

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TOPORIŠ

## DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM  
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TOPORIŠ

**UPORABA BOTULINSKEGA TOKSINA IN  
DERMALNIH POLNIL V LEHOTNI KIRURGIJI**

**USE OF BOTULINUM TOXIN AND DERMAL  
FILLERS IN AESTHETIC PLASTIC SURGERY**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag.farm.

## **Zahvala**

Zahvaljujem seizr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. za nasvete in pomoč pri pisanju diplomske naloge. Prav tako tudi mag. Francu Planinšku, dr. med. za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete.

Zahvaljujem se družini in prijateljem, predvsem pa Mitji, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me podpirali.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Ljubljana, 2014

Janja Toporiš

# VSEBINA

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                                                                | 1  |
| 1. 1. Koža in staranje.....                                                                                                  | 1  |
| 1. 2. Botulinski toksin (BTX) .....                                                                                          | 2  |
| 1. 2. 1. Zgodovina .....                                                                                                     | 3  |
| 1. 2. 2. Botulinski pripravki .....                                                                                          | 3  |
| 1. 3. Dermalna polnila .....                                                                                                 | 5  |
| 1. 3. 1. Začasne biorazgradljive spojine .....                                                                               | 5  |
| 1. 3. 2. Semipermanentne biorazgradljive snovi.....                                                                          | 8  |
| 1. 3. 3. Permanentna nerazgradljiva polnila .....                                                                            | 10 |
| 1. 3. 4. Avtologna maščoba .....                                                                                             | 13 |
| 1. 4. Celične terapije.....                                                                                                  | 14 |
| 1. 4. 1. Celična terapija z injiciranjem gojenih fibroblastov.....                                                           | 14 |
| 1. 4. 2. Matične celice.....                                                                                                 | 14 |
| 2. NAMEN DELA .....                                                                                                          | 16 |
| 3. METODA.....                                                                                                               | 16 |
| 3. 1. Pregled literaturnih podatkov.....                                                                                     | 16 |
| 3. 2. Pogovor z zdravnikom, specialistom plastične kirurgije.....                                                            | 16 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....                                                                                                | 17 |
| 4.1. Pregled podatkov iz literature .....                                                                                    | 17 |
| 4. 1. 1. Mehanizem delovanja BTX .....                                                                                       | 17 |
| 4. 1. 2. Terapevtski indeks BTX .....                                                                                        | 18 |
| 4. 1. 3. Odnos med odmerkom in odzivom BTX.....                                                                              | 20 |
| 4. 1. 4. Imunogenost BTX .....                                                                                               | 20 |
| 4. 1. 5. Študija primerjave pripravkov Dysport® in Botox® pri odpravljanju čelnih,<br>glabelarnih in periorbitalnih gub..... | 21 |
| 4. 2. Biorazgradljiva dermalna polnila.....                                                                                  | 22 |
| 4. 2. 1. Antigenost oziroma imunogenost kolagena .....                                                                       | 22 |
| 4. 2. 2. Tehnike injiciranja raztopin kolagena in hialuronske kisline (HA) .....                                             | 26 |
| 4. 2. 3. Neželene reakcije po uporabi HA.....                                                                                | 28 |
| 4. 2. 4. Biostimulativni učinek polnil .....                                                                                 | 29 |
| 4. 3. Semipermanentna in trajna polnila.....                                                                                 | 29 |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 4. 3. 1. Premikanje in razpadanje hidrogelov .....                   | 29 |
| 4. 3. 2. Reakcija na tujke .....                                     | 29 |
| 4. 3. 3. Toksičnost hidrogelov.....                                  | 30 |
| 4. 4. Uporaba avtologne maščobe .....                                | 31 |
| 4. 5. Celične terapije.....                                          | 32 |
| 4. 5. 1. Injiciranje predhodno gojenih avtoloških fibroblastov ..... | 32 |
| 4. 5. 2. Matične celice iz maščobnega tkiva .....                    | 32 |
| 4. 6. Pogovor s specialistom .....                                   | 33 |
| 5. SKLEP .....                                                       | 36 |
| 6. LITERATURA .....                                                  | 38 |

## SEZNAM SLIK

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Primerjava mlade in stare kože.....                            | 1  |
| Slika 2: Izguba adipoznega tkiva zaradi staranja.....                   | 2  |
| Slika 3: Kemijska struktura hialuronske kisline .....                   | 8  |
| Slika 4: Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva .....             | 15 |
| Slika 5: Vpliv BTX na sproščanje ACh.....                               | 18 |
| Slika 6: Obrazne gube .....                                             | 22 |
| Slika 7: Različne antigenske determinante kolagena.....                 | 23 |
| Slika 8: Odstranitev telopeptidov iz molekule kolagena s pepsinom ..... | 25 |
| Slika 9: Različne tehnike injiciranja polnil .....                      | 27 |
| Slika 10: Mišice zgornjega dela obraza .....                            | 34 |

## POVZETEK

Stremenje k popolnemu videzu in približevanje lepotnim idealom je danes nekaj povsem običajnega. Vsak si želi mladostnega videza, vendar pa nam čas ne prizanaša. Staramo se in pri tem naša koža ni izjema. To je vidno predvsem na obrazu, ki je nenehno izpostavljen zunanjim vplivom, zato so na njem znaki staranja tudi najbolj izraziti. Za izboljšanje videza kože so razvili različne postopke pomlajevanja.

Tako je botulinski toksin, ki ga proizvaja bakterija *Clostridium botulinum*, namenjen predvsem glajenju obraznih, mimičnih gub, kot so glabelarne gube, gube na čelu in tako imenovane račje tačke. Njegova uporaba v estetske namene je danes zelo razširjena. Z injiciranjem majhnih količin botulina (25 do 70 enot) v mišico preprečimo njeno krčenje, s tem pa se videz gub omehča. Uporablja se predvsem pri osebah med 30. in 50. letom starosti, pri katerih gube še niso pregloboke. Vsakih nekaj mesecev je potrebno postopek ponoviti, saj njegov učinek pojenja. Neželeni pojavi so zelo redki in k sreči kratkotrajni, saj izginejo že v nekaj tednih. Uporaba botulinskega toksina je varna in učinkovita in temelji na številnih raziskavah.

Poleg botulina uporabljajo za odpravljanje gub tudi različna dermalna polnila. Z njimi nadomestimo izgubljeni volumen tkiva, ki je lahko posledica staranja ali bolezni. Dermalna polnila so izdelana iz različnih materialov. Nekatera pridobivamo iz naravnih, tudi človeških virov, kot na primer maščobo, odvzeto z drugega dela telesa. Ostali materiali pa so sinteznega izvora. Glede na učinek trajanja njihovega delovanja jih delimo na začasna (kolagen, hialuronska kislina), semipermanentna (poli-L-mlečna kislina) in permanentna oz. trajna polnila (silikon). Na splošno lahko trdimo, da je njihova uporaba varna in učinkovita.

**Ključne besede:** *botulinski toksin, nekirurško pomlajevanje obraza, hialuronska kislina, kolagen*

## ABSTRACT

Nowadays, yearning for perfection has become quite common. Everyone wants a youthful appearance, but as time passes, we are getting older, and so does our skin. Prominent indications of aging are typical for facial skin, which is constantly exposed to environmental impacts. That is, why different rejuvenation procedures were developed, which can improve the appearance of aged skin.

Botulinum toxin is used to smooth facial, mimic wrinkles, such as forehead furrows, frown lines, and crow's feet. This substance is made by the *Clostridium botulinum* bacterium. It is widely used for aesthetic purposes. Botulinum causes muscles relaxation. To smooth wrinkles, tiny amounts of the substance (25 to 70 units) are injected into spots, where the muscles contract. This blocks the muscles from contracting, thus reducing wrinkles. Botulinum is recommended for 30 to 50 years old persons, whose wrinkles are just starting to form and are not too deep yet. Botulinum does not work for deep wrinkles, which are common in older persons. It is necessary to repeat the procedure every few months, because the effects wear off. Its adverse events are very rare, short-lived and disappear already within a few weeks. Being one of the most researched products, the use of botulinum is safe and effective.

As an additional treatment to botulinum toxin, different dermal fillers are used. Injectable skin fillers represent a common means of reducing deep wrinkles and folds, as they can replace the loss of tissue volume. Dermal fillers are made of different materials. Some of them originate from human sources, such as fat taken from appropriate parts of the body. Other materials are synthetic. Depending on how long their effects last, fillers are divided into temporary (collagen, hyaluronic acid), semi-permanent (poly-L-lactic acid), and permanent (silicone) types. Dermal filler injections are generally safe and effective.

**Keywords:** *botulinum toxin, non-surgical facial rejuvenation, hyaluronic acid, collagen*

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACh – acetilholin

BTX – botulinski toksin

ED<sub>50</sub> – odmerek, ki povzroči učinek pri 50% testiranih organizmov

EMA – etilmetakrilat

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila

GMP – dobra proizvodna praksa

GTA – glutaraldehid

HA – hialuronska kislina

hATDSC – izvirne celice, pridobljene iz človeškega adipoznega tkiva

HEMA – hidroksietilmetakrilat

KHA – kalcijev hidroksiapatit

KMC – karboksimetilceluloza

LD<sub>50</sub> – odmerek, ki povzroči v določenem času smrt 50% živali

MM – molekulska masa

MMC – mezenhimske matične celice

NASHA – stabilizirana hialuronska kislina, biosinteznega izvora

NPK – nevrotoksinski proteinski kompleks

PAAG – poliakrilamidni gel

PLLA – poli-L-mlečna kislina

PMMA – polimetilmetakrilat

PRP – s trombociti obogatena plazma

Pt – protitelesa

PVH – polivinil hidroksid

PVP – polivinilpirolidon

SNAP-25 – na sinaptosom vezan protein teže 25 kDa

SNARE – receptor za vezavo topnega dejavnika občutljivega na N-etilmalemid

SVF – frakcija stromalnih vaskularnih celic

TCP – trikalcijev fosfat

TI – terapevtski indeks (LD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub>)

VAMP – z vezikli povezan membranski protein

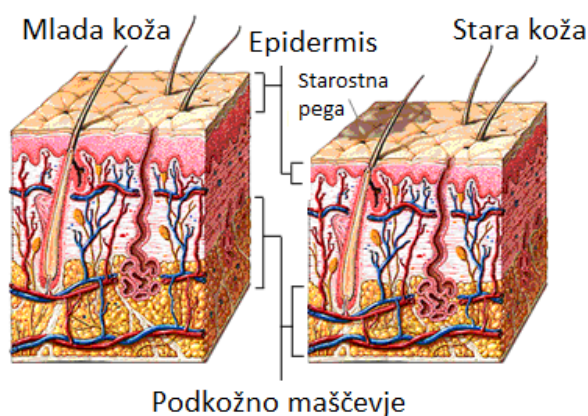


# 1. UVOD

## 1. 1. Koža in staranje

Spremenjen videz kože na obrazu je glavni vidni pokazatelj staranja. Številni zunanji in notranji dejavniki vplivajo na staranje kože in s tem na njeno spremenjeno teksturo, povečano resorpcijo kostnine in izgubo adipoznega tkiva. Zaradi ponavljajočih se gibov obraznih mišic pride do nastanka gub (Slika 1). Postaran obraz ima izrazite prečne gube na čelu, vertikalne gube v glabeli (področje med obrvmi), nazolabialne gube ter gubice okoli ust in oči.

Proces staranja se odraža v vseh plasteh kože:

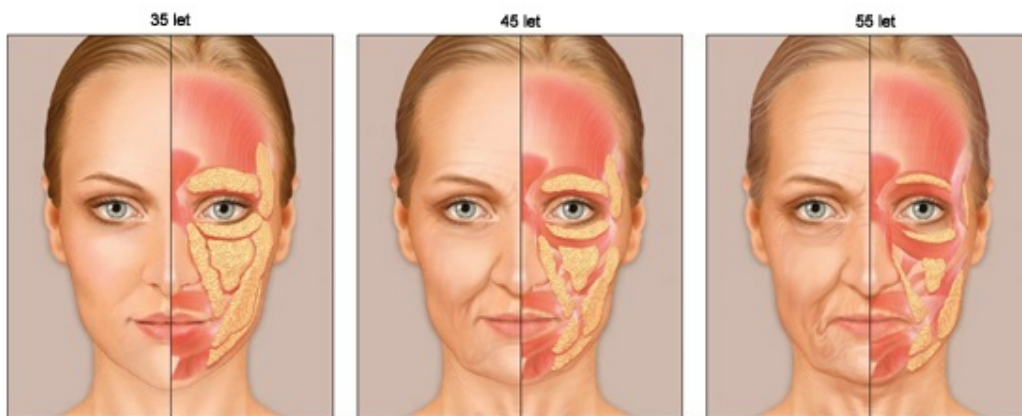


Slika 1: Primerjava mlade in stare kože (prirejeno po 1)

- Podkožje je najgloblja plast kože, sestavljena iz maščobnega tkiva, ki podpira zgornji plasti kože. S staranjem se maščevje obraza premika, predvsem v predelu spodnje veke, glabele, senc, lic, spodnje čeljusti ter ust (Slika 2).
- Srednja plast predstavlja dermis oz. usnjico. Vsebuje kolagen in elastin, ki dajeta koži obliko in prožnost. V mladi koži se oba nenehno obnavljata. V starejši pa se zaradi staranja fibroblastov zmanjša tudi njuna proizvodnja, kar posledično vodi v nastanek finih linij in gub. V usnjici se nahajajo tudi kapilare, lasni mešički, žleze znojnice in lojnice (Slika 1). Slednje postanejo manj aktivne, koža pa posledično bolj suha in nagnjena k nastajanju tankih linij.
- V epidermisu oz. povrhnjici pride do atrofije in zmanjšane sposobnosti obnove celic. V mladi koži se celice obnovijo približno vsakih 15 do 30 dni, starejša pa potrebuje za ta

proces dvakrat več časa. Koža je tudi suha zaradi manjše količine epidermalnih lipidov, odgovornih za zadrževanje vode.

Pri pomlajevanju obraza se lahko poslužujemo raznovrstnih neinvazivnih tehnik, kot so uporaba botulinskega toksina (BTX), polnil s hialuronsko kislino, kolagenom in drugimi poznanimi polimeri.



Slika 2: Izguba adipoznega tkiva zaradi staranja (prirejeno po 2)

## 1. 2. Botulinski toksin (BTX)

Botulinske nevrotoksine sintetizira anaerobna, gram pozitivna bakterija *Clostridium botulinum*. Gre za kompleksno zmes proteinov, ki vsebuje botulinske in druge, netoksične proteine (hemaglutininski in/ali nehemaglutininski proteini).

Poznamo osem različnih serotipov BTX: A, B, C1, C2, D, E, F in G (3).

Vsak od njih preprečuje sproščanje acetilholina v sinaptično špranjo, se pa med seboj razlikujejo v kemični strukturi, velikosti in mehanizmih delovanja. Na človeški živčni sistem vpliva le 5 omenjenih serotipov A, B, E, F, G, medtem ko tipa C in D ne. Serotipa A in B pa sta edina komercialno dostopna (3).

Botulinski toksin je polipeptid z velikostjo 150 kDa, zgrajen iz lahke (50 kDa) in težke (100 kDa) verige, ki sta med seboj kovalentno povezani z disulfidno vezjo. Težka veriga je pomembna za usmerjanje in vezavo BTX na specifične tipe končnih delov aksonov. Toksin po vezavi vstopa v nevron z endocitozo, nato pa njegova lahka veriga, ki je proteaza, razgrajuje fuzijske proteine SNARE v nevro-mišičnem stiku ter na ta način prepreči vezavo veziklov na membrano in s tem sproščanje ACh (4).

Med sintezo botulinskega nevrotoksinskega kompleksa se ta polipeptid združi z ne-nevrotoksičnimi proteini. Nastane nevrotoksinski kompleks, velik približno 500 kDa. Ne-nevrotoksinski dodatni proteini služijo kot stabilizatorji molekule botulinskega toksina, ki je sicer zelo občutljiva in krhka, ko jo rekonstituiramo za uporabo (5).

### **1. 2. 1. Zgodovina**

Bakterijo *Clostridium botulinum* je prvi odkril in izoliral profesor Van Ermengem, leta 1895. Leta 1944 jo je Schantz ugotovil, izoliral pa je tudi njen toksin. Burgen je pet let kasneje odkril, da BTX blokira nevromuskularni prenos (6).

Dr. Brooks je leta 1950 lociral mesto na motoričnih živčnih končičih, kjer se sproščanje acetilholina lahko blokira (3).

Prvič sta uporabo BTX za kozmetične namene opisala zakonca Carruthers.

Pri zdravljenju pacienta z blefarospazmom je dr. Carruthers opazila, da se je po uporabi BTX videz glabelarnih gub zmanjšal. S kliničnimi poskusi sta nadaljevala in rezultati so bili presenetljivi. Glabelarne linije so se namreč zmanjšale pri 16 od 17 pacientov, in sicer v obdobju med 3 in 11 meseci (5).

Njuna dognanja so vzpodbudila številne raziskovalce k nadaljnjemu preizkušanju delovanja BTX, in sicer predvsem za odpravljanje račjih tačk, prečnih linij na čelu in podbradkov. Sprva nobena od tovrstnih kozmetičnih uporab ni bila odobrena s strani FDA, zato je bila njihova raba nenamenska. Šele aprila leta 2002 je FDA odobrila rabo preparata Botox® za nekirurško zmanjševanje glabelarnih gub. Odobritev je temeljila na dvojno slepi, randomizirani študiji, ki so jo izvedli na 553 pacientih (5).

### **1. 2. 2. Botulinski pripravki**

Prvi botulinski nevrotoksinski pripravek Botox® so razvili v terapevtske namene v poznih 1970-ih. Od takrat se je število komercialno dostopnih pripravkov precej povečalo. Večina jih temelji na toksinskem serotipu A, le eden pa na serotipu B. Učinke ostalih serotipov E, F in C so tudi preučevali na ljudeh, vendar pa nikoli niso prišli v komercialno uporabo.

Ker gre za biološke produkte, je njihove proizvodne procese praktično nemogoče standardizirati. Vsak pripravek proizvedejo z edinstvenim procesom ne glede na to, da gre za enake toksinske serotipe (3).

Proizvodnja se prične s sintezo nevrotoksinskega proteinskega kompleksa (NPK) bakterije *C. botulinum*. Njeni različni sevi določajo serotip, samo velikost nevrotoksinskega

proteinskega kompleksa, proteolitično aktivnost in druge dejavnike. V tem koraku proteolitična bakterijska vrsta aktivira enoverižno nevrotoksinsko molekulo. Delež aktivacije nevrotoksina pa je odvisen od seva bakterije. Botulinski toksin tipa A pridobivajo iz  $\approx 95$ -odstotno aktiviranih kultur. Ker pa imajo nekateri sevi bakterij naravno nizek odstotek aktiviranih toksinov, kot npr. sevi, ki proizvajajo tip B, je proces proizvodnje spremenjen tako, da samo aktivacijo povečajo na približno 80%. Visok delež aktivnih nevrotoksinov v pripravku je pomemben, saj lahko neaktivni enoverižni nevrotoksini sicer povečajo skupno vsebnost proteinov, pri čemer pa ne povečajo aktivnosti oz. učinkovitosti produkta. Tudi ostali dejavniki, ki jih določa sam sev bakterije, lahko pomembno vplivajo na klinični profil BTX (3).

Nastali aktivirani NPK nato izolirajo iz bakterijskega medija in prečistijo z uporabo naj sodobnejših farmacevtskih tehnik, kot sta centrifugiranje ali kolonska kromatografija (7).

Pridobljen mora biti v skladu z dobro proizvodno prakso (GMP). Botulinski toksin tipa A, ki se nahaja v preparatu Botox<sup>®</sup>, vsebuje 900 kDa velik NPK, tisti v pripravku Dysport<sup>®</sup> pa med 500 in 900 kDa. Slednji vsebuje heterogeno mešanico kompleksov (3).

V pripravkih, ki vsebujejo toksinski serotip tipa B, pa so kompleksi NPK veliki od 500-700 kDa (3).

Večina komercialno dostopnih pripravkov BTX vsebuje ohranjeno naravno strukturo proteinskega kompleksa, vključno z nevrotoksinom in nanj vezanimi ne-nevrotoksinskimi proteini.

Pripravkom dodajajo tudi pomožne snovi, s katerimi stabilizirajo nevrotoksin med razredčevanjem in sušenjem. Mednje sodijo: NaCl, serumski albumin, laktoza, saharoza. Edina sestavina, ki je skupna vsem pripravkom, je serumski albumin, ki ga dodajajo v različnih količinah. V eni izmed kliničnih študij so ugotovili, da lahko s povečevanjem količine albumina spremenimo učinek in moč pripravka Dysport<sup>®</sup>. Poleg tega so v predklinični študiji pokazali, da izbor topil za rekonstitucijo različno vpliva na biološki učinek Dysport<sup>®</sup>-a in Botox<sup>®</sup>-a.

Po dodatku pomožnih snovi morajo produkt stabilizirati. Vsakega od komercialnih pripravkov tako stabilizirajo s pomočjo različnih metod: z vakuumskim sušenjem, freeze drying ali liofilizacijo. Preparate, ki vsebujejo toksin tipa B, stabilizirajo v pufrski raztopini z nizko vrednostjo pH (5,6). Možno je, da je ravno to vzrok za bolečine ob njegovem injiciranju.

Končni korak v proizvodnji je testiranje učinkovitosti BTX. Biološke proizvode odmerjajo v enotah biološke aktivnosti, ki niso odvisne od mase njihovih sestavin. Tako odmerki variirajo med izdelki z različnimi toksinskimi serotipi, kot tudi med tistimi z enakimi serotipi. Zato regulatorne agencije v Evropi, ZDA in drugod zahtevajo, da so na ovojninah navedeni podatki o specifičnosti enot glede na preparat, in sicer tako, da se jih ne da zamenjati z drugimi preparati. Razlike v učinkovitosti enot so torej lahko posledica vrste serotipa, rekonstitucijskega topila ali drugih dejavnikov (3).

### **1. 3. Dermalna polnila**

Ideja o pomlajevanju z injiciranjem dermalnih polnil vsekakor ni nova. Vrsto let so uporabljali substance kot so mineralno olje in tekoči silikon, da bi izboljšali nepopolnosti mehkega tkiva. Zaradi pogostih težav, vključno s kroničnimi edemi, limfadenopatijo, nastankom granulomov, brazgotinjenjem in nastankom ulceracij, so uporabo večine omenjenih substanc opustili. Ker pa je vse več ljudi iskalo nekirurške načine pomlajevanja kože obraza, se je zanimanje za dermalna polnila ponovno zelo povečalo.

Poleg uporabe človeškega in govejega kolagena je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) za estetske namene odobrila tudi različna polnila, ki vsebujejo hialuronsko kislino (HA). Za povečevanje volumna so se tako na tržišču pojavili tudi proizvodi, ki stimulirajo aktivnost fibroblastov, npr. poli-L-mlečna kislina (PLLA) in mikrokroglice kalcijevega hidroksiapatita. Pred kratkim je FDA odobrila tudi uporabo permanentnega polnila, ki vsebuje mikrokroglice PMMA, in sicer za odpravljanje nazolabialnih gub.

Dermalna polnila delimo glede na njihove fizikalne lastnosti in na trajanje njihovega učinka. Tako ločimo tri podskupine polnil: začasna biorazgradljiva (njihov učinek traja manj kot 1 leto), semipermanentna biorazgradljiva (1-2 leti) in permanentna nebiorazgradljiva (več kot 2 leti) (5).

#### **1. 3. 1 Začasne biorazgradljive spojine**

Z njimi povečamo volumen predelov, v katere jih injiciramo, njihov učinek pa običajno traja manj kot 1 leto. V zadnjem obdobju je na tem področju prišlo do velikega premika, in sicer od uporabe kolagena, do aplikacije HA. Pred spojinami s kolagensko osnovo, predvsem pred govejim kolagenom, ima HA to prednost, da je pojavnost alergijskih reakcij

nanj bistveno manjša. Poleg tega pa je tudi njen učinek daljši kot pri kolagenu. Povpraševanje po govejem kolagenu je močno upadlo, saj so pred njegovo uporabo nujna predhodna testiranja imunogenosti. Človeški kolagen pa še vedno ostaja odlično sredstvo za odpravljanje vodoravnih gub na čelu in za povečevanje volumna ustnic. Hialuronska kislina je v primerjavi s kolagenom primernejša za povečevanje nazolabialnega volumna, uporabna pa je tudi za korekcijo volumna ustnic. Obe polnili se torej dopolnjujeta in skupaj dajeta dobre rezultate.

### **1. 3. 1. 1. Kolagen**

Kolagen je najbolj zastopan protein vezivnega tkiva. Večina človeškega dermisa je zgrajena iz kolagenskih proteinov. Ti so sestavljeni iz treh manjših molekul oz. posameznih polipeptidnih alfa verig. Vsaka od teh vsebuje približno 1.000 aminokislin, z glicinom na vsakem tretjem mestu. Kar 96% kolagena ima obliko vijačnic, ki so pripete na telopeptide tako na amino kot na karboksilnem koncu. V človeškem telesu so molekule kolagena prečno premrežene in tvorijo kolagenske fibrile, te se združujejo v kolagenska vlakna. Poznamo več vrst človeškega kolagena. Med seboj se razlikujejo glede na kombinacije alfa vijačnic. Človeško telo vsebuje okvirno 80% kolagena tipa I in 20% kolagena tipa III (5).

#### **• Goveji kolagen**

Je imunogen, zato moramo pred njegovo aplikacijo izvesti kožno testiranje. Prav to je vzrok za upad njegove uporabe. V ZDA je goveji kolagen dostopen pod tržnima imenoma Zyderm® in Zyplast®.

Kolagenski implantati Zyderm® vsebujejo 95-98% kolagena tipa I, preostali del pa predstavlja kolagen tipa III. Kolagenski proteini so suspendirani v s fosfatom pufrani fiziološki raztopini, z dodanimi 0,3% lidokaina. Zyderm® 1 vsebuje 3,5% in Zyderm® 2 pa 6,5% kolagena. Tudi v Zyplast®-u je 3,5% govejega kolagena, le da je v tem primeru ta rahlo premrežen. To dosežejo z dodatkom 0,0075% glutaraldehida, ki kovalentno poveže proste lizinske ostanke v kolagenskih molekulah. Zato je Zyplast® odpornejši na proteolitično razgradnjo, manj imunogen kot Zyderm® in primernejši za popravilo globljih konturnih defektov (5).

Ker je kolagen pridobljen iz govedi, obstaja možnost prenosa bolezni. Zato živali gojijo na oddaljenih lokacijah, kjer je možnost njihove okužbe s spongiformno encefalopatijo kar najmanjša. O tovrstnem prenosu bolezni na človeka ni podatkov.

Zyderm<sup>®</sup> in Zyplast<sup>®</sup> sta dostopna v obliki predhodno napolnjenih brizg, ki jih moramo shranjevati pri nizki temperaturi (4°C). Le tako lahko fibrile kolagena ostanejo fluidne in majhne. Po aplikaciji se njegova struktura zaradi temperature telesa spremeni in preide v gel (5).

Manj pogosto se uporablja prašičji kolagen, in sicer v pripravku Permacol<sup>®</sup> in Evolence<sup>®</sup> (6).

#### • Človeški kolagen

Na voljo sta tudi dva kolagenska pripravka, pridobljena iz kože umrlih darovalcev, in sicer CosmoDerm<sup>®</sup> in CosmoPlast<sup>®</sup>. To sta edini, s strani FDA odobreni polnili, ki vsebujeta bioinženirsko predelan človeški kolagen tipa I/III, v s fosfatom pufrani fiziološki raztopini, z dodatkom 0,3% lidokaina (5).

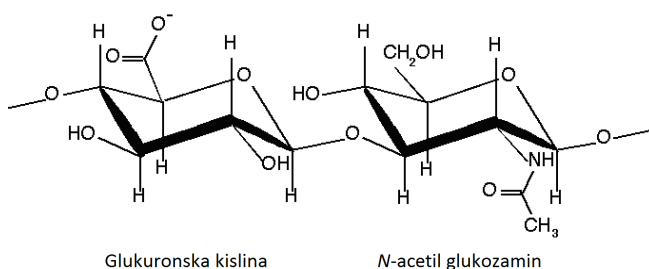
V nasprotju z govejim kolagenom, pri CosmoDerm<sup>®</sup>-u in CosmoPlast<sup>®</sup>-u predhodna kožna testiranja niso potrebna, saj je pojavnost alergij zelo majhna (1,3%). CosmoDerm<sup>®</sup> 1 in 2 sta analogna Zyderm<sup>®</sup>-u 1 in 2, CosmoPlast<sup>®</sup> pa Zyplast<sup>®</sup>-u. CosmoDerm<sup>®</sup> 1, 2 in CosmoPlast<sup>®</sup> vsebujejo prečiščen kolagen, brez prisotnosti človeških fibroblastov (5).

#### • Avtologni kolagen

Največja prednost uporabe avtolognih bioloških materialov je njihova varnost. Isolagen<sup>®</sup> je kultura avtolognih (pacientovih) kožnih fibroblastov. Njegovo uporabo omejuje čas, ki je potreben za kultiviranje. Autologen<sup>®</sup> pa je kolagen za injiciranje, pridobljen iz lastne kože pacienta (8).

### 1. 3. 1. 2. Hialuronska kislina (HA)

Gre za naravno prisotno sestavino v dermisu, ki je po kemizmu glikozaminoglikan in je glavna sestavina vezivnega tkiva. Je polimer, sestavljen iz *D*-glukuronske kisline in *N*-acetil glukozamina (Slika 3). Molekule HA v koži vežejo vodo in s tem ustvarijo ustrezen volumen medceličnine. Količina HA v koži z leti upada, to pa ima za posledico zmanjšano dermalno hidratacijo in posledično povečano gubanje (5).



**Slika 3: Kemijska struktura hialuronske kisline (povzeto po 9)**

Derivati HA se med seboj razlikujejo glede na izvor (bakterijski ali ptičji), koncentracijo, velikost makromolekule, premreženost, tip spojin, uporabljenih za premreženje in viskoznost (5).

Komercialno sta na voljo dve kategoriji polnil s HA. V prvi so tista, ki vsebujejo HA živalskega izvora (Hylaform<sup>®</sup>), in sicer pridobljeno iz petelinjega grebena, druga pa tista, v katerih se nahaja HA biosinteznega izvora (Restylane<sup>®</sup> in Juvéderm<sup>®</sup>), pridobljena s fermentacijo v bakterijah *Streptococcus*. Juvéderm<sup>®</sup> in Restylane<sup>®</sup> vsebujeta stabilizirano HA (NASHA).

Uporaba HA pri človeku ne izzove imunskih reakcij, zato predhodna testiranja kože niso potrebna. Ne glede na način pridelave, pa je nepremrežena oblika molekule HA podvržena hitremu razpadu, in sicer že v 24-48 urah. Da zagotovimo njeno podaljšano klinično učinkovitost, moramo HA stabilizirati. To dosežemo s premreževanjem molekule. Čvrstost gela iz HA pa lahko tudi zmanjšamo, in sicer z dodajanjem nepremrežene oblike HA k premreženi (6).

### 1. 3. 2. Semipermanentne biorazgradljive snovi

Prednost teh spojin je predvsem v njihovem dolgotrajnejšem polnilnem učinku, ki lahko traja tudi od 1 do 2 let. Njihove slabosti in omejitve pa so večji stroški, težavna aplikacija, več posegov, večja pojavnost hudih komplikacij (nastanek granuloma in nodul) (5).

#### 1. 3. 2. 1. Fascian<sup>™</sup>

Gre za liofolizirane delce človeških ovojnic (fascij) stegenskih mišic umrlih darovalcev.

Nasprotno od topnih oblik kolagena je Fascian<sup>™</sup> netopen in stimulira nastajanje lastnega kolagena v tkivu. Ta proces, ki ga izzove vstavljeni stimulirajoči material, imenujemo rekologenacija. S histološkimi študijami so potrdili, da se majhni delci ovojnic, ki jih



vstavijo intradermalno, tukaj predelajo kot tuje tkivo in se nato sčasoma nadomestijo z lastnim naravnim kolagenom.

Ker je Fascian™ pridobljen iz trupel umrlih oseb, morajo biti darovalci ustrezno testirani na povzročitelje bolezni.

Velikosti delcev v pripravku so različne. Naravni kolagen lažje zamenja večje delce, kot manjše. Pri uporabi večjih delcev je absorpcija manjša, učinek pa boljši in trajnejši. Po drugi strani pa uporaba manjših delcev zmanjša mašenje igle med injiciranjem, poleg tega lahko uporabimo igle z manjšim premerom. V večini primerov večje delce injicirajo subdermalno, manjše pa intradermalno.

Učinkovitost Fascian™-a z velikimi delci lahko primerjamo z avtologno maščobo, saj so znaki in trajanje njegovega učinka zelo podobni. Tistega, ki vsebuje manjše delce pa lahko, glede na trajanje in znake delovanja, primerjamo s topnimi oblikami kolagena (CosmoDerm®, Zyderm®) (5).

#### **1. 3. 2. 2. Mikrokroglice kalcijevega hidroksiapatita**

Radiance®/Radiesse® vsebuje mikrokroglice kalcijevega hidroksiapatita (KHA), s premeri 25-40 µm (30%), v 70% gelu karboksimetilceluloze (KMC). Mikrokroglice izzovejo manj vnetnih reakcij in se v organizmu odstranijo prej kot nepravilno oblikovani delci. Omenjeni pripravek ima močan potencial za tvorbo kosti (3).

Ker je KHA biokompatibilen, predhodni testi njegove imunogenosti niso potrebni. Mehanizem delovanja Radiesse® temelji na tem, da se KHA razporedi v okolno tkivo in spodbuja razvoj fibroblastov ter proces neokolageneze. Kalcijev hidroksiapatit se s hidrolitičnimi encimi razgradi na kalcij in fosfat. Pri tem obstaja velika verjetnost tvorbe granulomov. Ker je snov tudi precej gosta, ni priporočljiva za odpravljanje glabelarnih gub. V tem primeru bi namreč lahko prišlo do ishemične nekroze, ki je posledica okluzije ali stiskanja supraorbitalne in/ali supratrohlearne arterije.

Radiesse® ima odobritev FDA za zdravljenje lipoatrofije obraza (5).

Od leta 2006 pa se lahko uporablja tudi za odpravljanje globokih gub (10).

#### **1. 3. 2. 3. Mikrokroglice poli-L-mlečne kisline (PLLA)**

New-Fill®/Sculptra® je imunološko inertno in biokompatibilno polnilo, sinteznega izvora. Pripravljeno je iz mikrokroglic PLLA, s premeri 40-63 µm (4,45%), v raztopini natrijeve karboksimetilceluloze (2,67%) in manitola (3,87%). Pred uporabo ga moramo razredčiti s

3 ml sterilne apirogene vode. Delci, ki so večji od 40 µm, se ne fagocitirajo, pač pa jih encimska razgradnja naredi porozne. V prvi fazi nastane zmerno vnetje, ko pa delci postanejo porozni in razpadajo na nepravilne oblike, pride do sekundarnega močnega vnetja, z velikim številom fagocitnih celic, ki pospešijo razpad implantata. Vnetje se nato sčasoma umiri, delci izginejo, za njimi pa ostane obilno fibrozno tkivo (3). Njegovo uporabo v estetske namene je FDA odobrila leta 2009 (11).

#### **1. 3. 2. 4. Mikrokroglice trikalcijevega fosfata (β-TCP)**

Polnilo Atlean™ vsebuje mikrokroglice tri-kalcijevega fosfata, s premeri 25-40 µm (7%), v nepremreženi HA (1,8%) in karboksimetilcelulozi (2,7%). Zaradi okrogle oblike izzovejo mikrodelci manj vnetnih reakcij in izginejo prej, kot če bi bili oblikovani nepravilno. Polovica mikrokroglic izgine v letu dni in za seboj pusti obilno kolagensko mrežo (3).

#### **1. 3. 2. 5. Mikrokroglice dekstrana v HA**

Pripravka Reviderm® in Philoderm BeautySphere® vsebujeta mikrokroglice dekstrana, s premeri 40-60 µm (2,5%), z 2% prečno premreženo HA, v 95,5% apirogene vode. Pozitivni naboj mikrodelcev dekstrana ima stimulativen učinek na makrofage in fibroblaste ter na nastanek vezivnega tkiva. Poleg tega je dekstran zelo hidrofilen. Pred začetkom vzpodbujanja fibroblastov vedno povzroči nastanek edema (3).

#### **1. 3. 2. 6. Prečno premrežena polivinilna kislina**

Bioinblue® je polivinilni alkoholni gel (8%) v 92% apirogene vode. Ker se sam polimer metabolizira v acetoocetno kislino v Krebsovem ciklu, naj ne bi povzročal vnetij. Razgrajuje se počasi (več kot 12-18 mesecev), na izovolumetrični način ga zamenjuje neokolagen. (3)

### **1. 3. 3. Permanentna nerazgradljiva polnila**

Idealna dermalna polnila pravzaprav niso trajna. Čeprav se trajnost v tem primeru zdi izjemno mikavna, pa se moramo zavedati, da se s časom v telesu spreminjata struktura in volumen mehkih tkiv. Zato je veliko vprašanje, kaj se bo zgodilo z nerazgradljivim materialom in področjem njegovega injiciranja čez čas (5).

Ti materiali se trajno akumulirajo v telesu in lahko povzročajo tvorbe granulomov ali kronično zavrnitveno reakcijo. Pogosti so zapleti in reoperativni posegi, predvsem v primeru silikonskih in alkilamidnih vsadkov (3).

#### **1. 3. 3. 1. Etilmetakrilat in hidroksietilmetakrilat (EMA in HEMA)**

Preparat Dermalive<sup>®</sup> je izdelan iz fragmentov akrilnih polimerov HEMA in EMA, z velikostjo 45-65 µm (2%), v 1,4% prečno premrežene HA in 96,6% fiziološke raztopine. Dermadeep<sup>®</sup> prav tako vsebuje fragmente polimerov HEMA in EMA, ki pa so večji, in sicer 80-110 µm (2%), v 1,4% prečno premrežene HA in 96,6% fiziološke raztopine. Sočasna prisotnost HEMA in EMA sproži želeno neokolagenozo, obenem pa tudi močno vnetno reakcijo. Nepravilne oblike njunih delcev jo še poslabšajo (3).

#### **1. 3. 3. 2. Mikrokroglice polimetilmetakrilata (PMMA)**

Artecoll<sup>®</sup> in Artefill<sup>®</sup> vsebujeta homogene mikrokroglice PMMA (20%), enakomerno suspendirane v delno denaturiranem govejem kolagenu (80%). Velikost mikrokroglic je med 30 in 50 µm in imajo gladke površine. Poleg tega je v polnilu še 0,3% lidokain hidroklorida in 72,2% fiziološke raztopine. Po injiciranju v spodnji del dermisa se kolagenski vehikel razgradi v roku 1-3 mesecev. Nato mikrokroglice obda tanka fibrozna ovojnica, v kateri je prisotnih nekaj fagocitnih celic. To se zgodi v 2-4 mesecih po aplikaciji polnila. Ker mikrokroglice PMMA niso biorazgradljive in so prevelike za fagocitozo ter prehajanje v ožilje, je z njimi povzročena augmentacija tkiva trajna.

Tovrstno polnilo je primerno predvsem za odpravljanje glabelarnih in perioralnih linij, za augmentacijo usntic ter za zmanjševanje brazgotin zaradi aken. Ni pa namenjeno odpravljanju finih gub in linij, saj ga je potrebno vnesti globoko v dermis. FDA je odobrila njegovo uporabo kot dermalno polnilo za zmanjševanje nazolabialnih brazd. Njegove neželene učinke so opazili le v manjšem številu primerov (3).

#### **1. 3. 3. 3. Poliakrilamidni geli (PAAG)**

Pripravki Royamid<sup>®</sup>, Formacryl<sup>®</sup>, Interfall<sup>®</sup> in Aquamid<sup>®</sup> vsebujejo prečno premrežen poliakrilamidni gel (2,5%) v 97,5% sterilne apirogene vode. Ta je v svoji prečno premreženi obliki hidrofilen, biokompatibilen in netoksičen. Površina gela ne omogoča adsorpcije proteinov in posledično tudi ne celične adhezije. Poliakrilamidni geli ne sprožijo močnih odzivov na tujek. V 3-4 tednih po aplikaciji jih obdaja tanka fibrilarna membrana.

Če razpadejo na manjše delce, se ti lahko fagocitirajo, to pa povzroči močno vnetno reakcijo. Outline<sup>®</sup> je polnilo, ki prav tako vsebuje prečno premrežen poliakrilamidni gel (3%), v 97% sterilne apirogene vode. Poroznost gela so natančno določili zato, da bi ustvarili mrežo, v katero bi lahko vstopale le makromolekule, makrofagi pa bi ostali zunaj nje. Absorbira se počasi (> 2-8 let), odvisno od izbrane viskoznosti, in sicer zaradi razgradnje z nespecifičnimi esterazami. Te postopoma skrajšujejo verige polimera, vendar domnevajo, da se pri tem naj ne bi sproščali toksični akrilni monomeri (3).

#### **1. 3. 3. 4. Polialkilimidni gel**

Polnilo Bio-Alcamid<sup>®</sup> je alkilimidni polimerni gel (4%), v 96% sterilne apirogene vode. Od poliakrilamidnih gelov se razlikuje po svoji imidni skupini. Tako kot ostali akrilni geli, tudi ta ne povzroča hudih reakcij na tujek. Uporablja se za blaženje obrazne atrofije bolnikov s HIV (3).

#### **1. 3. 3. 5. Polivinilhidroksidne mikrokroglice s poliakrilamidnim gelom (PVH)**

Evolution<sup>®</sup> vsebuje porozne mikrokroglice PVH, s premerom 40 µm (6%), v prečno premreženem poliakrilamidnem gelu (2,5%) v 91,5% sterilne apirogene vode. Zaradi poroznosti resorbirajočih se mikrodolcev se lahko gel razdrobi na manjše fragmente, ki se lahko fagocitirajo, to pa posledično izzove močno vnetno reakcijo (3).

#### **1. 3. 3. 6. Silikonski delci**

Bioplastique<sup>®</sup> je narejen iz polimeriziranih delcev polimetilsiloksana, nepravilnih oblik, z velikostjo 100-600 µm, ki so suspendirani v raztopini polivinilpirolidona (PVP). Zaradi omenjene velikosti delcev njihova fagocitoza ni možna. Nepravilna oblika delcev pa kljub temu povzroča močno reakcijo na tujek. Tekoči nosilec namreč delcem ne preprečuje zbliževanja, zaradi česar pride do agregacije, s tem pa se poveča možnost za nastanek reakcije na tujek (3).

Prav pojavljanje resnih neželenih učinkov, kot so granulomi, noduli, nekroza kože in pljučnica, so razlog za zmanjšan obseg uporabe silikonov. Po drugi strani pa zagovorniki njegove uporabe trdijo, da gre za odlično in varno polnilo za glabelarne, nazolabialne in marionetne gube ter brazgotine (6).

### 1. 3. 4. Avtologna maščoba

Telesna maščoba (adipozno tkivo) je dolgo veljala le za primerno tkivno polnilo. V zadnjih desetletjih pa so odkrili številne vloge maščobnega tkiva. Ne le da ta predstavlja zalogo energije, je tudi endokrino in sekretorno tkivo, zaradi česar ima pomembno vlogo pri številnih fizioloških odzivih, vključno z vnetjem (3).

Glede na njihove fizikalne, morfološke in funkcijske lastnosti razlikujemo tri vrste adipoznega tkiva, in sicer: belo, rjavo in medularno ali rumeni mozeg. Belo adipozno tkivo je v osnovi sestavljeno iz trigliceridov, njegova poglavitna vloga pa je shranjevanje energije. Vsebuje predvsem adipocite, vendar so v njem prisotni tudi fibroblasti, makrofagi ter krvne in endotelijske celice.

Le belega maščobnega tkiva je v telesu v izobilju, ima pa tudi lastnosti, zaradi katerih ga lahko uporabljamo v regenerativni medicini. Obstaja v dveh oblikah, in sicer v difuzni, ki je pretežno v manjših izoliranih predelih organizma (npr. intramuskularna maščoba) in depojski, pri kateri se maščoba nahaja v večjih količinah na različnih anatomskehih mestih. Največji depoji adipoznega tkiva so v podkožju in v globokih predelih telesa, npr. intra-abdominalno ali visceralno (3).

Presajanje maščobe je ena izmed najuspešnejših oblik implantacij. Prednost tega postopka je, da lahko uporabimo veliko količino maščobe, sama kirurška tehnika pa je zanesljiva in uspešna. Učinek povprečno traja nekje med 12 in 36 meseci. Slabosti tega postopka so njegova invazivnost, ki terja uporabo lokalne anestezije in neželeni učinki, kot sta edem in ekhimoza (podkožno krvavenje, modrica) (3).

Po presaditvi adipoznega tkiva adipociti preživijo in nadaljujejo svoj cikel razvoja v prejemniku. Prvi dan po presaditvi adipociti zaključijo z ishemično fazo. Na mestu aplikacije se jim pridružijo makrofagi, histiociti in polimorfne celice, ki odstranijo odvečne ostanke. Četrty dan se s pospešeno gostiteljevo neoangiogenezo prične faza revaskularizacije presadka. Razrast žil se začne na periferiji presajenega tkiva in se širi v njegovo notranjost. Maščobne celice v sredini presadka so zato podvržene podaljšanii ishemiji. Tkivo pa se dobro revaskularizira le, če so njegovi delci majhni (3).

Novejše raziskave so potrdile dolgoročno preživetje adipocitov. Ne le, da adipozno tkivo preživi in nadaljuje svoj razvoj, temveč povzroči tudi spremembe lokalnemu tkivu. Gre za tako imenovano teorijo tkivne interaktivnosti. Gostiteljevo tkivo namreč omogoči preživetje adipoznega tkiva, to pa nato povratno reagira z njim (3).

## **1. 4. Celične terapije**

### **1. 4. 1. Celična terapija z injiciranjem gojenih fibroblastov**

Izolirane avtologne fibroblaste, predhodno namnožene v kulturi, uporabljajo za augmentacijo mehkih tkiv obraza. Ta pristop temelji na predpostavki, da injicirane celice, ki proizvajajo kolagen, lahko zagotovijo dolgotrajen učinek pri odpravljanju gub. Pacientu odvzamejo majhen vzorec tkiva, iz njega izolirajo stromalne celice, jih nato gojijo do ustreznih količin ter krio-prezervirajo. Tako so pripravljene za intradermalno injiciranje (3).

### **1. 4. 2. Matične celice**

So celice z največjim regenerativnim potencialom za popravljanje bolnih ali poškodovanih tkiv z novimi. Opređeljujejo jih tri pomembne značilnosti: samoobnova, zmožnost diferenciacije v več vrst celic (plastičnost) in sposobnost rekonstitucije tkiv *in vivo*. Matične celice se med seboj razlikujejo glede na njihov izvor in vrsto celic, v katere bodo diferencirale. Poznamo totipotentne matične celice, ki so zmožne tvorbe vseh zarodnih plasti, kot tudi ekstraembrionalnega trofoblata, ki spodbuja rast embrija. Z nadaljnjimi delitvami in diferenciacijo iz njih nastanejo najprej pluripotentne matične celice (tvorijo lahko mezoderm, endoderm in ektoderm), nato pa multipotentne celice, ki lahko diferencirajo v več vrst celic in na koncu še progenitorne matične celice odraslih tkiv, ki imajo omejeno samoobnovitveno kapaciteto in običajno diferencirajo le v en tip tkivnih celic.

Multipotentne matične celice, ki jih lahko izoliramo iz različnih tkiv in organov, imajo vlogo rezervnih celic, pripravljenih za regeneracijo poškodovanih ali obolelih tkiv. Njihovo število s starostjo upada (3).

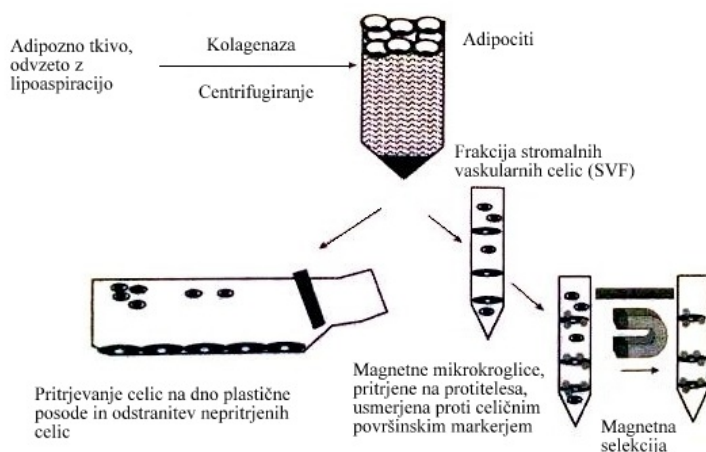
#### **1. 4. 2. 1. Matične celice iz kostnega mozga**

Matične celice predstavljajo le majhen delež celotne celične populacije kostnega mozga, in sicer 0,001-0,01% vseh mononuklearnih celic. Mezenhimske matične celice (MMC) se nahajajo v nišah znotraj stromalnega dela kostnega mozga. Sposobne so se diferencirati v celice vezivnega tkiva, vključno s kostmi, maščobo, hrustancem in mišicami. Skrbijo tudi za stromalni, to je podporni sistem za niše krvotvornih matičnih celic (KMC). Lahko jih namnožimo *ex vivo* in jih vnesemo v številna tkiva *in vivo*. V kostnem mozgu se nahajajo

tudi multipotentne odrasle progenitorne celice. Lahko jih gojimo *in vitro*, diferencirajo pa v endotelijske, endodermalne in živčne celice, in sicer tako *in vitro*, kot *in vivo*. Poleg tega so v kostnem mozgu še endotelijske progenitorne celice, ki jih lahko v kulturah *in vitro* ekspandiramo skozi daljše časovno obdobje in z njimi pospešimo neovaskularizacijo ishemičnih tkiv, potem ko jih prenesemo na mesto poškodbe (3).

#### 1. 4. 2. 2. Matične celice iz maščobnega tkiva

Matične celice iz človeškega adipoznega tkiva (hATDSC) lahko izolirajo iz številnih adipoznih tkiv: infrapatelarna maščoba kolena, visceralna in ingvinalna maščoba ter subkutano adipozno tkivo s trebuha, bokov in stegen. Po predelavi odvzetega tkiva s kolagenazo in po diferencialnem centrifugiranju nastale celične suspenzije pridobijo frakcijo stromalnih vaskularnih celic (SVF) in jih nato gojijo (Slika 4). V povprečju izolirajo približno 400.000 celic na ml aspiriranega maščobnega tkiva. Da se izognejo kontaminaciji z drugimi vrstami celic, ki prav tako sestavljajo omenjeno celično frakcijo, so razvili postopke ločevanja z imunomagnetnimi kroglicami, s katerimi pripravijo čiste matične celice adipoznega tkiva.



Slika 4: Izolacija matičnih celic iz maščobnega tkiva (prirejeno po 3)

Temeljni princip terapije z matičnimi celicami je, da se te nediferencirane celice, po vstavitvi v gostitelja in migraciji do mesta poškodbe pod vplivom lokalnih signalov, diferencirajo v celice določenega tkivnega fenotipa (3).

## **2. NAMEN DELA**

Namen našega dela je pojasniti delovanje pripravkov, ki se uporabljajo za odpravljanje gub v estetski kirurgiji in kritično opredeliti varnost njihove rabe glede na izzvane neželene učinke. Prav tako bomo predstavili tudi novejšje pristope na področju izboljšanja izgleda kože v estetski kirurgiji, ki pa za rutinsko uporabo potrebujejo še številne nadaljnje preiskave.

## **3. METODA**

### **3. 1. Pregled literaturnih podatkov**

S pregledom literaturnih podatkov o BTX in kožnih polnilih, in sicer tako teoretičnih kot tudi praktičnih, ki temeljijo na izsledkih kliničnih študij, smo pridobili splošen vpogled v obravnavano področje.

### **3. 2. Pogovor z zdravnikom, specialistom plastične kirurgije**

Pri pregledu literaturnih podatkov so se nam odprla številna vprašanja glede same uporabe omenjenih pripravkov in sodobnih trendov na področju plastične oziroma estetske kirurgije. Zato smo izkoristili možnost za razgovor z vodilnim strokovnjakom na tem področju v Sloveniji.



## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1. Pregled podatkov iz literature**

#### **4. 1. 1. Mehanizem delovanja BTX**

Na živčno-mišičnem stiku sta v neposredni bližini živčni končič in mišično vlakno. Ko akcijski potencial motoričnega nevrona depolarizira končni akson, se acetilholin (ACh) sprosti iz citozola v sinaptično špranjo. To sprostitev omogoča proteinski kompleks SNARE (Slika 5a). Ob uporabi BTX se njegova težka veriga selektivno veže na membranske receptorje holinergičnih živčnih končičev. Celoten botulinski nevrotoksinski kompleks (NPK), torej težka in lahka veriga, se nato prestavi v živčni končič z endocitozo. Nastali vezikli, ki vsebujejo BTX, se zlijejo z vakuolami, v katerih se težka in lahka veriga NPK ločita (5).

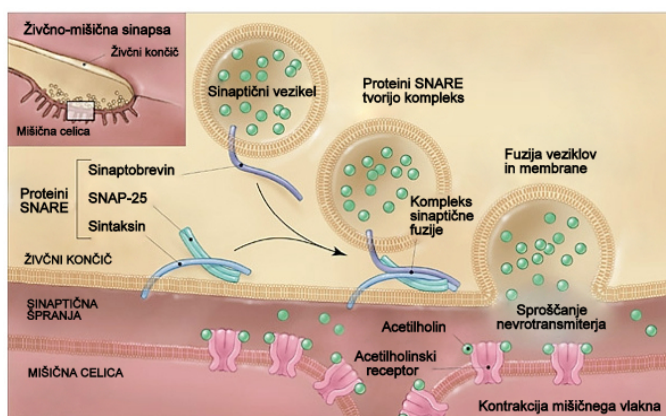
Lahka veriga deluje zaradi svoje metaloproteazne aktivnosti paralizirajoče. Veže se namreč na skupino proteinov kompleksa SNARE, odgovornih za fuzijo veziklov z živčno mišično sinapso in jih proteolitično razgradi (12).

Vis tipi BTX delujejo preko kompleksa SNARE, in sicer tipi A, C in E tako, da cepijo molekulo SNAP-25, medtem ko tipi B, D, F in G razgradijo sinaptobrevin ali z vezikli povezani membranski protein (VAMP) (Slika 5b) (5).

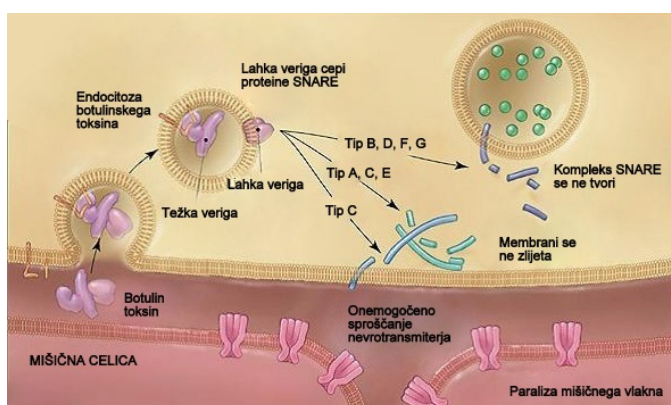
Natančneje, BTX tipa E hidrolizira vez med 180. in 181. aminokislinskim zaostankom (arginin-izolevcin), tip A pa med 197. in 198. aminokislinskim zaostankom (glutamin-arginin) molekule SNAP-25. (12)

Z zaviranjem sproščanja ACh z BTX dosežemo lokalno paralizo mišice. Ciljno tkivo pa je lahko tudi eksokrina žleza, natančneje njeno izločanje (5).

Približno dva meseca po aplikaciji BTX se začno širiti aksoni in na novo nastajati živčni končiči. Ponovno se vzpostavi tudi motorično-živčna enota, in sicer potem, ko na novo nastali končiči tvorijo sinaptično povezavo s prejšnjim živčno mišičnim stičiščem. Novi živčni poganjki, ki te povezave ne vzpostavijo, pa nazadujejo in spontano izginejo (5).



Slika 5a: Sproščanje ACh v normalnih pogojih (prirejeno po 13)



Slika 5b: Z BTX blokirano sproščanje ACh (prirejeno po 13)

#### 4. 1. 2. Terapevtski indeks BTX

Za določitev terapevtskega indeksa in varnosti BTX je najprej treba preučiti njegove učinke v predkliničnih modelih. V ta namen injicirajo v mišice mišjih zadnjih okončin več odmerkov BTX in zabeležijo, v kakšnem obsegu oslabi njihovo delovanje (nižji razpon odmerkov za določitev povprečne efektivne doze  $ED_{50}$ ). Poleg tega ugotavljajo tudi obseg smrtnosti (višji razpon odmerkov za določitev intramuskularno aplicirane letalne doze  $LD_{50}$ ).

Rezultati so pri uporabi različnih pripravkov z BTX, pokazali opazne razlike v terapevtskih indeksih, torej v razmerjih intramuskularna  $LD_{50}/ED_{50}$ . Najvišji terapevtski indeks imata pripravka, ki vsebujeta BTX tipa F ( $16,7 \pm 3,9$ ) in tipa A (Botox<sup>®</sup>:  $13,9 \pm 1,7$ ). Tema sledita pripravka Dysport<sup>®</sup> z BTX tipa A ( $7,6 \pm 0,9$ ) in pripravek NeuroBloc<sup>®</sup> s tipom B ( $5,4 \pm 0,3$ ).

Omenjeni podatki nam torej povedo, kakšne so razlike v količini preparata, ki migrira izven mesta aplikacije v mišico in vstopa v sistemski obtok.

Klinični podatki nam omogočajo vpogled v pojavnost različnih stopenj neželenih učinkov. Te delimo v 3 glavne skupine:

- tiste, ki so posledica pričakovanih vplivov nevrotoksina (pretirana oslabitev mišic);
- tiste, ki so posledica difuzije nevrotoksina v sosednje, neinjicirane mišice (oslabitev sosednjih mišičnih skupin);
- tiste, ki se pojavijo zaradi sistemske porazdelitve nevrotoksina (oslabitev od mesta aplikacije oddaljenih mišic).

Migracija BTX izven tarčnega mesta je odvisna od strukture molekule nevrotoksina, njegovega injiciranega volumna in difuzije. Pri tem velja, da skozi enakomeren vodni medij molekule z večjo molekulsko maso (MM) difundirajo počasneje kot tiste z nižjo, in sicer pod pogojem, da so naboj, temperatura in molekularna struktura substance enaki. Glede na to naj bi torej proteinski kompleksi BTX z večjo MM difundirali počasneje, kot tisti z nižjo.

Rezultati predkliničnih raziskav so potrdili to načelo. Pripravek z najvišjo MM nevrotoksinov tipa A (Botox®) izkazuje višji TI (majhen obseg uhajanja iz mesta aplikacije), kot heterogeni pripravek (Dysport®). Medtem pa ima pripravek z najnižjo MM nevrotoksinov tipa B (NeuroBloc®) najnižji TI.

Ugotavljali so tudi TI različnih molekulskih oblik BTX tipa A. V tem primeru so dokazali, da ima kompleks z najnižjo MM (300 kDa) najvišji TI. Temu je sledil kompleks z vmesno vrednostjo MM, nato pa še tisti z najvišjo MM nevrotoksina (900 kDa). Ti rezultati terjajo dodatne raziskave, saj so v nasprotju z osnovnim načelom difuzije. Seveda pri tem ne smemo izključiti možnosti, da lahko prisotnost hemaglutininskega proteina spremeni kinetiko difuzije BTX. Hemaglutininski protein je namreč prisoten v dveh kompleksih BTX z najvišjima MM, ne pa v tistem z nizko MM. Predklinični rezultati tudi v tem primeru nasprotujejo kliničnim ugotovitvam, ki kažejo manjši obseg neželenih učinkov pri uporabi preparatov s kompleksom 900 kDa (Botox®), v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo heterogene komplekse BTX (Dysport®).

V ostalih študijah so primerjali največji BTX kompleks tipa A (900 kDa) z izoliranim 150 kDa nevrotoksinom. Pri tem pa niso opazili pomembnejših razlik med njima glede neželenih učinkov. Verjetno na rezultate, ki so v nasprotju z osnovnim načelom difuzije, vplivajo ostale značilnosti molekule ali same formulacije (3).

#### **4. 1. 3. Odnos med odmerkom in odzivom BTX**

Količina apliciranega BTX in obseg izzvane lokalne mišične paralize sta pričakovano medsebojno povezana. Paralizo lahko dosežemo že z razmeroma nizkimi odmerki. Krivuljo, ki ponazarja korelacijo med odmerkom in učinkom, lahko uporabimo za optimizacijo odmerjanja BTX za injiciranje v mišično tkivo.

Kot smo že omenili, uporabljajo za preučevanje oslabitve mišic miške modele. S primerjavo različnih pripravkov lahko tako dobimo neparalelne krivulje odmerka-odziv. Dejstvo pa je, da se ti pripravki v sistemu *in vivo* obnašajo povsem drugače. To je glede na njihovo kompleksno biološko naravo in uporabo različnih proizvodnih metod tudi pričakovano.

Predvidevajo, da razmerje med odmerkom in odzivom variira za vsako posamezno mišico. S pomočjo kliničnih študij so ugotovili variabilnosti v razmerjih odmerkov Botox<sup>®</sup>-a in Dysport<sup>®</sup>-a. Raziskavo so zaključili z ugotovitvijo, da ni enostavnega razmerja za zamenjavo med omenjenimi pripravki. Učinek enakih enot različnih formulacij BTX torej ni enak, celo znotraj istega toksinskega serotipa. Gre za eno izmed najpomembnejših spoznanj glede uporabe BTX, saj lahko z menjavo proizvodov povzročimo predoziranje ali pa neodzivnost, oboje pa ima lahko določene klinične posledice (3).

#### **4. 1. 4. Imunogenost BTX**

Tako kot drugi bakterijski proteini, lahko tudi botulinski nevrotoksini pod določenimi pogoji pri nekaterih posameznikih izzovejo imunski odziv. Zaradi tega se lahko zmanjša ali celo izgine terapevtski učinek. Eden izmed možnih razlogov za zmanjšano klinično odzivnost na BTX so nevtralizirajoča protitelesa (Pt).

Načrtne izboljšave v proizvodnih procesih pripravka Botox<sup>®</sup> so dejansko pripomogle k nižji stopnji tvorbe teh Pt.

Nekaj zaporednih študij glede tvorbe nevtralizirajočih Pt so izvedli tudi z Dysport<sup>®</sup>-om. V nedavni preiskavi, med katero so bolnike s krči zdravili s tremi cikli injiciranja BTX, niso odkrili prisotnosti nevtralizirajočih Pt. Stopnja njihovega nastajanja naj bi bila nekoliko višja pri pripravkih, ki vsebujejo BTX tipa B (NeuroBloc<sup>®</sup>).

S povečevanjem odmerkov nevrotoksinskih proteinskih kompleksov se tveganje za tvorbo nevtralizirajočih Pt vsekakor poveča. Zato lahko pričakujemo, da je uporaba nekaterih pripravkov (Dysport<sup>®</sup> in NeuroBloc<sup>®</sup>) povezana s povečanim tveganjem za nastajanje

tovrstnih Pt. Za potrditev te predpostavke pa so potrebne še dodatne primerjalne raziskave (3).

#### **4. 1. 5. Študija primerjave pripravkov Dysport® in Botox® pri odpravljanju čelnih, glabelarnih in periorbitalnih gub**

Preparata se razlikujeta v nosilnem proteinu, ki je pripet na 150 kDa veliko molekulo BTX-A. Medtem, ko vsebuje Botox® na toksin pripet 900 kDa velik nosilni protein, je ta v Dysport®-u manjši, velik 750 kDa. Kljub različnim MM kompleksov pa niso opazili razlik v času njihovega difundiranja ali v njegovi učinkovitosti.

V študiji je sodelovalo 53 oseb, 52 žensk in 1 moški, starih od 34 do 65 let, z vidnimi glabelarnimi in periorbitalnimi gubami. Od teh jih je bilo 8 kadilcev, 26 pa jih je v preteklosti že imelo opravka z Botox®-om. Seveda so bile iz študije izključene nosečnice, osebe s kardiovaskularnimi ali nevromuskularnimi motnjami, z disfazijo (motnjo govora, ki nastane zaradi možganskih okvar), alergijami na mlečne proteine ali albumin ter tisti na aminoglikozidni terapiji. Izključeni so bili tudi tisti, ki so pred študijo prejeli Botox® ali Dysport®.

Pred posegom so vsakega posameznika fotografirali in opravili analizo gub, s programskim orodjem Visia Complexion Analysis System.

Oba botulinska preparata so nato razredčili s sterilno fiziološko raztopino tako, da je 1 ml raztopine vseboval 25 enot Botox®-a ali 62,5 enot Dysport®-a. Razmerje Botox®:Dysport® je bilo torej 1:2,5.

Za odstranjevanje gub v glabelarnem območju priporočajo uporabo 20 enot Botox®-a ali 50 enot Dysport®-a.

Nato so na eno stran obraza injicirali 25 enot Botox®-a, na drugo pa 62,5 enot Dysport®-a. Injicirani volumen raztopin je bil vedno enak, in sicer 0,6 ml. Stran obraza, kamor so v področje čela, glabele in okoli oči injicirali posamezen preparat, so izbrali naključno.

Vsakega posameznika so 2., 3., 4., 7., 90., 105., 120., 135. in 150. dan po injiciranju, digitalno fotografirali in ocenili videz gub.

Digitalne fotografije so ocenjevali z uporabo prirejene Fitzpatrickove lestvice za vrednotenje gub. Pri tem stopnja 0 pomeni odsotnost gub; stopnja 0,5 zelo plitve, komaj vidne gube; stopnja 1 rahlo poglobljene gube; stopnja 1,5 vidne gube, globoke manj kot 1 mm; stopnja 2 vidne gube, globoke 1-2 mm; stopnja 2,5 dobro vidne gube, globoke 2-3 mm in stopnja 3 brazde, globoke več kot 3 mm.

Ocenjevanje fotografij sta izvedla dva plastična in dva splošna kirurga. Videz čelnih, glabelarnih in periorbitalnih gub (Slika 6) so ocenjevali ob mirovanju in med nagubanjem obraza.

V študiji niso opazili večjih razlik v učinkovitosti med Botoks<sup>®</sup>-om in Dysport<sup>®</sup>-om. Njuna učinkovitost je bila enaka pri uporabljenem razmerju 1: 2,5 (Botox<sup>®</sup> proti Dysport<sup>®</sup>).

Edina razlika je bila v ceni. Enota Dysport<sup>®</sup>-a je stala 1,58, enota Botox<sup>®</sup>-a pa 5,25 dolarjev.

Ugotovili so, da je delovanje obeh pripravkov na mišice precej podobno. Tako Fitzpatrickova lestvica kot uporaba programske opreme, nista pokazali bistvenih razlik v njunem učinkovanju. Tudi difuzijske lastnosti toksinskih kompleksov v obeh pripravkih se niso razlikovale. Oba pripravka sta učinkovala več kot 150 dni.

Rezultati te študije torej niso pokazali bistvene razlike v učinkovitosti Botox<sup>®</sup>-a in Dysport<sup>®</sup>-a, ki oba dajeta dobre rezultate. Pri tem je treba upoštevati količini uporabljenih enot toksinov, ki pa se med pripravki razlikujeta (14).



Slika 6: Obrazne gube

## 4. 2. Biorazgradljiva dermalna polnila

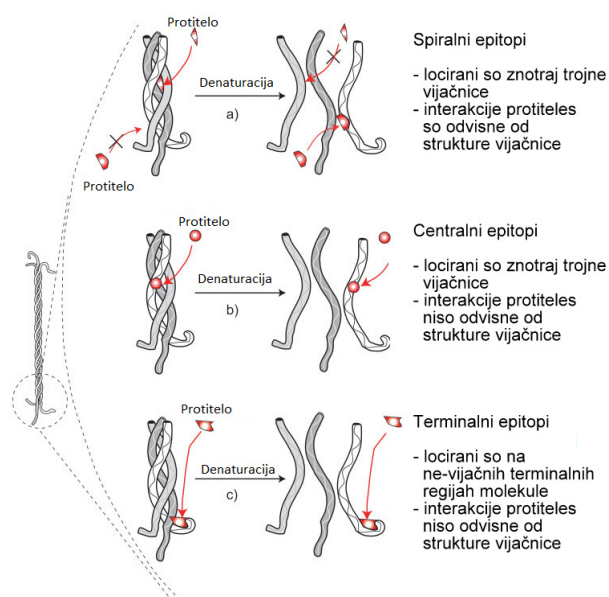
### 4. 2. 1. Antigenost oziroma imunogenost kolagena

Kolagen je vse do leta 1954 veljal za neimunogeno snov. Kljub kasnejšim dokazom, da se nanj lahko vežejo protitelesa, pa kolagen še vedno prištevamo med šibke antigene.

Kadar govorimo o imunokemijskih lastnosti proteinov, moramo razlikovati med njihovo antigenostjo in imunogenostjo. Antigenost se nanaša izključno na sposobnost interakcije s protitelesi, imunogenost pa na sposobnost kolagena, da izzove imunski odziv, vključno z nastankom teh protiteles (15).

Antigenske determinante, oz. epitope, izražene na kolagenskih molekulah, ki lahko močno ali šibko reagirajo s protitelesi, razvrščamo v tri kategorije:

1. Spiralne, pri katerih je prepoznavna protiteles odvisna od 3D konformacije kolagena (prisotnost intaktne trojne vijačnice) (Slika 7).
2. Centralne, ki se nahajajo znotraj trojne vijačnice molekule naravnega kolagena, njihova prepoznavna pa temelji le na aminokislinskem zaporedju (Slika 7).
3. Končne (terminalne), ki so izražene na ne-vijačnih terminalnih regijah, telopeptidih, v kolagenski molekuli (Slika 7).



**Slika 7: Različne antigenske determinante kolagena**

S številnimi študijami so pokazali, da se antigeni epitopi večinoma nahajajo znotraj terminalnih regij. Centralni epitopi so namreč pogosto skriti in lahko reagirajo s protitelesi le, ko je trojna vijačnica razprta, to pa se zgodi pri razpadu kolagenskega vsadka.

Antigenost kolagena lahko torej pripišemo predvsem terminalnim telopeptidom. Lokacija dominantnih antigenih epitopov kolagena pa se večinoma spreminja glede na razlike v species darovalca in prejemnika.

Imunski odziv na kolagen je tako humoralni kot tudi celično posredovan. S poskusi na miših so dokazali, da je protitelesni odziv na goveji kolagen odvisen od limfocitov T. Humoralna imunska reakcija miši na podganji kolagen in kolagen glist, pa ni bila odvisna od celic T. To nam pove, da je imunogeni odziv na kolagen odvisen od vrste donorja in prejemnika kolagenskega implantata (15).

Rezultati imunoloških študij kažejo na razmeroma majhno pojavnost preobčutljivosti ljudi na goveji kolagen (15).

Testirali so posameznike brez predhodnih alergij ali preobčutljivosti in skušali določiti potencialno alergenost injiciranega govejega kolagena. Aplikirali so jim Zyderm 1<sup>®</sup> po 0,3 ml. Najprej so tretjino injekcijskega volumna (0,1 ml) injicirali v dermis na spodnjem delu podlakti. Ob pojavu otekline, zatrdline, rdečice, občutljivosti področja je bil test pozitiven. Ti neželeni učinki lahko trajajo 6 ur do celo 4 tedne po testiranju. Na testiranje se je s pozitivno reakcijo preobčutljivosti odzvalo 3,0 do 3,5% posameznikov. Kljub negativnim kožnim testom pa sta kasneje 2% pacientov razvila alergijsko reakcijo. Vse pogostejše opravijo pred določeno aplikacijo tudi sekundarni test, pri katerem pa je pojavnost alergijskih reakcij manjša in tudi blažja. Ta test opravijo 4 tedne po prvem. V kolikor sta prvi in drugi test negativna, lahko kolagenski pripravek uporabijo 6 tednov po prvem testiranju. Uporabi kolagena se morajo izogibati tudi tisti posamezniki, ki se zdravijo s kortikosteroidi ali imunosupresivi. Kontraindikacije za tovrstno terapijo lahko predstavljajo še nekatere avtoimunske bolezni kot so: revmatoidni in psoriatični artritis, skleroderma, sistemski ali diskoidni lupus eritematosus ali polimiozitis. Študije s kolagenom pa niso izvedli na nosečnicah in otrocih, zato je njegova uporaba zanje prepovedana (5).

### **Atelokolagen**

To je kolagen, obdelan s proteolitičnimi encimi, ki odstranijo terminalne telopeptide. Telopeptidi na amino in karboksi-terminalnem delu molekule imajo pomembno vlogo pri premreževanju in tvorbi fibril. Po popolni odstranitvi telopeptidov se pojavi amorfn ureitev kolagenskih molekul in izguba fibrilarnega vzorca. Prav tako se znatno poveča topnost kolagena.

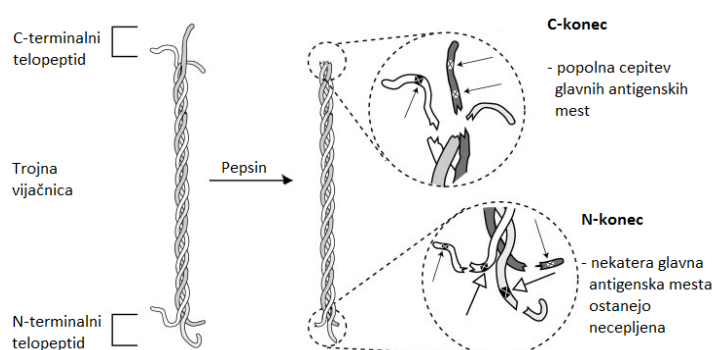
Najpogostejše za pripravo atelokolagena uporabljajo pepsin, ki sicer deluje le na mesta znotraj terminalnih regij, vendar pa N- in C-terminalnih telopeptidov ne odstrani v celoti



(Slika 8). Antigena aktivnost tako naravnih oblik kolagena kot tistih, obdelanih s pepsinom, je skoraj nezaznavna.

Z odstranjevanjem telopeptidov bi naj torej dosegli neimunogenost kolagena. To so potrdili s študijami, v katerih so uporabili darovalce in prejemnike kolagena iz različnih species, in sicer tele/zajec ter podgana/zajec. Ker pa pri tem niso upoštevali, da bi lahko bila glavna antigena determinanta pri parih drugih vrst spiralna ali centralna, se na omenjene študije ne moremo v celoti zanesti.

Trditve o imunskih koristih atelokolagena so zato še vedno premalo podkrepljene z dokazi, kar pomeni, da bo potrebno na to temo izvesti še več študij (15).



**Slika 8: Odstranitev telopeptidov iz molekule kolagena s pepsinom**

### **Premreževanje kolagena**

Da bi spremenili mehanske lastnosti kolagena in njegovo razgradnjo, so razvili različne fizikalne in kemične postopke premreževanja.

Najbolj poznan je postopek z glutaraldehidom (GTA). Kljub njegovim številnim prednostim pa še vedno razvijajo alternativne postopke premreževanja, s katerimi bi se izognili potencialnemu citotoksičnemu delovanju GTA. Citotoksično delovanje GTA je izključno posledica njegovih ostankov v pripravku.

Premreženje kolagena naj bi obranilo oz. spremenilo glavna antigena mesta in tako zmanjšalo njihovo sposobnost za vezavo s protitelesi. Čeprav je tak mehanizem zelo verjeten, pa še vedno ni podprt z jasnimi kliničnimi in imunološkimi dokazi. Nedavno so namreč ugotovili, da je tako obdelan kolagen lahko celo bolj imunogen: implantacija z GTA obdelanih kozjih srčnih zaklopk v psa.

Zato so potrebne dodatne preiskave, s katerimi bi določili dejanski učinek premreževalnega procesa na antigena lastnosti kolagena (15).

#### **4. 2. 2. Tehnike injiciranja raztopin kolagena in hialuronske kisline (HA)**

Izbira najustrežnejšega polnila je pogosto odvisna od globine gub in od področja v katerega bomo polnilo aplicirali. Nekatera polnila so bolj viskozna in jih morajo zato aplicirati v podkožno plast. Tista, ki so bolj fluidna, pa injicirajo bližje površini, torej v dermis. Tanjše in bolj površinske linije odpravijo z injiciranjem polnil v površinski dermis. Globoke, bolj znatne gube pa pogosto zajemajo tudi področja podkožja, zato je v teh primerih potrebno injicirati polnila v globlji dermis. Najpomembnejši dejavnik za uspešno aplikacijo polnil s kolagenom in HA je torej sama tehnika njihovega injiciranja (5).

Pri biorazgradljivih polnilih je boljša uporaba HA kot kolagena, in sicer predvsem pri odpravljanju nazolabialnih in melomentalnih brazd (marionetnih linij) in pri povečevanju ustnic. Za odpravljanje prečnih linij na čelu, periokularnih in vertikalnih linij ob ustnicah so uporabljali predvsem CosmoDerm 1<sup>®</sup>. Danes viskoznejši pripravki HA, kot so Perlane<sup>®</sup> in Juvéderm Ultra Plus<sup>®</sup>, nadomeščajo uporabo CosmoPlast<sup>®</sup>-a in Zyplast<sup>®</sup>-a pri zapolnjevanju globokih gub in povečevanju ustnic (5).

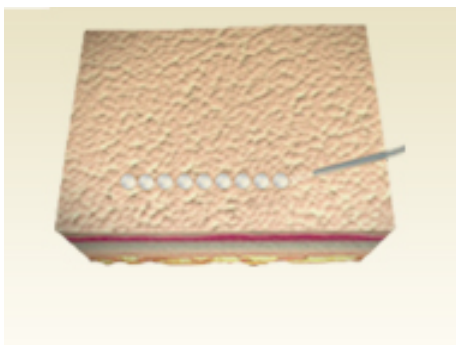
V randomizirani študiji, v kateri so primerjalno uporabili Restylane<sup>®</sup> in Zyplast<sup>®</sup>, so ugotovili, da so učinki prvega dolgotrajnejši (6).

Najboljše rezultate pri povečevanju volumna ustnic dosežemo s kombiniranjem človeškega kolagena in HA (5).

Lidokain, ki ga vsebuje CosmoPlast<sup>®</sup>, je kot anestetik odlično dopolnilo za nadaljnjo aplikacijo HA. Tako za definiranje osnovne oblike ustnic uporabljajo prav CosmoPlast<sup>®</sup>, nato pa s polnili, ki vsebujejo HA ustnicam le še dodatno povečajo volumen.

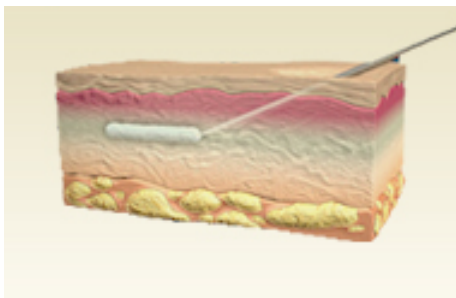
Osnovna načela za injiciranje polnil s HA so enaka, kot v primeru aplikacije kolagena. V nasprotju s kolagenskimi polnili, ki jih injicirajo s tehniko serijskih punkcij (Slika 9a), pa tista s HA injicirajo s tehniko linearnega nizanja (Slika 9b) (5).

S tehniko serijskih punkcij material namestijo z večkratnim zaporednim injiciranjem njegovih majhnih količin, običajno pravokotno na gubo. Pri tem je pomembno, da so si točke injiciranja polnila blizu, saj le tako lahko dosežejo gladko in kontinuirano porazdelitveno linijo polnila (Slika 9a) (16).



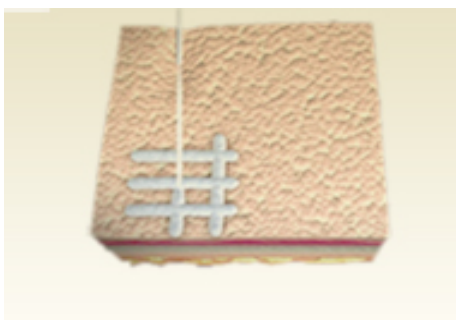
**Slika 9a: Serijsko točkasta tehnika injiciranja polnila**

Pri linearnem nizanju polnil, ta vnesejo vzdolž osi gube, pri čemer počasi umikajo iglo. To tehniko najpogosteje uporabljajo za odpravljanje nazolabialnih gub. V primeru, da so gube globoke, lahko vzporedno nizajo več linij polnila in tako dosežejo želeni učinek (Slika 9b) (16).



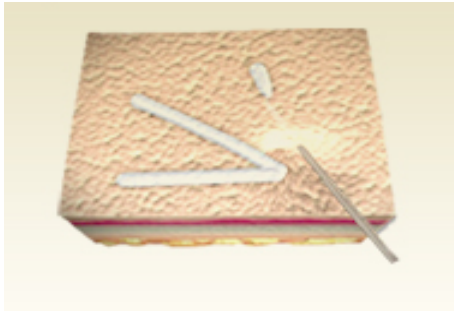
**Slika 9b: Tehnika linearnega nizanja polnila**

Navzkrižno-črtkana tehnika injiciranja predstavlja različico linearnega nizanja polnila. V tem primeru namreč ustvarimo vzporedne linije polnila, nato pa pravokotno nanj ponovimo postopek injiciranja. To tehniko uporabljajo predvsem za obdelavo širših področij, kot so npr. marionetne linije (Slika 9c) (16).



**Slika 9c: Navzkrižno-črtkana tehnika injiciranja polnila**

Tudi radialno nizanje predstavlja nekakšno različico linearnega nizanja polnila. Polnilo nanašajo vzdolž gube, pri čemer hkrati umikajo iglo. Še preden jo izvlečejo iz kože, jo ponovno usmerijo vanjo, in sicer radialno glede na prejšnjo linijo vnosa polnila. Postopek ponavljajo, vse dokler ne dosežejo želenega rezultata (Slika 9d) (16).



**Slika 9d: Radialno nizanje polnila (17)**

Poznamo pa tudi postopek tako imenovane mezoterapije, kjer HA, ki ni specifično kemijsko obdelana tako kot v polnilih, vstavljajo v kožo preko tanke iglice. Na ta način lahko poleg HA v kožo injicirajo tudi druge snovi, kot so vitamini in aminokisline. Zanimivo je, da kožo spodbuja k tvorbi novih kolagenskih vlaken že samo zbadanje, poleg tega pa s tem postopkom lahko apliciramo HA tja, kjer je primanjkuje, torej neposredno v usnjico (3).

#### **4. 2. 3. Neželene reakcije po uporabi HA**

Posledica uporabe polnil s HA so lahko neželene reakcije, ki jih delimo na ne-hipersenzitivne in hipersenzitivne. Najpogostejše so ne-hipersenzitivne, ki so prehodne in blage, mednje pa sodijo modrice, lokalizirane bakterijske okužbe in reaktivacija herpetičnih izbruhov. V nekaterih področjih kože se lahko vbrizgani material upira ciljani namestitvi, zato se lahko dvigne tkivo poleg same gube (5).

Med resnejše ne-hipersenzitivne reakcije štejemo vaskularne motnje v predelu aplikacije polnila, čemur sledi lokalizirana nekroza tkiva. Vaskularne motnje povzroča predvsem injiciranje viskoznejših polnil, kot sta Perlane® in Juvéderm UltraPlus®. Razlog za to je v tem, da se morajo ta polnila aplicirati globlje, blizu žil v dermisu. Kar 56% tovrstnih nekroz se pojavi v glabelarnem predelu, zato v tem primeru uporabi CosmoPlast®-a in Perlane®-a nista primerni.

V redkih primerih pride do nastanka granulomov, lokaliziranih nekroz in urtikarije. Nekroza tkiva se kaže z nastankom kraste, temu pa sledi odstopanje kože na mestu aplikacije ter posledični nastanek plitve brazgotine (5).

#### **4. 2. 4. Biostimulativni učinek polnil**

Poleg konstantnih fizioloških efektov, imajo nekatera polnila (poli-L-mlečna kislina, hidroksiapatit) tudi biostimulativni učinek. Polnila s kolagenom in HA zapolnijo področje v katerega jih injiciramo, poleg tega pa igrajo pomembno vlogo v kožnem metabolizmu, saj z izboljšanjem dermalne kohezije stimulirajo nastajanje neokolagena. Pomembna so tako za metabolizem fibrocitov in keratinocitov kot za zadrževanje vode. Polnila torej ne povečajo le volumna tkiva, so tudi pravi biostimulatorji, in to kljub njihovi razmeroma kratkotrajni prisotnosti v tkivih (3).

Kljub temu pa moramo biti pri njihovi uporabi previdni, saj lahko, sicer le redko, povzročijo močne vnetne reakcije ali celo ishemično nekrozo (5).

### **4. 3. Semipermanentna in trajna polnila**

#### **4. 3. 1. Premikanje in razpadanje hidrogelov**

Hidrogeli niso odporni na difuzijo in migriranje. Ravno nasprotno, difundirajo v tkivo in se s časom pomikajo vse nižje. Zaradi teže gela se moramo izogibati njegovemu injiciranju v koticke ustnic. Oblika in lokacija gelskega implantata nista stabilni, saj se gel razširja v vse smeri in v vsa sosednja tkiva. Ker ga ne obdaja fibrozna kapsula, ki bi ga imobilizirala znotraj tkiva, z lahkoto migrira pod vplivom lokalnih mišic in gravitacije.

Znana je migracija poliakrilamidnega gela (PAAG) v tkivo mlečnih žlez, podkožno maščevje in v tkiva daleč proč od mesta aplikacije. Pri izpodrivanju tak gel razpade na manjše delce. Ti fragmenti pa zaradi svoje velikosti, sprožijo reakcijo na tujke in posledično vnetje. Fragmentacijo bi lahko omehčali z dehidracijo gela, pri čemer nastane granulirana masa (3).

#### **4. 3. 2. Reakcija na tujke**

Prične se z vnetno reakcijo, ki se pojavi v dveh korakih. Najprej nastopi akutna vnetna reakcija z infiltracijo nevtrofilnih polimorfonuklearnih celic, nato pa čez dva tedna še kronično vnetje, s prisotnostjo limfocitov in/ali monocitov, pač odvisno od tipa in lokacije

implantata. Prejemnik mora tujek najprej prepoznati. Ta prepoznava temelji na monocitih/makrofagih, ki se pritrdijo na čvrsto površino vsadka. Adhezija je izjemno pomembna faza celičnih interakcij, od katere je odvisen celični odziv. Gre za kompleksen proces celične interakcije s površino tujka, na katero so adherirani določeni proteini (opsonini). Ti proteini sprožijo specifično prepoznavo s strani imunskih celic, ki izražajo površinske celične receptorje. Temu procesu sledi nespecifična interakcija med celičnimi receptorji, na tujek adsorbiranimi proteini in samim implantiranim materialom. Več kot je proteinov na površini vsajenega tujka, učinkovitejše bodo celična adhezija, ekspanzija in proliferacija. Makrofagi se zlijejo v orjaške celice, ki poskušajo fagocitirati velike delce. Ta celična fuzija in tvorba orjaških fagocitnih celic, naj bi predstavljala prilagoditev na težavno odstranitev velikega tujka, pri čemer ostale neučinkovite imunske celice propadejo z apoptozo. Torej, makrofagi se adherirajo na tujek, ga fagocitirajo ali pa se zlijejo v orjaške celice. V primeru, da implantata ne morajo fagocitirati in odstraniti, ga fibroblasti izolirajo tako, da ga obdajo s trdno fibrozno kolagensko ovojnico, ki jo postopoma nadomestijo fibrociti. Vsak posamezen neodstranjen tujek se namreč slej kot prej inkapsulira, in sicer neodvisno od drugih (3).

Delci, ki so večji od 40  $\mu\text{m}$  se ne morejo fagocitirati, manjši pa pogosteje izzovejo vnetja in migracije ter se hitreje fagocitirajo.

Vnetne reakcije, ki jih sprožijo tekočine ali geli trajajo več let, temu pa lahko sledi tudi migracija oz. premik vsadka.

Poleg vsega naštetega, vpliva na aktivnost makrofagov tudi sama oblika vsadka. Sferični delci sprožijo manj vnetij kot tisti, nepravilnih oblik (iritacija tkiva).

Poleg tega se sferični delci v tkivu tudi učinkoviteje obdajo s kolagenom, kot tisti, ki so nepravilnih oblik.

Pozitivno nabiti delci vsadka privlačijo in/ali aktivirajo makrofage. Pozitivni naboj tudi pospešuje tvorbo orjaških fagocitov in sproži hitrejšo orientacijo kolagenskih snopov okrog tujka, kar se odraža v nastanku debelejšega sloja vezivnega tkiva. To je tudi osnovni mehanizem tvorbe vezivnega tkiva okrog resorpcijskih mikrokroglic dekstrana (Reviderm<sup>®</sup> in BeautySphere<sup>®</sup>) (3).

#### **4. 3. 3. Toksičnost hidrogelov**

V svoji makromolekulski, prečno premreženi obliki, poliakrilamidni geli naj ne bi bili toksični. Kljub temu pa se polnila, ki vsebujejo PAAG lahko delno razgradijo in pri tem

sproščajo karcinogene in mutagene monomere. S študijami so potrdili tudi nefrotoksičnost (3).

#### **4. 4. Uporaba avtologne maščobe**

Zaradi dostopnosti do velikih količin maščobnega tkiva, zanesljivih tehnik za njeno pridobivanje ter dobre reproduktivnosti tkiva, je presajanje maščobe še vedno eden od najboljših pristopov v estetski kirurgiji.

Rezultati tovrstnega posega so vidni po 12–36 mesecih, vmes pa so velikokrat potrebni tudi popravki. Žal pa gre za invazivno tehniko, ki zahteva operacijski poseg. Neželeni učinki takega posega, med katere sodita edem in ekhimoza, pa so dolgotrajni (3).

Osnovni koraki pri presajanju maščobnega tkiva so vedno enaki: zbiranje, obdelava in injiciranje.

Prvi del procesa je odstranjevanje maščobe iz srednjega ali spodnjega dela telesa pacienta. Najprimernejša področja za zbiranje adipocitov so stegna, ritnice, koleno, stranski del bokov in trebuh. Postopek zbiranja izvedejo v lokalni anesteziji. Kožo je potrebno najprej očisti z raztopino povidon joda. Po injiciranju anestetika pa maščobo odstranijo iz različnih globin s pomočjo kanul in brizg. Višek maščobe lahko zamrznejo za 1 leto in jo nato uporabijo za kasnejše augmentacije (5).

Sledi obdelovanje odvzete maščobe. Nekateri zagovarjajo obsežno čiščenje zbranega tkiva, s čimer naj bi zmanjšali možnost vnetnih odzivov prejemnika po transplantaciji. Večinoma pa pustijo, da se odvzeta maščoba v brizgi loči sama, brez spiranja (5).

S spiranjem s fiziološko raztopino ali raztopino Ringerjevega laktata, naj bi odstranili neželene ostanke in razredčili v tkivu zaostali anestetik. Vendar pa s tem povzročimo le dodatno mehansko obremenitev odvzetega tkiva, čemur se moramo izogniti (3).

Alternativno lahko maščobo ločimo tudi z nežnim centrifugiranjem. Pri tem se vsebina brizge loči na 3 dele. Material, ki plava na vrhu in ima najnižjo gostoto je olje, sestavljeno iz trigliceridov poškodovanih adipocitov in ga lahko zlahka odstranimo. Najnižja plast vsebuje pretežno sestavine krvi in ostanke tkivnih infiltratov. Tudi ta del zavržemo. Vmesno plast, kjer se nahajajo adipociti, pa uporabimo za transplantacijo (3).

## **4. 5. Celične terapije**

Celične terapije so namenjene nadomeščanju bolnih in nefunkcionalnih celic. Gre za novejša tehnika, ki veliko obetajo pri zdravljenju številnih človeških boleznih. Danes na primer rutinsko presajamo krvotvorne matične celice pri zdravljenju levkemije, kožne celice za zdravljenje opeklin, gojimo celice roženice za odpravljanje okvar vida, in podobno v estetski kirurgiji, predstavljajo celične terapije nov pristop k obnovi postaranega in fotostaranega dermisa (3).

Novejši je postopek pomlajevanja z lastno, s trombociti obogateno plazmo. Posameznikovo kri centrifugirajo in del centrifugirane krvi čez 15 minut vbrizgajo v kožo. Rastni dejavniki pospešijo nastanek novih kolagenskih vlaken, drobne gubice pa posledično postopoma izginejo. Ta postopek je primeren predvsem za tiste, ki so preobčutljivi na sestavine polnil oziroma želijo čimbolj naravno izvajati postopke pomlajevanja svoje kože.

### **4. 5. 1. Injiciranje predhodno gojenih avtoloških fibroblastov**

Ta postopek je povsem varen. Tako pri miših niso opazili tvorbe tumorjev ali onkogenih lastnosti implantiranih celic. Za izboljšanje obstojnosti avtologne fibroblaste kombinirajo s polnili. Zaradi omejene proliferacijske sposobnosti, celične senescence in razmeroma majhnega odstotka živih celic, je uporaba predhodno gojenih avtoloških fibroblastov dokaj težavna. Le redke celice po aplikaciji preživijo zaradi njihove slabe odpornosti na ishemične pogoje, ki so povezani tudi s tveganjem za nastanek fibroze in kalcifikacij (3).

### **4. 5. 2. Matične celice iz maščobnega tkiva**

Matične celice iz maščobnega tkiva predstavljajo zaradi njihove enostavne dostopnosti obetaven celični terapevtski pristop za regeneracijo tkiv. Imajo veliko sposobnost proliferacije in plastičnost, kar pomeni, da lahko diferencirajo v več različnih vrst celic in tako pripomorejo k rekonstituciji tkiva *in vivo*.

Pri tem sta ključna izolacija in gojenje tovrstnih matičnih celic.

Danes še vedno iščejo optimalne metode za pridobitev teh celic. Poleg tega pa bo potrebno izvesti še precej kliničnih in predkliničnih študij za jasen dokaz dolgoročne varnosti in učinkovitosti te terapije (3).



## 4. 6. Pogovor s specialistom

Informacije o varnosti proizvodov, uporabnih za estetske posege smo pridobili v pogovoru s kirurgom, specialistom plastične oz. estetske kirurgije, mag. Francem Planinškom, dr. med. Predstavil nam je svoja stališča in izkušnje glede uporabe BTX in različnih dermalnih polnil.

Zaradi naše skeptičnosti glede uporabe BTX, predvsem trajanja njegovega učinka in pa morebitnih negativnih vplivov ponavljajočih se aplikacij, je naš sogovornik najprej pojasnil mehanizme delovanja BTX. Pri tem je poudaril, da se moramo zavedati, da je potreben določen čas, da toksin začne delovati in povzroči paralizo obraznih mišic. Povedal je, da so učinki BTX vidni šele po 3-4 dneh po injiciranju. Ta čas je potreben, da se molekula toksina veže na motorični živčni končič in blokira sproščanje ACh.

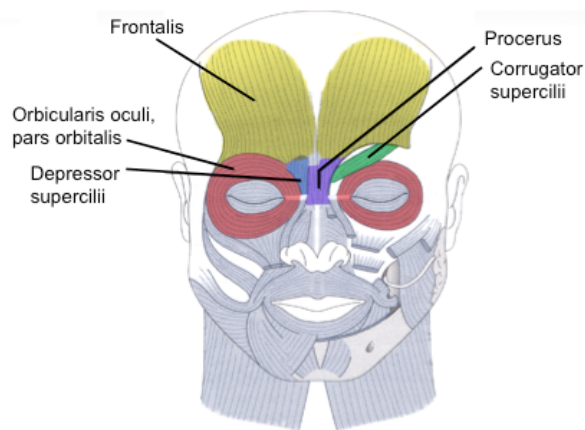
Ker učinki pri nekaterih posameznikih trajajo dlje, kot pri drugih, nas je zanimalo, kaj vpliva na čas delovanja in kaj bi lahko storili, da bi učinek BTX podaljšali. Pojasnil nam je, da ne moremo vplivati na podaljšanje posameznikovega učinka BTX. Ta običajno traja približno 3 do 4 mesece, kar ustreza času, ki je potreben, da zrastejo novi poganjki od živčne korenine do ponovno ustvarjenega motoričnega končiča. Torej trajanje učinka BTX ni odvisno od časa njegove prisotnosti v živčnem končiču, ampak od časa, ki ga potrebujejo živci, da se obnovijo in razvijejo ponovne povezave z mionevralnim stičiščem. Trajanje učinka pa je odvisno tudi od velikosti molekule BTX, se pravi od vrste preparata, ki ga kirurg uporabi.

Na naše vprašanje, kaj meni o dolgotrajni oz. stalni rabi BTX in o možnih posledicah na živčno-mišične sinapse je dejal, da so posledice seveda možne. Predvsem je pri tem izpostavil tehniko injiciranja, saj sam BTX na sinapsah ne pušča trajnih posledic.

Ker smo o uporabi BTX izvedeli praktično samo pozitivne lastnosti, smo ga povprašali, kako je z njegovo uporabo v kombinaciji z dermalnimi polnili. Poudaril je, da je moramo razlikovati med aktivnimi oz. kinetičnimi oz. mimetičnimi linijami obraznega izraza in med pasivnimi, ki so prisotne tudi v stanju mirovanja.

Prve se razvijejo zaradi ponavljajočih se kontrakcij obraznih mišic, kar vodi v nastanek različnih obraznih izrazov, npr.: vertikalnih glabelarnih gub, smejalnih linij ter prečnih gub na čelu, slednje so posledica dvigovanja obrvi, zaradi krčenja frontalne mišice. Botulinski toksin torej deaktivira mišice obraznega izraza, odgovorne za razvoj dinamičnih oz. mimetičnih gub. Za doseganje optimalnih rezultatov pa moramo zelo natančno poznati

obrazne mišice in njihovo delovanje, saj se le tako lahko izognemo morebitnim neželenim zapletom. Povedal je, da najpogosteje posegajo v naslednje mišice gornjega dela obraza: frontalis, procerus, corrugator/depressor supercilii complex, orbicularis oculi in nasalis (Slika 10).



**Slika 10: Mišice zgornjega dela obraza (18)**

Skozi vrsto let se oblikujejo tudi gube, ki so prisotne ob mirovanju. Gre za posledico preoblikovanja in razgradnje kolagena v globljih plasteh dermisa in samega podkožnega tkiva. V tem primeru je učinek BTX zanemarljiv, saj so gube prisotne tudi takrat, ko mišice niso aktivne. Zato naš sogovornik priporoča uporabo BTX mlajšim posameznikom, pri katerih se šele pričenjajo razvijati aktivne linije obraznega izraza, želijo pa preprečiti nastanek statičnih gub. Tipična starost takih oseb je okoli 30 do 50 let.

Povedal nam je tudi, da so dermalna polnila, kot so kolagen in derivati hialuronske kisline, najboljša opcija za zmanjševanje globokih statičnih gub. Te spojine namreč zapolnijo dermis ter s tem povzdignejo površino kože in zmanjšajo globino gub oz. linij. To pa v kombinaciji z BTX daje izjemne rezultate.

Njegova navdušenost predvsem nad HA je bila presenetljiva. Gre za snov, ki jo vsebuje naša koža, kar je njena velika prednost, vendar pa je pogostost njenega apliciranja na vsakih nekaj mesecev precej moteča. Podobne učinke bi lahko dosegli s trajnimi polnili, npr. silikonom. Veliko žensk se zaradi stremjenja k popolnosti oz. lepotnim idealom, odloča za trajno povečanje ustnic ali za poudarjanje kontur obraza s permanentnimi polnili. Glede na to, da je silikon dokaj inertna snov, ki se v telesu ne razkraja, smo predpostavljali, da je njegova uporaba zelo priljubljena med kirurgi. Naš sogovornik pa je jasno povedal, da se uporabi silikonskih materialov in drugih permanentnih polimernih polnil na široko izogibajo, saj so posledice njihove rabe lahko razmeroma hude. Trajna polnila namreč

predstavljajo potencialno grožnjo za videz na daljši rok (po nekaj letih), ko tkiva s staranjem izgubljajo svojo napetost in elastičnost. V primeru uporabe trajnih polnil so posamezni predeli obraza pravzaprav impregnirani z apliciranim materialom, drugi pa ne. Material tudi ne ostaja na mestu, kamor smo ga vstavili, ampak migrira, polzi in lahko zato povzroča hude oblike lokalnih vnetij. Prav tako je precej težavno tudi njegovo odstranjevanje, saj je za to potreben operacijski poseg.

## 5. SKLEP

Po temeljitnem pregledu in analizi podatkov iz literature ter ob upoštevanju informacij, ki smo jih pridobili od zdravnika, specialista za estetsko kirurgijo, smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Na področju estetske kirurgije je raba botulinskega toksina (BTX) A zelo učinkovita in tudi varna. Zaradi porazdelitve BTX v ostala tkiva lahko pride do neželenih učinkov, zato je potrebno natančno izbrati ustrezen botulinski pripravek, njegov odmerek in mišico, kamor se ga aplicira.
- S številnimi raziskavami delovanja BTX niso ugotovili smrtnih ali za življenje nevarnih neželenih učinkov pri uporabi odmerkov za estetske namene.
- Uporaba BTX še vedno narašča in trenutno predstavlja najpogostejši postopek v estetski medicini, saj je hiter, neboleč in zelo učinkovit.
- Botulinski toksin je zelo uporaben za preprečevanje gubic, saj sprosti prenapete mišice in tako odpravlja dinamične obrazne linije, ki nastanejo zaradi ponavljajočega se delovanja mimičnih mišic.
- Botulinski toksin ima stalen učinek tudi pri dolgotrajni, celo večletni uporabi. Zato lahko terapijo z njim kadarkoli prekinemo in jo ponovno, brez posledic nadaljujemo, ko to želimo. Njegov učinek bo torej ves čas enak in enako dolg.
- Biorazgradljiva dermalna polnila predstavljajo najboljšo možnost za nekirurško pomlajevanje, in sicer zaradi majhne pojavnosti alergij, z njimi izzvanih vnetij in drugih neželenih pojavov.
- Kožna polnila, ki vsebujejo hialuronsko kislino (HA), povrnejo izgubljeno polnost kože ter odpravljajo statične obrazne linije tako, da nadomestijo pomanjkanje naravne HA v tkivu.
- Kombinirana terapija z BTX in polnili, ki vsebujejo HA, predstavlja trenutno zlati standard nekirurškega pomlajevanja kože.
- Preobčutljivost in pojav alergij sta tako redka, da lahko kombinirano ali posamezno uporabo kolagena in/ali HA opredelimo kot varno.
- Nekatera podjetja so poskušala izdelati polnila tudi iz drugih materialov, na primer iz alg, vendar pa se je izkazalo, da so imunski odzivi in tveganja za pojav neželenih reakcij preveliki.

- Kljub izboljšani farmakologiji ter boljšim tehnikam injiciranja, je uporaba permanentnih polnil tvegana, in sicer zaradi nevarnosti tvorbe granulomov, pojavov akutnih in zakasnjenih okužb, premikanja polnil in nastanka deformacij po njihovi odstranitvi ali zaradi zapletov po aplikaciji tovrstnega polnila.

## 6. LITERATURA

- 1) <http://umm.edu/%20health/%20medical/%20reports/%20articles/%20skin-wrinkles-and-blemishes> (dostopano 5. 8. 2014)
- 2) <http://www.drball.com/facial-aging.php> (dostopano 5. 8. 2014)
- 3) Ascher B, Landau M, Rossi B: Injection treatments in cosmetic surgery, Informa, UK, 2009: 71–423.
- 4) Cohen A. C, DasGupta B. R, Lacy B. D, Stevens C. R, Tepp W: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. Nature structural biology 1998; 10: 898-902. Pridobljeno 6. 8. 2014, iz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=nat+struct+biol+1998%2C+5%3A898-902>
- 5) Lipam J. W: Cosmetic and Clinical Applications of Botox and Dermal Fillers, SLACK Incorporated, Thorofare, 2008: 1–157.
- 6) Aston S. J, Steinbrech D. S, Walden J. L: Aesthetic plastic surgery, Saunders, London, 2009: 847–882.
- 7) Meagher M. M, Potter J. K, Smith A, Zhang W: Production and Purification of the Heavy Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A, Expressed in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. Journal Series of the Nebraska Agricultural Research Division 2000; 19: 393-402. Pridobljeno 4. 8. 2014, iz <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1004&context=cbmemeagher>
- 8) Janis J. E: Essentials of Plastic Surgery: A UT Southwestern Medical Center Handbook, Quality Medical Publishing, Inc, St. Louis, 2007: 766–776.
- 9) <http://www.madsci.org/posts/archives/2001-04/986571103.Bc.r.html> (dostopano 7. 8. 2014)
- 10) <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm077277.htm> (dostopano 7. 8. 2014)
- 11) <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm176124.htm> (dostopano 7. 8. 2014)
- 12) Bostian A. K, Schmidt J. J: Proteolysis of Synthetic Peptides by Type A Botulinum Neurotoxin. Journal of Protein Chemistry 1995; 14: 703-704. Pridobljeno 5. 8. 2014, iz <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01886909#page-2>

- 13) <http://www.studentpulse.com/articles/324/botulinum-toxins-bad-bug-or-miracle-medicine> (dostopano 5. 8. 2014)
- 14) Michaels B. M, Csank G. A, Ryb G. E, Eko F. N, Rubin A: Prospective Randomized Comparison of OnabotulinumtoxinA (Botox) and AbobotulinumtoxinA (Dysport) in the Treatment of Forehead, Glabellar, and Periorbital Wrinkles. Aesthetic Surgery Journal 2012; 32: 96–102. Pridobljeno 2. 8. 2014, iz <http://aes.sagepub.com/content/32/1/96.full>
- 15) Lynn A. K, Yannas I. V, Bonfield W: Antigenicity and Immunogenicity of Collagen. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2004; 71B: 223–447.
- 16) <http://www.eu.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780702030895/Chapter%2007.pdf> (dostopano 7. 8. 2014)
- 17) <http://jolidermis.de/doc/injection-treatment.html> (dostopano 5. 8. 2014)
- 18) [http://www.medscape.org/viewarticle/769482\\_transcript](http://www.medscape.org/viewarticle/769482_transcript) (dostopano 5. 8. 2014)