

Research Paper

Evaluation of the Effects of Different Crosslinking Technologies on Hyaluronic Acid Behavior-study of Five Hyaluronic Acid Gels Available in Iran Market



Mehdi Aghsami<sup>1</sup>, \*Marjan Shariatpanahi<sup>1</sup>, Hamed Montazeri<sup>2</sup>, \*Negar Mottaghi-Dastjerdi<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.  
2. Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



**Citation** Aghsami M, Shariatpanahi M, Montazeri H, Mottaghi-Dastjerdi N. [Evaluation of the Effects of Different Crosslinking Technologies on Hyaluronic Acid Behavior-study of Five Hyaluronic Acid Gels Available in Iran Market (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2023; 32(2):116-127. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.2.2078.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.2.2078.1>



**Received:** 12 Dec 2022  
**Accepted:** 05 Apr 2023  
**Available Online:** 01 Jul 2023

**ABSTRACT**

**Background** The rheologic, mechanical, and pharmacological characteristics of hyaluronic acid (HA) gels vary in terms of their specific crosslinking technologies.

**Objective** To evaluate the various characteristics of selected HA gels available in Iran, using simple, inexpensive, and reproducible experimental tests are necessary to better understand their appropriateness for specific indications.

**Methods** The HA gels produced by various crosslinking technologies were evaluated by three experiments, including cohesivity, resistance to stretch, and microscopic examination. The gels subjected to these experiments in this study included Neuramis, Desirial, Belotero, Restylane, and Juvéderm.

**Results** We found that cohesivity was different among the gels so that Desirial was the least cohesive and Belotero was the most cohesive gel. Other HA gels were observed as partially cohesive. The resistance to stretch test confirmed the cohesivity results and Belotero had the most significant resistance. Microscopic examination of the HA gels showed HA particles of varying distribution and size. Belotero and Desirial were the gels with no particles visible under the microscope.

**Conclusion** Simple and inexpensive laboratory tests help to understand the way that they can affect the specific gel performance, and may be beneficial for physicians to decide on the best product for a particular therapeutic indication.

**Keywords:**

Hyaluronic acid, Gel, Filler, Crosslinking

**\* Corresponding Authors:**

**Negar Mottaghi-Dastjerdi**

**Address:** Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Tel:** +98 (912) 2936592

**E-Mail:** [Mottaghi.n@iums.ac.ir](mailto:Mottaghi.n@iums.ac.ir)

**Marjan Shariatpanahi**

**Address:** Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Tel:** +98 (21) 44606181

**E-Mail:** [Shariatpanahi.m@iums.ac.ir](mailto:Shariatpanahi.m@iums.ac.ir)

## Extended Abstract

### Introduction

**H**yaluronic acid (HA) gels were first introduced in 1996 and since then, bovine collagen was replaced by HA gels for aesthetic procedures in daily practice. HA has an identical chemical structure in its native form among various species. In addition, HA has an exceptional physicochemical and viscoelastic characteristics, which makes it suitable for the development of various HA-based medical products [7]. However, endogenous HA has a short half-life and therefore, it is necessary to increase its half-life by the introduction of chemical modifications via a crosslinking process. This process alters the 3D structure of the chains of HA and leads to the development of gels with various characteristics. Two steps are basically used for HA crosslinking. At first, HA is dissolved and linearized in a medium with an alkaline pH. Then, a crosslinker is added to the medium with temperature control. The rheologic, mechanical, and pharmacological characteristics of HA gels vary in terms of their specific crosslinking technologies [6]. Differences in the final amount of crosslinked HA in the HA gels influence the behavior of the gels; therefore, the technique and depth of injection should be selected based on the HA gel. To evaluate the various characteristics of selected HA gels available in Iran, using simple, inexpensive, and reproducible experimental tests are necessary to better understand their appropriateness for specific indications.

### Methods

In this study, the HA gels produced by various crosslinking technologies were evaluated by three experiments, including microscopic examination, cohesivity test, and resistance to stretch test. The gels subjected to these experiments in this study included Neuramis, Desirial, Belotero, Restylane, and Juvéderm. In the microscopic examination test, each gel was stained with toluidine blue and then the structure of the stained gel was examined under the microscope. In the cohesivity test, saline solution was mixed with Ecoline, and the mix was added to the HA gel. Then, ethanol was added; photos were captured before and after this addition to evaluating the cohesivity maintenance of the gel. Omnican syringes were used to examine the gels. In the resistance to stretch test, Adson's plier was used to stretch the gel, and the length was measured.

### Results

**Microscopic examination:** All gels in this experiment showed differences in their viscosity during the slide preparation in the microscopic examination test. This difference was significant, especially during the spreading on the slide. Microscopic examination of the HA gels showed HA particles of varying distribution and size. Belotero and Desirial were the gels with no particles visible under the microscope. The microscopic structure of Neuramis was similar to Restylane. Neuramis was a biphasic gel. Desirial was shown to be a monophasic gel without any particles under the microscope. Belotero was similar to Desirial under the microscope. As a monophasic gel, Belotero was shown to be a network without particles. Microscopic examination of the HA gels showed HA particles of varying distribution and size.

**Cohesivity test:** None of the gels were dispersed upon contact with the saline solution, and ethanol addition did not increase their dispersion. We found that cohesivity was different among the gels so that Desirial was the least cohesive and Belotero was the most cohesive gel. Other HA gels were observed as partially cohesive.

**Resistance to stretch test:** It was impossible to stretch Neuramis and Desirial gels more than 0.6 cm without breaking. These gels have lidocaine and antioxidant, which may influence their viscoelastic properties. Belotero had no lidocaine or antioxidant and was stretched more than 2.5 cm without breaking. The resistance to stretch test confirmed the cohesivity results and Belotero had the most significant resistance.

### Discussion

Different crosslinking technologies are used for the production of HA gels. These technologies influence the viscoelastic properties of the final product. NASHA is the technology used for the production of Restylane gel. In this technology, 1, 4- butanediol diglycidyl ether (BDDE) is used as the crosslinking agent in the manufacturing process of NASHA technology. This agent leads to few crosslinks among the chains of polysaccharides. The final partially viscose matrix is then dried. Using filters, the final suitable particles are obtained for the product's clinical indication [10]. The technology used for the production of Juvéderm gel is called Vycross. In this technique, the final product contains a high amount of low molecular weight HA compared to the high molecular weight HA. The low and high molecular weight molecules are mixed through a single step called crosslinking process [9]. CPM is the technology used for the production of the Belotero gel.

In this technology, two more steps are performed in addition to the classic crosslinking process, which leads to a poly-dense monophasic product, in which the crosslinked HA is maintained within a cohesive matrix [11]. SHAPE is the technology used for the production of Neuramis gel. This technology involves two crosslinking steps and an additional purification step, which removes the non-crosslinked BDDEs [10]. Simple and inexpensive laboratory tests help to understand the way that they can affect the performance of a specific gel and may be beneficial for physicians to decide on the best product for a particular therapeutic indication.

## **Ethical Considerations**

### **Compliance with ethical guidelines**

This study was approved by the ethics committee of the [Iran University of Medical Sciences](#) (Code: IR.IUMS.REC.1399.1330)

### **Funding**

The present study was funded by the Deputy for Research and Technology of [Iran University of Medical Sciences](#).

### **Authors' contributions**

Conceptualization, study design and drafting of the manuscript: Negar Mottaghi-Dastjerdi; Acquisition, analysis, and interpretation of data: Mehdi Aghsami; Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Marjan Shariatpanahi and Hamed Montazeri; Study supervision: Negar Mottaghi-Dastjerdi and Marjan Shariatpanahi

### **Conflicts of interest**

The authors declared no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the [Iran University of Medical Sciences](#).



مقاله پژوهشی

بررسی اثر تکنولوژی‌های مختلف کراس لینک بر رفتار هیالورونیک اسید: مطالعه ویژگی‌های ۵ هیدروژل هیالورونیک اسید موجود در بازار ایران

مهدی اقسامی<sup>۱</sup>، \*مرجان شریعت‌پناهی<sup>۱</sup>، حامد منتظری<sup>۲</sup>، \*نگار متقی دستجردی<sup>۲</sup>

۱. گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲. گروه فارماکونوزی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.



**Citation** Aghsami M, Shariatpanahi M, Montazeri H, Mottaghi-Dastjerdi N. [Evaluation of the Effects of Different Crosslinking Technologies on Hyaluronic Acid Behavior-study of Five Hyaluronic Acid Gels Available in Iran Market (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2023; 32(2):116-127. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.2.2078.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.2.2078.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۱ آذر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۶ اسفند ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۲

**زمینه:** تکنولوژی‌های گوناگون کراس لینک کردن هیالورونیک اسید در ژل‌های مختلف بر ویژگی‌های رئولوژیک، مکانیکال، و فارماکولوژیک آن‌ها تأثیر می‌گذارد.

**هدف:** به منظور ارزیابی ویژگی‌های مختلف ژل‌های منتخب موجود در بازار دارویی ایران، آزمایشات ساده، ارزان و تکرارپذیر انجام شد تا درک بهتری از مناسب بودن آن‌ها برای موارد مصرف خاص، حاصل شود.

**روش‌ها:** ژل‌های هیالورونیک اسید تولیدشده با استفاده از تکنولوژی‌های مختلف کراس لینک کردن، با استفاده از ۳ آزمایش ارزیابی شد. این آزمایشات شامل چسبندگی، مقاومت در برابر کشش و بررسی میکروسکوپی بود. نورامیس، دزیريال، بلوترو، رستیلین و ژوودرم، از جمله ژل‌هایی بودند که در این مطالعه تحت آزمایشات مذکور قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** میزان چسبندگی ژل‌ها بسیار متفاوت بود. دزیريال کمترین و بلوترو بالاترین میزان چسبندگی را نشان دادند. سایر ژل‌ها نسبتاً چسبنده بودند. آزمون مقاومت در برابر کشش نیز نتایج آزمایش چسبندگی را تأیید کرد و در آن، بلوترو بالاترین مقاومت در برابر کشش را از خود نشان داد. بررسی‌های میکروسکوپی ژل‌ها حاکی از تفاوت در اندازه و توزیع ذرات هیالورونیک اسید بود. بلوترو و دزیريال در زیر میکروسکوپ، فاقد ذره بودند.

**نتیجه‌گیری:** ژل‌های هیالورونیک اسید از طریق تکنولوژی‌های مختلف کراس لینک کردن تولید می‌شوند. استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی ساده و ارزان قیمت کمک می‌کند تا درک بهتری از نحوه تأثیر عملکرد ژل‌های خاص داشته باشیم و این مسئله می‌تواند در تصمیم‌گیری پزشکان در خصوص انتخاب بهترین محصول برای یک مورد مصرف خاص، مفید واقع شود.

کلیدواژه‌ها:

هیالورونیک اسید، ژل، فیلر، کراس لینک

\* نویسندگان مسئول:

نگار متقی دستجردی

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکونوزی و بیوتکنولوژی دارویی.

تلفن: ۲۹۳۶۵۹۲ (۹۱۲) ۰۹۸

رایانامه: [Mottaghi.n@iums.ac.ir](mailto:Mottaghi.n@iums.ac.ir)

مرجان شریعت‌پناهی

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی.

تلفن: ۴۴۶۰۶۱۸۱ (۲۱) ۰۹۸

رایانامه: [Shariatpanahi.m@iums.ac.ir](mailto:Shariatpanahi.m@iums.ac.ir)

## مقدمه

برای کراس‌لینک کردن استفاده می‌کنند، مشابه است. در مرحله نخست، هیالورونیک اسید در یک محیط بازی حل شده و خطی می‌شود و سپس، یک ماده کراس‌لینک‌کننده تحت دمای کنترل شده، به آن افزوده می‌شود. باین حال، تکنیک‌های مورد استفاده برای کراس‌لینک کردن هیالورونیک اسید در میان تولیدکنندگان مختلف، متفاوت است و مقادیر نهایی هیالورونیک اسید کراس‌لینک شده در محصول نهایی، متفاوت است. این تفاوت‌ها بر رفتار ژل‌ها تأثیرگذار است. بنابراین، عمق تزریق و تکنیک‌های آن باید براساس محصول ژل هیالورونیک اسید، بهینه‌سازی شود [۷].

آزمون هم‌ارزی زیستی (بایواکی والانس) از مهم‌ترین آزمون‌های آزمایشگاهی بالینی جهت بررسی عملکرد فرآورده‌های دارویی است. آنچه در این آزمون بررسی می‌شود، مقایسه فراهمی زیستی یک فرآورده ژنریک ساخته‌شده با فراهمی زیستی فرآورده مرجع است [۸]. در مطالعه حاضر، آزمایش‌های ارزان و تکرارپذیری استفاده شده است که به راحتی در آزمایشگاه قابل استفاده هستند. استفاده از چنین آزمایش‌هایی این امکان را فراهم می‌کند تا درک بهتری از ویژگی‌های ژل‌های هیالورونیک اسید تولیدشده با تکنیک‌های مختلف کراس‌لینک کردن داشته باشیم.

## روش‌ها

## ژل‌های مورد استفاده در این مطالعه

در این مطالعه، از میان ژل‌های هیالورونیک اسید موجود در بازار دارویی ایران (بین سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱) که با تکنیک‌های کراس‌لینک کردن مختلف تولید شده‌اند، برندهای نورامیس، دزیرال، بلوترو، رستیلن، و ژویدرم مورد آزمایش قرار گرفتند. برخی از این ژل‌ها حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها (در برند دزیرال) یا لیدوکائین (در برند نورامیس) هستند که در مرحله کراس‌لینک کردن در حین تولید به محصول افزوده شده است. آزمایشات بر روی ژل‌ها به همان صورتی که در دسترس هستند، انجام شد. موارد مصرف تمامی ژل‌ها، زیبایی و برای پر کردن خطوط یا ایجاد حجم بود. این آزمایشات در آزمایشگاه‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. از رستیلن و ژویدرم به‌عنوان ژل‌های استاندارد استفاده شد. در این مطالعه، ۳ سری ساخت از هر محصول استفاده شد و برای هر آزمایش، ۳ بار تکرار روی هر سری ساخت از محصول انجام شد.

## ارزیابی میکروسکوپی

برای ارزیابی میکروسکوپی، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر ژل بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شد و به همان صورتی که برای آزمایشات هماتولوژیک انجام می‌شود، بر روی لام پخش شد. لام شیشه‌ای دیگری برای پخش کردن ژل‌ها بر روی لام مورد استفاده قرار

ژل‌های هیالورونیک اسید<sup>۱</sup> کراس‌لینک‌شده از زمان معرفی به بازار، به‌عنوان یک انتخاب درمانی ایده‌آل برای پر کردن چین و چروک‌ها و خطوط، جایگزین ژل‌های کلاژن گاو شدند. امروزه، ژل‌های هیالورونیک اسید سهم عمده‌ای از تکنیک‌های زیبایی غیرتهاجمی را در کاربردهای رایج به خود اختصاص می‌دهند [۱].

ساختار شیمیایی فرم اصلی هیالورونیک اسید بین تمامی گونه‌های مختلف یکسان است. این ویژگی، به همراه ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ویسکوالاستیک آن، به توسعه ابزارهای مختلف پزشکی مبتنی بر هیالورونیک اسید منجر شده است. با وجود این، به دلیل آنکه هیالورونیک اسید اندوژن دارای نیمه عمر کوتاهی است، ضروری است که هیالورونیک اسید تحت اصلاحات شیمیایی قرار گیرد تا بتوان به ژل‌هایی با عمر طولانی دست یافت [۲]. برای رسیدن به این هدف، از فرایند کراس‌لینک کردن استفاده می‌شود که در آن، ساختار ۳ بعدی زنجیره‌های هیالورونیک اسید تغییر یافته و به تولید دانه‌های میکروسفرهای هیالورونیک اسید و یک حالت ژله‌ای منجر می‌شود. محصولات مبتنی بر هیالورونیک اسید پتانسیل ایمونوژنیسیته پایینی دارند. باین وجود، ساختار تغییر یافته ژل‌های هیالورونیک اسید می‌تواند منجر به شناسایی آن‌ها به‌عنوان بیگانه توسط پوست شود [۳، ۴].

ژل‌های هیالورونیک اسید با درجه‌بندی دارویی و خلوص یکسان به‌عنوان ماده اولیه برای تولید محصولات مبتنی بر هیالورونیک اسید برای موارد مصرف زیبایی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. باین حال، وزن مولکولی هیالورونیک اسید از ۶۰۰ تا بیش از ۲۵۰۰ کیلوالتون متغیر است. محصولات نهایی ژل‌های هیالورونیک اسید از نظر روش کراس‌لینک کردن و غلظت هیالورونیک اسید، با یکدیگر تفاوت دارند. فرایندهای شیمیایی یا فیزیکی برای کراس‌لینک کردن هیالورونیک اسید مورد استفاده قرار می‌گیرند. باوجود این، ماده شیمیایی اصلی که برای کراس‌لینک کردن هیالورونیک اسید با کاربردهای زیبایی، مورد استفاده قرار می‌گیرد، ۱ و ۴-بوتان دیول دی گلاسیسیدیل اتر<sup>۲</sup> است. این ماده سبب پایدارسازی اکثر فیلرهای پوستی مبتنی بر هیالورونیک اسید که در حال حاضر در بازار دارویی موجود هستند، می‌شود [۴، ۵]. ویژگی‌های مناسب این ماده شامل پروفایل سمیت، زیست تجزیه‌پذیری و پایداری است که آن را به ماده‌ای ایده‌آل در مقایسه با سایر مواد، مانند دیوینیل سولفون تبدیل کرده است [۴، ۶].

فرایند کراس‌لینک کردن اساساً تحت ۲ مرحله انجام می‌شود که برای محصولات هیالورونیک اسید متعدد موجود در بازار دارویی که از ۱ و ۴-بوتان دیول دی گلاسیسیدیل اتر

1. Hyaluronic Acid (HA)  
2. 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE)

دارای بالاترین ویسکوزیته بود. به علاوه، در طول مرحله آبکشی، مقدار زیادی از ژل دزیريال شسته شد. این مورد در ژل‌های نورامیس، رستیلین و ژوویدرم، کمتر مشاهده شد. ژل بلوترو، دارای بالاترین میزان ویسکوزیته و چسبندگی به لام شیشه‌ای بود. میزان چسبندگی به لام شیشه‌ای در نورامیس، مابین بلوترو و رستیلین بود. ارزیابی میکروسکوپی ژل‌ها تفاوت‌های شاخصی را در ساختار آن‌ها نشان داد. در تصویر شماره ۱ نتایج مربوط به ژل‌های بلوترو، دزیريال و نورامیس نشان داده شده است.

### نورامیس

ساختار میکروسکوپی ژل نورامیس شبیه به رستیلین بود. ذرات هیالورونیک اسید به صورت ذرات شبه‌بالون (نه به صورت دانه‌های استوانه‌ای) کاملاً مشخص مشاهده شد. این ساختار میکروسکوپی شبیه به رستیلین بود. نورامیس نسبتاً چسبنده بود و این چسبندگی به لام شیشه‌ای از رستیلین و دزیريال بیشتر بود اما نسبت به بلوترو کمتر بود. این ساختار میکروسکوپی، تأیید کرد که نورامیس یک ژل ۲ فاز متشکل از ۱ فاز نیمه‌جامد از ذرات هیالورونیک اسید کراس‌لینک‌شده‌ای بود که در یک فاز مایع پراکنده شده است.

### دزیريال

ساختار میکروسکوپی این ژل به صورت یک شبکه به هم پیوسته بدون ذرات مشاهده شد. تصویر میکروسکوپی این ژل دانسیته کمتری را نشان داد و شبکه آن پیوستگی کمتری در مقایسه با سایر ژل‌ها از خود نشان داد. باتوجه به ماتریکس به هم پیوسته مشاهده شده در زیر میکروسکوپ و نبود ذرات، این ژل، مونوفازیک و نسبتاً چسبنده چسبندگی (به لام شیشه‌ای) کمتری از نورامیس و بلوترو داشت.

### بلوترو

ساختار میکروسکوپی ژل بلوترو مانند دزیريال، به صورت یک شبکه پیوسته بدون ذرات مشاهده شد. با در نظر گرفتن ساختار ماتریکس به هم پیوسته، این ژل بدون ذرات بلوترو، یک ژل مونوفازیک بود. این ژل در زیر میکروسکوپ دارای برخی نواحی با دانسیته بالاتر بود که این نواحی، رنگ بیشتری را به خود جذب کرده بودند.

### آزمون چسبندگی

نتایج آزمون چسبندگی نشان داد هیچ‌یک از ژل‌ها به محض تماس با محلول رنگی نمک نرمال پخش نشدند و افزودن اتانول، پراکندگی آن‌ها را افزایش نداد. ژل بلوترو کاملاً به صورت منسجم باقی ماند و پس از آن به ترتیب، نورامیس و دزیريال انسجام خود را در تماس با محلول رنگی نمک حفظ کردند.

گرفت. مقاومت هر ژل در برابر پخش شدن به صورت غیرمستقیم به عنوان تخمینی از ویسکوزیته ژل در نظر گرفته شد. سپس رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از تولوئیدن بلو به نسبت ۱:۲ انجام شد. ۶۰ ثانیه بعد از افزودن رنگ به ژل‌ها، ۲ بار با آب مقطر ۲ بار تقطیر، آبکشی انجام شد. چسبندگی ژل‌ها به لام شیشه‌ای در طول آبکشی، مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، لام با لامل پوشانده شد و در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX31 RBSF) قرار داده شد تا ساختار ژل‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد [۹].

### آزمون چسبندگی<sup>۳</sup>

یک قطره اکولین (Ecoline® no.548 Talens® blue cio-) به عنوان ماده رنگ‌آمیزی به محلول نمک نرمال (۵۰ NaCl) میلی‌لیتر، ۰/۹ درصد) افزوده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از این محلول، بر روی یک پتری دیش قرار داده شد و ۲/۵ میکرولیتر اکولین به محلول موجود در پتری دیش افزوده شد. پس از مخلوط کردن، ۰/۲ میلی‌لیتر از ژل، به این محلول رنگی افزوده شد. افزودن ژل به محلول رنگی تحت فشار اندک پلانچر سرنگ انجام شد تا از هرگونه تغییر در ویژگی‌های ویسکوالاستیک هر ژل جلوگیری شود. هیچ‌گونه استرس یا اختلال دیگری بر ژل‌ها اعمال نشد. در نهایت، اتانول ۷۰ درصد (۲ قطره) افزوده شد و به آرامی مخلوط شد. قبل و بعد از افزودن اتانول، عکس‌برداری انجام شد. هر آزمایش ۳ بار بر روی هر ژل انجام شد. هر ژل به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بررسی شود که آیا ژل‌ها به صورت رشته‌های بلند و چسبنده باقی می‌مانند یا به چندین رشته یا ذرات کوچک‌تر تبدیل می‌شوند و انسجام خود را از دست می‌دهند.

### آزمون مقاومت در برابر کشش

هر ژل (۰/۲ میلی‌لیتر) بر روی پتری دیش قرار داده شد و سپس با استفاده از پنس ادسون فشرده و رها شد تا مقاومت در برابر کشش بررسی شود. یک عکس از ژل زمانی که ژل در بالاترین موقعیت کشیده شدن قرار داشت گرفته شد و میزان کشیده شدن با استفاده از یک کاغذ مدرج اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۳ بار برای هر ژل انجام شد.

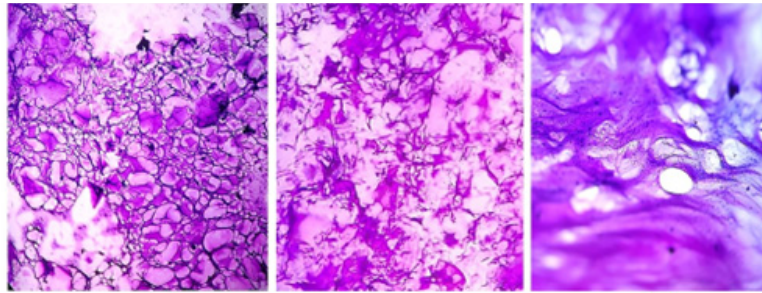
### یافته‌ها

#### ارزیابی میکروسکوپی

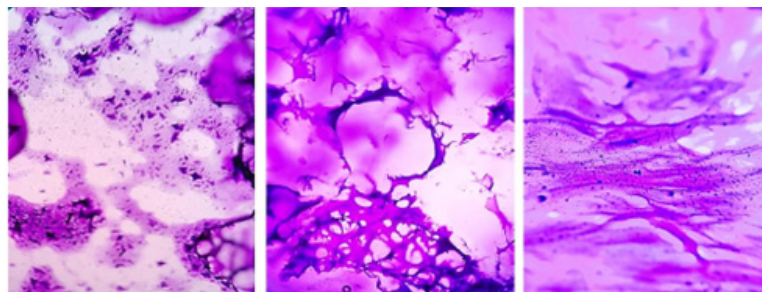
برای تمامی ژل‌های تحت آزمایش در این مطالعه، تفاوتی در ویسکوزیته حین آماده‌سازی اسلاید مشاهده شد. این تفاوت، به خصوص حین پخش کردن ژل بر روی لام مشاهده شد. دزیريال دارای پایین‌ترین ویسکوزیته و بلوترو به‌طور شاخص

3. Cohesivity

الف



ب نورامیس      دزیریال      بلوترو



نورامیس      دزیریال      بلوترو

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۱. ظاهر ژل‌های هیالورونیک اسید (نورامیس، دزیریال و بلوترو) زیر میکروسکوپ نوری. ردیف بالا با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شده است (بزرگ‌نمایی ۴ برابر). تصاویر ردیف پایین با استفاده از تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شده است (بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر).

که در تهیه فیلر رستیلین مورد استفاده قرار گرفته است، NA-SHA نام دارد که مخفف هیالورونیک اسید پایدار شده غیر حیوانی<sup>۴</sup> است. در این تکنیک، افزودن مقادیر اندکی ۱ و ۴-بوتان دیول دی گلاسیفیک اتر سبب ایجاد کراس‌لینک‌های کم میان زنجیره‌های پلی ساکاریدها می‌شود. درجه کراس‌لینک شدن در محصول نهایی بین ۱ تا ۲ درصد گزارش شده است. ماتریکس نسبتاً ویسکوز به‌دست آمده، خشک شده و سپس، الک شده یا از فیلترهایی عبور داده می‌شود تا ذرات ژلی متناسب با موارد مصرف بالینی محصول نهایی به دست آید. این فرایند، سبب ساخت دانه‌های جامد هیالورونیک اسید می‌شود که پس از آن در یک حامل کراس‌لینک‌نشده مانند سدیم کلراید (۰/۹ درصد) در بافر فسفات یا یک ژل هیالورونیک اسید کراس‌لینک‌نشده به‌صورت سوسپانسیون درمی‌آید. تعداد و اندازه دانه‌ها بسته به موارد مصرف ژل، متفاوت است. در مطالعه حاضر، از ژل رستیلین با قطر متوسط دانه برابر با ۲۵۰ میکرومتر (۱۰۰۰۰۰ دانه در میلی‌لیتر) استفاده شد [۱۰].

تکنولوژی مورد استفاده در تهیه فیلر ژوویدرم، Vycross<sup>®</sup> نام دارد. در این تکنیک، محصول، حاوی نسبت بالایی از مولکول‌های هیالورونیک اسید با وزن مولکولی پایین در برابر مولکول‌های با وزن مولکولی بالاست. در یک فرایند کراس‌لینک کردن تک‌مرحله‌ای، مولکول‌های با وزن مولکولی بالا و پایین با هم مخلوط می‌شوند.

افزودن اتانول، افزایش پراکندگی ایجاد نکرد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده چسبندگی ژل‌های مختلف بدین‌صورت بود که دزیریال دارای کمترین چسبندگی و بلوترو دارای بالاترین چسبندگی بود. ترکیبات افزوده‌شده به ژل نظیر لیدوکائین در نورامیس و آنتی‌اکسیدان در دزیریال ممکن است از فاکتورهای مؤثر بر انسجام ژل بوده و توجه‌کننده حفظ کمتر انسجام در این ژل در مقایسه با بلوترو باشد. در تصویر شماره ۲ نتایج مربوط به ژل‌های نورامیس، دزیریال و بلوترو نشان داده شده است.

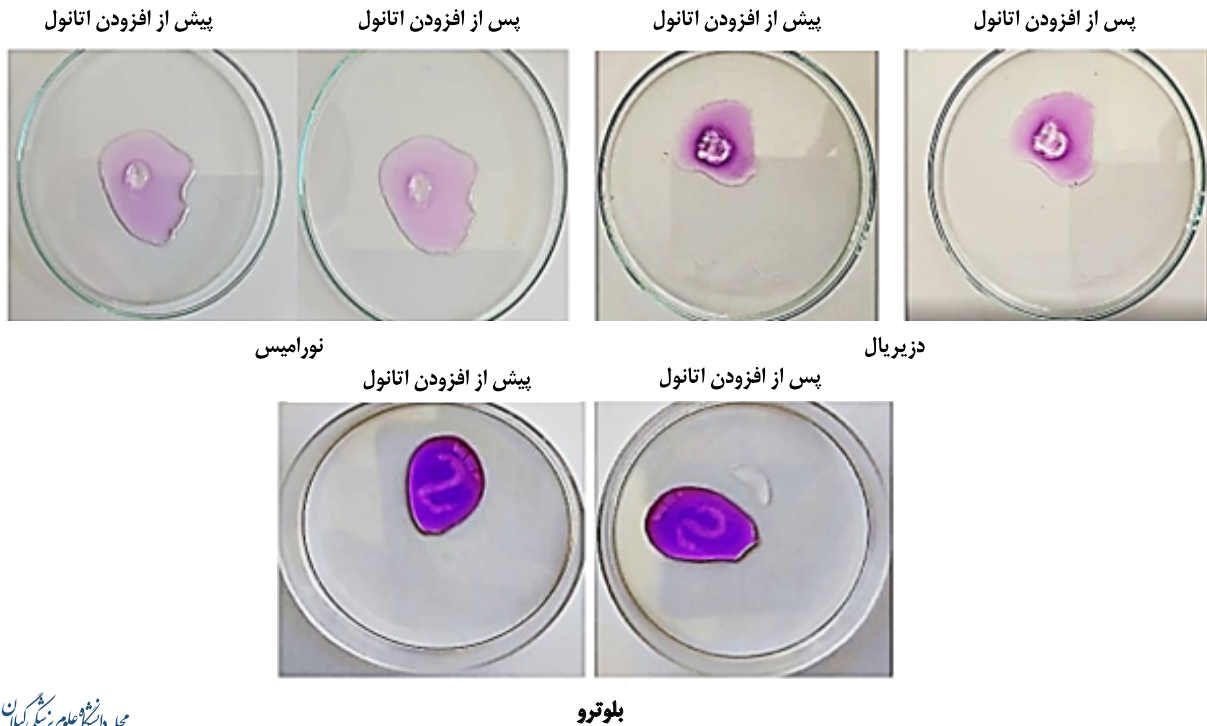
#### آزمون مقاومت در برابر کشش

برای ژل‌های نورامیس و دزیریال، کشیدن ژل تا فاصله‌ای بالاتر از ۰/۶ سانتی‌متر بدون بریده شدن، ممکن نبود. این ژل‌ها دارای مواد اضافی، مانند لیدوکائین و آنتی‌اکسیدان بودند که ممکن است در ایجاد تغییرات در چسبندگی محصولات و تغییرات در ویژگی‌های ویسکوالاستیک ژل‌ها دخیل باشد. باین‌حال، بلوترو که فاقد لیدوکائین یا آنتی‌اکسیدان بود تا فاصله‌ای بیش از ۲/۵ سانتی‌متر بدون بریده شدن کشیده شد. در تصویر شماره ۳ نتایج مربوط به برندهای نورامیس، بلوترو و دزیریال نشان داده شده است.

#### بحث

تکنولوژی‌های مورداستفاده توسط تولیدکنندگان مختلف فیلرهای هیالورونیک اسید، با یکدیگر متفاوت هستند. تکنولوژی

4. Non-animal stabilized hyaluronic acid



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

بلوترو

تصویر ۲. آزمون چسبندگی. ۰/۲ میلی لیتر از ژل هیالورونیک اسید به یک محلول رنگی نمکی در یک پتری دیش افزوده شد. به محض قرار گرفتن در محلول، هیچ یک از ژل‌ها پراکنده نشدند و افزودن اتانول، تأثیری بر پراکندگی آن‌ها نداشت. باین حال، بلوترو چسبنده ترین ژل بود که انسجام خود را به صورت یک رشته بلند پیوسته حفظ کرد. سایر ژل‌ها نسبتاً چسبنده بودند.

تکنولوژی مورد استفاده در فیلر دزیريال شبه شبکه متداخل<sup>۷</sup> نام دارد. در این تکنولوژی از ماتریکس‌های کراس لینک شده متعددی استفاده می‌شود که تحت فرایندی به نام شبه IPN قرار می‌گیرند تا یک ژل مونوفازیک حاصل شده و منتج به یک دانسیته مضاعف کراس لینک شود [۹].

براساس مطالعات انجام شده توسط میشلز و همکاران در سال ۲۰۱۶ [۹]، در مطالعه حاضر، از مجموعه‌ای از روش‌های ساده و درعین حال ارزان استفاده شد تا اثرات تکنولوژی‌های مختلف کراس لینک کردن بر رفتار هیالورونیک اسید با استفاده از ۵ محصول فیلر هیالورونیک اسید موجود در بازار دارویی ایران مورد ارزیابی قرار گیرد. این آزمایشات، به راحتی در مراکز پزشکی خصوصی یا در یک آزمایشگاه قابل انجام است. این نتایج، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را در رفتار ژل‌هایی که با تکنولوژی‌های مختلف کراس لینک کردن تولید شده‌اند، نشان داد. مرحله کراس لینک کردن برای کاهش تخریب هیالورونیک اسید ضروری است. باین حال، این مرحله، به منظور تغییر خصوصیات رئولوژیک ژل‌های هیالورونیک اسید که بر اثربخشی ژل برای استفاده در موارد مصرف خاص مؤثر است، نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹].

اتصال مولکول‌های ۱ و ۴-بوتان دیول دی گلايسيدیل اتر به کراس لینک شدن کارآمدتر منجر می‌شود. در مجموع، این محصول در مقایسه با محصولاتی مانند سرژیدرم، حاوی هیالورونیک اسید کمتری است [۹].

تکنولوژی مورد استفاده در محصول فیلر بلوترو، ماتریکس چسبنده پر تراکم<sup>۵</sup> نام دارد. این تکنولوژی، مبتنی بر یک روش کراس لینک کردن دوتایی داینامیک است. علاوه بر فرایند کلاسیک کراس لینک کردن، ۲ مرحله اضافی در این تکنولوژی، انجام می‌شود: افزودن مقادیر جدید هیالورونیک اسید و به دنبال آن، ادامه فرایند کراس لینک کردن. این کار سبب تولید یک محصول ژل مونوفازیک پلی دنس می‌شود که در آن هیالورونیک اسید کراس لینک شده را در یک ماتریکس چسبنده نگه می‌دارد [۱۱].

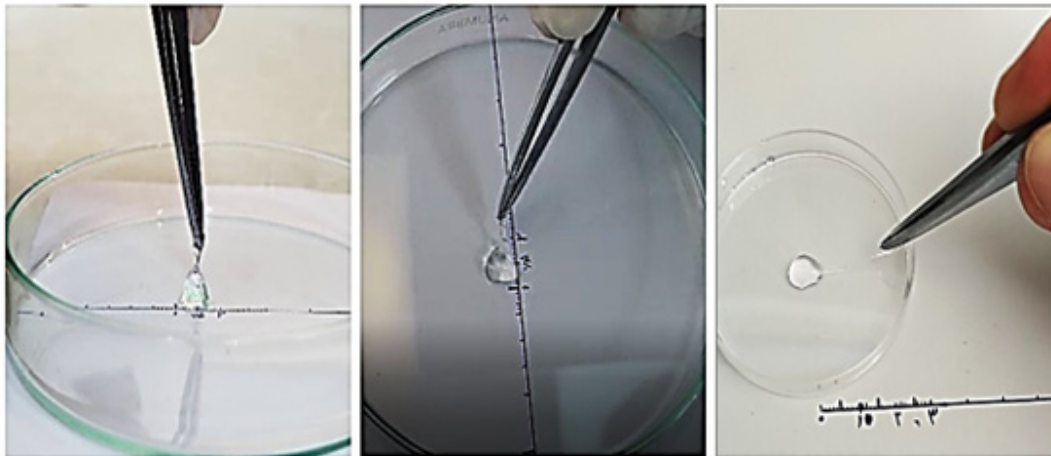
تکنولوژی مورد استفاده در تولید فیلر هیالورونیک اسید برند نورامیس SHAPE مخفف هیالورونیک اسید پایدار شده و افزایش خالص سازی<sup>۶</sup> نام دارد. این تکنولوژی شامل ۲ مرحله کراس لینک کردن و یک فرایند خالص سازی مضاعف است که در آن تمامی کراس لینک‌های متصل نشده، حذف می‌شوند [۹].

7. Interpenetrating Network-Like (IPN-Like<sup>®</sup>)

5. Cohesive Polydensified Matrix (CPM<sup>®</sup>)

6. Stabilized Hyaluronic Acid & Purification Enhancement





نورامیس

دزیريال

بلوترو

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۳. آزمون مقاومت در برابر کشش. میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از ژل بر روی پتری دیش قرار داده شد و با استفاده از پنس ادسون فشرده شد تا کشش ژل ارزیابی شود. عکسی از ژل در حالتی که در بالاترین میزان کشش قرار داشت گرفته شد و فاصله‌ای که کشیده شده بود با استفاده از کاغذ مدرج اندازه‌گیری شد.

آزمایشات ساده و تکرارپذیر به منظور روشن شدن مکانیسمی که از طریق آن ژل‌های مختلف با الاستین و کلاژن در پوست ترکیب می‌شوند، بسیار مفید است. براساس مطالعات قبلی، بیوپسی‌های پوستی بعد از چندین تزریق ژل هیالورونیک اسید، رفتار بافتی قابل‌پیش‌بینی را نشان می‌داد که براساس تکنولوژی مورد استفاده برای کراس‌لینک کردن، متفاوت بود [۹، ۱۲]. بلوترو، به‌عنوان یک ژل مونوفازیک، رنگ‌آمیزی هوموژنی را از خود نشان داد که به تمام قسمت‌های پوست به‌صورت یکنواخت، منتشر شده بود. نورامیس به‌عنوان یک ژل ۲ فازی، مشابه با رستیلین [۹] بود که به‌عنوان مخازن بزرگ هیالورونیک اسید به‌صورت دسته‌ها یا ترشحات پراکنده‌ای از مواد در قسمت پایینی پوست مشاهده می‌شد و در میان بخش میانی و بالایی پوست هیچ ماده‌ای مشاهده نشد. محصولات مونوفازی مانند دزیريال در این مطالعه، ماده هیالورونیک اسید را در تمام قسمت‌های پوست به‌صورت مخازن بزرگی نشان دادند [۹]. این الگوهای یکسان در میان بیماران، قابل‌پیش‌بینی است [۱۲]. توانایی بلوترو در پراکندگی یکنواخت در ناحیه هدف و بافت‌های مجاور، مربوط به وجود نواحی با درجات متغیر کراس‌لینک شدن است که در آن برخی نواحی سخت‌تر هستند، یعنی دانسیته کراس‌لینک‌شده بالاتری دارند و این نواحی، مجاور مناطق نرم‌تر هستند که دانسیته کراس‌لینک‌شده، پایین‌تر است [۱۳]. این امر، به حفظ انسجام ژل و مقاومت چشمگیر آن در برابر تغییر شکل منجر می‌شود. ویسکوزیته پایین در نورامیس و دزیريال، تزریق آسان‌تر آن‌ها را از طریق نیدل‌های با قطر کمتر و با فشار کمتر میسر می‌کند. گزارشات نشان می‌دهند که بلوترو توزیع یکنواختی در گستره بافت داشته و بنابراین می‌تواند در محدوده عمقی وسیع‌تری در بافت، همانند نواحی بسیار سطحی برای اصلاح خطوط بسیار ریز

آزمون چسبندگی به‌منظور ارزیابی توانایی فیلر در مقاومت در برابر تغییر شکل و حفظ انسجام آن، مورد استفاده قرار گرفت. چسبندگی و جی‌پرایم (مدول الاستیسیته) یک ژل عوامل مؤثر بسیار مهمی برای پتانسیل لیفتینگ در یک فیلر محسوب می‌شوند. اندازه‌گیری کمی چسبندگی یک ژل می‌تواند با استفاده از میزان فشار موردنیاز برای فشردن ژل بین ۲ صفحه انجام شود. در مطالعه حاضر، چسبندگی به‌صورت کیفی اندازه‌گیری شد و پراکندگی ژل در مخلوط شدن با یک محلول رنگی سالیین ارزیابی شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر، نشان‌دهنده چسبندگی ژل‌های مختلف بدین صورت بود که دزیريال دارای کمترین چسبندگی و بلوترو دارای بالاترین چسبندگی بود. ترکیباتی که حین پروسه کراس‌لینک کردن به ژل افزوده می‌شوند (نظیر لیدوکائین در نورامیس و آنتی‌اکسیدان در دزیريال) می‌توانند از فاکتورهای مؤثر بر انسجام ژل بوده و توجیه‌کننده حفظ کمتر انسجام در این ژل در مقایسه با بلوترو باشد. بلوترو، به‌عنوان فیلر دارای بالاترین میزان چسبندگی، به‌صورت رشته‌های بلند پیوسته باقی ماند و حتی پس از افزودن اتانول نیز انسجام خود را حفظ کرد. مطالعات نشان می‌دهند ژل‌های غیر چسبنده مانند رستیلین در مواجهه با محلول سالیین رنگی، پراکنده شده و افزودن اتانول، پراکندگی آن‌ها را افزایش می‌دهد [۹]. ارزیابی بیشتر چسبندگی با آزمون مقاومت ژل در برابر کشش، انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر، این نتایج را تایید کرد. بلوترو بالاترین قابلیت کشیدگی را در آزمون مقاومت در برابر کشیده شدن (۲/۵ سانتی‌متر) نشان داد، درحالی‌که، نورامیس و دزیريال بیشتر از ۰/۶ سانتی‌متر کشیده نشدند.

یک فیلر در کنار انتخاب تکنیک مناسب و عمق مناسب تزریق و توجه به خصوصیات بیمار، از جمله ضخامت پوست می‌تواند برای پزشکان در انتخاب بهترین محصول جهت رسیدن به بهترین نتیجه، کمک‌کننده باشد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ایران تصویب شد (کد اخلاق: IR.IUMS.REC.1399.1330).

#### حامی مالی

این مطالعه تحت حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

#### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، طراحی مطالعه، تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته: نگار متقی دستجردی؛ کسب، تحلیل و تفسیر داده‌ها: مهدی اقسامی؛ بازبینی نقادانه دست‌نوشته برای محتوای فکری مهم: مرجان شریعت‌پناهی، حامد منتظری قدس، نظارت بر مطالعه: نگار متقی دستجردی، مرجان شریعت‌پناهی.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از دانشگاه علوم پزشکی ایران اعلام می‌دارند.

تا عمیق تزریق شود. با این حال، محصولاتی مانند ژویدرم که با تکنولوژی‌های کراس‌لینک کردن متفاوتی تولید می‌شوند، متشکل از ژل‌هایی با مخلوطی از هیالورونیک اسیدهای کراس‌لینک‌شده هستند. این مخلوط شامل مولکول‌های هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا و پایین هستند که در آن مولکول‌های با زنجیره کوتاه، غالب هستند. این تکنولوژی ژلی با چسبندگی متوسط را تولید می‌کند که دارای جی‌پرایم بالا بوده و سخت است. این ویژگی‌ها سبب ایجاد یک ژل حجم‌دهنده مناسب برای تزریق سوپریوستال یا زیرجلدی می‌شوند [۹].

آزمایشات میکروسکوپی نیز مؤید ماهیت مونوفازیک یا ۲ فاز بودن هریک از محصولات فیلر بود. توزیع ذرات نیز در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. بلوترو و دزیرال، محصولات فاقد ذره بودند و نورامیس محصول پارتیکوله مشابه با رستیلین بود. مورفولوژی میکروسفرها در محصولات پارتیکوله، قبلاً به‌عنوان عوامل ایجاد واکنش‌های ناخواسته، از جمله واکنش‌های با شیوع پایین همچون گرانولوماتوز به دنبال استقرار میکروسفرها در سطوح نرم معرفی شده بود [۱۴]. به‌طوری‌که ذراتی با لبه‌های تیز و غیرمعمول می‌توانند آغازگر واکنش‌های گرانولوماتوز شدید باشند [۹].

پوست یکی از ارگان‌های بزرگ بدن بوده که تقریباً ۱۰ درصد از وزن کل بدن را به خود اختصاص می‌دهد. این ارگان، توان تعامل با محیط را به بدن می‌دهد. عملکردهای مختلف پوست، حفظ و نگهداری هموستاز، به‌خصوص از نظر حس آثار محیطی همچون درد، فشار، گرما و نیز ممانعت از ورود میکروارگانیسم‌ها و مواد آلرژی‌زاست. از طرف دیگر، پوست ممکن است براساس فاکتورهای گوناگونی همچون سابقه خانوادگی، نژاد، فاکتورهای محیطی، سن و جنس تحت تأثیر قرار بگیرد. بنابراین، فاکتورهای مذکور می‌توانند بر کارایی ژل هیالورونیک اسید مورد استفاده تأثیرگذار باشند [۱۵].

### نتیجه‌گیری

تنوع محصولات ژل هیالورونیک اسید موجود در بازار دارویی، انتخاب بهترین محصول برای موارد مصرف خاص را دشوار کرده است. تمامی این محصولات دارای هیالورونیک اسید به‌عنوان ماده اولیه خود هستند، ولی تکنولوژی‌های مورد استفاده در مرحله کراس‌لینک کردن در محصولات مختلف، متفاوت است. آگاهی از رفتار ژل پس از تزریق، جهت انتخاب بهترین روش تزریق و عمق مناسب تزریق، ضروری است. در این راستا، در مطالعه حاضر، به‌منظور آگاهی از تأثیر تکنولوژی‌های مختلف کراس‌لینک کردن بر رفتار ژل، از آزمایش‌هایی تکرارپذیر، ساده و ارزان‌قیمت استفاده شد. هریک از محصولات فیلر، برای موارد مصرف خاصی مناسب هستند و هیچ محصولی برای تمامی موارد مصرف مناسب نیست. بنابراین آگاهی از ویژگی‌های رئولوژیک

## References

- [1] Olenius M. The first clinical study using a new biodegradable implant for the treatment of lips, wrinkles, and folds. *Aesthetic Plastic Surgery*. 1998; 22(2):97-101. [Link]
- [2] Monheit GD, Coleman KM. Hyaluronic acid fillers. *Dermatologic Therapy*. 2006; 19(3):141-50. [DOI:10.1111/j.1529-8019.2006.00068.x] [PMID]
- [3] Micheels P. Human anti-hyaluronic acid antibodies: Is it possible? *Dermatologic Surgery*. 2001; 27(2):185-91. [DOI:10.1046/j.1524-4725.2001.00248.x]
- [4] De Bouille K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez JX, et al. A review of the metabolism of 1, 4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*. 2013; 39(12):1758-66. [DOI:10.1111/dsu.12301] [PMID] [PMCID]
- [5] Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clinical Interventions in Aging*. 2007; 2(4):509-19. [DOI:10.2147/CIA.S382] [PMID] [PMCID]
- [6] Tavsanli B, Okay O. Mechanically robust and stretchable silk/hyaluronic acid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 2019; 208:413-20. [DOI:10.1016/j.carbpol.2018.12.088] [PMID]
- [7] Huang G, Chen J. Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019; 125:478-84. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.074] [PMID]
- [8] Aboutaleb E, Manoochehri S. [Bioequiwin: Design of a bio-equivalence software (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2019; 27(108):35-44. [Link]
- [9] Micheels P, Sarazin D, Tran C, Salomon D. Effect of different crosslinking technologies on hyaluronic acid behavior: A visual and microscopic study of seven hyaluronic acid gels. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2016; 15(5):600-6. [Link]
- [10] Edsman K, Nord LI, Öhrlund Å, Lärkner H, Kenne AH. Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*. 2012; 38(7):1170-9. [DOI:10.1111/j.1524-4725.2012.02472.x] [PMID]
- [11] Bezzola A, Micheels P. [Esthélics®, acide hyaluronique de conception Suisse. Première étude complète des caractéristiques physico-chimiques et essais cliniques (French)]. *Journal de Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique*. 2005. 32(125):11-20. [Link]
- [12] Flynn TC, Sarazin D, Bezzola A, Terrani C, Micheels P. Comparative histology of intradermal implantation of mono and biphasic hyaluronic acid fillers. *Dermatologic Surgery*. 2011; 37(5):637-43. [DOI:10.1111/j.1524-4725.2010.01852.x] [PMID]
- [13] Micheels P, Besse S, Flynn TC, Sarazin D, Elbaz Y. Superficial dermal injection of hyaluronic acid soft tissue fillers: Comparative ultrasound study. *Dermatologic Surgery*. 2012; 38(7pt2):1162-9. [DOI:10.1111/j.1524-4725.2012.02471.x] [PMID]
- [14] Lemperle G, Gauthier-Hazan N, Wolters M, Eisemann-Klein M, Zimmermann U, Duffy DM. Foreign body granulomas after all injectable dermal fillers: Part 1. Possible causes. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009; 123(6):1842-63. [DOI:10.1097/PRS.0b013e31818236d7] [PMID]
- [15] Azizi Khereshki N, Aryafar S, Eftekhari H, Aboutaleb E. [Formulation and in vitro evaluation of dapsone topical gel 5% (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2020; 29(1):62-75. [Link]

This Page Intentionally Left Blank