

SIT

**Skin Investigation
and Technology
Hamburg GmbH**

Отчет об исследовании

Исследование - Номер 009_02_0001

**Стимулирование синтеза коллагена в
фибробластах в лабораторных условиях**

SIT

**Skin Investigation and Technology Hamburg GmbH
Dammtorwall 4**

20354 Hamburg Deutschland

Tel.: + 49 - (0)40 - 355381 - 0

Fax: + 49 - (0)40 - 355381 -11

E-mail: sit@sit-skin.de

Эс Ай Ти

**Скин Инвестигейшнс энд Текнолоджи Гамбург Лимитед
Даммторвол 4,**

20354 Гамбург, Германия

Тел: + 49 - (0)40 - 355381 - 0

Факс: + 49 - (0)40 - 355381 -11

E-mail: sit@sit-skin.de



Продукт: Омолаживающий комплекс Youth Complex;
формула 1873, 06.11.2007

Дата подписания контракта: 5 апреля, 2007 г.

Руководитель проекта/Заказчик: **Dr. Charlene DeHaven**
IS Clinical Company Headquarters
312 Western Ave.
Glandale, CA 91201
U.S.A.
Доктор медицины Шарлен ДеХейвен
Головной офис Ай Эс Клиникал Компани
Вестерн Авеню, 312, Гландейл,
Калифорния 91201, США

Исполнитель: **SIT**
Skin Investigation and Technology
Hamburg GmbH
Dammtorwall 4
20354 Hamburg
Deutschland
Эс Ай Ти
Скин Инвестигейшнс энд Текнолоджи
Гамбург Лимитед
Даммторвол 4, 20354 Гамбург, Германия

Номер проекта: 009-02-0001

Параметры испытания: – Синтез коллагена в человеческих
фибробластах в лабораторных условиях
после применения образца для
тестирования.

Сроки исследования: 18 июня – 29 июня

Руководитель исследования: А. Janssen (А. Джансен)

Гамбург.....

.....
А. Janssen (А. Джансен)
Автор



Информация об исследовании

Цель исследования:

Целью данного исследования является оценка влияния тестируемого продукта на синтез коллагена в человеческих фибробластах.

Таким образом, фибробласты взрослого человека подвергались воздействию тестируемого продукта (крема) различной концентрации в течение 24, 48 и 72 часов соответственно. Количество коллагена было измерено с помощью Sircol-пробы на коллаген (Байколор Лимитед, Ньютон Эбби, Великобритания / *Biocolor Ltd., Newton Abbey, UK*), представляющей собой количественный метод связывания красителя. Данный метод используется для измерения коллагена, извлеченного из клеток и помещенного в специальную питательную среду в процессе культивирования в лаборатории.

Материалы и методы

Фибробласты человека были помещены в модифицированную по способу Дульбекко среду «Игла» с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при высоком уровне влажности (37 °C, 5% CO₂)

Количественный анализ WST-1:

Клетки были засеяны в 96-луночные плашки (каждая с содержанием 100 микролитров (µl) питательной среды) с целью определить необходимую дозу тестируемого продукта, не являющуюся цитотоксической для клеток. По прошествии 24 часов фибробласты подверглись воздействию пробной смеси различной концентрации в течение 24 часов. Для того чтобы проанализировать количество жизнеспособных клеток после воздействия тестируемым продуктом, в клеточную среду был добавлен клеточный пролиферативный реагент WST-1. После 30-60 минутной инкубации WST реагента было осуществлено измерение коэффициента впитываемости на планшет-ридере при 450 нанометрах (стандартная длина волны – 650 нм). Количество жизнеспособных клеток после воздействия тестируемым продуктом сравнили с количеством клеток в стандартных условиях (т.е. количество клеток до проведения эксперимента).

Sircol-проба на коллаген:

Человеческие фибробласты были засеяны в 96-луночные плашки, содержащие 10% фетальную телячью сыворотку. По прошествии 24 часов содержание сыворотки в клеточной среде было уменьшено до 2%, и клетки подверглись воздействию тестируемым продуктом шести различных концентраций (0,06%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% и 2% соответственно) в течение 24, 48 и 72 часов. Содержимое каждой плашки затем изъяли и смешивали с Sircol красильным реагентом в течение 30 минут при комнатной температуре в механической мешалке. После этого образцы подверглись центрифугированию в течение 10 минут при ускорении 10,000 xg, и осадок окрашенного коллагена был ресуспендирован (перерастворён) в щелочной красильной жидкости. Коэффициент впитываемости измерили на планшет-ридере при 540 нанометрах. Эти данные сравнили с результатами, полученными в стандартных условиях (т.е. клетки до проведения эксперимента). Для получения калибровочной кривой были использованы 12.5, 25 и 50 µl (микролитров) исходного раствора коллагена и холостые контрольные реагенты (клеточная среда).

Результаты

Количественный анализ WST-1:

Человеческие фибробласты подверглись воздействию 0,6%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% and 2% тестируемого крема или только инкубированы с особой средой для определения дозы тестируемого продукта, не являющейся цитотоксической для клеток. Анализ WST-1 показал, что даже высокая концентрация крема не изменила уровень жизнеспособности клеток.

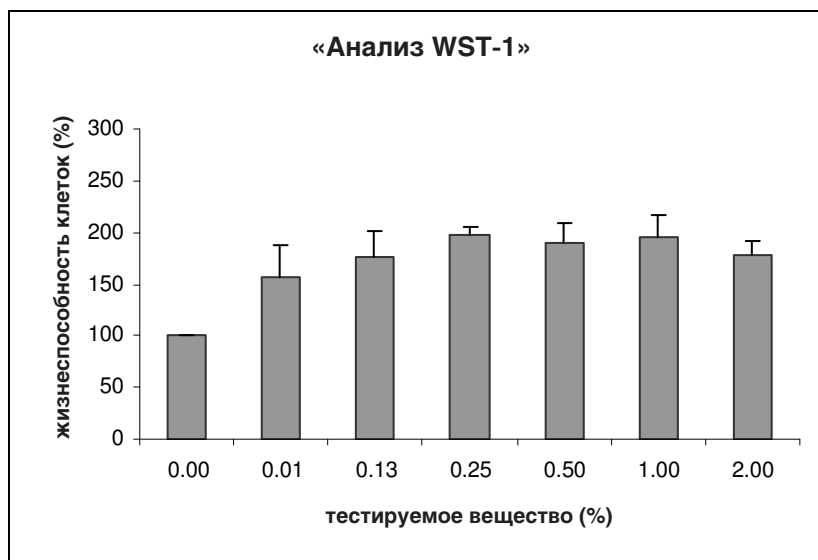


Рисунок 1: Анализ жизнеспособности клеток: Человеческие фибробласты подверглись воздействию тестируемого продукта различной концентрации в течение 24 часов. Данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения. Приведенные данные основаны на четырех образцах, исследуемых параллельно при каждой степени концентрации.

Sircol-проба на коллаген:

В лабораторных условиях наблюдается заметное увеличение скорости синтеза растворимого коллагена в фибробластах человека под воздействием тестируемого продукта 2%-ой концентрации (**Омолаживающий комплекс Youth Complex; формула 1873**) в течение 48 и 72 часов. Инкубация с 2%-ым тестируемым кремом приводит к увеличению количества коллагена до 1,64 μg после 48 часов воздействия и до 2,46 μg после 72 часов. Заметное увеличение скорости синтеза коллагена так же наблюдается у фибробластов, подверженных действию тестируемого крема с 1%-ой концентрацией в течение 48 и 72 часов (0,89 и 1,27 μg).

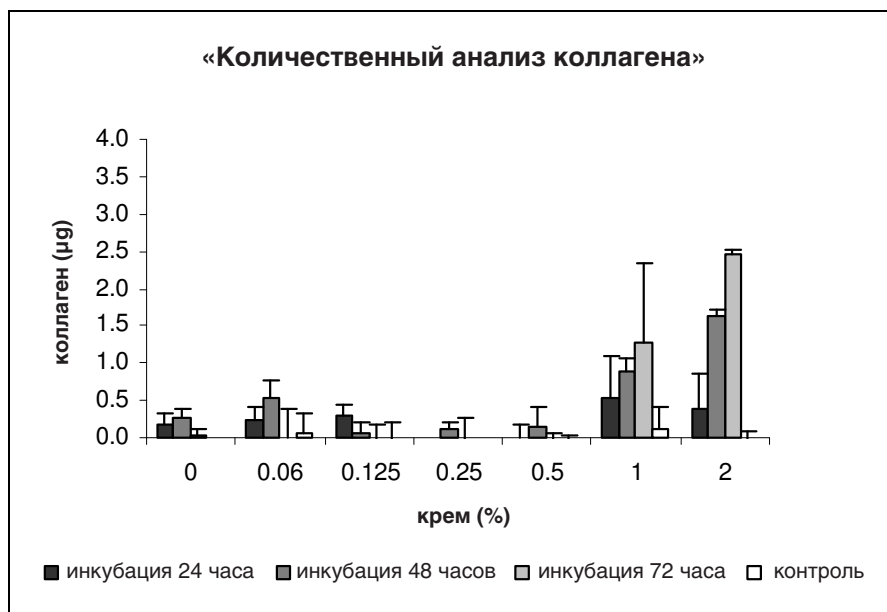


Рисунок 2: Sircol-проба на коллаген: Человеческие фибробласты подверглись воздействию тестируемого продукта 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 и 2% концентрации в течение 24, 48 и 72 часов. Эксперимент проводился три раза; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от **контрольных показателей**; только крем растворился в клеточной среде.



Декларация о проведении исследования

Настоящие подписи подтверждают, что исследование было проведено в соответствии с планом и согласно правилам качественной лабораторной практики*. Отчет содержит достоверную, точную и полную документацию всех данных о ходе и результатах исследования.

Гамбург.....

.....
J. Degwert (*Дж. Дегверт*)
кандидат наук,
Генеральный менеджер
SIT Hamburg GmbH
Эс Ай Ти Гамбург Лимитед

Гамбург.....

.....
A. Janssen (*А. Джансен*)
кандидат наук,
Руководитель лабораторных
исследований
SIT Hamburg GmbH
Эс Ай Ти Гамбург Лимитед

Отклонений от согласованного плана не произошло. Ошибки в управлении данными в проекте не обнаружены.

Гамбург.....

.....
U. Degwert (*Ю. Декверт*)
кандидат наук,
Контроль качества
SIT Hamburg GmbH
Эс Ай Ти Гамбург Лимитед

*ФРГ, Федеральное министерство по делам молодежи, семьи, женщин и здоровья, Федеральный Вестник №№ 243, 30. 10.1987, S. 16617; ЕС, СРМР, III/3976-88-N, 1.07.1990



Содержание

1	Введение	8
1.1	Цель исследования	8
1.2	Исходная информация	8
2	Материалы и методы	9
2.1	Тестируемый продукт	9
2.1.1	<i>Спецификация</i>	9
2.1.2	<i>Получение образца для тестирования</i>	9
2.2	Культивирование клеток	9
2.2.1	<i>Клеточная линия</i>	9
2.2.2	<i>Субкультивирование</i>	10
2.3	Материалы для культивирования клеток	10
2.4	Анализы:	10
2.5	Оборудование:	11
2.6	Анализ жизнеспособности клеток (WST-1)	11
2.7	Sircol-проба на коллаген:	12
3	Результаты	13
3.1	Отклонения от плана исследования	13
3.2	Анализ жизнеспособности клеток (WST-1)	13
3.3	Sircol-проба на коллаген	14
4	Комментарии	15
5	Литература	15
6	Приложения	16
6.1	Исходные данные для анализа жизнеспособности клеток (WST-1)	16
6.2	Исходные данные для Sircol-пробы на коллаген	17
6.2.1	<i>Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 24 часов</i>	17
6.2.2	<i>Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 48 часов</i>	19
6.2.3	<i>Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 72 часов</i>	21
6.2.4	<i>Контроль: Только крем, растворимый в клеточной среде</i>	23
6.2.5	<i>Способы проведения трех независимых экспериментов:</i>	25
6.2.6	<i>Способы проведения контрольного эксперимента:</i>	26

1 Введение

1.1 Цель исследования

Целью данного исследования является оценка влияния тестируемого продукта на синтез коллагена в человеческих фибробластах.

Таким образом, фибробласты взрослого человека подвергались воздействию тестируемого продукта (крема) различной концентрации в течение 24, 48 и 72 часов соответственно. Количество коллагена было измерено с помощью Sircol-пробы на коллаген (Байколор Лимитед, Ньютон Эбби, Великобритания / Biocolor Ltd., Newton Abbey, UK), представляющей собой количественный метод связывания красителя. Данный метод используется для измерения коллагена, извлеченного из клеток и помещенного в специальную питательную среду в ходе лабораторных исследований.

1.2 Исходная информация

Важнейшим структурным компонентом дермы является коллаген, преобладающий (из всех живых существ) только в коже у млекопитающих. Коллаген является одним из главных элементов внеклеточного матрикса (ВКМ) и играет первостепенную роль в поддержании целостности различных тканей. Например, коллаген кожи обеспечивает упругость и эластичность.

Преимущественно он синтезируется фибробластами, которые так же вырабатывают другие протеины, такие как эластин и глюкозаминогликаны. Первичная структура коллагена (проколлагены) представляет собой три полипептидные цепочки, которые отделяются от фибробластов и позже формируют целостные молекулы коллагена. Полипептидные цепочки проколлагенов формируют левозакрученные спирали, которые соединяются вместе, образуя правозакрученную спираль из трех цепей. Коллаген подразделяется на несколько классов: коллагены, образующие фибриллы (типы I, II, III, V и X), коллагены, образующие сетеподобные структуры (типы IV, VIII) и коллагены, ассоциированные с фибриллами (типы IX, XII, XIV и XVI)

Синтез коллагена – это процесс, который продолжается в течение всей жизни, и посредством которого происходит восстановление поврежденных коллагеновых тканей или строительство новых клеточных структур. Изменения, происходящие в структуре коллагена, являются основной причиной старения [1]. С возрастом способность кожи замещать поврежденный коллаген сокращается. Следует так же отметить, что фибробласты пожилых людей синтезируют более низкие концентрации коллагена, чем молодые клетки, как в лабораторных, так и в естественных условиях [2]. Старение кожи приводит к нарушению равновесия между выработкой и замещением коллагена. Более того, меняется так же и соотношение количества разных типов коллагена в коже. 80% коллагена молодой кожи состоит из коллагена I типа, 15% - III типа. По мере старения соотношение I и III типов меняется, причем содержание коллагена III заметно увеличивается. Кроме того, общее содержание коллагена на единицу поверхности кожи уменьшается примерно на 1% в год [3]. Таким образом, стимулирование синтеза коллагена для улучшения текстуры кожи и уменьшения морщин представляет собой большой интерес.



2 Материалы и методы

2.1 Тестируемый продукт

2.1.1 Спецификация

Производитель:	TechniGal LLC (ТекниГал Лимитед)
Кодировка:	1. Омолаживающий комплекс Youth Complex; формула 1873, 04.02.2007 2. Омолаживающий комплекс Youth Complex; формула 1873, 06.11.2007
Тип продукта:	косметический крем
Упаковка:	оба продукта упакованы в стеклянный тюбик с черной пластиковой закручивающейся крышкой
Размер упаковки:	1 продукт: 50 мл 2 продукт: 200 мл
Условия хранения:	хранить при комнатной температуре
Физические характеристики:	оба продукта: белый крем, без отдушек, умеренная густота
Получено:	13/04/2007 и 15/06/2007

Клиент несет ответственность за подлинность, чистоту и стабильность клинических образцов.

2.1.2 Получение образца для тестирования

Тестируемый продукт (крем) был растворен в клеточной среде для получения веществ различной концентрации (0.06%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% и 2% соответственно) для проведения анализа жизнеспособности клеток (WST-1) и Sircol-пробы на коллаген.

2.2 Культивирование клеток

2.2.1 Клеточная линия

Дермальные фибробласты зрелого человека (PromoCell, Heidelberg, Germany / ПромоСел, Гейдельберг, Германия) были помещены в модифицированную по способу Дульбекко среду «Игла» с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при высоком уровне влажности (37°C, 5% CO₂).

2.2.2 Субкультивирование

Фибробласты выращивались в матрасах 75 см² до достижения ими конfluenceности 70-80%. Параллельно были получены клетки путем обработки ткани трипсином, и определена жизнеспособность клетки методом трипанового синего окрашивания. После промывки (HepesBSS) и суспендирования в клеточной среде фибробласты были перемещены в новые матрасы для культивирования клеток с густотой посевов 3,500 шт/см², либо они были засеяны с густотой 1x10⁴ шт/см² в 96-луночные плашки для анализа жизнеспособности клеток и количественного анализа коллагена.

2.3 Материалы для культивирования клеток

Наименование/Тип:	Производитель:
Трипсин/ ЭДТК (10х)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Инвитроген Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
HEPES забуференный физиологический раствор	PromoCell, Heidelberg, Germany <i>ПромоСел, Гейдельберг, Германия</i>
Эссенциальная среда Дульбекко	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Инвитроген Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Фетальная телячья сыворотка	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Инвитроген Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Гентамицин	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Инвитроген Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Этанол	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Карл Рот Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Раствор трипана синего (0,5%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany <i>Сигма Алдрих Кемии Лимитед Тауфкирхен, Германия</i>
Матрасы для культивирования клеток (75 см ²)	Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany <i>ООО Нунк, Висбаден, Германия</i>
Матрасы для культивирования клеток (25 см ²)	Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany <i>Нунк Лимитед, Висбаден, Германия</i>
96-луночные плашки	Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany <i>Нунк Лимитед, Висбаден, Германия</i>
Стерильные насадки для микро-пипеток	Labsystems GmbH, Frankfurt, Germany <i>Лэбсистемз Лимитед, Франкфурт, Германия</i>
Стерильные пипетки (5 мл)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Карл Рот Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Стерильные пипетки (20 мл)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Карл Рот Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Стерильные пипетки (10 мл)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany <i>Карл Рот Лимитед, Карлсруэ, Германия</i>
Стерильные чаши (1.5 мл)	Eppendorf AG, Hamburg, Germany <i>Эппендорф, Гамбург, Германия</i>

2.4 Анализы:

Наименование/Тип:	Производитель:
Клеточный пролиферативный реагент WST-1	Roch, Mannheim, Germany <i>Рох, Манхайм, Германия</i>
Sircol-проба на коллаген	Biocolor Ltd., Newton Abbey, UK <i>Биокополор Лимитед, Ньютон Эбби, Великобритания</i>



2.5 Оборудование:

Наименование/Тип:	Производитель:
Химический реактор	KG Fritz Gossner GmbH & Go KG, Hamburg, Germany <i>КГ Фритц Госснер Лимитед & Го КГ, Гамбург, Германия</i>
Аппарат для деионизации воды	Arno Willers GmbH, Hamburg, Germany <i>Арно Виллерс Лимитед, Гамбург, Германия</i>
CO ₂ инкубатор для культивирования клеток Hera cell	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany <i>Гергаус Инструментс Лимитед, Ганау, Германия</i>
Ламинарный поток, Hera safe Kl. II, Typ H	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany <i>Гергаус Инструментс Лимитед, Ганау, Германия</i>
Считывающее устройство для микропланшетов: Lambda Scan 200	MWG-Biotech GmbH, Munchen, Germany <i>МВГ-Биотех Лимитед, Мюнхен, Германия</i>
Программное обеспечение KC4	Bio-Tek Instruments, Vermont, USA <i>Био-Тек Инструментс, Вермонт, США</i>
Шюттель-аппарат MTS4	IKA-Werke GmbH, Staufen, Germany <i>ИКА-Верке Лимитед, Стауфен, Германия</i>
Микроскоп: CK 40	Olympus <i>Олимпус</i>
Центрифуга: Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany <i>Гергаус Инструментс Лимитед, Ганау, Германия</i>
Микропипетки 2-1000 µl	Labsystems GmbH, Frankfurt, Germany <i>Лэбсистемз Лимитед, Франкфурт, Германия</i>
Дозатор пипеточный: Pipetus-akku	Hirschmann Laborgerate GmbH & Go KG, Eberstadt, Germany <i>Хиршманн Лаборгерате Лимитед & Го КГ, Эберштадт, Германия</i>

2.6 Анализ жизнеспособности клеток (WST-1)

Человеческие фибробласты были засеяны в 96-луночные плашки с густотой 1×10^4 штук на плашку (каждая с содержанием 100 µl питательной среды) с целью определить необходимую дозу тестируемого продукта, не являющуюся цитотоксической для клеток. По прошествии 24 часов фибробласты подверглись воздействию тестируемым продуктом шести различных концентраций (0,06%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% и 2% соответственно) в течение 24 часов. Либо на них воздействовали клеточной средой (без тестируемого продукта) для получения контрольных данных. Для того чтобы проанализировать количество жизнеспособных клеток после воздействия тестируемым продуктом, в клеточную среду был добавлен клеточный пролиферативный реагент WST-1. После 30-60 минутной инкубации WST реагента была определена метаболическая активность путем измерения коэффициента впитываемости формазанового продукта на планшет-ридере при 450 нанометрах (стандартная длина волны – 650 нм). Количество жизнеспособных клеток после воздействия тестируемым продуктом сравнили с количеством клеток в стандартных условиях. Для каждой степени концентрации были подготовлены 5 образцов.

Механизм анализа: Тетразоливая соль (WST-1) расщепляется до формазана клеточными энзимами. Таким образом, увеличение содержания формазана в клеточной среде отражает повышение активности митохондриального дегидрогеназа в образцах и соотносится с количеством клеток, обладающих интенсивным обменом веществ.

2.7 Sircol-проба на коллаген:

Человеческие фибробласты были засеяны в 96-луночные плашки с густотой 1×10^4 штук на плашку с содержанием 10%-ой фетальной телячьей сыворотки. По прошествии 24 часов содержание сыворотки в клеточной среде было уменьшено до 2%, и клетки в течение 24, 48 и 72 часов подвергались воздействию тестируемым продуктом шести различных концентраций (0,06%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% и 2% соответственно), либо на них воздействовали только клеточной средой для получения контрольных данных. Содержимое каждой плашки затем изъяли для анализа коллагена и смешивали с Sircol красильным реагентом в течение 30 минут при комнатной температуре в механической мешалке. После этого образцы подверглись центрифугированию в течение 10 минут при ускорении $10,000 \times g$, и осадок окрашенного коллагена был ресуспендирован (перерастворён) в 1 мл щелочной красильной жидкости. Коэффициент впитываемости измерили на планшет-ридере при 540 нанометрах. Эти данные сравнили с результатами, полученными с помощью клеток, которые не подверглись воздействию тестируемого продукта. Для получения калибровочной кривой были использованы 12.5, 25 и 50 μl (микролитров) исходного раствора коллагена и холостые контрольные реагенты (клеточная среда). Чтобы убедиться, что крем не оказал влияния на анализ коллагена, тестированию подверглись так же различные концентрации продукта (разбавленная среда, без клеток) – данное тестирование называется «негативный контроль». Анализ проводился три раза; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от показателей растворенных концентраций коллагена.

Механизм анализа: Sircol красильный реагент, используемый в анализе коллагена, содержит Сириус красный в пикриновой кислоте (конго красный 80). Сириус красный – это анионный краситель, содержащий группу сульфокислотных цепочек, которые прикрепляются к коллагену путем взаимодействия с группами цепочек основных аминокислот, имеющих в коллагене.



3 Результаты

3.1 Отклонения от плана исследования

Согласно инструкции от производителя среда для культивирования клеток, содержащая фетальную телячью сыворотку в количествах до 5%, не должна использоваться для анализа коллагена. Таким образом, исследование коллагена проводилось на основе модифицированной по способу Дульбекко среды «Игла» с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки. Однако вопреки информации от производителя, нам удалось вовремя обнаружить нежелательное вмешательство, и поэтому содержание сыворотки было уменьшено до 2%.

3.2 Анализ жизнеспособности клеток (WST-1)

Человеческие фибробласты подверглись воздействию 0,6%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% and 2% тестируемого крема или только инкубированы с особой средой для определения дозы тестируемого продукта, не являющейся цитотоксической для клеток.

Как показано на рисунке 1, даже высокая концентрация крема 2% не изменила уровень жизнеспособности фибробластов.

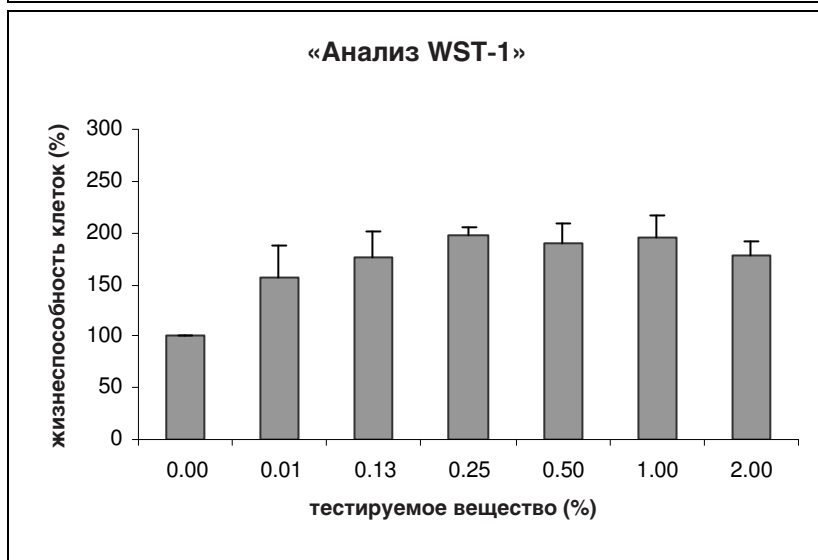
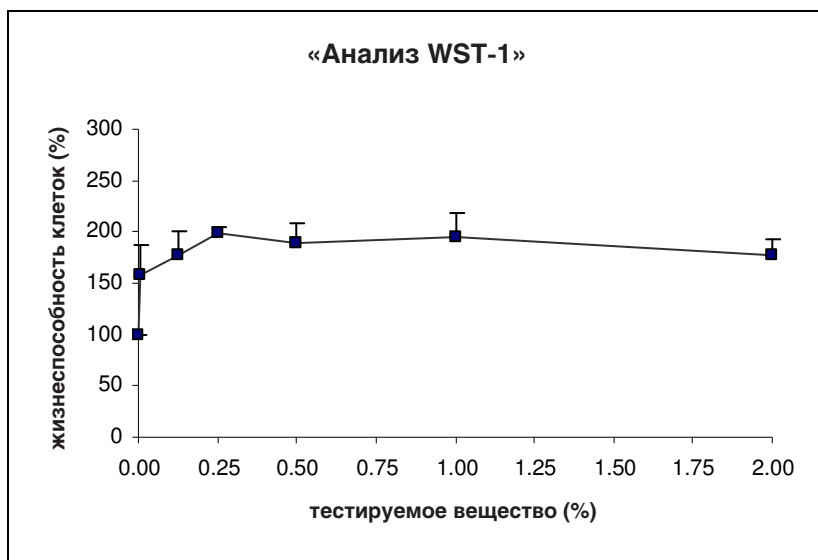


Рисунок 1: Анализ жизнеспособности клеток: Человеческие фибробласты подверглись воздействию тестируемого продукта различной концентрации в течение 24 часов. Данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения. Приведенные данные основаны на четырех образцах, исследуемых параллельно при каждой степени концентрации.

3.3 Sircol-проба на коллаген:

В лабораторных условиях наблюдается заметное увеличение скорости синтеза растворимого коллагена в фибробластах человека под воздействием тестируемого продукта 2%-ой концентрации (Омолаживающий комплекс Youth Complex; формула 1873) в течение 48 и 72 часов. Инкубация с 2%-ым тестируемым кремом привела к увеличению количества коллагена до $1,64 \pm 0,09 \mu\text{g}$ после 48 часов воздействия и до $2,46 \pm 0,05 \mu\text{g}$ после 72 часов. Заметное увеличение скорости синтеза коллагена так же наблюдается у фибробластов, подверженных действию тестируемого крема с 1%-ой концентрацией в течение 48 и 72 часов ($0,89 \pm 0,18 \mu\text{g}$ и $1,27 \pm 1,06 \mu\text{g}$).

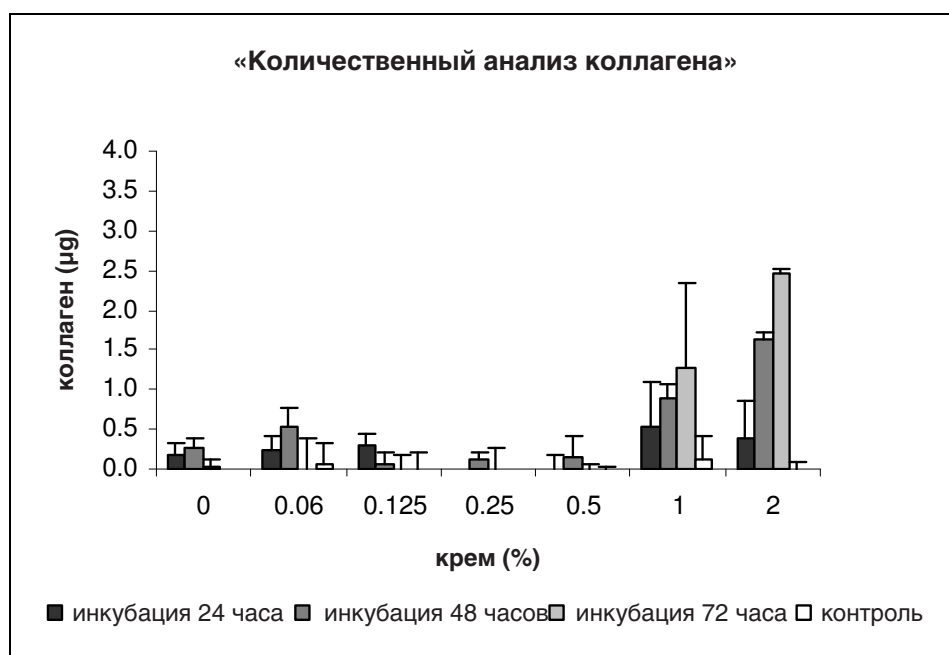


Рисунок 2: Sircol-проба на коллаген: Человеческие фибробласты подверглись воздействию тестируемого продукта 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 и 2% концентрации в течение 24, 48 и 72 часов. Эксперимент проводился три раза; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от **контрольных показателей**; только крем растворился в клеточной среде.

4 Комментарии

Воздействие 1 и 2% тестируемого средства Youth Complex; формула 1873 оказало положительное влияние на синтез растворимого коллагена в дермальных фибробластах в лабораторных условиях.

После инкубации с 2% кремом концентрация коллагена увеличилась до 1,64µg/100µl после 48 часов воздействия и до 2,46µg/100µl после 72 часов. Фибробласты, подвергшиеся воздействию одной лишь клеточной среды в течение 48 и 72 часов обеспечили ≤ 0,26µg/100µl растворимого коллагена. Так же инкубация с кремом 1%-ой концентрации привело к увеличению выработки коллагена (0,89µg/100µl после 48 часов и 1,27µg/100µl после 72 часов).

5 Литература

- [1] Baumann L., Journal of Pathology (2007), 211: 241 -251
- [2] Oikarinen A., Photodermatol Photoimmunol Photomed (1990), 7(1): 3-4
- [3] Shuster S. et al., Br J Dermatol (1975), 93(6): 639-643.



6 Приложения

6.1 Исходные данные для анализа жизнеспособности клеток (WST-1)

В таблице представлены показатели четырех культивированных образцов (показатели рассчитаны по формуле $\Delta OD = OD_{450 \text{ nm}} - OD_{690 \text{ nm}}$), на которые одновременно воздействовали соответствующей концентрацией тестируемого продукта в течение 24 часов. Полученные в результате данные о жизнеспособности клеток (в %) были сопоставлены с контрольными показателями.

Таблица 1: Исходные данные анализа жизнеспособности клеток (WST-1)

Человеческие фибробласты подверглись воздействию 06%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% and 2% тестируемого продукта в течение 24 часов.

	Blanc	Негативный контроль	Концентрация (%)					
			0.06	0.125	0.25	0.5	1	2
Рассчитанные показатели [ΔOD]	0.142	1.185	2.422	2.816	3.411	3.074	3.674	3.233
	0.143	2.325	3.189	3.520	3.361	3.488	3.093	3.081
	0.142	1.316	2.853	2.697	3.224	3.276	3.374	2.712
	0.140	2.105	2.093	2.773	3.185	2.744	2.883	2.838
MW (ΔOD)	0.142	1.733	2.639	2.952	3.295	3.146	3.256	2.966
± ДО	0.001	0.567	0.481	0.382	0.108	0.317	0.344	0.235
MW - MW _{Blanc}		1.591	2.498	2.810	3.154	3.004	3.114	2.824
Жизнеспособность клетки ± ДО (%)		100.000	156.98	176.60	198.21	188.80	195.74	177.51
		0.0	30.2	24.0	6.8	19.9	21.6	14.8

Blanc: среда и WST-1 реагент

Негативный контроль: на клетки воздействовали только средой

ДО: допустимое отклонение



6.2 Исходные данные для Sircol-пробы на коллаген

В каждый момент времени анализ растворенного коллагена проводился трижды; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от OD_{540nm} .

6.2.1 Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 24 часов

а) Эксперимент №1

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели $[OD_{540nm}]$				MW (OD_{540nm})	$\pm DO$	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген $[\mu g/100\mu l]$
0	0.036	0.036	0.035	0.035	0.0355	0.0006	0.0005	0.04
0.06	0.039	0.042	0.041	0.039	0.0403	0.0015	0.0053	0.38
0.125	0.045	0.04	0.042	0.039	0.0415	0.0026	0.0065	0.47
0.25	0.033	0.032	0.032	0.032	0.0323	0.0005	-0.0028	-0.20
0.5	0.037	0.038	0.037	0.036	0.0370	0.0008	0.0020	0.14
1	0.037	0.037	0.037	0.035	0.0365	0.0010	0.0015	0.11
2	0.036	0.036	0.036	0.035	0.0358	0.0005	0.0007	0.05

Стандартный уровень концентрации $[\mu g]$	Рассчитанные показатели $[OD_{540nm}]$		MW (OD_{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.689	0.708	0.699	0.664
25	0.430	0.429	0.430	0.395
12.5	0.244	0.254	0.249	0.214
0	0.037	0.033	0.035	0.000



В) Эксперимент №2

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.048	0.049	0.047	0.047	0.0478	0.0010	0.0048	0.32
0.06	0.049	0.047	0.045	0.05	0.0478	0.0022	0.0048	0.32
0.125	0.049	0.047	0.047	0.044	0.0468	0.0021	0.0038	0.25
0.25	0.042	0.044	0.043	0.041	0.0425	0.0013	-0.0005	-0.03
0.5	0.045	0.045	0.044	0.041	0.0438	0.0019	0.0008	0.05
1	0.064	0.061	0.059	0.057	0.0603	0.0030	0.0173	1.16
2	0.044	0.046	0.046	0.044	0.0450	0.0012	0.0020	0.13

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.771	0.782	0.777	0.734
25	0.412	0.415	0.414	0.371
12.5	0.257	0.255	0.256	0.213
0	0.044	0.042	0.043	0.000

В) Эксперимент №3:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.045	0.044	0.048	0.047	0.0460	0.0018	0.0030	0.20
0.06	0.043	0.041	0.046	0.044	0.0435	0.0021	0.0005	0.03
0.125	0.047	0.044	0.049	0.044	0.0460	0.0024	0.0030	0.20
0.25	0.043	0.041	0.043	0.04	0.0418	0.0015	-0.0012	-0.08
0.5	0.039	0.038	0.043	0.039	0.0398	0.0022	-0.0033	-0.22
1	0.049	0.046	0.053	0.046	0.0485	0.0033	0.0055	0.37
2	0.056	0.055	0.06	0.057	0.0570	0.0022	0.0140	0.94



Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.784	0.786	0.785	0.74
25	0.409	0.416	0.413	0.37
12.5	0.261	0.258	0.260	0.21
0	0.044	0.048	0.046	0.00

6.2.2 Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 48 часов

а) Эксперимент №1:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.038	0.039	0.039	0.039	0.04	0.000	0.005	0.38
0.06	0.041	0.042	0.043	0.048	0.044	0.003	0.010	0.72
0.125	0.033	0.033	0.033	0.036	0.034	0.001	0.000	0.02
0.25	0.034	0.035	0.034	0.036	0.035	0.001	0.001	0.09
0.5	0.034	0.035	0.034	0.034	0.034	0.000	0.001	0.05
1	0.049	0.047	0.047	0.048	0.048	0.014	0.001	1.03
2	0.055	0.058	0.056	0.059	0.057	0.024	0.002	1.70

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.722	0.73	0.73	0.69
25	0.363	0.345	0.35	0.32
12.5	0.253	0.261	0.26	0.22
0	0.034	0.033	0.03	0.00



В) Эксперимент №2:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.039	0.041	0.04	0.039	0.040	0.001	0.004	0.28
0.06	0.042	0.044	0.044	0.047	0.044	0.002	0.008	0.62
0.125	0.035	0.036	0.035	0.036	0.036	0.001	0.000	-0.04
0.25	0.036	0.037	0.035	0.037	0.036	0.001	0.000	0.02
0.5	0.035	0.037	0.035	0.035	0.036	0.001	0.000	-0.04
1	0.049	0.048	0.048	0.05	0.049	0.013	0.001	0.95
2	0.055	0.058	0.056	0.057	0.057	0.021	0.001	1.53

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.705	0.713	0.7090	0.6730
25	0.35	0.333	0.3415	0.3055
12.5	0.249	0.257	0.2530	0.2170
0	0.036	0.036	0.0360	0.0000

В) Эксперимент № 3:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.041	0.043	0.042	0.04	0.042	0.001	0.002	0.13
0.06	0.043	0.043	0.044	0.042	0.043	0.001	0.004	0.22
0.125	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.001	0.003	0.21
0.25	0.04	0.042	0.048	0.042	0.043	0.003	0.004	0.22
0.5	0.047	0.046	0.048	0.046	0.047	0.001	0.007	0.46
1	0.051	0.049	0.052	0.050	0.051	0.001	0.011	0.69
2	0.068	0.068	0.064	0.067	0.067	0.027	0.002	1.68



Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.832	0.838	0.8407	0.8013
25	0.442	0.449	0.4470	0.4077
12.5	0.275	0.273	0.2743	0.2350
0	0.037	0.042	0.1730	0.1337

6.2.3 Измерение концентрации растворимого коллагена после инкубации с кремом в течение 72 часов

А) Эксперимент №1:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.045	0.041	0.048	0.042	0.04	0.003	0.000	-0.03
0.06	0.04	0.036	0.04	0.035	0.038	0.003	-0.007	-0.47
0.125	0.044	0.038	0.042	0.039	0.041	0.003	-0.004	-0.26
0.25	0.039	0.037	0.04	0.037	0.038	0.001	-0.006	-0.44
0.5	0.039	0.037	0.044	0.037	0.039	0.003	-0.005	-0.37
1	0.071	0.073	0.073	0.072	0.072	0.001	0.028	1.94
2	0.087	0.081	0.081	0.073	0.081	0.006	0.036	2.52

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.739	0.746	0.74	0.70
25	0.422	0.44	0.43	0.39
12.5	0.232	0.234	0.23	0.19
0	0.044	0.045	0.04	0.00



В) Эксперимент №2:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.048	0.049	0.049	0.046	0.048	0.001	0.002	0.13
0.06	0.053	0.052	0.049	0.047	0.050	0.003	0.004	0.29
0.125	0.048	0.048	0.047	0.046	0.047	0.001	0.001	0.08
0.25	0.049	0.051	0.05	0.045	0.049	0.003	0.003	0.18
0.5	0.046	0.047	0.046	0.044	0.046	0.001	0.000	-0.02
1	0.072	0.075	0.074	0.072	0.073	0.001	0.027	1.83
2	0.083	0.083	0.083	0.081	0.083	0.001	0.037	2.45

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.784	0.786	0.785	0.74
25	0.409	0.416	0.413	0.37
12.5	0.261	0.258	0.260	0.21
0	0.044	0.048	0.046	0.00

В) Эксперимент №3:

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.048	0.044	0.05	0.044	0.047	0.003	0.001	0.03
0.06	0.049	0.047	0.051	0.046	0.048	0.002	0.002	0.15
0.125	0.053	0.044	0.048	0.044	0.047	0.004	0.001	0.08
0.25	0.049	0.045	0.05	0.044	0.047	0.003	0.001	0.07
0.5	0.047	0.043	0.049	0.042	0.045	0.003	-0.001	-0.05
1	0.044	0.049	0.048	0.046	0.047	0.002	0.001	0.05
2	0.084	0.079	0.085	0.08	0.082	0.003	0.036	2.42



Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.784	0.786	0.785	0.74
25	0.409	0.416	0.413	0.37
12.5	0.261	0.258	0.260	0.21
0	0.044	0.048	0.046	0.00

6.2.4 Контроль: Только крем, растворимый в клеточной среде

Крем был растворен в среде для получения необходимых концентраций, используемых для экспериментов по культивированию клеток и для проведения количественного анализа коллагена (негативный контроль). Анализ проводился дважды.

Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0,048	0,044	0,05	0,044	0,05	0,003	0,001	0,03
0.06	0,049	0,047	0,051	0,046	0,05	0,002	0,002	0,15
0.125	0,053	0,044	0,048	0,044	0,05	0,004	0,001	0,08
0.25	0,049	0,045	0,05	0,044	0,05	0,003	0,001	0,07
0.5	0,047	0,043	0,049	0,042	0,05	0,003	-0,001	-0,05
1	0,044	0,049	0,048	0,046	0,05	0,002	0,001	0,05
2	0,084	0,079	0,085	0,08	0,08	0,003	0,036	2,42



Концентрация крема [%]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]				MW (OD _{540nm})	±ДО	MW - MW _{Blanc}	Растворимый коллаген [µg/100µl]
0	0.039	0.039	0.04	0.038	0.039	0.001	-0.0055	-0.36
0.06	0.043	0.044	0.042	0.041	0.04	0.001	-0.002	-0.13
0.125	0.04	0.041	0.04	0.038	0.040	0.001	-0.005	-0.31
0.25	0.037	0.037	0.038	0.036	0.037	0.001	-0.008	-0.49
0.5	0.044	0.041	0.041	0.04	0.042	0.002	-0.003	-0.20
1	0.048	0.048	0.054	0.048	0.050	0.003	0.005	0.33
2	0.046	0.044	0.045	0.045	0.045	0.001	0.001	0.03

Стандартный уровень концентрации [µg]	Рассчитанные показатели [OD _{540nm}]		MW (OD _{540nm})	MW - MW _{Blanc}
50	0.784	0.81	0.80	0.75
25	0.419	0.416	0.42	0.37
12.5	0.257	0.258	0.26	0.21
0	0.043	0.046	0.04	0.00

6.2.5 Способы проведения трех независимых экспериментов

В каждый момент времени анализ растворенного коллагена проводился трижды; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от рассчитанных концентраций растворенного коллагена.

А) Инкубация крема в течение 24 часов:

Концентрация крема [%]	MW Концентрация коллагена [µg]	±ДО
0	0.19	0.14
0.06	0.24	0.18
0.125	0.31	0.14
0.25	-0.11	0.08
0.5	-0.01	0.19
1	0.54	0.55
2	0.38	0.49

В) Инкубация крема в течение 48 часов:

Концентрация крема [%]	MW Концентрация коллагена [µg]	±ДО
0	0.26	0.12
0.06	0.52	0.26
0.125	0.06	0.13
0.25	0.11	0.10
0.5	0.16	0.26
1	0.89	0.18
2	1.64	0.09



С) Инкубация крема в течение 72 часов:

Концентрация крема [%]	MW Концентрация коллагена [µg]	±ДО
0	0.04	0.09
0.06	-0.01	0.40
0.125	-0.03	0.20
0.25	-0.06	0.33
0.5	-0.14	0.19
1	1.27	1.06
2	2.46	0.05

6.2.6 Способы проведения контрольного эксперимента

Анализ растворенного коллагена проводился дважды; данные являются усредненными и имеют допустимые отклонения от рассчитанных концентраций растворенного коллагена. Контроль: только крем был растворен в среде.

Концентрация крема [%]	MW Концентрация коллагена [µg]	±ДО
0	-0.25	0.16
0.06	0.06	0.27
0.125	-0.10	0.30
0.25	-0.36	0.19
0.5	-0.10	0.14
1	0.12	0.30
2	-0.12	0.21