

kwartalnik

Academy of Aesthetic and Anti-Aging Medicine

Oficjalne czasopismo Polskiego Towarzystwa
Medycyny Estetycznej i Anti-Aging Oddział Polskiego Towarzystwa Lekarskiego
Official Journal of Polish Society of Aesthetic and Anti-Aging Medicine Division
of Polish Medical Society

4/2019

Nr 4/2019

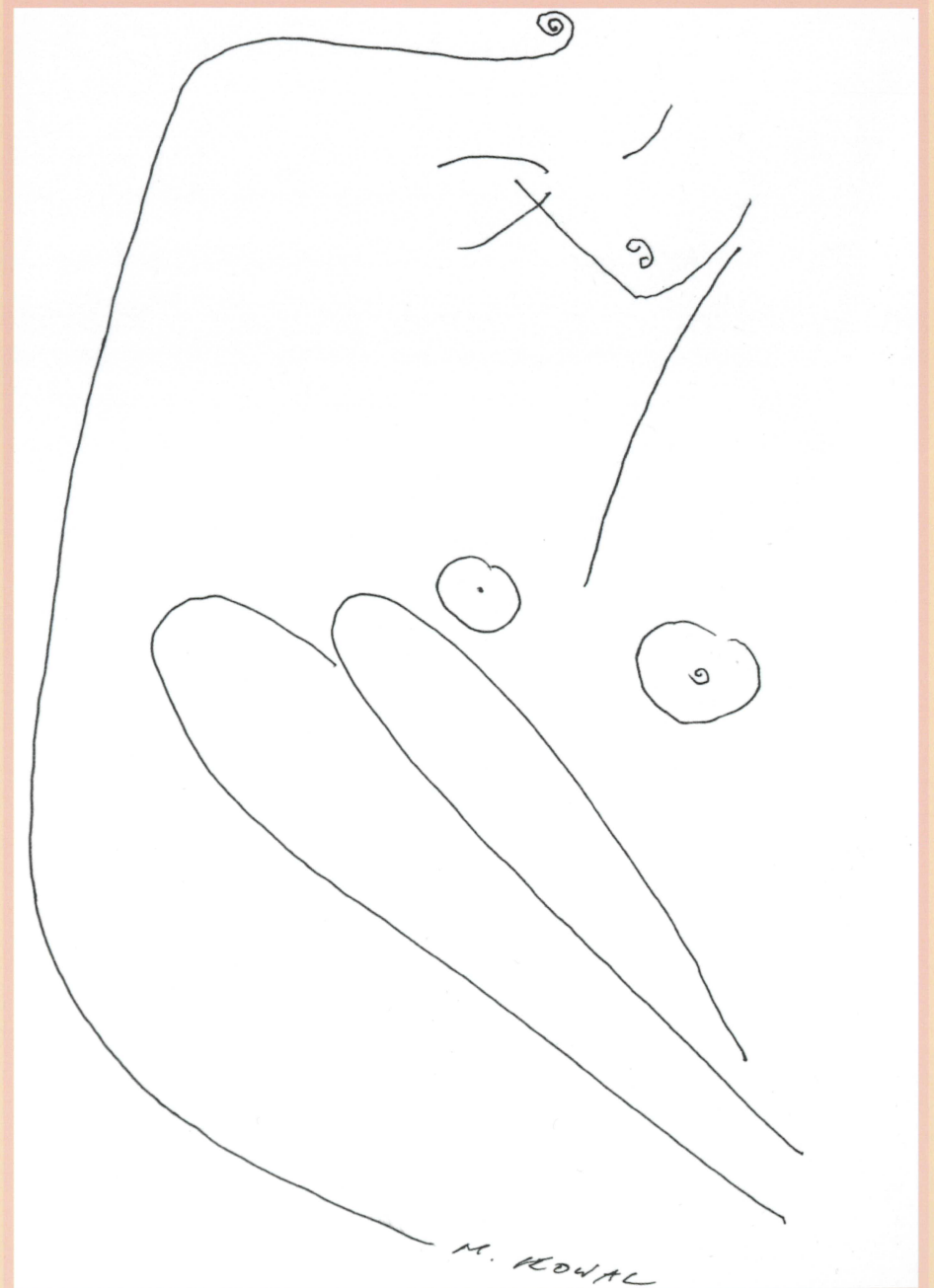
Grudzień 2019

Cena 38,88 zł (w tym 8% VAT)

ISSN 2081-3678



< 2081-3673 >



Wpływ temperatury na różne wypełniacze na bazie kwasu hialuronowego

Heat influence on different hyaluronic acid fillers

Paweł Kubik, Wojciech Gruszczyński

Nadzór naukowy: dr hab. n. med. Jerzy Jankau, kierownik Kliniki Chirurgii Plastycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Liczne wypełniacze na bazie kwasu hialuronowego (HA) wydają się mieć podobne właściwości, chociaż ich właściwości dotyczące reologii, lepkości, odporności termicznej różnią się na wiele sposobów. Znajomość odporności na degradację cieplną jest istotna w perspektywie następującego po sobie używania różnych technik zabiegowych, w tym opartych na emisji energii prowadzącej do podgrzania tkanek. Celem pracy było określenie właściwości żeli HA pod względem odporności na ciepło. Do badania zakwalifikowano 5 rodzajów wypełniaczy na bazie HA. Badano odporność in vitro na degradację cieplną. Wypełniacz żelowy HA-PEG 28 mg/ml wykazywał większą odporność na ciepło w porównaniu z wypełniaczami żelowymi BDDE 20 mg/ml i 25 mg/ml. HA-PEG 28 mg/ml wykazywał w obu testach (Cellticator z/bez obrotu i autoklawu) większą odporność na ciepło pod względem deformacji / degradacji termicznej i zmiany pola powierzchni. Nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem HA w produkcie a jego odpornością na działanie temperatury.

Słowa kluczowe: wypełniacze na bazie kwasu hialuronowego, hydrożele, degradacja cieplna.

Summary

Numerous hyaluronic acid (HA) fillers seem to have similar characteristics, although their properties regarding rheology, viscoelasticity, heat resistance are different in many ways. The resistance heat degradation is an important factor with the sequential use of hyaluronic acid fillers and energy-based devices.

Our objective was to determine the characteristics of HA gels in terms of heat resistance. 5 types of HA fillers were chosen for this research. The 28 mg/ml HA-PEG gel filler demonstrated higher resistance to heat than the 20 mg/ml and 25 mg/ml BDDE gel fillers. In both tests (Cellticator with/without rotation and autoclave) the 28 mg/ml HA-PEG showed higher resistance to heat in terms of deformation / thermal degradation and change of surface area. No correlation was observed between the concentration of hyaluronic acid in the product and its resistance to temperature.

Keywords: hyaluronic acid based fillers, hydrogels, thermal degradation.

Wprowadzenie

Odmładzanie twarzy za pomocą wypełniaczy na bazie kwasu hialuronowego (HA) to bezpieczna i skuteczna procedura estetyczna dla pacjentów pragnących zachować młody wygląd. **Liczba niechirurgicznych procedur z użyciem wypełniaczy HA wzrosła do prawie 3 mln rocznie na całym świecie** [1]. Ich przewaga wynika z natychmiastowego efektu estetycznego i stosunkowo krótkiego czasu regeneracji [2, 3]. Bezpieczeństwo wypełniaczy tkanek miękkich opartych na HA wynika z ich właściwości biokompatybilności i odwracalności.

Rodzaj i gęstość sieciowania HA, a także technologia wytwarzania mogą wpływać nie tylko na trwałość in vivo, ale także na profil bezpieczeństwa wypełniaczy.

W ostatnich latach na rynek wprowadzono **kilka rodzajów czynników sieciujących** [6]: eter diglicydowy 1,4-butanodiolu (BDDE); 1,2,7,8-diepoksyoctan (DEO), sulfon diwinyłu (DVS); heksametylenodiamina (HMDA) i eter diglicydowy glikolu polietylenowego (PEGDE) [7]. Ostatnio wprowadzono hydrożel HA usieciowany glikolem polietylenowym (PEG) [6, 8, 9]. Główną rolę w określaniu właściwości fizycznych

i chemicznych, w tym właściwości reologicznych i pęcznienia hydrożelu [4-6], które pełnią istotną funkcję w zastosowaniach klinicznych, odgrywają parametry sieciowania [5].

Materiał i metody

Materiał

Do badania zakwalifikowano 5 rodzajów wypełniaczy na bazie HA wybranych spośród najpopularniejszych na rynku produktów do tymczasowej korekty wrodzonych i nabytych deficytów tkanek miękkich twarzy poprzez wstrzyknięcie śródskórne lub podskórne: 20 mg/ml HA-BDDE, 20 mg/ml HA-BDDE, 20 mg/ml HA-BDDE, 25 mg/ml HA-BDDE i 28 mg/ml HA-PEG. Każdorazowo były to preparaty o najwyższej lepkości z oferty każdego z producentów.

Metody

Badano odporność *in vitro* na degradację cieplną przy użyciu urządzenia Celltibrator GT (Medikan Co. Ltd, Seul, Rep. Korei) i autoklawu (Medotti 22L Pro, Polska). Wszystkie próbki wypełniaczy HA (po 0,3 ml) umieszczono na szalkach Petriego i w autoklawie na 10 min w temperaturze 72,4°C. Próbki: 20 mg/ml HA-BDDE, 25 mg/ml HA-BDDE oraz 28 mg/ml HA-PEG (każda 0,3 ml) umieszczono w Celltibratorze na 10 min w temperaturze 55,2°C bez wirowania oraz z wirowaniem 30 rpm. Odwirowanie zastosowano do naśladowania zachowania wypełniaczy w warunkach sił działających na nie w tkance (naprężenia pod wpływem mimiki, ćwiczeń itp.).

Temperatury podczas tego testu odpowiadały powszechnie stosowanym urządzeniom na bazie ciepła: o częstotliwości radiowej (ok. 45°C), na podczerwień (ok. 55-65°C) i HIFU (ok. 70-75°C). Przed i po każdym badaniu wykonano zdjęcia próbek. Degradację cieplną próbek HA mierzono, porównując (przed i po) zmiany pola powierzchni próbek na szalkach Petriego (na papierze milimetrowym).

Każdą procedurę badawczą udokumentowano zdjęciami przed i po jej przeprowadzeniu.

Autoklaw

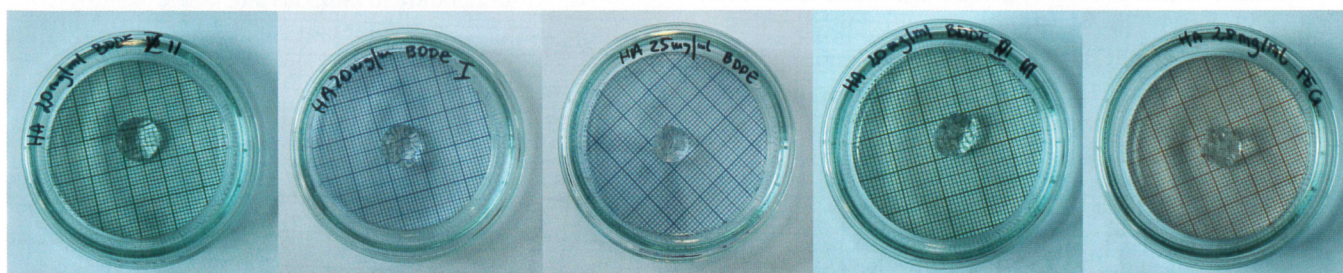
Wszystkie próbki wypełniaczy HA do tymczasowej korekty wrodzonych i nabytych niedoborów tkanek miękkich twarzy poprzez wstrzyknięcie śródskórne lub podskórne (20 mg/ml HA-BDDE, 20 mg/ml HA-BDDE, 20 mg/ml HA-BDDE, 25 mg/ml HA-BDDE, 28 mg/ml HA-PEG) umieszczono na szalkach Petriego (po 0,3 ml na każdej) i w autoklawie na 10 min w temperaturze 72,4°C (ryc. 1).

Celltibrator bez wirowania

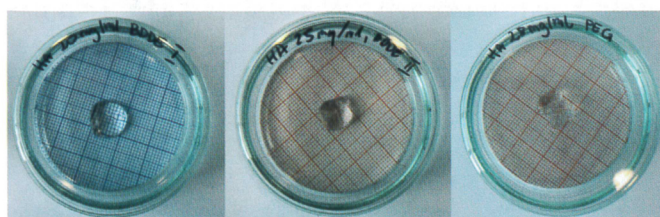
3 próbki wypełniaczy HA o najlepszych rezultatach w teście z użyciem autoklawu (20 mg/ml HA-BDDE, 25 mg/ml HA-BDDE, 28 mg/ml żel HA-PEG, po 0,3 ml każda) umieszczono na płytkach Petriego i w Celltibratorze na 10 min w temperaturze 55,2°C bez wirowania (ryc. 2).

Celltibrator z wirowaniem

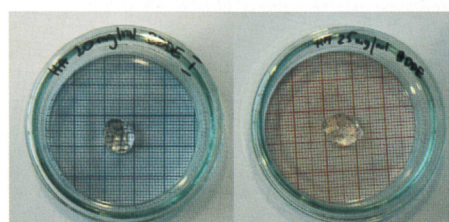
2 próbki wypełniaczy HA o najlepszych rezultatach w teście z użyciem Celltibratora bez wirowania (20 mg/ml HA-BDDE oraz 28 mg/ml HA-PEG,



Rycina 1. Próbkki wypełniaczy HA (po 0,3 ml każda) przed ogrzewaniem w autoklawie. Źródło: materiały własne



Rycina 2. Próbkki 20 mg/ml HA-BDDE; 25 mg/ml HA-BDDE i 28 mg/ml HA-PEG (po 0,3 ml każda) przed testem ogrzewania w Celltibratorze. Źródło: materiały własne



Rycina 3. Próbkki HA-BDDE 20 mg/ml i HA-PEG 28 mg/ml (po 0,3 ml każda) przed ogrzewaniem i wirowaniem w Celltibratorze. Źródło: materiały własne

po 0,3 ml każda) umieszczono na szalkach Petriego i w Celltibratorze na 10 min w temperaturze 55,2°C z wirowaniem 30 rpm (ryc. 3). Ponieważ nie było znaczącej degradacji żelu 28 mg/ml HA-PEG, preparat ten wybrano do dodatkowego testu. Próbkę 28 mg/ml HA-PEG odwrócono do góry nogami i pozostawiono na kolejne 10 min ze zwiększoną liczbą wirowań (60 rpm), aby sprawdzić, jak się zachowa w bardziej ekstremalnych warunkach.

Wyniki

Wszystkie próbki wypełniaczy HA po 10 min w autoklawie w temperaturze 72,4°C wykazały zmiany pola powierzchni (tab. 1, ryc. 4). **Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem HA w próbkach a rezultatem testu. Zmiana powierzchni żeli usieciowanych BDDE występowała w zakresie 4,1–18,0% w porównaniu z HA-PEG 3,6%.**

Tabela 1. Wyniki ogrzewania próbek HA; autoklaw – 10 min, 72,4°C. Źródło: materiały własne

	Przed [cm ²]	Po [cm ²]	[%]
25 mg/ml BDDE	1,0	1,06	+6,0
20 mg/ml BDDE I	1,364	1,610	+18,0
20 mg/ml BDDE II	1,224	1,275	+4,1
20 mg/ml BDDE III	1,265	1,345	+6,3
28 mg/ml PEG	1,321	1,368	+3,6

Do kolejnego testu (ogrzewanie w stymulatorze komórkowym Celltibrator bez wirowania) wybrano:

- **żel 20 mg/ml BDDE II** – jako najlepszy spośród żeli BDDE (na potrzeby kolejnego testu oznaczono go jako 20 mg/ml BDDE I) (ryc. 5);
- **żel 25 mg/ml BDDE** – drugi najlepszy spośród żeli BDDE (na potrzeby kolejnego testu oznaczony jako 25 mg/ml BDDE II) (ryc. 6);
- **żel 28 mg/ml PEG** – jedyny żel PEG w teście z uwagi na wynik próby z autoklawem oraz odmienny sposób sieciowania (ryc. 7).

Podczas testu w Celltibratorze bez wirowania zaobserwowano zmianę pola powierzchni próbek żeli sieciowanych BDDE, zaś żel sieciowany PEG nie zmienił pola powierzchni (tab. 2).

Tabela 2. Wyniki ogrzewania próbek HA: 20 mg/ml HA-BDDE, 25 mg/ml HA-BDDE, 28 mg/ml HA-PEG; Celltibrator bez wirowania. Źródło: materiały własne

	Przed [cm ²]	Po [cm ²]	[%]
20 mg/ml BDDE I	1,663	1,715	+3,1
25 mg/ml BDDE II	1,142	1,188	+4,0
28 mg/ml PEG	1,502	1,502	+0,0

Do kolejnego testu (ogrzewanie w stymulatorze komórkowym Celltibrator z wirowaniem) wybrano:

- **żel 20 mg/ml BDDE I** z testu ogrzewania w stymulatorze komórkowym Celltibrator bez wirowania – jako najlepszy rezultat spośród żeli BDDE (na potrzeby kolejnego testu nadal oznaczony jako 20 mg/ml BDDE I) (ryc. 8);
- **żel 28 mg/ml PEG** – jedyny żel PEG w teście z uwagi na wynik próby w stymulatorze komórkowym Celltibrator bez wirowania oraz odmienny sposób sieciowania (ryc. 9).

W przypadku testu łączonego – ogrzewania i wirowania – dla próbki 20 mg/ml żelu HA-BDDE degradacja wyniosła +29% w stosunku do rezultatu dla próbki 28 mg/ml HA-PEG na poziomie +4,3%.

Z uwagi na najlepszy rezultat uzyskany zarówno w teście przy użyciu autoklawu, jak i w testach z użyciem Celltibratora bez wirowania oraz z wirowaniem postanowiono poddać próbkę 28 mg/ml HA-PEG dodatkowemu testowi polegającemu na odwróceniu szalki o 180° oraz zwiększeniu ilości obrotów do 60 rpm przez 10 min. Dodatkowe ogrzewanie i wirowanie żelu HA-PEG 28 mg/ml nie zmieniało kształtu, pola ani właściwości żelu (tab. 3).

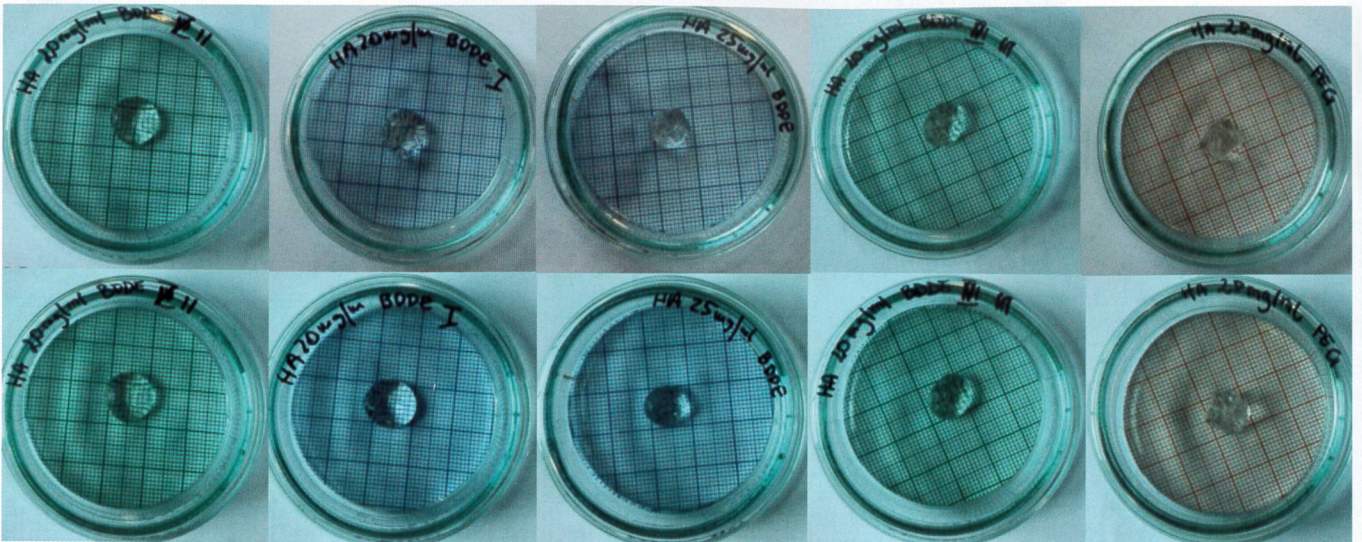
Tabela 3. Wyniki ogrzewania i wirowania próbek HA: 20 mg/ml HA-BDDE i 28 mg/ml HA-PEG. Źródło: materiały własne

	Przed [cm ²]	Po [cm ²]	[%]
20 mg/ml BDDE I	1,155	1,50	+29,0
28 mg/ml PEG	1,309	1,366	+4,3
Dodatkowe 10 min, 60 rpm, 55,2°C			
28 mg/ml PEG	1,366	1,366	+0,0

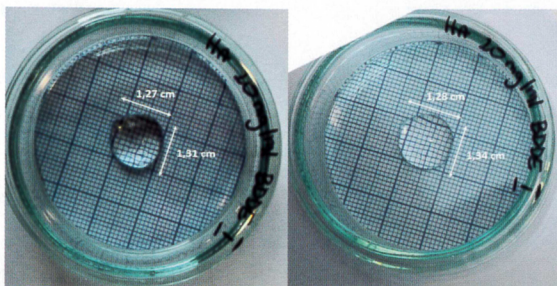
Dyskusja

W niniejszym badaniu wykazano, że **wyбір wypełniacza tkankowego do protokołów leczenia kombinowanego: wypełniacze + urządzenia oparte na emisji energii (EBD) może być kluczowym czynnikiem w osiągnięciu naturalnie wyglądającego, długotrwałego, pożądanego efektu estetycznego.** Wypełniacze HA w połączeniu z EBD są często stosowane sekwencyjnie podczas tej samej procedury lub w następujących po sobie wizytach, jednak w niektórych przypadkach może to spowodować uszkodzenie termiczne wypełniaczy na bazie HA.

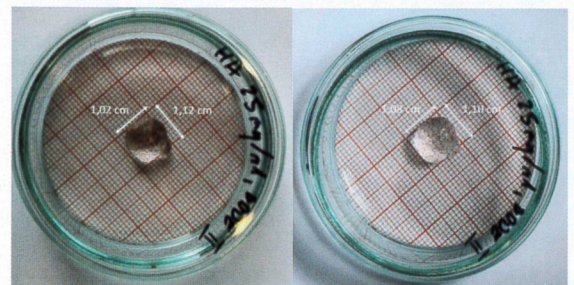
Ponieważ ogromna liczba pacjentów zainteresowanych leczeniem EBD była wcześniej poddawana zabiegom wypełniaczy HA, autorzy uważają, że **bardzo ważne jest wybranie produktu najbardziej**



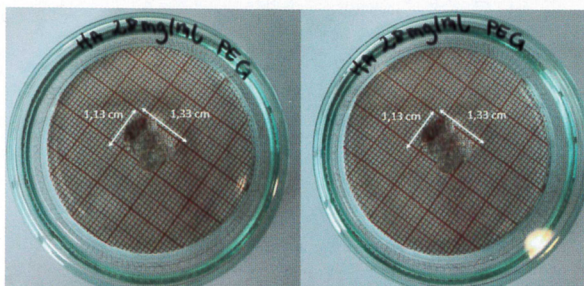
Rycina 4. Zdjęcia przed i po: autoklaw – 10 min, 72,4°C. Źródło: materiały własne



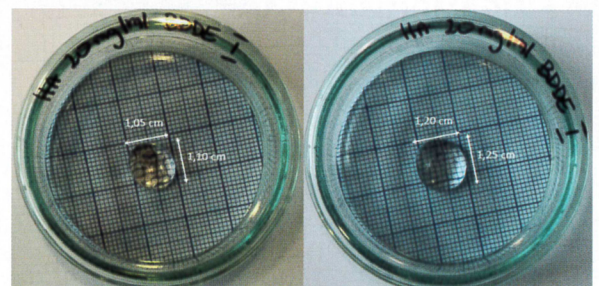
Rycina 5. Zdjęcia przed i po: żel 20 mg/ml HA-BDDE; Cellticator bez wirowania – 10 min, 55,2°C. Źródło: materiały własne



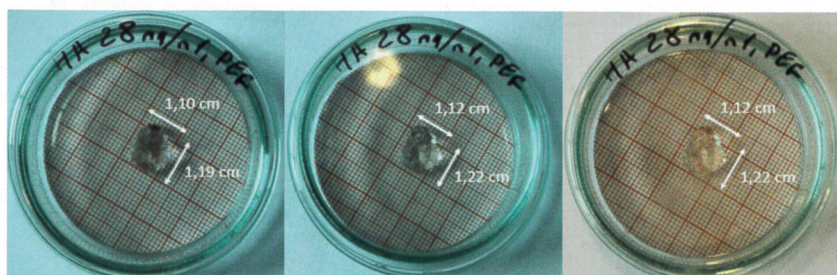
Rycina 6. Zdjęcia przed i po: żel 25 mg/ml HA-BDDE; Cellticator bez wirowania – 10 min, 55,2°C. Źródło: materiały własne



Rycina 7. Zdjęcia przed i po: żel 28 mg/ml HA-PEG; Cellticator bez wirowania – 10 min, 55,2°C. Źródło: materiały własne



Rycina 8. Zdjęcia przed i po: żel 20 mg/ml HA-BDDE; Cellticator – 10 min, 55,2°C, 30 rpm. Źródło: materiały własne



Rycina 9. Zdjęcia przed i po: żel 28mg/ml HA-PEG; Cellticator – 10 min, 55,2°C, 30 rpm oraz 10 min, 55,2°C, 60 rpm. Źródło: materiały własne

odpornego na działanie temperatury. Temperatura tkanek podczas zabiegów EBD waha się w granicach 45–70°C, a twarz nie jest nieruchoma. Wiedząc to, postanowiono sprawdzić *in vitro*, w jaki sposób najpopularniejsze wypełniacze na rynku będą działać w temperaturze 55–70°C, również w warunkach naprężeń działających na nie sił.

W badaniu tym w bardzo podstawowy sposób oceniono odporność na ciepło 5 hydrożeli HA różniących się zawartością HA oraz rodzajem i stężeniem środka sieciującego. Celem badania była ocena *in vitro*, w jaki sposób właściwości wypełniacza mogą wpływać na odporność termiczną produktu, a w konsekwencji czas trwania implantu stosowanego wraz z EBD. **Nie znaleziono korelacji między stężeniem HA w produktach a odpornością na ciepło. Zaobserwowano różnice między dwoma rodzajami środków sieciujących.**

Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane produkty były wrażliwe na degradację cieplną, ale **procent degradacji uzyskany w warunkach eksperymentalnych był znacznie niższy dla wypełniacza HA-PEG i może prowadzić do wniosku, że był zależny od środka sieciującego.** W szczególności zastosowanie PEG jako środka sieciującego jest innowacją w dziedzinie biomedycyny i stanowi zachętę do badania pegylowanych wypełniaczy w celu zbadania ich zachowania w obecności ciepła pod kątem poprawy stabilności i zachowanej biokompatybilności w przypadku stosowania razem z EBD. Wypełniacz stosowany razem z EBD powinien cechować się długoterminową stabilnością, ale jednocześnie plastycznością i powinien być biokompatybilny.

Podsumowując, znaleziono korelację między typem środka sieciującego a odpornością na degradację cieplną, ale ze względu na ograniczenia badań konieczne są dalsze prace.

Wnioski

Wyniki badania mogą dostarczyć dowodów na skuteczność kliniczną wypełniaczy HA sieciowanych przy użyciu PEG stosowanych wraz z urządzeniami emitującymi ciepło do odmładzania twarzy. Podsumowując wyniki, można stwierdzić, że odporność na ciepło wypełniaczy HA zależy od środka sieciującego, zaś wybór wypełniaczy tkankowych jest kluczowy w przypadku zastosowania IR, RF, HIFU lub innego urządzenia emitującego ciepło nad wprowadzonym wypełniaczem. Chociaż badanie przeprowadzono w bardzo prosty sposób, wyniki są obiecujące. Zwiększoną odporność termiczną pegylowanych wypełniaczy HA na skórę należy poddać dalszym testom, w szczególności *in vivo*.

Kontakt do autorów:
pawel.kubik@me.com.

Piśmiennictwo

1. ISAPS global statistics; www.isaps.org/news/isaps-global-statistics (dostęp: 28.11.2019).
2. Carruthers A., Carruthers J., *Non-animal-based hyaluronic acid fillers: scientific and technical considerations*, *Plast. Reconstr. Surg.* 2007(120, suppl. 6), s. 33–40.
3. Carruthers J. i wsp., *The science and art of dermal fillers for soft-tissue augmentation*, *J. Drugs Dermatol.* 2009(4), s. 335–350.
4. Tezel A., Fredrickson G.H., *The science of hyaluronic acid dermal fillers*, *J. Cosmet. Laser Ther.* 2008(1), s. 35–42.
5. Santoro S. i wsp., *Rheological properties of cross-linked hyaluronic acid dermal fillers*, *J. Appl. Biomater. Biomech.* 2011(2), s. 127–136.
6. Yeom J. i wsp., *Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration*, *Bioconjug. Chem.* 2010(2), s. 240–247.
7. Zerbinati N. i wsp., *Morphological evidence following pegylated filler treatment in human skin*, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2017(2, suppl. 2), s. 79–85.
8. Zerbinati N. i wsp., *In vitro evaluation of collagen production on human fibroblasts treated with hyaluronic acid peg cross-linked with micromolecules of calcium hydroxyapatite in low concentration*, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2017(2, suppl. 2), s. 87–90.
9. Zerbinati N. i wsp., *A new hyaluronic acid polymer in the augmentation and restoration of labia majora*, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2017(2, suppl. 2), s. 153–161.