

## СЕРТИФИКАТ

Данный сертификат подтверждает, что перевод ниже указанной статьи был выполнен профессиональным переводчиком и проверен редактором, в том числе с кандидатской степенью.

Ответственный редактор журнала может обратиться к нам для получения копии выполненного перевода.

Название оригинальной статьи:

**Evaluation of the Efficacy of an Elastin-Inducing Composition Containing Amino Acids, Copper, and Hyaluronic Acid: Results of an Open Single-Center Clinical Trial Study**

Авторы:

**Man-Seok Kim, Ko-Eun Chun, Dong-Keun Lee and Seh-Hyon Song**

Дата выдачи:

**3 апреля 2023**

Утверждено:

**Юрий Владимирович Субачев**



Наша компания специализируется на профессиональном переводе научных текстов с/на английский язык, в том числе для публикации в международных англоязычных журналах. Мы предоставляем услуги по переводу, редактированию, корректуре и оформлению научных статей. Переводим диссертации, заявки на гранты, научные презентации и доклады для конференций.

Email: [mail@nauchperevod.ru](mailto:mail@nauchperevod.ru)

Сайт: [www.nauchperevod.ru](http://www.nauchperevod.ru)

Тел.: +7(800) 551-66-28

620016, г. Екатеринбург, ул. Краснолесья, 28-15

# Оценка эффективности воздействия препарата на основе аминокислот, меди и гиалуроновой кислоты на синтез эластина: результаты открытого одноцентрового клинического исследования

**Резюме:** Деградация и уменьшение количества белков внеклеточного матрикса (ВКМ) являются репрезентативными биологическими признаками снижения эластичности кожи и провоцируют развитие связанных с этим проблем. Эластин — это белок внеклеточного матрикса, играющий важную роль в поддержании структуры кожи. Он обладает высокой эластичностью и помогает тканям восстанавливать свою форму после растяжения или сжатия. Цель данного исследования заключалась в оценке эффективности продукта, содержащего аминокислоты, медь и гиалуроновую кислоту, для замедления старения кожи. В небольшом открытом одноцентровом исследовании были использованы четыре процедуры Elastic Lab® на пяти пациентах с интервалом в одну неделю. В результате через одну неделю после последней процедуры у всех пациентов уменьшились морщины вокруг глаз, увеличились показатели увлажненности, внутренней эластичности, толщины и плотности кожи по сравнению с исходной ситуацией. Наиболее существенно повысились показатели эластичности, толщины и плотности кожи. Таким образом, применение состава, содержащего аминокислоты, минералы и гиалуроновую кислоту, позволяет стимулировать биосинтез эластина и коллагена в коже, восстановить эластичность кожи и уменьшить проявления различных кожных проблем.

**Ключевые слова:** эластин; коллаген; гиалуроновая кислота; эластичность кожи; плотность кожи; влажность кожи; морщина; толщина кожи; старение кожи; ВКМ

## 1. Введение

Старение кожи представляет собой сложный биологический феномен, протекающий под воздействием комплекса внутренних (хронологических, гормональных и генетических) и внешних факторов. К внешним факторам относятся воздействие солнца, загрязнение окружающей среды, пищевые привычки и химические вещества [1,2]. По мере старения кожи количество факторов, разрушающих белок, таких как матриксные металлопротеиназы (ММП), увеличивается, что приводит к нарушению баланса во внеклеточном матриксе (ВКМ), представляющим собой неклеточный компонент, обеспечивающий необходимый физический каркас и запускающий важные биохимические процессы в тканях [2].

Более того, с возрастом повышение уровня ММП, ингибитора активатора плазминогена и активных форм кислорода разрушает целостность сетей волокон эластина и коллагена и вызывает их модификацию [2]. Изменения в белках ВКМ сопровождаются такими признаками старения кожи, как глубокие морщины, дряблость, тусклость и обвисание кожи [1]. Таким образом, стимуляция синтеза белка ВКМ является важным фактором, предотвращающим старение кожи.

Дерма в основном состоит из фибробластов, продуцирующих первичные структурные компоненты кожи, в том числе различные типы коллагена, эластина и фибронектина [2]. Оптимальное количество и эффективное взаимодействие этих компонентов необходимы для поддержания нормальных физиологических свойств кожи [3]. Коллаген является наиболее распространенным волокнистым белком интерстициального ВКМ и составляет до 30% от общей белковой массы многоклеточного животного. Он обеспечивает прочность на растяжение, регулирует адгезию клеток, поддерживает хемотаксис и миграцию и направляет развитие тканей [2]. Существует почти 30 типов коллагена, однако не все они содержатся в ВКМ. Волокна коллагена организованы в фибриллы для обеспечения необходимой

структурной целостности тканей. В частности, фибриллы формируют коллагены I, II, III, V и XI типов. Коллаген I типа является доминирующей формой, обнаруживаемой почти во всех тканях, особенно в сухожилиях и коже. Другие типы коллагена обнаруживаются только в определенных областях, например, коллаген II типа составляет основу хрящей и роговицы, тогда как коллаген III типа в основном находится в стенках кровеносных сосудов. Коллаген продуцируется не только фибробластами, но и эндотелиальными и эпителиальными клетками [4].

Эластин — второе главное структурное волокно ВКМ, играющее важную роль в поддержании кожного гомеостаза [5]. Он обладает высокой эластичностью и обеспечивает тканям способность восстанавливаться после непрерывного растяжения [4]. Эластические волокна состоят из микрофибрилярного каркаса (образованного различными типами гликопротеинов) и ядра (состоящего из сшитого эластина). Эластин секретируется клетками в виде водорастворимого предшественника, называемого тропоэластином, и превращается в нерастворимый эластин посредством перекрестного связывания [6]. В отличие от коллагена, синтез эластина в основном происходит в раннем и позднем неонатальном периоде. Более того, скорость синтеза функциональных клеток тропоэластина или эластина снижается с возрастом [7]. Синтез эластина практически не происходит в фибробластах взрослых, и поврежденные эластиновые волокна не всегда должным образом восстанавливаются. Эластические волокна, будучи поврежденными, не могут нормально функционировать, а ткани, которые должны быть эластичными, становятся твердыми, что приводит к заболеваниям сердца, кровеносных сосудов, легких и кожи [8]. При имплантации волокон эластина может происходить их кальцификация, вызывающая развитие атеросклероза, заболеваний сердечных клапанов и кальцификацию биоискусственных сердечных клапанов. Механизмы кальцификации эластина до сих пор неизвестны [9]. Таким образом, сейчас инновационные разработки направлены на правильную стимуляцию синтеза эластина с целью поддержания гомеостаза и замедления старения кожи.

Известно также, что эластин обладает эффективными ранозаживляющими свойствами, в особенности на последних стадиях внутриутробного развития плода. Однако у новорожденных экспрессия эластина значительно снижается, что делает невозможным безрубцовое заживление раны. В экспериментах на различных животных моделях эластин успешно применялся в области ран взрослых особей для улучшения их заживления [10,11]. Каркасы на основе волокон эластина позволяют ускорить заживление раны, регулируя дифференцировку фибробластов и улучшая регенерацию дермы и эластичность кожи в целом [12]. Также было подтверждено, что применение пептидов эластина было терапевтически эффективным на животных моделях. Смесь пептидов эластина и ламинина усиливала реэпителизацию поврежденного уха кролика, а протеолитический гидролизат эластина улучшал синтез эластических волокон в дермальных фибробластах мышцы [13,14]. Для разработки новых методов лечения, способных обеспечить быстрое и полное заживление ран, необходимо дальнейшее изучение влияния эластина на заживление ран у взрослых и плода, а также сигнальных механизмов эластина в процессе заживления ран.

Коллаген и эластин имеют аминокислотный состав, свойственный только для них, и отличный от других белков. Тройная спиральная структура коллагена формируется вследствие преобладания трех аминокислот: глицина, пролина и гидроксипролина [15]. Эластин также имеет сходный с коллагеном аминокислотный состав по остаткам глицина и пролина, но примерно на 75% состоит из гидрофобных остатков (Gly, Val, Ala) [12]. Поэтому многие исследования были направлены на повышение уровня белков ВКМ с помощью различных компонентов аминокислот.

Исследователи ранее пытались индуцировать биосинтез эластина и коллагена, являющихся компонентами ВКМ. Эластин и коллаген извлекали из животных и подвергали гидролизу; кроме того, проводили клеточные тесты и исследования перорального введения [16-18]. Также изучалось воздействие полифенолов, стимулирующих синтез эластина и

коллагена [19].

Гиалуроновая кислота хорошо известна своей способностью восполнять влагу в коже вследствие своей водоудерживающей способности, в результате чего кожа становится гладкой и увлажненной. Увлажнение кожи позволяет замедлить образование морщин и улучшить текстуру кожи. Нутрикосметические свойства гиалуроновой кислоты способствуют регенерации клеток и стимулируют выработку коллагена. Гиалуроновая кислота уже используется в ряде продуктов, включая дермальные наполнители и косметику [20].

Лизилоксидаза представляет собой медь-содержащий фермент, необходимый для стабилизации ВКМ и ферментативного сшивания коллагена и эластина. Следовательно, активация лизилоксидазы необходима для увеличения стабильного синтеза эластина и коллагена. Активность лизилоксидазы повышается за счет меди, что положительно влияет на синтез эластина и коллагена [21].

Повышенный интерес вызывает исследование эффектов, стимулирующих синтез эластина и коллагена, посредством запуска механизма биологической обратной связи с помощью комбинации минералов и аминокислот, составляющих эластин и коллаген. Более того, продолжается поиск дополнительных комбинаций, способных стимулировать эластин и коллаген с аминокислотами. Результаты ранее проведенных исследований подтвердили эффективность воздействия смеси аминокислот и гиалуроновой кислоты на стимулирование синтеза эластина и коллагена [22].

Недавно было проведено исследование *in vitro*, цель которого заключалась в оценке возможности стимулирования экспрессии белков ВКМ в дермальных фибробластах при помощи специально разработанной смеси аминокислот, меди и гиалуроновой кислоты. Использованная смесь позволила увеличить уровни экспрессии генов и белков коллагена и эластина более чем в два и три раза соответственно. Результаты испытаний показали, что эта уникальная смесь последовательно способствует синтезу белка ВКМ в дермальных фибробластах [23]. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, подтверждающие воздействие стимулирования синтеза эластина на замедление старения кожи. Данное исследование включало проведение клинических испытаний разработанной смеси с целью оценки ее антивозрастного действия, включая сокращение морщин, увлажнение кожи, повышение ее эластичности, толщины и плотности.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Исследуемый препарат

Elastic Lab® — это продукт, содержащий в своем составе смесь аминокислот, таких как глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-лейцин, L-лизин моногидрохлорид, медь и гиалуроновую кислоту, действие которого направлено на замедление старения кожи.

#### Материалы

Список оборудования, использованного для каждого параметра, оцениваемого в исследовании, приведен в Таблице 1.

**Таблица 1.** Оборудование, использованное в исследовании.

Оцениваемые параметры	Оборудование
Морщины вокруг глаз	Antera 3D CS
Влажность кожи	Moisture meter D Compact
Внутренняя эластичность кожи	Dermal Torque Meter
Толщина и плотность кожи	Ultrascan UC22

### 2.2. Дизайн исследования

Небольшое открытое одноцентровое исследование было проведено с 21 октября по 17 декабря 2020 года в Глобальном центре медицинских исследований. В общей сложности пять пациентов прошли лечение с помощью продукта Elastic Lab® для оценки эффективности его воздействия на омоложение кожи, при этом анализировались следующие параметры: изменения морщин вокруг глаз, влажность кожи, внутренняя эластичность, толщина и плотность кожи. Пациентам препарат вводили в кожу лица четыре раза с интервалом в одну неделю. Оценку исследуемых параметров и анкетирование пациентов выполнили также до лечения и через неделю после завершения лечения. Врачи-дерматологи оценили безопасность продукта. Критерии включения и исключения пациентов в исследование представлены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Критерии включения и исключения пациентов в исследование.

Критерии включения	Критерии исключения
<ul style="list-style-type: none"><li>– Здоровые взрослые мужчины и женщины в возрасте от 25 до 60 лет.</li><li>– Субъекты, которые могут прочитать, понять и подписать форму информированного согласия.</li><li>– Субъекты, желающие и способные выполнять все требования исследования.</li><li>– Отсутствие открытых ран, волдырей или кожных заболеваний в месте проведения испытаний.</li><li>– Не находящиеся в процессе добровольного участия в другом исследовании.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Женщины, которые беременны или кормят грудью.</li><li>– Субъекты с серьезными или хроническими заболеваниями, которые могут повлиять на это клиническое исследование.</li><li>– Субъекты, прошедшие дерматологические процедуры по разглаживанию морщин и омоложению кожи или омоложению кожи в зоне лечения в течение одного года до участия в исследовании.</li></ul>

### 2.3. Статистический анализ

Данные были проанализированы с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона для оценки результатов улучшения состояния кожи. Парный t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости; при значении  $p < 0,05$  различия считали статистически достоверными.

### 3. Результаты

Исследование продукта Elastic Lab® было проведено с целью оценки эффективности его воздействия на сокращение морщин вокруг глаз, повышение влажности, внутренней эластичности, толщины и плотности кожи. Скорость изменения рассчитывали в процентах путем вычитания значения до лечения из значения после лечения и деления его на значение измерения до лечения.

$$\text{Скорость изменения} = \frac{\text{значение до лечения} - \text{значение после лечения}}{\text{значение до лечения}} \quad (1)$$

#### 3.1. Морщины вокруг глаз

Глубину (мм) морщин вокруг глаз измерили с помощью аппарата Antera 3D CS до и после лечения. Согласно полученным результатам, глубина морщин вокруг глаз у всех пациентов уменьшилась (средний размер уменьшился с 0,067 мм до 0,061 мм, Рис. 1) после лечения, при этом средняя скорость изменения составила -8,955.



**Рис. 1.** Средние значения результатов измерения глубины морщин вокруг глаз.  $0,067 \pm 0,038$  мм до лечения,  $0,061 \pm 0,033$  мм после лечения

### 3.2. Влажность кожи

Влажность кожи (%) измерили с помощью аппарата Moisturemeter D Compact с целью сравнения увлажнения кожи до и после применения исследуемого продукта. Содержание влаги в коже у всех пациентов увеличилось (средняя влажность кожи увеличилась с 48,900% до 55,893%, Рис. 2), при этом скорость изменения также увеличилась на 14,301%.

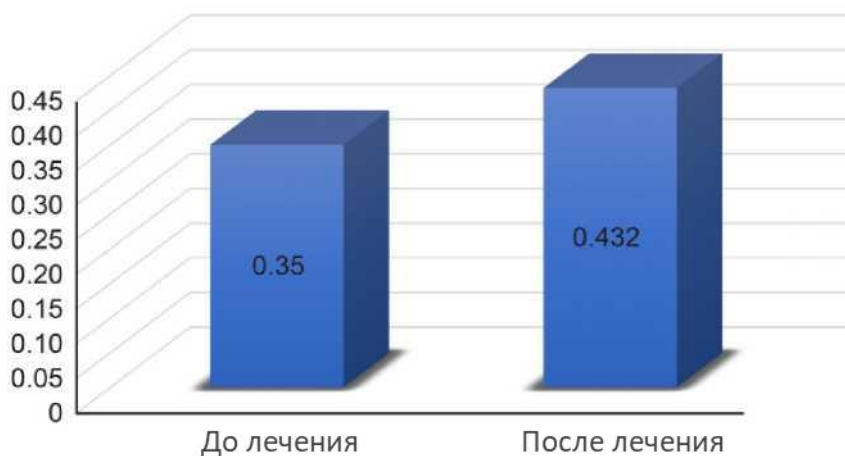


**Рис. 2.** Средние значения результатов измерения влажности кожи.  $48,9 \pm 4,126\%$  до лечения,  $55,893 \pm 3,371\%$  после лечения.

### 3.3. Внутренняя эластичность кожи

Аппарат Dermal Torque Meter использовали для измерения эластичности кожи лица ( $Ur/Ue$ ) и оценки скорости произошедших изменений. Аналогично другим результатам исследования, у пациентов повысилась эластичность кожи (средняя величина показателя внутренней эластичности кожи повысилась с 0,350  $Ur/Ue$  до 0,432  $Ur/Ue$ , Рис. 3). Эластичность кожи увеличилась на 26,429%, что было максимальным улучшением среди других исследуемых показателей.

Средняя величина показателя внутренней эластичности кожи ( $Ur/Ue$ )



**Рис. 3.** Средние значения результатов измерения внутренней эластичности кожи.  $0,3 \pm 0,029$  до лечения,  $0,432 \pm 0,06$  после лечения.

### 3.4. Толщина кожи

Толщину кожи измерили (мкм) измерили путем ультразвуковой визуализации аппаратом *Ultrascan UC22*. У каждого пациента было отмечено увеличение величины показателя толщины кожи (средняя величина показателя толщины кожи увеличилась с 1652,800 мкм до 1773,800 мкм, Рис. 4), при этом скорость изменения составила 7,321%.



**Рис. 4.** Средние значения результатов измерения толщины кожи.  $1652,8 \pm 302,064$  мкм до лечения,  $1773,8 \pm 293,577$  мкм после лечения.

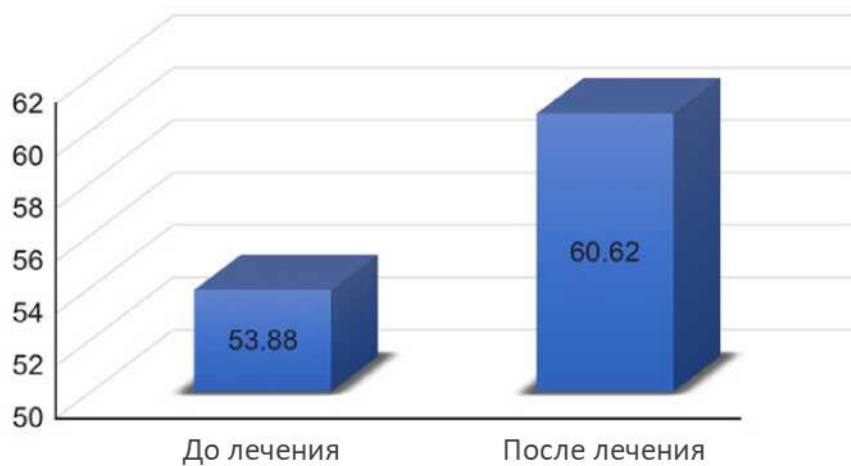
### 3.5. Плотность кожи

Плотность кожи измерили (мкм) при помощи ультразвукового сканера *Ultrascan UC22*. Принцип действия аппарата следующий: короткий электрический импульс генерируется генератором импульсов и преобразуется в ультразвуковой сигнал через ультразвуковой преобразователь; ультразвуковые сигналы передаются на кожу, создавая неоднородные (клеточные, сосудистые и др.) отражения или «эхо» ткани; далее эхо-сигналы принимаются одним и тем же преобразователем и преобразуются в электрические сигналы, которые оцифровываются, сохраняются и обрабатываются в компьютере для отображения изображения, полученного ультразвуковым аппаратом.

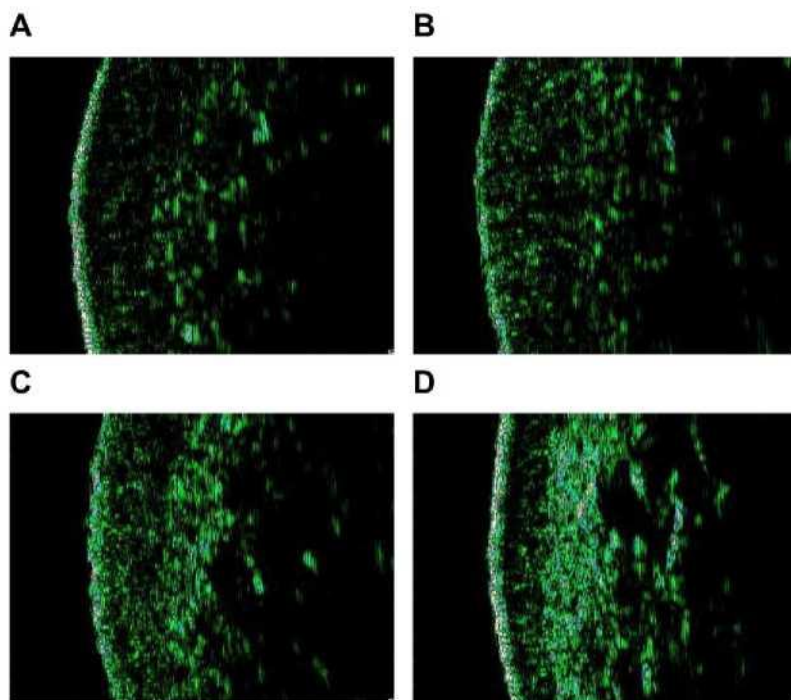
У пациентов было отмечено повышение плотности кожи (Рис. 5), скорость изменения составила 12,509%. На Рис. 6 показаны средние значения увеличения плотности кожи пациентов.



Средняя величина показателя плотности кожи (мкм)



**Рис. 5.** Средние значения результатов измерения плотности кожи.  $53,88 \pm 2,72$  мкм до лечения,  $60,62 \pm 4,201$  мкм после лечения.



**Рис. 6.** Полученные снимки плотности кожи. Субъект 2: плотность кожи до лечения (А) и через одну неделю после завершения лечения (В). Субъект 3: Плотность кожи до лечения (С) и через одну неделю после завершения лечения (D).

### 3.6. Оценка безопасности

Оценка побочных реакций проводилась врачами-дерматологами и пациентами. В течение периода проведения клинических испытаний ни одного сообщения о выявленных побочных реакциях не поступило.

### 3.7. Статистический анализ

В таблице 3 представлены значения скорости изменения и средние значения до и после лечения для каждого параметра, оцениваемого в исследовании. Значения критерия  $p$  были получены после определения критерия знаковых рангов Уилкоксона и приведены в таблице для оценки достоверности полученных различий. Однако из-за небольшого числа участников исследования статистическая значимость оказалась относительно низкой.

**Таблица 3.** Сравнение оцениваемых параметров до и после лечения.

Оцениваемые параметры	Среднее значение		Скорость изменения	$p$ -значение
	До лечения	После лечения		
Морщины вокруг глаз	$0,067 \pm 0,038$ мм	$0,061 \pm 0,033$ мм	-8,955%	0,042
Влажность кожи	$48,9 \pm 4,126\%$	$55,893 \pm 3,371\%$	14,301%	0,043
Внутренняя эластичность кожи	$0,35 \pm 0,029$ Ur/Уе	$0,432 \pm 0,06$ Ur/Уе	23,429%	0,042
Толщина кожи	$1652,8 \pm 302,06$ мкм	$1773,8 \pm 293,58$ мкм	7,321%	0,043
Плотность кожи	$53,88 \pm 2,72$ мкм	$60,62 \pm 4,201$ мкм	12,509%	0,042

## 4. Обсуждение

Старение кожи связано с изменениями внеклеточного матрикса дермы под действием комбинации внутренних и внешних факторов. Наиболее заметную роль в этом процессе играет дисбаланс между синтезом и деградацией компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), способствующий возрастному образованию морщин [24]. В частности, уменьшение количества и разрушение волокон коллагена и эластина, определяющих эластичность кожи, происходит вследствие воздействия протеолитических ферментов, таких как ММП [2]. В предыдущих исследованиях уменьшение содержания эластина и коллагена в дермальном слое кожи человека изучали с помощью многофотонной микроскопии [25,26].

В отличие от более молодой кожи, в возрастной коже обнаруживаются фрагментированные и деградировавшие волокна коллагена и эластина. В результате усиления деградации и замедления биосинтеза коллагеновых и эластических волокон возникает их дефицит [27]. Коллаген и эластин участвуют не только в естественном возрастном старении кожи, но и в старении, вызванном воздействием УФ-лучей [28]. Данный процесс носит название «солнечного эластоза» и, в отличие от эндогенного старения, характеризуется накоплением нефункциональных и дезорганизованных волокон эластина по всей дерме. При неоднократном воздействии УФ-лучей на кожу, ММП, представляющая собой фермент, разрушающий волокна эластина и коллагена, активируется и вызывает их деградацию, что приводит к утрате кожей эластичности [29].

В свою очередь, дефицит и деградация коллагеновых и эластических волокон вызывают такие клинические изменения кожи как морщины, дряблость и утрата ею эластичности [27,29,30]. Клинические признаки старения по своим биомеханическим свойствам имеют общие черты: уменьшение плотности и фрагментация коллагеновых волокон, атрофия сети эластических волокон и уменьшение толщины кожи [30].

Результаты одного из исследований показали, что эластичность кожи быстро снижается в период с 20 до 40 лет, вследствие чего глубина морщин быстро увеличивается в возрасте от 40 до 60 лет [31]. Полученные данные косвенно указывают на то, что старение кожи начинается с утраты ею эластичности, а это означает, что уход за возрастной кожей следует начинать с повышения ее эластичности. Таким образом, поддержание адекватного количества белков ВКМ является наиболее эффективным решением, способствующим замедлению старения кожи.

Репрезентативным методом поддержания надлежащего количества белков ВКМ является увеличение синтеза предшественников этих белков и создание надлежащих условий для лучшего продуцирования клеток. Положительное влияние на синтез белков ВКМ также оказывает применение таких компонентов как медь, вследствие активации лизилоксидазы [32]. Результаты недавно проведенных исследований подтвердили усиление экспрессии белков ВКМ – коллагена и эластина – в фибробластах кожи человека более чем в два и три раза соответственно, благодаря применению специальной смеси, состоящей из аминокислот, меди и гиалуроновой кислоты [23].

Антивозрастное действие продукта Elastic Lab<sup>®</sup>, в состав которого входят аминокислоты, медь и гиалуроновая кислота, было подтверждено результатами данного исследования. Продукт применили четыре раза на пяти пациентах с интервалом в одну неделю, полученные результаты оценили через неделю после завершения лечения. По всем оцениваемым параметрам было отмечено существенное повышение показателей. В среднем глубина морщин вокруг глаз уменьшилась на 8,955 %, влажность кожи увеличилась на 14,301 %, эластичность кожи увеличилась на 23,429 %, толщина и плотность кожи увеличились на 7,321 % и 12,509 % соответственно. Особенно важно отметить изменения показателей эластичности, толщины и плотности кожи, показавшие наибольший рост.

Аппарат Dermal Torque Meter использовали для измерения эластичности кожи лица. Данный аппарат оказывает постоянную нагрузку на кожу путем вращения диска по круговой схеме для измерения углового вращения. Аппарат определяет вращение как угловую деформацию и фиксирует восстановление кожи после снятия нагрузки [33]. Согласно данным предыдущего исследования, при сравнении измерений, полученных при помощи аппарата Dermal Torque Meter, кутометра и дермального фазометра, показатели глубины проникновения кожи, измеренные аппаратом Dermal Torque Meter и кутометром, были выше показателей, измеренных дермальным фазометром. Наиболее точные результаты были получены при помощи аппарата Dermal Torque Meter [34].

Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенного исследования *in vitro*, цель которого заключалась в оценке эффективности воздействия смеси аминокислот на синтез белков ВКМ. Смесь из аминокислот и дополнительных компонентов, использованная в исследовании *in vitro*, позволила повысить эластичность, толщину и плотность кожи за счет стимулирования синтеза белков ВКМ – коллагена и эластина – в дермальных фибробластах. Однако из-за небольшого числа участников исследования статистическая значимость оказалась относительно низкой. Поэтому необходимы дополнительные крупномасштабные клинические испытания. Кроме того, необходимы исследования по измерению изменений содержания эластина и коллагена в результате применения продукта в тканях различных моделей с использованием многофотонной микроскопии.

## 5. Заключение

С возрастом деградация компонентов ВКМ вызывает такие клинические изменения кожи как глубокие морщины, дряблость, тусклость, обвисание кожи и утрата ею эластичности. Проведенные исследования подтвердили, что применение смеси, содержащей аминокислоты, минералы и гиалуроновую кислоту усиливает биосинтез волокон эластина и коллагена в фибробластах дермы, что, в свою очередь, позволяет повысить эластичность кожи и решить такие проблемы кожи, как тонкие линии, покраснение и расширенные поры. Помимо повышения эластичности кожи, эластин обладает высокими ранозаживляющими и регенерирующими свойствами. Для полного понимания свойств и механизмов действия эластина необходимо проведение дальнейших исследований. Кроме того, статистическая значимость настоящего исследования оказалась относительно низкой из-за небольшого числа его участников, поэтому необходимо проведение дополнительных крупномасштабных клинических испытаний для получения достоверных научных и статистических данных.

**Вклад авторов:** Разработка концепции исследования, М.-С.К.; методология, М.-С.К.; программное обеспечение, М.-С.К.; валидация, М.-С.К.; формальный анализ, М.-С.К.; проведение исследования, М.-С.К.; источники данных, М.-С.К.; курирование данных, М.-С.К.; написание первичной рукописи, М.-С.К. и К.-Э.К.; редактирование рукописи, М.-С.К. и Д.-К.Л.; визуализация, М.-С.К.; контроль, М.-С.К.; администрирование проекта, М.-С.К. и С.-Х.С.; привлечение финансирования, М.-С.К. Все авторы одобрили окончательную версию рукописи и согласились с ее представлением к публикации.

**Финансирование:** Исследование было профинансировано Корейским институтом развития стартапов и предпринимательства, номер гранта 10271672.

**Заявление Институционального наблюдательного совета.** Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Институциональным наблюдательным советом Глобального центра медицинских исследований (№ GIRB-20022-FT, 22 декабря 2020 г.).

**Заявление об информированном согласии:** Все пациенты дали свое информированное согласие на участие в исследовании после того, как была полностью объяснена его суть.

**Заявление о доступности данных:** Данные могут быть запрошены у автора, отвечающего за переписку.

**Благодарность:** Все авторы исследования выражают свою благодарность и признательность Корейскому институту стартапов и развития предпринимательства.

**Конфликт интересов:** М.-С.К. является руководителем компании Elastic Lab Inc. К.-Э.К. и Д.-К.Л. являются сотрудниками компании Elastic Lab Inc. Все остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## References

1. Zhang, S.; Duan, E. Fighting against skin aging: The way from bench to bedside. *Cell Transplant.* **2018**, *27*, 729-738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195-4200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Uitto, J.; Olsen, D.R.; Fazio, M.J. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J. Investig. Dermatol.* **1989**, *92*, 61S-77S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kular, J.K.; Basu, S.; Sharma, R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* **2014**, *5*, 1-17. [[CrossRef](#)]
5. Weihermann, A.C.; Lorencini, M.; Brohem, C.A.; de Carvalho, C.M. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2017**, *39*, 241-247. [[CrossRef](#)]
6. Giro, M.G.; Oikarinen, A.I.; Oikarinen, H.; Sephel, G.; Uitto, J.; Davidson, J.M. Demonstration of elastin gene expression in human skin fibroblast cultures and reduced tropoelastin production by cells from a patient with atrophoderma. *J. Clin. Investig.* **1985**, *75*, 672-678. [[CrossRef](#)]
7. Wen, Q.; Mithieux, S.M.; Weiss, A.S. Elastin biomaterials in dermal repair. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 280-291. [[CrossRef](#)]
8. Baud, S.; Duca, L.; Bochicchio, B.; Brassart, B.; Belloy, N.; Pepe, A.; Dauchez, M.; Martiny, L.; Debelle, L. Elastin peptides in aging and pathological conditions. *Biomol. Concepts* **2013**, *4*, 65-76. [[CrossRef](#)]

9. Truter, S.; Rosenbaum-Fiedler, J.; Sapadin, A.; Lebwohl, M. Calcification of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum. *Mt. Sinai J. Med.* **1996**, *63*, 210-215.
10. Almine, J.F.; Wise, S.G.; Weiss, A.S. Elastin signaling in wound repair. *Birth Defects Res. Part C* **2012**, *96*, 248-257. [[CrossRef](#)]
11. Rodriguez-Cabello, J.C.; de Torre, I.G.; Ibanez-Fonzeca, A.; Alonso, M. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 118-133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Daamen, W.F.; Veerkamp, J.H.; van Hest, J.C.; van Kuppevelt, T.H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4378-4398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hashimoto, T.; Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Kakimaru, Y.; Suzuki, K. Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1407-1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hinek, A.; Rabinovitch, M.; Keeley, F.; Okamura-Oho, Y.; Callahan, J. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J. Clin. Investig.* **1993**, *91*, 1198-1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L. Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In *Molecular Cell Biology*, 4th ed.; W. H. Freeman: New York, NY, USA, 2000; pp. 145-154.
16. Shiratsuchi, E.; Nakaba, M.; Yamada, M. Elastin hydrolysate derived from fish enhances proliferation of human skin fibroblasts and elastin synthesis in human skin fibroblasts and improves the skin conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *96*, 1672-1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Barati, M.; Jabbari, M.; Navekar, R.; Farahmand, F.; Zeinalian, R.; Salehi-Sahlabadi, A.; Abbaszadeh, N.; Mokari-Yamchi, A.; Davoodi, S.H. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 2820-2829. [[CrossRef](#)]
18. Bianchi, F.M.; Angelinetta, C.; Rizzi, G.; Pratico, A.; Villa, R. Evaluation of the Efficacy of a Hydrolyzed Collagen Supplement for Improving Skin Moisturization, Smoothness, and Wrinkles. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2022**, *15*, 48-52.
19. Chowdhury, A.; Nosoudi, N.; Karamched, S.; Parasaram, V.; Vyavahare, N. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; Implications to improve skin health. *J. Dermatol. Sci.* **2021**, *102*, 94-100. [[CrossRef](#)]
20. Bukhari, S.N.A.; Roswandi, N.L.; Waqas, M.; Habib, H.; Hussain, F.; Khan, S.; Sohail, M.; Ramli, N.A.; Thu, H.E.; Hussain, Z. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120 Pt B*, 1682-1695. [[CrossRef](#)]
21. Rucker, R.B.; Kosonen, T.; Clegg, M.S.; Mitchell, A.E.; Rucker, B.R.; Uriu-Hare, J.Y.; Keen, C.L. Copper, Lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67* (Suppl. 5), 996S-1002S. [[CrossRef](#)]
22. de Servi, B.; Orlandini, A.; Caviola, E.; Meloni, M. Amino acid and hyaluronic acid mixtures differentially regulate extracellular matrix genes in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2018**, *32*, 517-527. [[PubMed](#)]
23. Chung, K.W.; Song, S.H.; Kim, M.S. Synergistic effect of copper and amino acid mixtures on the production of extracellular matrix proteins in skin fibroblasts. *Mol. Biol Rep.* **2021**, *48*, 3277-3284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Panwar, P.; Butler, G.S.; Jamroz, A.; Azizi, P.; Overall, C.M.; Bromme, D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* **2018**, *65*, 30-44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Pitte, J.C.; Freis, O.; Vazqueq-Duchene, M.D.; Perie, G.; Pauly, G. Evaluation of elastin/collagen content in human dermis in-vivo by multiphoton tomography variation with depth and correlation with aging. *Cosmetics* **2014**, *1*, 11-221.
26. Wang, H.; Shyr, T.; Fevola, M.J.; Cula, G.O.; Stamatas, G.N. Age-related morphological changes of the dermal matrix in human skin documented in vivo by multiphoton microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2018**, *23*, 030501. [[CrossRef](#)]
27. Shin, J.-W.; Kwon, S.-H.; Choi, J.-Y.; Na, J.-I.; Huh, C.-H.; Choi, H.-R.; Park, K.-C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2126. [[CrossRef](#)]
28. Baumann, L.; Bernstein, E.F.; Weiss, A.S.; Bates, D.; Humphrey, S.; Silberberg, M.; Daniels, R. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet. Surg. J. Open Forum.* **2021**, *14*, 1-8. [[CrossRef](#)]
29. McCabe, M.C.; Hill, R.C.; Calderone, K.; Cui, Y.; Yan, Y.; Quan, T.; Fisher, G.J.; Hansen, K.C. Alterations in extracellular matrix composition during aging and photoaging of the skin. *Matrix Biol. Plus* **2020**, *8*, 100041. [[CrossRef](#)]
30. Haydonta, V.; Bernardb, B.A.; Fortunel, N.O. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *177*, 150-156. [[CrossRef](#)]
31. Cho, C.; Cho, E.; Kim, N.; Shin, J.; Woo, S.; Lee, E.; Hwang, J.; Ha, J. Age-related biophysical changes of the epidermal and dermal skin in Korean women. *Skin Res. Technol.* **2019**, *25*, 504-511. [[CrossRef](#)]
32. Hill, K.E.; Davidson, J.M. Induction of increased collagen and elastin biosynthesis in copper-deficient pig aorta. *Arteriosclerosis* **1986**, *6*, 98-104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Boyce, S.T.; Supp, A.P.; Wichkett, R.R.; Hoath, S.B.; Warden, G.D. Assessment with the Dermal Torque Meter of Skin Pliability After Treatment of Burns with Cultures Skin Substitutes. *J. Bure Care Rehabil.* **2000**, *21*, 55-63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Murray, B.C.; Wickett, R.R. Correlations between Dermal Torque Meter<sup>®</sup>, Cutometer<sup>®</sup>, and Dermal Phase Meter<sup>®</sup> measurements of human skin. *Skin Res. Technol.* **1997**, *3*, 101-106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

© 2022 от авторов. Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария. Эта статья находится в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY). (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>):

### Атрибуты Лицензии 4.0 International (CC BY 4.0)

Это удобочитаемое краткое описание лицензии (а не ее замена).

В рамках лицензии пользователь имеет право:

- Делиться — копировать и распространять материал на любом носителе или в любом формате;
- Адаптировать — копировать, трансформируйте и изменять материал для любых целей, даже коммерческих.

Лицензиар не может лишить вас этих прав до тех пор, пока вы соблюдаете следующие условия:

- Указание авторства — пользователь обязан указать соответствующую информацию, предоставить ссылку на лицензию и указать, были ли внесены изменения. Это можно делать любым разумным способом, но ни в коем случае не предполагающим, что лицензиар одобряет вас или ваше использование.
- Никаких дополнительных ограничений — Вы не имеете права применять юридические условия или технологические меры, которые юридически ограничивают других в выполнении чего-либо, разрешенного лицензией.

#### **Уведомления:**

- Пользователь не обязан соблюдать условия лицензии в отношении элементов материала, находящихся в общественном достоянии, или в тех случаях, когда ваше использование разрешено применимым исключением или ограничением.
- Никаких гарантий не дается. Лицензия может не предоставлять вам всех разрешений, необходимых для использования по назначению. Например, другие права, такие как публичность, неприкосновенность частной жизни или моральные права, могут ограничивать то, как вы используете материал.

#### **Глоссарий**

amino acid composition – аминокислотный состав  
anti-aging effects – антивозрастное действие  
collagen and elastin fibers – волокна коллагена и эластина  
cross-linking – перекрестное связывание  
cuproenzyme – медь-содержащий фермент  
dermal fibroblasts – дермальные фибробласты  
elastin calcification – кальцификация эластина  
elastin synthesis – синтез эластина  
extracellular matrix – внеклеточный матрикс  
fibroblast – фибробласт  
hyaluronic acid – гиалуроновая кислота  
laminin peptides – пептиды ламинина  
L-lysine HCL – L-лизин моногидрохлорид  
lysyl oxidase – лизилоксидаза  
microfibrillar scaffold – микрофибриллярный каркас  
multiphoton microscopy – многофотонная микроскопия  
proteolytic digest – протеолитический гидролизат  
signaling mechanisms – сигнальные механизмы  
skin aging – старение кожи  
skin density – плотность кожи  
skin elasticity – эластичность кожи  
skin moisture – влажность кожи  
skin thickness – толщина кожи  
solar elastosis – солнечный эластоз  
triple-helical structure – тройная спиральная структура  
wound-healing properties – ранозаживляющие свойства  
wrinkle reduction – сокращение морщин

## Article

# Evaluation of the Efficacy of an Elastin-Inducing Composition Containing Amino Acids, Copper, and Hyaluronic Acid: Results of an Open Single-Center Clinical Trial Study

Man-Seok Kim <sup>1,\*</sup>, Ko-Eun Chun <sup>1</sup>, Dong-Keun Lee <sup>1</sup> and Seh-Hyon Song <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Elastic Lab Inc., 8, Seongnam-daero 331beon-gil, Bundang-gu, Seongnam-si 13558, Korea; elasticlab.kechun@gmail.com (K.-E.C.); elasticlab.dk@gmail.com (D.-K.L.)

<sup>2</sup> College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 48434, Korea; shsong@ks.ac.kr

\* Correspondence: elasticlab.kr@gmail.com; Tel.: +82-70-7537-0380

**Abstract:** The degradation and reduction in number of extracellular matrix (ECM) proteins are representative biological changes associated with decreased elasticity resulting in various skin problems. Elastin is an ECM protein that plays an important role in maintaining the skin's structure. It is highly elastic and helps the tissue regain its shape after stretching or contracting. We aimed to evaluate the efficacy of the product containing amino acids, copper, and hyaluronic acid on the improvement of skin aging. A small open single-center study involved four treatments performed on five subjects at 1-week intervals with Elastic Lab<sup>®</sup>. As a result, eye wrinkles, skin moisture, inner elasticity, thickness, and density were improved 1 week after the last treatment in all subjects compared to the baseline. Among all evaluation items, skin elasticity, thickness, and density showed significant increases. Therefore, by using a composition containing amino acids, minerals, and hyaluronic acid, the biosynthesis of elastin and collagen in the skin increases, restoring skin elasticity and improving various skin problems.

**Keywords:** elastin; collagen; hyaluronic acid; skin elasticity; skin density; skin moisture; wrinkle; skin thickness; skin aging; ECM



**Citation:** Kim, M.-S.; Chun, K.-E.; Lee, D.-K.; Song, S.-H. Evaluation of the Efficacy of an Elastin-Inducing Composition Containing Amino Acids, Copper, and Hyaluronic Acid: Results of an Open Single-Center Clinical Trial Study. *Cosmetics* **2022**, *9*, 51. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9030051>

Academic Editor: Nobutomo Ikarashi

Received: 15 April 2022

Accepted: 15 May 2022

Published: 16 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Skin aging is a complex biological phenomenon that is affected by a combination of intrinsic (chronological, hormonal, and genetic) and extrinsic factors. The extrinsic factors include sun exposure, pollution, dietary habits, and chemicals [1,2]. As skin ages, protein degrading factors such as metalloproteinases (MMPs) increase, resulting in an abnormal balance in the extracellular matrix (ECM), a noncellular component that provides essential physical scaffolding and initiates crucial biochemical activities in tissues [2].

Moreover, the increased MMP, plasminogen activator inhibitor, and reactive oxygen species levels destroy the integrity of elastin networks and modify collagen fiber networks with aging [2]. Such changes in ECM proteins lead to skin aging phenotypes, including deep wrinkles, laxity, dullness, and sagging [1]. Therefore, stimulating ECM protein synthesis is an essential approach to preventing skin aging.

The dermis is mainly composed of fibroblasts that produce the primary structural constituents of the skin, including various types of collagen, elastin, and fibronectin [2]. Optimal quantities and delicate interactions of these components are necessary to maintain normal physiological properties of the skin [3]. Collagen is the most abundant fibrous protein within the interstitial ECM and constitutes up to 30% of the total protein mass of a multicellular animal. It provides tensile strength, regulates cell adhesion, supports chemotaxis and migration, and directs tissue development [2]. There are almost 30 types of collagen that exist, although not all are isolated to ECM. Collagen is arranged into fibrils to provide the required structural integrity to the tissues. Specifically, this fibril formation is



defined by collagen types I, II, III, V, and XI. Collagen type I is the dominant form found extensively in almost all tissues, particularly in tendons and the skin. Other forms of collagen occur in defined areas. Collagen type II is found in cartilage and the cornea, whereas collagen type III is primarily found within the walls of blood vessels. Collagen is not only produced by fibroblasts, but also by endothelial and epithelial cells [4].

Elastin is another major ECM fiber that plays an important role in maintaining cutaneous homeostasis [5]. It is highly elastic and provides tissues with the ability to recover from continuous stretching [4]. Elastic fibers are composed of a microfibrillar scaffold (composed of various types of glycoproteins) and a core (composed of cross-linked elastin). Elastin is secreted from cells in the form of a water-soluble precursor called tropoelastin and is converted into insoluble elastin through cross-linking [6]. Unlike collagen, elastin synthesis mainly occurs during early and late neonatal periods. Moreover, the synthesis rate of functional levels of tropoelastin or elastin decreases with age [7]. Although elastin synthesis rarely occurs in adult fibroblasts, damaged elastin fibers are not always properly repaired. The elastic fibers that have undergone this process cannot function normally and tissues that should be elastic become hard, resulting in heart, blood vessel, lung, and skin diseases [8]. Moreover, when elastin is implanted it calcifies, causing arteriosclerosis, heart valve disease, and bioartificial heart valve calcification. However, the mechanisms of elastin calcification are still unknown [9]. Thus, the proper stimulation of elastin synthesis became an innovative target to maintain skin homeostasis and reduce skin aging.

Elastin is also known to possess wound-healing properties. These properties are most effective during the last-gestational stages of fetal development. However, in newborns, elastin expression significantly decreases, making scarless wound repair impossible. In various animal models, elastin has successfully been used on adult wounds to enhance wound healing [10,11]. Elastin-based scaffolds can reduce wound contraction by regulating fibroblast differentiation and improving dermal regeneration and skin elasticity [12]. It was also confirmed that the application of elastin peptides was therapeutically effective in animal models. A mixture of elastin and laminin peptides augmented the re-epithelialization of an injured rabbit ear and a proteolytic digest of elastin increased the synthesis of elastic fibers in mouse dermal fibroblasts [13,14]. Further investigation of the effects of elastin on wound healing in adults and fetuses as well as the signaling mechanisms of elastin in the wound healing process will open up new approaches to treatments that will enable complete wound healing.

Collagen and elastin have unusual amino acid compositions compared to other proteins. The triple-helical structure of collagen arises from an unusual abundance of three amino acids: glycine, proline, and hydroxyproline [15]. Elastin also has a similar amino acid composition to that of collagen in terms of glycine and proline residues, but with about 75% hydrophobic residues (Gly, Val, Ala) [12]. Therefore, many studies have focused on attempts to increase ECM protein levels with various components of amino acids.

Previous studies have attempted to induce ECM components such as elastin and collagen. To confirm these effects, elastin and collagen were extracted from animals and hydrolyzed, and cell tests or oral administration studies were conducted [16–18]. In addition, the elastin and collagen-inducing effects of polyphenols were also studied [19].

Hyaluronic acid is well known for its ability to replenish moisture in the skin. It has water-holding ability, resulting in smooth, moisturized skin. The hydration of the skin can slow down the formation of wrinkles and improve skin texture. The nutricosmetic effects of hyaluronic acid promote cell regeneration and even stimulate the production of collagen. Hyaluronic acid is already used in a number of products, including dermal fillers and cosmetics [20].

Lysyl oxidase (LOX) is a cuproenzyme that is necessary for the stabilization of ECM, especially the enzymatic cross-linking of collagen and elastin. Therefore, activation of LOX is required to increase the stable synthesis of elastin and collagen. Copper increases the activity of LOX, which will positively affect the synthesis of elastin and collagen [21].

We are interested in the investigation of the elastin–collagen-inducing effects through the biofeedback mechanism of the combination of mineral and amino acids constituting elastin and collagen. Moreover, we are looking for additional combinations that induce elastin and collagen with amino acids. In previous studies, researchers confirmed the elastin–collagen-inducing effects of a mixture of amino acids and hyaluronic acid [22].

Recently, we conducted an in vitro study to confirm whether the mixture of amino acids, copper, and hyaluronic acid that we developed stimulates the expression of ECM proteins in dermal fibroblasts. The composition increased the gene and protein expression levels of collagen and elastin by over two- and three-fold, respectively. The test results indicated that this unique composition successively promotes ECM protein synthesis in dermal fibroblasts [23]. However, further studies are still needed to confirm the effect of improving elastin synthesis on skin aging. In this study, a clinical trial was conducted to confirm whether this particular composition has anti-aging effects including wrinkle reduction, skin moisture, elasticity, thickness, and density improvement.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Product

Elastic Lab<sup>®</sup> is a product containing a mixture of amino acids such as glycine, L-proline, L-alanine, L-valine, L-leucine, L-lysine HCL, copper, and hyaluronic acid for the improvement of skin aging.

### Materials

A list of the materials employed for each evaluation item in the study is described in Table 1.

**Table 1.** Materials employed in the study.

Evaluation Items	Materials
Wrinkles Around the Eyes	Antera 3D CS
Skin Moisture	Moisture meter D Compact
Skin Inner Elasticity	Dermal Torque Meter
Skin Thickness and Density	Ultrascan UC22

### 2.2. Study Design

A small open single-center study was conducted from October 21st to December 17th, 2020, at the Global Medical Research Center. A total of five subjects were treated with Elastic Lab<sup>®</sup> to evaluate its efficacy on skin anti-aging by observing changes in eye wrinkles, skin moisture, inner elasticity, thickness, and density. The subjects received treatment on the face four times at one-week intervals. Moreover, measurement and questionnaire evaluations were conducted before the treatment and one week after the last treatment. Dermatologists proceeded with the safety evaluation. The inclusion and exclusion criteria are presented in Table 2.

**Table 2.** Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Healthy male and female adults between 25 and 60 years of age.</li> <li>• Subjects who can read, understand, and sign the informed consent form.</li> <li>• Subjects willing and able to comply with all study requirements.</li> <li>• No open wounds, blisters, or skin diseases at the test site.</li> <li>• Not in the process of being a volunteer for another research.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Women who are pregnant or lactating.</li> <li>- Subjects who have serious or chronic illnesses that may affect this clinical research</li> <li>- Subjects who have undergone dermatological procedures for treating wrinkles, and skin resurfacing. Or skin rejuvenation in the treatment area within 1 year of study participation.</li> </ul>

### 2.3. Statistical Analysis

The data were analyzed using the Wilcoxon signed-rank test to determine the results in terms of skin improvements. Statistical significance was determined by the paired *t*-test method with *p*-values less than 0.05 considered a significant difference.

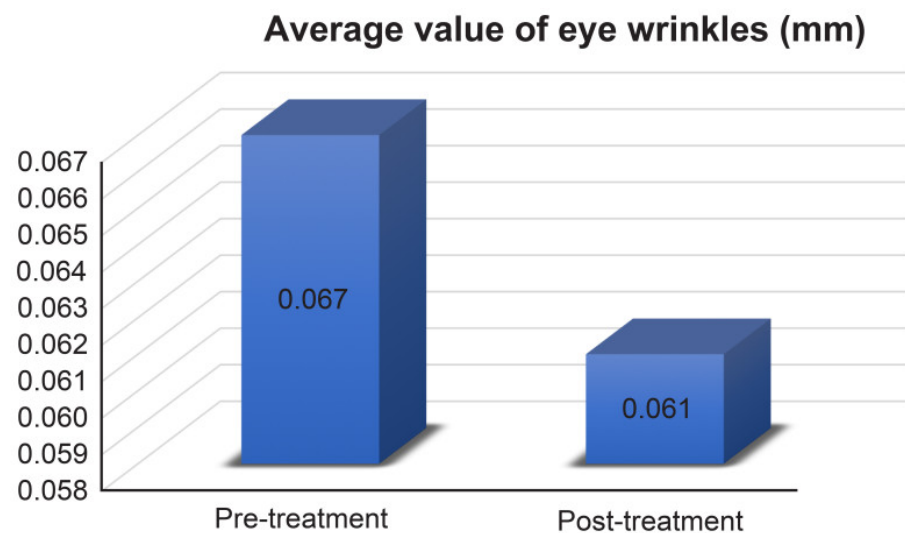
### 3. Results

This study was conducted to confirm the efficacy of Elastic Lab® in the improvement of skin wrinkles, moisture, inner elasticity, thickness, and density. The rate of change was calculated as a percentage by subtracting the pre-treatment value from the post-treatment value and dividing it by the pre-treatment measurement value.

$$\text{change rate} = \frac{\text{pre-treatment value} - \text{post-treatment value}}{\text{pre-treatment value}} \cdot 100 \quad (1)$$

#### 3.1. Wrinkles around the Eyes

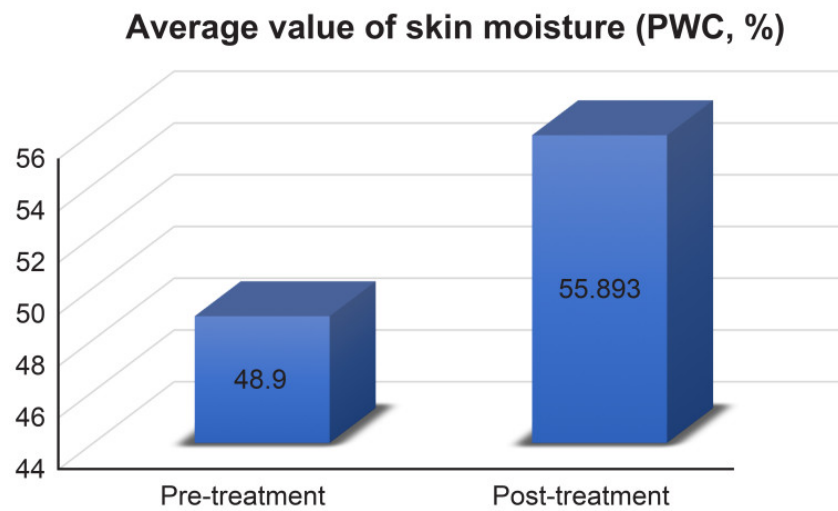
The depth (mm) of wrinkles around the eyes was measured using Antera 3D CS before and after the treatment. This showed that the depth of wrinkles around the eyes of all subjects decreased (average decreased from 0.067 mm to 0.061 mm, Figure 1) after the treatments, and the average rate of change was  $-8.955\%$ .



**Figure 1.** Average values of eye wrinkles measurement results. Pre-treatment  $0.067 \pm 0.038$  mm, post-treatment  $0.061 \pm 0.033$  mm.

#### 3.2. Skin Moisture

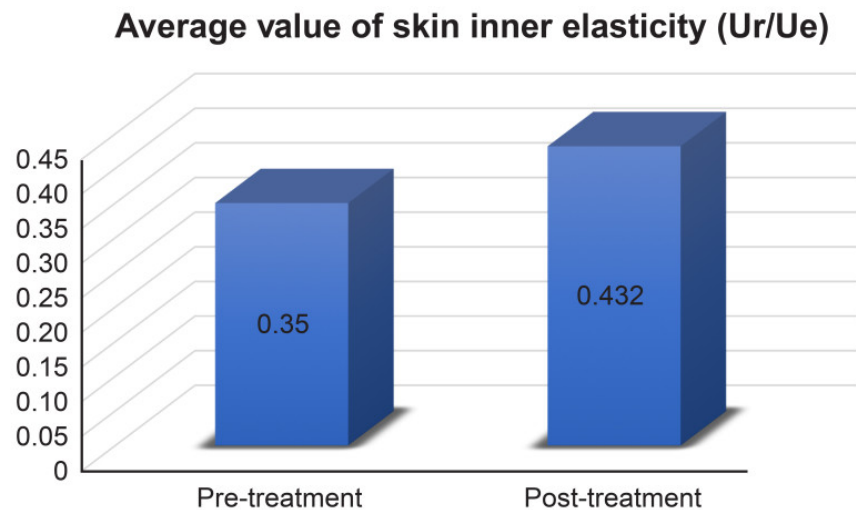
To compare skin hydration before and after product treatment, skin moisture was measured (PWC, %) with a Moisturemeter D Compact. The skin moisture content of all subjects showed improvement (average skin moisture increased from 48.900% to 55.893%, Figure 2), and the change rate also showed a large change of 14.301%.



**Figure 2.** Average values of skin moisture measurement results. Pre-treatment  $48.9 \pm 4.126\%$ , post-treatment  $55.893 \pm 3.371\%$ .

### 3.3. Skin Inner Elasticity

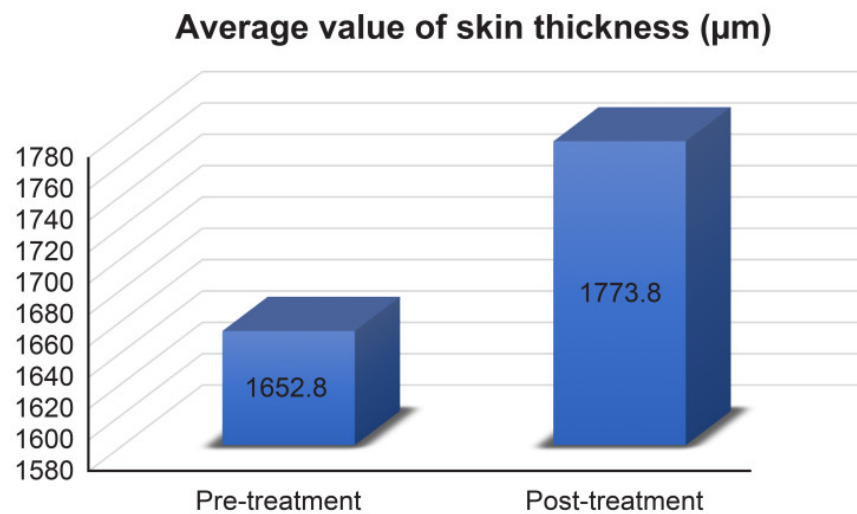
Using a dermal torque meter, the elasticity in the inner skin was measured ( $U_r/U_e$ ) and the rate of change was evaluated. Similar to other results, skin elasticity was also improved in all subjects (average elasticity in the inner skin increased from  $0.350 U_r/U_e$  to  $0.432 U_r/U_e$ , Figure 3). Skin elasticity showed a 26.429% increase, which was the maximum improvement among other evaluation items.



**Figure 3.** Average values of skin inner elasticity measurement results. Pre-treatment  $0.3 \pm 0.029$ , post-treatment  $0.432 \pm 0.06$ .

### 3.4. Skin Thickness

Skin thickness was measured ( $\mu\text{m}$ ) via imaging with an Ultrascan UC22. Skin thickness also increased in every subject (average skin thickness increased from  $1652.800 \mu\text{m}$  to  $1773.800 \mu\text{m}$ , Figure 4) and the change rate was 7.321%.

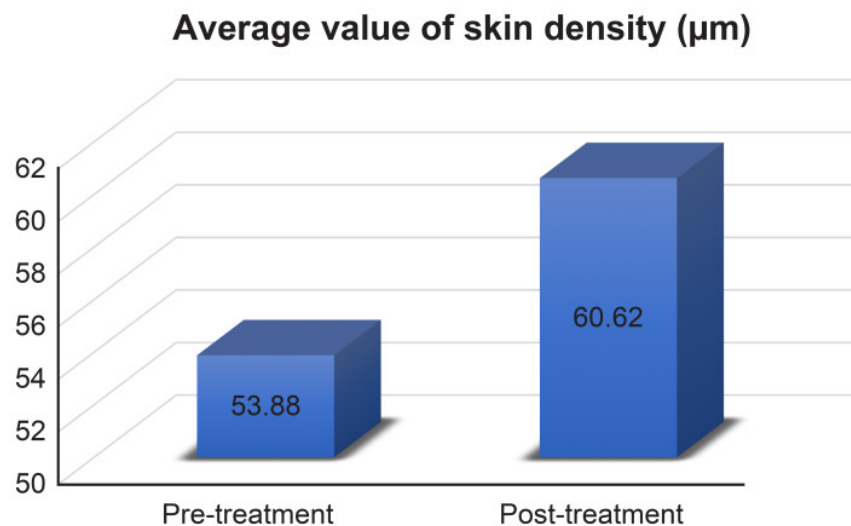


**Figure 4.** Average values of skin thickness measurement results. Pre-treatment  $1652.8 \pm 302.064 \mu\text{m}$ , post-treatment  $1773.8 \pm 293.577 \mu\text{m}$ .

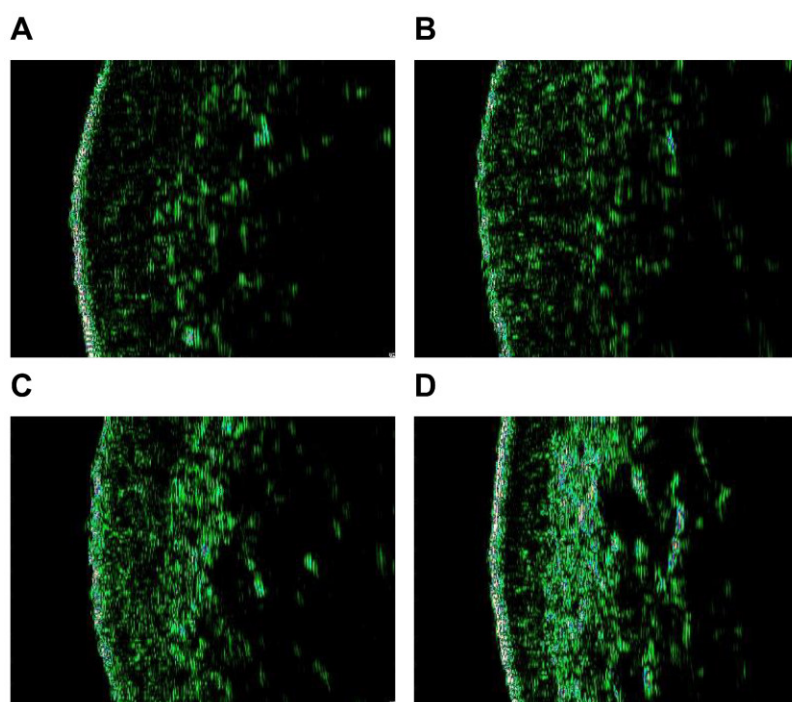
### 3.5. Skin Density

Skin density was also photographed and measured ( $\mu\text{m}$ ) using an Ultrascan UC22. The principle of the device is as follows. A short electrical pulse is generated from the pulse generator and converted into an ultrasonic signal through an ultrasonic transducer. Ultrasonic signals are transmitted to the skin, creating inhomogeneous (cell-forming, vascular, etc.) reflections or “echoes” of the tissue. These echoes are received by the same transducer and converted into electrical signals, which are digitalized, stored, and processed in a computer to display an ultrasound image.

The skin density of subjects was improved (Figure 5) and the change rate was 12.509%. As shown in Figure 6 below, the skin density of subjects increased significantly.



**Figure 5.** Average values of skin density measurement results. Pre-treatment  $53.88 \pm 2.72 \mu\text{m}$ , post-treatment  $60.62 \pm 4.201 \mu\text{m}$ .



**Figure 6.** Skin density photo results. Subject 2: Skin density before treatment (A) and 1 week after the last treatment (B). Subject 3: Skin density before treatment (C) and 1 week after the last treatment (D).

### 3.6. Safety Evaluation

The adverse reaction evaluation was performed by a dermatologist and test subjects, and there was no report of any specific adverse reaction during the clinical trial period.

### 3.7. Statistical Analysis

Table 3 presents the rate of change and the mean pre-treatment and post-treatment values for each measurement. The table also provides the estimates along with *p*-values. These *p*-values were provided from the results of the Wilcoxon signed-rank test. However, due to the small number of subjects, the statistical significance is relatively low.

**Table 3.** Comparison of each evaluation item results pre and post-treatment.

Evaluation Item	Mean		Rate of Change	<i>p</i> -Value
	Pre-Treatment	Post-Treatment		
Wrinkles Around the Eyes	0.067 ± 0.038 mm	0.061 ± 0.033 mm	−8.955%	0.042
Skin Moisture	48.9 ± 4.126%	55.893 ± 3.371%	14.301%	0.043
Skin Inner Elasticity	0.35 ± 0.029 Ur/Ue	0.432 ± 0.06 Ur/Ue	23.429%	0.042
Skin Thickness	1652.8 ± 302.06 μm	1773.8 ± 293.58 μm	7.321%	0.043
Skin Density	53.88 ± 2.72 μm	60.62 ± 4.201 μm	12.509%	0.042

## 4. Discussion

Skin aging is characterized by alterations in the extracellular matrix of the dermis through a combination of intrinsic and extrinsic factors. The most notable change is an imbalance between ECM synthesis and degradation, which promotes age-associated wrinkle formation [24]. In particular, collagen and elastin fibers, which are key to skin elasticity, are decomposed and reduced by proteolytic enzymes such as MMP [2]. In previous studies, a decrease in the distribution of elastin and collagen in the human dermal layer was observed through multiphoton microscopy [25,26].

In contrast to younger skin, aged skin showed fragmented and degraded collagen and elastic fibers. An increase in degradation and reduction in the biosynthesis of collagen

and elastic fibers leads to a deficiency of collagen and elastin [27]. Collagen and elastin are not only involved in aging with time but also aging due to exposure to UV rays [28]. This process is called “solar elastosis”, and unlike endogenous aging, it is characterized by the accumulation of nonfunctional and disorganized elastic fibers throughout the dermis. If the skin is repeatedly exposed to UV rays, MMP, which is an enzyme that breaks down elastin and collagen, is activated and causes the degradation of collagen and elastic fibers, resulting in loss of skin elasticity [29].

This deficiency and degradation of collagen and elastic fibers results in a range of clinical changes such as wrinkles, loss of elasticity, and sagging of the skin [27,29,30]. The biomechanical properties of these clinical signs of aging showed common features. A decrease in collagen fiber density and fragmentation, atrophy of the elastin network, and reduction of skin thickness were observed [30].

Another study found that skin elasticity shows a rapid decrease from one’s 20s to the early 40s. Thereafter, wrinkle depth rapidly increases from the early 40s to the 60s [31]. These results indirectly indicate that skin aging starts from the loss of elasticity, meaning that skin aging care should be started from the care of elasticity. Thus, maintaining an adequate amount of ECM proteins is the most effective approach to delaying skin aging.

A representative approach for the maintenance of ECM proteins includes supplying adequate precursors of these proteins and creating proper conditions for cells to produce more. Supplementation of other components such as copper also showed positive effects on ECM protein synthesis by activating lysyl oxidase [32]. Recently, we developed a mixture composed of amino acids, copper, and hyaluronic acid, and demonstrated that it increased the expression of ECM proteins, collagen, and elastin in human skin fibroblasts by over two- and three-fold, respectively [23].

In this study, the results confirmed the anti-aging effects of Elastic Lab<sup>®</sup> products containing amino acids, copper, and hyaluronic acid. The product was administered to five subjects at one-week intervals for four sessions, and evaluations were performed a week later. The results showed improvements in all evaluation criteria for all subjects. On average, the wrinkle depth around the eyes decreased by 8.955%, skin moisture increased by 14.301%, skin elasticity increased by 23.429%, skin thickness increased by 7.321%, and skin density increased by 12.509%. Primarily, it is important to note the changes in skin elasticity, skin thickness, and skin density, which showed the greatest improvements.

Moreover, we measured skin elasticity using a dermal torque meter (DTM). A DTM is a device that applies a constant load to the skin by rotating a disk in a ring pattern to measure the angular rotation. The device records the rotation as an angular deformation and records the rotational recovery of the skin after the load is released [33]. According to a previous study, when a DTM, cutometer, and DPM (dermal phase meter) were compared with each other, the skin depths measured by DTM and cutometer were deeper than that by the DPM. In addition, the parameters and results for the DTM were found to be the most sensitive [34].

This result was consistent with the *in vitro* experiment previously conducted in which the mixture of amino acids stimulated ECM protein synthesis. We can conclude that skin elasticity, thickness, and density showed considerable improvements as amino acids and various components stimulated the skin fibroblasts to produce ECM proteins such as collagen and elastin. However, due to the small number of subjects, the statistical significance of this study is relatively low. Therefore, additional large-scale clinical trials are needed. Furthermore, studies to measure changes in elastin and collagen contents due to application of the product in tissues of various models using multiphoton microscopy are also needed.

## 5. Conclusions

As we age, ECM components degrade and elasticity decreases, resulting in deep wrinkles, laxity, dullness, and sagging of the skin. Using a composition containing amino acids, minerals, and hyaluronic acid, it is possible to induce an increase in the amount

of biosynthesis of elastin and collagen in the fibroblasts of the skin dermis. This in turn restores skin elasticity and improves various skin problems, such as fine lines, redness, and skin pores. In addition to the effects of improving skin elasticity, elastin has properties that improve wound healing and regeneration. However, further studies will be needed to fully understand the effects and mechanisms of elastin. Additionally, since this study lacks statistical significance due to the small number of subjects studied, further studies such as large-scale clinical trials are needed to build up more scientific and statistical evidence.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.-S.K.; methodology, M.-S.K.; software, M.-S.K.; validation, M.-S.K.; formal analysis, M.-S.K.; investigation, M.-S.K.; resources, M.-S.K.; data curation, M.-S.K.; writing—original draft, M.-S.K. and K.-E.C.; writing—review and editing, M.-S.K. and D.-K.L.; visualization, M.-S.K.; supervision, M.-S.K.; project administration, M.-S.K. and S.-H.S.; funding acquisition, M.-S.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Korea Institute of Startup and Entrepreneurship Development, grant number 10271672.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Global Medical Research Center (No. GIRB-20022-FT, 22 December 2020).

**Informed Consent Statement:** All of the patients gave their informed consent to participate in the study after the nature of the study had been fully explained.

**Data Availability Statement:** The data are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** All authors are thankful to the Korea Institute of Startup and Entrepreneurship Development. We ensure that all authors have consented to the acknowledgment.

**Conflicts of Interest:** M.-S.K. is an employer of Elastic Lab Inc. K.-E.C. and D.-K.L. are employees of Elastic Lab Inc. All other authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Zhang, S.; Duan, E. Fighting against skin aging: The way from bench to bedside. *Cell Transplant.* **2018**, *27*, 729–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Uitto, J.; Olsen, D.R.; Fazio, M.J. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J. Investig. Dermatol.* **1989**, *92*, 61S–77S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kular, J.K.; Basu, S.; Sharma, R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* **2014**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
5. Weihermann, A.C.; Lorencini, M.; Brohem, C.A.; de Carvalho, C.M. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2017**, *39*, 241–247. [[CrossRef](#)]
6. Giro, M.G.; Oikarinen, A.I.; Oikarinen, H.; Sephel, G.; Uitto, J.; Davidson, J.M. Demonstration of elastin gene expression in human skin fibroblast cultures and reduced tropoelastin production by cells from a patient with atrophoderma. *J. Clin. Investig.* **1985**, *75*, 672–678. [[CrossRef](#)]
7. Wen, Q.; Mithieux, S.M.; Weiss, A.S. Elastin biomaterials in dermal repair. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 280–291. [[CrossRef](#)]
8. Baud, S.; Duca, L.; Bochicchio, B.; Brassart, B.; Belloy, N.; Pepe, A.; Dauchez, M.; Martiny, L.; Debelle, L. Elastin peptides in aging and pathological conditions. *Biomol. Concepts* **2013**, *4*, 65–76. [[CrossRef](#)]
9. Truter, S.; Rosenbaum-Fiedler, J.; Sapadin, A.; Lebowhl, M. Calcification of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum. *Mt. Sinai J. Med.* **1996**, *63*, 210–215.
10. Almine, J.F.; Wise, S.G.; Weiss, A.S. Elastin signaling in wound repair. *Birth Defects Res. Part C* **2012**, *96*, 248–257. [[CrossRef](#)]
11. Rodríguez-Cabello, J.C.; de Torre, I.G.; Ibañez-Fonzeca, A.; Alonso, M. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 118–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Daamen, W.F.; Veerkamp, J.H.; van Hest, J.C.; van Kuppevelt, T.H. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4378–4398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hashimoto, T.; Suzuki, Y.; Tanihara, M.; Kakimaru, Y.; Suzuki, K. Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1407–1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hinek, A.; Rabinovitch, M.; Keeley, F.; Okamura-Oho, Y.; Callahan, J. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J. Clin. Investig.* **1993**, *91*, 1198–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



15. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L. Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In *Molecular Cell Biology*, 4th ed.; W. H. Freeman: New York, NY, USA, 2000; pp. 145–154.
16. Shiratsuchi, E.; Nakaba, M.; Yamada, M. Elastin hydrolysate derived from fish enhances proliferation of human skin fibroblasts and elastin synthesis in human skin fibroblasts and improves the skin conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *96*, 1672–1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Barati, M.; Jabbari, M.; Navekar, R.; Farahmand, F.; Zeinalian, R.; Salehi-Sahlabadi, A.; Abbaszadeh, N.; Mokari-Yamchi, A.; Davoodi, S.H. Collagen supplementation for skin health: A mechanistic systematic review. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 2820–2829. [[CrossRef](#)]
18. Bianchi, F.M.; Angelinetta, C.; Rizzi, G.; Pratico, A.; Villa, R. Evaluation of the Efficacy of a Hydrolyzed Collagen Supplement for Improving Skin Moisturization, Smoothness, and Wrinkles. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2022**, *15*, 48–52.
19. Chowdhury, A.; Nosoudi, N.; Karamched, S.; Parasaram, V.; Vyavahare, N. Polyphenol treatments increase elastin and collagen deposition by human dermal fibroblasts; Implications to improve skin health. *J. Dermatol. Sci.* **2021**, *102*, 94–100. [[CrossRef](#)]
20. Bukhari, S.N.A.; Roswandi, N.L.; Waqas, M.; Habib, H.; Hussain, F.; Khan, S.; Sohail, M.; Ramli, N.A.; Thu, H.E.; Hussain, Z. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120 Pt B*, 1682–1695. [[CrossRef](#)]
21. Rucker, R.B.; Kosonen, T.; Clegg, M.S.; Mitchell, A.E.; Rucker, B.R.; Uriu-Hare, J.Y.; Keen, C.L. Copper, Lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67* (Suppl. 5), 996S–1002S. [[CrossRef](#)]
22. de Servi, B.; Orlandini, A.; Caviola, E.; Meloni, M. Amino acid and hyaluronic acid mixtures differentially regulate extracellular matrix genes in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2018**, *32*, 517–527. [[PubMed](#)]
23. Chung, K.W.; Song, S.H.; Kim, M.S. Synergistic effect of copper and amino acid mixtures on the production of extracellular matrix proteins in skin fibroblasts. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 3277–3284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Panwar, P.; Butler, G.S.; Jamroz, A.; Azizi, P.; Overall, C.M.; Brömme, D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* **2018**, *65*, 30–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pitte, J.C.; Freis, O.; Vazquez-Duchene, M.D.; Perie, G.; Pauly, G. Evaluation of elastin/collagen content in human dermis in-vivo by multiphoton tomography variation with depth and correlation with aging. *Cosmetics* **2014**, *1*, 11–221.
26. Wang, H.; Shyr, T.; Fevola, M.J.; Cula, G.O.; Stamatas, G.N. Age-related morphological changes of the dermal matrix in human skin documented in vivo by multiphoton microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2018**, *23*, 030501. [[CrossRef](#)]
27. Shin, J.-W.; Kwon, S.-H.; Choi, J.-Y.; Na, J.-I.; Huh, C.-H.; Choi, H.-R.; Park, K.-C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2126. [[CrossRef](#)]
28. Baumann, L.; Bernstein, E.F.; Weiss, A.S.; Bates, D.; Humphrey, S.; Silberberg, M.; Daniels, R. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet. Surg. J. Open Forum.* **2021**, *14*, 1–8. [[CrossRef](#)]
29. McCabe, M.C.; Hill, R.C.; Calderone, K.; Cui, Y.; Yan, Y.; Quan, T.; Fisher, G.J.; Hansen, K.C. Alterations in extracellular matrix composition during aging and photoaging of the skin. *Matrix Biol. Plus* **2020**, *8*, 100041. [[CrossRef](#)]
30. Haydonta, V.; Bernardb, B.A.; Fortunel, N.O. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *177*, 150–156. [[CrossRef](#)]
31. Cho, C.; Cho, E.; Kim, N.; Shin, J.; Woo, S.; Lee, E.; Hwang, J.; Ha, J. Age-related biophysical changes of the epidermal and dermal skin in Korean women. *Skin Res. Technol.* **2019**, *25*, 504–511. [[CrossRef](#)]
32. Hill, K.E.; Davidson, J.M. Induction of increased collagen and elastin biosynthesis in copper-deficient pig aorta. *Arteriosclerosis* **1986**, *6*, 98–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Boyce, S.T.; Supp, A.P.; Wichkett, R.R.; Hoath, S.B.; Warden, G.D. Assessment with the Dermal Torque Meter of Skin Pliability After Treatment of Burns with Cultures Skin Substitutes. *J. Bure Care Rehabil.* **2000**, *21*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Murray, B.C.; Wickett, R.R. Correlations between Dermal Torque Meter<sup>®</sup>, Cutometer<sup>®</sup>, and Dermal Phase Meter<sup>®</sup> measurements of human skin. *Skin Res. Technol.* **1997**, *3*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]