

Wpływ naturalnego kolagenu na stan antyoksydacyjny i profil lipidowy skóry wrażliwej. Badania wstępne

The influence of natural collagen on antioxidant and lipid status of sensitive skin. Preliminary studies



Kosmetologia
i nauka

WPROWADZENIE

Skóra stanowi aktywną barierę, która bierze udział w wydalaniu produktów przemiany materii, regulacji temperatury i ochronie przed egzogennymi czynnikami fizycznymi, chemicznymi oraz biologicznymi. Jako bariera zewnętrzna jest narażona na ciągłe działanie czynników utleniających: fizycznych (promieniowanie UV), wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (RFT). Źródłem RFT mogą być również czynniki endogenne. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórce jest łańcuch oddechowcy w mitochondriach oraz enzymy biorące udział w procesach utleniania: oksydazy NADPH, lipooksygenazy, cyklooksygenazy oraz mieloperoxydazy w neutrofilach [1].

W niskich stężeniach RFT są nieodzowne dla funkcjonowania komórek. Stanowią one wtórne przekaźniki, które przekazują informacje wewnątrz komórek, biorąc udział w procesach proliferacji czy programowanej śmierci (apoptozie), stanowią element odpowiedzi immunologicznej.

Nadmierna produkcja RFT i/lub niewydolność mechanizmów usuwających ich nadmiar prowadzi do stresu oksydacyjnego. W jego wyniku zmienia się przemiana materii, dochodzi do uszkodzenia makrocząstek: lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Oksydacyjne zmiany biochemiczne leżą u podstaw przewlekłych stanów zapalnych, dezorganizacji lub zaburzonej struktury włókien kolagenowych, zmiany funkcji skóry, jej starzenia, procesów zapalnych czy procesów kancerogenezy [2].

W celu ochrony przed reaktywnymi formami tlenu w skórze rozwinął się złożony układ antyoksydacyjny. Układ ten obejmuje składowe enzymatyczne oraz nieenzymatyczne. Enzymy mogą bezpośrednio przeciwdziałać RFT, np. poprzez dysmutazę ponadtlenkową (zmiana anionorodnik ponadtlenkowy), a katalaza i peroksydaza glutationowa rozkładają nadtlenek wodoru. Istnieje grupa enzymów, które wspomagają aktywność głównych enzymów antyoksydacyjnych (np. reduktaza glutationowa). Nieenzymatyczny układ antyoksydacyjny obejmuje antyoksydanty niskocząsteczkowe,



—> 182

STRESZCZENIE

Naturalny nanotropokolagen uzyskiwany ze skóry ryb morskich swobodnie przenika do przestrzeni międzykomórkowej, gdzie jest wykorzystywany przez fibroblasty do syntezy włókien kolagenowych. Właściwości antyoksydacyjne włókien kolagenowych związane są z wychwytem reaktywnych form tlenu (rodnik hydroksyloxy) oraz promieniowaniem UV.

W pracy przedstawiono nowatorską, nieinwazyjną metodę ekstrakcji według M. Portugal-Cohen stosowaną do oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej i unieczynniania rodnika syntetycznego DPPH przez nanotropokolagen aplikowany na powierzchnię skóry wrażliwej. Stwierdzono, że systematyczne stosowanie nanotropokolagenu prowadzi do wzrostu całkowitej zdolności antyoksydacyjnej FRAP i do większej zdolności zmiatania rodnika DPPH.

Słowa kluczowe: nanotropokolagen, całkowita zdolność antyoksydacyjna, skóra wrażliwa

ABSTRACT

Natural nanotropocollagen obtained from skin of marine fish freely passes into the intercellular spaces where it is used by fibroblasts for the synthesis of collagen fibers. The antioxidant properties of collagen fibers are bound with reactive oxygen species scavenging (mainly hydroxy radical) and absorption of UV radiation.

The study assess the total antioxidant capacity and the ability to scavenge synthetic DPPH radical by nanotropocollagen applied to the sensitive skin surface. In the study a novel, non-invasive method of extraction by M. Portugal-Cohen was used. It was found that the regular use of nanotropocollagen in the surface of sensitive skin leads to an increase in total antioxidant capacity FRAP and increase in ability to scavenge DPPH.

Key words: nanotropocollagen, total antioxidant capacity, sensitive skin

AGATA PIETRZYCKA¹

IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA²

¹ Zakład Cytobiologii, Katedra Farmakologii
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum, ul. Medyczna 9
30-688 Kraków, tel. +48 12 620 57 11
e-mail: apietrzyt@cm-uj.krakow.pl

² Małopolska Wyższa Szkoła im. J. Dietla
Wydział Nauk o Zdrowiu
Rynek Główny 34, 31-010 Kraków

otrzymano / received:
14.03.2014

poprawiono / corrected:
12.04.2014

zaakceptowano / accepted:
29.06.2014



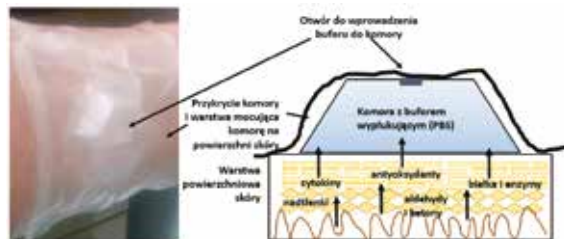
które są syntetyzowane w komórce (glutation), są produktami przemiany materii (kwas moczowy) lub są dostarczane z dietą lub w kosmetykach (kwas askorbowy, α -tokoferol, β -karoten, polifenole herbaty, izoflawony sojowe). Istnieją również antyoksydanty niskocząsteczkowe, które działają pośrednio – białka wiążące jony metali przejściowych, katalizujących reakcje Habera-Weissa [3].

Podstawową strukturą, która zapewnia właściwości skóry, jest kolagen. Jest on produkowany przez fibroblasty w obrębie szorstkiej siateczki endoplazmatycznej z aminokwasów hydroksylizyny i hydroksyproliny, tzw. łańcuch α prokolagenu. Proteazy prokolagenu przekształcają go w przestrzeni pozakomórkowej do tropokolagenu. Częsteczki tropokolagenu polimeryzują w włókna kolagenowe [4]. Do prawidłowej syntezy tego białka konieczny jest kwas askorbinowy (witamina C). Kolagen zapewnia skórze wytrzymałość na rozciąganie i sprężystość. Sieć kolagenowa stanowi miejsce umocowania cząsteczek melaniny (odpowiadającej za pigmentację skóry) oraz kwasu hialuronowego (odpowiadającego za nawilżenie skóry).

Naturalny tropokolagen uzyskiwany ze skóry ryb morskich (np. łososia czy tilapii) jako nanocząsteczka o wymiarach 280 x 1,5 nm może swobodnie dyfundować do przestrzeni międzykomórkowej poprzez mieszki włosowe, gruczoły łojowe i gruczoły potowe. Najważniejszą drogą wchłaniania transdermalnego tropokolagenu są pory skórne. Tropokolagen przekazany do przestrzeni międzykomórkowej wychwytywany jest przez fibroblasty do syntezy włókien kolagenowych.

Badając bezpośredni wpływ starzenia się skóry i fotostarzenia na metabolizm kolagenu, wykazano znamienne obniżony poziom kolagenu oraz mRNA dla prokolagenu typu I w komórkach starzejących się w porównaniu do komórek skóry młodej [5].

W innych badaniach stwierdzono, że kolagen przejmuje na siebie działanie reaktywnych form tlenu, chroniąc fibroblasty [6]. Rodnik hydroksylowy lub nadtlenek wodoru powodują uszkodzenie kolagenu poprzez tworzenie pomiędzy cząsteczkami kolagenu wiązań krzyżowych, w wyniku czego cząsteczki kolagenu ulegają polimeryzacji, tracą swoje elastyczne właściwości, wytrącają się z roztworów [7].



Rys. 1. Schemat komory do przemywania powierzchni skóry w celu oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej FRAP oraz zdolności zmiatania rodnika DPPH. Model komory przygotowany według M. Portugal-Cohen [11]

Tabela 1. Porównanie wyników uzyskanych w grupie kontrolnej i grupie stosującej regularnie kolagen

	Grupa Kontrolna n = 9				Grupa Kolagenu n = 17			
	Średnia	Mediana	Wariancja	Błąd Standard.	Średnia	Mediana	Wariancja	Błąd Standard.
Wiek	20,50	20,50	1,67	0,65	24,76	25,00	9,32	0,74
Nattuszczenie %	14,64	14,29	5,99	1,22	17,82	17,67	19,38	1,07
FRAP mMol/L	0,24	0,24	0,001	0,01	0,31	0,31	0,001	0,01
RS DPPH % / próbkę	36,55	36,61	3,19	0,89	45,25	41,68	63,98	1,94

Wypadkowa działania nieenzymatycznych antyoksydantów niskocząsteczkowych stanowi o całkowitym potencjale antyoksydacyjnym [8].

Wysoki odsetek składu płaszcza lipidowego na powierzchni skóry SSL (*Skin Surface Lipid*) stanowią długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, trójglicerydy, cholesterol i estry cholesterolu, fosfolipidy oraz skwalen. Promieniowanie UV i wzrost stężenia RFT, wywołując reakcje peroksydacji, prowadzą do wzrostu stężenia utlenowanego skwalenu oraz cholesterolu, ich penetrację w głębsze warstwy skóry, gdzie wywołują miejscowe reakcje zapalne i immunologiczne. Zmiany w SSL obserwowano m.in. w trądziku, atopowym zapaleniu skóry, pokrzywce i starzeniu się [9]. Wzajemne reakcje między RFT i cytokinami prozapalnymi odgrywają ważną rolę w patofizjologii wielu różnych zaburzeń skórnych [10].

Ze względu na fakt, że naskórek posiada wysoką aktywność metaboliczną, wydziela z warstw głębszych na powierzchnię: cytokiny, białka, enzymy i antyoksydanty, co może być wykorzystane do diagnozowania i monitorowania stanu skóry. Od niedawna stosuje się nieinwazyjną metodę oceny na podstawie składu bufora opłukującego naskórek [11] (Rys. 1).

Wysoco prawdopodobnym jest, że zbyt niski poziom kolagenu może prowadzić do zwiększonego narażenia fibroblastów na działanie RFT oraz zaburzenia równowagi pomiędzy składnikami układu antyoksydacyjnego skóry. Aplikacja tropokolagenu drogą transdermalną może poprawić właściwości antyoksydacyjne skóry.

CEL PRACY

Celem pracy było oznaczenie całkowitego stanu antyoksydacyjnego oraz zdolności zmiatania rodnika DPPH na powierzchni skóry i porównanie wyników w grupie stosującej regularnie przez dwa tygodnie preparat nanotropokolagenu w odniesieniu do grupy nie stosującej preparatów kolagenowych.

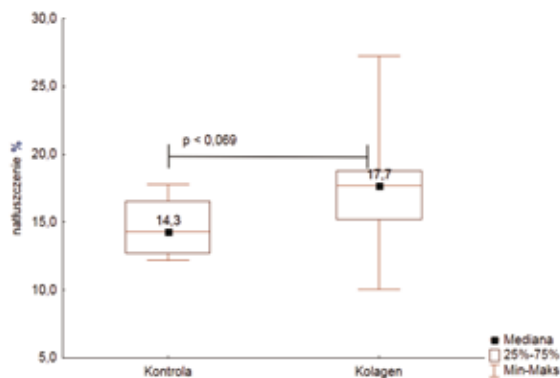
MATERIAŁ BADAWCZY I METODA

W badaniu wzięło udział 26 studentek kosmetologii Małopolskiej Wyższej Szkoły im. J. Dietla w Krakowie, w wieku od 19–30 lat ($24 \pm 0,7$; średnia \pm SD), u których stwierdzono cerę wrażliwą. Grupę badaną stanowiło 17 studentek, które zostały zobowiązane do systematycznego stosowania preparatu z nanotropokolagenem na wskazany obszar skóry. Grupa kontrolna składała się z 9 studentek, które nie stosowały żadnego preparatu kolagenowego.

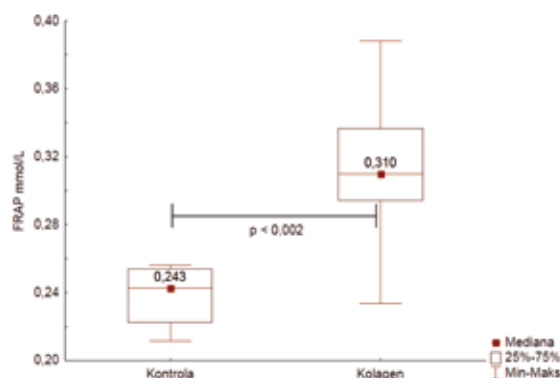
Przebadano wpływ nanotropokolagenu w preparacie Collagen Active wprowadzonym do obrotu w 2013 roku przez firmę Collagen Active Science (nr. rejestracji RK/372591/2013).

W badaniu wykorzystano metodę opracowaną przez M. Portugal-Cohen [11] w celu oznaczania cytokin obecnych

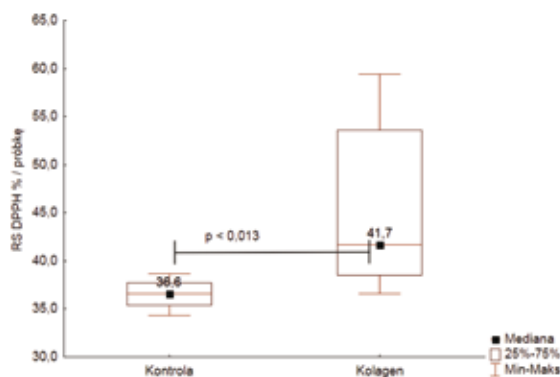
na powierzchni skóry. Jako komorę wykorzystano polipropylenowe naczynie wagowe o średnicy 4 cm. Komorę przymocowano do powierzchni skóry po wewnętrznej stronie kostki lub nadgarstka za pomocą Parafilmu (Rys.1). Przez otwór do komory wprowadzono 2 ml bufora wypłukującego: fosforanowego (PBS) o pH 7.2 i zamknięto otwór Parafilmem na



Rys. 2. Stopień natłuszczenia skóry w grupie kontrolnej i grupie stosującej regularnie kolagen



Rys. 3. Porównanie całkowitego stanu antyoksydacyjnego wyrażonego jako zdolność redukcji jonów żelaza III do jonów żelaza II (FRAP) w grupie kontrolnej i stosującej regularnie kolagen



Rys. 4. Porównanie zdolności zmiatania rodnika DPPH przez naskórek w grupie kontrolnej i grupie stosującej regularnie kolagen

czas ekstrakcji. Bufor zebrano z komory po 30 minutach i oznaczono w nim całkowitą zdolność antyoksydacyjną oraz zdolność zmiatania rodnika DPPH.

Całkowitą zdolność antyoksydacyjną oznaczono spektrofotometrycznie na podstawie zdolności do redukcji jonów żelaza III do jonów żelaza II FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) według metody I. Benzie [8].

Zdolność zmiatania rodników na powierzchni skóry zmierzono na podstawie zdolności zmiatania syntetycznego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl) metodą opracowaną przez Janaszewską i in. [12, 13].

Stopień natłuszczenia skóry oznaczono za pomocą powszechnie stosowanego analizatora skóry.

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu STATISTIKA PL. Do oceny różnic pomiędzy grupami zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya.

WYNIKI

Wyniki przedstawiono na wykresach (Rys. 2-4), na których oznaczono wartości median (punkty), 25-75 kwartyli (pudełko) oraz wartości minimalne i maksymalne (wąsy) oraz w tabeli 1.

Porównując stopień natłuszczenia skóry w grupie badanej i kontrolnej, nie zanotowano istotnej statystycznie różnicy (Rys. 2). W grupie stosujących kolagen w dwóch przypadkach stopień natłuszczenia był wyższy od wartości maksymalnych grupy kontrolnej i wynosił 27%. Osoby te wykazywały najniższe wartości FRAP (0,200 mMol/L; 0,237 mMol/L i 0,260 mMol/L) i najmniejszą zdolność zmiatania rodnika DPPH (około 40%).

Niższe właściwości antyoksydacyjne w przypadkach wyższego stężenia lipidów na powierzchni cery potwierdzają korelację pomiędzy wysokim poziomem triglicerydów i wolnych kwasów tłuszczowych obserwowanych w atopowym zapaleniu skóry [9] a działaniem prooksydacyjnym.

Całkowity stan antyoksydacyjny jest wypadkową miarą działania antyoksydantów niskocząsteczkowych rozpuszczalnych w wodzie (kwas moczowy, kwas hialuronowy, kwas askorbowy, melanina). Stwierdzono, że osoby stosujące nanotropokolagen wykazywały istotnie statystycznie wyższe wartości FRAP w porównaniu do grupy kontrolnej (Rys. 3). Wyniki te sugerują właściwości antyoksydacyjne kolagenu.

W badaniach przeprowadzonych na szczurach, którym podawano doustnie hydrolizaty kolagenu uzyskane ze skóry ryb morskich (*Iososia*), stwierdzono zahamowanie fragmentacji i utraty kolagenu w starzejącej się skórze [14]. Działanie ochronne, antyoksydacyjne kolagenów ryb morskich związane jest ze zdolnością do pochłaniania promieniowania UVB [15] lub rodników hydroksylowych [6]. Powierzchnia skóry kobiet stosujących kolagen charakteryzowała się istotnie statystycznie wyższą zdolnością zmiatania syntetycznego rodnika DPPH.

PODSUMOWANIE

Na obronę antyoksydacyjną na powierzchni skóry składają się głównie antyoksydanty nieenzymatyczne, niskocząsteczkowe, które są w stanie przeniknąć z melanocytów, fibroblastów i komórek Langerhansa w skórze właściwej na powierzchnię naskórka. W skórze stwierdzono również aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy unieczynniających anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. Pod wpływem środowiska (głównie promieniowania UVA), w wyniku starzenia skóry lub przewlekłych stanów zapalnych naturalna powierzchniowa obrona antyoksydacyjna ulega zniszczeniu. Na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatkiego zwiększa się stopień peroksydacji lipidów, w efekcie zniszczeniu ulegają błony komórkowe i warstwa lipidowa naskórka.

W pracy po raz pierwszy oceniono nieinwazyjną metodą stan obrony antyoksydacyjnej na powierzchni skóry i oceniono wpływ kolagenu stosowanego na skórę wrażliwą. W przedstawionej pracy do oceny całkowitej zdolności antyoksydacyjnej i zdolności do zmiatania rodnika syntetycznego na powierzchni skóry wykorzystano nowatorską metodę ekstrakcji M. Portugal-Cohen.

Stwierdzono, że aplikacja kolagenu na powierzchnię skóry przywraca równowagę antyoksydacyjną: zwiększa

całkowity stan antyoksydacyjny mierzony jako FRAP, zwiększa zdolność zmiatania rodników wyrażoną zdolnością zmiatania syntetycznego rodnika DPPH. Ponadto stosowanie kolagenu na powierzchnię przywraca prawidłowy poziom lipidów. Na podstawie wymienionych efektów można wnioskować, że preparaty zawierające nanotropokolagen posiadają działanie ochronne, antyoksydacyjne i odmładzające. **ZE**

LITERATURA

1. J. Kruk: *Oxidative stress and skin diseases: Possible role of physical activity*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(2), 2014, 561-568.
2. K. Nakai, K. Yoneda, et al.: *Oxidative stress in allergic and irritant dermatitis: From basic research to clinical management*, Recent Patents on Inflammation and Allergy Drug Discovery, 6(3), 2012, 202-209.
3. R. Kohen: *Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation*, Biomed & Pharmacother, 53, 1999, 181-192.
4. M. Zabel: *Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii*, Wydawnictwo Urban & Partner, Wrocław 2009.
5. J. Chung, H. R. Seo, Jy Fau-choi, et al., *Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo*, J Invest Dermatol., 2001, 117(5), 1218-1224.
6. S. Arisawa, T. Arisawa, M. Ohashi, Y. Nitta, T. Ikeya, J. Asai: *Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro*, Clin Exp Pharmacol Physiol., 23(3), 1996, 222-228.
7. J. Tiedtke, O. Marks: *Stimulation of Collagen Production in Human Fibroblasts*, Cosmetic Science Technology, 2007.
8. I.F. Benzie, J.J. Strain: *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power”: the FRAP assay*, Anal Biochem., 239(1), 1996, 70-76.
9. C. De Luca, G. Valacchi: *Surface lipids as multifunctional mediators of skin responses to environmental stimuli*, Mediators of Inflammation, 2010.
10. M. Portugal, V. Barak, I. Ginsburg, R. Kohen: *Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations*, Biomed. Pharmacother, 61, 2007, 412-422.
11. M. Portugal-Cohen, R. Kohen: *Non-invasive evaluation of skin cytokines secretion: An innovative complementary method for monitoring skin disorders*, Methods 61, 2013, 63-68.
12. A. Janaszewska, G. Bartosz: *Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma*, Scand J Clin Lab Invest, 62, 2002, 231-236.
13. Om P. Sharma, K. Tej Bhat: *DPPH antioxidant assay revisited*, Food Chemistry 113, 2009, 1202-1205.
14. J.P. Liang, Z. Zhang, N. Wang, J. Wang, Y. Li: *The protective effects of long-term oral administration of marine collagen hydrolysate from chum salmon on collagen matrix homeostasis in the chronological aged skin of Sprague-Dawley male rats*, J Food Sci., 75(8), 2010, 230-238.
15. Y. Zhuang, H. Hou, X. Zhao, Z. Zhang, B. Li: *Effects of Collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (Rhopilema esculentum) on mice skin photoaging induced by UV irradiation*, JFood Sci, 74, 2009, 183.



Spróbuj nowego Versum

Zaskoczy Cię...

dowiedz się więcej na www.versum.com



BAJECZNE KOLORY W TWOIM SALONIE

Nasza firma oferuje szeroką gamę produktów jednorazowych dla fryzjerstwa oraz kosmetyki w szerokiej gamie kolorystycznej.



Ręczniki papierowe
800 listków



Ręczniki włókninowe
50 sztuk, różne kolory



Prześcieradła kosmetyczne
jednorazowe



tel 668 693 237 www.fryzjerstwokosmetyka.eu

PPH Porzelać Polska ul. Folużowa 69, 65-786 Zielona Góra