

Ocena *In Vitro* bezpieczeństwa biologicznego kwasu hialuronowego PEG krzyżowo połączonego z mikrocząsteczkami hydroksyapatytu wapnia w niskim stężeniu

Nicola Zerbinati¹, Torello Lotti², Damiano Monticelli³, Raffaele Rauso⁴, Pablo González-Isaza⁵, Edoardo D'Este⁶, Alberto Calligaro⁷, Sabrina Sommatì⁸, Cristina Maccario⁸, Roberto Mocchi⁸, Jacopo Lotti^{9*}, Uwe Wollina¹⁰, Georgi Tchernev^{11,12}, Katlein França¹³

¹Università degli Studi dell'Insubria Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, Varese, Italy; ²University of Rome "G. Marconi" - Centro Studi per la Ricerca Multidisciplinare e Rigenerativa (CSRMR), Rome, Italy; ³Università degli Studi dell'Insubria Dipartimento di Scienza e Alta Tecnologia, Como, Italy; ⁴University of Foggia - Department of Plastic Reconstructive Surgery, Foggia, Italy; ⁵Hospital Universitario San Jorge - Head Chief of Urogynecology, Carrera 32410, Pereira, Risaralda 660002, Colombia; ⁶Centro Medico Polispecialistico, Pavia, Italy; ⁷University of Pavia - Department of Public Health, Experimental and Forensic Medicine, Pavia, Italy; ⁸UB-CARE S.r.l. - Spin-off University of Pavia, Pavia, Italy; ⁹University of Rome "G. Marconi" - Department of Nuclear, Subnuclear and Radiation Physics, Rome, Italy; ¹⁰Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt - Department of Dermatology and Venereology, Friedrichstrasse 41, Dresden, Sachsen 01067, Germany; ¹¹Department of Dermatology, Venereology and Dermatologic Surgery, Medical Institute of Ministry of Interior (MVR-Sofia), General Skobelev 79, 1606 Sofia, Bulgaria; ¹²Onkoderma - Policlinic for Dermatology, Venereology and Dermatologic Surgery, General Skobelev 26, 1606, Sofia, Bulgaria; ¹³University of Miami School of Medicine, 1400 NW 10th Avenue, Miami, Florida 33136-1015, United States

Abstrakt

Cytat: Zerbinati N, Lotti T, Monticelli D, Rauso R, González-Isaza P, D'Este E, Calligaro A, Sommatì S, Maccario C, Mocchi R, Lotti J, Wollina U, Tchernev G, França K. Ocena *In Vitro* bezpieczeństwa biologicznego kwasu hialuronowego PEG krzyżowo połączonego z mikrocząsteczkami hydroksyapatytu wapnia w niskim stężeniu.

Open Access Maced J Med Sci. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.044>

Słowa kluczowe: kwas hialuronowy; bezpieczeństwo biologiczne; hydroksyapatyt wapnia; ludzkie keratynocyty; Neauvia Stimulate

* **Korespondencja:** Jacopo Lotti. Uniwersytet Rzymski "G. Marconi" - Departament Fizyki Jądrowej, Subatomowej i Radiacyjnej, Rzym, Włochy. E-mail: adsidera.editor@gmail.com

Otrzymano: 19-paź-2017; **Poprawiono:** 27 października 2017 r.

Zaakceptowano: 29-paź-2017; Pierwszy dostęp online: 07-sty-2018

Copyright: © 2018 Nicola Zerbinati, Torello Lotti, Damiano Monticelli, Raffaele Rauso, Pablo González-Isaza, Edoardo D'Este, Alberto Calligaro, Sabrina Sommatì, Cristina Maccario, Roberto Mocchi, Jacopo Lotti, Uwe Wollina, Georgi Tchernev, Katlein França. Jest to artykuł o otwartym dostępie rozpowszechniany na warunkach licencji Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne 4.0 (CC BY-NC 4.0)

Finansowanie: Te badania nie uzyskały żadnego wsparcia finansowego.

Konflikt interesów: Autorzy zadeklarowali, że nie istnieje konflikt interesów.

PRZEDMIOT: Neauvia Stimulate to biokompatybilny, wstrzykiwalny wypełniacz z kwasem hialuronowym (HA) (26 mg / ml) PEG połączony krzyżowo z 1% hydroksyapatytu wapnia (CaHA), służący do augmentacji tkanek miękkich twarzy, zapewniający wypełnienie tkanek, a następnie proces neokolagenyzy w celu poprawy jakości skóry.

CEL: Celem niniejszego badania jest ocena bezpieczeństwa biologicznego produktu (nr. 160517-26-1 / 2 PEG) z użyciem ludzkich keratynocytów hodowanych *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY: Zaproponowany model eksperymentalny, mimo że jest systemem *in vitro*, pozwala na wyprowadzenie użytecznych informacji w celu przewidywania możliwej aktywności produktu w dalszym stosowaniu *in vivo*. Ludzkie keratynocyty (komórki HaCaT) potraktowano produktem przez 24 h przy wzrastających stężeniach produktu, względem próbek kontrolnych (komórki niepotraktowane).

WYNIKI: Oceniono bezpieczeństwo biologiczne testowanego produktu, stosując różne metody: test MTT, test NRU, test Kenacid Blue. Ponadto oceniono jakikolwiek możliwy wpływ na strukturę, morfologię i żywotność komórek.

WNIOSEK: Podsumowując, wyniki uzyskane różnymi metodami pokazują, że produkt Neauvia Stimulate® nie powoduje żadnego efektu cytotoksycznego i nie wpływa na prawidłową strukturę i morfologię kultur komórkowych.

Wprowadzenie

Neauvia Stimulate (MatexLab SA, Lugano, CH) to produkt łączący czysty kwas hialuronowy pochodzenia probiotycznego (*Bacillus Subtilis*) połączony krzyżowo z PEG (glikol polietylenowy) i mikrocząsteczki (o rozmiarach 10-12 μm) hydroksyapatytu wapnia w niskim stężeniu (1%). Produkt można uznać za „kompozytowy” wypełniacz (całkowicie biokompatybilny i degradowalny), z efektami objętościowymi, typowymi dla skrzyżowanego wypełniacza polimeru HA [1] [2] [3] i aktywnością kolagenezy. To ostatnie jest wynikiem działania hydroksyapatytu wapnia, który stymuluje autoprodukcję kolagenu przez skórę [4] [5] [6].

Celem niniejszej pracy jest ocena bezpieczeństwa biologicznego *in vitro*, pod względem cytotoksyczności oraz modyfikacji struktury komórkowej i morfologii, po potraktowaniu ludzkich keratynocytów hodowanych *in vitro* za pomocą produktu Kwas Hialuronowy Hydrożel 26 mg / ml PEG skrzyżowany z Hydroksyapatytem Wapnia 1% (Partia 160517-26-1 / 2 PEG), o nazwie Neauvia Stimulate. Zaproponowany model eksperymentalny, mimo że jest systemem *in vitro*, umożliwia wyprowadzenie użytecznych informacji w celu przewidywania możliwej aktywności produktu w dalszych zastosowaniach *in vivo*.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek

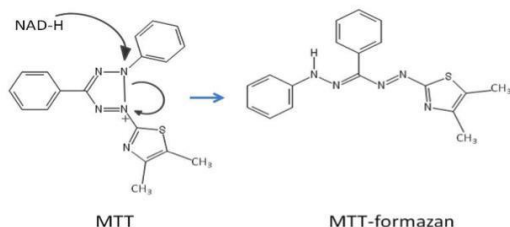
Produkt Neauvia Stimulate został zważony i rozpuszczony w stężeniu 5 mg / ml w kompletnym podłożu utworzonym przez DMEM z 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), jednym mM L-glutaminy i antybiotykami (100 UI / ml penicyliny i 100 μg / ml streptomycyny). SLS (Laurylosiarczan Sodowy), dobrze znana substancja cytotoksyczna, została użyta jako pozytywna substancja kontrolna i została przygotowana w sposób opisany dla produktu.

Hodowle komórkowe

Keratynocyty są najbardziej reprezentowanym typem komórek w komórkach epidermy. Wyrastają one z podstawy naskórka, gdzie komórki rozmnażają się, a następnie migrują na powierzchnię skóry, tworząc lipidy, naturalne czynniki hydratacji i keratynę. Ludzkie unieśmiertelnione keratynocyty stosowane w teście były ludzką linią komórkową (HaCaT, kod BS CL 168). Linię komórkową hodowano w warunkach całkowitej sterylności i utrzymywano w inkubacji w 37 ° C z 5% atmosferą dwutlenku węgla (CO_2).

Test cytotoksyczności (test MTT)

Test MTT jest kolorymetrycznym testem cytotoksyczności stosowanym do testowania proliferacji i żywotności komórek w oparciu o wydajność mitochondrium. MTT, sól tetrazolowa, która w przypadku aktywności metabolicznej komórek jest redukowana z wysoce redukującego środowiska mitochondrialnego żywych komórek poprzez działanie dehydrogenazy mitochondrialnej. Redukcja MTT prowadzi do tworzenia się kryształów formazanu (ryc. 1) - nierozpuszczalnych w pożywce hodowlanej, ale rozpuszczalnych w DMSO - które nadają typowo purpurowy kolor mitochondriom żywych komórek. Natomiast w uszkodzonych lub martwych komórkach, ponieważ brakuje aktywnych mitochondriów, MTT nie ulegnie redukcji, dając mniej intensywny fioletowy kolor [7]. Dla celów weryfikacji bezpośredniego związku między oddychaniem komórkowym a żywotnością, MTT jest uważany za dobry test identyfikacji niecytotoksycznych stężeń produktu Neauvia Stimulate.



Rysunek 1: Redukcja MTT w formazanie. Reakcja jest katalizowana przez dehydrogenazę bursztynianową.

W celu przygotowania testu, komórki HaCaT homogenicznie wysiewano na 96-zbiorniczkowych płytkach przy gęstości $1,5 \times 10^4$ komórek na zbiorniczek i inkubowano w 37 ° C z atmosferą nawilżoną 5% CO_2 . Po 24 godzinach komórki potraktowano (sześć powtórzeń dla każdego z ośmiu różnych stężeń), zaczynając od stężenia 5 mg / ml aż do końcowego 0,039 mg / ml przez seryjne rozcieńczenie 1: 2. Komórki traktowane SLS zastosowano jako pozytywną substancję kontrolną (Ctrl +, stężenie początkowe 5 mg / ml w pożywce pełnej).

Inkubację prowadzono przez 24 godziny. Następnie, dziesięć μl roztworu MTT (5 mg / ml w PBS)

dodano do komórek HaCaT w 37 ° C na dwie godziny. Pożywkę następnie usunięto i do komórek dodano 100 µl DMSO. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Żywotność komórek obliczono, mierząc różnicę gęstości optycznej każdego z ośmiu stężeń badanego produktu, dotyczących substancji kontrolnej (komórki niepotraktowane) (8). Dane przetworzono przy użyciu Photox v. 2.0 dla obliczenia IC₅₀, które jest stężeniem produktu, określającym 50% żywotności komórek.

Test cytotoksyczności (test NRU)

Test cytotoksyczności NRU jest testem kolorymetrycznym opartym na zdolności żywych komórek do włączenia barwnika do lizosomów [9]. Neutralna czerwień (NR, Sigma) jest słabym kationowym barwnikiem, który łatwo przenika przez błony komórkowe i akumuluje się wewnątrzkomórkowo w lizosomach, zapewniając w ten sposób bezpośrednią informację o integralności błony komórkowej i pośrednio o żywotności komórek. W celu przygotowania testu komórki wysiano i potraktowano jak opisano wcześniej. Następnie komórki badano pod mikroskopem z kontrastem fazowym i płukano w PBS. Następnie dodano sto µl pożywki NR i komórki inkubowano przez trzy godziny w 37 ° C, 5% CO₂. Po usunięciu pożywki dodano roztwór kwasu octowego w celu wyodrębnienia NR z komórek, a odczyt absorbancji przeprowadzono przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikroplitek (Tecan Sunrise). Żywotność komórek obliczono jak opisano wcześniej.

Test cytotoksyczności (test Kenacid Blue)

Test Kenacid Blue jest kolorymetrycznym testem cytotoksyczności stosowanym do testowania żywotności komórek w oparciu o zdolność barwnika do wiązania białek komórkowych [10]. System testowy Kenacid Blue mierzy całkowitą biomasę poprzez barwienie białek (całkowita biomasa) za pomocą specjalnie opracowanego barwnika, tworząc prosty, dokładny i wysoce powtarzalny test. W celu przygotowania testu komórki wysiano i potraktowano jak opisano wcześniej. Komórki następnie przepłukano PBS i utrwalono 3% roztworem glutaraldehydu przez 20 minut w temperaturze pokojowej. 50 µl roztworu Kenacid Blue Acid Stain dodano do każdego zbiorniczka na 20 minut, w temperaturze pokojowej. Pod koniec inkubacji pożywkę następnie odrzucono, a komórki przemyto roztworem kwasu octowego (5% w 10% etanolu). Na koniec do każdego zbiorniczka dodano 100 µl roztworu do ekstrakcji Kenacid Blue Assay Extraction Solution na 20 minut, w temperaturze pokojowej, delikatnie wstrząsając. Następnie absorbancję odczytywano przy długości fali 570 i 690 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Przeżywalność komórek obliczono jak opisano wcześniej.

Ocena żywotności komórek

Żywotność komórek oceniano za pomocą komercyjnego zestawu "LIVE / DEAD" (Life Technologies Ltd), który wykorzystuje dwa różne probirdze fluorescencyjne, barwnik z czerwonymi fluorescencyjnymi kwasami nukleinowymi, jodek propidyny i zielono-fluorescencyjne zabarwienie SYTO® dziewięć do oznaczania żywych i martwych komórek. SYTO 9 przenika wszystkie komórki, zarówno z nienaruszonymi jak i uszkodzonymi błonami. Jodek propidyny natomiast przenika tylko komórki z uszkodzonymi błonami, powodując zmniejszenie fluorescencji barwników SYTO 9, gdy obecne są oba barwniki. W celu przygotowania testu komórki homogenicznie wysiewano na szklane szkiełka nakrywkowe (22 x 22 mm), umieszczano na szalkach Petriego (35 x 10 mm), przy gęstości 1 x 10⁵ komórek i inkubowano w 37 ° C z atmosferą nawilżoną, 5 % CO₂. Po 24 godzinach komórki potraktowano dwoma stężeniami produktu, równymi 2,5 mg / ml i 1,25 mg / ml, wykazując, że są niecytotoksyczne i mają najlepszą rozpuszczalność w pożywce hodowlanej. Po 24 godzinach traktowania, odpowiednią mieszaninę dwóch barwników podano na każdą płytkę, na czas 15 minut. Próbkę były następnie chronione przed światłem i analizowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Ocena morfologii komórek

Barwienie hematoksyliną i eozyną (EE), powszechnie stosowane w badaniu mikroskopowym tkanek zwierzęcych i rutynowej histopatologii, zastosowano do oceny jakiegokolwiek możliwego wpływu na hodowlę komórkową po potraktowaniu produktem Neauvia Stimulate. W celu przygotowania testu komórki wysiano i traktowano jak opisano w poprzednim akapicie. Pod koniec traktowania komórki przemyto i utrwalono w metanolu; następnie do każdego szkiełka dodano roztwór 1% hematoksyliny-eozyny. Po ostrożnym usunięciu płam, szkiełka nakrywkowe zostały zamontowane na szkiełkach mikroskopowych w celu przyspieszenia suszenia.

Ocena struktury komórek

W celu zbadania wpływu na cytoskielet w wyniku potraktowania produktem Neauvia Stimulate® do wykrycia mikro-włókien F-aktyny w immunofluorescencji zastosowano fluorescencyjną cząsteczkę falloidyny [11]. W celu przygotowania testu komórki wysiano i traktowano jak opisano wcześniej. Po traktowaniu, komórki HaCaT utrwalano 4% paraformaldehydem przez 20 minut w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano z przeciwciałem Alexa Fluor® 488 falloidyny w temperaturze pokojowej. Po tym okresie nadmiar falloidyny i

wszelkie osady usunięto poprzez dwa kolejne płukania PBS i jądra wybarwione Hoechst 33258. Następnie szkiełka nakrywkowe zamontowano na płytkach mikroskopowych i analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej.

Wyniki

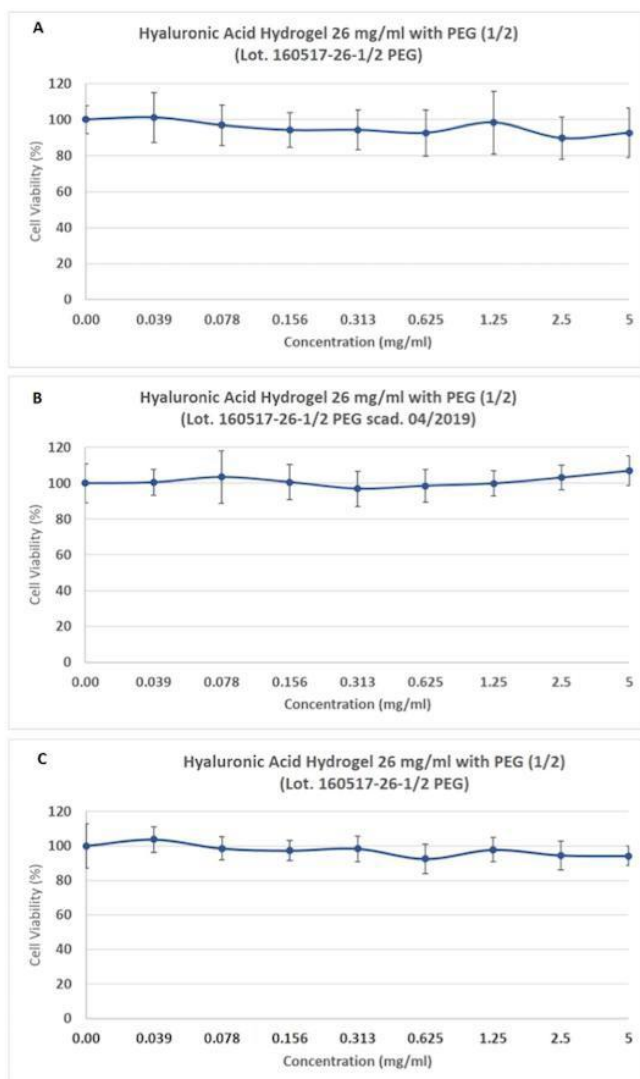
Wyniki przedstawiono na wykresach i obrazach zawierających pomiary uzyskane w testach cytotoksyczności komórkowej i ocenę żywotności komórek, struktury i morfologii po traktowaniu produktem Neauvia Stimulate w odniesieniu do kontrolnych komórek HaCaT. Dane zaprezentowane jako średnia z co najmniej dwóch niezależnych eksperymentów wykonanych w trybie pojedynczym.

Ocena cytotoksyczności komórkowej

Komórki HaCaT inkubowano i traktowano przez 24 godziny ośmioma różnymi stężeniami produktu Neauvia Stimulate®, wraz z odpowiednią pozytywną próbą kontrolną, w celu zidentyfikowania możliwego efektu cytotoksycznego w kulturach komórkowych i stężeń do zastosowania w poniższym teście.

Rys. 2 pokazuje wyniki badań cytotoksyczności. Można zauważyć, że przy wszystkich badanych stężeniach i we wszystkich trzech testach produkt Neauvia Stimulate nie powodował zmniejszenia żywotności komórek, więc w obliczeniu wartości IC_{50} , produkt nie wykazywał aktywności cytotoksycznej.

Stężenia 1,25 mg / ml i 2,5 mg / ml wybrano do następujących testów ze względu na najlepszą ich rozpuszczalność w pożywce hodowlanej.



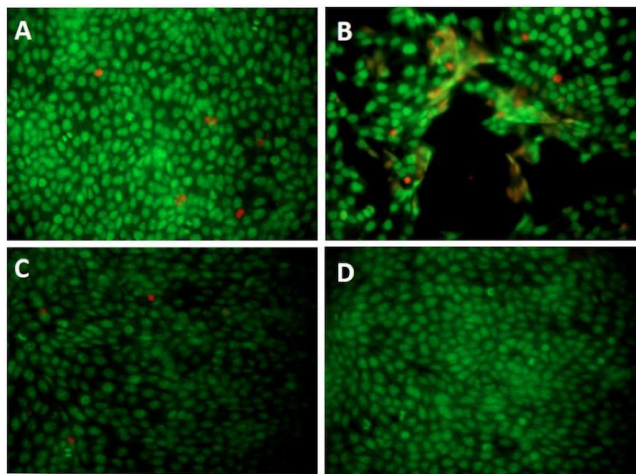
Rys. 2: Grafiki przedstawiające żywotność komórek uzyskaną po 24 godzinach traktowania komórek HaCaT za pomocą produktu Neuvia Stimulate®. (A): test MTT; (B) test NRU; (C) Test Kenacid Blue

Ocena żywotności komórek

Komórki HaCaT inkubowano i traktowano przez 24 godziny stężeniami 1,25 mg / ml i 2,5 mg / ml produktu Neuvia Stimulate®, wraz z odpowiednią pozytywną próbą kontrolną. Ryc. 3 pokazuje reprezentatywne obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyników testu LIVE / DEAD. Analizując obrazy, jasne jest, że żadne z dwóch badanych stężeń nie determinuje zmienności żywotności komórek i że liczba wybarwionych komórek w zieleni (żywa) jest porównywalna do próby kontrolnej (komórki niepotraktowane). W przeciwieństwie do tego, widoczna jest zmiana żywotności po potraktowaniu SLS, ze zmniejszeniem całkowitej liczby obserwowanych komórek i zwiększoną śmiertelnością (komórki zabarwione na czerwono), w porównaniu do próby kontrolnej.

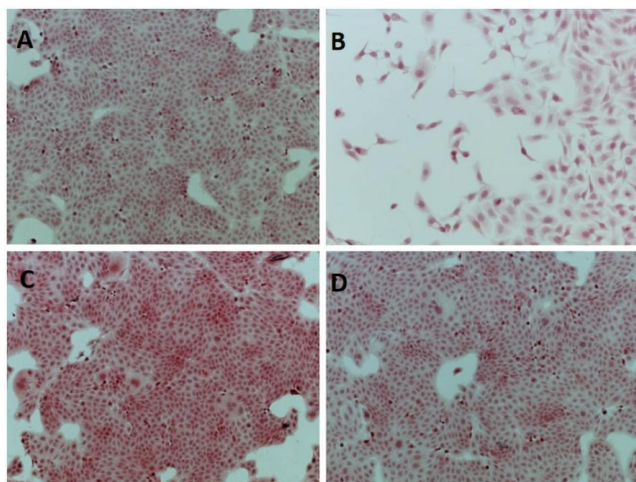
Ocena morfologii komórek

Komórki HaCaT inkubowano i traktowano przez 24 godziny dwoma poprzednio opisanymi stężeniami produktu Neuvia Stimulate®, wraz z odpowiednią pozytywną próbą kontrolną.



Rys. 3: Obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wybarwień z zestawem LIVE / DEAD po 24 godzinach traktowania produktem Neuvia Stimulate®. A) Ctrl (komórki nietraktowane); B) SLS (Ctrl +); C) produkt 2,5 mg / ml; D) produkt 1,25 mg / ml

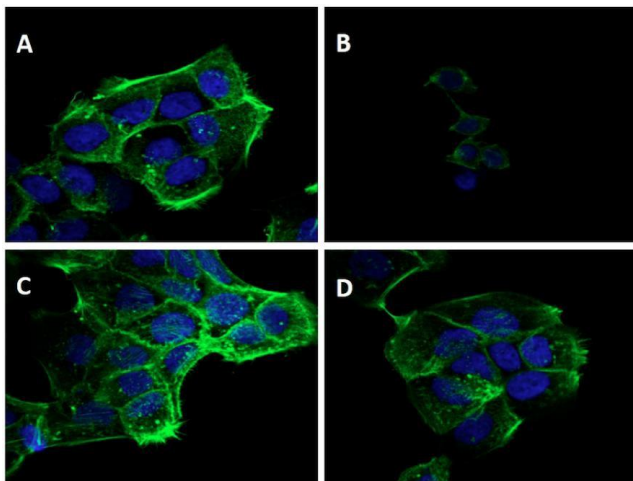
Rys. 4 pokazuje reprezentatywne obrazy w mikroskopii optycznej wyników testu hematoksyliną-eozyną dla każdego testowanego stanu. Żadne z dwóch stężeń produktu nie zmienia morfologii komórki w porównaniu z niepotraktowaną próbą kontrolną. Widoczna jest również zmiana w morfologii komórek indukowana przez SLS, z zauważalnym spadkiem całkowitej liczby obserwowanych komórek i modyfikacją prawidłowej morfologii komórek HaCaT w porównaniu z ujemną próbą kontrolną.



Rys. 4: Obrazy z mikroskopu optycznego związane z barwieniem EE po 24 godzinach traktowania komórek HaCaT za pomocą produktu Neuvia Stimulate®. A) próba kontrolna (nietraktowane komórki); B) SLS (Ctrl +); C) produkt 2,5 mg / ml; D) produkt 1,25 mg / ml

Ocena struktury komórek

Komórki HaCaT inkubowano i traktowano przez 24 godziny dwoma wcześniej opisanymi stężeniami produktu Neuvia Stimulate®, wraz z odpowiednią pozytywną próbą kontrolną. Rys. 5 pokazuje reprezentatywne obrazy w mikroskopii konfokalnej wyników uzyskanych poprzez ocenę struktury cytoszkieletu. Analizując obrazy, jasne jest, że żadne z dwóch badanych stężeń nie determinuje zmiany w strukturze cytoszkieletu (barwionego na zielono) w porównaniu z próbą kontrolną (komórki nietraktowane). W przeciwieństwie do tego, oczywiste jest, że struktura uległa zmianom po potraktowaniu SLS, ze zmniejszeniem znakowanej F-aktyny i zmniejszeniem całkowitej liczby obserwowanych komórek.



Rys. 5: Obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego, barwienia za pomocą faloidyny po 24 godzinach traktowania produktem Neauvia Stimulate®. A) Ctrl (komórki niepotraktowane); B) SLS 0,1 mg / ml (Ctrl +); C) produkt 2,5 mg / ml; D) produkt 1,25 mg / ml

Dyskusja

Z wyników uzyskanych za pomocą testów in vitro można wywnioskować, że produkt Neauvia Stimulate® nie wywołuje żadnego efektu cytotoksycznego po 24-godzinnym działaniu w ludzkich keratynocytach w badanych warunkach. Co więcej, analizy przeprowadzone przy dwóch stężeniach wykazały najlepszą rozpuszczalność w pożywce do hodowli komórkowej, nie powodują żadnych zmian w żywotności komórek, morfologii komórek i strukturze komórek, wykazując wyniki porównywalne z komórkami kontrolnymi, które nie były traktowane.

Odwołania

1. Larsen NE, Leshchiner E, Pollak CT, Balasz EA, Piacquadio E. Evaluation of Hylan B (hylan gel) as soft tissue dermal implants. Proc Mat Res Soc (Spring Meeting, San Francisco, CA). 1995; 394:193-7. <https://doi.org/10.1557/PROC-394-193>
2. Larsen NE, Pollak CT, Reiner K, Leshchiner E, Balasz EA. Hylan gel biomaterial: dermal and immunological compatibility. J Biomed Mater Res. 1993; 27:1129-34. <https://doi.org/10.1002/jbm.820270903> PMID:8126011
3. Duranti F, Salti G, Bovani B, et al. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. Dermatol Surg. 1998; 24: 1317-25. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.1998.tb00007.x> PMID:9865196
4. Varani J, Dame MK, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin. Am J Pathol. 2006; 168:1861-8. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051302> PMID:16723701 PMCID:PMC1606623
5. Marmur ES, Phelps R, Goldberg DJ. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. J Cosmet Laser Ther. 2004; 6:223-6.
6. Berlin AL, Hussain M, Goldberg DJ. Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: a histologic and immunohistochemical analysis. Dermatol Surg. 2008; 34(S1):64-7.
7. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1993; 65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
8. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011; 731:237-45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20 PMID:21516412
9. Repetto G, del Peso A, Zuritsa JL. Neutral red uptake for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Prot. 2008; 3: 1125-31. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75> PMID:18600217
10. Knox P, Uphill PF, Fry JR, Benford J, Balls M. The FRAME Multicentre project on In Vitro Toxicology. Chemical Toxicology. 1986; 24:457-63. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90092-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90092-X)
11. Wulf E, Deboben A, Faulstich H, Wieland T. Fluorescent phalloidin, a tool for the visualization of cellular actin. Cell Biology. 1979; 4498: 1-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4498>