

rFGF1 W PIELEGNACJI PRZECIWSTRARZENIOWEJ

rFGF1 in anti-aging skin care

Justyna **Szpanka**
Renata **Dębowska**
Katarzyna **Rogiewicz**
Irena **Eris**

Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris

Streszczenie

Na zmiany zachodzące w skórze składają się dwa główne procesy: starzenie wewnętrzne i zewnętrzne. Zmarszczki są najbardziej widocznym objawem starzenia się skóry twarzy, a kluczową rolę w procesie ich powstawania pełnią fibroblasty odpowiedzialne za produkcję podstawowych substancji strukturalnych skóry.

FGF1 jest najlepiej scharakteryzowanym przedstawicielem rodziny FGF. Ze względu na swoją mitogenną funkcję stał się substancją aktywną o potencjalnym szerokim zastosowaniu w kosmetologii.

Zbadano wpływ rekombinowanego FGF1 (rFGF1) na proliferację fibroblastów. Wykazano silną stymulację proliferacji komórek zależną od wieku dawcy. Ponadto zbadano możliwość przejścia przez warstwę rogową czystego rFGF1 oraz rFGF1 w dwóch różnych systemach nośnikowych (liposomy i sfery lipidowe). Wykazano, że testowana substancja w czystej postaci nie przenika przez warstwę rogową do żywych warstw naskórka, jednakże zamknięta w sferach lipidowych przenika przez *stratum corneum*.

Badania z udziałem ochotników (grupa wiekowa 50+) wykazały, iż stosowanie produktów kosmetycznych zawierających rFGF1 spowodowało spłycenie zmarszczek okolicy czoła i bruzdy nosowo-wargowej.

Zarówno testy w warunkach *in vitro*, jak i *ex vivo* oraz *in vivo* wykazały, że rFGF1 może być substancją o szerokim spektrum działania do zastosowań w kosmetologii.

STARZENIE SIĘ SKÓRY

Starzenie się jest procesem naturalnym, rozpoczynającym się około 25-30. roku życia i dotyczy w różnym stopniu wszystkich organów naszego ciała. Jest to zespół zmian postępujących w czasie, które polegają na zmniejszeniu biologicznej aktywności komórek, spowolnieniu procesów regeneracyjnych, obniżeniu odporności i odpowiedzi na stres oraz obniżeniu właściwości adaptacyjnych organizmu. Zmiany zachodzące w skórze są wypadkową dwóch głównych procesów. Jednym z nich jest starzenie wewnętrzne, czyli proces związany z mechanizmami wrodzonymi, a drugim – starzenie zewnętrzne, czyli proces uwarunkowany wpływem środowiska zewnętrznego. Skóra najbardziej ze wszystkich tkanek jest narażona na destrukcyjne działanie czynników zewnętrznych, dlatego ulega starzeniu szybciej niż inne narządy naszego ciała, a efekt tego procesu

jest bardziej widoczny. Charakterystycznym objawem starzenia się skóry są pojawiające się na twarzy zmarszczki [1].

W zależności od wieku i kondycji skóry zmarszczki mają zróżnicowane natężenie i wygląd. Można wyróżnić 4 typy zmarszczek świadczących o stopniu zaawansowania starzenia się skóry:

- 1° – zmarszczki ekspresyjne. Pojawiają się około 25-30. roku życia jako wynik fizjologicznego starzenia się związanego z mimiką twarzy. Ich pojawienie się jest spowodowane ruchem mięśni w trakcie unoszenia brwi, mrużenia oczu, układania ust w formę uśmiechu. Wpływ na ich powstanie ma również obniżenie poziomu kwasu hialuronowego, przez co naskórek ulega przesuszeniu, staje się cieńszy i traci elastyczność. Powstałe zmarszczki przybierają formę drobnych linii na powierzchni skóry, najczęściej w okolicach oczu i ust, a czasem na czole.

Słowa kluczowe:

FGF1, starzenie, mikrosfery lipidowe

Summary

Endogenous and exogenous aging are two main processes which are responsible for the changes in the skin structure. The most visible and common sign of aging are wrinkles. The key role of their appearance (formation) perform (play) fibroblasts, which produces basic structural skin substances.

FGF1 is the best characterized representative of the FGF family. Due to its mitogenic function becomes active substance of a potential wide range of applications in cosmetology.

The effect of recombinant FGF1 (eFGF1) on fibroblast proliferation has been studied. The study showed strong stimulation of the cells depending on the age of skin cells donors. Moreover, the penetration ability of pure rFGF1 and rFGF1 closed in two types of delivery systems (liposomes and lipid spheres) through the stratum corneum has been examined. It was shown that the tested substance in a pure form didn't penetrate through the stratum corneum into the living epidermis. However, encapsulated in lipid spheres penetrated through stratum corneum.

Studies with volunteers (age group 50+) have shown that the cosmetic products containing rFGF1 reduced depth of forehead and nasal-labial wrinkles. All tests in vitro, ex vivo and in vivo revealed that the rFGF1 might be a substance with a wide spectrum of activity for use in cosmetology.

Key words:

FGF1, aging, lipid micro-sphere

- 2° – zmarszczki elastostyczne. Są wynikiem szkodliwego działania czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie UV czy dym papierosowy. Destrukcyjne działanie słońca prowadzi do uszkodzeń włókien kolagenowych i elastycznych (elastoza posłoneczna). W efekcie w skórze właściwej włókna kolagenu i elastyny są mniej uporządkowane i niewłaściwie połączone. Skóra wyraźnie traci na elastyczności, staje się cieńsza i sucha, a drobne linie – bardziej widoczne. Na skutek zaburzeń w produkcji melaniny zmienia się także kolor skóry.
- 3° – zmarszczki atroficzne. Są wynikiem pojawiających się z wiekiem zmian w fizjologii i funkcjach skóry oraz tzw. atrofi skóry, czyli procesu stopniowego zanikania tkanek. Komórki skóry właściwej są mniej aktywne, następuje wyraźne zmniejszenie produkcji kolagenu i elastyny. W obrębie naskórka dochodzi do spłaszczenia granicy skórno-naskórkowej i osłabienia dostarczenia substancji odżywczych do głębszych warstw skóry, co daje efekt szarej i zmęczonej skóry. Pojawiają się głębsze zmarszczki i fałdy, naskórek staje się cieńszy, warstwa rogowa natomiast grubsza. Skóra jest cienka, wysuszona i szorstka, traci swoją gęstość i zaczyna wiotczeć. Pojawiają się zmiany naczyniowe w postaci przejściowego lub utrwalonego zaczerwienienia skóry.
- 4° –zmarszczki grawitacyjne. Są wynikiem postępujących z upływem czasu zmian w obrębie skóry i działania siły grawitacji.

Dane kontaktowe:

mgr inż. Justyna Szpanka

Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena

Eris Sp. z o.o.

Ul. Armii Krajowej 12

05-500 Piaseczno

+48 717 541 269

justyna.szpanka@eris.pl

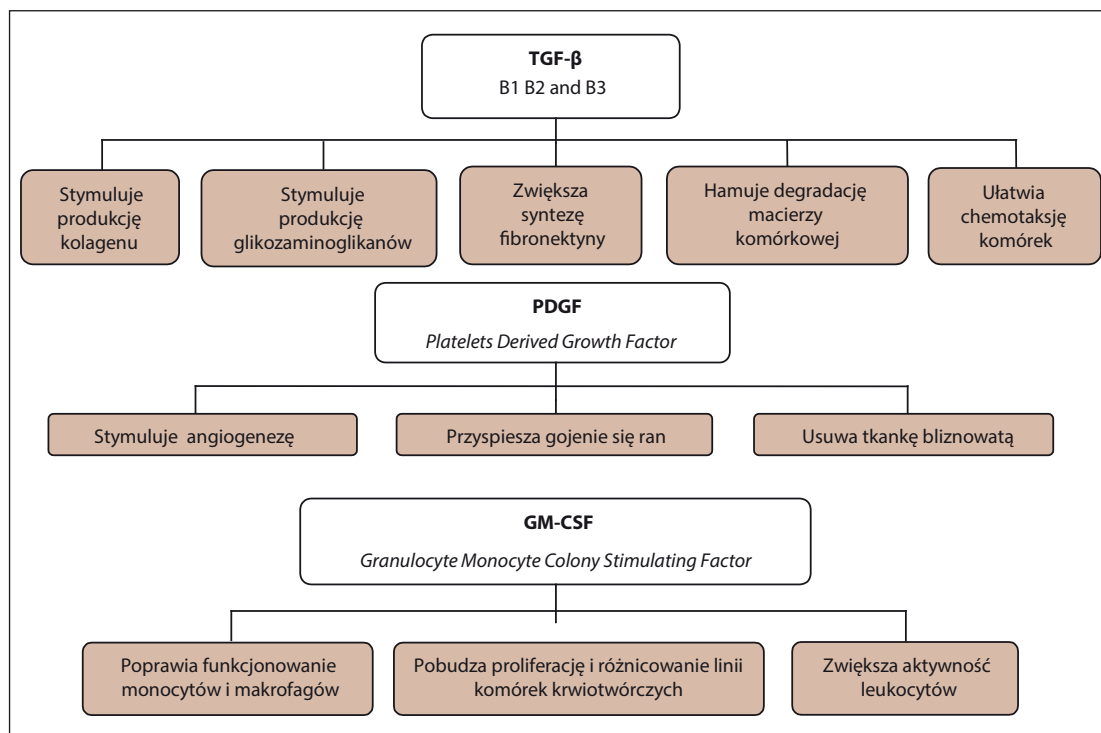
W wyniku spłaszczenia granicy między naskórkiem a skórą właściwą dochodzi do zaburzeń w komunikacji między komórkami, w wyniku czego nie odbierają one sygnałów do naprawy zaistniałych uszkodzeń. Zmarszczki są głębokie i wyraźnie widoczne, skóra mało elastyczna, sucha z bardzo osłabioną pracą gruczołów łojowych. Następuje zmiana owalu twarzy, spowodowana zmniejszoną ilością włókien podtrzymujących owal twarzy oraz siłami grawitacji. Dodatkowym problemem stają się zmiany naczyniowe (teleangiektazje) i trwałe zaburzenia pigmentacji skóry.

Kluczową rolę w procesie starzenia się skóry odgrywają fibroblasty odpowiedzialne za produkcję podstawowych substancji strukturalnych skóry: kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego. To one warunkują odpowiednie fizyczne i mechaniczne właściwości skóry. Utworzone z kolagenu i elastyny włókna budują w skórze swoiste rusztowanie, które sprawia, że jest ona elastyczna, zwarta i odporna na rozciąganie. Z kolei kwas hialuronowy, który pełni funkcję substancji spajającej włókna, dzięki zdolności wiązania dużych ilości wody zapewnia skórze odpowiednie nawilżenie. Z wiekiem aktywność proliferacyjna i metaboliczna fibroblastów ulega zmniejszeniu. Pogarsza się funkcjonalność włókien kolagenowych i elastynowych, a ich struktura ulega modyfikacji i zniszczeniu. To właśnie osłabienie, zniekształcanie i zanikanie z wiekiem elementów podporowych skóry powoduje, że traci ona sprężystość i naturalną gładkość, staje się cieńsza, sucha, z widocznymi zmarszczkami.

HGF A SKÓRA

Fibroblasty produkują duże, agregujące proteoglikany oraz proteoglikany o mniejszej masie cząsteczkowej. Ich podstawową funkcją w skórze jest wiązanie różnych elementów międzykomórkowych, w tym także czynników wzrostu (*human growth factor* – HGF) niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórek, co ma kluczowe znaczenie np. w gojeniu się ran i w angiogenezie [2].

Czynniki wzrostu pełnią wiele funkcji. Są przekąźnikami międzykomórkowymi, biorą udział w podziałach i wzroście komórek, a także w produkcji i dystrybucji kolagenu oraz elastyny. Duża ilość czynników wzrostu jest uniwersalna i stymuluje podziały komórkowe w wielu



Ryc. 1. Funkcje HGF [3].
Fig. 1. HGF functions [3].

typach tkanek, inne natomiast są specyficzne dla określonego rodzaju komórek. HGF są zaangażowane we wzrost i regenerację wielu różnych komórek, takich jak fibroblasty, komórki wątroby, naczyń krwionośnych, tarczycy, jajników i przysadki mózgowej.

W 1986 roku naukowcy Stanley Cohen i Rita Levi-Montalcini otrzymali Nagrodę Nobla za pracę na temat roli *epidermal growth factor* – EGF i *nerve growth factor* – NGF w biologii komórek. Ich badania dały podłoże dla licznych zastosowań HGF zwłaszcza w gojeniu się ran, regeneracji tkanek i poprawy kondycji skóry. Obecnie czynniki wzrostu są także stosowane w pielęgnacji przeciwstarzeniowej w celu poprawy kondycji skóry i spłycania zmarszczek [3] (ryc. 1).

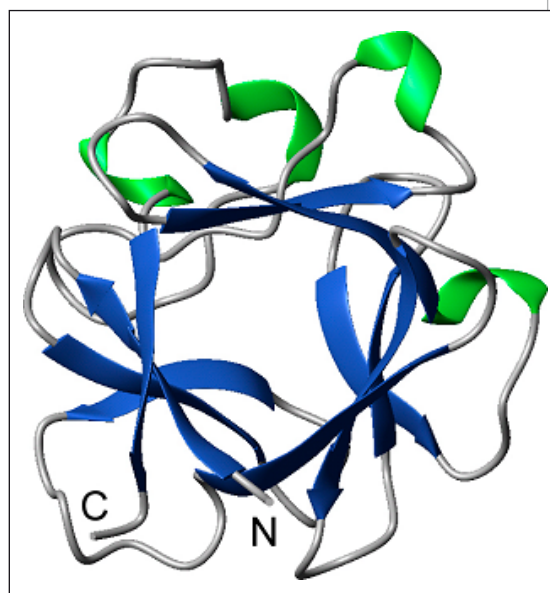
FGF1

Czynnik wzrostu fibroblastów 1 (ang. *fibroblast growth factor 1* – FGF1) jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych przedstawicieli rodziny FGF. Jest to białko globularne składające się z 12 włókien β zaaranżowanych w motyw typu „ β -koniczynki” (ang. *β -trefoil*).

FGF1 wytwarzany jest w wielu typach tkanek, m.in. w komórkach mięśni gładkich i nabłonka, w hepatocytach, keratynocytach, fibroblastach, makrofagach i neuronach. Jest silnym mitogenem, który stymuluje syntezę DNA oraz proliferację różnych typów komórek zarówno

pochodzenia ektodermalnego, jak i mezodermalnego. FGF1 pobudza migrację i chemotaksję komórek *endotelium* (śródbłónka), a także fibroblastów. Z tego względu jest on niezwykle ważnym czynnikiem biorącym udział w procesach naprawczych, gojenia się ran oraz w angiogenezie [4].

Temperatura denaturacji FGF1 wynosi około 40°C. Oznacza to, że w warunkach fizjologicznych znaczny procent cząsteczki białka nie posiada natywnej konformacji. W takim stanie łańcuch polipeptydowy jest dużo bardziej wrażliwy na działanie proteaz. Poprzez podatność FGF1 na denaturację białko to charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania *in vivo*. Stabilność FGF1 wzrasta w obecności heparyny i jej



Ryc. 2. Struktura przestrzenna ludzkiego FGF1 [4].
Fig. 2. The structure of human FGF1.

pochodnych polianionów. Obecność heparyny podnosi temperaturę denaturacji białka o ok. 20°C oraz wydłuża okres jego półtrwania [5, 6].

W celu podwyższenia stabilności konformacyjnej zaprojektowano i otrzymano metodami inżynierii białkowej [w bakteryjnym systemie ekspresyjnym BI21(DE3)pLysS] rekombinowane białko FGF1 Q40P/S47I/H93G. Zmiany w sekwencji zwiększyły stabilność FGF1, a uzyskane białko okazało się w pełni funkcjonalne i charakteryzowało się wyższą aktywnością mitogenną, dłuższym czasem półtrwania, a także znacznie większą odpornością na proteolizę niż jego dziki typ [4-6].

MECHANIZM DZIAŁANIA FGF1

Biologiczna aktywność FGF1 rozpoczyna się w momencie jego kontaktu ze specyficznym receptorem (FGFR1-4) o aktywności kinazy tyrozynowej usytuowanym w błonie plazmatycznej komórek docelowych. Przyłączenie się czynnika wzrostowego do zewnątrzkomórkowej domeny receptora wywołuje jego dimeryzację, zwiększając lokalnie stężenie kinaz tyrozynowych i ułatwiając tym samym fosforylację wewnątrzkomórkowych domen katalitycznych (o aktywności kinazy tyrozynowej) sąsiadujących ze sobą receptorów. Fosforylacja receptora wytwarza miejsca wiązania dla domen SH2

(ang. *Src homology 2*) i PTB (ang. *phosphotyrosine binding*) różnych białek sygnałowych i adaptorowych, umożliwiając im bezpośrednie interakcje. Po aktywacji receptorowej kinazy dochodzi do przyłączenia, a następnie fosforylacji białek adaptorowych, które z kolei uruchamiają kluczowe dla funkcjonowania komórki kaskady przekazywania sygnału: kaskady kinaz aktywowanych przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellularly regulated kinases* – Erk1/2), kaskady kinazy p38, a także kinazy Akt oraz fosfolipazy C γ .

Aktywacja kinaz prowadzi do przemieszczenia sygnału do jądra komórkowego i pobudzenia ekspresji wielu genów, w tym genów kodujących czynniki transkrypcyjne, takich jak: AP-1, c-Myc, STAT. Te z kolei oddziałują na ekspresję innych genów, uruchamiając szereg odpowiedzi komórkowych [5, 6].

ZASTOSOWANIE rFGF1 W PIELĘGNACJI PRZECIWSTRZENIOWEJ

Ze względu na swoją mitogenną funkcję FGF1 stał się potencjalną substancją aktywną o szerokim zastosowaniu w kosmetologii, skierowaną na regenerację skóry. Istnieją doniesienia, że FGF1 jest silnym antyoksydantem, hamuje starzenie się komórek skóry, wzmacnia jej procesy obronne oraz spłyca zmarszczki [4-6]. Przeprowadzono także badania wpływu rekombinowanego FGF1 (rFGF1) na żywotność fibroblastów pobranych od dawców w różnym wieku (20, 34, 40 i 60 lat).

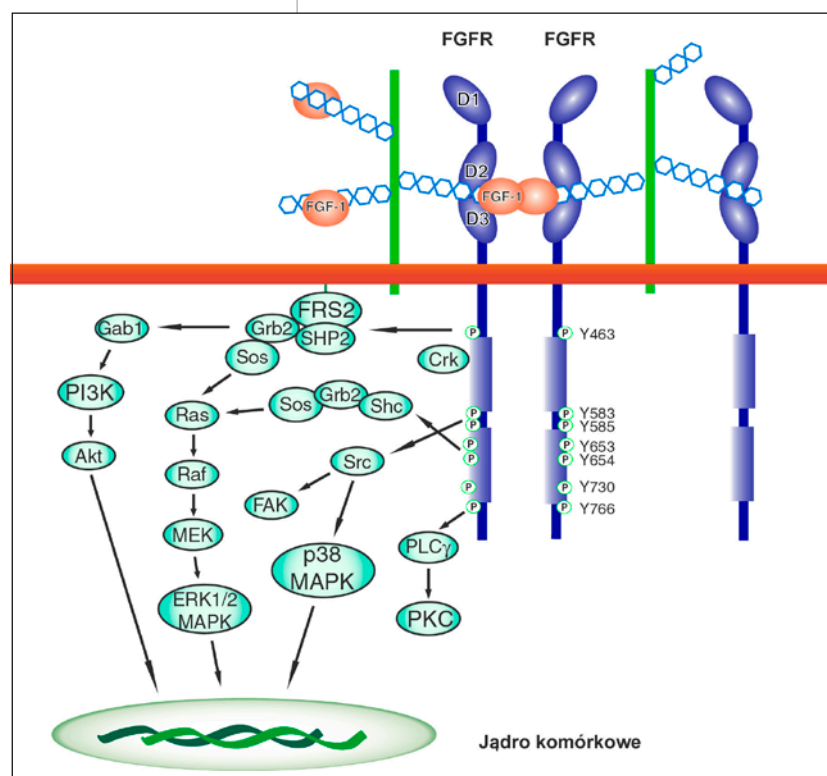
W badaniach wykazano silną stymulację proliferacji fibroblastów zależną od wieku dawcy. Rekombinowany FGF1 najsilniej stymulował proliferację fibroblastów L34 i L40. Otrzymane wyniki wskazują, iż rFGF1 posiada wysoki potencjał do wykorzystania w produktach pielęgnacyjnych o właściwościach regeneracyjnych [7].

PRZENIKANIE rFGF1 PRZEWARSTWĘ ROGOWĄ SKÓRY

Rekombinowany FGF-1 jest białkiem o masie 15,196 kDa. Punkt izoelektryczny (pI) wynosi 8,12. Na powierzchni białka znajduje się „patch” silnie naładowany dodatnio. Przez wzgląd na duże rozmiary białka konieczne było opraco-

Ryc. 3. Główne szlaki przekazywania sygnału w komórce aktywowane przez FGF1. Numeracja tyrozyn receptora ulegających fosforylacji odpowiada numeracji reszt FGFR [wg 4, 5, 6].

Fig. 3. The main signal transduction pathways in the cell activated by FGF1. Numbering the phosphorylated tyrosine of receptor corresponds with the numbers of FGFR rests [from 4, 5, 6].



wanie technologii, która zapewni przejście przez warstwę rogową skóry.

Przenikanie przez skórę obejmuje wędrówkę cząsteczki przez kolejne warstwy skóry – począwszy od warstwy rogowej aż do wnikięcia do ustroju. W przypadku składników kosmetycznych nie jest wskazane, aby przenikały przez wszystkie warstwy skóry. Dotyczy to przede wszystkim małych cząsteczek, które ze względu na właściwości fizykochemiczne mają większą zdolność do penetracji skóry. W przypadku dużych cząsteczek barierę w absorpcji przezskórnej stanowi głównie *stratum corneum*. Przenikanie substancji kosmetycznych można przyspieszyć, usuwając ze skóry film hydrofilowy przy użyciu środka powierzchniowo czynnego lub stosując substancje ułatwiające wnikanie (np. alkohole, glikole rozluźniające komórki warstwy rogowej) [8].

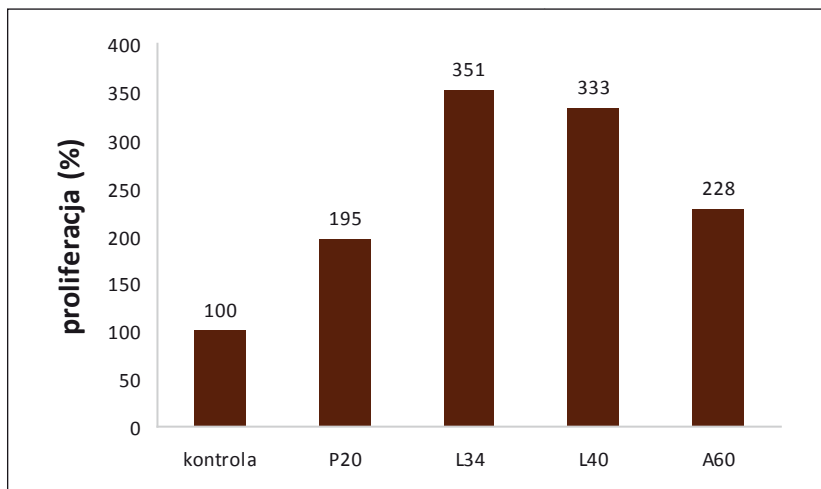
Struktura i właściwości lipofilowe najbardziej zewnętrznej warstwy skóry – martwej warstwy rogowej – powodują, że przenikaniu do żywych warstw skóry i przez skórę ulegają przede wszystkim substancje lipofilowe, niepolarne (niejonowe) i o niskiej masie cząsteczkowej (< 500 Da), choć i tak przenikanie tego typu związków jest często niewystarczające do wywołania pożądanego działania. Istnieje więc konieczność zwiększenia lub nawet umożliwienia przenikania substancji aktywnych do skóry, zarówno w odniesieniu do substancji lipofilowych, jak i hydrofilowych [9].

W kosmetykach nie stosowano dotychczas specjalnych nośników dla aplikowanych białek. Działanie dużych białek (typu kolagen) opiera się na działaniu powierzchniowym ze względu na wielkość, kształt i charakter chemiczny związku.

Z tego też względu przeprowadzono badania określające zdolność rFGF1 do przejścia przez *stratum corneum*. Zbadano głębokość przenikania czystej substancji oraz substancji zamkniętej w liposomy i mikrosfery lipidowe.

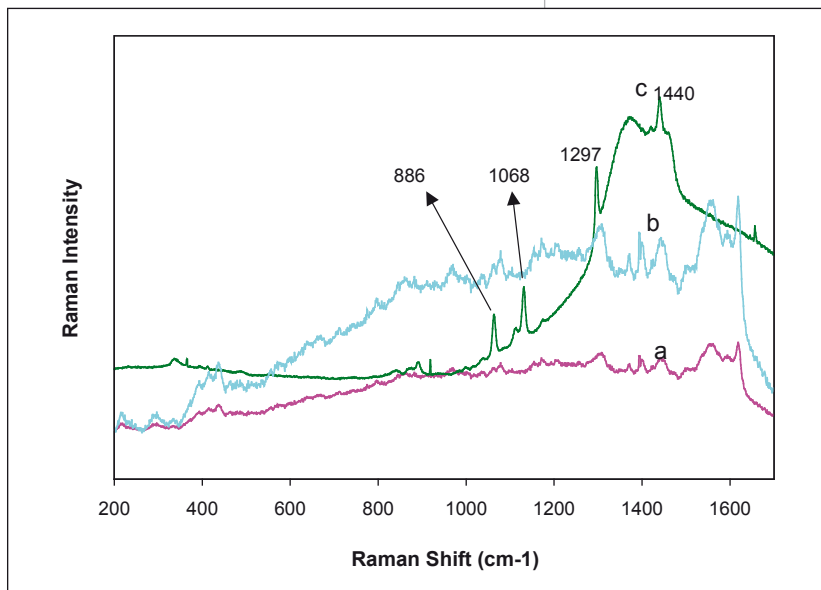
Nano- i mikrosfery lipidowe znajdują coraz większe zastosowanie w kosmologii. Biorąc pod uwagę skład i budowę skóry, preparaty oparte na lipidach wydają się najwłaściwsze dla miejscowego podania substancji aktywnych, ponieważ ze względu na zawartość fizjologicznych i biodegradowalnych lipidów wykazują powinowactwo do warstwy rogowej skóry i stosowane zewnętrznie nie naruszają jej funkcji [10].

Do oceny głębokości przenikania rFGF1 wykorzystano Spektroskop Ramana Renishaw InVia Raman System wyposażony w laser diodo-



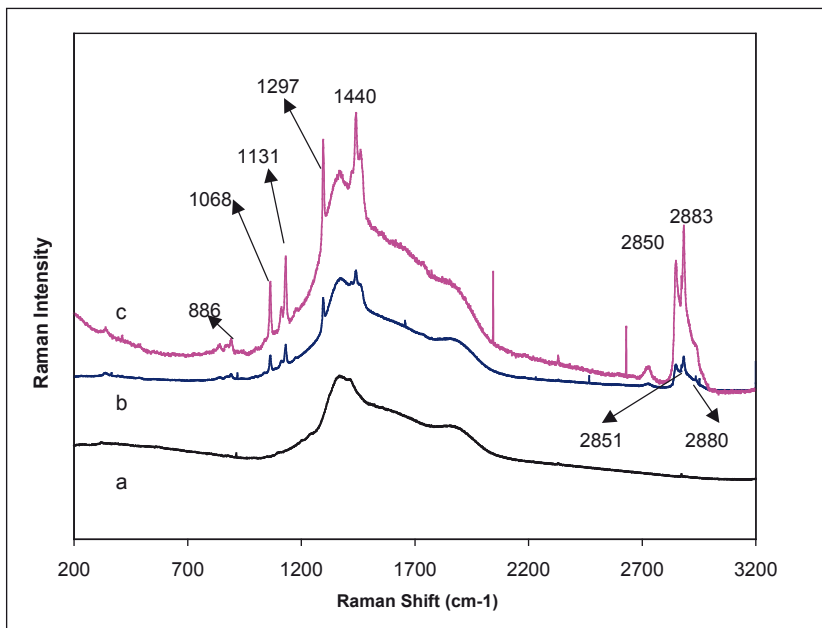
Wykres 1. Żywotność fibroblastów (test MTT) od dawców w wieku 20 (P20), 34 (L34), 40 (L40) i 60 (A60) lat, hodowanych przez 7 dni w pożywce MEM zawierającej 10% FCS, 10 mM buforu HEPES, 2 mM L-glutaminy i antybiotyków (100 U/ml penicyliny i 0,25 µg/ml streptomycyny) i rekombinowany FGF1 (10 ng/ml), w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

Graph 1. Viability of fibroblasts (MTT assay) from donors at 20 (P20), 34 (L34), 40 (L40) and 60 (A60) years old, growing in MEM medium with 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin, 0,25 µg/ml streptomycin sulphate) in the presence of recombinant FGF1 (10ng/ml) at 37°C in 5% CO₂.



Wykres 2. Przenikanie rFGF1 zamkniętego w liposomy: krzywa a – widmo samego liposomu, krzywa b – widmo rFGF1 (0,8 µg/ml) zamkniętego w liposomy w próbce skóry, krzywa c – widmo rFGF1 (100 µg/ml) [12].

Graph 2. The penetration ability of rFGF1 encapsulated in liposome: curve a – the spectra of liposome, curve b – the spectra of rFGF1 (0,8 µg/ml) encapsulated in liposome in a sample of the skin, curve c – the spectra of rFGF1 (100 µg/ml).



Wykres 3. Przenikanie rFGF1 zamkniętego w sfery lipidowe: krzywa a – widmo samej sfery, krzywa b – widmo sfery z rFGF1 (0,8 µg/ml) w próbce skóry, krzywa c – widmo rFGF1 (100 µg/ml) [12].

Graph 3. The penetration ability of rFGF1 encapsulated in lipid spheres: curve a – the spectra of lipid spheres, curve b – the spectra of rFGF1 (0,8 µg/ml) encapsulated in lipid spheres in a sample of the skin, curve c – the spectra of rFGF1 (100 µg/ml).

wy o mocy 300 mW emitujący wiązkę światła o długości fali 785 nm.

Spektroskopia ramanowska jest nieinwazyjną techniką badawczą umożliwiającą wykonywanie pomiarów w warunkach otoczenia w czasie rzeczywistym. Dotychczas znalazła zastosowanie np. w analizie składu kamieni nerkowych i dozowania leków (biodystrybucja), diagnostyce chorób skóry, badaniu uszkodzeń DNA oraz penetracji składników aktywnych w głąb skóry. Ponadto umożliwia badanie zawartości wody, mocznika, lipidów, karotenoidów oraz NMF w skórze [11].

Badanie przenikalności rFGF1 przeprowadzono w warunkach *ex vivo* na wycinkach skóry. Wyznaczono widmo Ramana tzw. *fingerprint* dla czystego rFGF1, pustych liposomów i sfer lipidowych. Określono głębokość przenikania rozpuszczonego w soli fizjologicznej rFGF1 oraz rFGF1 zamkniętego w liposomy i mikrosfery lipidowe. „Fingerprint” jest rodzajem

wzorcowego widma substancji umożliwiającego wykrycie obecności związku w widmie wygenerowanym podczas mapowania próbki skóry, na którą została ona naniesiona. Wykazano, że zarówno sama cząsteczka rFGF1, jak i zamknięta w liposomy (wykres 3) nie przenika przez warstwę rogową – brak charakterystycznych dla składnika pasm o częstościach 1063, 1131, 1291, 1440, 2850 i 2883 cm⁻¹ (profil głębokościowy 15-25 µm). Natomiast rFGF1 zamknięty w mikrosfery lipidowe przenika przez warstwę rogową, o czym świadczy obecność w widmie pasm charakterystycznych dla badanego składnika (przy częstościach: 1063, 1131, 1291, 1440, 2850 i 2883 cm⁻¹) (wykres 4) [12].

Wodna kompozycja mikrosfer lipidowych zawierająca rekombinowany czynnik wzrostu fibroblastów (rFGF1) została zgłoszona do opatentowania w UP RP [13].

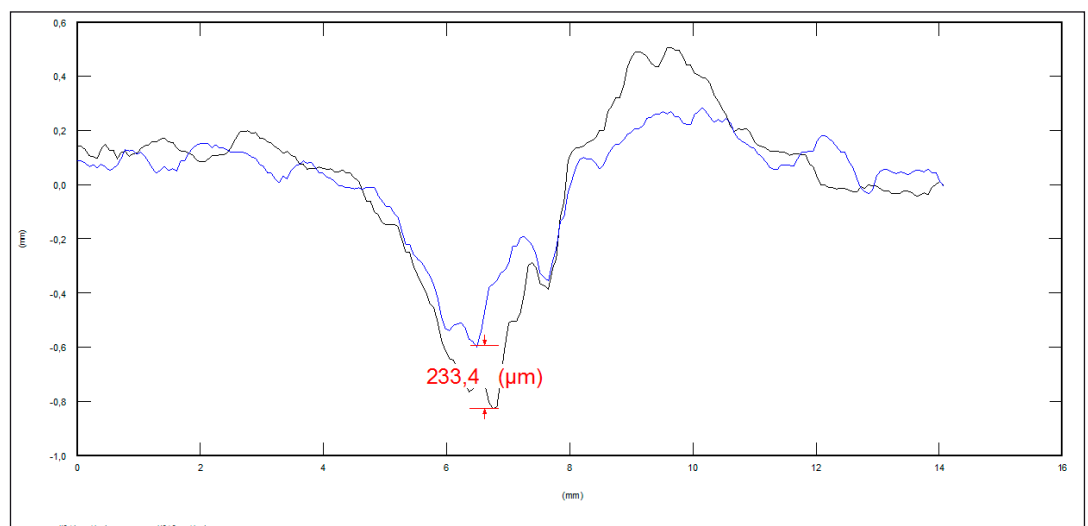
Właściwością cząstek lipidowych (mikrosfer lipidowych) szczególnie ważną z punktu widzenia kosmologii jest tworzenie nieciągłej warstwy okluzyjnej na powierzchni skóry. Im mniejsza jest wielkość cząstek, tym silniejsza jest ich adhezja do skóry, a tym samym skuteczniejsza okluzja. Pozwala to zmniejszyć przestępczą utratę wody, przez co zwiększa się nawilżenie i elastyczność skóry. Okluzja zwiększa także penetrację substancji aktywnych w skórę. Udowodniono to chociażby dla koenzymu Q10 aplikowanego w postaci zawiesiny lipidowych nano-cząstek [14].

rFGF1 w sferach lipidowych przenika przez warstwę rogową prawdopodobnie na zasadzie:

- utworzenia przez sfery lipidowe specyficznej dla danej substancji aktywnej warstwy okluzyjnej silnie zwiększającej jej przenikanie do skóry;
- oddziaływania elektrostatycznego między cząsteczkami białka a mikrosferami

Wykres 4. Redukcja głębokości bruzdy nosowo-wargowej (o 233,4 µm) u probantki WS po 4 tygodniach stosowania kremu na dzień (czarna linia – przed, niebieska linia – po 4 tyg. stosowania).

Graph 4. The reduction of the depth of nose-labial wrinkles (decrease in the depth by 233 µm) after 4 weeks of day cream use (black curve – before, blue curve – after the 4 weeks of use).



lipidowymi, gdzie mikrosfery lipidowe służą jako mający powinowactwo do lipidów warstwa rogową nośnik substancji aktywnej kosmetycznej.

rFGF1 W PRODUKTACH DO PIELĘGNACJI SKÓRY

Rekombinowany FGF1 silnie pobudzał proliferację fibroblastów, co sugeruje duży potencjał na wykorzystanie tego białka w produktach do pielęgnacji przeciwstarzeniowej. Jednakże przejście tego białka przez warstwę rogową wymagało zamknięcia go w odpowiednim systemie nośnikowym – mikrosferach lipidowych. Dopiero zastosowanie takiej formy składnika w produkcie kosmetycznym mogło zapewnić pożądane działanie.

W celu sprawdzenia efektów działania produktów przeciwmarszczkowych zawierających rFGF1 przeprowadzono badania *in vivo* z udziałem 21 ochotników powyżej 50. roku życia. Produkty – krem na dzień i na noc przeznaczone były do codziennej pielęgnacji skóry twarzy przez okres 4 tygodni.

U ochotników wykonano aparaturową analizę głębokości i objętości zmarszczek przed rozpoczęciem testu oraz po 4 tygodniach stosowania badanych kremów. Pomiary wykonano w okolicy czoła (zmarszczka międzybrowowa) oraz w okolicy bruzdy nosowo-wargowej. Analiza obrazowa zmarszczek została wykonana przy użyciu Primos (GFMesstechnik GmbH).

Po 4 tygodniach badania zaobserwowano redukcję zarówno głębokości, jak i objętości zmarszczek. Zmarszczki na czole uległy spłyceniu u 71% badanych o średnio 69,56 μm , a ich objętość zmniejszyła się o średnio 1,6 mm^3 . Głębokość bruzd nosowo-wargowych uległa zmniejszeniu u 67% badanych o średnio 136,49 μm , a ich objętość o średnio 3,35 mm^3 . Wersje placebo produktów są w trakcie badań.

PODSUMOWANIE

Testy w warunkach *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo* wykazały, że rFGF1 może być substancją o szerokim spektrum działania do zastosowań w kosmetyce.

Piśmiennictwo

1. Zegarska B., Woźniak M.: Przyczyny wewnątrzpochodnego starzenia się skóry. *Gerontologia Polska* 2006, 14 (4), 153-159.
2. Noszczyk M.: Kosmetologia Pielęgnacyjna i Lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.
3. Hilling C.: Human Growth Factors as Natural Healers: Current Literature and Application. *Cosmetics and Toiletries magazine* 2010, 125 (5), 73-78.
4. Zakrzewska M., Krowarsch D., Wiedlocha A., Otlewski J.: Design of fully active FGF-1 variants with increased stability. *Protein Eng Des Sel* 2004, 17(8), 603-11.
5. Zakrzewska M., Krowarsch D., Wiedlocha A., Olsnes S., Otlewski J.: Highly Stable Mutants of Human Fibroblast Growth Factor-1 Exhibit Enhanced Biological Activity. *J Mol Biol* 2005, 352, 860-875. Epub 2005 Aug 25.
6. Zakrzewska M., Wiedlocha A., Szlachcic A., Krowarsch D., Otlewski J., Olsnes S.: Increased protein stability of FGF1 can compensate for its reduced affinity for heparin. *J Biol Chem* 2009 Sep 11, 284(37), 25388-403.
7. Szpanka J., Dębowska R., Pasikowska M., Zakrzewska M., Otlewski J., Eris I.: Biological study of genetically modified Growth Factor and its potential use in skin care products, poster 21st EADV Congress – 27-30.09.2012, Praga, Czechy.
8. Placek W.: Kosmetologia i farmakologia skóry. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wyd. I, Warszawa 2007.
9. Cal K.: Across skin barrier: Known methods, new performances. [W:] Caldwell G.W., ur-Rahman A., Yan Z., Choudhary M.I.: *Frontiers in Drug Design and Discovery*, Vol. 4. Bentham Science Publishers 2009, 162-188.
10. Souto E.B., Muller R.H.: Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). *Int J Cosmet Sci* 2008, 30(3), 157-165.
11. Caspers P.J., Lucassen G.W., Puppels G.J.: Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. *Biophys J* 2003, 85(1), 572-580.
12. Szpanka J., Dębowska D., Tyszczyk B., Kamińska A., Eris I.: Applicability of Raman Spectroscopy for the assessment of the ability of cosmetics ingredients to penetrate through the stratum corneum, poster, 42nd Annual ESDR Meeting – 19-22.09.2012, Wenecja, Włochy.
13. Zgłoszenie patentowe nr P. 400804 z dnia 18.09.2012 r.
14. Muller R.H., Petersen R.D. i wsp.: Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, 59(6), 522-530.