

Эффективность фрагментов гиалуроновой кислоты с аминокислотами в борьбе со старением кожи лица: ультразвуковое и гистологическое исследование

Antonio Scarano E. Qorri • A. Sbarbati • S. A. Gehrke • Alessio Frisone¹ • D. Amuso • Sergio Rexhep Tari

ВВЕДЕНИЕ

Кожа человека, помимо своей важнейшей защитной функции, играет важную роль в обеспечении метаболического и информационного обмена между организмом и окружающей средой. К сожалению, под воздействием различных повреждающих факторов, как внешних (например, ультрафиолетовое излучение), так и внутренних (например, эндокринно-метаболические нарушения), усугубляемых неумолимым течением времени, она может претерпевать ряд функциональных и структурных изменений, которые в той или иной степени нарушают ее целостность [1]. Это может проявиться изменением цвета кожи, обезвоживанием, снижением эластичности, в виде микрососудистых изменений и т.д., особенно заметных в таких областях, как лицо и зона декольте [2, 3]. Для устранения и предотвращения таких проблем кожи, в том числе морщин, в косметической медицине была предложена концепция "биостимуляции кожи". Этот подход основан на инъекциях, направленных на восстановление нормальной структуры и функций кожи, в первую очередь за счет стимуляции фибробластов, которые отвечают за поддержание состояния внеклеточного матрикса и каркасных функций дермы. [4].

Однако важно понимать, что комплекс фибробласт-миофибробласт-фиброцит – это лишь один из элементов гораздо более крупной головоломки, включающей другие компоненты, как клеточные (такие как эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов, моноциты-макрофаги, лимфоциты, нервные ганглии и т.д.), так и неклеточные (например, внеклеточный матрикс и другие). Их анаболические процессы должны постоянно уравниваться катаболическими процессами и клеточной рециркуляцией, и все это под контролем сигнальных молекул (от свободных радикалов до цитокинов и факторов роста) [5, 6]. Другими словами, учитывая сложную структуру и функции кожи на молекулярном уровне, очевидно, что без комплексного подхода одной стимуляции фибробластов может оказаться недостаточно для предотвращения или лечения дегенеративных проблем в дерме.

В области эстетической медицины примечательно наблюдение, что фрагменты гиалуроновой кислоты, содержащие от 20 до 30 мономеров, могут активировать фибробласты, связываясь с рецепторами CD44, тем самым способствуя выработке ретикулярного коллагена III типа [7, 8]. Естественно, это явление зависит от наличия предшественников, ферментов и кофакторов, участвующих в биосинтезе этого структурного белка, о чем подробнее будет сказано далее в этом тексте [9-11]. Гиалуроновая кислота является основным компонентом внеклеточного матрикса, который играет важную роль в сохранении структуры тканей и регулировании клеточных сигнальных путей. Гиалуроновая кислота обеспечивает защиту от окислительного стресса, поддерживает эластичность кожи, улучшает заживление ран и устойчивость к раку и артриту, что во многом объясняется взаимодействием с CD44 и другими сложными механизмами [12, 13]. В результате предыдущих клинических испытаний была исследована гиалуроновая кислота, смешанная с аминокислотами, с целью борьбы со старением кожи [11, 14].

Ультрасонография (УЗ) находит широкое применение в исследовательских, клинических и хирургических аспектах. Alexander и Miller в 1979 году использовали прибор с частотой 15 МГц в одномерном режиме для измерения толщины кожи [15]. Сегодня разработаны более высокочастотные аппараты, цель которых – повысить разрешение и увидеть особенности изучаемых поверхностей даже на более коротких длинах волн [16]. Благодаря своей безболезненности и экономичности ультразвук находит все большее применение в различных областях медицины.

В данном исследовании изучается роль гиалуроновой кислоты наряду с различными органическими и неорганическими веществами в профилактике и лечении распространенных недостатков кожи. Цель данного исследования – провести гистологическую и ультразвуковую оценку влияния низкомолекулярных фрагментов гиалуроновой кислоты и аминокислот (НААМ) на омоложение кожи лица с помощью внутрикожных микроинъекций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены двадцать женщин, средний возраст которых составил 45 лет (от 35 до 64 лет), в том числе восемь женщин в менопаузе и двенадцать – в детородном возрасте. Исследование проводилось на кафедре медицинских наук Университета Тираны, Албания, зарегистрировано под № 321 Прот. дата 24.05.2022. В ходе исследования строго соблюдались этические принципы, включая соответствие Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (<https://www.wma.net/wp-content/uploads/2018/07/DoH-Oct2008.pdf>) и дополнительные

требования, предусмотренные законодательством Албании. План клинических исследований (ПКИ) для данного исследования был разработан в соответствии с требованиями международного стандарта ISO 14155. Все пациенты дали информированное согласие на проведение процедуры, хотя и не знали о конкретных целях терапии. Среди общих проблем, наблюдавшихся у всех пациентов, были генерализованный ритидоз (морщины), сниженная гидратация кожи, гипоксия, недостаточная выработка себума. Критерии исключения включали в себя особенности в рационе питания, беременность, курение (20 сигарет в день), аллергический и/или ирритативный контактный дерматит рук, системные заболевания и психические расстройства.

После сбора анамнестических данных и физикального осмотра пациенты проходили измерение pH, себометрию, гидрометрию, фотографирование и эхографию в таких областях, как глабелла, кантус, скула, подбородок и шея. Для оценки гидратации кожи, выработки кожного сала и уровня pH использовался прибор SoftPlus (Callegari, Парма, Италия), при этом гидратация измерялась в г/м²/ч, а выработка кожного сала в г/см²/мин. Клинические результаты были опубликованы в предыдущем исследовании [11]. В исследовании использовалась общая основа из низкомолекулярных фрагментов гиалуроновой кислоты, к которой добавлялся буферный водный раствор. Состав включал гиалуронат натрия, а также L-лизин, L-пролин, L-аланин, глицин, L-серин, L-цистеин, L-лейцин, L-валин и L-изолейцин в растворе с бикарбонатом натрия (SKIN-B®, Italfarmacia, Рим, Италия). Пациенты получали лечение препаратами НААМ с использованием техники мезотерапии по 8-недельному протоколу. Раствор вводился в глубокий дермальный слой, при этом в гипотоничных точках вводилось не менее 0,2/0,3 мл. Для точности дозировки использовался шприц объемом 2,5 мл, а также мезоигла 30G x 6 мм. Пациенты проходили по одному сеансу каждые 15 дней, всего четыре сеанса (рис. 1).

Ультразвуковые исследования

До и через три месяца после терапевтической процедуры каждому пациенту проводилось УЗИ. Ультразвуковые исследования проводились в В-режиме с получением двумерных изображений в продольном или поперечном направлениях с частотой от 5 до 13 МГц (MY LAB X8, ESAOTE, Генуя, Италия). Эти оценки позволили визуализировать эпидермис, дерму и подкожные структуры. Морфологические характеристики, толщина эпителия и толщина дермы оценивались в таких областях, как щечно-скуловая зона, подбородок и нижнечелюстной угол. Толщина дермы и толщина эпителия измерялись путем проведения прямой линии, перпендикулярной эпителию и подкожной клетчатке, с помощью программы Viewer. Всего было проведено 60 ультразвуковых исследований, из них 30 – до лечения и 30 – после.



Рис. 1 Клинический аспект сразу после введения НААМ



Рис. 2 Небольшие биоптаты были взяты до и через три месяца после терапевтической процедуры

Гистологическая оценка

До и через три месяца после терапевтической процедуры у каждого пациента проводилась круговая панч-биопсия (KAI Industries, Ояна, Япония) диаметром 2 мм (рис. 2). Биоптат был взят только в угловой части нижней челюсти. До лечения образцы извлекались в области левого нижнечелюстного угла, а после лечения – в области правого нижнечелюстного угла. Это позволило избежать анализа одной и той же области и относительных артефактов.

Всего было взято 40 биопсий, из них 20 – до лечения и 20 – после. Образцы были окрашены гематоксилином и эозином, трихромом Массона и с помощью окраски по Ван Гизону. Для каждого образца оценивали четыре поля, каждое диаметром 2000 мкм и длиной 4000 мкм [17].

Специальная гистологическая оценка была проведена с помощью НААМ на образце испытуемых с дефектами кожи. Иммуногистохимическая реакция на эпидермальный фактор роста (EGF) оценивалась количественно, исключая роговой слой при измерении эпидермиса. Иммуногистохимическая реакция на эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) оценивалась количественно, исключая роговой слой при измерении эпидермиса.

Гистологическая оценка биоптатов проводилась двумя патологоанатомами из разных медицинских университетов Вероны и Модены-Реджо-Эмилии, чтобы свести к минимуму возможность погрешности интерпретации.

Биопсия проводилась с целью документирования:

- Толщины эпителия
- Толщины дермы
- Количества кровеносных сосудов
- Количества клеток с положительным откликом на эпидермальный фактор роста (EGF)

Таблица 1 Сводная информация об эффективности до и после биомодуляционного лечения (среднее значение, стандартное отклонение)

| Группы | Толщина дермы (мм) | | Толщина эпидермиса (мкм) | |
|--------------------------|--------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | До | После | До | После |
| МС (маляр-щека) | 1.11 ± 0.593 | 1.219 ± 0.640 | 0.127 ± 0.080 | 0.201 ± 0.584 |
| значение <i>p</i> | <i>p</i> = 0.58 | | <i>p</i> = 0.52 | |
| ГС (Подбородок) | 1.263 ± 0.375 | 1.327 ± 0.403 | 0.149 ± 0.080 | 0.289 ± 0.780 |
| значение <i>p</i> | <i>p</i> = 0.6650 | | <i>p</i> = 0.0344 | |
| МА (нижнечелюстной угол) | 1.243 ± 0.535 | 1.313 ± 0.656 | 0.102 ± 0.072 | 0.232 ± 0.619 |
| значение <i>p</i> | <i>p</i> = 0.6344 | | <i>p</i> = 0.3657 | |



Рис. 3 Ультразвуковая оценка: графики показывают толщину дермы, толщину эпителия до и после лечения – Ультразвуковые изображения до лечения



Рис. 4 Ультразвуковая оценка: графики показывают толщину дермы, толщину эпителия до и после лечения – Ультразвуковые изображения после лечения

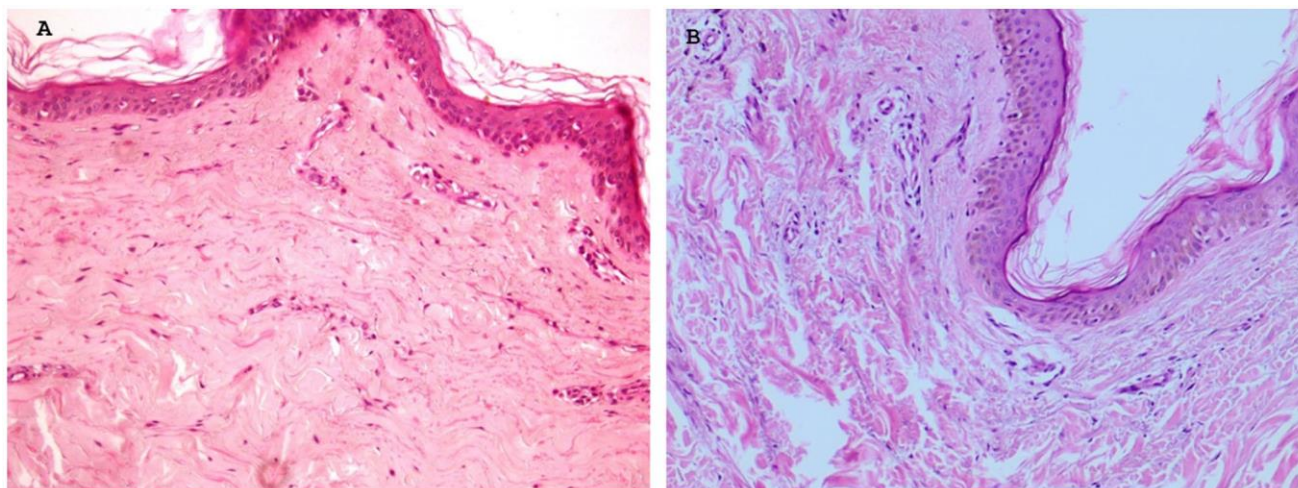


Рис. 5 А Эпидермис был хорошо структурирован В Внешний вид эпидермиса характеризуется повышенной толщиной. Гематоксилин и эозин 30х

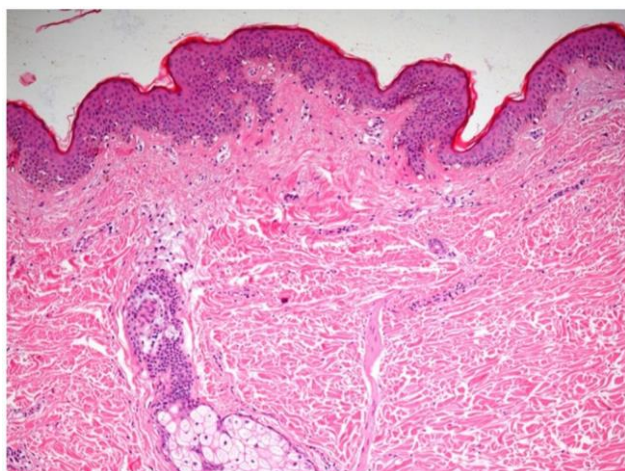


Рис. 6 После лечения наблюдается увеличение количества сосудов, фибробластов и толщины эпителия. Гематоксилин и эозин 20х

Статистический анализ

С помощью клинического программного обеспечения был проведен анализ мощности для определения необходимого количества образцов для получения статистической значимости при количественном анализе числа клеток, включая толщину эпителия, количество сосудов и оценку реакции на эпидермальный фактор роста (EGF). Для выявления причин была использована расчетная модель для дихотомических переменных (принцип "да/нет") с эффектом 90% для испытуемой группы и 10% для контрольной группы, при уровне альфа 0,05 и мощности 80%. Оптимальное количество образцов для анализа было определено как 10 пациентов на группу.

Числовые результаты представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. Сбор и оценку данных исследования проводили с помощью пакета статистических программ Graphpad 6 (Prism, Сан-Диего, США). Для оценки нормальности распределения данных исследования был проведен тест Колмогорова-Смирнова, а для расчета статистической значимости исследуемых переменных был использован t-критерий Стьюдента.

Таблица 2. Сводная информация об эффективности до и после биомодуляционного лечения (среднее значение,

| Группы | Толщина дермы [мм] | | Толщина эпителия [мкм] | | Эпидермальный фактор роста (EGF) ⁺ | | Сосуды | |
|--------------|--------------------|-------|------------------------|--------|-----------------------------------------------|---------|------------|-------|
| | До | После | до | после | до | после | До | После |
| Среднее | 0.9 | 1.32 | 68.21 | 150.01 | 10.5 | 224.0 | 4.0 | 8.75 |
| SD | ± 0.3 | ± 0.3 | ± 1.1 | ± 0.3 | ± 2.22 | ± 12.77 | ± 1.2 | ± 1.4 |
| значение p | $p = 0.0008$ | | $p < 0.01$ | | $p < 0.01$ | | $p < 0.01$ | |

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ультразвуковые исследования

Толщина кожи, эпидермиса и дермы не имела значительной корреляции с лечением НААМ. Анализ данных до и после лечения не выявил статистической разницы в толщине кожи в области скуловой кости, подбородка и угла нижней челюсти. На изображениях, полученных с помощью ультразвукового сканера, четко выделялись три верхних слоя кожи: эпидермис, дерма и подкожно-жировой слой. Данные сведены в таблицу 1 и на рис. 3 и 4.

Гистологическая оценка

До лечения: Биопсия показала снижение числа коллагеновых пучков в ретикулярном слое, а также явные изменения микроциркуляции. Наблюдалось невысокое количество фибробластов и уменьшение эпидермального слоя и соответствующих микроциркуляторных структур (рис. 5B). Патологических воспалительных клеток в эпидермисе и эпителии не наблюдалось (рис. 5A и B). Результаты гистоморфометрии представлены в сопроводительной таблице.

После лечения: Эти результаты наглядно демонстрируют, что инъекционные процедуры НААМ способны стимулировать активность фибробластов, что приводит к выработке ретикулярного коллагена III типа. Эпидермис имел хорошо структурированный вид с увеличенной толщиной (см. рис. 6). Примечательно, что наблюдалась выраженная репликативная активность эпидермиса, подтвержденная положительными иммуногистохимическими реакциями на эпидермальный фактор роста (EGF). Фибробласты проявляли иммуногистохимический ответ в ядрах герминативного слоя эпидермиса (базальный слой) и в некоторых дермальных клетках. Коллагеновые волокна заметно реорганизовались, повысилась микроциркуляция. Содержание коллагеновых волокон в эпидермисе заметно увеличилось, как и толщина эпидермиса, и все это на фоне отсутствия патологических воспалительных клеток. Подробные результаты гистоморфометрии представлены в таблице 2 и на рис. 7 и 8.

Обсуждение

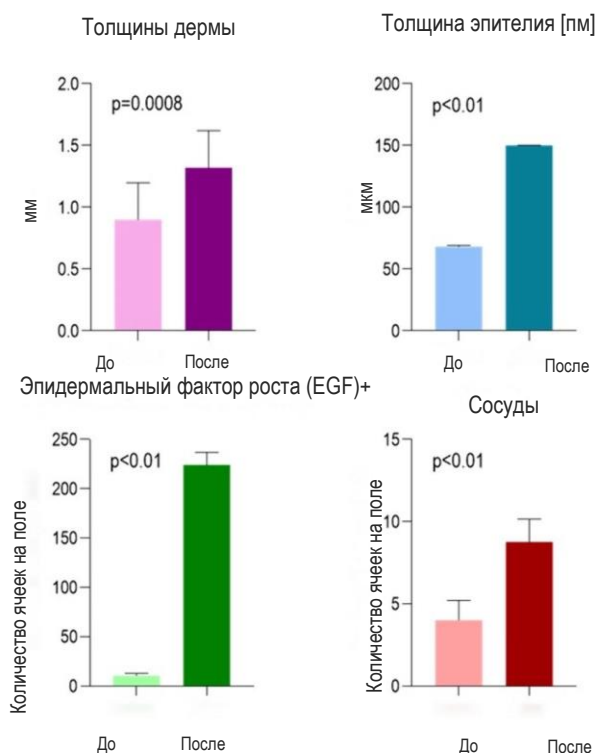


Рис. 7 Гистологическая оценка: графики показывают толщину дермы, толщину эпителия, эпидермальный фактор роста и сосуды до и после лечения

Гистологические результаты данного исследования подтвердили несомненно положительные изменения, в то время как ультразвуковые исследования не выявили существенных различий в результатах до и после. Толщина кожи, эпидермиса и дермы по ультразвуковой оценке заметно не изменилась. Согласно гистологическим данным, роговой слой сохранил свою типичную толщину, хотя зрелая кожа имеет более тонкий эпидермис, чем молодая, что объясняется стягиванием ретикулярного слоя [18]. Эти данные были подтверждены результатами исследований, проведенных с помощью ультразвука, которые показали аналогичные результаты в отношении толщины рогового слоя. Тем не менее, несмотря на многочисленные исследования толщины эпидермиса и дермы, точно отследить возрастные изменения при помощи УЗИ по-прежнему сложно [19].

Цель исследования была достигнута, в частности, продемонстрировано, что введение препаратов, содержащих фрагменты гиалуроновой кислоты размером 20–38 мономеров, в сочетании с аминокислотами приводит к заметному улучшению структуры дермы и эпидермиса в области лица. Введение НААМ оказывает заметное влияние на гидратацию эпидермиса, что свидетельствует об участии повышенного количества влаги в стандартных физиологических процессах.

Гистологическая оценка выявила повышенную активность фибробластов, что привело к выработке ретикулярного коллагена III типа. Кроме того, заметно увеличилось количество кровеносных сосудов, а толщина эпидермиса возросла, что сопровождалось увеличением количества клеток базального слоя. Коллагеновые волокна заметно реорганизовались, а микроциркуляция стала очевидной. Важно отметить, что в эпидермисе значительно увеличилось содержание коллагеновых волокон, а толщина эпидермального слоя выросла без патологического присутствия воспалительных клеток.

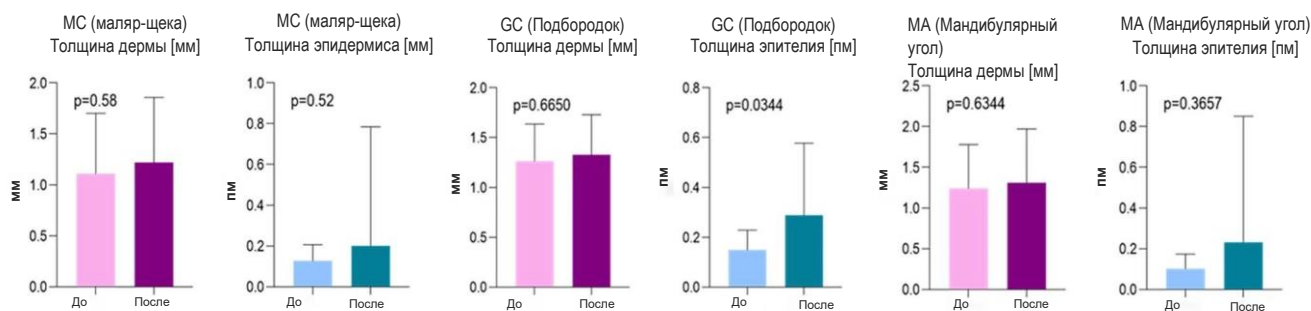


Рис. 8 Ультразвуковое исследование: графики показывают толщину дермы, толщину эпителия до и после лечения

Гиалуронат (НА) широко используется в эстетической медицине для процедур, связанных с увеличением мягких тканей и омоложением кожи [20]. НА естественным образом синтезируется на клеточных мембранах различных типов клеток, включая фибробласты и кератиноциты. Он играет важную роль в поддержании уровня гидратации в соединительных тканях, облегчая миграцию клеток при воспалительных процессах и улучшая заживление ран [21]. Снижение уровня НА связано со старением кожи [22].

В данном исследовании были выбраны фрагменты гиалуроновой кислоты от 20 до 38 мономеров в сочетании с аминокислотами, что обусловлено их значительной ролью в биомодуляции дермы [23-27]. Гиалуроновая кислота является самым распространенным гликозаминогликаном во внеклеточном матриксе и достигает своей максимальной концентрации в высокогидратированных тканях, таких как стекловидное тело и пуповина [28]. Ферментативное расщепление гиалуроната на фрагменты под действием гиалуронидаз стимулирует такие процессы, как ангиогенез, ремоделирование тканей и клеточный обмен [29, 30].

Биологические эффекты фрагментов гиалуроната (ГФ) зависят от длины молекулы. Более длинные ГФ имеют большее количество рецепторов, демонстрируют более высокую avidность, что приводит к усилению связывания [31, 32]. Оптимальной эффективности достигает ГФ, содержащий 20 мономеров, состоящих из двух гексамеров, разделенных октамером (вероятно, в благоприятной конформации, например, геликоидальной), каждый из которых связывается с рецептором CD44 [33]. ГФ, равный или превышающий 30 единиц, не обеспечивает значительного улучшения связывания [34, 35]. Более короткие ГФ проявляют различные эффекты, влияя на модуляцию воспалительных процессов и иммунных реакций путем активации различных рецепторов, включая RHAMM, Toll-подобные рецепторы (TLR), гиалуронановый рецептор для эндоцитоза (HARE) и рецептор эндотелия лимфатических сосудов 1 (LYVE-1) [11, 36-53].

В данном исследовании для стимуляции синтеза белка использовались аминокислоты. Можно предположить, что НААМ оказывает провоспалительный эффект на начальном этапе, который служит функциональной цели в процессе заживления. Важно отметить, что при избыточном закислении тканей аминокислоты не подвергаются химической модификации, а скорее изменяют свои электролитические свойства. Это включает в себя перестановку ионов водорода, в результате чего образуются преимущественно протонированные формы, несущие положительный заряд. Потеря полярности потенциально облегчает их поглощение фибробластами [54]. Постепенная диффузия ионов водорода из кислотного состава впоследствии приводит к постепенному гидролизу фрагментов гиалуроновой кислоты. Таким образом, после преходящей воспалительной фазы дермальность реактивности физиологически модулируется в противовоспалительном направлении, эффективно способствуя восстановлению тканей.

С точки зрения микроциркуляции становится очевидным увеличение как острой, так и хронической перфузионной способности капиллярного русла. Это усиление может быть связано со структурными изменениями в периваскулярных и преадипоцитарных структурах [55], которые, вероятно, связаны с функциональными и биохимическими модификациями, как показывают гистологические исследования. Однако ультразвуковые исследования не выявили существенных различий. Некоторым ограничением данного исследования является то, что использовались относительно низкие частоты ультразвука. Мы не знаем, привело ли бы использование более высоких частот к другим результатам ультразвукового исследования. Благодаря своей неинвазивности, дешевизне и безопасности ультразвук является технологией, которая имеет многообещающие перспективы в антивозрастной и эстетической медицине. Среди ограничений данной работы – те, что связаны с малым количеством пациентов. Расширение этого диапазона должно стать материалом для последующей работы.

На основании этих наблюдений предполагается, что низкомолекулярные фрагменты гиалуроновой кислоты, благодаря стимуляции воспалительного каскада и иммунной системы, снижению экспрессии матриксных металлопротеиназ MMP-1 и MMP-3, а также способности стимулировать ангиогенез и контролировать окислительный стресс, способствуют процессам регенерации тканей в острой фазе. Это наделяет гиалуроновую кислоту свойствами физиологического модулятора. Данное исследование показывает, что введение низкомолекулярной гиалуроновой кислоты и аминокислот способствует гистологически подтвержденным положительным изменениям в дерме лица.

ВЫВОДЫ

В заключение следует отметить, что результаты гистологических исследований показывают, что введение НААМ с помощью инъекционных методик стимулирует фибробласты и приводит к эстетическому улучшению кожи лица пациентов, прошедших лечение. Однако ультразвуковые исследования, проводимые в В-режиме с получением двухмерных изображений в продольном или поперечном направлениях с частотой от 5 до 13 МГц, не выявляют никаких изменений.

Библиография:

1. Russell-Goldman E, Murphy GF (2020) The pathobiology of skin aging: new insights into an old dilemma. *Am J Pathol* 190(7):1356-1369
2. Scarano A, Carinci F, Festa F, Candotto V, Amore R, Lorusso F (2020) Periauricular wrinkles removed with voltaic arc dermabrasion (atmospheric plasma technique). *J Cosmet Dermatol* 19(7):1709-1714
3. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI (2008) Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci* 30(2):87-95
4. Scarano A, Ceccarelli M, Marchetti M, Piattelli A, Mortellaro C (2016) Soft tissue augmentation with autologous platelet gel and p—TCP: a histologic and histometric study in mice. *Biomed Res Int* 2016:2078104
5. Bodnar RJ, Rodgers ME, Chen WCW, Wells A (2013) Pericyte regulation of vascular remodeling through the CXCR3 receptor 3. *ATVB* 33(12):2818-2829
6. Medley SC, Rathnakar BH, Georgescu C, Wren JD, Olson LE (2020) Fibroblast-specific Stat1 deletion enhances the myofibroblast phenotype during tissue repair. *Wound Repair Regen* 28(4):448-459
7. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S et al (1999) CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res* 59(17):4427-4434
8. Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M (2006) Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J Biol Chem* 281(9):5861-5868
9. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M (2003) Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* 278(34):32259-32265
10. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P et al (2000) Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 165(4):1863-1870
11. Scarano A, Sbarbati A, Amore R, Iorio EL, Ferraro G, Marchetti M et al (2024) A clinical investigation of hyaluronic acid fortified with amino acids for addressing facial aging. *Eur J Musculoskelet Dis* 13(1):11-16
12. Bourguignon LYW, Earle C, Shiina M (2017) Activation of matrix hyaluronan-mediated CD44 signaling, epigenetic regulation and chemoresistance in head and neck cancer stem cells. *Int J Mol Sci* 18(9):1849
13. Lagunas-Rangel FA (2023) Naked mole-rat hyaluronan. *Biochimie* 220:58-66
14. Svolacchia F, Svolacchia L, Marchetti M, Prisco C, Inchingolo F, Amuso D et al (2023) Evaluation of the efficacy and safety of hyaluronic acid and supplemented with amino acids, and glutathione or colin, for the prevention and treatment of wrinkles on the face, neck, décolleté and hands. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 27(3 Suppl):99-108
15. Alexander H, Miller DL (1979) Determining skin thickness with pulsed ultra sound. *J Invest Dermatol* 72(1):17-19
16. Alessio F, Scarano A, Valentini G, Boccatonda A, Andreetto L, Vicari S (2024) Ultrasound-guided diagnosis on a parapharyngeal mass. *J Ultrasound*. <https://doi.org/10.1007/s40477-024-00882-z>
17. Scarano A, Sbarbati A, Amore R, Iorio EL, Ferraro G, Lorusso F et al (2021) A new treatment for stretch marks and skin ptosis with electromagnetic fields and negative pressure: a clinical and histological study. *J Cutan Aesthet Surg* 14(2):222-228
18. Rallan D, Harland CC (2003) Ultrasound in dermatology—basic principles and applications. *Clin Exp Dermatol* 28(6):632-638
19. Bagatin E, de Vasconcelo Nasser Caetano L, Soares JLM (2013) Ultrasound and dermatology: basic principles and main applications in dermatologic research. *Expert Rev Dermatol* 8(5):463-477
20. Скарано А, Каринчи Ф, Пьяттелли А (2009) Увеличение губ с помощью нового наполнителя (гель агарозы): трехлетнее наблюдение. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108(2):e11-15
21. Chen WY, Abatangelo G (1999) Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 7(2):79-89
22. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S et al (2018) Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: a review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutraceutical effects. *Int J Biol Macromol* 120:1682-1695
23. Weiss JM, Renkl AC, Ahrens T, Mai BH, Denfeld RW, Schopf E et al (1998) Activation-dependent modulation of hyaluronate-receptor expression and of hyaluronate-avidity by human monocytes. *J Invest Dermatol* 111(2):227-232
24. Tzircotis G, Thome RF, Isacke CM (2005) Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *J Cell Sci* 118(21):5119-5128
25. Laurent TC, Fraser JR (1992) Hyaluronan. *FASEB J* 6(7):2397-2404
26. Toole BP (1997) Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 242(1):35-40
27. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61(7):1303-1313
28. Shiedlin A, Bigelow R, Christopher W, Arbabi S, Yang L, Maier RV et al (2004) Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidemicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromol* 5(6):2122-2127
29. Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85(8):699-715
30. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S (1985) angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228(4705):1324-1326
31. Bajorath J (2000) Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 39(2):103-111
32. Turley EA, Belch AJ, Poppema S, Pilarski LM (1993) Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes. *Blood* 81(2):446-453
33. Nagano O, Saya H (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 95(12):930-935
34. Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M (1994) A novel ligand for CD44 is sulfated proteoglycan. *Int Immunol* 6(4):655-660
35. Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Vassalli P, Stamenkovic I (1997) Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev* 11(8):996-1007
36. Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F (2003) Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem* 278(32):29420-29434
37. Tög C, McCarthy JB, Yazdani A, Turley EA (2014) Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the “cancerization” of stromal tissues. *Biomed Res Int* 2014:103923
38. SMejkalova D, Huerta Angeles G, Ehlova T (2015) Hyaluronan (hyaluronic acid): a natural moisturizer for skin care. pp 605-22
39. Tosti A, Padova MPD (2007) Atlas of mesotherapy in skin rejuvenation, 1st edn. CRC Press, Boca Raton
40. Prikhnenko S (2015) Polycomponent mesotherapy formulations for the treatment of skin aging and improvement of skin quality. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 8:151-157
41. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221-233
42. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K et al (2008) Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 16(2):274-287
43. Kaya G, Kaya A, Saurat JH (2019) Induction of hyaluronan by topical hyaluronate fragments: results in superficial filling of the skin complementary to hyaluronate filler injections. *Dermatopathology* 6(2):45-49
44. Kaya G, Tran C, Sorg O, Hotz R, Grand D, Caraux P et al (2006) Hyaluronan fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism. *PLoS Med* 3(12):e493
45. Takema Y, Hattori M, Aizawa K (1996) The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J Dermatol Sci* 12(1):56-63
46. Yamane T, Konno R, Iwatsuki K, Oishi Y (2020) Negative effects of a low-quality protein diet on wound healing via modulation of the MMP2 activity in rats. *Amino Acids* 52(4):505-510
47. Murakami H, Shimbo K, Inoue Y, Takino Y, Kobayashi H (2012) Importance of amino acid composition to improve skin collagen protein synthesis rates in UV-irradiated mice. *Amino Acids* 42(6):2481-2489
48. Vrhovski B, Weiss AS (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 258(1):1-18
49. Qin Z, Fisher GJ, Voorhees JJ, Quan T (2018) Actin cytoskeleton assembly regulates collagen production via TGF—p type II receptor in human skin fibroblasts. *J Cell Mol Med* 22(9):4085-4096
50. Aimes RT, Zijlstra A, Hooper JD, Ogbourne SM, Sit ML, Fuchs S et al (2003) Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 89(3):561-572
51. Kerksick C, Willoughby D (2005) The antioxidant role of glutathione and n-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr* 2(2):38
52. Murakami H, Shimbo K, Takino Y, Kobayashi H (2013) Combination of BCAAs and glutamine enhances dermal collagen protein synthesis in protein-malnourished rats. *Amino Acids* 44(3):969-976
53. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990
54. Hohenester E, Engel J (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 21(2):115-128
55. Britton K, Fox C (2011) Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clin Lipidol* 6(1):79-91