ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

Антоньетта СТЕЛЛАВАТО
Луизиана КОРСУТО
Антонелла Д'АГОСТИНЬО
Аннализа Ла ГАТТА
Паола ДАЙАНА
Патриция БЕРНИНИ
Марио Де РОЗА
Кьяра ЧИРАЛЬДИ

департамент экспериментальной медицины, секция биотехнологии, медицинской гистологии и молекулярной биологии, Второй неаполитанский университет, Bioteknet (Италия), IBSA Farmaceutici Italia Srl (Лоди, Италия)

ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ РУБЕЖИ КЛЕТОЧНОЙ РЕАКТИВАЦИИ

РЕЗЮМЕ

Препараты на основе гиалуроновой кислоты (ГК) получили широкое распространение в эстетической медицине и дерматологии. ГК обладает высокой активностью в межклеточном матриксе, действует как инициатор каскадов биохимических реакций, стимулирует миграцию и пролиферацию клеток и посредством определенных взаимодействий со своими рецепторами обеспечивает «иммунный надзор» в коже. В составе наружных препаратов ГК используется как стимулятор, ускоряющий заживление ран. Внутрикожное введение инъекционных препаратов на основе ГК является привлекательным для специалистов и клиентов малоинвазивным методом предупреждения старения кожи (коррекция морщин, сухости, снижения эластичности) и восстановления ее нормальных функций.

Биологическую активность коммерческого препарата Profhilo®, созданного по технологии NAHYCO™, сравнивали с действием H-HA или L-HA. Формирование гибридных комплексов было подтверждено внезапным снижением значения 0 (вязкости) при реологических измерениях. Доказана устойчивость гибридных комплексов к действию гиалуронидазы (BTH). В экспериментах in vitro на кератиноцитах, фибробластах и 3D-модели полнослойной кожи Phenion® FT гибридные комплексы сравнивали с H-HA, широко используемой в процедурах биоревитализации, и L-HA, недавно предложенной в качестве самой активной фракции, модулирующей воспалительную реакцию. Для количественного анализа транскрипта коллагена и эластина проводили количественную ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени. Синтез всех исследованных веществ оценивали с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания. Было выявлено повышение степени экспрессии коллагена I и III типов в фибробластах, IV и VII типов в кератиноцитах при обработке гибридными комплексами по сравнению с необработанными клетками (контроль) и клетками, обработанными H-HA и L-HA. Увеличение экспрессии эластина, обнаруженное и на клеточной модели, и на 3D-модели кожи Phenion® FT в более длительное время (до 7 дней) подтверждает клинически выраженное повышение эластичности кожи. Исследованные биомаркеры свидетельствуют об увеличении ремоделирования ткани в присутствии Profhilo®, вероятно, благодаря постепенному высвобождению и одновременному действию двух типов ГК.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря физико-химическим и реологическим свойствам – вязкоэластичности и способности удерживать воду – гиалуроновая кислота играет основную роль в увлажнении ткани и ее проницаемости для небольших или крупных молекул, участвует в обеспечении функции иммунного барьера и обладает великолепной биосовместимостью. Высокое содержание ГК в дерме обеспечивает увлажнение кожи, одновременно поддерживая необходимый объем ткани, защищающий клетки от механического повреждения. Показано, что in vitro ГК сама по себе или в сочетании с другими веществами ускоряет процессы заживления ран [1], а *in vivo* – способствует регенерации тканей (при ожогах, язвах и т.д.) [2]. Кроме того, ГК обладает противовоспалительным и биостимулирующим действием и посредством взаимодействия с такими рецепторами, как CD44, TLR 4 и RHAMM активизирует другие сигнальные пути [3]. Недавно выявлена способность гиалуронана предотвращать повреждения, вызванные реактивными формами кислорода (РФК) [4]. ГК принимает непосредственное участие в процессе старения кожи. Благодаря вышеупомянутым свойствам ГК представляет собой великолепное средство для коррекции дефектов мягких тканей лица и активизации синтеза коллагена, что приводит к эффекту омоложения [5]. На процесс старения влияют факторы окружающей среды (образование свободных радикалов) и индивидуальный генетический фон. В частности, старение кожи можно рассматривать как повреждение волокон коллагена, эластина и – главным образом — снижение содержания ГК [6]. Поддерживающий каркас кожи отвечает за ее структурную целостность, эластичность, устойчивость и выполняет множество других функций. Разрушение ГК вместе с резорбцией костей играет главную роль в формировании морщин и появлении других признаков старения. Для поддержания здоровья и молодости кожи важно также и содержание структурных белков [7, 8]. Кроме того, старение кожи может быть связано с такими изменениями тканей различных слоев кожи, как разрушение дермо-эпидермального соединения, атрофия дермы и сокращение упругой ткани в субэпидермальной сети волокон эластина [9, 10]. Может также измениться соотношение различных типов

коллагена, что повлияет сразу на несколько функций кожи. С возрастом снижается выработка коллагена I и III типов и замедляется обновление эпидермиса [9]. Показано, что у пожилых женщин соотношение коллагена I и III типов повышается в основном из-за снижения синтеза коллагена I типа [11, 12]. Коллаген IV и VII типов участвует в гомеостазе кожи [13]: коллаген IV типа обнаружен, прежде всего, в области базальной мембраны и играет ключевую роль в поддержании механической плотности кожи, в то время как коллаген VII типа необходим для формирования якорных фибрилл и фиксации базальной мембраны к подлежащей дермальной ткани. Было высказано предположение, что образование морщин также вызывается постепенным сокращением вышеупомянутых типов коллагена [14]. Что касается гомеостаза кожи, то снижение содержания ГК может привести к нарушению функций кератиноцитов и фибробластов [15, 16]. Исследование на мышах показало, что применение ГК некоторым образом улучшает функции эпидермального барьера и увеличивает толщину ткани [17]. Все полученные с начала 1980-х годов данные привели к широкому использованию инъекций ГК с целью коррекции морщин и проведения омолаживающих процедур [12]. В настоящее время в эстетической медицине применяется множество препаратов на основе ГК, в большинстве из которых содержится стабилизированная (перекрестно связанная) гиалуроновая кислота. Благодаря такой химической модификации повышается стабильность, плотность и эластичность ГК (модули упругости G' и вязкости G"), но одновременно существенно изменяется и естественная структура ее молекулы. Наружные или инъекционные препараты, содержащие ГК с высокой молекулярной массой (H-HA), обладают различными действиями, восстанавливая увлажненность и физиологическое окружение, характерные для молодой кожи [18, 19].

В данном исследовании in vitro оценивали клеточные и молекулярные изменения дермальных кератиноцитов и фибробластов и эффективность нового препарата на основе ГК Profhilo® по сравнению с гелями, содержащими ГК с высокой (H-HA) и низкой (L-HA) молекулярной массой. В монокультурах фибробластов и кератиноцитов посредством количественной ПЦР в реальном времени оценивали содержание коллагена I, III, IV и VII типов и экспрессию гена эластина. Кроме того, с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания оценивали экспрессию и локализацию белков межклеточного матрикса (коллагена I и III типов и эластина) в совместно культивируемых кератиноцитах и фибробластах, обработанных гибридными комплексами, гиалуроновой кислотой с высокой (H-HA) и низкой (L-HA) молекулярной массой, и в необработанных клетках. В дополнение к этому проводили полный набор экспериментов, используя полнослойную 3D-модель кожи Phenion® FT (Phenion® Full Thickness Skin Model 3D) для определения экспрессии гена всех маркеров через 24 часа и 7 дней, и иммунофлюоресцентное окрашивание (для эластина), уже выполненное на монослое совместно культивируемых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Использовали гиалуроновую кислоту с высокой (H-HA; Mw = 1200 ±100 кДа) и низкой (L-HA; Mw = 100 ± 10 кДа) молекулярной массой (компания Altergon s.r.l., Италия), полученную путем микробной ферментации *Streptococcus equi* ssp. *equi* фармацевтической степени чистоты (чистота > 95%, содержание воды < 10%, ЕЭ/мг < 0,05, очень низкое содержание тяжелых металлов). Исследуемый препарат произведен по запатентованной технологии NAHYCO™ (WO/2012/032, 151) [20], основанной на тепловом воздействии для формирования гибридных совместных комплексов гиалуроновой кислоты, начиная со смешивания равных количеств (соотношение 1:1) H-HA (Mw = 1200 ± 100 кДа, Mw/Mn = 1,4) и L-HA (Mw = 100 ± 10 кДа, Mw/Mn = 1,4). Окончательная концентрация, используемая в экспериментах, составляла 32 г/л: 32 мг H-HA и 32 мг L-HA в предварительно наполненных шприцах объемом 2 мл.

Реологические измерения

Измерения динамической вязкости выполняли с помощью ротационного реометра Physica MCR301 (Anton Paar, Германия), оснащенного коаксиальными цилиндрами и системой температурного контроля на элементах Пельтье. Реологические кривые были построены для 50 измерений при температуре 25°C в диапазоне скоростей сдвига 0,001–300 с-1. На каждой кривой вязкость при нулевом сдвиге (η0) находилась в диапазоне ньютоновского плато. Кривые были получены для следующих образцов:

- H-HA (16 г/л, до и после тепловой обработки) – ГК с высокой молекулярной массой, растворенная при комнатной температуре, подвергавшаяся или нет тепловой обработке;
- H-HA + L-HA без тепловой обработки (16 г/л + 16 г/л) – ГК с высокой и низкой молекулярной массой, растворенная при комнатной температуре (окончательная концентрация 32 г/л);
- гибридные комплексы H-HA/L-HA – ГК с высокой и низкой молекулярной массой, растворенная при комнатной температуре и подвергавшаяся тепловому воздействию (окончательная концентрация 32 г/л, начальное соотношение H-HA/L-HA 1:1);
- H-HA + L-HA смешанные после раздельной тепловой обработки – ГК с высокой и низкой молекулярной массой, растворенная в различных флаконах (каждый из которых содержит 32 г/л или H-HA, или L-HA), подвергавшаяся тепловой обработке раздельно, а затем, после охлаждения до комнатной температуры, смешанная в соотношении 1:1 (v/v) (окончательная концентрация 32 г/л).

Устойчивость к действию гиалуронидазы

Образцы гибридных комплексов H-HA/L-HA разводили фосфатным буфером до концентрации 4 мг/мл и инкубировали в присутствии бычьей тестикулярной гиалуронидазы (1 ед./мл) при температуре 37°C при перемешивании (1000 об./мин). В различные моменты инкубации (в пределах от 30 минут до 10 дней) брали образцы, кипятили в течение 10 минут для инактивации фермента, а затем разводили для хроматографического анализа. При этом использовали трехдетекторный модуль для гель-проникающей хроматографии SEC-TDA (Viscotek, Lab Service Analytica ▷

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ РУБЕЖИ КЛЕТОЧНОЙ РЕАКТИВАЦИИ

s.r.l., Италия). Система SEC-TDA и условия проведения анализа подробно описаны в работах [21, 22]. Определяли молекулярную массу образца (Mw, Mn, Mw/Mn), размер молекул (гидродинамический радиус Rh) и распределение внутренней вязкости ([η]). Разрушения отслеживали по уменьшению в образце фракции (w/w %) с Mw более 1 мДа. В качестве контроля использовали линейную H-HA (Mw = 1120 ± 100 кДа; Mw/Mn = 1,5 ± 0,1).

Культуры клеток

Для оценки биологических свойств гибридных комплексов ГК в качестве клеточных моделей кожи использовали культуры человеческих кератиноцитов (HaCat) и фибробластов (HDF). Спонтанно трансформированные неонкогенные кератиноциты линии HaCat были предоставлены Институтом зоопрофилактики (Istituto Zooprofilattico, Брешиа, Италия). Клетки культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), в присутствии 10% (v/v) термально инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS), пенициллина 100 ед./мл и стрептомицина 100 мкг/мл. DMEM, FBS, фосфатный буфер с пенициллином/стрептомицином и трипсин были предоставлены компанией Gibco Invitrogen (Милан, Италия). Дермальные фибробласты человека, иммортализованные с помощью hTERT (фибробласты человека линии BJ-5ta, ATCC® No. CRL-4001™), культивировали в средах DMEM и 199, взятых в соотношении 4:1 с добавлением 0,01 мг/мл гидромицина B и 10% (v/v) FBS. Все материалы для культуры HDF были приобретены у компании ATCC (США). Клетки выращивали в планшете для культуры тканей (BD Falcon, Италия), в термостате, в условиях влажности (95% воздуха/5%CO_2 v/v), при температуре 37°C. Для анализа экспрессии гена кератиноциты и фибробласты культивировали в различных клеточных культурах. Клетки высевали в стандартный 24-луночный планшет 3,75 × 104 кл./см^2. Для иммунофлюоресцентного окрашивания использовали совместно культивируемые клетки HaCat/HDF. В этой модели высевали кератиноциты и фибробласты, совместно культивировали, а затем анализировали на предметном стекле под микроскопом. Для разделения двух популяций клеток и их взаимодействия использовали чашки μ-Dish (35 мм, высокие) (Ibidi, Integrated BioDiagnostics, Мюнхен, Германия). Клетки высевали непосредственно в контейнер, прикрепленной к специальному предметному стеклу микроскопа (BD Falcon™ BD Biosciences), в соотношении HaCat:HDF 1:1,25 (1 × 103/см^2 и 1,25 × 103/см^2, соответственно). В обеих моделях клетки обрабатывали H-HA (1400 кДа, 0,16% w/w), L-HA (100 кДа, 0,16% w/w) и гибридными комплексами (H-HA/L-HA 0,16% w/w). Обработку проводили в течение 4 и 24 часов для анализа экспрессии гена и 24 часов — для флюоресцентного окрашивания.

3D-модель кожи

В данном исследовании использовали полнослойную модель кожи Phenion® FT (Henkel, Дюссельдорф, Германия) диаметром 1,3 см. В этой модели кератиноциты эпидермиса и фибробласты дермы (полученные из биоптатов здоровых доноров) в условиях культивирования формируют кожный эквивалент, напоминающий человеческую кожу с многослойной структурой и тканевыми функциями [23]. После этого модели были немедленно удалены из полутвердой транспортной среды. Три небольшие чашки Петри с 2-мя стерильными металлическими крепежами были размещены в большой чашке Петри (диаметром 100 мм). Небольшие чашки Петри с 5-ю мл питательной среды ALI1 и моделями кожи были сразу перенесены в термостат (37°C, 5% CO_2). В 6 различных точек модели, чуть ниже эпидермиса, в дермальный слой, выполнили 6 инъекций по 50 мкл каждая. Вводили гибридные комплексы (гель Profhilo®) и H-HA или L-HA. Затем образцы инкубировали в течение 24 часов и 7 дней. Контрольным образцом служила модель кожи, обработанная буферным раствором (6 инъекций по 50 мкл). Результат введения препарата Profhilo® и по отдельности H-HA или L-HA оценивали по действию на выработку коллагена I (COLI), III (COLIII), IV (COLIV), VII (COLVII) типов и эластина (ELS).

Через 24 часа и 7 дней на различных участках модели кожи стерильным лезвием делали срезы, которые погружали в соответствующий буфер для дальнейших исследований, в частности для проведения ПЦР в реальном времени и иммунофлюоресцентного окрашивания.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени на монослое клеток

Экспрессию каждой мРНК, кодирующей такие белки межклеточного матрикса, как коллаген I (COLIA1), III (COLIIIA1), IV (COLIVA1) и VII (COLVIIA1) типов и эластин (ELS), анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). РНК выделяли из кератиноцитов и фибробластов с помощью реагента TRIzol® (Invitrogen, Милан, Италия) согласно рекомендациям производителя, полностью описанным D'Agostino с соавторами (2015). Один мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой (набор без ДНК; Ambion-

ТАБЛИЦА 1. **Последовательность праймера для специфических биомаркеров, используемых для qRT-PCR**

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	T°C ПЦР
HPRT	5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3'	5'-CGAGCAAGACGTTCAGTCCT-3'	55°C
COLIA1	5'-CCAGAAGAACTGGTACATCA-3'	5'-CCGCCATACTCGAACTGGAA-3'	55°C
COLIIIA1	5'-TGGTCCCCAAGGTGTCAAAG-3'	5'-GGGGGTCCTGGGTTACCATTA-3'	55°C
COLIVA1	5'-GGATCGGCTACTCTTTTGTGATG-3'	5'-AAGCGTTTGCGTAGTAATTGCA-3'	55°C
COLVIIA1	5'-CGGAACTGACCATCCAGAAT-3'	5'-AATAGGGTGCTCACGGTCAC-3'	55°C
Эластин	5'-AGGTGTATACCCAGGTGGCGTGCT-3'	5'-CAACCCCTGTCCCTGTTGGGTAAC-3'	60°C

Applied Biosystems), был преобразован в кДНК с помощью набора для обратной транскрипции (Reverse Transcription System Kit, Promega, Милан, Италия). Затем с использованием реактивов iQ™ SYBR1-Green Supermix (Bio-Rad Laboratories s.r.l., Милан, Италия) была выполнена ПЦР с соответствующими парами праймеров, чтобы оценить степень экспрессии коллагена и эластина. Последовательности праймеров и протокол амплификации представлены в табл. 1. Все реакции выполняли в трех параллельных опытах, и относительную экспрессию специфической мРНК определяли, нормализуя к конститутивному гену гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HPRT). Кратность изменения экспрессии гена вычисляли с помощью сравнительного порогового метода (ΔΔCt = разница ΔCt между клетками, обработанными ГК, и контролем). Результаты выражали как нормализованную кратность экспрессии по сравнению с контролем, вычисленную с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ™5 (Bio-Rad Laboratories Srl), как ссотношение точек пересечения кривых амплификации нескольких генов и внутреннего стандарта [24].

Вестерн-блоттинг для монослоя клеток

Через 7 дней обработки H-HA, L-HA и гибридными комплексами H-HA/L-HA выполняли вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в буфере RIPA (Cell Signaling Technology, США). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [25], 80 мкг внутриклеточных белков растворяли в 10% растворе SDS–PAGE. Затем разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham). Мембрану блокировали в 5% растворе молока в трис-буфере и 0,05% Tween-20. Первичное антитело к эластину (60 кДа) использовали в разведении 1:250. Иммунореактивные полосы определяли методом хемилюминесценции с применением вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (Santacruz Biotechnology; разведение 1:5000) и реагирующего с системой ECL (Chemicon-Millipore). Уровни белка нормализовали по отношению к сигналу антиактин-поликлонального антитела, используемого в качестве конститутивного белка (Santacruz Biotechnology; разведение 1:1000). Полуколичественный анализ уровней белка выполняли с помощью систем гель-документирования Gel Doc 2000 UV System и Gel Doc EZ Imager (Quantity one software, Bio-Rad Laboratories Srl).

Иммунофлюоресцентное окрашивание на монослое клеток

Экспрессию трех белков межклеточного матрикса — коллагена I и III типов и эластина – оценивали в фиксированных совместно культивированных HaCat/HDF. Через 24 часа и 7 дней инкубации только для антител к эластину совместно культивированные клетки для обеспечения однородных условий флюоресцентного анализа одновременно окрашивали, в течение 15 минут фиксировали в 4% параформальдегиде, отмывали в фосфатном буфере и в течение 60 минут блокировали с помощью блокирующего раствора (1X PBS/5% нормальная сыворотка/0,3% тритон X-100).

Затем совместно культивируемые клетки инкубировали в течение ночи (температура 4°C) с первичными антителами: коллаген I типа (моноклональные кроличьи антитела, 1:100; Abcam, Кембридж, Массачусетс, США), эластин (моноклональные мышиные антитела, 1:50; Santa Cruz biotechnology, США), коллаген III типа (поликлональные мышиные антитела, 1:100; Novus Biologicals, Кембридж, Великобритания). После трех отмываний предметные стекла инкубировали с вторичными антителами козы к IgG кролика (H+L) Alexa Fluor® 488 conjugate (1:100; Life Technologies, Италия), вторичными антителами козы к IgG мыши (H+L) Alexa Fluor® 568 conjugate (1:100; Life Technologies, Италия). Для визуализации филаментов актина клетки в течение 40 минут при комнатной температуре окрашивали раствором 50 мг/мл конъюгата флуоресцентного фаллоидина-TRITC (Sigma-Aldrich, Италия) в фосфатном буфере. Ядра в течение 10 минут контрастно окрашивали красителем Hoechst (0,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, Италия). Покровные стекла обрабатывали реагентом ProLong™ antifade mountant (Life Technologies, Италия).

Количественная ПЦР в реальном времени на модели FT-кожи

Для выделения тотальной РНК из моделей FT-кожи использовали набор TRIzol® (Invitrogen, Милан, Италия) и гомогенизатор тканей Tissue Ruptor (Qiagen, Хильден, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию кДНК выполняли с помощью набора для обратной транскрипции Reverse Transcription System Kit (Promega, Милан, Италия). Затем проводили ПЦР как описано выше. Исследовали образцы 3D-модели кожи FT, обработанные:

- раствором фосфатного буфера (контроль);
- гибридными комплексами H-HA/L-HA;
- H-HA;
- L-HA. ▷

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

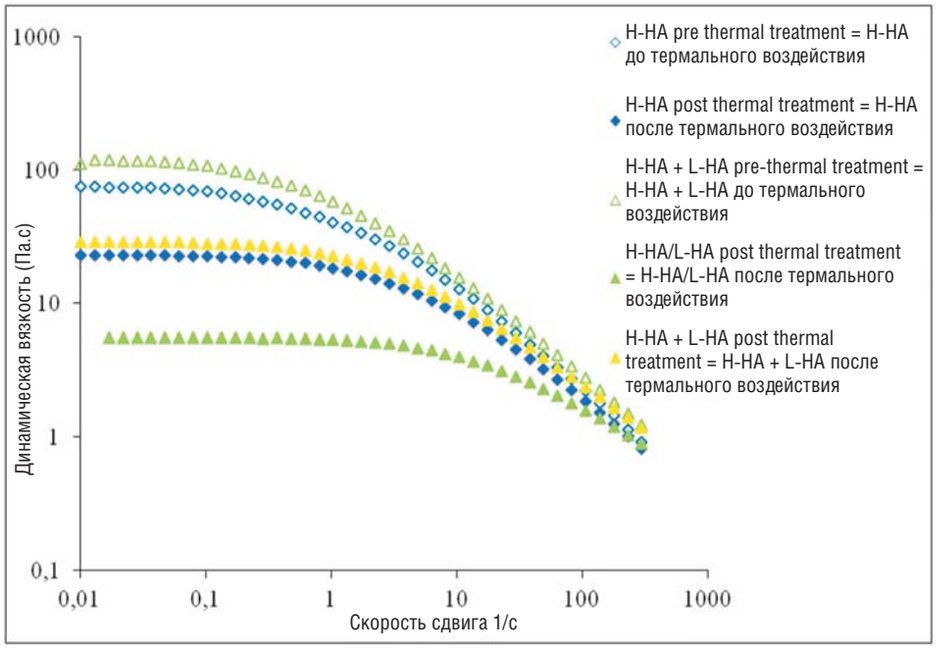

РИС. 1. *Реологические кривые (η vs скорость сдвига) для H-HA до и после теплового воздействия (пустые и сплошные синие символы, соответственно), H-HA + L-HA до теплового воздействия (пустые зеленые треугольники), гибридных комплексов H-HA/L-HA (сплошные зеленые треугольники), смеси H-HA + L-HA, H-HA и L-HA обрабатывали отдельно, а затем после охлаждения смешивали (сплошные желтые символы)*

Кратность изменения экспрессии гена вычисляли с помощью сравнительного порогового метода (ΔΔCt = разница ΔCt между клетками, обработанными ГК, и отрицательным контролем). Результаты выражали как нормализованную кратность экспрессии относительно конститутивного гена, вычисленную с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ™ 5 (Bio-Rad Laboratories Srl).

Иммунофлюоресцентное окрашивание эластина на модели FT-кожи

После инкубации (в течение 24 часов и 7 дней) модели FT-кожи на ночь погружали в формалин 4% v/v в фосфатном буфере.

Фрагменты FT-кожи обезвоживали этиловым спиртом при увеличивающейся концентрации (до 95% v/v), затем – изопропиловым спиртом, далее на ночь оставляли в растворе ксилена для окончательной подготовки к заливке в парафин; потом с помощью микротома готовили срезы (толщиной 10–20 мкм) для инкубации антител эластина.

На этапе иммунофлуоресценции выполняли депарафинизацию и обезвоживание, в течение 8 минут срезы инкубировали при температуре 99°C в цитратном буфере в качестве демаскировки антигена, в течение 60 минут блокировали в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере, затем инкубировали с первичным антителом: эластин (моноклональные мышиные антитела, 1:50; Santa Cruz biotechnology, США). После чего срезы в течение 1 часа инкубировали с соответствующим вторичным антителом Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Для визуализации актиновых филаментов клетки в течение 40 минут при комнатной температуре

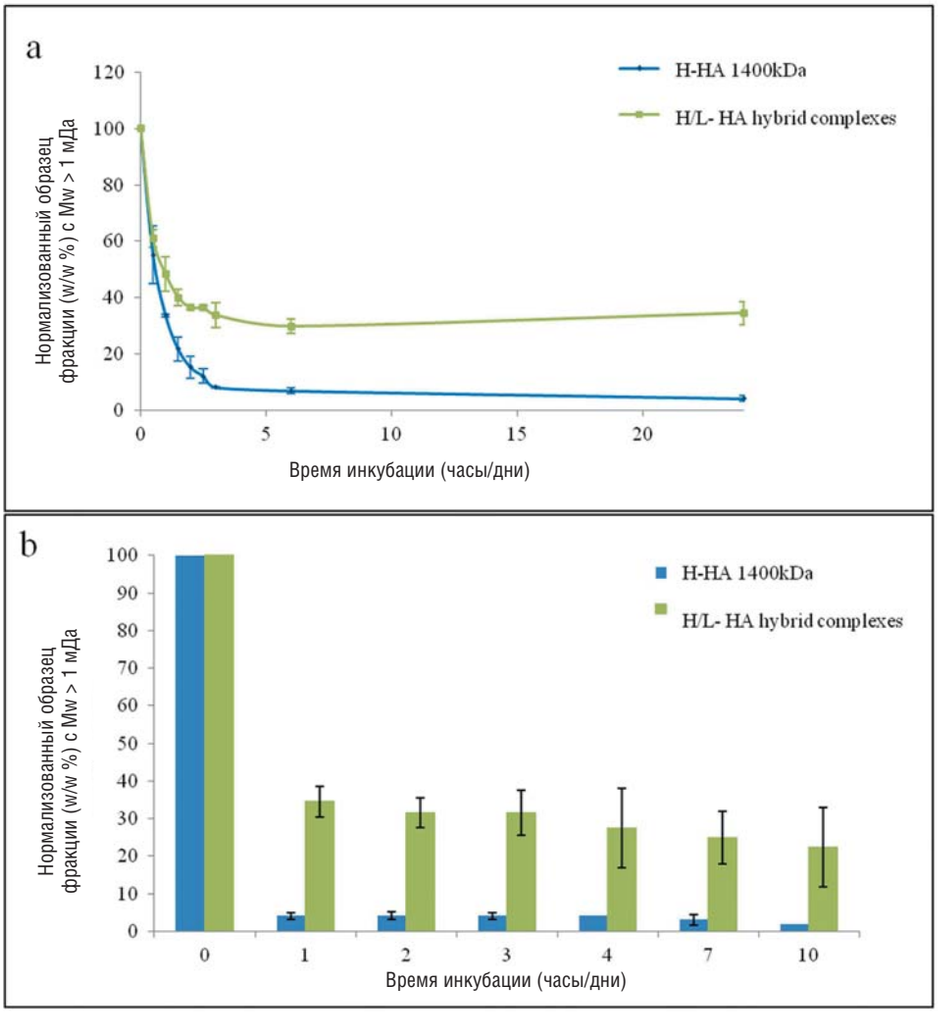

РИС. 2. *Результаты исследования чувствительности к действию ферментов для гибридного комплекса и H-HA: нормализованный образец фракции (w/w %) с Mw выше 1 мДа в течение действия ВТН 1 ед./мл до 24 часов (a) и 10 дней (b)*

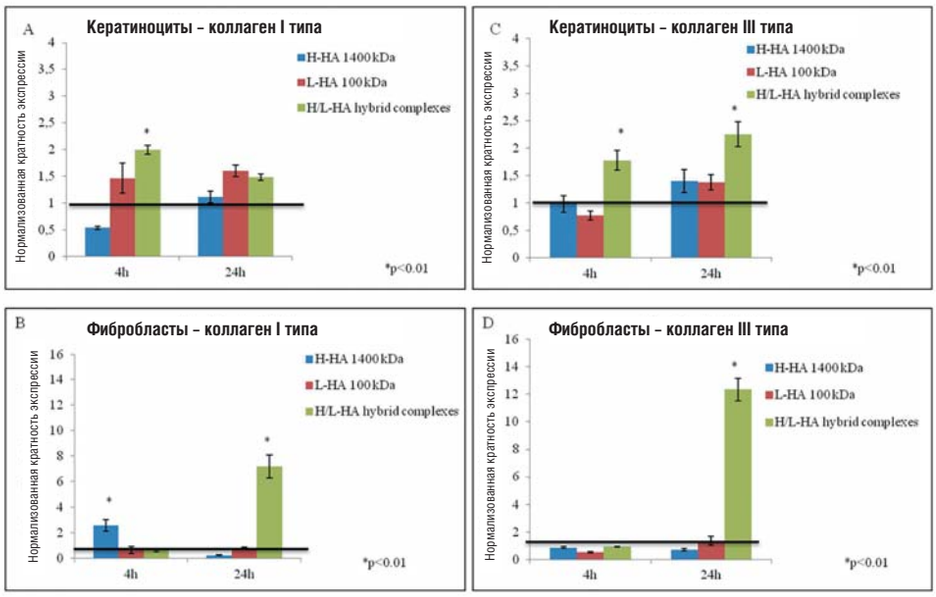

РИС. 3. *qRT-PCR экспрессии COLI и COLIII. Транскрипционный анализ генов COLIA1 и COLIIIA1 в кератиноцитах (a-в) и фибробластах (c-d) в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) через 4 и 24 часа. Значения вычислены как среднее ± SD трех различных экспериментов и выражены как нормализованная кратность увеличения мРНК по сравнению с контролем (1). T-критерий Стьюдента (*p<0.01)*

ТАБЛИЦА 2. **Реологические значения (η0) для H-HA (исходный материал для Profhilo®), смеси H-HA + L-HA и H-HA/L-HA (комплекс) до и после теплового воздействия (12 минут при t=120°C) и соответствующая кратность уменьшения**

η	η0 (Па × с) до теплового воздействия	η0 (Па × с) после теплового воздействия	Кратность уменьшения
H-HA (16 мг/л)	74,4 ± 0,3	23,0 ± 0,2	3,2
Смесь H-HA + L-HA (16 + 16 мг/л)	120,0 ± 0,5	28,3 ± 0,4	4,7
Комплекс H-HA /L-HA (16 + 16 г/л)	120,0 ± 0,5	5,5 ± 0,0	21,9

окрашивали раствором 50 мг/мл конъюгата флуоресцентного фаллоидина-TRITC (Sigma-Aldrich, Италия) в фосфатном буфере. Ядра в течение 10 минут контрастно окрашивали красителем Hoechst (0,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, Италия). Затем образцы исследовали под флюоресцентным микроскопом Nikon (Multicolor Package, Leica).

Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трех параллельных опытах. Для статистической оценки использовали t-критерий Стьюдента. Уровень значимости выбирали при p<0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерения динамической вязкости

Реологические кривые изображены на рис. 1. В частности, кривые были построены для H-HA (пункт 1 в параграфе «Реологические измерения»), H-HA + L-HA, смешанной до или после тепловой обработки (пункты 2 и 4), и для гибридных комплексов H-HA/L-HA (пункт 3).

Значения вязкости при нулевом сдвиге (η0) для исследуемых образцов приведены в табл. 2.

У всех образцов отмечалось снижение вязкости, но с постоянным η0 при скорости сдвига от 0,01 до 0,5 с-1. Уменьшение динамической вязкости более чем в 20 раз было связано с формированием гибридных комплексов (табл. 2). Действительно, при сравнении η0 образцов 2 (смесь H-HA и L-HA при комнатной температуре) и 4 (те же растворы, подвергшиеся тепловой обработке, а затем смешанные) наблюдалось только 4,7-кратное уменьшение вязкости, в то время как вязкость образца 1 (H-HA) уменьшилась в 3,2 раза.

Низкое значение η0 гибридных комплексов обеспечивает более легкое введение препарата (рекомендуется применять иглу 30G) и ожидаемое лучшее распределение в ткани.

Устойчивость к действию ферментов

Результаты исследования ферментативного разрушения приведены на рис. 2. Оценивали остаточную фракцию (w/w %) с молекулярной массой выше 1 мДа после инкубации в присутствии ВТН 1 ед./мл. Изучали гибридные комплексы ГК и линейную H-HA после инкубации от 30 минут до 10 дней в присутствии фермента (рис. 2a, 2b). Значения были нормализованы для начального состава в момент времени t0 (до инкубации). Гибридные комплексы ГК показали значительно более высокую устойчивость к действию ВТН, чем H-HA. Через день инкубации в результате действия ВТН остаточная фракция фракции H-HA (в гибридных комплексах) снизилась примерно на 35% по сравнению с начальной концентрацией и менее чем на 10% по сравнению с линейной H-HA. В дальнейшем при увеличении срока инкубации до 10 дней в обоих образцах не отмечалось значительного разрушения.

Анализ коллагена с помощью ПЦР в реальном времени на монослое клеток

Исследования экспрессии генов коллагена (I, III, IV, VII типов) и эластина выполняли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Результаты представляли как нормализованную кратность увеличения экспрессии по сравнению с контрольными необработанными клетками и конститутивным геном HPRT. Уровни экспрессии гена коллагена I и III типов в культурах кератиноцитов и фибробластов показаны на рис. 3.

Через 4 часа инкубации в присутствии гибридных комплексов ГК уровни экспрессии коллагена I типа в кератиноцитах были в 2 раза выше по сравнению с контрольными клетками и клетками, обработанными H-HA и L-HA. Значения для последних и контрольных клеток были подобны (0,5 и 1,5 раза, соответственно) (рис. 3a). Через 4 часа обработка фибробластов H-HA привела к более чем 2-кратному увеличению экспрессии гена коллагена I типа. Через 24 часа в присутствии гибридных комплексов ГК была обнаружена в 7 раз большая экспрессия гена ▷

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ РУБЕЖИ КЛЕТОЧНОЙ РЕАКТИВАЦИИ

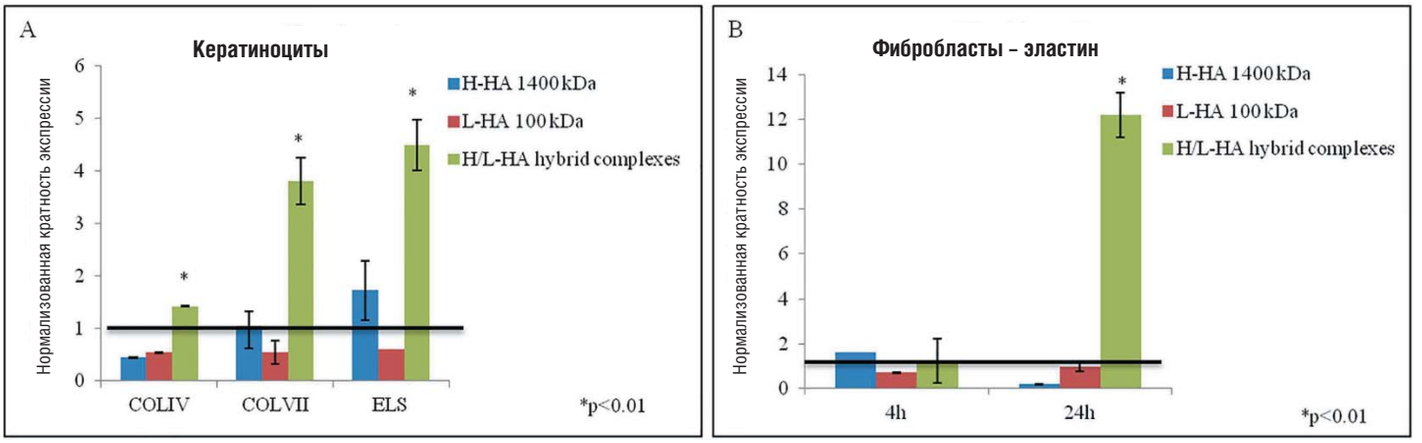

РИС. 4. *qRT-PCR экспрессии COLIV, COLVII и ELS. Транскрипционный анализ генов COLIVA1, COLVIIA1 и ELS в кератиноцитах (a) через 4 часа и фибробластах (b-c) в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) через 4 и 24 часа. Значения представлены как среднее ± SD трех различных экспериментов и выражены как нормализованная кратность увеличения мРНК по сравнению с контролем (1). Согласно t-критерию Стьюдента (*p<0,01), различия между образцами (комплексы H-HA/L-HA по сравнению с H-HA) значимые*

коллагена I типа по сравнению с обработанным H-HA и L-HA (рис. 3b). Что касается экспрессии гена коллагена III типа в кератиноцитах, то через 24 часа в присутствии гибридных комплексов ГК отмечалось ее 2-кратное увеличение по сравнению с клетками, обработанными H-HA и L-HA (рис. 3c). В фибробластах наблюдалось 12-кратное увеличение (рис. 3d).

На рис. 4 приведены нормализованные уровни экспрессии мРНК COLIV, COLVII и ELS в кератиноцитах и ELS в фибробластах. После 4 часов инкубации в присутствии гибридных комплексов H-HA/L-HA значительно повысилась экспрессия COLIV, COLVII и ELS в кератиноцитах (рис. 4a), в то время как в фибробластах уровни мРНК COLIV и COLVII были немного меньше или подобны значениям, отмечавшимся в контрольных клетках. Через 24 часа в присутствии гибридных комплексов ГК значительно повысился ELS (в 12 раз) (рис. 4b).

Вестерн-блоттинг эластина

Как показано на рис. 5, вестерн-блоттинг выявил значительное увеличение эластина, особенно в присутствии гибридных комплексов H-HA/L-HA по сравнению с H-HA и L-HA и контролем.

Иммунофлюоресцентное окрашивание коллагена и эластина на монослое клеток

Интенсивность синтеза и содержание коллагена (COLI и COLIII) и эластина (ELS) выявляли иммунофлюоресцентным окрашиванием совместно культивируемых кератиноцитов и фибробластов. Флюоресцентная микроскопия показала, что синтез коллагена I типа был выше в фибробластах, чем в кератиноцитах (рис. 6). Кроме того, результаты позволяют предположить различную экспрессию и локализацию COLI при обработке клеток гибридными комплексами ГК по сравнению с обработкой H-HA и L-HA.

Через 24 часа инкубации интенсивность флюоресценции COLIII была выше в присутствии гибридных комплексов ГК по сравнению с контролем и клетками, обработанными H-HA и L-HA (рис. 7). Рис. 8 иллюстрирует более высокую экспрессию эластина при обработке совместно культивируемых кератиноцитов-фибробластов гибридными комплексами по сравнению с обработкой ГК с высокой и низкой молекулярной массой, соответственно. Кроме того, на рис. 9 показано иммунофлюоресцентное окрашивание эластина через 7 дней инкубации. Эти данные подтвердили, что гибридные комплексы ГК повышают экспрессию эластина по сравнению с контролем и длительной обработкой H-HA и L-HA по отдельности.

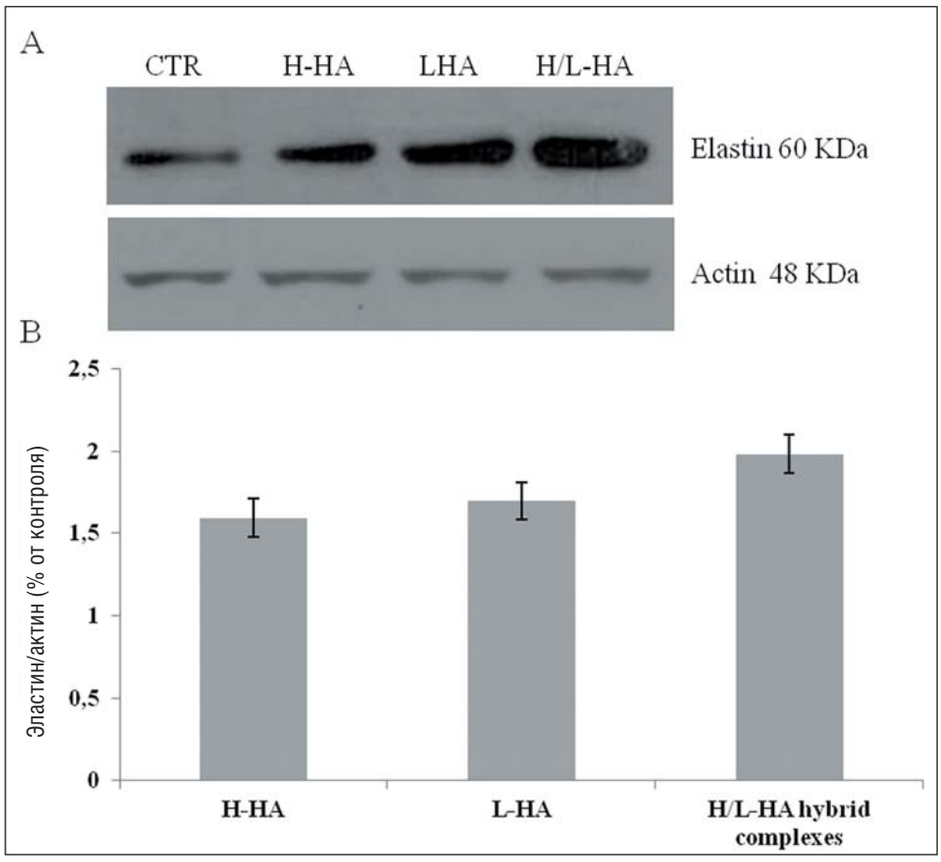

РИС. 5. *Вестерн-блоттинг уровней эластина и коститутивного белка актина в образцах, обработанных H-HA, L-HA и гибридными комплексами H-HA/L-HA, через 7 дней обработки по сравнению с контролем. (A) Специфические полосы, соответствующие исследуемым белкам, измерены с помощью программного обеспечения (Image J software). (B) Денситометрия представлена как среднее значение двух различных экспериментов, выполненных в двух сериях*

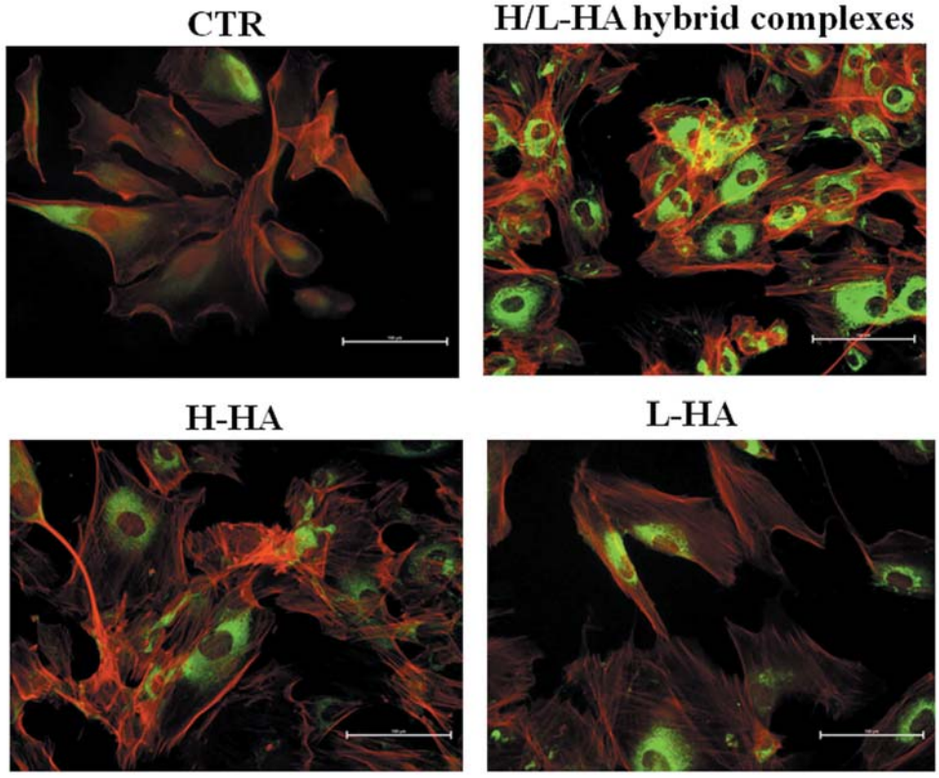

РИС. 6. *Картины иммунофлюоресценции кератиноцитов-фибробластов в отношении экспрессии COLIA1 в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) в течение 24 часов. Зеленый цвет – коллаген I типа; красный – цитоскелет (фаллоидин)*

Анализ коллагена с помощью qRT-PCR на модели FT-кожи

Через 24 часа и 7 дней культивирования все биомаркеры, уже измеренные на 2D-модели in vitro в экспериментах на HaCat и фибробластах, оценивали на 3D-модели кожи. Как видно из рисунков 10a и 10b, qRT-PCR показала значительно более высокую экспрессию COLI, COLVII и эластина в образцах полнослойной модели кожи, обработанных гибридными комплексами. Более высокий уровень экспрессии был отмечен не только по отношению к контролю (обработка фосфатным буфером), но и по сравнению с образцами, обработанными L-HA и H-HA. Однако экспрессия COLIII и COLIV была лишь немного выше, оставаясь значимой. В целом полученные данные согласуются с результатами исследования однослойной модели дермальных клеток человека. На 3D-модели кожи FT при более длительной инкубации (7 дней) экспрессия COLI, COLIII и COLVII была все еще невысокой, но для гибридных комплексов значительно выше по сравнению с H-HA и L-HA.

Иммунофлюоресценое окрашивание эластина на модели FT-кожи

Результаты иммунофлюоресцентного окрашивания эластина на 3D-модели кожи FT при всех видах обработок и для контроля представлены на рис. 11. Как и ожидалось, экспрессия эластина присутствовала во всех образцах FT-кожи (ткань, обработанная фосфатным буфером, H-HA, L-HA и гибридными комплексами). Однако в образцах, обработанных гибридными комплексами, отмечалась более высокая экспрессия белка, о чем свидетельствует более интенсивный сигнал по сравнению с образцами, обработанными L-HA и H-HA, соответственно. Кроме того, через 7 дней в 3D-образцах, обработанных гибридными комплексами, толщина эпидермиса была заметно больше по сравнению с другими образцами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Благодаря гидрофильности и вязкоупругим свойствам ГК используется в кос- ▷

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

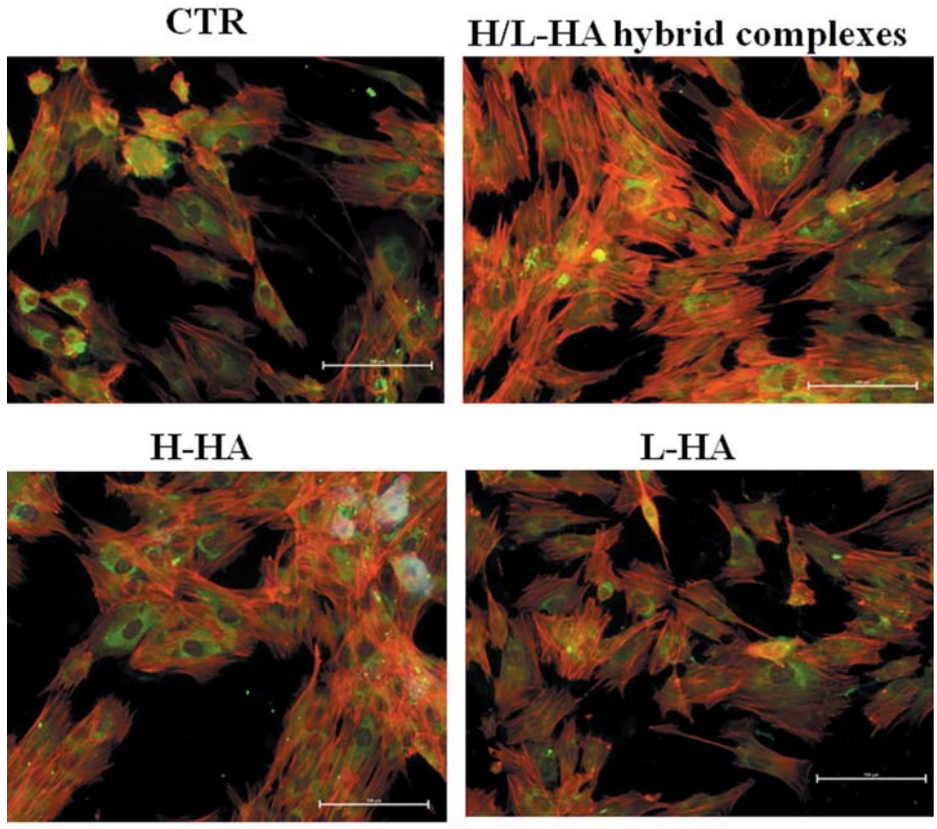

РИС. 7. *Картины иммунофлюоресценции кератиноцитов-фибробластов в отношении экспрессии COLIIIA1 в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) в течение 24 часов. Зеленый цвет – коллаген III типа; красный – цитоскелет (фаллоидин)*

метологии в качестве средства для ухода за кожей, а в эстетической медицине – дермальных филлеров и препаратов для биоревитализации (интра-/субдермальные инъекции). В настоящее время разработано и выведено на рынок несколько лекарственных препаратов на основе ГК. Для проведения малоинвазивных эстетических процедур производится широкий спектр гидрогелей на основе ГК [26].

Препараты для интрадермального введения, содержащие ГК, делятся на препараты животного происхождения; препараты, полученные в результате процессов биоферментации; содержащие стабилизированную или нестабилизированную ГК; содержащие дополнительные компоненты (аминокислоты, витамины, антиоксиданты).

С 2006 года инъекции ГК стали наиболее востребованными неинвазивными процедурами для омоложения кожи. ГК применяется для заполнения морщин и складок, восстановления объема, коррекции различных дефектов и повышения увлажненности кожи. Главный недостаток линейных ГК – малый период существования *in vivo* из-за быстрого разрушения гиалуронидазами, свободными радикалами и другими факторами (растворение, механическое сжатие и т.д.). Поэтому, несмотря на развитие и широкое применение препаратов на основе ГК, их эффективность зависит от многих характеристик – концентрации, размера молекулы, типа, степени стабилизации, химической и физической стабильности конечного продукта [27, 28, 29, 30]. Имеются сообщения о появлении нежелательных эффектов, связанных с препаратами с высокой степенью перекрестных связей и/или присутствием остатков других химических веществ [9, 31]. Были разработаны новые препараты, содержащие ГК. Для улучшения переносимости, повы-

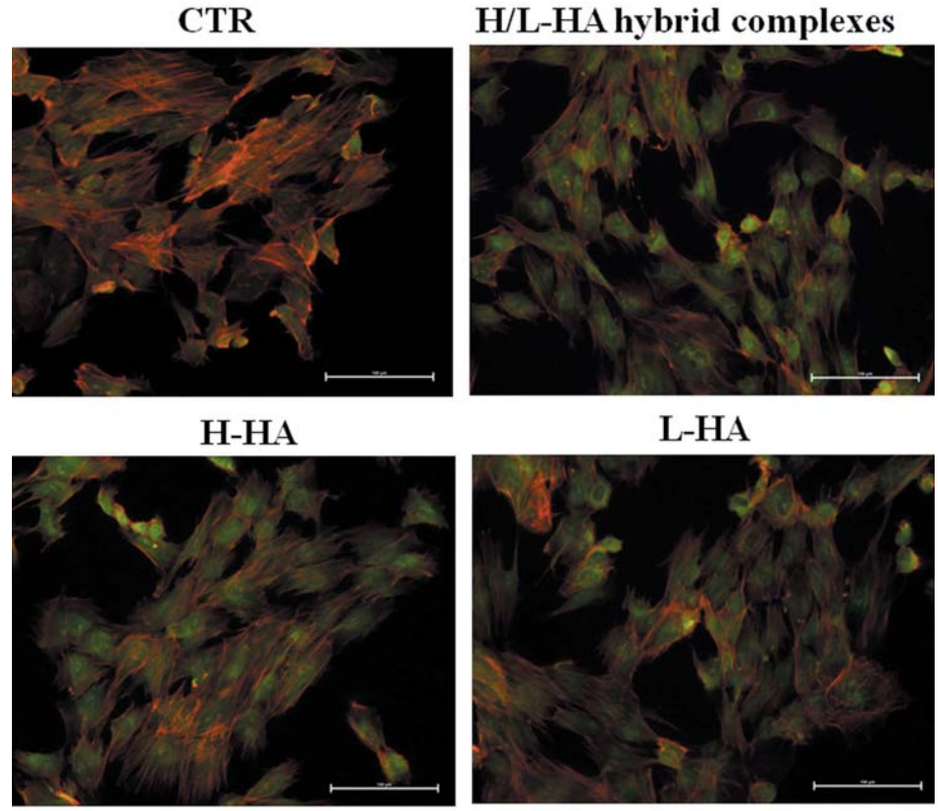

РИС. 8. *Картины иммунофлюоресценции кератиноцитов-фибробластов в отношении экспрессии эластина в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) в течение 24 часов. Зеленый цвет – эластин; красный – цитоскелет (фаллоидин)*

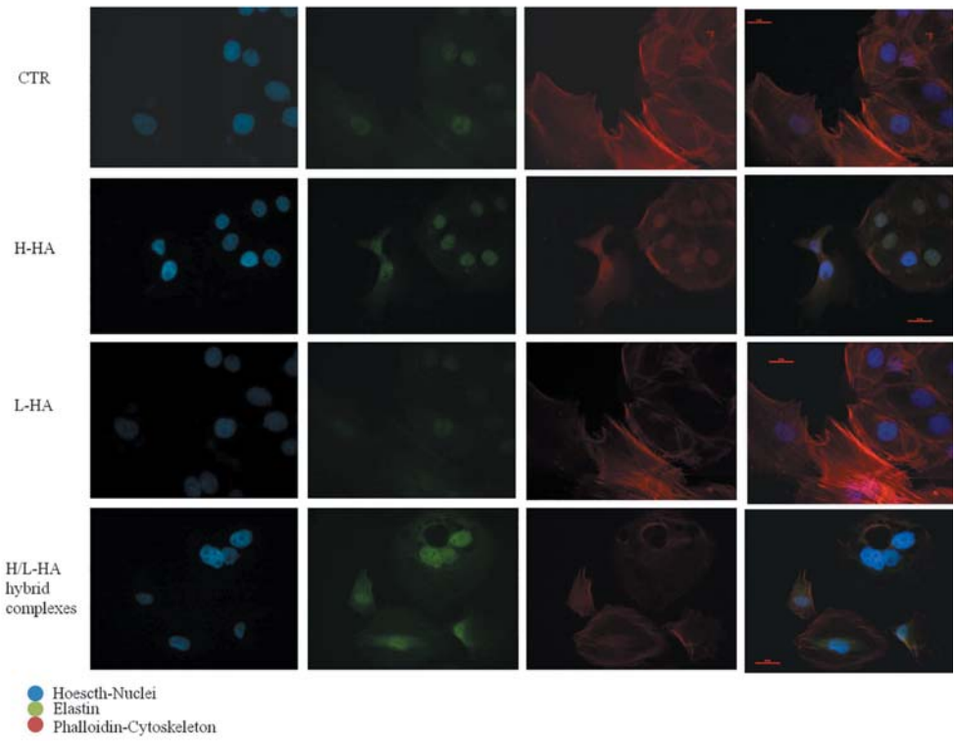

РИС. 9. *Картины иммунофлюоресценции кератиноцитов-фибробластов в отношении экспрессии эластина в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) в течение 7 дней. Голубой цвет – ядро (краситель Hoescth; зеленый цвет – эластин; красный – цитоскелет (фаллоидин)*

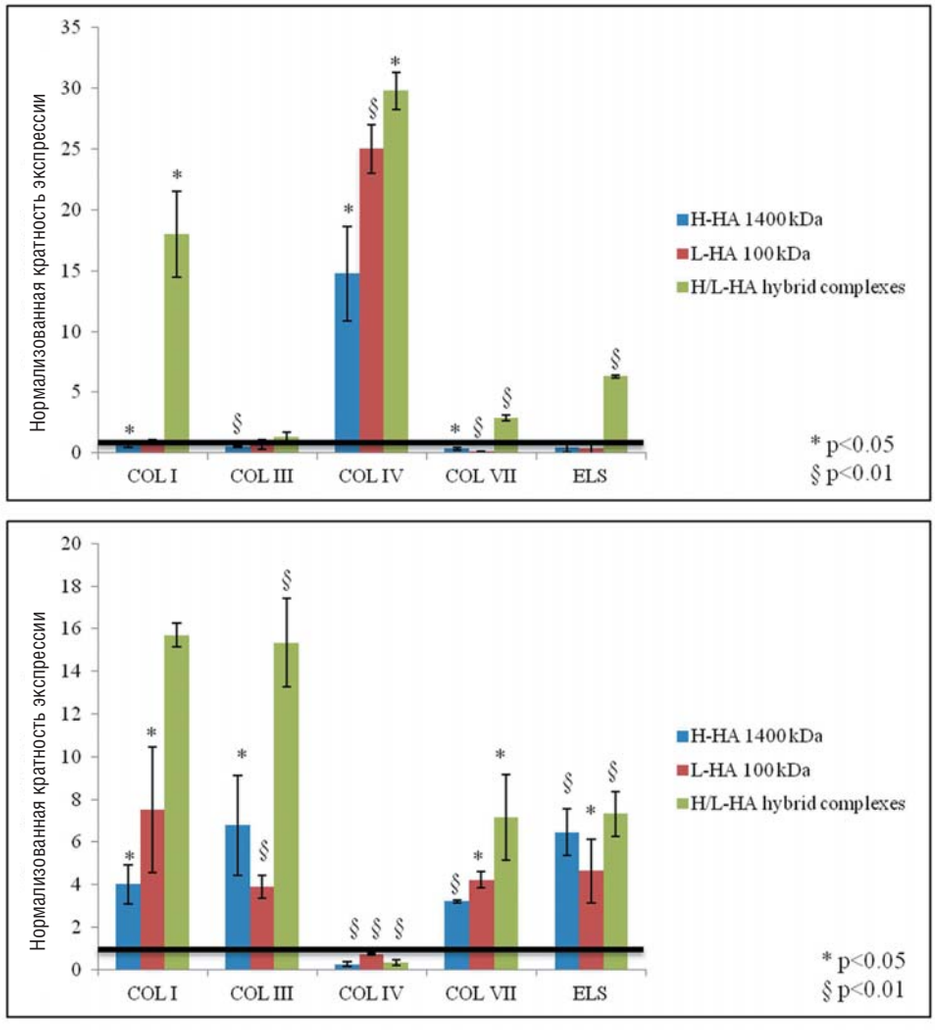

РИС. 10. *Анализ qRT-PCR экспрессии мРНК коллагена I, III, IV, VII типа и эластина на модели FT-кожи. Анализ экспрессии гена на модели FT-кожи выражали как нормализованную кратность экспрессии по сравнению с конститутивным геном и моделью FT-кожи, обработанной фосфатным буфером (используемой в качестве отрицательного контроля) через 24 часа (a) и 7 дней (b)*

шения стабильности и удлинения срока действия in situ при производстве некоторых из них не использовалась химическая модификация.

Благодаря запатентованной технологии NAHYCO™ (WO/2012/032151) получен новый препарат для внутрикожного введения, более стабильный, без химической модификации, медленно разрушающийся, с более длительным сроком действия и высокой биологической совместимостью [20]. Этот «более натуральный» препарат с коммерческим названием Profhilo® использовался в данной работе и описан в общедоступной и патентной литературе. В гибридных комплексах содержится большее количество ГК, чем в препаратах на основе немодифицированной ГК. Действительно, формирование гибридных комплексов характеризуется снижением динамической вязкости, благодаря чему при клиническом применении можно вводить очень высокие концентрации ГК. Что касается технологии получения нового препарата, то предполагается, что энергия теплового воздействия разрывает внутренние водородные связи цепей H-HA и приводит сначала к переплетению цепей H-HA и L-HA, а затем их соединению друг с другом во время охлаждения. При тепловом воздействии на фракции H-HA и L-HA по отдельности и их дальнейшем смешивании после охлаждения такие специфические связи не образуются. Кроме того, тепловой цикл может привести к образованию гибридных комплексов только при использовании типов ГК с молекулярными массами определенного диапазона, взятых при определенном соотношении, которые, как описано в патенте, перед ▷

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ РУБЕЖИ КЛЕТОЧНОЙ РЕАКТИВАЦИИ

тепловой обработкой необходимо вместе растворить.

Новые препараты на основе гибридных комплексов можно определить как «физические гели», в которых образованы связи между длинными и короткими цепями ГК без изменения структуры дисахаридных единиц и без введения других химических соединений.

Гибридные комплексы обладают большей стабильностью, чем линейная H-HA, даже без химической модификации или перекрестных связей. Действительно, гидролиз ВТН происходит медленнее: через 10 дней инкубации *in vitro* в образцах еще присутствовало 35% начальной фракции с высокой молекулярной массой, тогда как уже через день инкубации остаток H-HA был ниже 10% (рис. 2b). По-видимому, гибридные комплексы защищают гиалуронан с высокой молекулярной массой от ферментативного разрушения и, как ожидается, именно это обеспечивает длительную устойчивость препарата *in vivo*. Предполагается, что типичные реологические свойства и биологическое действие (например, взаимодействие с рецепторами/каскад биохимических реакций) H-HA в новом препарате будут более устойчивыми по сравнению с препаратами, содержащими линейную ГК. Поэтому гибридные комплексы ГК могут стать новой и потенциально ценной альтернативой дермальным филлерам, обычно используемым в эстетической медицине.

Возможной альтернативой гибридным комплексам в смысле пролонгированного действия и отсутствия химических модификаций могло бы быть введение большого количества H-HA (> 16–20 мг/мл), но недостатком этого выбора является очень высокая вязкость и необходимость большого усилия при инъекции. Одно же из преимуществ технологии NAHYCO™ – снижение

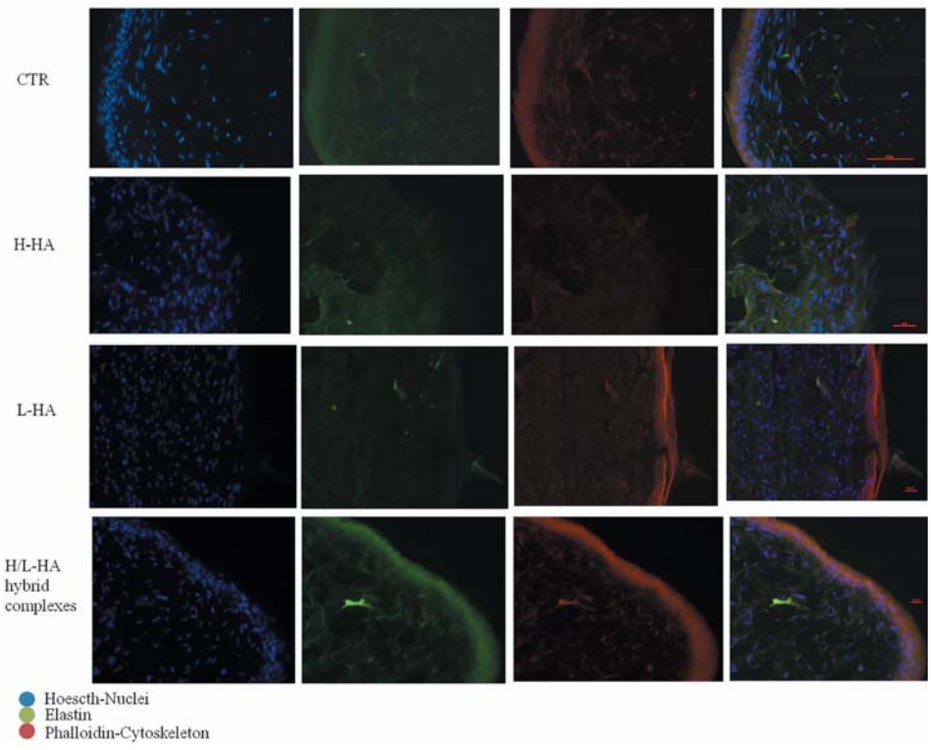

РИС. 11. *Картины иммунофлюоресценции экспрессии эластина на модели FT-кожи в присутствии H-HA, L-HA и комплексов H-HA/L-HA 0,16% (w/w) в течение 7 дней. Голубой цвет – ядро (краситель Hoescth); зеленый цвет – эластин; красный – цитоскелет (фаллоидин)*

вязкости примерно в 7 раз по сравнению с H-HA (рис. 1). Благодаря этому можно увеличить концентрацию вводимой ГК до 64 мг/2 мл (игла 29G). Как известно, вязкость инъекционных препаратов – очень важный параметр, влияющий на их биологические и механические свойства. Однако кроме механических эффектов новых препаратов (например, создание поддерживающего каркаса, восстановление объемов, увлажнение), ключевой момент исследований – их биологическое действие. Для лучшей имитации естественных условий и выяснения биохимического/биологического действия в данной работе в качестве модели использовали совместно культивируемые кератиноциты-фибробласты человека [32]. Возможность сравнения гиалуронанов in vitro в стандартных условиях, которые нелегко воспроизвести *in vivo*, может помочь объяснить механизмы действия и предложить основу для клинического применения. Биохимические реакции, участвующие в механизме действия ГК, очень сложные и включают взаимодействие различных веществ. Поэтому

в этом исследовании в качестве биомаркеров были выбраны коллаген и эластин из-за их основной роли в ремоделировании кожи [33, 34].

Известно, что один из факторов, способствующих старению кожи, – истощение запасов эндогенной ГК в межклеточном матриксе [35]. В экспериментах с монокультурами, выполненными в ходе данного исследования, после инкубации в присутствии гибридных комплексов были показаны различные изменения экспрессии гена мРНК коллагена и эластина в зависимости от типа клетки. Например, экспрессия коллагена I и III типов наблюдалась в культурах кератиноцитов через 4 часа по сравнению с фибробластами, где уровни экспрессии коллагена значительно увеличивались через 24 часа инкубации. Кроме того, анализ типов коллагена показал выраженную экспрессию коллагена IV и VII типов в кератиноцитах. Эти данные позволили предположить, что в разные временные интервалы в фибробластах и кератиноцитах активизируется синтез различных белков межклеточного матрикса (например, коллаген I и III типов vs коллаген IV и VII типов). Также взаимодействие между кератиноцитами и фибробластами, различным образом распределенными в слоях кожи, могло стимулировать синтез и перестройку межклеточного матрикса [36]. Чтобы лучше оценить и предсказать эффективность гибридных комплексов H-HA/L-HA использовали полнослойную модель кожи. Обработка образцов 3D-модели кожи гибридными комплексами H-HA/L-HA вызывала раннюю активизацию COLI и COLIV, что указывает на ремоделирование матрикса и регенерацию кожи [37]; в то время как повышение экспрессии COLI, COLIII, COLVII и ELS, отмеченное через 7 дней после инъекции (рис. 10b), свидетельствует об активизации ремоделирования матрикса в сторону оптимальной структуры ткани и гомеостаза. Кроме того, при иммунофлюоресцентном анализе эластина интенсивность зеленого сигнала усиливалась под действием введения гибридного комплекса через 7 дней инкубации, а также отмечалось улучшение структуры и увеличение толщины эпидермиса.

Представленные данные свидетельствуют, что новый препарат на основе гибридного комплекса ГК повышает экспрессию коллагена и эластина больше, чем линейная ГК, способствуя улучшению морфологических характеристик клеток, потенциально улучшая функции кожи, эластичность и общий гомеостаз ткани. Причем данные об экспрессии коллагена и эластина подтверждаются данными о синтезе белка: при иммунофлюоресценции (на монослоях) в присутствии гибридных комплексов показано большее увеличение коллагена I и III типов и эластина по сравнению с другими препаратами ГК.

Эти данные подтверждают, что введение препарата на основе ГК в дерму препятствует физиологическим признакам старения и приводит к эффекту биоревитализации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании оценивали взаимодействия между кератиноцитами и дермальными фибробластами в присутствии нового препарата на основе гибридного комплекса ГК. На модели *in vitro* оценивали функциональные взаимодействия между двумя типами клеток, включая синтез и формирование белков межклеточного матрикса. Для лучшей имитации условий in vivo использовали полнослойную модель кожи. Результаты показали заметную разницу биологических реакций в отношении экспрессии и синтеза коллагена и эластина гибридных комплексов ГК по сравнению с нативной ГК и потенциально лучший эффект биоревитализации. Главной особенностью гибридных комплексов является длительная стабильность к действиям ферментов, несмотря на отсутствие химических перекрестных связей. В целом результаты данного исследования подтверждают клинические данные *in vivo*, полученные при применении гибридного комплекса ГК [38].

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. D'Agostino A., Stellavato A., Busico T., Papa A., Tirino V., Papaccio G. et al. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. BMC Cell Biol. 2015, 11, 16:19. doi: 10.1186/s12860-015–0064-6 PMID: 26163378.

2. Dicker KT., Gurski LA., Pradhan-Bhatt S., Witt RL., Farach-Carson MC., Jia X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. Acta Biomater. 2014, 10(4):1558±70. doi: 10.1016/j. actbio.2013.12.019 PMID: 24361428.

3. Vigetti D., Karousou E., Viola M., Deleonibus S., De Luca G., Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. Biochim Biophys Acta. 2014, 1840(8):2452±9. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.001 PMID: 24513306.

4. Hiramoto K., Kobayashi H., Yamate Y., Ishii M., Sato EF. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. Exp Dermatol. 2012, 21(12):911±4. doi: 10.1111/exd.12032 PMID:23171450.

5. Stern R., Maibach HI. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. Clin Dermatol. 2008, 26(2):106±22. doi: 10.1016/j. clindermatol.2007.09.013 PMID: 18472055.

6. Donejko M., Przylipiak A., Rysiak E., Miltyk W., Galicka E., Przylipiak J. et al. Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts. Drug Des Devel Ther. 2015, 24;9:6225±33. doi: 10.2147/ DDDT.S91968 PMID: 26648698.

7. Papakonstantinou E., Roth M., Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. Dermatoendocrinol. 2012, 1, 4(3):253±8. doi: 10.4161/derm.21923 PMID: 23467280.

8. Croce MA., Dyne K., Boraldi F., Quaglino D Jr., Cetta G., Tiozzo R. et al. Hyaluronan affects protein and collagen synthesis by in vitro human skin fibroblasts. Tissue Cell. 2001, 33(4):326±31. doi: 10.1054/tice.2001.0180 PMID: 11521947.

9. Fakhari A., Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. Acta Biomater. 2013, 9(7):7081±92 doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.005 PMID: 23507088.

10. Farwick M., Gauglitz G., Pavicic T., Köhler T., Wegmann M., Schwach-Abdellaoui K. et al. Fifty-kDa hyaluronic acid upregulates some epidermal genes without changing TNF-α expression in reconstituted epidermis. Skin Pharmacol Physiol. 2011, 24(4):210±7. doi: 10.1159/000324296 PMID: 21412035.

11. Varani J., Dame MK., Rittie L., Fligiel SE., Kang S., Fisher GJ : et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. Am J Pathol. 2006, 168(6):1861±8. doi: 10.2353/ ajpath.2006.051302 PMID:16723701.

12. Baumann L. Skin ageing and its treatment. J Pathol. 2007, 211(2):241±51. doi: 10.1002/ path.2098 PMID: 17200942.

13. Wang TW., Sun JS., Huang YC., Wu HC., Chen LT., Lin FH. Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. Biomaterials. 2006, 27 (29):5059±68. doi: 10.1016/j. biomaterials.2006.05.004 PMID: 16781770.

ДОКАЗАТЕЛЬНАЯ КОСМЕТОЛОГИЯ

ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ РУБЕЖИ КЛЕТОЧНОЙ РЕАКТИВАЦИИ

14. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003, Nov 28, 55(12):1531±46. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002 PMID: 14623400.

15. Oh JH., Kim YK., Jung JY., Shin JE., Kim KH., Cho KH. et al. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. J Dermatol Sci. 2011, 62(3):192±201. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.02.007 PMID: 21477996.

16. Kage M., Tokudome Y., Matsunaga Y., Hariya T., Hashimoto F. Effect of hyaluronan tetrasaccharides on epidermal differentiation in normal human epidermal keratinocytes. Int J Cosmet Sci. 2014, 36(1):109±15. doi: 10.1111/ics.12105 PMID: 24219060.

17. Symonette CJ., Kaur Mann A., Tan XC., Tolg C., Ma J., Perera F. et al. Hyaluronan-phosphatidylethanolamine polymers form pericellular coats on keratinocytes and promote basal keratinocyte proliferation. Biomed Res Int. 2014, 2014:727459. doi: 10.1155/2014/727459 PMID: 25276814.

18. Williams S., Tamburic S., Stensvik H., Weber M. Changes in skin physiology and clinical appearance after microdroplet placement of hyaluronic acid in aging hands. J Cosmet Dermatol. 2009, 8(3):216±25. doi: 10.1111/j.1473–2165.2009.00447.x PMID: 19735521.

19. Andre P. New trends in face rejuvenation by hyaluronic acid injections. J Cosmet Dermatol. 2008, 7:251±8. doi: 10.1111/j.1473–2165.2008.00402.x PMID: 19146600.

20. De Rosa M., D'Agostino A., La Gatta A., Schiraldi C. Hybrid cooperative complexes of hyaluronic acid. WOPatent WO/2012/032,151.

21. La Gatta A., De Rosa M., Marzaioli I., Busico T., Schiraldi C. A complete hyaluronan hydrodynamic characterization using a triple detector-SEC system during in vitro enzymatic degradation. Analytical Biochemistry, 2010, 404, 21±29. doi: 10.1016/j.ab.2010.04.014 PMID: 20399193.

22. La Gatta A., Schiraldi C., Papa A., De Rosa M. Comparative analysis of commercial dermal fillers based on crosslinked hyaluronan: Physical characterization and in vitro enzymatic degradation. Polym Degrad Stab. 2011, 96(4):630±6. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.025.

23. Bellas E., Seiberg M., Garlick J., Kaplan DL. In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. Macromol Biosci. 2012, 12(12):1627±36. doi: 10.1002/mabi.201200262 PMID: 23161763.

24. Stellavato A., Tirino V., de Novellis F., Vecchia AD., Cinquegrani F., De Rosa M. et.al. Biotechnological Chondroitin a Novel Glycosamminoglycan with Remarkable Biological Function on Human Primary Chondrocytes. J Cell Biochem. 2016, Mar 28, doi: 10.1002/jcb.25556. Epub 2016 May 11.

25. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 7(72):248±254. doi: 10.1016/0003–2697(76)90527–3 PMID: 942051.

26. Girardeau-Hubert S., Teluob S., Pageon H., Asselineau D. The reconstructed skin model as a new tool for investigating in vitro dermal fillers: increased fibroblast activity by hyaluronic acid. Eur J Dermatol. 2015, 25(4):312±22. doi: 10.1684/ejd.2015.2563 PMID: 26065380.

27. La Gatta A., Schiraldi C., Papa A., D'Agostino A., Cammarota M., De Rosa A. et al. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: toward improvements in composition and performance. Carbohydrate Polymers. 2013, 96, 536±544 doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.022 PMID: 23768598.

28. La Gatta A., Papa A., Schiraldi C., De Rosa M. Hyaluronan dermal fillers via crosslinking with 1,4-butandiol diglycidyl ether: Exploitation of heterogeneous reaction conditions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016, 104(1):9±18. doi: 10.1002/jbm.b.33329 PMID: 25611588.

29. Paliwal S., Fagien S., Sun X., Holt T., Kim T., Hee CK. et al. Skin extracellular matrix stimulation following injection of a hyaluronic acid-based dermal filler in a rat model. Plast Reconstr Surg. 2014, 134 (6):1224±33. doi: 10.1097/PRS.0000000000000753 PMID: 25415091.

30. Kim ZH., Lee Y., Kim SM., Kim H., Yun CK., Choi YS. A composite dermal filler comprising cross-linked hyaluronic acid and human collagen for tissue reconstruction. J Microbiol Biotechnol. 2015, 25(3):399±406. doi: 10.4014/jmb.1411.11029 PMID: 25502824.

31. Schantè CE, Zuber G., Herlin C., Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. Carbohydrate Polymers. 2011, 85 3 (1):469±489 doi: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019.

32. Espada J., Matabuena M., Salazar N., Lucena S., Kourani O., Carrasco E. et al. Cryptomphalus aspersa mollusc eggs extract promotes migration and prevents cutaneous ageing in keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. Int J Cosmet Sci. 2015, 37(1):41±55. doi: 10.1111/ics.12167 PMID: 25256953.

33. Damodarasamy M., Johnson RS., Bentov I., MacCoss MJ., Vernon RB., Reed MJ. Hyaluronan enhances wound repair and increases collagen III in aged dermal wounds. Wound Repair Regen. 2014, 22 (4):521±6. doi: 10.1111/wrr.12192 PMID: 25041621.

34. Bentov I., Damodarasamy M., Plymate S., Reed MJ. Decreased proliferative capacity of aged dermal fibroblasts in a three dimensional matrix is associated with reduced IGF1R expression and activation. Biogerontology. 2014; 15(4):329±37. doi: 10.1007/s10522-014–9501-8 PMID: 24770843.

35. Funt D., Pavicic T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2013, 12;6:295±316. Review. doi: 10.2147/CCID.S50546 PMID: 24363560.

36. Varma SR., Sivaprakasam TO., Mishra A., Kumar LM1, Prakash NS., Prabhu S. et al. Protective Effects of Triphala on Dermal Fibroblasts and Human Keratinocytes. PLoS One. 2016, 5, 11(1):e0145921. doi: 10.1371/journal.pone.0145921 PMID: 26731545.

37. La Gatta A., De Rosa M., Frezza MA., Catalano C., Meloni M., Schiraldi C. Biophysical and biological characterization of a new line of hyaluronan-based dermal fillers: a scientific rationale to specific clinical indications. Materials Science and Engineering C 2016, 68:565±572. doi: 10.1016/j.msec.2016.06. 008 PMID: 27524055.

38. Laurino C., Palmieri B., Coacci A. Efficacy, Safety, and Tolerance of a New Injection Technique for High- and Low-Molecular-Weight Hyaluronic Acid Hybrid Complexes. Eplasty. 2015, 8;15:e46. eCollection 2015. PMID: 26491508.