

## 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:

**Elastin hydrolysate derived from fish enhances proliferation of human skin fibroblasts and elastin synthesis in human skin fibroblasts and improves the skin conditions**

Авторы:

**Eri Shiratsuchi, Misako Nakaba and Michio Yamada**

Дата выдачи:

**9 апреля 2013**

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

# Применение гидролизата рыбного эластина для усиления пролиферации фибробластов, синтеза в них эластина и улучшения состояния кожи человека

## Резюме

**АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Согласно результатам недавно проведенных исследований, некоторые пептиды значительно улучшают состояние кожи здоровой женщины, повышают ее эластичность и содержание в ней влаги. Целью данного исследования было изучение воздействия гидролизата эластина на кожу человека. Пролиферацию и синтез эластина оценивали в фибробластах кожи человека в лабораторных условиях после воздействия на них гидролизата эластина и пролилглицина (Pro-Gly), содержащегося в крови человека после приема внутрь гидролизата эластина. Также было проведено исследование на людях с целью оценки состояния кожи после перорального приема гидролизата эластина.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Применение гидролизата эластина и Pro-Gly позволяет усилить пролиферацию фибробластов и синтез эластина. Максимально выраженная реакция пролиферации наблюдалась при концентрации Pro-Gly равной 25 нг/мл<sup>1</sup>. При пероральном приеме гидролизата эластина улучшилось состояние кожи, повысилась ее эластичность, сократилось количество морщин, и усилилась циркуляция крови. В экспериментальной группе после приема гидролизата эластина эластичность кожи увеличилась на 4%, в то время как в группе плацебо повышение показателя эластичности кожи составило только 2%.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, гидролизат эластина активизирует фибробласты кожи человека и благотворно влияет на состояние кожи.

**Ключевые слова:** эластин; гидролизат эластина; фибробласты; кожа

## ВВЕДЕНИЕ

Эластические волокна представляют собой важные компоненты внеклеточного матрикса и состоят из двух основных компонентов: микрофибрилл и эластина. Микрофибриллы богаты кислыми гликопротеинами и организованы в фибриллы размером 8–16 нм, напоминающие бусинки.<sup>1</sup> Эластин является основным белком (>90%) эластических волокон, и отвечает за эластичность таких тканей, как кожа, аорта, связки и легкие.<sup>1,2</sup> Прочность тканей на растяжение обеспечивается эластическими волокнами и коллагеном, также являющимся важным компонентом внеклеточного матрикса.<sup>3,4</sup>

Эластин и коллаген играют важную роль в поддержании формы и функции различных органов. Поскольку эти два белка, как правило, работают вместе, было высказано предположение, что соотношение между ними влияет на механические свойства клеток и тканей.<sup>4-12</sup>

Согласно результатам исследований, содержание эластина в коже составляет 2-4% от веса сухой обезжиренной кожи, коллагена – свыше 70%.<sup>13,14</sup> Благодаря наличию небольшого количества эластина в коже, обеспечивается ее эластичность и повышается тургор. Однако в результате старения эластические волокна разрушаются и в конечном итоге исчезают,<sup>15</sup> что становится причиной появления морщин и обвисания кожи.

Благодаря своим уникальным физическим и биохимическим характеристикам эластин часто используется в косметике и биоматериалах. Растворимый эластин, содержащийся в косметике, повышает упругость и эластичность кожи, придавая ей вязкоупругие свойства и компенсируя утрату (по мере старения) собственного эластина кожи.<sup>16</sup> Кроме того, было проведено большое количество прикладных исследований по применению биоматериалов,

содержащих эластина, для создания искусственной кожи, кровеносных сосудов и связок.<sup>17–20</sup> В отличие от эластина, коллаген стали использовать в косметике и биоматериалах намного раньше и изучать его воздействие на человеческий организм при пероральном приеме человеком. Прием гидролизата коллагена позволял увеличить содержание влаги в коже у здоровых женщин<sup>21</sup> и уменьшить боль в коленных суставах у пациентов с остеоартритом.<sup>22</sup> После приема<sup>23</sup> пациентами пептидов коллагена, таких как пролил-гидроксипролин (Pro-Hyp), полученных из пищевых продуктов, их содержание в периферической крови повышалось, вследствие чего было отмечено усиление роста фибробластов и синтеза внеклеточного матрикса, имеющих полезное воздействие на кожу.

Следует отметить, что между эластином и дипептидом Pro-Gly существует аналогичная связь. Pro-Gly был обнаружен в периферической крови человека после перорального приема гидролизата эластина, полученного из рыбы (полосатого тунца).<sup>24</sup> Как следствие, синтез эластина фибробластами кожи человека *in vitro* был значительно повышен после достижения Pro-Gly концентрации в 0,1 – 10 мкг/мл<sup>1</sup> в течение 72-часового инкубационного периода.<sup>24</sup> Несмотря на то, что клинические испытания на людях еще не проводились, полученный результат свидетельствует о том, что пероральный прием гидролизата эластина может использоваться для улучшения состояния кожи человека.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке воздействия перорального приема гидролизата эластина, полученного из полосатого тунца, на пролиферацию фибробластов, синтез в них эластина и общее состояние кожи человека.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Воздействие гидролизата эластина и Pro-Gly на фибробласты кожи

#### *Гидролизат эластина*

Гидролизат эластина (1 кДа, средняя молекулярная масса) получили из артериальной луковицы полосатого тунца *Katsuwonus pelamis* (Окунеобразные, Скумбриевые, Полосатый тунец *K. pelamis*) по методу Nakaba *и соавт.*<sup>25</sup> Полосатый тунец обитает в Индийском и Тихом океанах рядом с Таиландом. Артериальная луковица представляет собой орган, характерный для рыб, с большим количеством эластических волокон и губкообразной структурой, определяющей скорость кровотока. Аминокислотный состав гидролизата эластина (Табл. 1), использованного в настоящем исследовании, аналогичен составу рыбного эластина, примененного в предыдущих исследованиях.<sup>25,26</sup> Гидролизат эластина выпускается японской компанией под торговой маркой Katsuwo Elastin (Hayashikane Sangyo Co., Ltd., Симоносеки, Ямагути, Япония).

#### *Химические препараты*

В настоящем исследовании использовали следующие химические препараты: Pro-Gly производства Kokusan Kagaku (Токио, Япония), первичные культивированные нормальные кожные фибробласты человека (НКФЧ) производства Takara Bio Inc. (Шига, Япония), модифицированную среду Игла Дульбекко (МСИД) и фетальную бычью сыворотку (ФБС) производства Invitrogen (Карлсбад, Калифорния, США), антитела против тропоэластина человека производства Cosmo Bio (Токио, Япония), микролуночный ТМВ субстрат для пероксидазы и конъюгат поликлональных антител козы к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена производства KPL (Гейтерсберг, Мэриленд, США), солюбилизованный эластин из связок бычьей шеи производства Sigma (Сент-Луис, Миссури, США), набор для определения жизнеспособности клеток (ССК-8) производства Dojin Global (Кумамото, Япония). Все остальные реагенты были аналитической степени чистоты или выше.

#### *Пролиферация клеток*

НКФЧ (от трех до шести пассажей), суспендированные в МСИД, содержащей 10% ФБС,

аликвотировали, высадили в 96-луночные пластиковые микропланшеты (3500 клеток см<sup>-2</sup>) и инкубировали в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, при 37°C в течение 24 часов. Затем культуральную среду заменили на 0,5% ФБС/МСИД, чтобы привести клетки в состояние покоя. Через 24 часа клетки обработали гидролизатом эластина в концентрации 0, 5, 50, 500 и 5000 нг/мл<sup>-1</sup> и Pro-Gly в концентрации 0, 5, 25, 50, 500 и 5000 нг/мл<sup>-1</sup>. Четыре дня спустя пролиферацию клеток оценили с помощью набора ССК-8 путем определения оптического поглощения при длине волны 490 нм.

#### Синтез эластина в НКФЧ

Воздействие гидролизата эластина и Pro-Gly на синтез эластина проанализировали через 4 дня после начала их применения. Для оценки синтеза эластина провели измерения тропоэластина в эластических волокнах, являющегося белком-предшественником зрелого эластина. Концентрацию тропоэластина в среде определили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по методу Prosser и соавт.<sup>27</sup> Калибровочная кривая была построена с использованием растворимого эластина из связок бычьей шеи. Результаты рассчитали как количество эластина, синтезированного на клетку.

Таблица 1. Аминокислотный состав (остатки/1000 остатков) гидролизата эластина, полученного из полосатого тунца		
Аминокислота	Гидролизат эластина	
Asp	21	
Thr	68	
Ser	25	
Glu	37	
Gly	440	
Ala	85	
Val	72	
Cys	1	
Met	4	
Ile	12	
Leu	37	
Tyr	30	
Phe	21	
Hyl	0	
His	3	
Lys	8	
Ide	0.3	
Des	0.2	
Arg	25	
Hyp	7	
Pro	102	

Таблица 2. Состав (мг день 1) ингредиентов в обоих образцах		
Компонент	Группа, принимавшая эластин	Группа плацебо
Гидролизат эластина	75	—
Микрокристаллическая целлюлоза	87	21
Лактоза	132	270
Эфиры сахарозы	6	9

## Влияние приема гидролизата эластина на состояние кожи

### Дизайн исследования

В исследовании приняли участие 20 здоровых японских женщин в возрасте от 30 до 40 лет, которых беспокоили морщины вокруг глаз, сухость кожи и чувство холода. Кроме того, у всех 20 женщин были низкие значения эластичности кожи и кожного кровотока на правой щеке. Эластичность кожи измеряли при помощи кутометра (MPA 580®; Integral Corp., Токио, Япония), кожный кровоток измеряли с помощью устройства лазерной доплеровской визуализации перфузии (PeriScan PIM II; PERIMED Ltd, Стокгольм, Швеция). Субъекты были проинформированы о цели, потенциальных преимуществах и ходе исследования, после чего было получено их письменное согласие. Вся личная информация была строго конфиденциальной. Проводимое исследование и его дизайн были одобрены комитетом по этике SOUKEN Co., Ltd (организация, проводящая клинические исследования по контракту). Исследование придерживалось принципов Хельсинкской декларации.

Для оценки воздействия приема гидролизата эластина на состояние кожи было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. Состав ежедневных добавок приведен в Табл. 2. Доза гидролизата эластина (75 мг) считалась безопасной и была определена на основании данных предыдущего исследования, в котором доза гидролизата эластина равная приблизительно 400 мг в день<sup>-1</sup>, и применяемая в течение 13 месяцев<sup>28</sup>, не привела к клинически значимым осложнениям. Участников исследования распределили в две группы: группу принимающих гидролизат эластина (n = 10, средний возраст = 35,7 ± 3,2), и группу плацебо (n = 10, средний возраст = 35,6 ± 3,0). Срок проведения исследования составил 4 недели. Посещение лаборатории было запланировано в первый день исследования и через 4 недели после его начала. Участники исследования должны были принимать препарат перед сном, чтобы не менять свои пищевые привычки и физические нагрузки, и избегать чрезмерного воздействия солнечного света.

Таблица 3. Параметры, используемые для оценки состояния кожи	
Свойство	Оцениваемый параметр
Эластичность	Обвисание щек
	Эластичность и упругость кожи
	Пружинение\ тургор кожи
Сухость	Сухость кожи вокруг глаз и рта
	Сухость кожи всего лица
	Мелкие морщины
Качество	Тусклая кожа
	Чистая кожа
	Стойкий макияж
	Разглаживающий макияж

### Оценка состояния кожи

Состояние кожи лица участников исследования определили после их умывания обычным способом и пребывания в кондиционируемом помещении (температура 22 ± 1°C, влажность 50 ± 10 % влажности) в течение 30 мин.

Эластичность кожи измерили при помощи кутометра (MPA 580®; Integral Corp.), работающего по принципу всасывания/растяжения кожи. В аппарате создается отрицательное давление, втягивающее кожу в отверстие зонда. Подробное описание работы прибора приведено в исследовании *Sin и соавт.*<sup>29</sup> Измерения проводили на щеке, отступив 4 см от основания мочки уха на уровне губ. Эластичность кожи рассчитывали как отношение освобожденной кожи

(после отключения отрицательного давления) к максимальной высоте кожи (при втягивании кожи в зонд).

Морщины в области глаз измеряли при помощи реплики кожи. Морщина – это видимая кожная складка, затрагивающая поверхностный и подкожный слои кожи. Объем, максимальную глубину, максимальную ширину и количество морщин определили с помощью системы визуального анализа ASA-03RXD (Asahibiomed Co., Ltd, Токио, Япония).

Кожный кровоток на исследуемом участке правой щеки измеряли с помощью лазерного доплеровского перфузионного томографа (PeriScan PIM II; PERIMED Ltd.). При направлении на кожу лазера, луч рассеивается при столкновении с клетками крови. Скорость движения клеток крови рассчитывали по скорости изменения частоты лазерного излучения, вызванного эффектами Доплера, при этом количество изменений лазерного излучения преобразовывали в количество клеток крови. Объем кровотока рассчитывали путем умножения скорости движения клеток крови на общее количество клеток крови.

Субъективная оценка состояния кожи включала определение эластичности, сухости и качества кожи (Табл. 3) и была выполнена по пятибалльной шкале, где значение 5 соответствовало наилучшему возможному состоянию.

### **Статистическая оценка**

Статистическую значимость данных, полученных при исследовании клеточных культур, определили с использованием критерия Даннета. Статистическую значимость инструментальных данных, полученных в ходе исследования на людях, оценили при помощи парных t-тестов внутри групп и t-критерия Стьюдента между группами. Данные, полученные во время субъективной оценки состояния кожи, проанализировали при помощи непарного t-критерия или критерия знакового ранга Уилкоксона. Результаты считались значимыми при значениях  $p < 0,05$  и высокозначимыми при  $p < 0,01$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Пролиферация клеток**

Результаты воздействия гидролизата эластина, полученного из полосатого тунца, и Pro-Gly на пролиферацию НКФЧ продемонстрированы на Рис. 1. Гидролизат эластина позволил существенно повысить пролиферацию фибробластов: в 1,10 – 1,19 раз через 96 часов при концентрации в диапазоне 5-5000 нг/мл<sup>-1</sup>. Применение Pro-Gly также способствовало значительному увеличению пролиферации фибробластов: в 1,12 – 1,20 раза через 96 часов при концентрации 5-50 нг/мл<sup>-1</sup>. Максимальный ответ на Pro-Gly наблюдался при концентрации 25 нг/мл<sup>-1</sup>, при этом пролиферация фибробластов под воздействием гидролизата эластина не усиливалась при его концентрациях в диапазоне 500-5000 нг/мл<sup>-1</sup>.

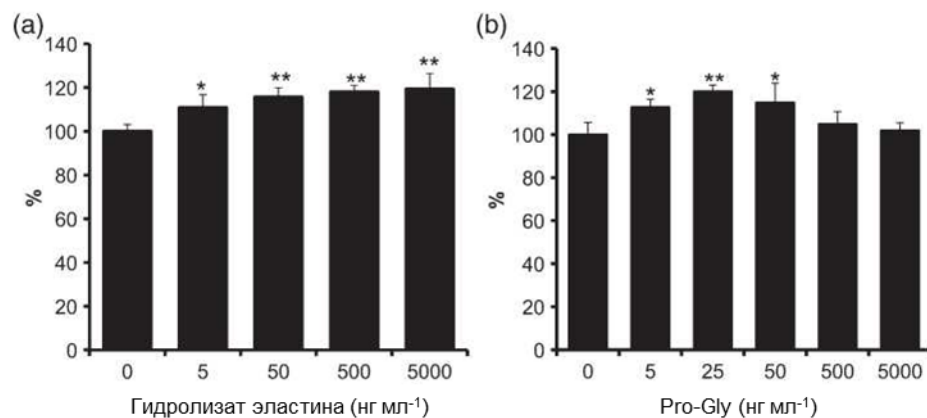
### **Синтез эластина в НКФЧ**

Воздействие гидролизата эластина, полученного из полосатого тунца, и Pro-Gly на синтез эластина в НКФЧ показано на Рис. 2. Увеличение синтеза эластина в 1,14 раза было отмечено при добавлении гидролизата эластина в концентрации 5000-50 000 нг/мл<sup>-1</sup>; при добавлении Pro-Gly в концентрации 5-50 000 нг мл<sup>-1</sup> по прошествии 96 часов синтез эластина усиливался в 1,13 – 1,39 раз.

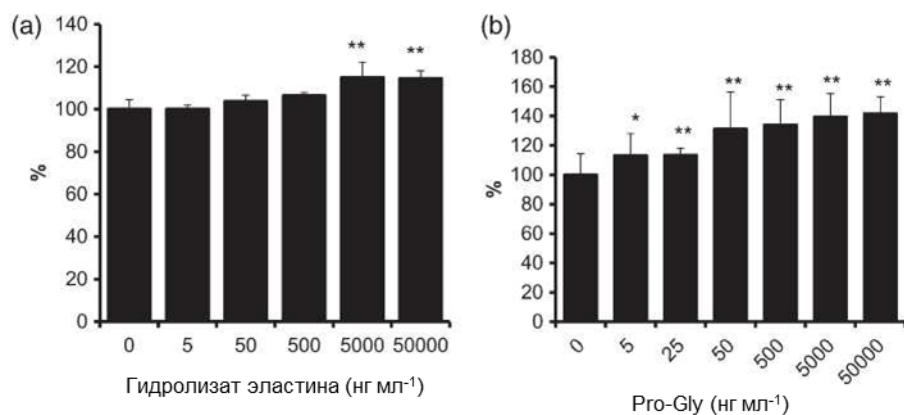
### **Воздействие приема гидролизата эластина на состояние кожи**

В группе пациенток, перорально принимавших гидролизат эластина, эластичность кожи существенно повысилась через 4 недели после начала исследования (Рис. 3). Значения показателя эластичности увеличились на 4% у пациенток, принимавших гидролизат эластина, и

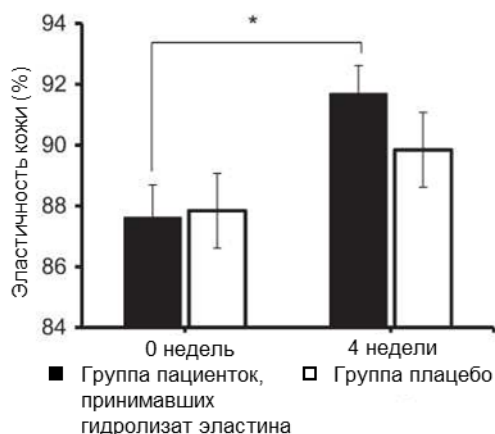
на 2% у пациенток в группе плацебо. Существенных различий в любой момент времени между двумя группами выявлено не было. Как показано на Рис. 4, морщины в области глаз постепенно сокращались по мере проведения исследования. Объем, максимальная глубина, ширина и количество морщин существенно сократились у пациенток, принимавших гидролизат эластина, по сравнению с пациентками из группы плацебо. Однако существенных различий между двумя группами выявлено не было. Результаты измерения кровотока в коже щек продемонстрированы на Рис. 5. В группе плацебо значения кровотока существенно снизились через 4 недели после начала исследования. Снижение значений кровотока отмечалось в обеих группах, вероятно, по той причине, что исследование проводилось в зимний период. Однако в группе пациенток, принимавших гидролизат эластина, значительного снижения кровотока выявлено не было. Кроме того, была выполнена субъективная оценка состояния кожи, в ходе которой были определены эластичность, сухость и качество кожи. По общим баллам через 4 недели после начала исследования состояние кожи было нормализовано по сравнению с исходной ситуацией. По сравнению с группой плацебо, в группе пациенток, принимавших гидролизат эластина, через 4 недели после начала исследования были отмечены следующие существенные изменения: уменьшение сухости области вокруг глаз и рта, улучшение состояния кожи после применения разглаживающего макияжа и повышение его стойкости (Рис. 6). По сравнению с исходным состоянием кожи, большинство исследуемых параметров, за исключением тургора кожи, показали значительные улучшения после приема гидролизата эластина, в частности при использовании разглаживающего макияжа и наложении стойкого макияжа (Рис. 6).



**Рис. 1.** Воздействие гидролизата эластина и Pro-Gly на пролиферацию НКФЧ. К покоящимся культурам клеток, погруженных в 0,5% ФБС/МСИД среду, в течение 4 дней добавляли гидролизат эластина (а) и Pro-Gly (б) в указанных концентрациях. Уровни пролиферации клеток нормализовали относительно контроля (0 нг/мл<sup>-1</sup>). Данные представляют собой средние значения ± стандартное отклонение; гидролизат эластина, n = 6; Pro-Gly, n = 5. Звездочки указывают на статистически значимое отличие от контроля (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

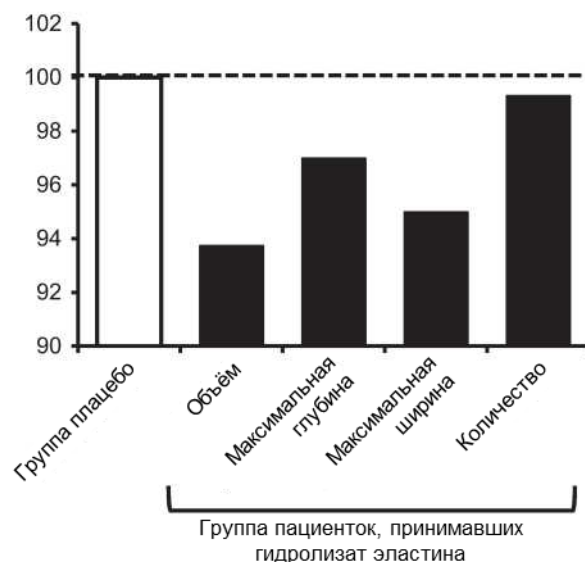


**Рис. 2.** Воздействие гидролизата эластина и Pro-Gly на синтез эластина в НКФЧ. К клеткам в течение 4 дней добавляли гидролизат эластина (а) и Pro-Gly (б) в указанных концентрациях. Уровень тропоэластина в среде определили при помощи твердофазного иммуноферментного анализа и нормализовали относительно контроля (0 нг/мл<sup>-1</sup>). Данные представляют собой средние значения ± стандартное отклонение; гидролизат эластина, n = 4; Pro-Gly, n = 5. Звездочки указывают на статистически значимое отличие от контроля (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

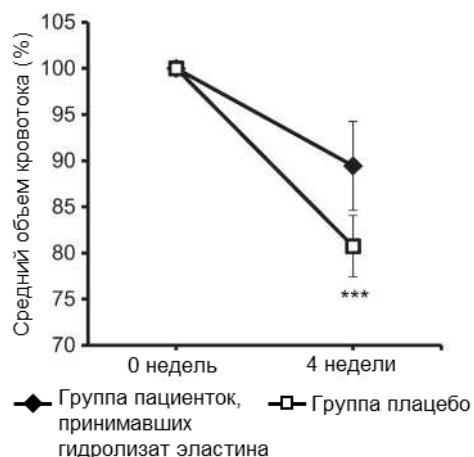


**Рис. 3.** В группе пациенток, принимавших гидролизат эластина, было отмечено существенное повышение эластичности кожи по сравнению с пациентками из группы плацебо. Парный t-тест (0 против 4 недель); \*p<0,05. Данные представляют собой средние значения ± стандартное отклонение.





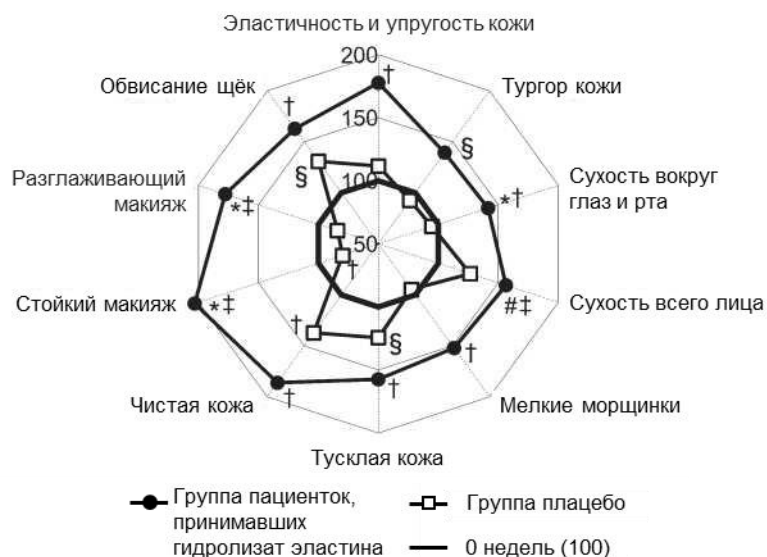
**Рис. 4.** Существенное сокращение морщин отмечалось в группе пациенток, принимавших гидролизат эластина, по сравнению с пациентками из группы плацебо.



**Рис. 5.** Сравнение данных объема кровотока в щеке на момент начала исследования и через 4 недели после его завершения. Парный t-тест (0 против 4 недели); \*\*\* $p < 0,001$ . Данные представляют собой средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование было проведено с целью изучения воздействия гидролизата эластина и Pro-Gly на пролиферацию фибробластов и состояние кожи человека. Согласно данным ранее проведенного исследования, применение Pro-Gly в концентрациях 0, 100, 1000 и 10 000 нг/мл<sup>1</sup> не оказало существенного влияния на пролиферацию НКФЧ.<sup>24</sup> В результате было принято решение изучить применение Pro-Gly в более низких концентрациях. Максимально выраженный ответ кожи на Pro-Gly был отмечен при его применении в концентрации 25 нг мл<sup>-1</sup>, при этом повышение концентрации Pro-Gly до 500-5000 нг мл<sup>-1</sup> не позволило увеличить пролиферацию фибробластов. Как следствие, было сделано предположение, что применение Pro-Gly в концентрациях, превышающих 100 нг/мл<sup>1</sup>, может снижать пролиферацию фибробластов.



**Рис. 6.** Состояние кожи после применения гидролизата эластина существенно улучшилось. Непарный t-критерий (группа пациентов, принимавших гидролизат эластина, против группы плацебо); #  $p < 0,1$ , \* $p < 0,05$ . Критерий знакового ранга Уилкоксона (0 против 4 недель); §  $p < 0,1$ , † $p < 0,05$ , ‡ $p < 0,01$ .

С другой стороны, применение гидролизата эластина в концентрациях 5-5000 нг/мл<sup>1</sup> значительно увеличивало пролиферацию фибробластов. Поскольку эффективные пептидные последовательности гидролизата эластина, полученного из полосатого тунца, являются частичными, считается, что высокие концентрации индуцируют пролиферацию клеток.

Усиление пролиферации клеток под воздействием гидролизата эластина также было подтверждено другими исследованиями. Согласно данным Tajima и соавт.<sup>30</sup>, протеинкиназа С усиливала пролиферацию фибробластов в ответ на применение полигексапептида, полученного из эластина (VGVAPG)<sub>n</sub>. Результаты исследований свидетельствовали о том, что гидролизат эластина, полученный из полосатого тунца, позволял увеличить пролиферацию фибробластов за счет активации протеинкиназы С. По данным исследования Okamoto<sup>31</sup>, протеинкиназа С участвовала в миграции гладкомышечных клеток цыплят в ответ на применение мономера Val-Pro-Gly, полученного из эластина. Результаты всех проведенных ранее исследований могут помочь объяснить механизм пролиферации фибробластов, запускаемый с помощью Pro-Gly. Однако многие вопросы, связанные с основным механизмом усиления пролиферации фибробластов с помощью Pro-Gly, еще предстоит решить, поскольку тип клеток и структура пептида отличаются от пептида, описанного ранее в исследованиях. Для этого необходимо проведение исследований *in vitro*. Синтез эластина усиливался в зависимости от концентрации гидролизата эластина и Pro-Gly. Данные результаты согласуются с результатами ранее проведенных исследований.<sup>24</sup>

В ходе проведения двойного слепого плацебо-контролируемого исследования было отмечено существенное увеличение эластичности кожи, сокращение морщин, усиление кровотока и повышение субъективной оценки состояния кожи при приеме внутрь гидролизата эластина. По сравнению с началом исследования, эластичность кожи и большинство параметров субъективной оценки состояния кожи, за исключением тургора кожи, значительно улучшились после приема гидролизата эластина. В группе плацебо показатели кровотока значительно уменьшились по прошествии 4 недель после начала исследования. По сравнению с пациентами из группы плацебо, у пациентов, принимавших гидролизат эластина, было отмечено значительное улучшение субъективной оценки состояния кожи по следующим параметрам: сухость области вокруг глаз и рта, плохое разглаживание макияжа и стойкость макияжа.

В коже содержится небольшое количество эластина, однако он играет важную роль в обеспечении эластичности и упругости кожи. Содержание эластина в коже уменьшается с возрастом и под воздействием ультрафиолетовых лучей, что приводит к появлению морщин и обвисанию кожи. Для проведения настоящего исследования отобрали пациентов, которых в частности беспокоили морщины вокруг глаз и обвисание кожи. Поскольку содержание эластина в коже может уменьшиться или же он может разрушиться, биосинтез эластина в поврежденной коже очень важен. Учитывая все вышесказанное, концентрация Pro-Gly в крови человека является важным фактором. Согласно результатам предыдущего исследования, Pro-Gly обнаруживался в концентрации равной примерно  $18 \text{ пмоль л}^{-1}$  через 30 мин после приема 10 г гидролизата эластина; таким образом, примерная концентрация Pro-Gly будет равна  $0,14 \text{ пмоль л}^{-1}$  ( $24 \text{ нг мл}^{-1}$ ) после приема внутрь 75 мг гидролизата эластина. Согласно результатам настоящего исследования, Pro-Gly в концентрации  $0,14 \text{ пмоль л}^{-1}$  усиливал пролиферацию фибробластов и синтез эластина. Однако существует вероятность того, что Pro-Gly попал в кровь и улучшил состояние кожи, взаимодействуя с фибробластами. Для того чтобы доказать, что биосинтез эластина действительно индуцируется в поврежденной коже, необходимо проведение исследования на животных.

Кроме того, было отмечено, что Pro-Gly способен улучшить состояние капилляров кожи. Результаты исследования Takemori *и соавт.*,<sup>32</sup> показали, что степень повреждения эндотелия в животной модели гипертонии (т.е. SHR/Izm) была уменьшена при пероральном приеме гидролизата эластина и внутривенном введении Pro-Gly.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что гидролизат эластина благотворно влияет на кожу человека. Однако необходимы дальнейшие исследования для выяснения всех механизмов, лежащих в основе этих улучшений. Важную роль играет определение концентрации Pro-Gly после перорального приема 75 мг гидролизата эластина. Проводимые в будущем исследования также могут включать применение не только Pro-Gly, но и различных пептидов, связанных с эластином рыб. Авторы исследования надеются, что в ближайшем будущем гидролизат эластина будет полезен человечеству в качестве косметической добавки и/или материала для здоровой пищи.

## ВЫРАЖЕНИЕ БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы исследования выражают свою благодарность компании SOUKEN Co., Ltd (Токио, Япония) за организацию проведения клинических испытаний на людях, а также компании Urabe-Taikandoseiyaku Co., Ltd. (Фукуока, Япония) за производство препарата, используемого в качестве добавки в настоящем исследовании.

## REFERENCES

- 1 Vrhovski B and Weiss AS, Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**:1-18(1998).
- 2 Mithieux SM and Weiss AS, Elastin. *Adv Protein Chem* **70**:437-461 (2005).
- 3 Kwansa AL, De Vita R and Freeman JW, Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. *Matrix Biol* **34**:161 -169 (2014).
- 4 Parkinson J, Brass A, Canova G and Brechet Y, The mechanical properties of simulated collagen fibrils. *J Biomech* **30**:549 - 554 (1997).
- 5 Roach MR and Burton AC, The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol* **35**:681 -690 (1957).

- 6 Hajdu MA, Heistad DD, Siems JE and Baumbach GL, Effects of aging on mechanics and composition of cerebral arterioles in rats. *Circ Res* **66**:1747-1754(1990).
- 7 Oxlund H and Andreassen TT, The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. *J Anat* **131**:611 -620 (1980).
- 8 Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C and Savage K, Elastic proteins: Biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc London SerB Biol Sci* **357**:121 - 132 (2002).
- 9 Teti A, Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* **2**:S83 - S87 (1992).
- 10 Agrez MV, Bates RC, Boyd AW and Burns GF, Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: Implications for wound healing. *Cell Regul* **2**:1035 - 1044 (1991).
- 11 Hinek A, Wrenn DD, Mecham RP and Barondes SH, The elastin receptor: A galactoside-binding protein. *Science* **239**:1539 - 1541 (1988).
- 12 Mecham RP, Whitehouse L, Hay M, Hinek A and Sheetz MP, Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J Cell Biol* **113**:187 - 194 (1991).
- 13 Varadi DP and Hall DA, Cutaneous elastin in Ehlers - Danlos syndrome. *Nature* **208**:1224-1225 (1965).
- 14 Uitto J, Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol* **72**:1 -10 (1979).
- 15 Tsuji T and Hamada T, Age-related changes in human dermal elastic fibers. *Br J Dermatol* **105**:57 - 63 (1981).
- 16 Yasuda T, Elastin in cosmetics. *Pract Dermatol* **9**:1164 - 1166 (1987).
- 17 Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC and van Kuppevelt TH, Elastin asa biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials* **28**:4378 - 4398 (2007).
- 18 Haslik W, Kamolz LP, Manna F, Hladik M, Rath T and Frey M, Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: First long-term experiences with the dermal matrix Matriderm. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **63**:360 - 364 (2010).
- 19 Caves JM, Kumar VA, Martinez AW, Kim J, Ripberger CM, Haller CA, *et al.*, The use of microfiber composites of elastin-like protein matrix reinforced with synthetic collagen in the design of vascular grafts. *Biomaterials***31**:7175-7182 (2010).
- 20 Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, Hasegawa M, Miyamoto K and Horiuchi T, The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. *J Artif Organs* **17**:50 - 59 (2014).
- 21 Matsumoto H, Ohara H, Itoh K, Nakamura Y and Takahashi S, Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Lett* **7**:386-390 (2006).
- 22 Schauss AG, Stenehjem J, Park J, Endres JR and Clewell A, Effect of the novel low molecular weight hydrolyzed chicken sternal cartilage extract, BioCell Collagen, on improving osteoarthritis-related symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem* **60**:4096 - 4101 (2012).
- 23 Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Oda C, Taira T *et al.*, Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem* **57**:444-449 (2009).
- 24 Shigemura Y, Nakaba M, Shiratsuchi E, Suyama M, Yamada M, Kiyono T *et al.*,

Identification of food-derived elastin peptide, prolyl-glycine (Pro-Gly), in human blood after ingestion of elastin hydrolysate. *J Agric Food Chem* **60**:5128 - 5133 (2012).

25 Nakaba M, Ogawa K, Seiki M and Kunimoto M, Properties of soluble elastin peptide from bulbus arteriosus in fish species. *Fisheries Sci* **72**:1322-1324 (2006).

26 Sage H and Gray WR, Studies on the evolution of elastin-I. *Phylogenic distribution. Comp Biochem Physiol* **64**:313 - 327 (1979).

27 Prosser IW, Whitehouse LA, Parks WC, Stahle-Backdahl M, Hinek A, Park PW, *et al.*, Polyclonal antibodies to tropoelastin and the specific detection and measurement of tropoelastin *in vitro*. *Connect Tissue Res* **25**:265-279 (1991).

28 Shiratsuchi E, Investigation of the safety of elastin peptide from skipjack (*Katsuwonus pelamis*) bulbus arteriosus by the long-term ingestion. *Pharmacometrics* **83**:23 - 26 (2012).

29 Sin P, Stupka I and Brychta P, Evaluation and comparison of composite and split-thickness skin grafts using cutometer MPA 580. *Ann Burns Fire Disast* **23**:208- 213 (2010).

30 Tajima S, Wachi H, Uemura Y and Okamoto K, Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **289**:489 - 492 (1997).

31 Okamoto K, Behavior of cell migration by repeated peptides, in *Elastin: Structure, Function, Pathology*, ed. by Ito H. Fukumachi, Wakayama, Japan, pp. 124- 137 (2008).

32 Takemori K, Yamamoto E, Ito H and Kometani T, Prophylactic effects of elastin peptide derived from the bulbus arteriosus of fish on vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **120**:48-53 (2015).

# Elastin hydrolysate derived from fish enhances proliferation of human skin fibroblasts and elastin synthesis in human skin fibroblasts and improves the skin conditions

Eri Shiratsuchi,\* Misako Nakaba and Michio Yamada

## Abstract

**BACKGROUND:** Recent studies have shown that certain peptides significantly improve skin conditions, such as skin elasticity and the moisture content of the skin of healthy woman. This study aimed to investigate the effects of elastin hydrolysate on human skin. Proliferation and elastin synthesis were evaluated in human skin fibroblasts exposed to elastin hydrolysate and prolyl-glycine (Pro-Gly), which is present in human blood after elastin hydrolysate ingestion. We also performed an ingestion test with elastin hydrolysate in humans and evaluated skin condition.

**RESULTS:** Elastin hydrolysate and Pro-Gly enhanced the proliferation of fibroblasts and elastin synthesis. Maximal proliferation response was observed at 25 ng mL<sup>-1</sup> Pro-Gly. Ingestion of elastin hydrolysate improved skin condition, such as elasticity, number of wrinkles, and blood flow. Elasticity improved by 4% in the elastin hydrolysate group compared with 2% in the placebo group.

**CONCLUSION:** Therefore, elastin hydrolysate activates human skin fibroblasts and has beneficial effects on skin conditions.

© 2015 Society of Chemical Industry

**Keywords:** elastin; elastin hydrolysate; fibroblasts; skin

## INTRODUCTION

Elastic fibres are important components of extracellular matrix and comprise two major components: microfibrils and elastin. Microfibrils are rich in acidic glycoproteins and are organised into 8–16 nm fibrils of beaded appearance.<sup>1</sup> Elastin is the core protein (>90%) of elastic fibres, which gives elasticity to tissues, such as skin, aorta, ligaments, and lungs.<sup>1,2</sup> Conversely, collagen, which is an important component of extracellular matrix as well as elastic fibres, provides tensile strength to tissues.<sup>3,4</sup>

Elastin and collagen both play important roles in maintaining the shape and function of various organs. These two proteins often co-exist, and it has been suggested that the ratio between them influences the mechanical properties of cells and tissues.<sup>4–12</sup>

Elastin content of the skin has been reported to be 2–4% on a fat-free dry weight of the skin, collagen being over 70%.<sup>13,14</sup> A small amount of elastin in the dermis allows for elasticity and flexibility of skin. However, as a result of ageing, elastic fibres break down and eventually disappear.<sup>15</sup> These changes in elastin induce wrinkles and sagging of skin.

Interestingly, due to its unique physical and biochemical characteristics, elastin has been used in cosmetics and biomaterials. For example, in cosmetics, soluble elastin has improved tension and elasticity of the skin by imparting visco-elastic properties and compensating for the loss of (and ageing of) the skin's own elastin.<sup>16</sup> Elastin also plays an important role in the growing field of biomaterials, where many applied studies have been conducted to

construct artificial skin, blood vessels, and ligaments.<sup>17–20</sup> In contrast, collagen has been used in cosmetics and biomaterials much longer than elastin and has been subjected to human ingestion trials. Ingestion of collagen hydrolysate increased moisture content of the skin in healthy women<sup>21</sup> and moderated knee joint pain in osteoarthritis patients.<sup>22</sup> Food-derived collagen peptides, such as prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), which was detected in human peripheral blood following ingestion,<sup>23</sup> enhanced fibroblast growth and the synthesis of the extracellular matrix, both of which were suggested as beneficial for the skin.

Interestingly, there seems to be a similar association between elastin and the prolyl-glycine (Pro-Gly) dipeptide. Pro-Gly was detected in peripheral blood of human following oral ingestion of elastin hydrolysate derived from fish (skipjack).<sup>24</sup> Additionally, elastin synthesis by the human skin fibroblasts *in vitro* was significantly enhanced from 0.1 to 10 µg mL<sup>-1</sup> Pro-Gly after a 72-h incubation period.<sup>24</sup> While clinical trials with humans have not yet been conducted, this result suggests that oral ingestion of

\* Correspondence to: Eri Shiratsuchi, Hayasikane Sangyo Co. Ltd, 2-4-8 Yamato-machi, Shimonoseki, Yamaguchi, 750-8608, Japan, E-mail: esirat-suti@hayashikane.co.jp

Hayasikane Sangyo Co. Ltd, 2-4-8 Yamato-machi, Shimonoseki, Yamaguchi, 750-8608, Japan

elastin hydrolysate may have the potential to improve human skin conditions.

The purpose of this study was to test the effect of elastin hydrolysate ingestion on the human skin. We prepared elastin hydrolysate from skipjack tuna and examined its effects on fibroblast proliferation and synthesis of elastin in human skin fibroblasts. We also performed an oral ingestion test to evaluate effects on human skin conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Effects of elastin hydrolysate and Pro-Gly on dermal fibroblast cells

#### Elastin hydrolysate

Elastin hydrolysate (1 kDa, average molecular weight) was prepared from the bulbus arteriosus of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* (Perciformes, Scombridae, *K. pelamis*), according to the method of Nakaba *et al.*<sup>25</sup> Skipjack tuna live in the Indian Ocean and Pacific Ocean around Thailand. The bulbus arteriosus is an organ peculiar to fishes with large number of elastic fibres, and a sponge-like structure that is related to the blood flow velocity. The amino acid composition of elastin hydrolysate (Table 1) was in fair agreement with previous reports for fish elastin.<sup>25,26</sup> This elastin hydrolysate can be commercially obtained as Katsuwo Elastin (Hayashikane Sangyo Co., Ltd., Shimonoseki, Yamaguchi, Japan).

#### Chemicals

Pro-Gly was obtained from Kokusan Kagaku (Tokyo, Japan). Primary cultured normal human dermal fibroblasts (NHDFs) were obtained from Takara Bio Inc. (Shiga, Japan). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), and the antibody against human tropoelastin was obtained from Cosmo Bio (Tokyo, Japan). A TMB microwell peroxidase substrate system and goat-anti-rabbit IgG polyclonal antibody-horseradish peroxidase conjugate were purchased from KPL (Gaithersburg, MD, USA). Solubilised elastin prepared from bovine neck ligament was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was purchased from Dojin Glocal (Kumamoto, Japan). All other reagents were of analytical grade or higher.

#### Cell proliferation

NHDF cells (three to six passages) suspended in DMEM containing 10% FBS were aliquoted to 96-well plastic plates (3500 cells cm<sup>-2</sup>) and incubated in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. Then, culture media was replaced with 0.5% FBS/DMEM to bring cells to a quiescent state. After 24 h, cells were treated with 0, 5, 50, 500 and 5000 ng mL<sup>-1</sup> elastin hydrolysate and 0, 5, 25, 50, 500 and 5000 ng mL<sup>-1</sup> Pro-Gly. Four days later, cell proliferation was assessed by measuring absorbance at 490 nm using CCK-8.

#### Elastin synthesis in normal human dermal fibroblasts cells

Elastin synthesis was determined 4 days after exposure to elastin hydrolysate and Pro-Gly. Tropoelastin, a precursor protein of mature elastin found in elastic fibres, was measured to estimate elastin synthesis. Tropoelastin concentration in the medium was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the method of Prosser *et al.*<sup>27</sup> The calibration curve was generated using bovine neck ligament soluble elastin. Results were calculated as the quantity of elastin synthesised per cell.

**Table 1.** Amino acid composition (residues/1000 residues) of elastin hydrolysate derived from skipjack tuna

Amino acid	Elastin hydrolysate
Asp	21
Thr	68
Ser	25
Glu	37
Gly	440
Ala	85
Val	72
Cys	1
Met	4
Ile	12
Leu	37
Tyr	30
Phe	21
Hyl	0
His	3
Lys	8
Ide	0.3
Des	0.2
Arg	25
Hyp	7
Pro	102

**Table 2.** Composition (mg day<sup>-1</sup>) of ingredients in both samples

Component	Elastin group	Placebo group
Elastin hydrolysate	75	–
Microcrystalline cellulose	87	21
Lactose	132	270
Sucrose esters	6	9

### Effects of elastin hydrolysate ingestion on skin conditions

#### Study design

Twenty healthy Japanese women in their 30s who were concerned about wrinkles around the eye area, skin dryness, and feeling of cold were enrolled in this trial. Additionally, these 20 women had low values of skin elasticity and skin blood flow in the right cheek. Skin elasticity was measured by a cutometer (MPA 580®; Integral Corp., Tokyo, Japan) and skin blood flow was measured by a laser Doppler Perfusion Imager (PeriScan PIM II; PERIMED Ltd, Stockholm, Sweden). Subjects were informed about the aim and potential benefits of the study and examination details, and informed consent was obtained prior to enrollment. All personal information was kept confidential. This trial and its design were approved by the ethics committee of SOUKEN Co., Ltd (contract clinical trial organisation). The study adhered to the principles of the Declaration of Helsinki.

We performed a double-blind, placebo-controlled test to investigate the effects of elastin hydrolysate ingestion on skin conditions. The composition of daily supplements is shown in Table 2. A dose of elastin hydrolysate (75 mg) was considered safe. This dose was based on a previous study where a dose of approximately 400 mg elastin hydrolysate day<sup>-1</sup> administered for 13 months<sup>28</sup> did not result in clinically important problems. Subjects were divided into an elastin hydrolysate group ( $n = 10$ ; mean age = 35.7 ± 3.2)

**Table 3.** Parameters used to evaluate skin condition

Parameter	Item of evaluation
Elasticity	Sagging of cheek Skin elasticity and tension Flexibility of skin
Dryness	Dry eye area and mouth area Dry whole face
Quality	Fine wrinkles Dull skin Clear skin Long lasting make-up Smoothing make-up

or placebo group ( $n = 10$ ; mean age =  $35.6 \pm 3.0$ ). The trial was carried out for 4 weeks. Subjects were instructed to visit a laboratory on the first day and 4 weeks after the start of the trial. Subjects were advised to take samples at bedtime, to avoid changing their eating and exercise habits, and to avoid excess sunlight.

*Evaluation of skin condition*

Before evaluation of skin condition, the subjects washed their faces in the normal way and remained in an air-conditioned room (temperature  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; and humidity  $50 \pm 10\%$  humidity) for 30 min.

Skin elasticity was evaluated using a cutometer (MPA 580®; Integral Corp.), which collects measurements based on suction/elongation. Negative pressure is created in the device, drawing the skin into the aperture of the probe. The detailed principle is described in the literature by Sin *et al.*<sup>29</sup> Measurements were taken from the cheek, in the 4-cm region from the basal point of the earlobe in alignment with the lips. Skin elasticity was calculated as the ratio of the skin released (after negative pressure was disconnected) to maximum height of skin (when skin was drawn into the probe).

Wrinkles in the eye area were observed using a skin replica. A wrinkle is defined as a crevice that extends into the dermal and subcutaneous layers. Volume, maximum depth, maximum width, and number of wrinkles were measured by an image analysis system ASA-03RXD (Asahibiomed Co., Ltd, Tokyo, Japan).

Skin blood flow in the right cheek was measured by a laser Doppler perfusion imager (PeriScan PIM II; PERIMED Ltd.). When the skin surface is illuminated by the laser, the beam scatters when it collides with blood cells. Blood cell speed was calculated by the rate of change of laser light frequency induced by Doppler effects, and the amount of variation of laser light was converted to the number of blood cells. Blood flow volume was calculated by multiplying blood cell speed by the number of blood cells.

Subjective evaluation of skin condition was performed by observing elasticity, dryness, and quality of skin (Table 3). Scoring was based on a five-point scale, with a value of 5 representing the best condition possible.

**Statistical evaluation**

For cell culture data, statistical significance was determined using Dunnett’s test. Statistical significance of instrumental data from the human trial was determined using paired *t*-tests within groups and Student’s *t*-tests between groups. Additionally, subjective skin condition scoring was analysed by the unpaired *t*-test or Wilcoxon signed-rank test. Results were deemed significant ( $P < 0.05$ ) or highly-significant ( $P < 0.01$ ).

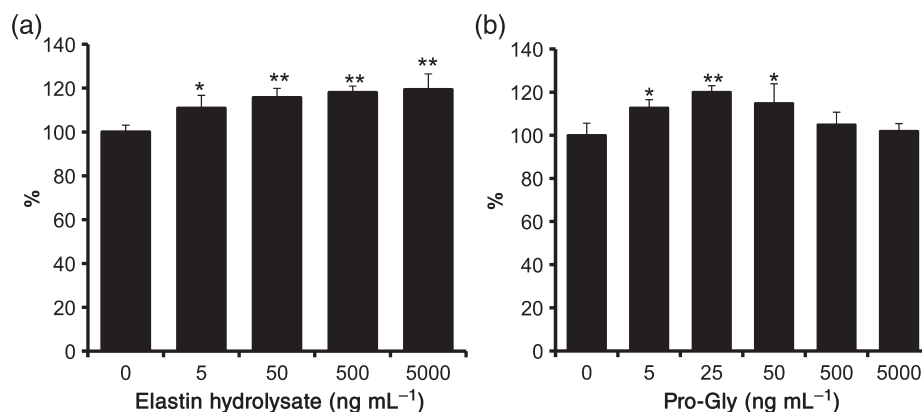
**RESULTS**

**Cell proliferation**

Effects of skipjack elastin hydrolysate and Pro-Gly on NHDF proliferation are shown in Fig. 1. Elastin hydrolysate significantly enhanced fibroblast proliferation from 1.10- to 1.19-fold after 96 h at concentrations of 5–5000  $\text{ng mL}^{-1}$ . Pro-Gly also significantly enhanced fibroblast proliferation from 1.12- to 1.20-fold after 96 h at 5–50  $\text{ng mL}^{-1}$ . Maximal response to Pro-Gly was observed at 25  $\text{ng mL}^{-1}$ , and fibroblast proliferation was not enhanced at concentrations of 500–5000  $\text{ng mL}^{-1}$ .

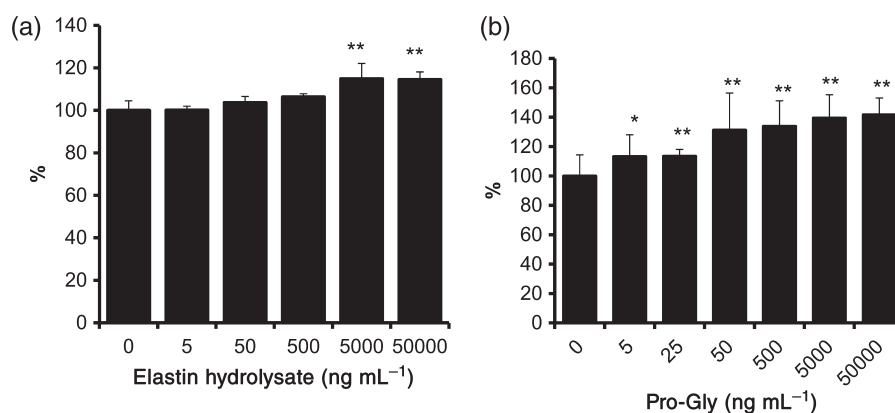
**Elastin synthesis in normal human dermal fibroblasts cells**

Effects of skipjack elastin hydrolysate and Pro-Gly on elastin synthesis in NHDF cells are shown in Fig. 2. Elastin synthesis was significantly enhanced 1.14-fold by addition of 5000–50 000  $\text{ng mL}^{-1}$  elastin hydrolysate and enhanced 1.13- to 1.39-fold by addition of 5–50 000  $\text{ng mL}^{-1}$  Pro-Gly after 96 h.

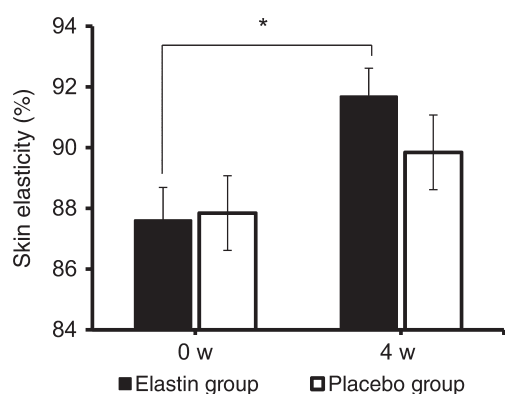


**Figure 1.** Effects of elastin hydrolysate and Pro-Gly on NHDF cell proliferation. Quiescent cultures in 0.5% FBS/DMEM were treated for 4 days with elastin hydrolysate (a) and Pro-Gly (b) at the concentrations indicated. Proliferation levels were normalised against control (0  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Data are means  $\pm$  SD; elastin hydrolysate,  $n = 6$ ; Pro-Gly,  $n = 5$ . Asterisks indicate significant difference from control (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).





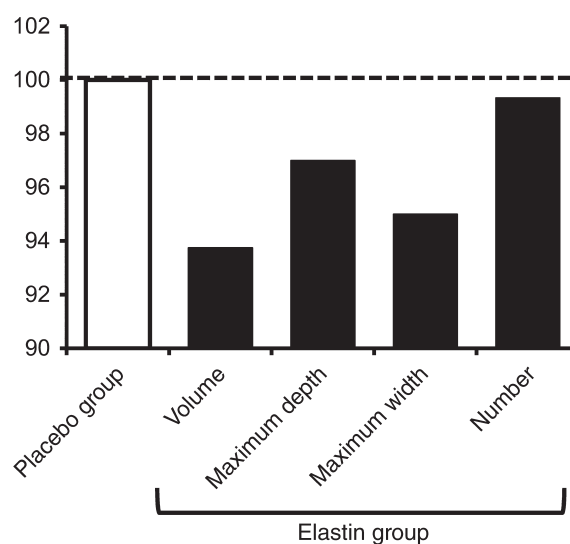
**Figure 2.** Effects of elastin hydrolysate and Pro-Gly on elastin synthesis in NHDF cells. Cells were treated for 4 days after addition of elastin hydrolysate (a) and Pro-Gly (b) at concentrations indicated. Tropoelastin levels in media were determined by ELISA and normalised against controls (0 ng mL<sup>-1</sup>). Data are means  $\pm$  SD; elastin hydrolysate,  $n = 4$ ; Pro-Gly,  $n = 5$ . Asterisks indicate significant difference from control (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).



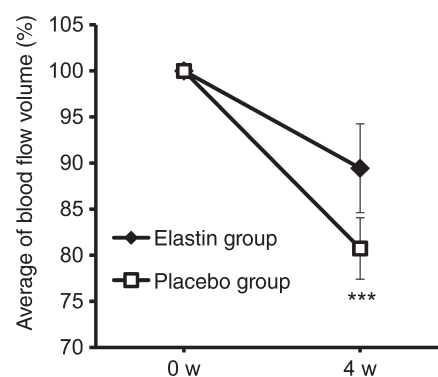
**Figure 3.** Improvement of skin elasticity by elastin hydrolysate versus placebo. Paired  $t$ -test (0 vs. 4 weeks); \* $P < 0.05$ . Data are means  $\pm$  SE.

### Effects of elastin hydrolysate ingestion on skin condition

Skin elasticity significantly improved in the elastin hydrolysate group 4 weeks after the start of the trial (Fig. 3). Elasticity values were 4% higher in the elastin group compared with 2% change in the placebo group. There were no significant differences between the two groups at either time point. As shown in Fig. 4, wrinkles in the eye area tended to improve during the trial. The volume, maximum depth, maximum width, and number were reduced compared with placebo group. However, there were no significant differences between the two groups. Results for cheek skin blood flow are shown in Fig. 5. In the placebo group, blood flow significantly decreased 4 weeks after the start of trial. A decrease in blood flow was observed in both groups, possibly because the trial was conducted during the winter season. However, no significant decrease in blood flow was observed in the elastin group. We also performed a subjective assessment of skin condition, evaluating elasticity, dryness, and quality. Total scores after 4 weeks were normalised against the score at the start of the trial. Compared with the placebo group 4 weeks, after the start of trial, the elastin group showed improvements in the following areas: drying of the eye and mouth areas, badness of smoothing make-up, and long-lasting make-up (Fig. 6). Compared with conditions at the start of trial, most parameters, except for flexibility of the skin, showed significant improvement after ingestion of elastin hydrolysate, particularly badness of smoothing make-up and long-lasting make-up (Fig. 6).



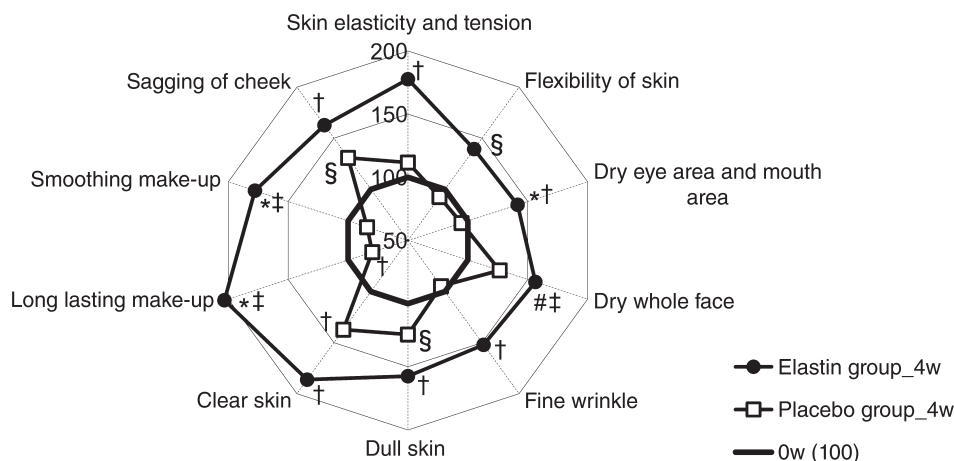
**Figure 4.** Improvement of wrinkles by elastin hydrolysate versus placebo.



**Figure 5.** Comparison of cheek blood flow volumes 4 weeks after trial. Paired  $t$ -test (0 vs. 4 weeks); \*\*\* $P < 0.001$ . Data are presented as means  $\pm$  SE.

## DISCUSSION

In this study, we investigated effects of elastin hydrolysate and Pro-Gly on human skin fibroblasts and skin condition. In a previous study, 0, 100, 1000 and 10 000 ng mL<sup>-1</sup> of Pro-Gly did not affect proliferation of NHDF cells.<sup>24</sup> Based on these results, we examined



**Figure 6.** Improvements in skin condition by elastin hydrolysate. Unpaired t-test (elastin group vs. placebo group); # $P < 0.1$ , \* $P < 0.05$ . Wilcoxon signed-rank test (0 vs. 4 weeks); § $P < 0.1$ , † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$ .

lower concentrations of Pro-Gly. Maximal response to Pro-Gly was 25 ng mL<sup>-1</sup>, but 500–5000 ng mL<sup>-1</sup> Pro-Gly did not increase proliferation. It is possible that Pro-Gly concentrations >100 ng mL<sup>-1</sup> may decrease the proliferation of fibroblasts.

On the other hand, elastin hydrolysate significantly enhanced proliferation of fibroblasts at concentrations of 5–5000 ng mL<sup>-1</sup>. Because the effective peptide sequences of skipjack-elastin hydrolysate are partial, it is considered that high concentrations induced cell proliferation.

Cell proliferation patterns observed for elastin hydrolysate were supported by other study. Tajima *et al.*<sup>30</sup> reported that protein kinase C was involved in fibroblast proliferation in response to elastin-derived polyhexapeptide (VGVAPG)<sub>n</sub>. As this evidence suggests, skipjack-elastin hydrolysate may enhance fibroblast proliferation via protein kinase C activation. In another study, Okamoto<sup>31</sup> reported that protein kinase C was involved in chick smooth muscle cell migration in response to elastin-derived Val-Pro-Gly monomer. This evidence may help explain fibroblast proliferation by Pro-Gly. However, underlying mechanism for enhancement of fibroblast proliferation by Pro-Gly remains to be solved because cell type and structure of peptide are different from the peptide in literature study. We want to clarify these mechanisms by *in vitro* assays. Elastin synthesis was enhanced depending on concentrations of elastin hydrolysate and Pro-Gly. These results are in agreement with the literature.<sup>24</sup>

Our double-blind, placebo-controlled study has demonstrated that skin elasticity, wrinkles, blood flow, and subjective evaluation of skin conditions were improved by elastin hydrolysate ingestion. For details, compared with the start of trial, skin elasticity and most parameters of subjective evaluation of skin conditions, except for flexibility of the skin, significantly improved after ingestion of elastin hydrolysate. In the placebo group, blood flow significantly decreased 4 weeks after the start of trial. Compared with the placebo group, the elastin group showed significant improvements in subjective evaluation of skin conditions in the following areas: drying of the eye and mouth areas, badness of smoothing make-up, and long-lasting make-up.

As mentioned previously, there is a small amount of elastin in the skin. However, elastin plays a significant role in providing elasticity and lifting the skin. The elastin content in the skin decreases with ageing and through exposure to ultraviolet rays, which may

induce wrinkles and sagging. In this human trial, subjects were concerned about wrinkles around the eye area and sagging of the skin. Their elastin content in the skin may decrease or break down. Therefore, the biosynthesis of elastin in their damaged skin is very important. Based on these parameters, concentration of Pro-Gly in human blood is an important factor. We estimated that Pro-Gly was detected at approximately 0.14 μmol L<sup>-1</sup> (24 ng mL<sup>-1</sup>) after ingestion of 75 mg of elastin hydrolysate, based on a previous study where Pro-Gly was detected at approximately 18 μmol L<sup>-1</sup> 30 min after ingestion of 10 g of elastin hydrolysate.<sup>24</sup> Pro-Gly at 0.14 μmol L<sup>-1</sup> would have effects on cell proliferation and elastin synthesis according to results from the present study. Regarding this estimation, there is a possibility that Pro-Gly shifted into the blood and improved skin condition by interacting with fibroblasts. In order to prove that the biosynthesis of elastin is really induced in the damaged skin, it is necessary to perform an animal study.

Furthermore, Pro-Gly in the blood may also have improved the condition of capillaries in the skin. This idea is supported by Take-mori *et al.*,<sup>32</sup> who reported that the extent of endothelial damage in an animal model of hypertension (i.e. SHR/Izm) was reduced by oral administration of elastin hydrolysate and intravenous administration of Pro-Gly.

## CONCLUSIONS

The results of this study suggest that elastin hydrolysate has beneficial effects on the human skin. However, further study is required to elucidate the mechanisms behind these improvements. Determining the concentration of Pro-Gly that results after ingestion of 75 mg elastin hydrolysate is important. Future investigations may also focus on peptides associated with fish elastin, other than Pro-Gly. We hope that elastin hydrolysate will be beneficial to human populations as a beauty supplement and/or health food material in the near future.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank SOUKEN Co., Ltd (Tokyo, Japan) for conducting the human trial and Urabe-Taikandoseiyaku Co., Ltd. (Fukuoka, Japan) for manufacturing elastin supplements used in this study.

## REFERENCES

- Vrhovski B and Weiss AS, Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**:1–18 (1998).
- Mithieux SM and Weiss AS, Elastin. *Adv Protein Chem* **70**:437–461 (2005).
- Kwansa AL, De Vita R and Freeman JW, Mechanical recruitment of N- and C-crosslinks in collagen type I. *Matrix Biol* **34**:161–169 (2014).
- Parkinson J, Brass A, Canova G and Brechet Y, The mechanical properties of simulated collagen fibrils. *J Biomech* **30**:549–554 (1997).
- Roach MR and Burton AC, The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol* **35**:681–690 (1957).
- Hajdu MA, Heistad DD, Siems JE and Baumbach GL, Effects of aging on mechanics and composition of cerebral arterioles in rats. *Circ Res* **66**:1747–1754 (1990).
- Oxlund H and Andreassen TT, The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissues. *J Anat* **131**:611–620 (1980).
- Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C and Savage K, Elastic proteins: Biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* **357**:121–132 (2002).
- Teti A, Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* **2**:S83–S87 (1992).
- Agrez MV, Bates RC, Boyd AW and Burns GF, Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: Implications for wound healing. *Cell Regul* **2**:1035–1044 (1991).
- Hinek A, Wrenn DD, Mecham RP and Baronides SH, The elastin receptor: A galactoside-binding protein. *Science* **239**:1539–1541 (1988).
- Mecham RP, Whitehouse L, Hay M, Hinek A and Sheetz MP, Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J Cell Biol* **113**:187–194 (1991).
- Varadi DP and Hall DA, Cutaneous elastin in Ehlers–Danlos syndrome. *Nature* **208**:1224–1225 (1965).
- Uitto J, Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol* **72**:1–10 (1979).
- Tsuji T and Hamada T, Age-related changes in human dermal elastic fibers. *Br J Dermatol* **105**:57–63 (1981).
- Yasuda T, Elastin in cosmetics. *Pract Dermatol* **9**:1164–1166 (1987).
- Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC and van Kuppevelt TH, Elastin as a biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials* **28**:4378–4398 (2007).
- Haslik W, Kamolz LP, Manna F, Hladik M, Rath T and Frey M, Management of full-thickness skin defects in the hand and wrist region: First long-term experiences with the dermal matrix Matriderm. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **63**:360–364 (2010).
- Caves JM, Kumar VA, Martinez AW, Kim J, Ripberger CM, Haller CA, *et al.*, The use of microfiber composites of elastin-like protein matrix reinforced with synthetic collagen in the design of vascular grafts. *Biomaterials* **31**:7175–7182 (2010).
- Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, Hasegawa M, Miyamoto K and Horiuchi T, The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. *J Artif Organs* **17**:50–59 (2014).
- Matsumoto H, Ohara H, Itoh K, Nakamura Y and Takahashi S, Clinical effect of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Lett* **7**:386–390 (2006).
- Schauss AG, Stenehjem J, Park J, Endres JR and Clewell A, Effect of the novel low molecular weight hydrolyzed chicken sternal cartilage extract, BioCell Collagen, on improving osteoarthritis-related symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem* **60**:4096–4101 (2012).
- Shigemura Y, Iwai K, Morimatsu F, Iwamoto T, Oda C, Taira T *et al.*, Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *J Agric Food Chem* **57**:444–449 (2009).
- Shigemura Y, Nakaba M, Shiratsuchi E, Suyama M, Yamada M, Kiyono T *et al.*, Identification of food-derived elastin peptide, prolyl-glycine (Pro-Gly), in human blood after ingestion of elastin hydrolysate. *J Agric Food Chem* **60**:5128–5133 (2012).
- Nakaba M, Ogawa K, Seiki M and Kunimoto M, Properties of soluble elastin peptide from bulbus arteriosus in fish species. *Fisheries Sci* **72**:1322–1324 (2006).
- Sage H and Gray WR, Studies on the evolution of elastin-I. *Phylogenic distribution. Comp Biochem Physiol* **64**:313–327 (1979).
- Prosser IW, Whitehouse LA, Parks WC, Stahle-Backdahl M, Hinek A, Park PW, *et al.*, Polyclonal antibodies to tropoelastin and the specific detection and measurement of tropoelastin *in vitro*. *Connect Tissue Res* **25**:265–279 (1991).
- Shiratsuchi E, Investigation of the safety of elastin peptide from skipjack (*Katsuwonus pelamis*) bulbus arteriosus by the long-term ingestion. *Pharmacometrics* **83**:23–26 (2012).
- Sin P, Stupka I and Brychta P, Evaluation and comparison of composite and split-thickness skin grafts using cutometer MPA 580. *Ann Burns Fire Disast* **23**:208–213 (2010).
- Tajima S, Wachi H, Uemura Y and Okamoto K, Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **289**:489–492 (1997).
- Okamoto K, Behavior of cell migration by repeated peptides, in *Elastin: Structure, Function, Pathology*, ed. by Ito H, Fukumachi, Wakayama, Japan, pp. 124–137 (2008).
- Takemori K, Yamamoto E, Ito H and Kometani T, Prophylactic effects of elastin peptide derived from the bulbus arteriosus of fish on vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **120**:48–53 (2015).