

# Proti-vrásková terapie : významná, nová zjištění v neinvazivní kosmetické léčbě kožních vrásek Beta-glukanem

Ravi Pillai<sup>1</sup>, Mark Redmond<sup>2</sup>, Joachim Röding<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Symrise Inc., 10 Gordon Drive, Totowa, New Jersey, USA

<sup>2</sup> Ceapro Inc. 1008 RTF University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

<sup>3</sup> Symrise GmbH & Co KG., Bleichenbrücke 10, 20354 Hamburg, Germany

Corresponding author – email: ravi.pillai@symrise.com

---

## Obsah

Ovesný beta-glukan je ve vodě rozpustný lineární polymer glukózy obsahující 1,4 (70%) a 1,3 (30%) vazby s průměrnou molekulární hmotností  $1 \times 10^6$  Da. Vědecké studie označují beta-glukan jako film tvořící zvlhčující látku, modifikátor biologických reakcí a látku podporující hojení ran. Naším úkolem bylo studovat pronikání ovesného (1,4; 1,3) beta-glukanu modelem lidské kůže a zhodnotit klinicky jeho účinnost při redukci jemných linek a vrásek na kůži.

Studie pronikání provedená na lidské kůži odebrané z oblasti břicha použila aplikaci 0,5%-ního roztoku beta-glukanu v dávce 5 mg na  $\text{cm}^2$ . Výsledky ukázaly, že beta-glukan, i přes svou velkou molekulární hmotnost, hluboce pronikl kůží do vrstev epidermis a dermis.

Klinická studie, které se zúčastnilo 27 subjektů byla prováděna za účelem vyhodnocení účinků beta-glukanu na jemné linky a vrásky na obličejí. Po 8 týdenní léčbě ukázala analýza digitálních obrázků silikónových replik významné snížení hloubky a výšky vrásek i celkové hrubosti kůže.

Tato práce je první *ex vivo* a *in vivo* demonstrací fyziologických efektů beta-glukanu v jeho pronikání a reorganizaci lidské tkáně. Studie podporuje používání ovesného beta-glukanu v péči a udržování zdravé pokožky a v kosmetické léčbě projevů stárnutí.

---

## ÚVOD

Oves má dlouhou historii bezpečného používání za účelem rychlé, dočasné úlevy od pocitů svědění, zčervenání a bolestí spojených s mnoha příčinami podráždění pokožky, jako reakce na styk s některými druhy rostlin (škumpa jedovatá apod.), kousnutí hmyzem a alergie [1]. V kosmetických aplikacích beta-glukanu popisují jeho uživatelé různé přínosy včetně vynikajících, trvalých zvlhčujících účinků spolu se zlepšením, jemnějším vzhledem pokožky. Nedávno byly rovněž uplatněny nové produkty z beta-glukanu určené k hojení ran, jako popákenin, odřenin či ran po ošetření laserem [2,3]. Bylo prokázáno, že lokální podávání

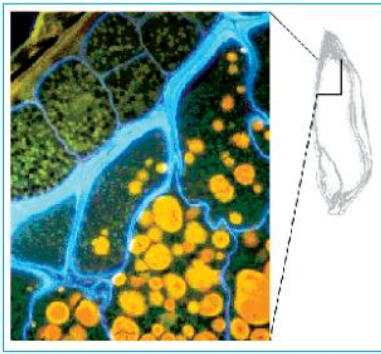
glukanu podporuje hojení ran zvýšeným pronikáním makrofágů do prostředí rány, stimulováním granulace tkáně, ukládání kolagenu a re-epitalizace, spolu se zvýšením tažné síly hojené rány.

Laboratorní experimenty používající beta-glukan z obilnin (1,4 ; 1,3 lineární glukózový polymer) a z hub ( 1,3 ; 1,6 rozvětvený glukózový polymer) naznačily, že všechny beta-glukany jsou modifikátory biologických reakcí, s tím, že ovesný beta-glukan vytváří největší indukční aktivitu cytokinu v makrofázích [6.7].

Mechanismus, kterým glukan nebo glukanem indukovaný imunomodulátor zvyšuje hojení rány zůstává těžko pochopitelným. My víme, že receptory beta-glukanu existují na makrofázích a

fibroblastech savců [4.8]; spekuluje se, že glukan působí na hojení rány tak, že dochází k uvolnění makrofágů růstovými faktory rány spolu s další přímou i nepřímou modulací aktivity fibroblastů, včetně biosyntézy kolagenu.

V případě ran, poskytuje narušení dermální bariéry otevřený a přímý přístup makrofágů a fibroblastů lokálně aplikovanému beta-glukanu. K zodpovězení tudíž zůstává otázka, zda-li lze dosáhnout buněčného efektu také skrz normální, neporušenou kůži a zda-li struktura stárnoucí pokožky může být pozitivně ovlivněna kosmetickou aplikací beta-glukanu.



**Obr. 1** Fluoreskující zbarvené částičky ovesného zrna. Beta glukán přítomný v buněčných stěnách ovesa svítí jasně modrou barvou poté co byl obarven Calcofluorem White

## EXPERIMENT

### Ovesný (1,4; 1.3) beta-glukan

Beta-glukan je rozpustná vláknina, která se nachází v buněčných stěnách ovesného zrna (**obr.1**). Strukturálně je ovesný beta-glukan lineární polymer glukózy obsahující 1,4 (70%) a 1,3 (30%) glykosidické vazby (**obr. 2**).

Beta-glukan použitý v těchto studiích byl extrahován z ovesa a byl dodán jako čirý, viskózní 1% roztok (Symrise Inc., New Jersey). Stručně, extrakční metoda sestává z vodné, mírně alkalické (pH 9,2) extrakce beta-glukanu z ovesných otrub, poté je odstraněna bílkovina a následuje mikrofiltrace přes filtrační systém o velikosti 0,1 mikronu. Výsledný roztok byl dvakrát vysrážen ethanolem a resuspendován na konečnou koncentraci 1%. Ultrafiltrací roztoku beta-glukanu vznikl čirý roztok s nízkým základem (<40 jednotek NT). Molekulární hmotnost beta-glukanu se pohybovala mezi  $0,5 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^6$  Da, měřeno Woodovou metodou [9].

### Studie pronikání kůží

V první studii jsme zkoumali dermální penetraci (1,4;1,3) beta-glukanu do částí chirurgicky odstraněné lidské kůže z břišní oblasti. Toto pronikání bylo vizualizováno pomocí Calcofluoru White, speciálního fluoreskujícího barviva. Použití Calcofluoru White

také umožnilo částečné kvantitativní měření pronikání beta-glukanu fluorescenčním densitometrem [10,11]. Části břišní tkáně byly odstraněny chirurgicky bez podkožního tuku. Kůže byla nařezána na plátky, vhodné k penetraci. Části kůže byly nejdříve hluboce zmrazeny tekutým vodíkem a sterilizovány gamma-zářením, které zlikvidovalo všechny kvasinky a plísňe, jež by mohly ovlivnit sledované soubory. Po ozáření byly části kůže rozmrazeny a vzorky byly před tlakovým testem zkoumány z hlediska integrity. Dále byly vzorky podrobeny zkoumání z hlediska teploty a obsahu vlhkosti. Této podmínky bylo dosaženo předehřátím tekutého média v testovací komoře a úpravou průtoku vzduchu ventilačním kanálem komory. Makroskopické a fyzikální zkoumání vzorků kůže bylo provedeno před tímto testem, aby byla zajištěna jejich vhodnost a plocha testovaných vzorků byla stanovena na 10 cm<sup>2</sup>. Během testu bylo vzorkům dodáváno jednotně cirkulující nutriční médium, které oplachovalo jejich povrch. Testovací procedura zahrnovala jednu aplikaci 0,5% (w/w) roztoku beta-glukanu s použitím mikrodávkovacího aplikátoru v dávce 5 mg na cm<sup>2</sup> kůže. Po 8 hodinách inkubace byla kožní tkáň hluboce zmrazena. Poté byla nakrájena na plátky od nižší k vyšší možné koncentraci, tzn. od hlubší dermis k rohovité vrstvě.

Vzorky byly umístěny na podložní sklíčka aby mohly schnout. K obarvení se použila jedna kapka Calcofluoru White po dobu 30 sekund. Nadměrné zabarvení bylo odstraněno vymýváním deionizovanou vodou. Vzorky byly poté zkoumány s použitím fluorescenčního mikroskopu s budící vlnovou délkou 400-500 nm a vrcholem 440 nm. Neošetřená kůže byla použita ke kontrole.

Testy byly prováděny společně s dvěma vzorky a jedním kontrolním pro každý vzorek kůže dobrovolníka. Všechny testy byly opakovány na kůži pěti dobrovolníků.

### Studie o stárnutí

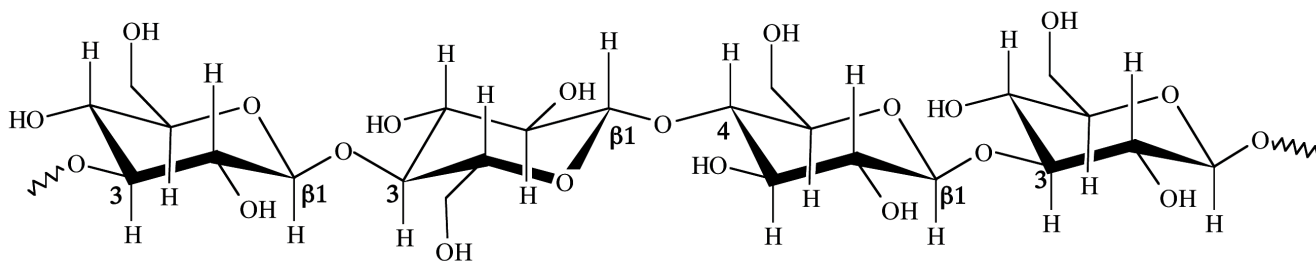
V druhé studii jsme provedli klinické zhodnocení kapacity beta-glukanu zmírnit vedlejší projevy stárnutí. Studie byla prováděna v Coloradu v zimním období, které poskytuje suché prostředí spolu s vysokou mírou expozice UV záření.

Tento test byl prováděn na vzorku 27 subjektů se dvěma vzorky karbomerového gelu; jeden obsahoval 0,1% (w/w) (1,4;1.3) beta-glukanu a druhý byl placebo. Subjekty is aplikovaly oba produkty náhodně vybrané dvakrát denně s tím, že každý nanášely na jednu půlku obličeje. Každý ze subjektů měl 3 dny na přípravu před prováděním měření. Všechny 27 účastníků testu ošetřovalo levou a pravou tvář svého obličeje dvakrát denně, po dobu 8 týdnů. Po 8 týdnech ošetřování byly změny kůže vyhodnoceny vzhledem k výchozímu stavu v několika parametrech včetně jemných linek, vrásek v obličeji a hrubosti kůže.

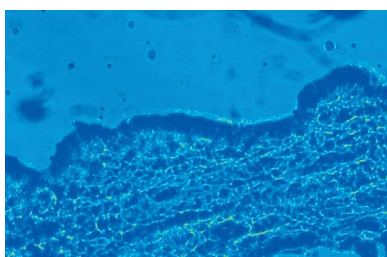
Klinická studie zahrnovala subjektivní a objektivní hodnocení, které byly zaznamenávány ve výchozím stavu, po 2,4 a 8 týdnech. Pro hodnocení jemných linek a vrásek byly silikonové repliky vnějších očních koutků (oční vrásky) podrobeny analýze digitálních obrázků, kterou prováděli experti. K vyhodnocení změn jemných linek a vrásek byla také použita makrofotografie.

### Výsledky a diskuze

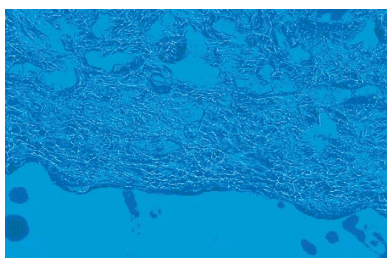
Výsledky studie pronikání kůží ukázaly, že (1,4;1.3) beta-glukan pronikl kůží do části epidermis a dermis (**obr. 1 a obr. 5**). V kontrolní skupině, která nebyla ošetřena beta-glukanem se neobjevilo žádné fluorescenční zabarvení (**obr. 4**). Kvantitativní hodnocení fluorescenčního zabarvení ukázalo, že významná část produktu (28,5% aplikovaného beta-glukanu) pronikla kůží (**obr.6**). Výsledky klinických studií ukazují vysoký výskyt zlepšení s beta-glukanem než s placebem. **Obr. 7** ukazuje průměrné procento změny vybraných parametrů od výchozího stavu v porovnání s placebem.



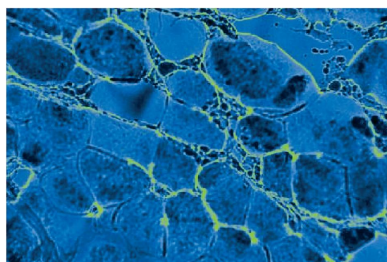
**Obr. 2** Chemická struktura ovesného beta-glukanu ukazující strukturu beta 1,4 a beta 1,3 glykosidické vazby



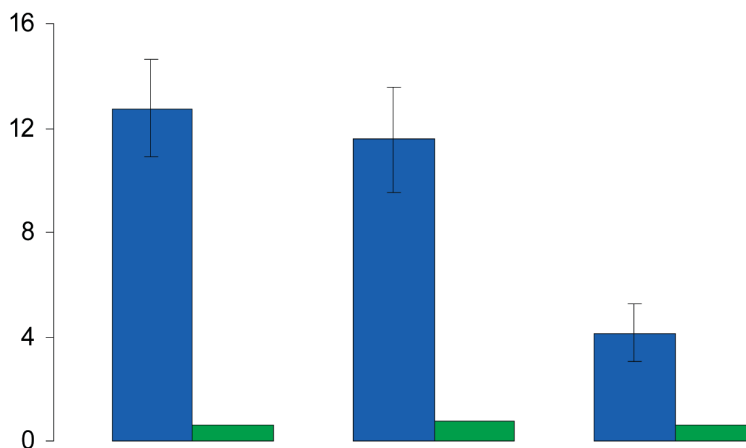
**Obr. 3** Fotografie vzorku kožní dermis ošetřené 0,05% roztokem beta glukanu (zvětšeno 125x)



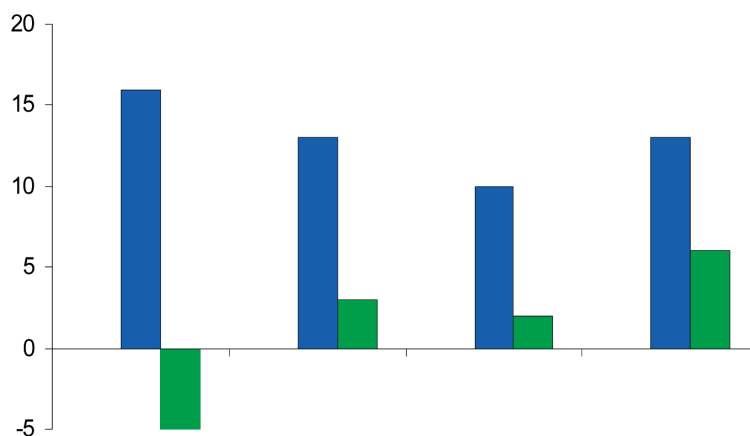
**Obr. 4** Fotografie kontrolního vzorku kožní dermis (zvětšeno 125x)



**Obr. 5** Velmi zvětšená fotografie vzorku epidermis ošetřené 0,05% roztokem beta-glukanu. Za zmínku stojí, že obervný beta-glukan je spojený s mezi buněčnou strukturou, což naznačuje, že beta-glukan proniká kůží tak, že postupuje mezi buňkami a neprochází nimi přímo (zvětšeno 250x)



**Obr. 6** Grafická analýza fluorometrických údajů získaných ze studie pronikání kůží. Modrý sloupec znázorňuje kůži ošetřenou beta-glukanem, zelený sloupec znázorňuje kůži z kontrolního vzorku. Výsledky ukazují, že beta-glukan je schopen proniknout do nižších vrstev kůže a je tudíž schopen se vzájemně ovlivňovat s fibroblasty a ostatními strukturálními prvky.



**Obr. 7** Grafická analýza výsledků studie obličejové kůže, získané analýzou digitálních obrázků po 8 týdnech. Modrý sloupec znázorňuje kůži ošetřenou beta-glukanem, zelený sloupec znázorňuje kůži z kontrolního vzorku.

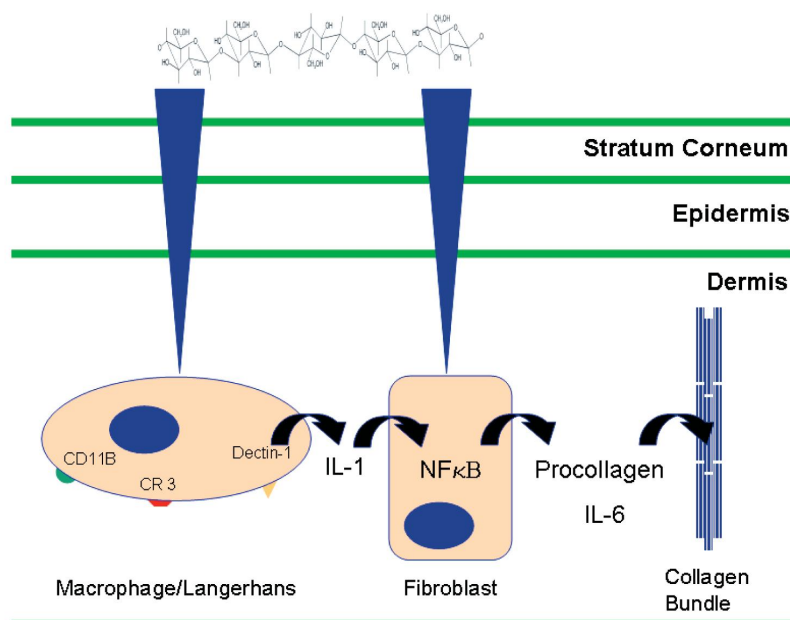
Silikonové repliky po testovacím období vykazovaly zjevně očních koutků po 8 týdnech ošetřování beta-glukanem. Makrofotografie levé a pravé části obličeje také ukázaly redukci linek a vrásek.

Tyto výsledky představují pozoruhodná, nová zjištění, která přispívají k našemu porovnání vzájemných vztahů mezi kůží a beta-glukanem a schopnosti beta-glukanu pronikat hluboko do kůže a tak vyvolat buněčné změny.

V minulosti byla potenciální schopnost beta-glukanu pronikat do kůže zpochybňována díky jeho poměrně vysoké molekulární hmotnosti ( $> 0,5 \times 10^6$  Da), nemožnosti proniknout do částí epidermis a dermis a tudíž neschopnosti se vzájemně ovlivňovat s buňkami fibroblastů a makrofágů. Beta-glukan je schopen se přizpůsobit množství struktur a typicky je extrahován ve formě agregovaných částic  $> 1 \mu\text{m}$ , které jsou zřetelně viditelné pod světelným mikroskopem. Je pochopitelné, že tak velké částice mohou velmi těžko proniknout kůží a účinek takového beta-glukanu se bude omezovat pouze na povrch pokožky.

Nicméně, beta-glukan použitý v této studii prošel submikronovou filtrací, jejíž výsledkem je roztok s nízkým základem a s částicemi, které nejsou pozorovatelné pod světelným mikroskopem. Zkoumání mikrografů z obrázku 5 ukazuje, že beta-gluka použitý v naší studii nevstupuje do kůže tak, že by procházel přímo buňkami epidermis a dermis, ale hledá si svojí cestu mezi těmito buňkami. Tento proces může být usnadněn difúzním gradientem a interakcí lipidů a fosfolipidů. Interakce beta-glukanů a lipidů jsou známy a jsou základem zdraví podporujících, lipidy kontrolovaných vlastností, které uznává i úřad FDA [12].

Tím, že beta-glukan proniká skrz kůži až do vrstvy dermis, je schopen interakce se specifickými buňkami, jmenovitě makrofágy a fibroblasty. Výsledky *in vitro* experimentů ukazují, že interakce beta-glukanů s makrofágy indukuje tvorbu interleukinu IL-1, který nepřímo podporuje tvorbu prokolagenu fibroblasty. Navíc, beta-glukan se vzájemně ovlivňuje s receptory fibroblastů, přímým výsledkem této



**Obr. 8** Předpokládaný mechanismus pronikání beta-glukanu kůží. Na vrchní vrstvě zrohovatěle kůže a epidermis vytváří beta-glukan tenký film, který podporuje její zvlhčování. Uvnitř kožní dermis je pak beta-glukan schopen produkovat kolagenovou syntézu přímou interakcí s fibroblasty a nepřímou, cytokinem zprostředkovanou, interakcí s makrofágy. Kolagenová syntéza je jeden možný mechanismus, kterým dochází ke zvýšení elasticity kůže.

interakce je tvorba prokolagenu [13.14]. Přeměna prokolagenu na kolagen a jeho včlenění do kolagenových svazků by měla za následek druh efektu pozorovaného v naší studii, speciálně posílení kůže na obličeji vedoucí k redukci jemných linek a vrásek.

Dotazníky a další sledování ukázaly, že efekt beta-glukanu na jemné linky a vrásky je dlouhodobý, ale nikoliv permanentní. Vzhledem k normálnímu buněčnému vývoji, byly pozorovány opět jemné linky. Lze ovšem spekulovat o tom, že dalším používáním beta-glukanu by mohlo dojít k trvalejšímu zlepšení vzhledu. Výsledky prezentované v této studii nabízí kosmetické alternativy jiným invazivnějším způsobům ošetření zaměřeným na redukci jemných linek a vrásek u stárnoucí populace. Injektivatelná plnidla jako kolagen – ať už z lidského, či zvířecího zdroje ( hovězí , prasečí ) – jsou běžně používáné a nedávno byla do praxe rovněž uvedena kyselina hyaluronová. Tato plnidla poskytují dočasnou, měkkou tkáň s efektem přetrvávajícím 3 až 4 měsíce. Podobného efektu lze dosáhnout s použitím Botulotoxinu typu A [15]. K ošetřování vrásek se používá také kyselina retinová a koenzym Q10. Pravidelné a časté používání kosmetických přípravků s obsahem ovesného (1,4;1,3) beta-glukanu je novým a vzrušujícím nástrojem v boji proti projevům stárnutí.

## ZÁVĚR

Ovesný (1,4;1,3) beta-glukan je přírodní, aktivní ingredience nabízející významné vlastnosti v oblasti péče o tělo. Naše studie ukázaly, že molekuly, i přes svou větší molekulární hmotnost, jsou schopny prostoupit zrohovatělou částí kůže a kožním epidermem a proniknout hluboko do části dermis. Pozorované efekty beta-glukanu na reorganizaci tkáně a redukce vrásek jsou s největší pravděpodobností efekty zprostředkované stimulací fibroblastů a ukládáním kolagenu v dermis. Tyto vyjimečné vlastnosti dělají z ovesného beta-glukanu slibnou a účinnou ingredienci pro kosmetické účely.

## REFERENCE

### REFERENCES

- [1] United States FDA, Federal Register, **68** (2003) 35346-35348.
- [2] Lee, S.B., Jeon, H.W., Lee, Y.W., Lee, Y.M.L., Song, K.W., Park, M.H., Nam, Y.S., and Ahn, H.C., Bio-artificial skin composed of gelatin and (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucan, *Biomaterials*, **24** (2003) 2503-2511.
- [3] Delatte, S.J., Evans, J., Hebra, A., Adamson, W., Othersen, H.B., and Tagge, E.P., Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial thickness burns in children, *J. Pediatr. Surg.*, **36** (2001) 113-118.
- [4] Wei, D., Zhang, L., Williams, D.L., and Browder, I.W., Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism, *Wound Repair and Regeneration*, **10** (2002) 161-168.
- [5] Portera, C.A., Love, E.J., Memore, L., Zhang, L., Mueller, A., Browder, W., and Williams, D.L., Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound, *Am. Surg.*, **63** (1997) 125-131.
- [6] Yun, C.H., Estrada, A., Van Kessel, A., Gadajadhar, A.A., Redmond, M., and Laarveld, B., Beta (1-3, 1-4) oat glucan enhances the resistance to *Eimeria vermiformis* in immunosuppressed mice, *Int. J. Parasitol.*, **27** (1997) 329-337.
- [7] Estrada, E., Yun, C.H., Van Kessel, A., Li, B., Hauta, S., and Laarveld, B., Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in-vitro and in-vivo, *Microbial. Immunol.*, **41** (1997) 991-998.
- [8] Wei, D., Williams, D.L., and Browder, I.W., Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts, *International Immunopharmacology*, **2** (2002) 1163-1172.
- [9] Wood, P.J., Weisz, J., and Mahn, W., Molecular characterization of cereal betaglucans, II. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight, *Cereal Chem.*, **68** (1991) 530-536.
- [10] Wood, P.J. and Fulcher, R.G., Interaction of some dyes with cereal beta-D-glucans, *Cereal Chem.*, **55** (1978) 952-966.
- [11] Szmazinski, H. and Lakowicz, J.R., Sodium green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime, *Anal. Biochem.*, **250** (1997) 131-138.
- [12] United States FDA, Federal Register, **63** (1998) 8103-8121.
- [13] Mueller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W., and William, D.L., The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line, *Glycobiol.*, **10** (2000) 339-346.
- [14] Wei, D., Zhang, L., Williams, D.L., and Browder, I.W., Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism, *Wound Repair Regen.*, **10** (2002) 161-168.
- [15] The Economist, Pots of Promise, The Economist (2003) May 22, 2003 Edition.
- [16] Rosenthal, D.S., Roop, D.R., Huff, C.A., Weiss, J.S., Ellis, C.N., Hamilton, T., Voorhees, J.J. and Yuspa, S.H., Changes in photo-aged human skin following topical application of all-trans retinoic acid, *J. Invest. Dermatol.*, **95** (1990) 510-515.
- [17] Personelle, J., De Campos, S., Ruiz, Rde O., and Ribeiro, G.Q., Injection of all-trans retinoic acid for treatment of thin wrinkles, *Aesthetic Plast Surg.*, **21** (1997) 196-204.
- [18] Hoppe, U., Bergemann, J., Diembeck, W., Ennen, J., Gohla, S., Harris, I., Jacob, J., Kielholz, J., Mei, W., Pollet, D., Schachtschabel, D., Saueremann, G., Schreiner, V., Stab, F., and Steckel, F., Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer, *Biofactors*, **9** (1999) 371-8.