA) 1995; 394:193–197.
- Larsen N. E., Poliak C. T., Reiner K., Leshchiner E., Balasz E. A. Hylan gel biomaterial: dermal and immunological compatibility. J Biomed Mater Res 1993; 27:1129–34.
- Duranti F., Salti G., Bovani B., Calandra M., Rosati M. L. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. Dermatol Surg 1998; 24:1317–25.
- Varani J., Dame M. K., Rittie L., Fligel S. E., Kang S., Fisher G. J., Voorhees J. J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. Am J Pathol 2006; 168:1861–8.
- Marmur E. S., Phelps R., Goldberg D. J. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. J Cosmet Laser Ther 2004; 6:223–6.
- Berlin AL, Hussain M., Goldberg DJ. Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis. Dermatol Surg 2008; 34 (SI): 64–7.
- Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1993; 65:55–63.
- Van Meerloo J., Kaspers G. J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol 2011; 731:237–45.
- Zerbinati N., D'Este E., Parodi P. C., Calligaro A. Microscopic and ultrastructural evidences in human skin following calcium hydroxylapatite filler treatment. Arch Dermatol Res 2017 [Epub ahead of print].

# NEAUVIA™

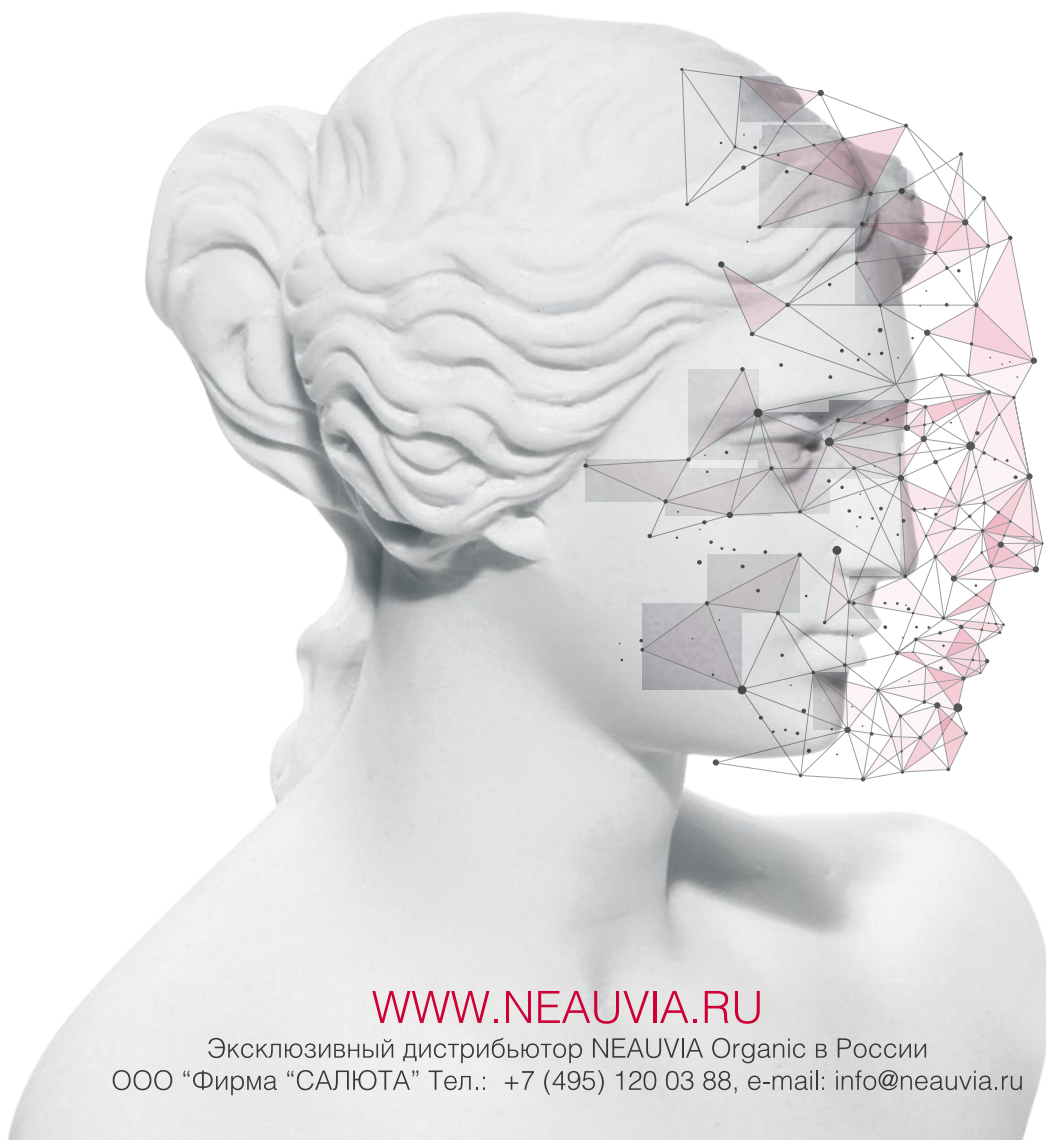
## ORGANIC



Первая в мире максимально натуральная линия филлеров

Разработана с использованием новейших технологий,  
обеспечивающих непревзойденную чистоту и эффективность

Чистые исходные материалы и современные производственные  
технологии делают филлеры **NEAUVIA** новым поколением препаратов



[WWW.NEAUVIA.RU](http://WWW.NEAUVIA.RU)

Эксклюзивный дистрибьютор NEAUVIA Organic в России  
ООО "Фирма "САЛЮТА" Тел.: +7 (495) 120 03 88, e-mail: info@neauvia.ru