

Rola lamelarnych warstw lipidowych w procesie przenikania substancji przez skórę

The role of lamellar lipid layers in the skin penetration



Kosmetologia
/ nauka

WSTĘP

Skóra stanowi barierę chroniącą organizm przed działaniem zewnętrznych czynników mechanicznych, fizycznych, chemicznych oraz biologicznych.

Ochronę przed urazami mechanicznymi zapewnia:

- warstwa rogowa i jej zdolność do przetrwania w przypadku powtarzających się urazów mechanicznych,

—» 20

STRESZCZENIE

Proces przenikania substancji leczniczych i kosmetycznych przez skórę jest zdeterminowany budową warstwy rogowej naskórka. W jego powierzchniowej części, pomiędzy ściśle do siebie przylegającymi martwymi komórkami, zwanymi keratynocytami, występuje macierz lipidowa. Lamelarna struktura lipidowych przestrzeni międzykomórkowych warstwy rogowej naskórka o wysoce hydrofobowym charakterze jest główną drogą transportu substancji przez wierzchnią część skóry i jednocześnie efektywną barierą. Prowadzone są badania naukowe mające na celu poznanie macierzy lipidowych naskórka oraz odnalezienie nowych kierunków modyfikacji jej struktury i właściwości fizykochemicznych zwiększających jej przepuszczalność dla związków kosmetycznych i leczniczych. W artykule przedstawiono badania spektroskopowe w podczerwieni osłabionego całkowitego odbicia IR-ATR (*Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*) przedstawiające konformacyjne rozluźnienie struktury modelowej dwuwarstwy lipidowej w obecności flufenazyny, które może prowadzić do wzrostu przepuszczalności tak zmodyfikowanych błon lipidowych. **Słowa kluczowe:** przenikanie przez skórę, lipidy warstwy rogowej naskórka, badania IR-ATR, flufenazyna

ABSTRACT

The diffusion of cosmetics and medical substances through the skin is determined by the structure of stratum corneum. On the surface of skin, between the closely packed cells of keratinocytes, there is a lipid matrix. Lamellar structure of the lipid matrix characterized by highly hydrophobic nature is the main pathway of different substances through the skin and it is the most effective barrier, at the same time. At present, many different scientific studies are focused on the explanation of the structure of skin lipid matrix and findings on new directions of the modifications of structure and physicochemical properties leading to the increase of the permeability of skin for cosmetics and medical substances. The IR-ATR (Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance) studies of conformational fluidization of lipid model bilayers in the presence of flufenazine, were presented in the article, which can drive to increase the permeability of modified membranes.

Key words: diffusion through the skin, lipids of the stratum corneum, IR-ATR studies, flufenazine

KATARZYNA CIEŚLIK-BOCZULA¹,
AGATA JASZCZYŹYŃ²,
KAZIMIERZ GAŚSIOROWSKI²,
PIOTR ŚWIĄTEK³,
WIEŚLAW MALINKA³

¹ Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 72 09

² e-mail: katarzyna.cieslik@chem.uni.wroc.pl
Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław

³ Katedra Chemii Leków, Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich, ul. Borowska 211
50-556 Wrocław

otrzymano / received:

07.12.2012

poprawiono / corrected:

11.01.2013

zaakceptowano / accepted:

08.02.2013

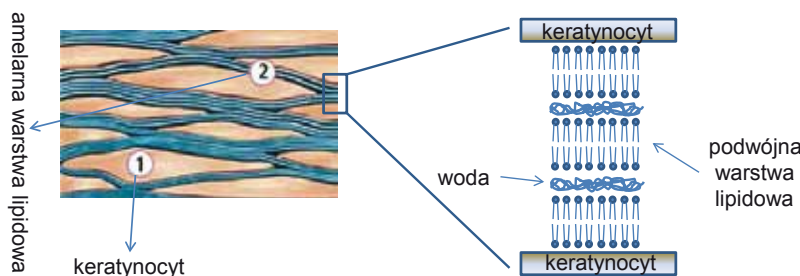


- falista budowa warstwy brodawkowej pozwalająca na rozciąganie skóry,
- włókna kolagenowe i sprężyste skóry właściwej, nadające skórze sprężystość i spistość,
- tkanka podskórna – tłuszczowa, która na skutek swej sprężystości osłabia działanie bodźców zewnętrznych.

SKÓRA

Płaszcz tłuszczowy skóry, składający się z wydzieliny gruczołów łojowych, wody wydzielanej przez gruczoły potowe oraz z lipidów pochodzących z komórek naskórka, kwaśny odczyn skóry (pH 4.2-5.6), jak również obecność keratyny zapewniają ochronę przed szkodliwymi czynnikami chemicznymi. Działanie antybakteryjne skóry polega na utrzymywaniu kwaśnego odczynu płaszcza tłuszczowego i jednoczesnym wysychaniu naskórka oraz stałym procesie złuszczenia go, przez co bakterie zostają usunięte w sposób mechaniczny. Ochrona przed czynnikami fizycznymi polega na:

- powstawaniu melaniny, która chroni skórę i tkanki pod nią przed promieniowaniem UV,
- ochronie przed ciepłem i zimnem, czyli regulacji cieplnej (zwiększanie lub zmniejszanie utraty ciepła). Dodatkowo skóra uczestniczy w metabolizmie lipidów, węglowodanów, białek i witamin, w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej oraz w procesach odpornościowych.



Rys. 1 Model muru warstwy rogowej naskórka z lamelarnymi warstwami lipidowymi wypełniającymi przestrzenie międzykomórkowe. Źródło: www.eucenin.com.

Skóra składa się ze skóry właściwej (*dermis*) oraz przykrywającego ją od zewnętrznej strony naskórka (*epidermis*) z warstwą rogową (*stratum corneum*). Między naskórkiem a skórą właściwą znajduje się błona podstawowa o bezkomórkowej strukturze. Komórki warstwy podstawowej (*stratum basale*) ulegają ciągłym podziałom, dając początek keratynocytom naskórka. Od 2 do 4 tygodni trwa proces przemieszczania się keratynocytów z warstwy podstawowej do warstwy rogowej, gdzie w najbardziej zewnętrznych jej obszarach ulegają one złuszczeniu. W okresie tym komórki w wyniku keratynizacji tworzą strefę martwych komórek *stratum corneum*, złożoną z około 15-20 warstw. Podczas keratynizacji w warstwie ziarnistej z lipidów tworzą się tzw. ciała lamelarne, które podczas obumierania keratynocytów wydzielane są do przestrzeni międzykomórkowych. Struktura warstwy rogowej przypomina swoją budową model muru, w którym cegły stanowią martwe, ubogie w lipidy i obficie zaopatrzone w białka (głównie w α -keratyny) keratynocyty, a zaprawę murarską – macierz zawierającą lipidy (ceramidy, cholesterol), wolne kwasy tłuszczowe, a także enzymy kataboliczne, które powodują przekształcanie się lipidów ze związków polarnych w niepolarne, nierozpuszczalne w wodzie. Lipidy tworzą na drodze krystalizacji

zacji tzw. płaszcz lipidowy. Schemat struktury warstwy rogowej naskórka przedstawiono na rysunku 1.

Przestrzenie międzykomórkowe *stratum corneum* wypełnione są lipidami ułożonymi w uporządkowane struktury laminarne, których jednostką podstawową jest podwójna warstwa lipidowa [1]. Hydrofilowe ugrupowania polarne lipidów zwrócone są do siebie, a pomiędzy nimi znajdują się warstwy wody (Rys. 1). Cząsteczki lipidu są związkami amfifilowymi, tzn. posiadają w swej strukturze obszar o charakterze polarnym i rejon niepolarny. Część hydrofilowa (polarna), zwana inaczej hydrofilową „główką”, reprezentowana jest przez polarne grupy fosforanowe, karboksylowe, hydroksylowe, cholinowe itd. Obszar hydrofobowy (niepolarny) stanowią długie łańcuchy węglowodorowe, zwane hydrofobowymi „ogonami” cząsteczek lipidowych. Cząsteczki amfifilowe tworzą agregaty, których struktura zależy między innymi od kształtu budujących je cząsteczek lipidowych, rodzaju środowiska, w którym powstają, temperatury, siły jonowej czy pH. Dwuwarstwa lipidowa jest termodynamicznie stabilną i jedną z najczęściej przyjmowanych form agregacji lipidów budujących żywe komórki. Dwuwarstwowe struktury lipidowe wypełniające przestrzenie między komórkami keratynocytów powstają w wyniku lamelnego ułożenia cząsteczek lipidowych kontaktujących się ze sobą główkami polarnymi, a w obszarze hydrofobowym węglowodorowe łańcuchy przylegają do siebie wzdłuż swej długości. Jedna monowarstwa kontaktuje się z drugą poprzez obszar hydrofobowy. W ten sposób powstaje dwuwarstwa lipidowa, która przylega do drugiej dwuwarstwy swoją polarną powierzchnią (Rys. 1). Przestrzeń między dwuwarstwami lipidowymi ma charakter wysoce hydrofilowy i wypełniona jest cząsteczkami wody, które odpowiadają między innymi za stopień nawilżenia skóry oraz za wzrost stopnia wchłaniania związków kosmetycznych i leczniczych.

Rzeczywistą barierę w przenikaniu substancji przez skórę stanowi martwa warstwa rogową naskórka, przez którą substancje dyfundują głównie lipidową drogą międzykomórkową. Przez warstwę rogową skóry substancje dyfundują ponad tysiąc razy wolniej niż przez żywe warstwy skóry, głównie z powodu ścisłego przylegania keratynocytów i lamilarnie ułożonych lipidów otaczających komórki. Niepolarny charakter warstwy rogowej sprzyja przenikaniu substancji lipofilowych, niepolarnych, niezjonizowanych i o niskiej masie cząsteczkowej.

W dużym uproszczeniu warstwę rogową naskórka można traktować jako szereg membran lipidowych, które musi pokonać dyfundująca cząsteczka. Proces przenikania substancji aplikowanej w nośniku (podłożu) na skórę można uznać za dyfuzję bierną, którą opisuje pierwsze prawo Ficka (1):

$$J = K \cdot D \cdot \Delta C / L \quad (1)$$

gdzie:

J - ilość substancji dyfundującej - szybkość dyfuzji (kg/cm² x h),

K - współczynnik podziału substancji między warstwę rogową a podłoże,

D - współczynnik dyfuzji substancji w warstwie rogowej (cm²/h),

AC - różnica stężeń substancji po obu stronach membrany
 - warstwy rogowej (kg/cm^3),
 L - długość drogi dyfuzji - grubość warstwy rogowej (cm).

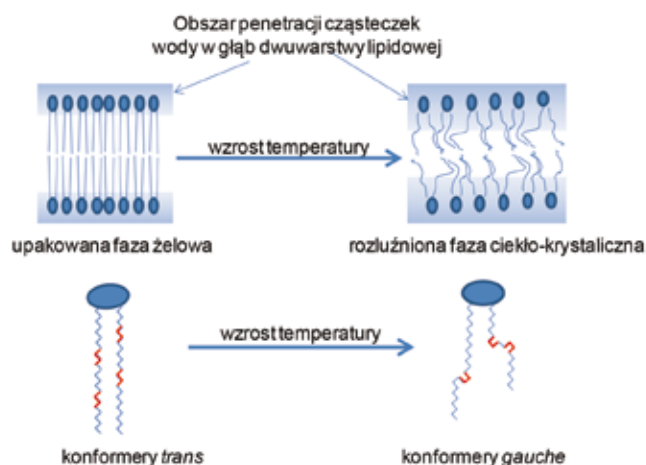
Współczynnik K (podziału substancji między warstwę rogową a podłoże) trudno wyznaczyć eksperymentalnie z uwagi na złożoność struktury warstwy rogowej, dlatego do obliczeń zwykle stosuje się wartość współczynnika podziału substancji między n-oktanołem a wodą. Związki, dla których wartości logarytmu dziesiętnego współczynnika podziału substancji n-oktanol/ woda ($\log P$) wynoszą od 2 do 4, najchętniej i najszybciej przenikają przez skórę.

Zdolność ksenobiotyków do przenikania przez skórę zależy od właściwości fizykochemicznych substancji penetrującej, rodzaju nośnika, z którego substancja w postaci rozpuszczonej musi się uwolnić, i drogi penetracji. Wydajność transportowania oraz przenikania substancji leczniczych lub kosmetycznych wzdłuż warstwy rogowej naskórka może być regulowana zmianą stopnia upakowania, uporządkowania i uwodnienia warstw lipidowych przestrzeni międzykomórkowych. Dwuwarstwa lipidowa w temperaturze zwanej temperaturą głównego przejścia fazowego (T_m) podlega głównemu przejściu fazowemu, podczas którego błona lipidowa ze sztywnej, ściśle upakowanej i wysoce uporządkowanej fazy żelowej przechodzi w rozluźnioną i nieuporządkowaną strukturę fazy ciekłokrystalicznej (Rys. 2). Wzrost temperatury dostarcza do układu energię, która pozwala na tworzenie konformerów *gauche* z energetycznie korzystniejszej konformacji *trans* grup CH_2 w łańcuchach węglowodorowych cząsteczek lipidów. Wprowadzenie konformera *gauche* zakrzywia łańcuch węglowodorowy cząsteczki lipidu, przez co jej kształt staje się bardziej nieregularny (Rys. 2). W zakresie niskich temperatur, tzn. przed głównym przejściem fazowym, w fazie żelowej grupy CH_2 węglowodorowych ogonów lipidowych przyjmują głównie konformację *trans*. W tym stanie cząsteczki lipidu z prostymi, niezakrzywionymi łańcuchami węglowodorowymi przyjmują regularny kształt walca, dzięki któremu jest możliwe ściśle i dokładne dopasowanie cząsteczek lipidowych w dwuwarstwie lipidowej. W fazie żelowej odległości między lipidami są minimalne, przez co ograniczona zostaje głębokość penetracji cząsteczek wody w głąb błony. Wraz z podwyższeniem temperatury, w fazie ciekłokrystalicznej następuje wzrost odległości pomiędzy nieregularnie ułożonymi cząsteczkami lipidowymi. To sprzyja powstawaniu wolnych przestrzeni i wypełnianiu ich, głównie w części powierzchniowej błony, przez cząsteczki wody. Rozluźnienie struktury błony, której towarzyszy wzrost jej uwodnienia, ułatwia przenikanie bardziej polarnych substancji przez warstwę rogową skóry.

ZAŁOŻENIA BADAŃ WŁASNYCH

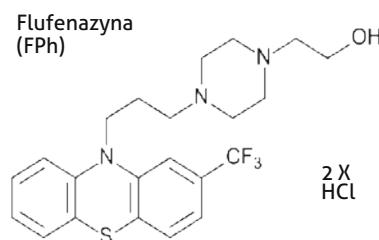
Upłynnienie struktury błony lipidowej może nastąpić pod wpływem temperatury oraz związków, które fluidyzują dwuwarstwę lipidową, np. detergenty. Związki z grupy fenotiazyn wykazują silne powinowactwo do struktur lipidowych i w większości zbadanych przypadków znacząco obniżają temperaturę głównego przejścia fazowego, wprowadzając błonę w rozluźniony stan ciekłokrystaliczny [2-5]. Zbadano, iż należąca do fenotiazyn flufenazy (FPh), której strukturę przedstawiono na rys. 3, wywołuje w błonie konformacyjne rozluźnienie, które-

Podczas głównego przejścia fazowego następuje wzrost uwodnienia dwuwarstwy lipidowej



Rys. 2 Główne przejście fazowe dwuwarstwy lipidowej, któremu towarzyszy wzrost konformacyjnego nieuporządkowania błony oraz wzrost jej uwodnienia
 Źródło: opracowanie własne autora

go poziom ściśle zależy od ilości związku wprowadzonego w strukturę dwuwarstwy lipidowej (Rys. 4).



Rys. 3 Wzór strukturalny flufenazy (FPh)
 Źródło: opracowanie własne autora

Spektroskopia w podczerwieni osłabionego całkowitego odbicia IR-ATR (*Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*) pozwala śledzić zmiany konformacyjne grup CH_2 w łańcuchach węglowodorowych cząsteczek lipidów. Drgania rozciągające symetryczne i antysymetryczne grup metylenowych ($\nu_{\text{asym}} \text{CH}_2$) odzwierciedlają zmiany w stosunku konformerów *trans* do *gauche*.

MATERIAŁY I METODY

Jajeczną sfinngomielinę (SM) zakupiono w Avanti Polar Lipids, czystość wynosiła $> 99\%$. Dwuchlorowodorek flufenazy (FPh) zakupiono w Jelfa, Jelenia Góra, Polska.

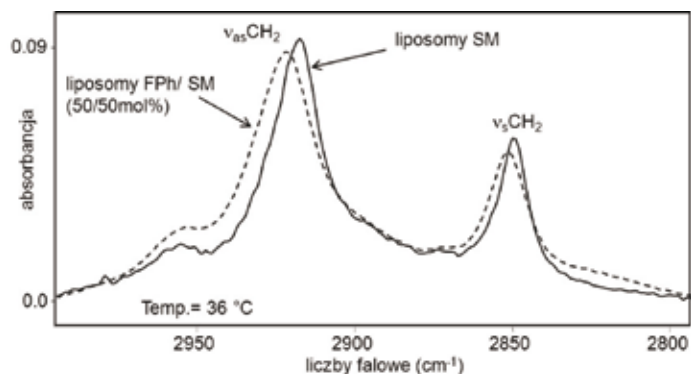
Przygotowanie liposomów: liposomy o składzie SM/FPh przygotowano w następujących stosunkach moliowych obu składników: 90/10 mol%, 80/20 mol%, 70/30 mol%, 60/40 mol% i 50/50 mol%. Ilość użytego lipidu wynosiła 10 mg. Suchy film SM/FPh otrzymano poprzez odsuszenie roztworu o składzie metanol/chloroform (1:1) na ściance kolbki okrągłodennej. W wyniku hydratacji suchego filmu jednym mililitrem wody (Millipore, Mili Q) otrzymano dyspersję liposomową, którą poddano ekstruzji przez membranę o średnicy 100 nm (LiposoFast z polikarbonyłową membraną, Avestin, Kanada).

Pomiary IR-ATR: otrzymaną dyspersję liposomową naniesiono na kryształ ZnSe (10-odbiciowy, Specac) i prowadzono badania w funkcji temperatury. Widma rejestrowano z rozdzielczością 2 cm^{-1} (128 skanów) na spektrometrze Nicolet Magna 860 FT-IR.



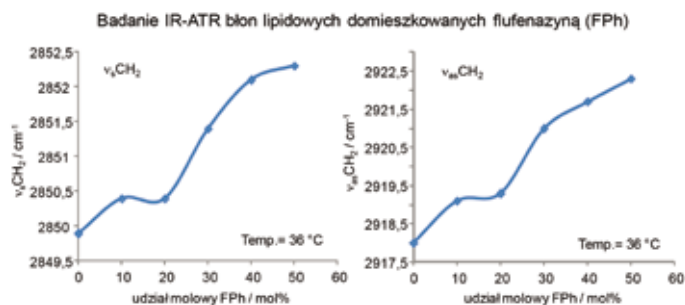
WYNIKI I WNIOSKI

Wzrost udziału konformerów *gauche* przesuwają maksimum pasm $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ w kierunku wyższych częstotliwości, dodatkowo obniża się ich intensywność oraz ulegają one poszerzeniu (Rys. 4).



Rys. 4 Widmo IR-ATR w obszarze drgań rozciągających symetrycznych i antysymetrycznych grup CH_2 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) cząsteczek lipidowych mierzone w układzie liposomów sfingomielinowych (SM) i liposomów o składzie FPh/SM 50/50mol% w temperaturze 36°C
Źródło: opracowanie własne autora

Obecność flufenazyny w błonie zmienia stan konformacyjny w obszarze hydrofobowym. Dla udziału molowego FPh w przedziale od 10 mol% do 50 mol% maksimum pasma drgań rozciągających symetrycznych ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$) przesuwa się odpowiednio od 2850,4 cm^{-1} do 2852,5 cm^{-1} . Dla pasma pochodzącego od drgań rozciągających antysymetrycznych ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$) położenia te wynoszą odpowiednio 2918 cm^{-1} i 2922,5 cm^{-1} (Rys. 5). Otrzymane wyniki dowodzą wzrostu konformacyjnego nieuporządkowania powstałemu na skutek wprowadzenia flufenazyny pomiędzy cząsteczkę lipidowe błony. Liposomy zbudowane z lipidu - jajecznej sfingomieliny, posłużyły w prezentowanych badaniach jako model błon biologicznych, dla których maksimum pasm $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ w temperaturze 36°C wynosiły odpowiednio 2849,8 i 2917,9 cm^{-1} . W badanej temperaturze niedomieszkowane dwuwarstwy lipidowe występowały w ściśle upakowanej fazie żelowej, której przepuszczalność dla związków chemicznych jest ograniczona.



Rys. 5 Zależność zmiany położenia maksimum pasm $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ w funkcji stężenia flufenazyny w modelowych błonach lipidowych zbudowanych z jajecznej sfingomieliny w temperaturze 36°C
Źródło: opracowanie własne autora

Domieszkowane flufenazyną błony lipidowe przyjmują strukturę rozluźnioną, nieuporządkowaną i bogatą w konformery *gauche*, co sprzyja wzrostowi ich przepuszczalności dla różnych substancji. Głębokość penetracji cząsteczek wody wzrasta dla rozluźnionych dwuwarstw lipidowych, przez co błona staje się bardziej uwodniona i polarna. Pochodne fenotiazyny mogą stanowić potencjalne czynniki zwiększające nawodnienie i zmiękczenie lipidowej macierzy warstwy rogowej skóry, a tym samym mogą przyczynić się do podwyższenia wydajności skórniego wchłaniania związków kosmetycznych i leczniczych. **KE**

LITERATURA

1. J. Hadgraft, R.H. Guy: *Transdermal drug delivery*, Marcel Dekker, New York 1989.
2. K. Cieślak-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gąsiorowski, A. Koll: *Interactions of dihydrochloride flufenazine with DPPC liposomes: ATR-IR and 31P NMR studies*, Journal of Physical Chemistry B, 113, 2009, 15495-15502.
3. A. B. Hendrich, O. Wesolowska, K. Michalak: *Trifluoperazine induces domain formation in zwitterionic phosphatidylcholine but not in charged phosphatidylglycerol bilayers*, Biochimica et Biophysica Acta, 1510, 2001, 414-425.
4. A. B. Hendrich, O. Wesolowska, M. Komorowska, N. Motohashi, K. Michalaka: *The alterations of lipid bilayer fluidity induced by newly synthesized phenothiazine derivative*, Biophysical Chemistry, 98, 2002, 275-285.
5. M. Makoto, S. Tatsuo, Y. Kunio: *Effects of chlorpromazine and other phenothiazine derivatives on the permeability of liposomes*, Biochemical Pharmacology, 28(2), 1979, 295-299.

Praca współfinansowana w ramach programu POMOST (V edycja) Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Regionalnego. Dodatkowo współfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki (grant nr. N N204 150338) i ÖAD (projekt nr. PL-05/2011) w ramach umowy między PRL a republiką Austrii o współpracy kulturalnej i naukowej, podpisanej 14VI 1972 r. w Wiedniu. Dodatkowe wsparcie finansowe zostało udzielone w ramach dotacji celowej przyznanej przez MNiSW na prowadzenie w 2012 r. badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców.

