

mgr inż. Kinga Anna Kazimierska - Gęca

**Ocena wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry  
dojrzałej oraz trądzikowej**

**Assessment of the effects of sheep colostrum on specific parameters of mature and  
acne-prone skin**

**Rozprawa na stopień doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

**Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych**

Promotor: dr hab. n. farm. Urszula Kalinowska-Lis, prof. uczelni,  
Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, Wydział Farmaceutyczny,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Promotor (pomocniczy): dr n. med. Anna Erkiert-Polguj,  
Zakład Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej,  
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

Akceptuję: 17.09.2024 Urszula Kalinowska-Lis  
(data i podpis promotora)

17.09.2024 Anna Erkiert-Polguj  
(data i podpis promotora/promotora pomocniczego)

## *Podziękowania*

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania Pani Profesor dr hab. n. farm. Urszuli Kalinowskiej - Lis za uwierzenie w mój pomysł, nieocenioną pomoc, motywację oraz wsparcie, które były niezbędne na każdym etapie mojej pracy badawczej. Pani Profesor, dziękuję za cierpliwość, zaangażowanie oraz cenne wskazówki, które pomogły mi rozwijać badania i uwierzyć, że mi się uda.*

*Podziękowania kieruję także do Pani dr n. med. Anny Erkiert-Polguj za wsparcie, cenne rady oraz nieocenioną pomoc w realizacji badań. Pani Doktor, dziękuję za profesjonalizm, życzliwość i otwartość, które motywowały mnie do dalszej pracy.*

*Wyrazy wdzięczności składam również Pani Profesor dr hab. n. farm. Elżbiecie Budzisz za wiarę w mój pomysł, przyjęcie mnie do swojego zespołu oraz pomoc, którą okazała zarówno mnie, jak i moim badaniom. Dziękuję również za możliwość realizacji badań oraz publikację ich wyników, stanowiących istotny element tej pracy.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim Pracownikom i Koleżankom z Katedry Kosmetologii za życzliwe przyjęcie, pomoc i wsparcie, jakie okazywały mi przez cały czas mojej pracy. Wasza pomoc była nieoceniona i niezmiernie ważna w realizacji mojego projektu.*

*Pracę tę dedykuję mojej rodzinie, bez której wsparcia nie osiągnęłabym tego sukcesu. Serdecznie dziękuję moim rodzicom za niezachwianą wiarę w moje możliwości i we mnie samą, co dawało mi siłę w trudnych momentach. Wyrazy wdzięczności kieruję również do mojego męża za nieustające wsparcie i cierpliwość okazywane podczas pracy nad tą rozprawą doktorską. Dziękuję mojej siostrze Julii za wspólne radości z moich sukcesów oraz za towarzyszenie mi w chwilach niepewności i wyzwań. Szczególne podziękowania składam mojemu wujkowi Piotrkowi, który zawsze był dla mnie wsparciem i niezawodnym bratem.*

*Dziękuję Wam z całego serca.*

## Spis treści

<b>Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej</b> .....	<b>4</b>
<b>Wykaz skrótów</b> .....	<b>5</b>
<b>Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej</b> .....	<b>7</b>
<b>Cele naukowe pracy</b> .....	<b>12</b>
<b>Część doświadczalna</b> .....	<b>14</b>
1. Metodyka badań .....	14
1.1 Próbkę siary .....	14
1.2 Receptura preparatu kosmetycznego z colostrum owczym .....	14
1.3 Analiza białek, tłuszczów i kwasów tłuszczowych w colostrum owczym .....	15
1.4 Badanie aktywności przeciwutleniającej colostrum metodami ABTS i DPPH .....	16
1.5 Ocena potencjalnych właściwości wybielających colostrum owczego przez analizę hamowania aktywności tyrozynazy.....	17
1.6 Badanie in vitro wpływu colostrum owczego na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N) i keratynocytów naskórka noworodków.....	18
1.7 Analiza wpływu colostrum na proliferację ludzkich komórek fibroblastów cukrzycowych (dHF) wyizolowanych z próbek tkanek pobranych od 4 pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej.....	18
1.8 Test rysy (scar test) wobec komórek dHF stymulowanych colostrum owczym.....	19
1.9 Wpływ colostrum na ekspresję genów związanych z proliferacją i odpowiedzią immunologiczną w komórkach dHF czterech pacjentów .....	20
1.10 8-tygodniowe randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą, kontrolowane placebo, przeprowadzone na grupie 52 ochotników .....	20
1.11 8-tygodniowe badanie na grupie 30 ochotników preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową .....	21
<b>Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja</b> .....	<b>23</b>
2. Badania składu i właściwości biologicznych colostrum owczego .....	23
2.1 Analiza zawartości białek, tłuszczów i kwasów tłuszczowych w colostrum owczym .....	23
2.2 Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej colostrum metodami ABTS i DPPH .....	26
2.3 Badanie wpływu colostrum na hamowanie aktywności tyrozynazy.....	28

2.4	Badanie in vitro wpływu colostrum na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N), keratynocytów naskórka noworodków i ludzkich fibroblastów (dHF) wyizolowanych z próbek tkanek pobranych od 4 pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej .....	28
2.5	Test rysy (scar test) wobec komórek dHF stymulowanych colostrum .....	31
2.6	Wpływ colostrum na ekspresję genów związanych z proliferacją i odpowiedzią immunologiczną w komórkach dHF .....	33
3.	Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę dojrzałą.....	34
4.	Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową.....	40
	<b>Wnioski .....</b>	<b>46</b>
	<b>Streszczenie .....</b>	<b>47</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>49</b>
	<b>Piśmiennictwo .....</b>	<b>51</b>
	<b>Wykaz tabel.....</b>	<b>67</b>
	<b>Wykaz wykresów i rycin.....</b>	<b>68</b>
	<b>Załączniki.....</b>	<b>69</b>
	<b>Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej [P1-P4].....</b>	<b>85</b>
	Publikacja 1: Kazimierska K, and Urszula Kalinowska-Lis. <i>Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology</i> . <i>Molecules</i> . 2021; 26, no. 11: 3253 .....	85
	Publikacja 2: Kazimierska K, Szabłowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośła K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. <i>Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care</i> . <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . 2024; 25(15):8091.....	108
	Publikacja 3: Kazimierska K, Erkiert-Polguj A, Kalinowska-Lis U. <i>The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study</i> . <i>Applied Sciences</i> . 2024; 14(7):2862 .....	130
	Publikacja 4: Erkiert-Polguj A, Kazimierska K, Kalinowska-Lis U. <i>Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin</i> . <i>Applied Sciences</i> . 2024; 14(5):2199.....	144
	<b>Oświadczenie kandydata ubiegającego się o nadanie stopnia doktora .....</b>	<b>154</b>
	<b>Oświadczenia współautorów .....</b>	<b>155</b>
	<b>Całkowity dorobek naukowy.....</b>	<b>162</b>

## Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Poniżej zamieszczono zestawienie publikacji naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej mgr inż. Kingi Kazimierskiej-Gęca zatytułowanej: „Ocena wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry dojrzałej oraz trądzikowej”.

Dla publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu zgodny z rokiem publikacji jest równy **14,827**, zaś punktacja MNiSW wynosi **480** punktów MNiSW.

- **Publikacja 1 [P1]:**

**Kazimierska K**, and Kalinowska-Lis U. 2021. "Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology" *Molecules* 26, no. 11: 3253.

<https://doi.org/10.3390/molecules26113253>.

IF: 4,927; MNiSW: 140.

- **Publikacja 2 [P2]:**

**Kazimierska K**, Szabłowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośła K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care.

*International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8091.

<https://doi.org/10.3390/ijms25158091>.

IF: 4,9; MNiSW: 140.

- **Publikacja 3 [P3]:**

**Kazimierska K**, Erkiert-Polguj A, Kalinowska-Lis U. The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Applied Sciences*. 2024; 14(7):2862.

<https://doi.org/10.3390/app14072862>.

IF: 2,7; MNiSW: 100.

- **Publikacja 4 [P4]:**

Erkiert-Polguj A, **Kazimierska K**, Kalinowska-Lis U. Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin. *Applied Sciences*. 2024; 14(5):2199.

<https://doi.org/10.3390/app14052199>.

IF: 2,7; MNiSW: 100.

## Wykaz skrótów

1BR.3.N	Linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej
$\beta$ -LG	$\beta$ -Laktoglobulina
ABTS	Kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonowy)
dHF	Komórki fibroblastów cukrzycowych (ang. Diabetic human fibroblasts)
DMEM	Pożywka do hodowli komórek eukariotycznych, zmodyfikowana o wysoką zawartość glukozy (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetylosulfotlenek
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
ECACC	Europejska Kolekcja Kultur Komórkowych (ang. European Collection of Authenticated Cell Cultures)
EGF	Naskórkowy czynnik wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor)
FGF	Czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor)
FSB	Płodowa surowica bydlęca (ang. Fetal Bovine Serum)
GHP	Dobra praktyka higieniczna (ang. Good Hygiene Practice)
GMP	Dobra praktyka produkcyjna (ang. Good Manufacturing Practice)
IGF	Insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. Insulin-like Growth Factor)
IGF-I	Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. Insulin-like Growth Factor 1)
IGF-II	Insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (ang. Insulin-like Growth Factor 2)
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ang. International Organization for Standardization)
KGL3A	Szczep bakterii <i>Lactobacillus plantarum</i> (probiotycznych lub fermentacyjnych)
Ki67	Antygen Ki-67 (marker proliferacji komórek)
L-DOPA	Lewo-dihydroksyfenyloalanina (ang. Levodopa)

LF	Laktoferyna
MTT	3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylotetrazoliowy bromek (ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
PRP	Peptyd bogaty w prolinę (ang. Proline Rich Peptide)
PTGS-2	Prostaglandyna-endoperoksydaza syntaza 2, znany jako cyklooksyzgenaza-2 (COX-2) (ang. Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2)
TEWL	Transepidermalna utrata wody (ang. Transepidermal Water Loss)
TGF- $\alpha$	Transformujący czynnik wzrostu $\alpha$ (ang. Transforming Growth Factor $\alpha$ )
TGF- $\beta$	Transformujący czynnik wzrostu $\beta$ (ang. Transforming Growth Factor $\beta$ )
TGF $\beta_2$	Transformujący czynnik wzrostu $\beta_2$ (ang. Transforming Growth Factor $\beta_2$ )
TSG-6	Białko stymulowane przez czynnik martwicy nowotworów 6 (ang. Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6)

## Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost zainteresowania zdrowym stylem życia, który obejmuje zarówno dietę, jak i pielęgnację ciała. Coraz więcej osób zwraca uwagę na naturalne surowce i produkty, które mogą wspomagać zdrowie i urodę. Według raportu "Global Natural and Organic Personal Care Market" z 2024 roku, rynek kosmetyków naturalnych rośnie w tempie 9,32% rocznie, co odzwierciedla rosnące zainteresowanie konsumentów produktami pochodzenia naturalnego [1]. Dodatkowo, społeczeństwo w Polsce starzeje się, a obecne normy kulturowe wymagają utrzymania młodego i zdrowego wyglądu skóry [2]. W związku z tym wzrasta zapotrzebowanie na skuteczne metody pielęgnacji skóry, które mogą opóźnić procesy starzenia czy poprawiać jej wygląd.

Wraz z wiekiem skóra ulega zmianom, które prowadzą do zmniejszenia jej nawilżenia, elastyczności, grubości oraz gęstości. Zmiany te mogą być spowodowane różnymi czynnikami, w tym predyspozycjami genetycznymi, stylem życia oraz czynnikami środowiskowymi, takimi jak ekspozycja na słońce, zanieczyszczenia i palenie [3]. Terapie przeciwstarzeniowe stawiają wyzwania, ponieważ często okazują się niewystarczająco skuteczne lub zbyt inwazyjne, zwłaszcza w przypadku niektórych procedur medycyny estetycznej [4].

Podczas gdy starzenie się skóry stanowi kluczowy problem dla osób dorosłych, trądzik pospolity (łac. *acne vulgaris*) pozostaje jedną z najczęstszych chorób skóry, dotykając głównie młodzież i młodych dorosłych w wieku od 11 do 30 lat w krajach rozwiniętych [5]. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi, leczenie trądziku opiera się głównie na stosowaniu miejscowych retinoidów, nadtlenku benzoilu oraz antybiotyków. Kwas azelainowy i kwas salicylowy są zalecane szczególnie w łagodniejszych postaciach trądziku. W cięższych przypadkach trądziku rekomenduje się stosowanie doustnych retinoidów lub antybiotyków, w zależności od charakteru i nasilenia choroby [6]. Niemniej jednak, liczne działania niepożądane tych leków (np. podrażnienia, wysuszenie, nadwrażliwość skóry na promieniowanie słoneczne czy zaburzenia funkcji wątroby) oraz narastająca wielolekooporność bakterii skłaniają naukowców do poszukiwania nowych metod terapeutycznych oraz strategii pielęgnacyjnych skóry [6,7]. Pomocne dla osób zmagających się z trądzikiem mogą być preparaty dermatologiczne pochodzenia naturalnego, które dodatkowo wspomagałyby leczenie trądziku.

W obliczu powyższych wyzwań, rozpoczęto badania nad możliwością zastosowania naturalnych składników aktywnych, które mogłyby sprostać wymaganiom terapeutycznym, będąc jednocześnie skutecznymi, mało inwazyjnymi oraz o minimalnym ryzyku działań niepożądanych.



W tym kontekście szczególne zainteresowanie wzbudziły substancje o szerokim spektrum biologicznego działania. Jednym z takich surowców jest colostrum (siara), bogate w składniki odżywcze i biologicznie aktywne, które mogą pozytywnie wpływać na kondycję skóry [8–15] [P1]. Dostępne dane wskazują, że colostrum bovinum (bydlęce), wykazuje działanie przeciwzapalne, regeneracyjne i nawilżające [10,16]. Zastosowanie siary bydlęcej w leczeniu trudno gojących się ran wykazało skuteczność w badaniu preparatu dermatologicznego u pacjentów z owrzodzeniami [16]. Ponadto, kremy zawierające colostrum końskie doprowadziły do całkowitej regeneracji skóry u osób z trądzikiem łojotokowym [13]. A preparaty z mlekiem oślim wykazały właściwości nawilżające oraz działanie przeciwstarzeniowe u ludzi ze skórą dojrzałą [17]. Wyniki badań z wykorzystaniem colostrum pochodzących od różnych zwierząt [13,14] [P1] stanowią uzasadnienie dla podjęcia dalszych badań z wykorzystaniem colostrum w dermatologii i kosmetologii.

Colostrum (siara), jest to wydzielina produkowana przez gruczoły mlekowe w okresie okołoporodowym u ssaków, w tym u ludzi [18–20] [P1]. Siara jest żółta, ma lekko kwaśne pH wynoszące około 6,4 [20]. Ze względu na swoje przeznaczenie, zawiera znacznie większą ilość (niż mleko późniejsze) biologicznie aktywnych substancji, które mają istotnie wzmocnić układ odpornościowy noworodków [20] [P1]. Skład ilościowy siary różni się w zależności od gatunku. Największe różnice dotyczą zawartości białka i tłuszczu poszczególnych zwierząt. Najlepiej przebadanym colostrum pod kątem wykorzystania w medycynie i kosmetologii jest colostrum bovinum (bydlęce) [P1]. Jednak istnieją także badania dotyczące zastosowania colostrum oślego, końskiego, koziego czy wielbłądziego [13,21–23]. Siara owcza wyróżnia się wysoką całkowitą zawartością białka i tłuszczu, która jest prawie półtora razy wyższa niż w mleku i siarze bydlęcej czy koziej (Tabela 1) [P1].

**Tabela 1. Skład colostrum bydlęcego, koziego i owczego (%) [P1].**

Składnik	Colostrum		
	Bydlęce	Kozie	Owcze
Laktoza	3,60	3,39-4,24 <sup>a</sup>	3,30
Minerały	0,90	0,85-0,9 <sup>a</sup>	0,90
Białka	7,10	3,53-5,69 <sup>a</sup>	11,80
Tłuszcze	5,10	3,88-8,21 <sup>a</sup>	13,00

<sup>a</sup> podano wartości minimalne i maksymalne z badań;

Colostrum bydlęce, ale także owcze zawiera liczne białka, tłuszcze, witaminy i minerały, które przynoszą korzyści lecznicze i pielęgnacyjne dla skóry [24–26] **[P1]**. W siarze znajdują się takie białka jak kazeina,  $\beta$ -laktoglobulina, laktoferyna, immunoglobuliny, lizozym, laktoperoksydaza i czynniki wzrostu **[P1]**. Proteiny te wykazują aktywność przeciwzapalną, immunomodulacyjną, przeciwdrobnoustrojową oraz regeneracyjną [27]**[P1]**. Właściwości te mogą wspierać leczenie trądziku oraz pielęgnację skóry dojrzałej, która wymaga intensyfikacji procesów naprawczych i ochrony przed stanami zapalnymi. Wśród białek zawartych w colostrum, laktoferyna i laktoperoksydaza, wykazują udokumentowane działanie przeciwdrobnoustrojowe, obejmujące aktywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwgrzybiczą [28,29]. Laktoferyna, poprzez chelatację żelaza i dezintegrację ścian komórkowych bakterii, hamuje ich rozwój oraz blokuje receptory komórkowe dla wirusów i pasożytów [30,31]. Stymuluje również fagocytozę i redukuje produkcję cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 i TNF- $\alpha$ , łagodząc stany zapalne [32,33]. Laktoperoksydaza (LPO) katalizuje reakcję utleniania tiocyjanianów w obecności nadtlenu wodoru, generując pośrednie produkty o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego [29,34,35].

Właściwości przeciwbakteryjne przypisuje się także innym białkom obecnym w colostrum bydlęcym, jak na przykład peptydy kazeinowe (np. GMP, GHP),  $\beta$ -laktoglobulina czy lizozym [27,36–41]. Peptydy kazeinowe, takie jak kazoplateiny, działają przeciwbakteryjnie wobec *Streptococcus aureus* [37].  $\beta$ -laktoglobulina (Lg) hamuje adhezję patogenów, zapobiegając ich kolonizacji, a jej działanie bakteriobójcze potwierdzono wobec bakterii Gram (+) i Gram (-) [38,39]. Lizozym, enzym hydrolityczny, wykazuje działanie przeciwbakteryjne, szczególnie wobec bakterii Gram(+), a także wspomaga efektywność leków bakteriobójczych i bakteriostatycznych [41]. Immunoglobuliny obecne w colostrum zapobiegają adhezji patogenów, hamują metabolizm bakterii i neutralizują toksyny [42,43].

Czynniki wzrostu, takie jak EGF, IGF-1 i FGF, stymulują proliferację i różnicowanie komórek, co jest niezbędne w procesach regeneracyjnych skóry [44–48]. EGF wspiera podział i migrację keratynocytów, przyspieszając odnowę naskórka, IGF-1 wpływa na regenerację tkanki łącznej poprzez stymulację syntezy kolagenu, a FGF reguluje angiogenezę i proliferację fibroblastów, co jest istotne w procesie odbudowy skóry i gojenia ran [44,45]. W skórze dojrzałej, gdzie zdolności regeneracyjne są osłabione, czynniki wzrostu mogą przyczynić się do przywrócenia prawidłowych funkcji naprawczych [49,50]. Ponadto, zawarte w colostrum polipeptydy bogate w prolinę (PRP) wykazują działanie zarówno regeneracyjne, jak i immunomodulacyjne, co wspiera proces gojenia i odbudowy tkanek skóry [51] **[P1]**. Działanie antyoksydacyjne białek, takich jak  $\beta$ -laktoglobulina i laktoferyna, może chronić skórę przed uszkodzeniami wywołanymi

przez wolne rodniki i przeciwdziałać procesom starzenia skóry [52,53] [P1]. Laktoferyna jako antyoksydant, przez chelatowanie jonów żelaza i miedzi, zapobiega produkcji wolnych rodników [54–57] Ochrona przed stresem oksydacyjnym jest szczególnie istotna dla skóry narażonej na działanie czynników zewnętrznych, jak promieniowanie UV i zanieczyszczenia środowiskowe [58]. Laktoferyna, peptydy kazeinowe (jak GMP), oraz PRP wykazują działanie przeciwzapalne i mogą modulować odpowiedź immunologiczną, co pomaga w ograniczaniu stanów zapalnych [51,59,60][P1]. W przypadku trądziku, stan zapalny jest jednym z głównych czynników prowadzących do rozwoju zmian skórnych, dlatego substancje przeciwzapalne obecne w colostrum mogą być pomocne w jego leczeniu [61].

Tłuszcz zawarty w colostrum składa się głównie z triacyloglicerydów (97–98% całkowitego tłuszczu mleka) pozostałe frakcje to fosfolipidy, wolne kwasy tłuszczowe i sterole [62,63]. Triacyloglicerydy są źródłem energii oraz dostarczają niezbędnych kwasów tłuszczowych, które odgrywają istotną rolę w utrzymaniu bariery lipidowej skóry, zapobiegając utracie wody i chroniąc przed działaniem czynników zewnętrznych [64,65]. Wspierają strukturę i funkcję komórek skóry, poprawiając ich integralność i elastyczność [63,66]. Dokładna analiza profilu kwasów tłuszczowych w colostrum owczym, znajduje się w dalszej części niniejszej rozprawy (rozdział 1.1).

Ponadto, colostrum owcze charakteryzuje się wysoką zawartością witamin rozpuszczalnych zarówno w tłuszczach (A, D, E, K), jak i w wodzie (C, B1, B2, B6, B12, kwas foliowy) [24,67–69]. Witamina A odgrywa kluczową rolę w regulacji produkcji sebum, odnowie komórek, stymulacji syntezy kolagenu i elastyny, ochronie skóry przed promieniowaniem UV, wpływa na degradację melaniny i koloryt skóry oraz ogranicza rozwój *Cutibacterium acnes* [70–75]. Witamina E, ze swoimi właściwościami przeciwutleniającymi, wspomaga syntezę kolagenu, elastyny i glikozaminoglikanów, a także chroni struktury lipidowe warstwy rogowej naskórka i zapobiega rozwojowi rumienia wywołanego promieniowaniem UV [76–82]. Witamina D reguluje proliferację i różnicowanie naskórka, chroni skórę przed fotouszkodzeniami i przyspiesza gojenie ran [83]. Witaminy z grupy B, takie jak witamina B12, wykazują działanie przeciwzapalne i przyspieszają regenerację uszkodzonej skóry, natomiast pirydoksyna (witamina B6) stymuluje produkcję filagryny, kluczowego białka barierowego skóry [84,85]. Witamina C wspiera produkcję kolagenu i hamuje melanogenezę, jednocześnie chroniąc przed fotostarzeniem i promieniowaniem UV [86–90].

Do minerałów zawartych w colostrum należą wapń, miedź, żelazo, cynk, magnez, mangan i fosfor [24,68,69,91]. Miedź wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, stymuluje

dojrzewanie kolagenu oraz moduluje syntezę melaniny [92–95]. Cynk z kolei chroni skórę przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem UV i wspiera procesy naprawcze [19,96–101].

Wspomniane właściwości siary owczej sprawiają, że może być cennym składnikiem aktywnym w kosmetykach i produktach leczniczych. Szczególnie istotne wydają się być jej funkcje regenerujące, antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne. Właściwości siary i jej poszczególnych składników, mogą być wykorzystywane, m.in. w produktach przeznaczonych do pielęgnacji wrażliwej czy problematycznej skóry, w tym trądzikowej, oraz w terapiach przeciwstarzeniowych.

Większość badań koncentruje się na colostrum bydlęcym, które jest szeroko stosowane jako suplement diety wspierający odporność oraz jako składnik aktywny w preparatach kosmetycznych. Colostrum pochodzenia owczego należy do mniej przebadanych surowców mlecznych. Literatura dotycząca colostrum owczego w większości podaje jedynie jego skład. Dlatego też badania wybranych właściwości biologicznych colostrum oraz jego wpływ na parametry skóry dojrzałej i skóry trądzikowej, podjęte w ramach niniejszej rozprawy, stanowią uzupełnienie dotychczasowych badań.

## Cele naukowe pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry dojrzałej oraz skóry trądzikowej.

Cel realizowano w oparciu o przeprowadzenie następujących badań:

1. Opracowanie oryginalnej receptury preparatu kosmetycznego w formie emulsji zawierającego jako komponent aktywny colostrum pochodzące od polskich owiec.
2. Przeprowadzenie niezbędnych badań dla przygotowanego preparatu kosmetycznego:
  - czystości mikrobiologicznej,
  - skuteczności zastosowanego systemu konserwującego,
  - stabilności i kompatybilności z opakowaniem,
  - badań dermatologicznych (test półotwarty na 25 ochotnikach) oceniających potencjał drażniący i alergizujący preparatu.

3. Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę dojrzałą:

8-tygodniowe randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą, kontrolowane placebo, przeprowadzone na grupie 52 ochotników. Badanie polegało na:

- Pomiarze nawilżenia skóry na podstawie zawartości wody w warstwie rogowej,
- Ocenie transepidermalnej utraty wody (TEWL),
- Pomiarze poziomu hemoglobiny (rumień) i melaniny, dwóch głównych barwników odpowiadających za kolor skóry,
- Ocenie ilości sebum na skórze,
- Pomiarze właściwości viscoelastycznych skóry,
- Wykonaniu fotodokumentacji stanu skóry osób badanych przed i po stosowaniu preparatu,
- Subiektywnej ocenie stanu skóry przez osoby badane przed i po zakończeniu stosowania preparatu.

4. Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową:

8-tygodniowe badanie na grupie 30 ochotników. Badanie polegało na:

- Pomiarze ilości sebum na skórze,
- Ocenie nawilżenia skóry,
- Oznaczeniu przeznaskórkowej utraty wody (TEWL),

- Subiektywnej ocenie stanu skóry przez osoby badane pod kątem występowania zaskórników, grudek, krostek, rumienia, a także jej nawilżenia, łojotoku oraz ogólnej kondycji skóry.
5. Ocena właściwości biologicznych colostrum owczego:
- Analiza składu colostrum pod kątem obecności białek, tłuszczów i kwasów tłuszczowych,
  - Zbadanie aktywności przeciwutleniającej colostrum metodami ABTS i DPPH,
  - Ocena potencjalnych właściwości wybielających przez badanie hamowania aktywności tyrozynazy,
  - Badanie *in vitro* wpływu colostrum na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N) i keratynocytów naskórka noworodków,
  - Analiza wpływu colostrum na proliferację ludzkich fibroblastów (dHF) wyizolowanych z próbek tkanek pobranych od 4 pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej,
  - Porównanie wpływu colostrum na ekspresję genów związanych z proliferacją i odpowiedzią immunologiczną w komórkach dHF czterech pacjentów,
  - Wykonanie testu rasy (scar test) wobec komórek dHF stymulowanych colostrum.

## **Część doświadczalna**

### **1. Metodyka badań.**

#### **1.1 Próbki siary [P2, P3, P4]**

W badaniach wykorzystano siarę owcza pochodzącą od owiec rasy Lacaune żyjących w gospodarstwie w centralnej Polsce. Siarę pobierano podczas pierwszych 12 godzin laktacji owiec i natychmiast zamrażano. Przechowywano je przez kilka dni w temperaturze – 22°C, a następnie liofilizowano. Siara nie była pasteryzowana.

#### **1.2 Receptura preparatu kosmetycznego z colostrum owczym [P3, P4].**

Recepturę preparatu kosmetycznego z colostrum owczym opracowano na potrzeby tego badania. Zawartości poszczególnych składników i ich funkcje opisano w Tabeli 2. Preparat z 15% colostrum owczym ma formę emulsji typu O/W.

Krem placebo, niezbędny do przeprowadzenia badania [P3], posiada identyczny skład jak krem z colostrum, z wyłączeniem tego komponentu.

Powyższe preparaty przygotowano zgodnie z wymogami Rozporządzenia (WE) nr 1223/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 30 listopada 2009 r. w sprawie produktów kosmetycznych.

Zakres badań zgodnych z wymogami rozporządzenia obejmował badania czystości mikrobiologicznej, badania skuteczności systemu konserwującego, badania stabilności i zgodności z opakowaniem oraz testy dermatologiczne (test półotwarty).

**Tabela 2. Formulacja kremu z colostrum.**

Nazwa INCI	Funkcja składnika	Stężenie [%]
Aqua	Rozpuszczalnik	Do 100,00
Acrylates/C10-30 alkyl Acrylate Crosspolymer	Zagęstnik	0,2
Pentylene Glycol	Humektant, booster konserwacji	3,0
Isononyl Isononanoate	Emolient	7
Cetearyl Oliviate, Sorbitan Oliviate	Emulgator	4,5
Glyceryl Stearate Citrate	Koemulgator	2
Tripelargonin	Emolient	7
Helianthus Annuus Seed Oil, Tocopherol	Antyoksydant	0,1
Parfum	Substancja zapachowa	0,7
Colostrum	Składnik aktywny	15
Aqua, Sodium Lactate	Regulator pH	0,5
Aqua, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate	Konserwant	1,5
Aqua, Citric Acid	Regulator pH	1,30-1,50

### 1.3 Analiza białek, tłuszczów i kwasów tłuszczowych w colostrum owczym [P2].

#### Analiza tłuszczu

Zawartość tłuszczu w colostrum owczym określono za pomocą metody Soxhleta, zgodnie z normą PN-ISO-1444:2000. Do ekstrakcji zastosowano próbkę colostrum o masie 3 g, poddaną 40 cyklom ekstrakcyjnym przy użyciu heksanu jako rozpuszczalnika. Proces ten polegał na wielokrotnym przepłukiwaniu próbki przez rozpuszczalnik, który odparowywał, skraplał się, a następnie ponownie obmywał badaną substancję, umożliwiając skuteczne wydobycie lipidów zawartych w colostrum. Na zakończenie ekstrakcji rozpuszczalnik oddestylowano, a uzyskany ekstrakt lipidowy poddano analizie w celu określenia zawartości tłuszczów w badanej próbce



[102]. Proces ekstrakcji tłuszczu przeprowadzono przy użyciu urządzenia Büchi B-811 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Szwajcaria).

### **Analiza kwasów tłuszczowych**

Analizę przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 12966-1:2015-01.

Oznaczanie kwasów tłuszczowych przeprowadzono metodą chromatografii gazowej (GC) po estryfikacji do estrów metylowych. Lipidy wyekstrahowane z próbek colostrum poddano estryfikacji z użyciem boranu trifluoru ( $\text{BF}_3$ ) w metanolu. Estry metylowe kwasów tłuszczowych ekstrahowano przy użyciu heksanu, a następnie warstwę heksanową osuszono za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika próbkę rozpuszczono w heksanie i przeprowadzono analizę chromatograficzną na aparacie GC wyposażonym w kolumnę polarno-niepolarną (Agilent 6890N Series GC) oraz detektor MS (Agilent 5973) [103].

### **Analiza białka**

Zawartość białka w colostrum owczym została zbadana metodą Kjeldahla przy użyciu systemu Kjeltec 9 (Hilleroed, Dania), zgodnie z normą EN ISO 8968-1:2014. Proces obejmuje mineralizację próbki w obecności kwasu siarkowego ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), destylację uwolnionego amoniaku oraz jego miareczkowanie. Całkowita zawartość azotu została określona poprzez miareczkowanie standardowym roztworem HCl, a następnie przeliczona na zawartość białka przy użyciu współczynnika konwersji  $\text{N} \times 6,25$  [104].

Analizy przeprowadzone we współpracy z Katedrą Rozwoju Funkcjonalnych Produktów Żywnościowych przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

## **1.4 Badanie aktywności przeciwutleniającej colostrum metodami ABTS i DPPH [P2].**

### **Ocena aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS**

Badanie aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono przy użyciu nieznacznie zmodyfikowanej metody odbarwiania kationów rodnicowych ABTS [105].

Metoda ABTS polega na pomiarze zdolności antyoksydacyjnej w kontakcie z kationorodnikiem  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , wygenerowanym w wyniku reakcji ABTS (Kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) z nadsiarczanem potasu ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Zmiany absorbancji roztworu kationorodnika

ABTS+• przy długości fali 734 nm, wobec próbek colostrum o określonym stężeniu, były miarą zdolności substancji do neutralizacji wolnych rodników [106].

Absorbancję roztworów, przy 734 nm, mierzono za pomocą (spektrofotometru UV-1800 Shimadzu UV). Wyniki przedstawiono jako wartość  $EC_{50}$  (ang. Half Maximal Effective Concentration), czyli stężenie roztworu colostrum, przy którym uzyskuje się 50% maksymalnej możliwej aktywności antyoksydacyjnej [105].

#### **Ocena aktywności antyoksydacyjnej metodą DPPH**

Badanie aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono przy użyciu nieznacznie zmodyfikowanej metody zmiatania wolnych rodników DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) [107–109].

Metoda DPPH polega na pomiarze zdolności antyoksydacyjnej substancji w kontakcie z rodnikiem DPPH, który ulega odbarwieniu w obecności antyoksydantu. Zmiany absorbancji roztworu DPPH przy długości fali 517 nm, wobec próbek colostrum o określonym stężeniu, były miarą zdolności substancji do neutralizacji wolnych rodników [107–109].

Absorbancję roztworów mierzono przy 517 nm za pomocą spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu UV). Wyniki przedstawiono jako wartość  $EC_{50}$ .

### **1.5 Ocena potencjalnych właściwości wybielających colostrum owczego przez analizę hamowania aktywności tyrozynazy [P2].**

#### **Ocena hamowania aktywności tyrozynazy**

Hamowanie aktywności tyrozynazy oceniono zgodnie z dwoma wcześniej opisanymi metodami [110,111]. Metoda polegała na pomiarze zdolności substancji do inhibicji enzymu tyrozynazy, który katalizuje dwa kluczowe etapy syntezy melaniny: przekształcenie L-tyrozyny w L-DOPA oraz utlenianie L-DOPA do dopachinonu, będącego prekursorem melaniny [110,111]. Zmiany absorbancji roztworu przy długości fali 477 nm, wobec roztworów colostrum o stężeniu 1 mg/ml, były miarą zdolności substancji do inhibicji enzymu. Kontrolą pozytywną był roztwór witaminy C (1 mg/ml). Absorbancję mierzono przez 20 minut za pomocą spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu). Procent hamowania tyrozynazy obliczono według wzoru, zgodnie z literaturą [110,111].

### **1.6 Badanie *in vitro* wpływu colostrum owczego na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N) i keratynocytów naskórka noworodków [P2].**

Celem oceny wpływu colostrum na żywotność komórek fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N, nr kat. 90020508, ECACC) oraz keratynocytów naskórka noworodków (nr kat. SCCE020, Sigma Aldrich) przeprowadzono kolorymetryczny test MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy), oparty na pomiarze aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej. Analizę wykonano na 96-dołkowych płytkach hodowlanych, na które nanoszono zawiesinę komórkową o gęstości 8000 komórek na dołek. Po 24 godzinach hodowli komórek, przeprowadzono ekspozycję na colostrum w wybranym zakresie stężeń (0,1–2 mg/ml). Po określonym czasie inkubacji (24 i 48 godzin) na płytce nanoszono roztwór bromku MTT. Po zakończeniu reakcji i rozpuszczeniu powstałych kryształów formazanu za pomocą DMSO (dimetylosulfotlenek), absorbancję w dołkach mierzono kolorymetrycznie przy długości fali 570 nm. Na podstawie uzyskanych wartości oszacowano wpływ colostrum na żywotność fibroblastów i keratynocytów w porównaniu do kontroli pozytywnych (komórki bez colostrum), a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Karcynogenezy Molekularnej i Zakładem Genomiki Funkcjonalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

### **1.7 Analiza wpływu colostrum na proliferację ludzkich komórek fibroblastów cukrzycowych (dHF) wyizolowanych z próbek tkanek pobranych od 4 pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej [P2].**

Analizę wpływu colostrum na proliferację ludzkich fibroblastów cukrzycowych (dHF, ang. diabetic human fibroblasts) wyizolowanych z próbek od pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej przeprowadzono przy użyciu testu Presto Blue (mierzy aktywność metaboliczną komórek). Wszyscy pacjenci przekazujący próbki wyrazili świadomą zgodę na dostarczenie materiału do badania (nr zgody KB/128/2019 i KB/3/A2021) (Załącznik 1). Komórki wysiano na płytki 96-dołkowe (20000 kom./cm<sup>2</sup>) i hodowano przez 3 dni, po czym medium hodowlane (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)) o wysokiej zawartości glukozy z 10% FBS (płodowej surowicy bydlęcej) i 1% roztworem antybiotyku/leku przeciwgrzybiczego) zastąpiono medium wzbogaconym o roztwór 1 mg/ml colostrum. Jako kontrolę użyto standardowe podłoże. Inkubacja trwała 48 godzin, a proliferację analizowano po 24 i 48 godzinach. W celu oceny

proliferaacji zastosowano odczynnik Presto Blue, który zawiera wskaźnik tetrazolowy przekształcany jest w żywych komórkach przez dehydrogenazy mitochondrialne w rozpuszczalny produkt fluorescencyjny. Po inkubacji (1 godzina, 37°C) zmierzono intensywność fluorescencji (wzbudzenie/emisja = 540 nm/590 nm) na czytniku płytek Spark (Tecan, Szwajcaria). Wyniki fluorescencji dla komórek traktowanych colostrum porównano do kontroli, a wskaźnik proliferacji obliczono jako procent fluorescencji komórek kontrolnych.

Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Laboratorium Badań i Zastosowań Komórek, Centrum Badań i Technologii Przedklinicznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

### **1.8 Test rysy (scar test) wobec komórek dHF stymulowanych colostrum owczym [P2].**

#### **Przeprowadzenie testu rysy.**

W metodzie testu rysy tworzy się przerwę (ryś) w monowarstwie komórek adherujących do płytki hodowlanej, co pozwala ocenić zdolność komórek do migracji i regeneracji uszkodzonych tkanek. W badaniu fibroblastów cukrzycowych (dHF), komórki wysiano na 24-dołkowe płytki z wkładkami Culture-Inserts 2 Well (Ibidi GmbH), które po 3 dniach hodowli usunięto, tworząc szczelinę (ryś) w monowarstwie komórek. Powstała rysa symuluje uszkodzenie tkanki.

Następnie medium hodowlane zastąpiono standardowym medium dHF lub medium dHF wzbogaconym o 1 mg/ml colostrum owczym, co pozwoliło ocenić wpływ colostrum na migrację i regenerację komórek. Komórki hodowano w standardowych warunkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), a ich migrację w kierunku zamknięcia rysy monitorowano przez 72 godziny. Zdjęcia wykonywano co 4 godziny przy użyciu mikroskopu odwróconego Nikon Eclipse Ti w kanale jasnego pola (brightfield).

Obrazy rys analizowano za pomocą oprogramowania Image J z makrem Wound Healing Size Tool, które mierzy powierzchnię rysy. Wskaźnik zamknięcia rysy obliczono jako procent powierzchni bez komórek w momencie początkowym (T=0h) [112,113].

Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Laboratorium Badań i Zastosowań Komórek, Centrum Badań i Technologii Przedklinicznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

### **1.9 Wpływ colostrum na ekspresję genów związanych z proliferacją i odpowiedzią immunologiczną w komórkach dHF czterech pacjentów [P2].**

Komórki fibroblastów cukrzycowych (dHF) od czterech pacjentów wysiano do kolb T25 i hodowano w standardowej pożywce dHF. Po trzech dniach pożywkę zastąpiono świeżą pożywką dHF lub pożywką wzbogaconą o roztwór 1 mg/ml colostrum owczego. Komórki inkubowano przez 48 godzin w warunkach 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Po zakończeniu inkubacji zebrano komórki do dalszej analizy ekspresji genów [P2].

Izolację RNA z komórek poddanych 48-godzinnej inkubacji z colostrum przeprowadzono metodą mikrokolumnkową. Wyizolowane RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA. Obecność cDNA sprawdzono poprzez przeprowadzenie reakcji PCR z użyciem genu referencyjnego – 18S rRNA.

Ilościową ocenę poziomu ekspresji genów Ki67, IL-6, PTGS-2 oraz TSG-6 przeprowadzono z wykorzystaniem metody Real-time PCR. Analizę przeprowadzono w celu porównania poziomu ekspresji wybranych genów w komórkach dHF w zależności od zastosowanego stężenia roztworu colostrum i warunków inkubacji. Szczegóły technik molekularnych zamieszczono w Publikacji 2.

Badania zostały przeprowadzone we współpracy z Laboratorium Badań i Zastosowań Komórek, Centrum Badań i Technologii Przedklinicznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

### **1.10 8-tygodniowe randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą, kontrolowane placebo, przeprowadzone na grupie 52 ochotników [P3].**

Badanie zostało przeprowadzone, zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku i późniejszymi zmianami oraz za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (numer zgody RNN/13/22/KE z dnia 11 stycznia 2022 roku) (Załącznik 2).

Kryteria włączenia:

- Płeć żeńska,
- Wiek między 40 a 70 lat,
- Widoczne oznaki starzenia skóry, takie jak zmarszczki, utrata elastyczności, przebarwienia i suchość skóry,
- Podpisana świadoma zgoda na udział w badaniu.

Uczestników losowo przydzielono do grupy stosującej krem z siarą (32 osoby) lub do grupy stosującej placebo (20 osób), przy czym ani uczestnicy, ani badacze nie byli świadomi, do której grupy zostali przypisani. Dwie osoby z grupy placebo nie dokończyły badania z przyczyn losowych, a z grupy stosującej krem z siarą dwie osoby przerwały badanie z powodu działań niepożądanych (suchość i podrażnienie skóry).

Badani aplikowali krem (jedną lub dwie dozy) raz dziennie - wieczorem po oczyszczeniu twarzy. Przed rozpoczęciem stosowania kremu, dokonano pomiarów poziomu nawilżenia skóry, przeznaskórkowej utraty wody (TEWL), ilości sebum, indeksu hemoglobiny (rumień) i melaniny w skórze, a także elastyczności skóry. Do oceny nawilżenia skóry wykorzystano sondę Corneometer® CM825 z systemu Courage + Khazaka electronic GmbH Multi Probe Adapter. Do oceny transepidermalnej utraty wody (TEWL) wykorzystano sondę Tewameter® TM. Do pomiaru poziomu indeksu hemoglobiny (rumień) i melaniny wykorzystano sondę Mexameter® MX18. Do pomiaru ilości sebum na powierzchni skóry wykorzystano sondę Sebumeter® SM 815. Do pomiaru właściwości viscoelastycznych skóry wykorzystano sondę Cutometer® MPA 580. Parametry mierzono na środkowej części obu policzków.

Uczestnicy wypełnili również ankietę dotyczącą subiektywnej oceny stanu skóry (Załącznik 3).

Po 8 tygodniach stosowania preparatu, wszystkie testy zostały powtórzone.

Podczas pierwszej i ostatniej wizyty wykonano dokumentację fotograficzną skóry za pomocą systemu Photomedicus. Zdjęcia robiono w standardowym oświetleniu, zachowując ustalone wcześniej pozycje twarzy.

#### **1.11 8-tygodniowe badanie na grupie 30 ochotników, oceniające wpływ preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową [P4].**

Badanie zostało przeprowadzone na grupie 30 ochotników z łagodnym lub umiarkowanym trądzikiem. Grupa została utworzona zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku, wraz z późniejszymi zmianami. Na przeprowadzenie badania uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr RNN/44/23/KE z dnia 14 lutego 2023 roku) (Załącznik 4). Uczestnicy badania aplikowali krem dwa razy dziennie – rano i wieczorem, po oczyszczeniu twarzy, przez okres ośmiu tygodni. Spośród zrekrutowanych 30 osób dwie zrezygnowały z badania bez podania wyraźniej przyczyny, a jedna osoba nie ukończyła badania z powodu działań niepożądanych, takich jak suchość i podrażnienie skóry. Badanie ukończyło 27 osób.

Dokonano zarówno obiektywnej, jak i subiektywnej oceny stanu skóry uczestników przed rozpoczęciem terapii oraz po ośmiu tygodniach stosowania kremu. Ocena obiektywna uwzględniała pomiar takich parametrów skóry jak nawilżenie, TEWL i sebum, na czole, policzku i podbródku przy użyciu aparatu MPA 580 (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Kolonia, Niemcy).

W ocenie subiektywnej, z użyciem autorskiego kwestionariusza ankietowego, uczestnicy oceniali efekty 8-tygodniowej kuracji (Załącznik 5).

## **Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja**

Badania *in vitro* zawarte w niniejszej rozprawie obejmowały analizę potencjału antyoksydacyjnego, wybielającego oraz zdolności colostrum do stymulacji proliferacji fibroblastów (w tym fibroblastów dHF) i keratynocytów a także test gojenia rany. Zbadano również wpływ colostrum owczego na ekspresję genów związanych z proliferacją i właściwościami przeciwzapalnymi [P2]. Dopiero po uzyskaniu wyników z tych eksperymentów przystąpiono do badań wpływu na skórę dojrzłą i trądzikową, co pozwoliło zweryfikować skuteczność colostrum w warunkach rzeczywistych [P3, P4].

Publikacja [P2] obejmuje porównanie składu i wybranych właściwości biologicznych colostrum owczego pochodzącego z Polski i ze Szwajcarii. W niniejszej rozprawie wykorzystano tylko część wyników dotyczących colostrum pochodzenia polskiego, ponieważ to na jego bazie przygotowano preparat kosmetyczny wykorzystany do badań na ochotnikach [P3, P4].

### **2. Badania składu i właściwości biologicznych colostrum owczego [P2].**

#### **2.1 Analiza zawartości białek, tłuszczów i kwasów tłuszczowych w colostrum owczym [P2].**

Średnia zawartość procentowa tłuszczu i białka ogółem w liofilizowanej siarze owczej wynosiła odpowiednio  $38,05\% \pm 0,50$  i  $34,14\% \pm 0,23$ .

Wyniki badań różnią się od uzyskanych przez innych badaczy. Wendorff i in. stwierdzili niższą zawartość białka (11,8%) i tłuszczu (13,0%) [114]. W badaniu dziesięciu ras owiec zawartość białka wynosiła od 13,75% do 22,49%, a tłuszczu od 4,04% do 13,64% [115]. Guiso i in. podali, że średnia zawartość białka i tłuszczu w siarze wynosiła 16% i 7,8%, a w późniejszym mleku odpowiednio 5,5% i 5,8% [116]. Różnice te mogą wynikać z różnych czynników, takich jak postać siary (płynna lub liofilizowana), moment pobrania próbki, rasa owiec, dieta oraz warunki hodowlane [114–116]. Wyższa zawartość tłuszczu i białka w badanym colostrum, w porównaniu do literatury [114,115], może być wyjaśniona jego liofilizowaną formą, która zwiększa koncentrację składników. Dodatkowo, próbki colostrum pochodziły z pierwszych 12 godzin laktacji, co również tłumaczy wyższe stężenia białka i tłuszczu [114].

#### **Analiza kwasów tłuszczowych**

Dominującymi nasyconymi kwasami tłuszczowymi (SFA) w colostrum były kwasy palmitynowy - 37,41%, mirystynowy - 11,17% i stearynowy - 10,65%. (Tabela 3).



Wśród jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) największą ilość stanowiły kwas oleinowy (29,11%) oraz kwas palmitoleinowy (2,02%).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), w tym kwas linolowy (LA), sprzężony kwas linolowy (CLA) oraz kwas  $\alpha$ -linolenowy (ALA), stanowiły łącznie 4,86% wszystkich kwasów tłuszczowych. Największą ilość w tej grupie stanowił kwas linolowy, którego zawartość wynosiła 2,98% (Tabela 3).

**Tabela 3. Zawartość (%) kwasów tłuszczowych w colostrum owczym [P2].**

			Colostrum		
			M	SD	SE
Kwas kaprylowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	C8:0	0,000	0,000	0,000
Kwas kaprynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	C10:0	0,000	0,000	0,000
Kwas laurynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	C12:0	2,337	0,391	0,226
Kwas mirystynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C14:0	11,173	1,173	0,677
Kwas pentadekanowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	C15:0	1,090	0,069	0,040
Kwas palmitynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0	37,413	0,163	0,094
Kwas oleopalmitynowy	Kwas 9-cis-heksadekenowy	C16:1	2,043	0,300	0,173
Kwas margarynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	C17:0	1,320	0,279	0,161
Kwas stearynowy	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0	10,650	0,795	0,459
Kwas oleinowy	Kwas cis-9-oktadekenowy	18:1 (n-9)	29,113	1,258	0,727
Kwas linolowy (LA)	Kwas all-cis-9,12-oktadekadienowy	18:2 (n-6)	2,983	0,182	0,105
Sprzężony kwas linolowy (CLA)	(9Z,11E)-Kwas oktadeka-9,11-dienowy	CLA	0,757	0,061	0,035
Kwas alfa-linolenowy (ALA)	Kwas all-cis-9,12,15-oktadekatrienowy	18:3 (n-3)	1,123	0,040	0,023
		<b>SFA</b>	63,983	1,107	0,639
		<b>MUFA</b>	31,157	0,977	0,564
		<b>PUFA</b>	4,863	0,146	0,084

M – wartość średnia; SD – odchylenie standardowe, SE – błąd standardowy; n=3.

W badanym colostrum owczym stężenia MUFA, SFA i PUFA wynosiły odpowiednio 31,16%, 63,98% i 4,86%. Podobne profile kwasów tłuszczowych odnotowano we wcześniejszych badaniach [116–118]. Guiso i in. podali następujące zawartości kwasów tłuszczowych: 37% - MUFA, 58% - SFA oraz 6% - PUFA [116]. Podobny profil kwasów tłuszczowych odnotowano również w sianie bydłej: 65,6% SFA i 27,5% MUFA [119]. Dominującymi substancjami tłuszczowymi w badanym colostrum owczym był kwas palmitynowy (z grupy SFA) i kwas oleinowy (z grupy MUFA) o zawartościach odpowiednio 37,41% i 29,11%.

Badacze wykazali, że stosowanie odpowiednich stężeń kwasu palmitynowego (PA) sprzyja prawidłowemu różnicowaniu naskórka, wspierając jego morfogenezę [120]. PA, będący głównym składnikiem sebum, obok kwasu oleinowego, linolowego i stearynowego, wspomaga tworzenie lipidów sebum, w tym ceramidów, triacylogliceroli oraz nasyconych glikolipidów, co przyczynia się do zachowania właściwej struktury i funkcji bariery skórnej [120–122]. PA wykazuje jednak działanie prozapalne, zwiększając produkcję cytokin takich jak IL-1 $\beta$ , IL-6, i IL-8 w komórkach łojowych, co sugeruje jego rolę w patogenezie trądziku [123].

Z kolei miejscowe stosowanie kwasu oleinowego może naruszać barierę lipidową skóry, jak wykazano w badaniach nad oliwą z oliwek (76,3% kwasu oleinowego), co prowadziło do osłabienia bariery skórnej i lekkiego zaczerwienienia [124–127]. Jednonienasycony kwas oleinowy, może zwiększać przepuszczalność skóry, ułatwiając przenikanie innych substancji przez naskórek [127,128].

Kolejną, najmniejszą grupą kwasów tłuszczowych zidentyfikowaną w badanym colostrum były PUFA, a najwyższą zawartość odnotowano dla kwasu linolowego (LA) (2,98%). LA odgrywa kluczową rolę w organizacji i funkcjonowaniu bariery przepuszczalności skóry, zwłaszcza poprzez włączenie do  $\omega$ -hydroksylowanych ceramidów, które tworzą rusztowanie dla lipidów skóry [129–133]. LA jest również głównym składnikiem lipidów sebum, które nie tylko nawilżają skórę i włosy, ale także wspierają procesy regeneracyjne [134]. Niski poziom LA jest związany z patogenezą trądziku, ponieważ powoduje zwiększoną proliferację komórek łojowych oraz powstawanie zaskórników. Stosowanie miejscowe LA wykazuje działanie komedolityczne i przeciwzapalne [135–138].

Z badań wynika, że zarówno kwas oleinowy, jak i palmitynowy mogą wykazywać działanie korzystne, jak i drażniące na skórę, w tym stymulować trądzik. Dotychczasowe badania dotyczyły jednak olejów o wysokiej zawartości tych kwasów, np. oliwy z oliwek, a próby nie uwzględniały obecności innych składników, takich jak PUFA, białka czy witaminy, które mogą modulować ich działanie.

## 2.2 Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej colostrum metodami ABTS i DPPH [P2].

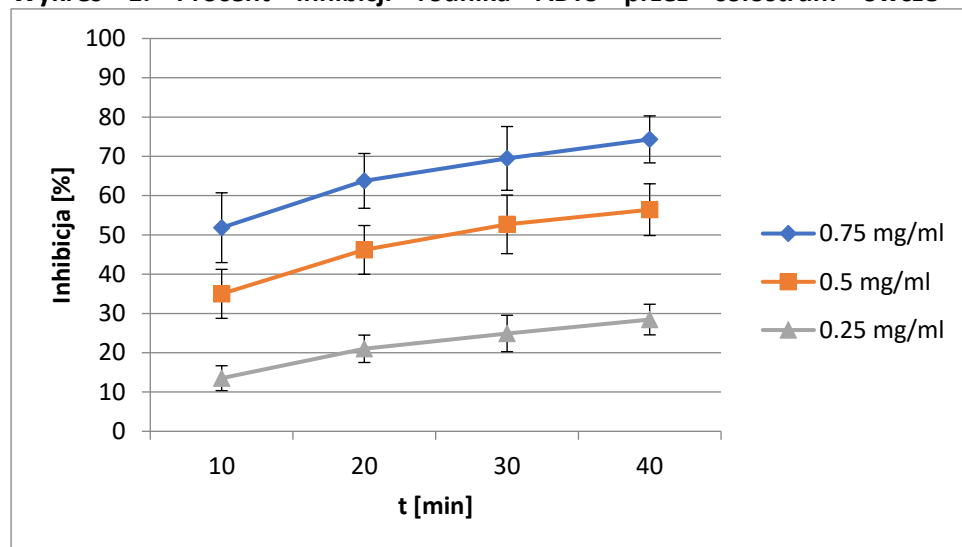
Aktywność antyoksydacyjną colostrum owczego określono poprzez wyznaczenie wartości  $EC_{50}$ , czyli stężenia colostrum, przy którym następuje zahamowanie aktywności rodnika DPPH i ABTS w 50%.

W metodzie DPPH, colostrum owcze wykazało umiarkowaną aktywność przeciwutleniającą, z wartością  $EC_{50}$  wynoszącą 0,988 mg/ml (Tabela 4). W metodzie ABTS, siara wykazywała około dwa razy silniejszą aktywność przeciwrodnikową w porównaniu do aktywności w teście DPPH, z wartościami  $EC_{50}$  wynoszącymi 0,515 mg/ml (po 30 minutach) i 0,477 mg/ml (po 40 minutach). Potencjał antyoksydacyjny colostrum był około sto razy niższy niż dla użytego standardu antyoksydacyjnego, tj. kwasu askorbinowego, dla którego wartość  $EC_{50}$  wynosiła 0,0053 mg/ml.

**Tabela 4. Aktywność antyoksydacyjna colostrum owczego metody ABTS i DPPH [P2].**

	ABTS				DPPH
	$EC_{50}$ [mg/ml] $\pm$ SD				$EC_{50}$ [mg/ml] $\pm$ SD
	10 min	20 min	30 min	40 min	30 min
Colostrum	0,727 $\pm$ 0,051	0,574 $\pm$ 0,034	0,515 $\pm$ 0,048	0,477 $\pm$ 0,048	0,988 $\pm$ 0,137
Kwas askorbinowy	0,0053 $\pm$ 0,0007				0,0026 $\pm$ 0,0003

Dodatkowo, zmierzono procent inhibicji rodnika ABTS przez colostrum (przy stężeniach 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml i 0,75 mg/ml) co 10 minut w okresie 40 minut (Wykres 1). Największy wzrost inhibicji zaobserwowano w ciągu pierwszych 10 minut: wykazano inhibicję na poziomie 13,5%, 35,0% i 51,8% przy stężeniach odpowiednio 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml i 0,75 mg/ml.

**Wykres 1. Procent inhibicji rodnika ABTS przez colostrum owcze w czasie [P2].**

Hydrofilowe antyoksydanty w mleku obejmują m.in. kazeiny, białka serwatkowe (laktoferynę,  $\beta$ -laktoglobulinę), peptydy, minerały, witaminy oraz związki azotowe o niskiej masie cząsteczkowej. Mleko jest również bogate w enzymy antyoksydacyjne, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, laktoperoksydaza, peroksydaza glutationowa i katalaza. Do lipofilowych antyoksydantów należą sprzężony kwas linolowy (CLA), karotenoidy,  $\alpha$ - tokoferol, witaminy A i D3, fosfolipidy oraz koenzym Q10. Zdolność antyoksydacyjna mleka różni się w zależności od gatunku zwierzęcia, diety oraz fazy laktacji [139,140].

W omawianych eksperymentach zastosowano pełne colostrum owcze. Należy jednak podkreślić, że metody oparte na polarnych rozpuszczalnikach, takich jak DPPH i ABTS, mierzą jedynie aktywność antyoksydacyjną fazy hydrofilowej colostrum. Faza lipofilowa, zawierająca składniki rozpuszczalne w tłuszczach, nie wchodzi w reakcję z tymi hydrofilowymi odczynnikami, co stanowi istotne ograniczenie tych metod. W związku z tym rzeczywista aktywność antyoksydacyjna colostrum byłaby prawdopodobnie wyższa, gdyby możliwe było uwzględnienie działania przeciwutleniającego lipofilowych składników colostrum.

W badaniach dotyczących różnych rodzajów mleka ssaków, mleko owcze wykazywało największą zdolność neutralizowania wolnych rodników w teście DPPH (27,28%) [141]. Ponadto, w innym badaniu mleko owcze fermentowane przy użyciu szczepu bakterii KGL3A wykazywało właściwości antyoksydacyjne w teście ABTS w zakresie od 18,4% do 34,6% [142]. Te wyniki sugerują, że colostrum owcze, które jest bogatsze w składniki aktywne od mleka, może wykazywać jeszcze większy potencjał antyoksydacyjny, co zostało udowodnione w powyższym badaniu.

### **2.3 Badanie wpływu colostrum na hamowanie aktywności tyrozynazy [P2].**

W celu oceny potencjalnego działania wybielającego colostrum, przeanalizowano jego zdolność do inhibicji aktywności tyrozynazy przy stężeniu roztworu 1 mg/ml. Colostrum wykazało słabą inhibicję na poziomie  $23,4\% \pm 0,6$ , co jest wynikiem około czterokrotnie niższym niż w przypadku zastosowanej kontroli — kwasu askorbinowego.

Niewiele badań dotyczy hamowania aktywności tyrozynazy przez siarę owczą, mleko owcze czy siarę bydlęcą. Jedno z badań analizowało działanie inhibicyjne białek mleka, hydrolizatów białkowych, peptydów i aminokwasów, takich jak  $\beta$ -kazeina czy  $\alpha$ -laktoalbumina względem tyrozynazy. Peptydy zawierające argininę i fenyloalaninę w połączeniu z waliną, alaniną lub leucyną okazały się bardziej skuteczne niż te zawierające reszty kwasów asparaginowego i glutaminowego [143]. Kolejne badanie potwierdziło zdolność hamowania aktywności tyrozynazy przez białka mleka, tj.  $\kappa$ -kazeina i  $\beta$ -laktoglobulina [144]. W innym badaniu wykazano, że mleko ośle hamuje aktywność tyrozynazy oraz syntezę melaniny [21].

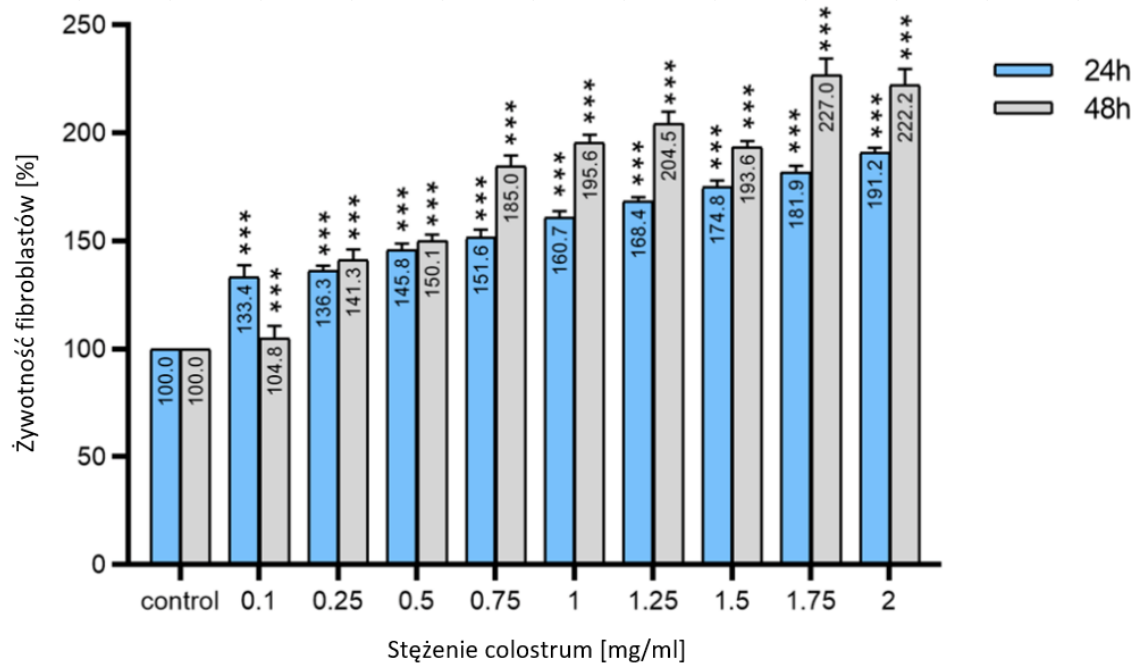
### **2.4 Badanie *in vitro* wpływu colostrum na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej (1BR.3.N), keratynocytów naskórka noworodków i ludzkich fibroblastów (dHF) wyizolowanych z próbek tkanek pobranych od 4 pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej [P2].**

Wpływ colostrum owczego na proliferację linii komórkowych fibroblastów skóry ludzkiej 1BR.3.N i keratynocytów naskórka noworodków został określony za pomocą testu MTT. Po 24- i 48-godzinnej inkubacji wszystkie badane stężenia colostrum owczego znacząco zwiększyły proliferację fibroblastów w sposób zależny od dawki (im wyższa dawka colostrum, tym wyższa proliferacja) w porównaniu z komórkami niepoddanymi działaniu siary (Wykres 2). Największy wzrost proliferacji, wynoszący 91,2% (po 24 godzinach) i 122,2% (po 48 godzinach), zaobserwowano dla najwyższego z badanych stężeń - 2 mg/ml.

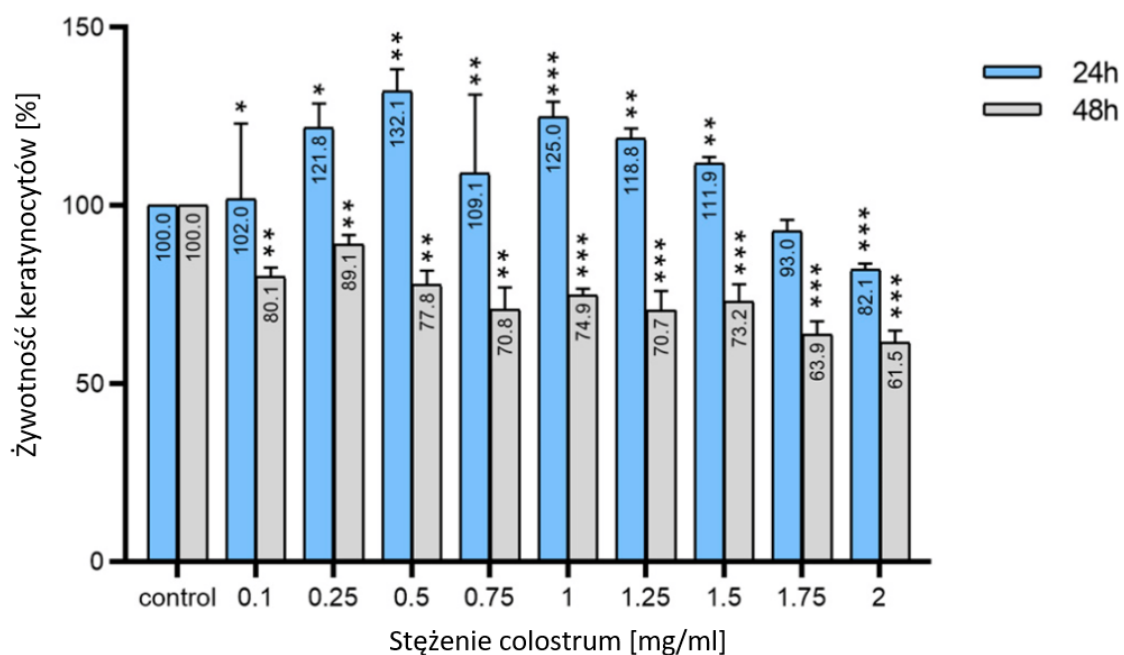
Keratynocyty naskórka noworodków wykazywały różną wrażliwość na działanie colostrum (Wykres 3). Inkubacja przez 24 godziny w niskich stężeniach siary (do 0,5 mg/ml) nieznacznie zwiększyła żywotność komórek o 32,1%, podczas gdy wysokie stężenia (2 mg/ml) zmniejszyły żywotność nawet o 17,9%. Po 48 godzinach efekt zmniejszenia żywotności keratynocytów był już

widoczny przy najniższym z testowanych stężeń - 0,1 mg/ml, a zwiększenie stężenia prowadziło do coraz większego hamowania żywotności keratynocytów, o około 40% przy stężeniu 2 mg/ml.

**Wykres 2. Wpływ colostrum na żywotność fibroblastów skóry ludzkiej 1BR.3.N [P2].**

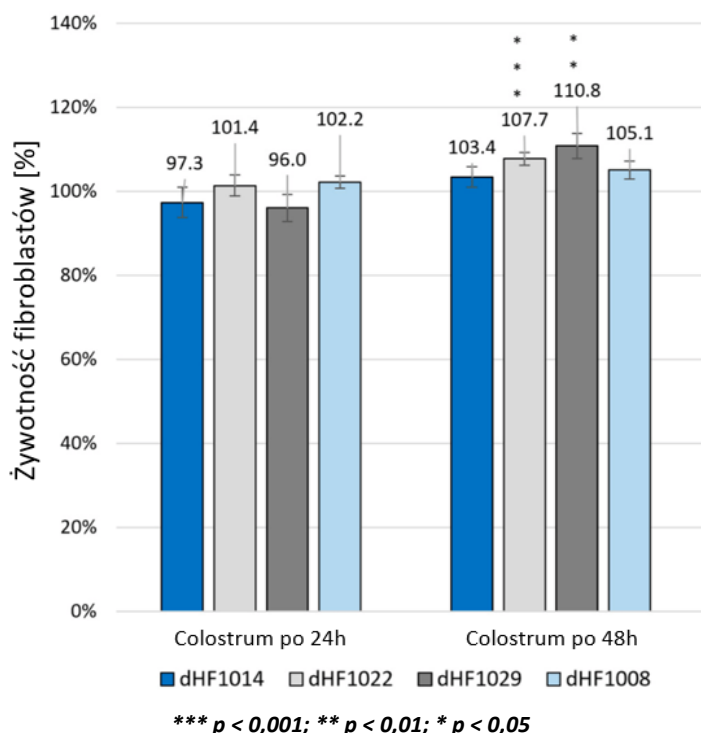


**Wykres 3. Wpływ colostrum na żywotność keratynocytów z naskórka noworodków [P2].**



Wpływ colostrum owczego na fibroblasty ludzkie pochodzące od pacjentów z cukrzycą wykazał zróżnicowane tendencje w zależności od pochodzenia komórek (Wykres 4). Po 48 godzinach hodowli wszystkie badane komórki wykazały wyższe wskaźniki proliferacji, szczególnie dHF1022 (107,7%,  $p < 0,001$ ) i dHF1029 (110,8%,  $p < 0,01$ ).

**Wykres 4. Wpływ colostrum na żywotność fibroblastów pochodzących od pacjentów (dHF) z owrzodzeniami stopy cukrzycowej [P2].**



Dotychczas stwierdzono, że siara bydlęca stymuluje wzrost psich fibroblastów *in vitro*. Najwyższe z zastosowanych stężeń siary bydlęcej, tj. 0,3 mg/ml i 1 mg/ml, stymulowały wzrost fibroblastów odpowiednio o 12% i 32% w porównaniu do kontroli po 48 godzinach inkubacji [9].

Wpływ colostrum bydlęcego na procesy starzenia skóry badano również m.in. przez ocenę długości telomerów i ich tempa skracania. W jednym z badań oceniano wpływ siary na proliferację fibroblastów ludzkich w warunkach standardowych oraz w obecności stresu oksydacyjnego wywołanego przez  $H_2O_2$ . Wyniki wskazały, że colostrum bydlęce może wspomagać regenerację skóry poprzez zwiększenie proliferacji fibroblastów oraz ochronę telomerów przed ich skracaniem, nawet w warunkach stresu oksydacyjnego [145].

Ponadto wykazano, że frakcja kuleczek tłuszczu wyizolowana z siary kłaczy najsilniej stymulowała proliferację fibroblastów, prawdopodobnie ze względu na zawartość laktadheryny [146].

Dotychczas nie badano wpływu colostrum na fibroblasty pochodzące od pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej (dHF). Wyniki będące częścią tej rozprawy wskazały, że proliferacja fibroblastów dHF, stymulowanych colostrum owczym, wynosiła od 96,0% do 115,4%, co jest niższym wskaźnikiem niż w przypadku zdrowych fibroblastów (227%) po 48 godzinach inkubacji. Wynika to prawdopodobnie z niższego potencjału proliferacyjnego komórek dHF, które pochodzą od pacjentów z zaburzeniami metabolicznymi. Aby osiągnąć podobne efekty jak w komórkach zdrowych, mogą być potrzebne wyższe stężenia siary, co wymaga dalszych badań. Ponadto należy zauważyć, że długotrwały wzrost proliferacji fibroblastów nie zawsze jest pożądany, gdyż może skutkować powstawaniem blizn keloidowych [147]. Dlatego potrzebne są dalsze i dłuższe obserwacje z siarą, zwłaszcza w warunkach klinicznych.

Ocena wpływu siary na wzrost podstawowych komórek budujących skórę właściwą i naskórek, takich jak fibroblasty i keratynocyty, oraz fibroblastów dHF pochodzących od pacjentów z owrzodzeniami stopy cukrzycowej, stanowi wartościowy model badawczy. Pozwala on na ocenę efektywności wspomagania procesów gojenia się ran, zdolności regeneracyjnych oraz potencjału siary w kontekście opóźniania procesów starzenia. Wyniki te mają istotne znaczenie w realizacji założonych celów badawczych niniejszej rozprawy doktorskiej.

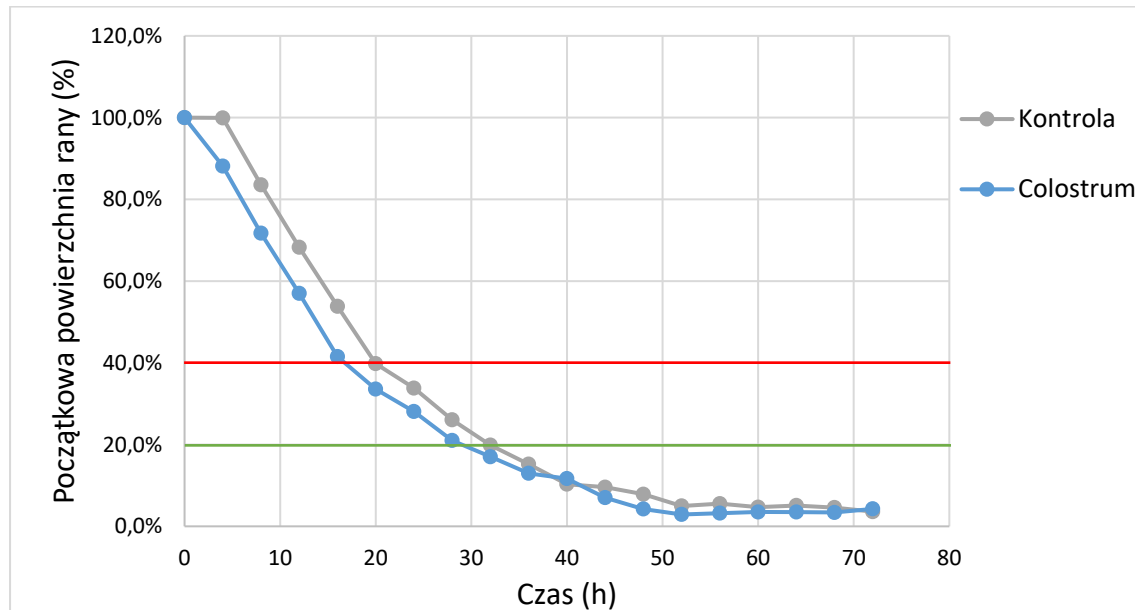
Stwierdzono, że colostrum po 24 godzinach stymulowało proliferację keratynocytów, jednak tylko do stężenia 1,5 mg/ml. Wyższe stężenia hamowały proliferację keratynocytów w obu czasach inkubacji. Podobny efekt hamujący wykazała siara bydlęca na prawidłowe keratynocyty ludzkie. Badacze przypuszczają, że zatrzymanie wzrostu mogło być związane ze zwiększoną ekspresją inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDKI), co sugeruje potencjalne zastosowanie siary w ograniczaniu nadmiernej proliferacji keratynocytów w leczeniu chorób skóry związanych z zaburzeniami bariery skórnej i różnicowania komórek [148].

## **2.5 Test rasy (scar test) wobec komórek dHF stymulowanych colostrum [P2].**

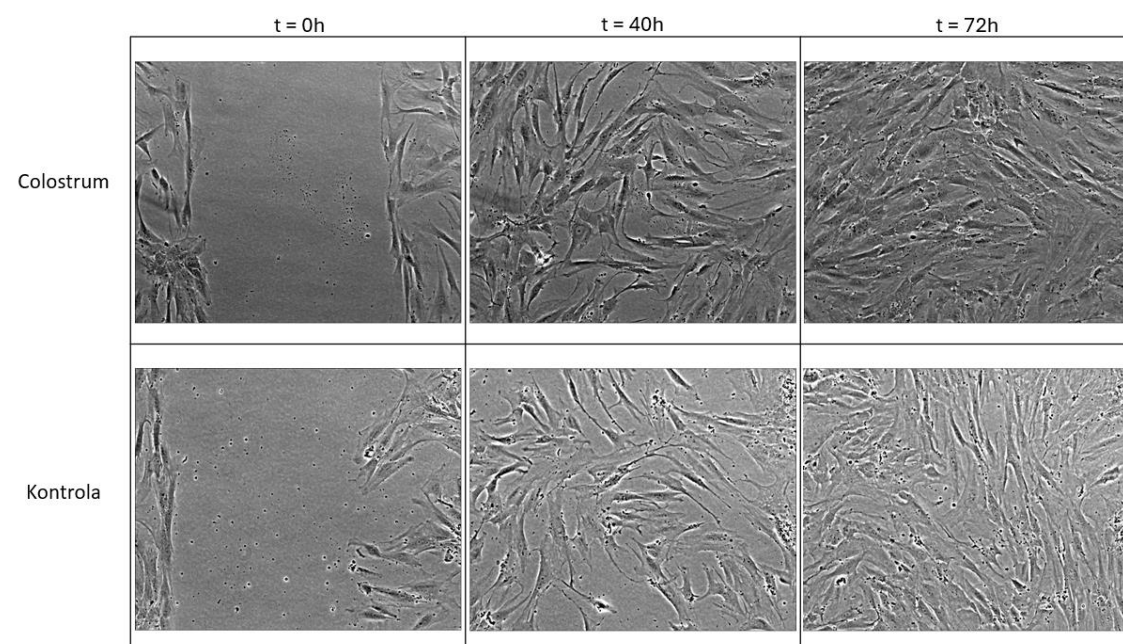
Komórki dHF hodowane w obecności colostrum owczego wykazały przyspieszone tempo zamykania rany. Komórki traktowane colostrum, proliferowały i migrowały szybciej niż komórki kontrolne, pokrywając 40% początkowej powierzchni rany po 16 godzinach hodowli (komórki kontrolne po 20 godzinach) oraz 20% powierzchni po 28 godzinach (kontrola po 32 godzinach) (Wykres 5, Rycina 1). Wyniki te sugerują, że colostrum owcze może wspomagać proces gojenia ran, co może być szczególnie korzystne w terapii owrzodzeń stopy cukrzycowej.



**Wykres 5. Wyniki testu zamykania rany dla komórek dHF stymulowanych colostrum ovczym [P2].**



**Rycina 1. Wyniki testu zamykania rany dla komórek dHF stymulowanych colostrum ovczym. Reprezentatywne fotografie ran w trzech wybranych punktach czasowych [P2].**



Wyniki badania sugerują, że colostrum owcze wspomaga procesy gojenia ran, szczególnie w przypadkach owrzodzeń stopy cukrzycowej, głównie dzięki wysokiej zawartości antyoksydantów oraz laktoferyny. Laktoferyna odgrywa kluczową rolę, stymulując proliferację i migrację fibroblastów, co przyczynia się do regeneracji tkanek [149]. Jak dotychczas w literaturze nie znaleziono badań oceniających wpływ colostrum na proces zamykania ran.

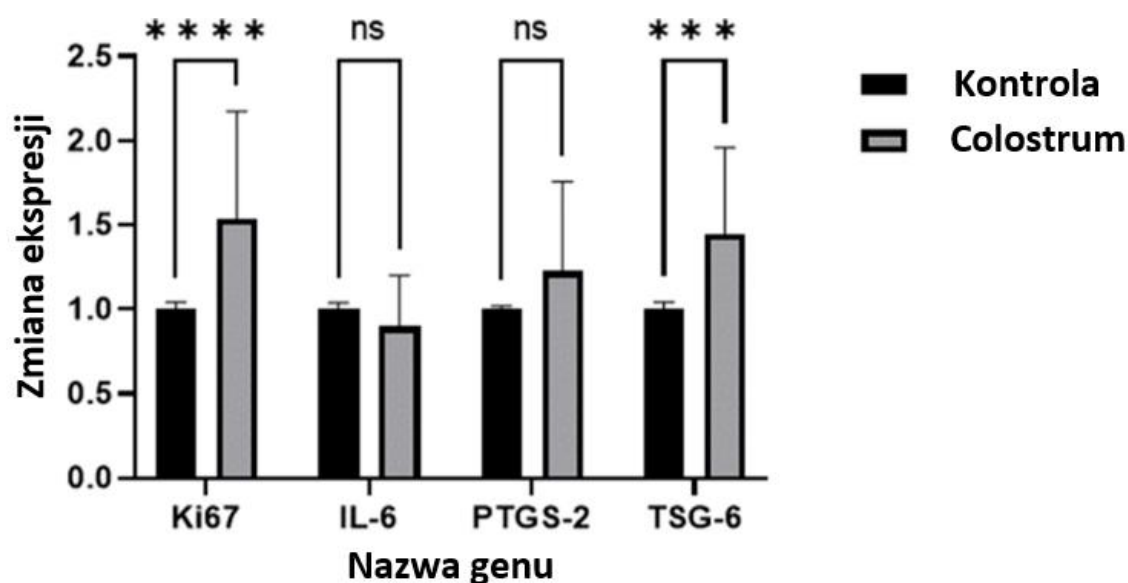
Przeprowadzono jedno badanie, które porównywało skuteczność opatrunków z siarą bydlęcą do opatrunków konwencjonalnych w przypadku głębokich ran. Wyniki wykazały, że opatrunki z colostrum promowały gojenie ran poprzez: skrócenie czasu gojenia rany, zmniejszenie bólu i zmniejszenie liczby zmian opatrunków. Dlatego badacze sugerują, że opatrunki z siary bydlęcej mogą być stosowane wspomagająco w leczeniu głębokich ran [150]. Siara bydlęca skutecznie wspomagała gojenie ran, prawdopodobnie dzięki obecności transformującego czynnika wzrostu (TGF- $\beta$ ), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) [45,150].

## 2.6 Wpływ colostrum na ekspresję genów związanych z proliferacją i odpowiedzią immunologiczną w komórkach dHF [P2].

Wyniki ekspresji genów komórek dHF czterech pacjentów traktowanych colostrum owczym wykazują wzrost ekspresji genów Ki67 (marker proliferacji), oraz TSG-6 (geny związane z właściwościami przeciwzapalnymi) względem komórek nietraktowanych (Wykres 6).

Wyniki pokrywają się z tendencjami obserwowanymi w teście rysy.

Wykres 6. Ekspresja genów Ki67, IL-6, PTGS-2 i TSG-6 w komórkach dHF po 48-godzinnym traktowaniu colostrum owczym [P2].



(n = 4); \*\*\*\* p < 0,0001; \*\*\* p < 0,001; ns oznacza brak istotności.

Bardzo niewiele badań analizowało wpływ siary na ekspresję genów i jej aktywność biologiczną, a te, które są dostępne, stosowały różne metodologie i typy próbek, co utrudnia bezpośrednie porównanie ich wyników z wynikami niniejszego badania.

Colostrum owcze znacząco zwiększyło ekspresję Ki67, co wskazuje na silny efekt proliferacyjny [151]. Początkowy wzrost tempa migracji i proliferacji komórek dHF (test rysy), w połączeniu ze zwiększoną ekspresją Ki67, sugeruje, że colostrum owcze posiada właściwości sprzyjające proliferacji komórek [151].

Zwiększenie ekspresji TSG-6 sugeruje również korzystne efekty przeciwzapalne. TSG-6 jest białkiem, które chroni tkanki przed uszkodzeniami wywołanymi stanem zapalnym [152]. Wcześniejsze badania wykazały, że siara bydłęca zawiera czynniki wzrostu, takie jak IGF-1 i EGF, które mogą stymulować proliferację komórek nabłonka jelitowego, co znajduje odzwierciedlenie w obserwacjach dotyczących zwiększonej ekspresji Ki67 po zastosowaniu colostrum owczego [48].

Ponieważ komórki dHF mogą być obciążone tzw. "pamięcią metaboliczną" związaną z cukrzycą, zwiększona ekspresja genów przeciwzapalnych, takich jak TSG-6, oraz zmniejszona ekspresja genu IL-6 mogą sugerować, że siara wykazuje korzystny wpływ na zaburzone właściwości zapalne komórek dHF [153]. Ponadto, w populacji fibroblastów w tkance wrzodowej stopy cukrzycowej zaobserwowano zwiększoną ekspresję TSG-6, która była związana z procesami gojenia [154].

Podsumowując, colostrum owcze wykazuje właściwości proliferacyjne, co potwierdza wzrost ekspresji markera Ki67, oraz działanie przeciwzapalne poprzez zwiększoną ekspresję TSG-6. Wyniki wskazują, że colostrum owcze może mieć potencjał wspomagający procesy gojenia ran.

### **3. Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę dojrzałą [P3]**

#### **Instrumentalny pomiar parametrów skóry [P3]**

Test nawilżenia skóry wykazał statystycznie istotne zwiększenie nawilżenia w grupie stosującej krem z siarą owczą, gdzie średnie nawilżenie wzrosło istotnie statystycznie z 35,9 do 51,1 jednostek (Wykres 7, Tabela 5). W grupie placebo zaobserwowano jedynie niewielką, nieistotną statystycznie zmianę nawilżenia, z 42,2 do 46,2 jednostek.

Aby dokładnie opisać ten parametr skóry, obliczono medianę oraz zakres międzykwartylowy (mediana (25%; 75. Wyniki wskazały na znacznie wyższą, istotną statystycznie poprawę nawilżenia skóry w grupie kremu z siarą (45,5%) w porównaniu do grupy placebo (9,5%).

Średnie wartości TEWL (przezskórnej utraty wody) były podobne w obu grupach przed aplikacją kremów: 21,1 g/h/m<sup>2</sup> dla siary i 20,8 g/h/m<sup>2</sup> dla placebo. Po ośmiu tygodniach terapii wartości TEWL poprawiły się w obu grupach o około 5 jednostek, tj. z poziomu normalnego (15-25 g/h/m<sup>2</sup>) do zdrowego stanu (10-15 g/h/m<sup>2</sup>). Zmiany te były statystycznie istotne w obu grupach  $P < 0,05$ .

Elastyczność skóry, oceniana za pomocą R0 i F0, poprawiła się w obu grupach w trakcie eksperymentu. R0 reprezentuje pasywną odpowiedź skóry na siłę, a F0 elastyczność skóry w momencie ssania. Średnie wartości R0 zmniejszyły się z 0,201 do 0,177 jednostek w grupie kremu z siarą oraz z 0,207 do 0,177 jednostek w grupie placebo. Podobnie, średnie wartości F0 zmniejszyły się z 32,6 do 27,1 jednostek w grupie kremu z siarą i z 31,6 do 26,7 jednostek w grupie placebo ( $P < 0,001$ ).

Nie zaobserwowano istotnych zmian w zakresie rumienia, zawartości melaniny ani sebum na końcu badania w żadnej z grup (krem z siarą oraz placebo).

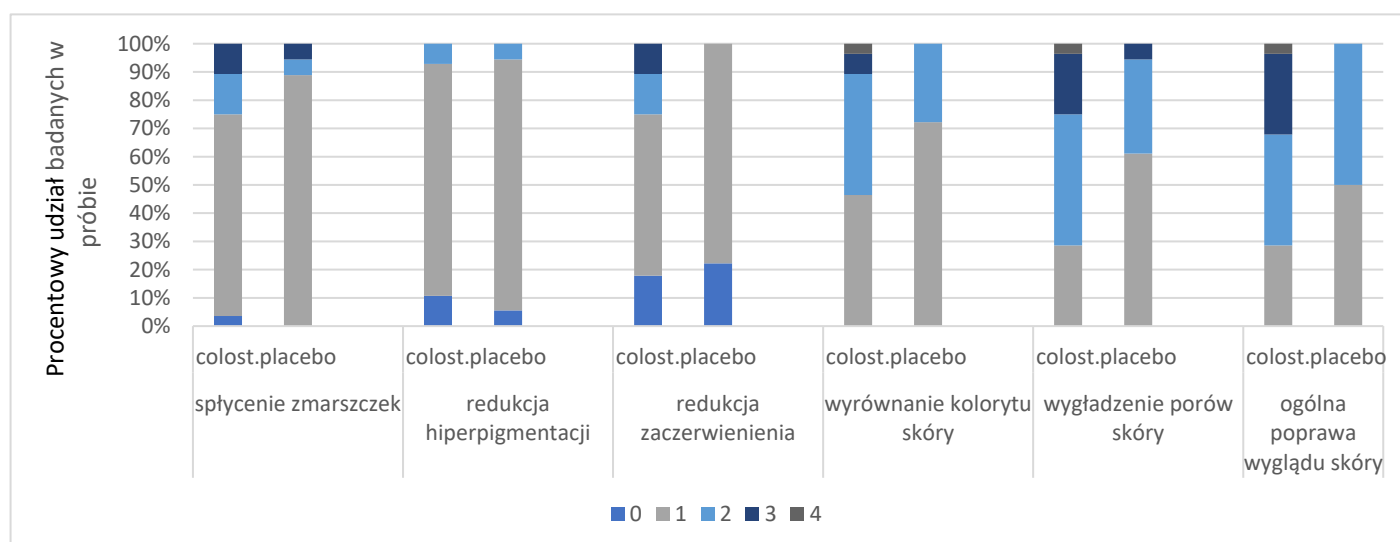
**Tabela 5.** Zmiany parametrów skóry po ośmiu tygodniach leczenia w grupach używających kremu z colostrum i placebo w postaci kremu bazowego, wyrażone jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe [P3].

Badany parameter skóry	Group	Pomiar I	Pomiar II	Istotność statystyczna (P)
		(tydzień 0)	(tydzień 8)	
Nawilżenie	Colostrum (N=30)	35,9 $\pm$ 11,8 [U]	51,1 $\pm$ 10,7 [U]	P<0,0001
	Placebo (N=18)	42,2 $\pm$ 11,9 [U]	46,2 $\pm$ 8,3 [U]	NS (P=0,147)
TEWL	Colostrum (N=30)	21,1 $\pm$ 12,3 [U]	15,3 $\pm$ 5,4 [U]	P=0,021
	Placebo (N=16)	20,8 $\pm$ 9,0 [U]	16,1 $\pm$ 6,2 [U]	P=0,030
Rumień	Colostrum (N=30)	351,9 $\pm$ 83,2 [U]	361,6 $\pm$ 92,5 [U]	NS (P=0,254)
	Placebo (N=18)	336,2 $\pm$ 78,1 [U]	359,0 $\pm$ 82,1 [U]	NS (P=0,115)
Zawartość melaniny	Colostrum (N=30)	111,7 $\pm$ 33,7 [U]	109,8 $\pm$ 33,3 [U]	NS (P=0,520)
	Placebo (N=18)	107,6 $\pm$ 31,0 [U]	104,5 $\pm$ 26,1 [U]	NS (P=0,517)
Sebum	Colostrum (N=28)	40,9 $\pm$ 35,0 [U]	39,0 $\pm$ 26,2 [U]	NS (P=0,684)
	Placebo (N=18)	42,1 $\pm$ 35,5 [U]	39,7 $\pm$ 27,8 [U]	NS (P=0,689)
Elastyczność R0	Colostrum (N=29)	0,201 $\pm$ 0,026 [U]	0,177 $\pm$ 0,021 [U]	P<0,0001
	Placebo (N=16)	0,207 $\pm$ 0,029 [U]	0,177 $\pm$ 0,031 [U]	P=0,001
Elastyczność F0	Colostrum (N=29)	32,6 $\pm$ 4,6 [U]	27,1 $\pm$ 3,0 [U]	P<0,0001
	Placebo (N=16)	31,6 $\pm$ 4,1 [U]	26,7 $\pm$ 3,5 [U]	P<0,0001

### Fotodokumentacja [P3]

Podczas oceny zdjęć badacze nie mieli informacji, czy oceniana pacjentka została przydzielona do grupy kremu z colostrum, czy do grupy placebo. Analiza wykazała znaczące zmiany w zaczerwienieniu i wygładzeniu porów w grupie colostrum ( $p < 0,05$ ). Dla pozostałych parametrów wykazano poprawę w grupie colostrum, jednakże nieistotną statystycznie (Wykres 7). Zmniejszenie zaczerwienienia odnotowano u 25% pacjentek w grupie z kremem z colostrum i u 0% osób w grupie placebo. Wygładzenie porów na skórze twarzy stwierdzono u 71,4% badanych stosujących krem z colostrum i u 38,9% osób stosujących krem placebo. Oceniono również parametr "ogólna poprawa" (oznaczający ogólną poprawę wyglądu skóry twarzy w całości) i wyrównanie kolorytu, które uległy zmianie u pacjentów z grupy kremu z colostrum i placebo, odpowiednio u 71,4% i 53,6% (Wykres 7).

**Wykres 7.** Wyniki oceny fotografii wykonanych przed i po badaniu [P3].



Zdjęcia oceniano według następującej skali: 0 - brak poprawy (taki sam stan jak na zdjęciu początkowym), 1 - niewielka poprawa, 2 - umiarkowana poprawa, 3 - znaczna poprawa (istotna poprawa wyglądu w porównaniu do stanu początkowego, ale nie całkowicie optymalna), 4 - maksymalna możliwa poprawa.

### Subiektywna ocena parametrów skóry [P3]

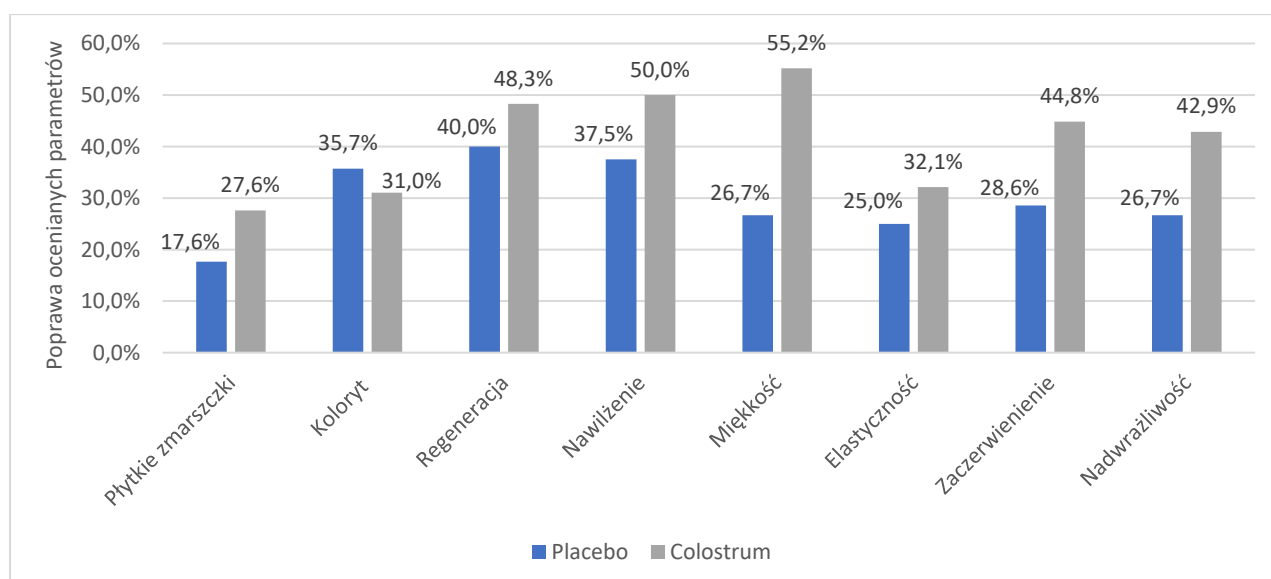
Badani zostali poproszeni o wypełnienie ankiety przed i po badaniu, w której mieli ocenić stan swojej skóry na podstawie różnych parametrów. Podczas wypełniania ankiety po 8-tygodniowym badaniu pacjenci wciąż nie wiedzieli, do której grupy należeli (czy stosowali krem z colostrum czy placebo). Uzyskane wyniki zostały przedstawione jako procent badanych, u których doszło do zmiany lub też nie w ocenianych parametrach. W grupie stosującej krem

z colostrum zaobserwowano poprawę w zakresie od 27,6% do 55,2%, natomiast w grupie placebo od 17,6% do 40,0% (Wykres 8). Szczegółowe dane dostępne są w publikacji.

Najwyższą poprawę odnotowano w obszarach takich jak regeneracja, nawilżenie i miękkość skóry. Analiza ocen wykazała statystycznie istotną różnicę w poprawie miękkości skóry w grupie colostrum.

Podsumowując uzyskane wyniki, więcej pacjentów w grupie colostrum wskazało poprawę w zakresie nawilżenia, regeneracji, miękkości skóry, redukcji zaczerwienienia i zmniejszenia nadwrażliwości niż w grupie placebo, lecz różnice te nie były istotne statystycznie.

**Wykres 8.** Odsetek osób, które odnotowały poprawę parametrów skóry po 8 tygodniach stosowania kremu placebo i kremu z colostrum.



Zwiększone nawilżenie skóry w grupie stosującej krem z siarą owczą można przypisać wysokim poziomom lipidów, czynników wzrostu, witamin i minerałów obecnych w colostrum owczym, które występują w wyższych stężeniach niż w siarze bydlęcej [48,69]. Substancje te promują nawilżenie i odżywienie skóry [48,69]. Produkt wspiera nawilżenie skóry dzięki kwasom tłuszczowym z colostrum, które mogą poprawiać funkcję bariery skórnej i redukować przezskórną utratę wody (TEWL). Jednakże, ponieważ podobne zmniejszenie TEWL zaobserwowano również w przypadku kremu placebo, konieczne są dalsze badania w celu dokładnego określenia specyficznego wpływu siary owczej na TEWL i nawilżenie.

Wiele korzystnych efektów dla skóry można przypisać obecności witamin, minerałów i aminokwasów w siarze bydlęcej [155]. Witaminy takie jak C, niacyna (B3), biotyna (B7),

witamina E i A wspierają produkcję kolagenu, gojenie ran i działanie antyoksydacyjne, podczas gdy minerały, takie jak cynk i miedź, neutralizują wolne rodniki i wspomagają regenerację tkanek [155]. Aminokwasy, w tym prolina, treonina, metionina i arginina, wspierają zdrowie skóry, przeciwdziałając starzeniu i przyspieszając gojenie ran [155] **(P1)**.

Zwiększenie elastyczności skóry po zastosowaniu kremu z colostrum owczym można przypisać antyoksydacyjnemu działaniu jego składników, takich jak witaminy A, C i E oraz  $\beta$ -laktoglobulina i laktoferyna. Substancje te chronią przed stresem oksydacyjnym i wspierają produkcję kolagenu (witaminy A,C,E), co spowalnia procesy starzenia [52,53,155]. Choć poprawa elastyczności była również widoczna w grupie placebo, wzrost nawilżenia w grupie colostrum owczego dodatkowo wspomagał ten proces, co wynika ze związku pomiędzy nawilżeniem a elastycznością skóry [156].

Analiza fotodokumentacji wykazała istotne zmiany w wygładzeniu porów i redukcji zaczerwienienia w grupie stosującej krem z colostrum ( $p < 0,05$ ). Efekt ten można przypisać stymulacji proliferacji keratynocytów i fibroblastów oraz właściwościom antyoksydacyjnym, które wykazuje colostrum owcze w badaniach *in vitro* [157]. Podobne wyniki uzyskano badając siarę bydlęcą, dodatkowo udowodniono, że stosowanie colostrum bydlęcego hamuje skracanie telomerów, zapobiegając tym samym zapaleniu skóry i zmianom tekstury [145,158].

Prolifercja i różnicowanie keratynocytów, udokumentowane w badaniach *in vitro*, mogą być także odpowiedzialne za zmniejszenie nadwrażliwości skóry, sptyczenie zmarszczek oraz poprawę regeneracji skóry, co potwierdzają zarówno subiektywne odczucia uczestników, jak i dokumentacja fotograficzna. Literatura wskazuje, że stymulacja fibroblastów przyczynia się do poprawy procesów regeneracyjnych skóry, co zapobiega jej przedwczesnemu starzeniu [145,158].

Badanie wpływu kremu z colostrum owczym na skórę dojrzałą jest pionierskie, ponieważ dotychczas nie testowano preparatów z siarą owczą. Wyniki wskazały, że krem z colostrum owczym poprawia nawilżenie skóry, zmniejsza TEWL oraz zwiększa elastyczność, co sugeruje jego potencjalne zastosowanie w dermatologii i kosmetologii. Produkt placebo, choć nieco poprawił TEWL i elastyczność skóry, nie wykazał takich efektów jak krem z siarą. Subiektywne oceny pacjentów oraz dokumentacja fotograficzna potwierdzają, że krem z colostrum przynosi korzyści w zakresie miękkości, wygładzenia porów i redukcji zaczerwienienia.



#### **4. Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową [P4].**

W poprzednim badaniu dotyczącym wpływu kremu zawierającego colostrum owcze na skórę dojrzłą zaobserwowano efekt w postaci zmniejszenia wydzielania sebum u trzech osób z tłustą cerą. Zgłoszenia pacjentów były zgodne z wynikami pomiarów, które potwierdziły redukcję produkcji sebum po kuracji. Te obserwacje zasugerowały, że colostrum może mieć pozytywny wpływ na regulację wydzielania sebum, co uzasadnia podjęcie dalszych badań na grupie pacjentów z trądzikiem, w celu zweryfikowania jego skuteczności w leczeniu skóry trądzikowej.

##### **Badania aparaturowe parametrów skóry.**

Po 8-tygodniowym stosowaniu kremu z owczym colostrum odnotowano istotną statystycznie redukcję łojotoku na czole, co jest szczególnie istotne, ponieważ w innych obszarach twarzy wyjściowy poziom łojotoku był niższy. Dodatkowo zaobserwowano poprawę nawilżenia skóry na czole i policzkach oraz zmniejszenie wartości TEWL na policzkach i brodzie (Tabela 6). W pozostałych badanych partiach twarzy parametry te także uległy poprawie, lecz wyniki nie wykazywały istotności statystycznej.

Tabela 6. Zmiany parametrów skóry po 8 tygodniach leczenia wyrażone jako średnia  $\pm$  SD oraz mediana [P4].

Obszar twarzy	Pomiar I (przed zastosowaniem kremu)	Pomiar II (po 8 tygodniach stosowania kremu)	Istotność statystyczna (p)
<b>Nawilżenie</b>			
Czoło	50,7 $\pm$ 13,8	56,6 $\pm$ 10,0	p=0,036
	51,0 (42,2-58,2)	58,5 (53,2-61,0)	
Policzek	43,2 $\pm$ 12,8	49,3 $\pm$ 11,4	p=0,013
	41,0 (38,5-52,0)	50,0 (41,5-55,7)	
Broda	50,1 $\pm$ 10,9	54,9 $\pm$ 19,7	NS (P=0,171)
	50,0 (41,5-54,2)	52,0 (40,7-60,0)	
<b>TEWL</b>			
Czoło	17,3 $\pm$ 9,1	16,8 $\pm$ 6,1	NS (P=0,876)
	15,5 (10,0-20,5)	15,0 (13,0-18,5)	
Policzek	20,1 $\pm$ 6,5	16,5 $\pm$ 6,2	p=0,013
	18,5 (14,7-25,0)	15,0 (13,0-16,2)	
Broda	26,4 $\pm$ 11,9	18,9 $\pm$ 8,4	p<0,001
	22,0 (17,7-33,0)	16,0 (14,0-20,0)	
<b>Sebum</b>			
Czoło	132,8 $\pm$ 67,8	91,7 $\pm$ 41,0	p=0,002
	120,5 (81,5-199,7)	84,0 (61,0-101,2)	
Policzek	63,3 $\pm$ 62,1	69,2 $\pm$ 52,7	NS (P=0,264)
	51,5 (22,2-69,2)	64,0 (35,0-83,7)	
Broda	110,2 $\pm$ 65,3	103,1 $\pm$ 56,2	NS (P=0,207)
	89,5 (62,7-145,0)	90,0 (60,5-134,2)	

Wartości w Tabeli: Średnia  $\pm$ SD, Mediana (25-75) (interkwartył 25% i 75%)

### **Subiektywna ocena badanych.**

Uczestnicy ocenili swoje objawy skórne, takie jak zaskórniki, grudki, krosty i rumień, a także nawilżenie skóry, łojotok i ogólny stan skóry po ośmiu tygodniach leczenia.

Odsetek osób badanych doświadczających poprawy w zakresie redukcji zaskórników, grudek, krost i rumienia wynosił odpowiednio 68%, 78%, 75% i 82% (Wykres 9a).

Zaś średnia poprawa w grupie deklarującej poprawę wyniosła 38% (redukcja zaskórników), 39% (redukcja grudek), 43% (redukcja krost) i 38% (zmniejszenie rumienia) (Tabela 7a).

Odsetek osób badanych doświadczających poprawy nawilżenia skóry, redukcji łojotoku oraz utrzymania skóry w dobrej kondycji wynosił odpowiednio 82%, 82% i 90% (Wykres 9b).

Zaś średnia poprawa w grupie deklarującej poprawę wyniosła 40% (wzrost nawilżenia), 29% (redukcja łojotoku), 43% (redukcja krost) i 39% (dobra kondycja skóry) (Tabela 7b).

**Tabela 7.** Dane dotyczące subiektywnej oceny uczestników w zakresie poprawy badanych parametrów [P4].

a)

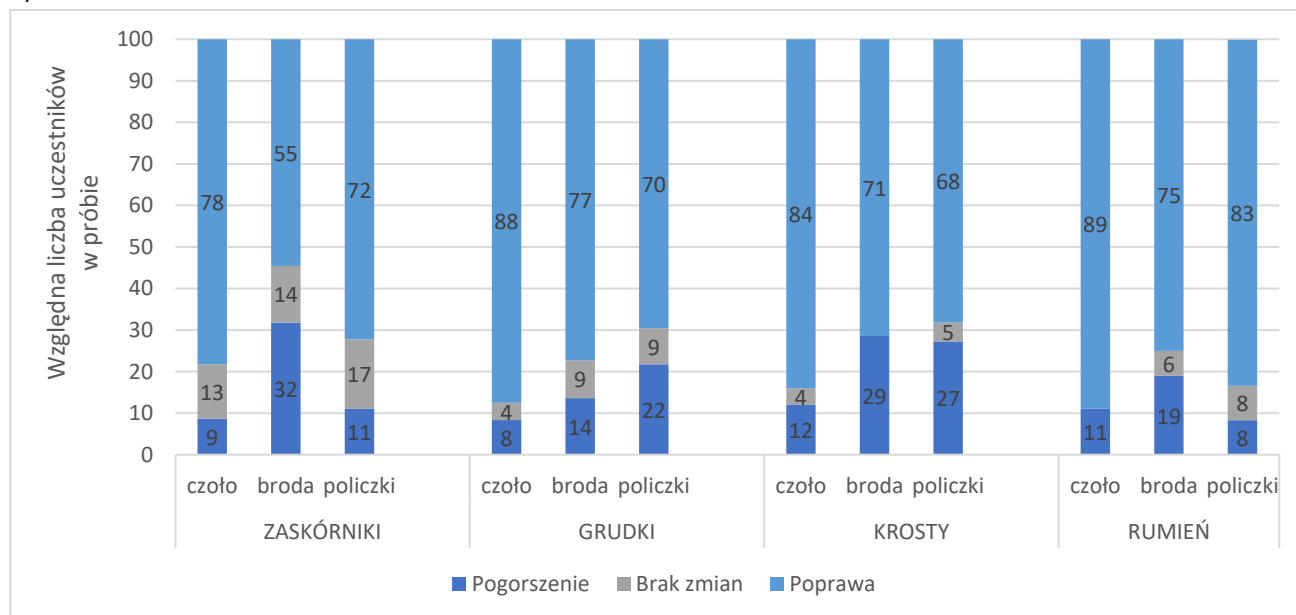
	Zaskórniki			Grudki			Krosty			Rumień		
	czoło	broda	policzki	czoło	broda	policzki	czoło	broda	policzki	czoło	broda	policzki
<b>Średnia poprawa w grupie deklarującej poprawę</b>	33,30%	38,80%	40,40%	32,60%	43,20%	41,80%	37,60%	44,30%	48,30%	40,40%	31,50%	43,50%
<b>(liczność grupy)</b>	(N=18)	(N=12)	(N=13)	(N=21)	(N=16)	(N=17)	(N=21)	(N=15)	(N=15)	(N=16)	(N=10)	(N=12)
Liczność grupy z brakiem zmian	N=3	N=3	N=3	N=1	N=2	N=2	N=1	N=1	N=0	N=0	N=1	N=1
<b>Średnie pogorszenie w grupie deklarującej pogorszenie</b>	12,50%	10,70%	10%	15,00%	16,00%	30,00%	10,00%	19,50%	30,80%	10,00%	10,00%	8,30%
<b>(liczność grupy)</b>	(N=2)	(N=7)	(N=2)	(N=2)	(N=5)	(N=3)	(N=3)	(N=6)	(N=6)	(N=2)	(N=1)	(N=3)
Liczność grupy z brakiem objawów	N=4	N=5	N=9	N=3	N=4	N=5	N=2	N=5	N=6	N=9	N=15	N=11

b)

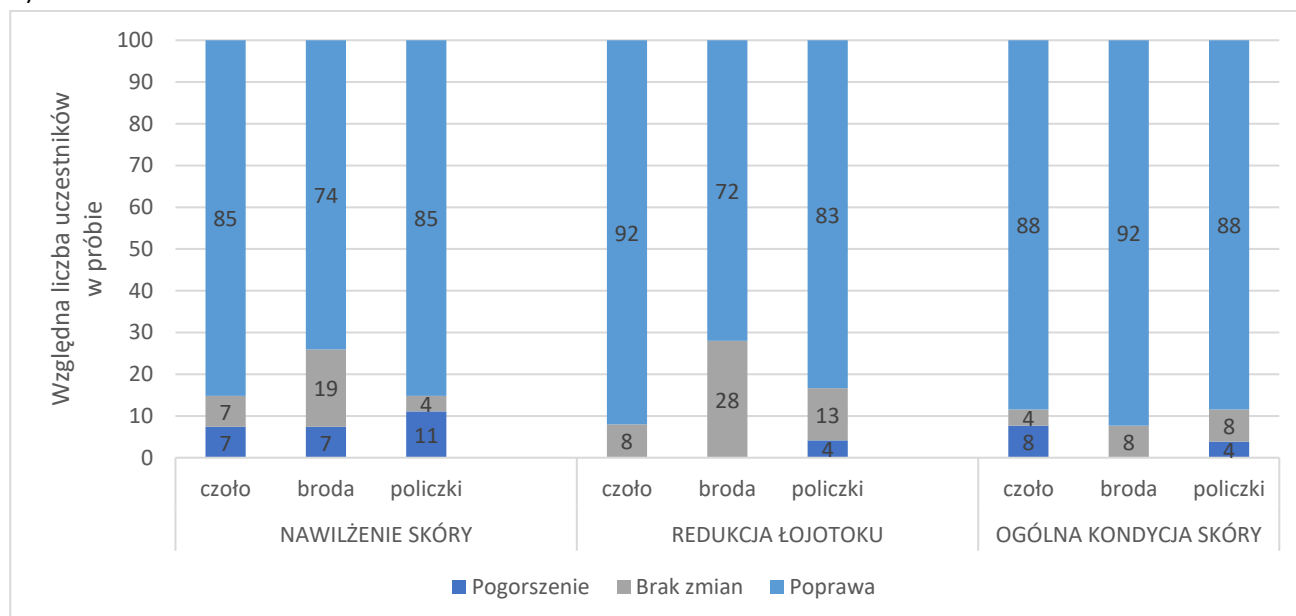
	Nawilżenie skóry			Redukcja łojotoku			Dobra kondycja skóry		
	czoło	broda	policzki	czoło	broda	policzki	czoło	broda	policzki
<b>Średnia poprawa w grupie deklarującej poprawę</b>	37,50%	38,00%	43,20%	32,50%	24,10%	29,60%	39,70%	33,90%	43,80%
<b>(liczność grupy)</b>	(N=23)	(N=20)	(N=23)	(N=23)	(N=18)	(N=20)	(N=23)	(N=24)	(N=23)
Liczność grupy z brakiem zmian	N=2	N=5	N=1	N=2	N=7	N=3	N=1	N=2	N=2
<b>Średnie pogorszenie w grupie deklarującej pogorszenie</b>	20,00%	15,00%	36,70%	0,00%	0,00%	10,00%	22,50%	0,00%	20,00%
<b>(liczność grupy)</b>	(N=2)	(N=2)	(N=3)	(N=0)	(N=0)	(N=1)	(N=2)	(N=0)	(N=1)
Liczność grupy z brakiem objawów	N=0	N=0	N=0	N=2	N=2	N=3	N=1	N=1	N=1

**Wykres 9.** Procent uczestników, którzy zadeklarowali poprawę (niebieski), brak zmiany (szary) i pogorszenie (granatowy) w zakresie zmian skórnych [P4].

a)



b)



Zarówno leczenie trądziku, jak i sam trądzik mogą zwiększać utratę wody z naskórka, prowadząc do suchości skóry, stanów zapalnych i jej większej wrażliwości [159]. W próbkach skóry trądzikowej zaobserwowano zmienioną ekspresję cząsteczek odgrywających kluczową rolę w utrzymaniu funkcji bariery naskórkowej [160], a pacjenci z trądzikiem wykazywali wyższy wynik TEWL i niższe nawilżenie w porównaniu do grupy kontrolnej [161].

Uzyskane wyniki wskazują, że terapia prowadziła do poprawy nawilżenia skóry na czole i policzkach, co może sugerować, że aktywne składniki colostrum (w tym czynniki wzrostu, witaminy

i lipidy) zwiększają zdolność skóry do zatrzymywania wody. Ponadto zmniejszenie TEWL na brodzie i policzkach sugeruje poprawę integralności bariery hydrolipidowej, prawdopodobnie dzięki lipidom i białkom wzmacniającym warstwę rogową naskórka [13,148]. Laktoferyna, jeden z kluczowych składników colostrum, jak sugerują Mueller i in. [162], poprawia stan skóry poprzez redukcję zmian trądzikowych, zwiększenie nawilżenia, zmniejszenie TEWL oraz obniżenie produkcji sebum.

Wyniki badań, obejmujących ponad 900 pacjentów, wykazały istotną rolę sebum w powstawaniu zmian zapalnych [163]. W niniejszym badaniu zaobserwowano, że stosowanie preparatu zawierającego colostrum owcze wiązało się ze znaczącą redukcją produkcji sebum na czole. Można to przypisać regulacyjnemu działaniu lipidów, cytokin i immunoglobulin zawartych w colostrum, które wpływają na funkcjonowanie gruczołów łojowych [164–167]. Co istotne, największe zmniejszenie produkcji sebum zaobserwowano na czole, przy braku istotnych zmian w innych obszarach twarzy, co sugeruje, że produkcja sebum została znormalizowana, a nie jedynie zredukowana. Uczestnicy badania zgłaszali poprawę w zmianach zapalnych związanych z trądzikiem, co potwierdza przeciwzapalne właściwości colostrum owczego, w tym jego składników, takich jak immunoglobuliny, laktoferyna, laktoperoksydaza i cytokiny [162,168]. Regeneracja i odbudowa skóry zostały również wzmocnione dzięki obecności czynników wzrostu, takich jak IGF-1, EGF i TGF, co może przyspieszać gojenie ran oraz zmniejszenie rumienia po trądziku [169]. Laktoferyna, znana ze swoich właściwości przeciwzapalnych wykazuje zdolność regulowania wydzielania cytokin, hamowania reakcji zapalnych oraz redukcji prozapalnych cytokin, takich jak IL-8 [12]. Sugeruje to potencjał laktoferyny w łagodzeniu stanów zapalnych związanych z trądzikiem oraz poprawie ogólnego stanu skóry. Może również zmniejszać zaczerwienienia, najprawdopodobniej poprzez hamowanie aktywności kluczowych białek zapalnych [12].

Ponadto wcześniej wykonane badania *in vitro* potwierdziły działanie przeciwzapalne i regenerujące (stymulując proliferację fibroblastów i przyspieszając migrację komórek skóry) [P2] colostrum owczego, co dodatkowo wspiera możliwość jego zastosowania w pielęgnacji skóry trądzikowej.

## Wnioski

W niniejszej pracy podjęto temat wpływu colostrum owczego na skórę, którego działanie nie zostało do tej pory tak dobrze przebadane jak w przypadku colostrum bydlęcego.

Ocena wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry dojrzałej oraz trądzikowej została poprzedzona przeglądem literatury i badaniami *in vitro*. Badania własne colostrum owczego wykazały jego właściwości antyoksydacyjne, a także wysoką zdolność do stymulacji wzrostu fibroblastów i umiarkowaną dla keratynocytów, co przy spowolnionych podziałach komórkowych w skórze starzejącej się, może przekładać się na właściwości przeciwstarzeniowe i regeneracyjne. Badania przeprowadzone na fibroblastach pochodzących od osób chorych na cukrzycę wykazały stymulację ich proliferacji (Ki67) i migracji, ale też wzrost ekspresji genów dla białek przeciwzapalnych (TSG-6), a zmniejszenie prozapalnych IL-6, co pozwala przypuszczać o pozytywnym działaniu na procesy gojenia.

Potwierdzona aktywność biologiczna colostrum owczego, sugeruje jego korzystne działanie na skórę zdrową i chorą. W badaniach obiektywnych po stosowaniu kremu z colostrum owczym wykazano istotną statystycznie poprawę nawilżenia, redukcję przeskórkowej utraty wody, a także poprawę elastyczności. Subiektywna ocena osób stosujących kosmetyki i fotodokumentacja, potwierdziły wyniki uzyskane aparaturowo, a także wskazały na poprawę miękkości, wygładzenie porów skóry i zmniejszenie rumienia.

Działanie kremu z colostrum okazało się również efektywne u osób ze skórą trądzikową. Zmniejszenie wydzielania łoju i poprawa nawilżenia pozwoliły na utrzymanie skóry w dobrej kondycji. Regularne stosowanie kremu z colostrum prowadziło również do redukcji zmian trądzikowych, takich jak zaskórniki, grudki i krosty. Stąd krem z colostrum może wspomagać pielęgnację skóry trądzikowej podczas leczenia dermatologicznego, np. z zastosowaniem retinoidów, poprzez poprawę bariery naskórkowej.

Powyższe wyniki wskazują na możliwość zastosowania w dermatologii, również o działaniu typowo pielęgnacyjnym.

## Streszczenie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry dojrzałej oraz skóry trądzikowej. Działanie colostrum pochodzenia owczego nie zostało do tej pory tak dobrze przebadane jak w przypadku colostrum bydlęcego.

Na początkowym etapie badań opracowano oryginalną recepturę preparatu kosmetycznego w formie emulsji zawierającego jako komponent aktywny colostrum pochodzące od polskich owiec.

Następnie oceniono wpływ przygotowanego preparatu kosmetycznego z colostrum owczym na skórę dojrzałą, w 8-tygodniowych randomizowanych badaniach z podwójnie ślełą próbą, kontrolowane placebo, na grupie 52 ochotników. Badanie obejmowało: pomiar nawilżenia skóry na podstawie zawartości wody w warstwie rogowej; ocenę transepidermalnej utraty wody (TEWL), pomiar poziomu hemoglobiny (rumień) i melaniny; ocenę ilości sebum na skórze, pomiar właściwości viscoelastycznych skóry, a także wykonanie fotodokumentacji stanu skóry osób badanych przed i po stosowaniu preparatu, oraz subiektywną ocenę stanu skóry przez osoby badane przed i po zakończeniu stosowania preparatu.

W drugim 8-tygodniowym badaniu na ochotnikach (30 osób) oceniono wpływ preparatu kosmetycznego z colostrum owczym na skórę trądzikową. Badanie polegało na pomiarze ilości sebum na skórze, ocenie nawilżenia skóry, oznaczeniu przesnaskórkowej utraty wody (TEWL), oraz subiektywnej ocenie stanu skóry przez osoby badane pod kątem występowania zaskórników, grudek, krostek, rumienia, a także jej nawilżenia, łojotoku oraz ogólnej kondycji skóry.

Ocena wpływu colostrum owczego na wybrane parametry skóry dojrzałej oraz trądzikowej została poprzedzona przeglądem literatury i badaniami *in vitro*. Badania własne colostrum owczego wykazały jego właściwości antyoksydacyjne, a także wysoką zdolność do stymulacji wzrostu fibroblastów i umiarkowaną dla keratynocytów, co przy spowolnionych podziałach komórkowych w skórze starzejącej się, może przekładać się na właściwości przeciwstarzeniowe i regeneracyjne. Badania przeprowadzone na fibroblastach pochodzących od osób chorych na cukrzycę wykazały stymulację ich proliferacji (Ki67) i migracji, ale też wzrost ekspresji genów dla białek przeciwzapalnych (TSG-6), a zmniejszenie prozapalnych IL-6, co pozwala przypuszczać o pozytywnym działaniu na procesy gojenia.

Potwierdzona aktywność biologiczna colostrum owczego, sugeruje jego korzystne działanie na skórę zdrową i chorą. W badaniach obiektywnych po stosowaniu kremu z colostrum owczym wykazano istotną statystycznie poprawę nawilżenia, redukcję



przez naskórkowej utraty wody, a także poprawę elastyczności. Subiektywna ocena osób stosujących kosmetyk i fotodokumentacja, potwierdziły wyniki uzyskane aparaturowo, a także wskazały na poprawę miękkości, wygładzenie porów skóry i zmniejszenie rumienia.

Działanie kremu z colostrum okazało się również efektywne u osób ze skórą trądzikową. Zmniejszenie wydzielania łoju i poprawa nawilżenia pozwoliły na utrzymanie skóry w dobrej kondycji. Regularne stosowanie kremu z colostrum prowadziło również do redukcji zmian trądzikowych, takich jak zaskórniki, grudki i krosty. Stąd krem z colostrum może wspomagać pielęgnację skóry trądzikowej podczas leczenia dermatologicznego, np. z zastosowaniem retinoidów, poprzez poprawę bariery naskórkowej.

Powyższe wyniki wskazują na możliwość zastosowania w dermatologii, również o działaniu typowo pielęgnacyjnym.

## Summary

The aim of this doctoral thesis was to examine the effects of sheep colostrum on selected parameters of mature and acne-prone skin. The effects of ovine colostrum have not been as thoroughly studied as bovine colostrum.

At the initial stage of the research, an original formula of a cosmetic product in the form of an emulsion containing ovine colostrum from Polish sheep as the active component was developed. Subsequently, the effects of the prepared cosmetic product with sheep colostrum on mature skin were evaluated in an 8-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial involving 52 volunteers. The study included: measurement of skin hydration based on the water content in the stratum corneum; evaluation of transepidermal water loss (TEWL); measurement of hemoglobin (erythema) and melanin levels; assessment of sebum levels in the skin; measurement of skin viscoelastic properties; photographic documentation of the skin condition before and after the application of the product; and a subjective assessment of the skin condition by the participants before and after the use of the product. In the second 8-week study involving volunteers (30 people), the effect of the cosmetic product with ovine colostrum on acne-prone skin was evaluated. The study included measurements of sebum levels on the skin, evaluation of skin hydration, determination of transepidermal water loss (TEWL), and subjective assessment of the skin condition by the participants, focusing on the presence of blackheads, papules, pustules, erythema, as well as skin hydration, seborrhea, and overall skin condition.

The evaluation of the effects of sheep colostrum on selected parameters of mature and acne-prone skin was preceded by a literature review and *in vitro* studies. The *in vitro* studies of ovine colostrum demonstrated its antioxidant properties, as well as its high ability to stimulate fibroblast growth and moderate ability to stimulate keratinocytes. Given the slowed cellular division in aging skin, this may translate into anti-aging and regenerative properties. Studies conducted on fibroblasts from diabetic patients demonstrated stimulation of their proliferation (Ki67) and migration, as well as an increase in the expression of anti-inflammatory proteins (TSG-6) and a reduction in pro-inflammatory IL-6, suggesting a positive effect on healing processes.

The confirmed biological activity of sheep colostrum suggests its beneficial effects on both healthy and diseased skin. Objective studies following the use of a cream containing ovine colostrum showed a statistically significant improvement in hydration, a reduction in transepidermal water loss, and an improvement in skin elasticity. The subjective evaluation by

the participants and the photographic documentation confirmed the instrumentally obtained results, as well as indicated improvements in skin softness, pore smoothing, and erythema reduction.

The effect of the cream with colostrum also proved to be effective in individuals with acne-prone skin. The reduction in sebum secretion and improvement in hydration allowed the skin to maintain good condition. Regular use of the cream with colostrum also led to a reduction in acne lesions such as blackheads, papules, and pustules. Therefore, the colostrum cream can support acne-prone skin care during dermatological treatment, for example, with the use of retinoids, by improving the epidermal barrier.

These results indicate the potential for its use in dermatology, including for skincare purposes.

## Piśmiennictwo

1. Revenue of the Natural Personal Care Market Worldwide 2018-2028  
<https://www.statista.com/forecasts/1468810/revenue-of-the-natural-personal-care-market-worldwide> (dostęp 8.07.2024).
2. GUS Biuletyn Statystyczny Nr 11/2023  
<https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/inne-opracowania/informacje-o-sytuacji-spoleczno-gospodarczej/biuletyn-statystyczny-nr-112023,4,144.html> (dostęp: 8.07.2024).
3. Zhang, S.; Duan, E. Fighting against Skin Aging. *Cell Transplant* 2018, 27, 729–738, doi:10.1177/0963689717725755.
4. Du, N.; Yang, R.; Jiang, S.; Niu, Z.; Zhou, W.; Liu, C.; Gao, L.; Sun, Q. Anti-Aging Drugs and the Related Signal Pathways. *Biomedicines* 2024, 12, 127, doi:10.3390/biomedicines12010127.
5. Janda, K.; Chwiłkowska, M. Acne vulgaris – aetiology, classification, treatment. *Pomeranian Journal of Life Sciences* 2014, 60, 13–18, doi:10.21164/pomjlifesci.24.
6. Reynolds, R.V.; Yeung, H.; Cheng, C.E.; Cook-Bolden, F.; Desai, S.R.; Druby, K.M.; Freeman, E.E.; Keri, J.E.; Stein Gold, L.F.; Tan, J.K.L.; et al. Guidelines of Care for the Management of Acne Vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2024, 90, 1006.e1-1006.e30, doi:10.1016/j.jaad.2023.12.017.
7. Kandhari, R. Side Effects of Anti-Acne Medications: A Narrative Review. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology* 2024, 44, 1, doi:10.4103/ejdv.ejdv\_31\_22.
8. Hewitt, E.; Mros S; McConnell M; Cabral Jd; Ali A Melt-Electrowriting with Novel Milk Protein/PCL Biomaterials for Skin Regeneration. PMID: 31318339. *Biomedical materials* 2019, 14(5), doi:10.1088/1748-605X/ab334.
9. Torre, C.; Jeusette, I.; Serra, M.; Brazis, P.; Puigdemont, A. Bovine Colostrum Increases Proliferation of Canine Skin Fibroblasts. *J Nutr* 2006, 136, 2058S-2060S, doi:10.1093/jn/136.7.2058S.
10. Saraceno, R.; Gramiccia, T.; Chimenti, S.; Valenti, P.; Pietropaoli, M.; Bianchi, L. Topical Lactoferrin Can Improve Stable Psoriatic Plaque. *Giornale italiano di dermatologia e venerologia : organo ufficiale, Società italiana di dermatologia e sifilografia* 2014, 149, 335–340.
11. Cosentino, C.; Elshafie, H.S.; Labella, C.; D’Adamo, C.; Pecora, G.; Musto, M.; Paolino, R.; Camele, I.; Freschi, P. Study on the Protective Effect of an Innovative Cow Milk-Based Product against Some Human Skin-Bacterial Pathogens. *J Biol Res* 2018, 91, doi:10.4081/jbr.2018.7426.

12. Su, Y.; Cui, W.; Wei, H. Influence of Lactoferrin on Propionibacterium Acnes-Induced Inflammation in Vitro and in Vivo. *Dermatologic Therapy* 2020, 33, e14483, doi:10.1111/dth.14483.
13. Gobbi, R.M. Pharmaceutical and Dermocosmetic Compositions Containing Equine Colostrum 1998, US5750149A.
14. Gobbi, R.M. Cosmetic Compositions Containing Hyaluronic Acid and Colostrum 2007, WO2007009790A1.
15. Kwak T.; Kim K.; Kim J.H.; Jung M.G.; Seo S.A.; Seo H.R. A cosmetic composition of fermented colostrum product for anti-acne 2019.
16. Pukacka, M.; Pukacki, P.; Żaba, R.; Adamski, Z.; Mrozewicz, B. Use of Bovine Colostrum in Dermatology in the Department of Dermatology and Venerology of Poznan. *Derm. Prakt.* 2015, 7, 61–64.
17. Kocic, H.; Langerholc, T.; Kostic, M.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Krstic, M.; Nestic, I.; Godic, A.; Wollina, U. The Regenerative Potential of Donkey and Human Milk on the Redox-Sensitive and Proliferative Signaling Pathways of Skin Fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, 2020, 1–8, doi:10.1155/2020/5618127.
18. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America* 2013, 60, 49–74, doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002.
19. Vollmer, D.; West, V.; Lephart, E. Enhancing Skin Health: By Oral Administration of Natural Compounds and Minerals with Implications to the Dermal Microbiome. *IJMS* 2018, 19, 3059, doi:10.3390/ijms19103059.
20. McGrath, B.A.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Kelly, A.L. Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Science & Technology* 2016, 96, 133–158, doi:10.1007/s13594-015-0258-x.
21. Li, A.; He, H.; Chen, Y.; Liao, F.; Tang, J.; Li, L.; Fan, Y.; Li, L.; Xiong, L. Effects of Donkey Milk on UVB-Induced Skin Barrier Damage and Melanin Pigmentation: A Network Pharmacology and Experimental Validation Study. *Front Nutr* 2023, 10, 1121498, doi:10.3389/fnut.2023.1121498.
22. Biadała, A. Goat's Milk-Derived Bioactive Components - A Review. *Mljekarstvo* 2018, 68, 239–253, doi:10.15567/mljekarstvo.2018.0401.
23. Behrouz, S.; Saadat, S.; Memarzia, A.; Sarir, H.; Folkerts, G.; Boskabady, M.H. The Antioxidant, Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Camel Milk. *Front. Immunol.* 2022, 13, doi:10.3389/fimmu.2022.855342.

24. Playford, R.J.; Weiser, M.J. Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses. *Nutrients* 2021, *13*, 265, doi:10.3390/nu13010265.
25. Farooq, U.; Ahmed, S.; Liu, G.; Jiang, X.; Yang, H.; Ding, J.; Ali, M. Biochemical Properties of Sheep Colostrum and Its Potential Benefits for Lamb Survival: A Review. *Animal Biotechnology* 2024, *35*, 2320726, doi:10.1080/10495398.2024.2320726.
26. Gallo, S.; Botéquio Moretti, D.; Cardoso Oliveira, M.; Santos, F.F.; Brochine, L.; Micai, G.; Silva, M.; Tedeschi, L. The Colostrum Composition of Sheep Fed with High-Energy Diets Supplemented with Chromium. *Small Ruminant Research* 2020, *191*, 106177, doi:10.1016/j.smallrumres.2020.106177.
27. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2013; ISBN 978-1-4614-4713-9.
28. Orsi, N. The Antimicrobial Activity of Lactoferrin: Current Status and Perspectives. *Biometals* 2004, *17*, 189–196, doi:10.1023/B:BIOM.0000027691.86757.e2.
29. Özer, B. NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Lactoperoxidase and Lactoferrin. In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*; Batt, C.A., Tortorello, M.L., Eds.; Academic Press: Oxford, 2014; pp. 930–935 ISBN 978-0-12-384733-1.
30. Baker, E.N.; Baker, H.M. Molecular Structure, Binding Properties and Dynamics of Lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005, *62*, 2531–2539, doi:10.1007/s00018-005-5368-9.
31. Drago-Serrano, M.E.; de la Garza-Amaya, M.; Luna, J.S.; Campos-Rodríguez, R. Lactoferrin-Lipopolysaccharide (LPS) Binding as Key to Antibacterial and Antiendotoxic Effects. *Int Immunopharmacol* 2012, *12*, 1–9, doi:10.1016/j.intimp.2011.11.002.
32. M Zimecki; K Spiegel; A Właszczuk; A Kübler; M L Kruzel Lactoferrin Increases the Output of Neutrophil Precursors and Attenuates the Spontaneous Production of TNF-Alpha and IL-6 by Peripheral Blood Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999, *47*, 113–118.
33. Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Hashimoto, S.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H.; Tomita, M. Effects of Orally Administered Bovine Lactoferrin on the Immune System of Healthy Volunteers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, *443*, 261–265, doi:10.1007/978-1-4757-9068-9\_32.
34. Garcia, H.S.; López-Hernandez, A.; Hill, C.G. 4.47 - Enzyme Technology – Dairy Industry Applications. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, 2011; pp. 567–574 ISBN 978-0-08-088504-9.
35. Fox, P.F.; Kelly, A.L. Indigenous Enzymes in Milk: Overview and Historical Aspects—Part 1. *International Dairy Journal* 2006, *16*, 500–516, doi:10.1016/j.idairyj.2005.09.013.
36. Brody, E.P. Biological Activities of Bovine Glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* 2000, *84 Suppl 1*, S39-46, doi:10.1017/s0007114500002233.

37. *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*; Park, Y.W., Ed.; Wiley-Blackwell: Ames, Iowa, 2009; ISBN 978-0-8138-1982-2.
38. Chatterton, D.E.W.; Smithers, G.; Roupas, P.; Brodkorb, A. Bioactivity of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin—Technological Implications for Processing. *International Dairy Journal* 2006, *16*, 1229–1240, doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.001.
39. Y. Pan; B. Shiell; J. Wan; M.J. Coventry; W.P. Michalski; A.Leeb; H.Roginski The Molecular Characterisation and Antimicrobial Properties of Amidated Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *International Dairy Journal* 2007, *17*, 1450–1459, doi:10.1016/j.idairyj.2007.04.006.
40. Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Hunziker, P. Isolation and Identification of Three Bactericidal Domains in the Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin Molecule. *Biochimica et Biophysica Acta* 10.
41. Żelechowska, P.; Agier, J.; Brzezińska-Błaszczyk, E. Endogenous Antimicrobial Factors in the Treatment of Infectious Diseases. *Cent Eur J Immunol* 2016, *41*, 419–425, doi:10.5114/ceji.2016.65141.
42. Gapper, L.W.; Copestake, D.E.J.; Otter, D.E.; Indyk, H.E. Analysis of Bovine Immunoglobulin G in Milk, Colostrum and Dietary Supplements: A Review. *Anal Bioanal Chem* 2007, *389*, 93–109, doi:10.1007/s00216-007-1391-z.
43. Korhonen, H. Milk-Derived Bioactive Peptides: From Science to Applications. *Journal of Functional Foods* 2009, *1*, 177–187, doi:10.1016/j.jff.2009.01.007.
44. Gauthier, S.F.; Pouliot, Y.; Maubois, J.-L. Growth Factors from Bovine Milk and Colostrum: Composition, Extraction and Biological Activities. *Lait* 2006, *86*, 99–125, doi:10.1051/lait:2005048.
45. Bhora, F.Y.; Dunkin, B.J.; Batzri, S.; Aly, H.M.; Bass, B.L.; Sidawy, A.N.; Harmon, J.W. Effect of Growth Factors on Cell Proliferation and Epithelialization in Human Skin. *Journal of Surgical Research* 1995, *59*, 236–244, doi:10.1006/jsre.1995.1160.
46. Amiot, J.; Germain, L.; Turgeon, S.; Lemay, M.; Ory-Salam, C.; Auger, F.A. Peptides from Milk Protein Hydrolysates to Improve the Growth of Human Keratinocytes in Culture. *International Dairy Journal* 2004, *14*, 619–626, doi:10.1016/j.idairyj.2003.11.007.
47. Elfstrand, L.; Lindmark-Månsson, H.; Paulsson, M.; Nyberg, L.; Åkesson, B. Immunoglobulins, Growth Factors and Growth Hormone in Bovine Colostrum and the Effects of Processing. *International Dairy Journal* 2002, *12*, 879–887, doi:10.1016/S0958-6946(02)00089-4.

48. Playford, R.J.; Macdonald, C.E.; Johnson, W.S. Colostrum and Milk-Derived Peptide Growth Factors for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, *72*, 5–14, doi:10.1093/ajcn/72.1.5.
49. Pamela, R.D. Topical Growth Factors for the Treatment of Facial Photoaging: A Clinical Experience of Eight Cases. *J Clin Aesthet Dermatol* 2018, *11*, 28–29.
50. He, X.; Gao, X.; Guo, Y.; Xie, W. Research Progress on Bioactive Factors against Skin Aging. *Int J Mol Sci* 2024, *25*, 3797, doi:10.3390/ijms25073797.
51. Boldogh, I.; Aguilera-Aguirre, L.; Bacsi, A.; Choudhury, B.K.; Saavedra-Molina, A.; Kruzell, M. Colostrinin Decreases Hypersensitivity and Allergic Responses to Common Allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008, *146*, 298–306, doi:10.1159/000121464.
52. Bamdad, F.; Bark, S.; Kwon, C.H.; Suh, J.-W.; Sunwoo, H. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Peptides Released from  $\beta$ -Lactoglobulin by High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis. *Molecules* 2017, *22*, 949, doi:10.3390/molecules22060949.
53. Bielecka, M.; Cichosz, G.; Czczot, H. Antioxidant, Antimicrobial and Anticarcinogenic Activities of Bovine Milk Proteins and Their Hydrolysates - A Review. *International Dairy Journal* 2022, *127*, 105208, doi:10.1016/j.idairyj.2021.105208.
54. van der Strate, B.W.; Beljaars, L.; Molema, G.; Harmsen, M.C.; Meijer, D.K. Antiviral Activities of Lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001, *52*, 225–239, doi:10.1016/s0166-3542(01)00195-4.
55. Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Valenti, P.; Seganti, L. Antirotaviral Activity of Milk Proteins: Lactoferrin Prevents Rotavirus Infection in the Enterocyte-like Cell Line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.* 1997, *186*, 83–91, doi:10.1007/s004300050049.
56. Superti, F.; Berlutti, F.; PAESANO, R. Structure and Activity of Lactoferrin\–A Multi-Functional Protective Agent for Human Health. *Iron Metabolism and Disease* 2008, 1–32.
57. Superti, F. Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients* 2020, *12*, doi:10.3390/nu12092562.
58. Papaccio, F.; D'Arino, A.; Caputo, S.; Bellei, B. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants (Basel)* 2022, *11*, 1121, doi:10.3390/antiox11061121.
59. Li, T.; Gao, D.; Du, M.; Cheng, X.; Mao, X. Casein Glycomacropeptide Hydrolysates Inhibit PGE2 Production and COX2 Expression in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells via Akt Mediated NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways. *Food Funct.* 2018, *9*, 2524–2532, doi:10.1039/C7FO01989K.



60. Siqueiros-Cendón, T.; Arévalo-Gallegos, S.; Iglesias-Figueroa, B.F.; García-Montoya, I.A.; Salazar-Martínez, J.; Rascón-Cruz, Q. Immunomodulatory Effects of Lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin* 2014, *35*, 557–566, doi:10.1038/aps.2013.200.
61. Tanghetti, E.A. The Role of Inflammation in the Pathology of Acne. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013, *6*, 27–35.
62. Park, Y.; Haenlein, G.F.W.; Wendorff, W. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. Second Edition.*; 2017; ISBN 978-1-119-11027-9.
63. Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A.M.; Arráez-Román, D.; Hettinga, K. Recent Advances in Phospholipids from Colostrum, Milk and Dairy By-Products. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, *18*, 173, doi:10.3390/ijms18010173.
64. Ahmad, A.; Ahsan, H. Lipid-Based Formulations in Cosmeceuticals and Biopharmaceuticals. *Biomedical Dermatology* 2020, *4*, 12, doi:10.1186/s41702-020-00062-9.
65. Choudhary, V.; Choudhary, M.; Bollag, W.B. Exploring Skin Wound Healing Models and the Impact of Natural Lipids on the Healing Process. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, *25*, 3790, doi:10.3390/ijms25073790.
66. Dai, Y.; Tang, H.; Pang, S. The Crucial Roles of Phospholipids in Aging and Lifespan Regulation. *Front. Physiol.* 2021, *12*, doi:10.3389/fphys.2021.775648.
67. McGrath, B.A.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Kelly, A.L. Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Sci. & Technol.* 2016, *96*, 133–158, doi:10.1007/s13594-015-0258-x.
68. Recio, I.; Fuente, M.A. de la; Juárez, M.; Ramos, M. Bioactive Components in Sheep Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009; pp. 83–104 ISBN 978-0-8138-2150-4.
69. Moatsou, G.; Sakkas, L. Sheep Milk Components: Focus on Nutritional Advantages and Biofunctional Potential. *Small Ruminant Research* 2019, *180*, 86–99, doi:10.1016/j.smallrumres.2019.07.009.
70. Khalil, S.; Bardawil, T.; Stephan, C.; Darwiche, N.; Abbas, O.; Kibbi, A.G.; Nemer, G.; Kurban, M. Retinoids: A Journey from the Molecular Structures and Mechanisms of Action to Clinical Uses in Dermatology and Adverse Effects. *Journal of Dermatological Treatment* 2017, *28*, 684–696, doi:10.1080/09546634.2017.1309349.
71. Oliveira, L. de M.; Teixeira, F.M.E.; Sato, M.N. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation* 2018, *2018*, 3067126, doi:10.1155/2018/3067126.

72. Ferreira, R.; Napoli, J.; Enver, T.; Bernardino, L.; Ferreira, L. Advances and Challenges in Retinoid Delivery Systems in Regenerative and Therapeutic Medicine. *Nat Commun* 2020, *11*, 4265, doi:10.1038/s41467-020-18042-2.
73. Penniston, K.L.; Tanumihardjo, S.A. The Acute and Chronic Toxic Effects of Vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006, *83*, 191–201, doi:10.1093/ajcn/83.2.191.
74. Tanumihardjo, S.A.; Russell, R.M.; Stephensen, C.B.; Gannon, B.M.; Craft, N.E.; Haskell, M.J.; Lietz, G.; Schulze, K.; Raiten, D.J. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Vitamin A Review. *The Journal of Nutrition* 2016, *146*, 1816S–1848S, doi:10.3945/jn.115.229708.
75. Arscott, S.A.; Howe, J.A.; Davis, C.R.; Tanumihardjo, S.A. Carotenoid Profiles in Provitamin A-Containing Fruits and Vegetables Affect the Bioefficacy in Mongolian Gerbils. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010, *235*, 839–848, doi:10.1258/ebm.2010.009216.
76. Khadangi, F.; Azzi, A. Vitamin E – The Next 100 Years. *IUBMB Life* 2019, *71*, 411–415, doi:10.1002/iub.1990.
77. Traber, M.G.; Atkinson, J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radical Biology and Medicine* 2007, *43*, 4–15, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024.
78. Lee, G.Y.; Han, S.N. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients* 2018, *10*, 1614, doi:10.3390/nu10111614.
79. Keen, M.A.; Hassan, I. Vitamin E in Dermatology. *Indian Dermatology Online Journal* 2016, *7*, 311, doi:10.4103/2229-5178.185494.
80. Tsourelis-Nikita, E.; Hercogova, J.; Lotti, T.; Menchini, G. Evaluation of Dietary Intake of Vitamin E in the Treatment of Atopic Dermatitis: A Study of the Clinical Course and Evaluation of the Immunoglobulin E Serum Levels. *International Journal of Dermatology* 2002, *41*, 146–150, doi:10.1046/j.1365-4362.2002.01423.x.
81. Butt, H.; Mehmood, A.; Ali, M.; Tasneem, S.; Tarar, M.N.; Riazuddin, S. Vitamin E Preconditioning Alleviates In vitro Thermal Stress in Cultured Human Epidermal Keratinocytes. *Life Sciences* 2019, *239*, 116972, doi:10.1016/j.lfs.2019.116972.
82. Szymańska, R.; Nowicka, B.; Kruk, J. Vitamin E - Occurrence, Biosynthesis by Plants and Functions in Human Nutrition. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2017, *17*, 1039–1052, doi:10.2174/1389557516666160725094819.
83. Bikle, D.D. Vitamin D Metabolism and Function in the Skin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011, *347*, 80–89, doi:10.1016/j.mce.2011.05.017.

84. Zhao, Y.-C.; Wang, H.-Y.; Li, Y.-F.; Yang, X.-Y.; Li, Y.; Wang, T.-J. The Action of Topical Application of Vitamin B Ointment on Radiodermatitis in a Porcine Model. *International Wound Journal* 2023, 20, 516–528, doi:10.1111/iwj.13899.
85. Temova Rakuša, Ž.; Šenk, A.; Roškar, R. Content and Stability of B Complex Vitamins in Commercial Cosmetic Products. *J Cosmet Dermatol* 2023, 22, 628–636, doi:10.1111/jocd.15321.
86. Janda, K.; Kasprzak, M.; Wolska, J. Vitamin C – structure, properties, occurrence and functions. *Pomeranian Journal of Life Sciences* 2015, 61, doi:10.21164/pomjlifesci.427.
87. Pullar, J.M.; Carr, A.C.; Vissers, M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* 2017, 9, 866, doi:10.3390/nu9080866.
88. Rhie, G.; Shin, M.H.; Seo, J.Y.; Choi, W.W.; Cho, K.H.; Kim, K.H.; Park, K.C.; Eun, H.C.; Chung, J.H. Aging- and Photoaging-Dependent Changes of Enzymic and Nonenzymic Antioxidants in the Epidermis and Dermis of Human Skin *In Vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 2001, 117, 1212–1217, doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01469.x.
89. Pasonen-Seppänen, S.; Suhonen, M.T.; Kirjavainen, M.; Suihko, E.; Urtti, A.; Miettinen, M.; Hyttinen, M.; Tammi, M.; Tammi, R. Vitamin C Enhances Differentiation of a Continuous Keratinocyte Cell Line (REK) into Epidermis with Normal Stratum Corneum Ultrastructure and Functional Permeability Barrier. *Histochem Cell Biol* 2001, 116, 287–297, doi:10.1007/s004180100312.
90. Offord, E.A.; Gautier, J.-C.; Avanti, O.; Scaletta, C.; Runge, F.; Krämer, K.; Applegate, L.A. Photoprotective Potential of Lycopene,  $\beta$ -Carotene, Vitamin E, Vitamin C and Carnosic Acid in UVA-Irradiated Human Skin Fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 2002, 32, 1293–1303, doi:10.1016/S0891-5849(02)00831-6.
91. Pereira, P.C. Milk Nutritional Composition and Its Role in Human Health. *Nutrition* 2014, 30, 619–627, doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
92. Choudhary, S.V.; Gadegone, R.W.; Koley, S. Menkes Kinky Hair Disease. *Indian Journal of Dermatology* 2012, 57, 407, doi:10.4103/0019-5154.100503.
93. Borkow, G. Using Copper to Improve the Well-Being of the Skin. *Current Chemical Biology* 2014, 8, 89–102.
94. Philips, N.; Hwang, H.; Chauhan, S.; Leonardi, D.; Gonzalez, S. Stimulation of Cell Proliferation and Expression of Matrixmetalloproteinase-1 and Interleukin-8 Genes in Dermal Fibroblasts by Copper. *Connective Tissue Research* 2010, 51, 224–229, doi:10.3109/03008200903288431.

95. Olivares, C.; Solano, F. New Insights into the Active Site Structure and Catalytic Mechanism of Tyrosinase and Its Related Proteins. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2009, 22, 750–760, doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00636.x.
96. Godswill, A.G.; Somtochukwu, I.V.; Ikechukwu, A.O.; Kate, E.C. Health Benefits of Micronutrients (Vitamins and Minerals) and Their Associated Deficiency Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Food Sciences* 2020, 3, 1–32, doi:10.47604/ijf.1024.
97. Gupta, M.; Mahajan, V.K.; Mehta, K.S.; Chauhan, P.S. Zinc Therapy in Dermatology: A Review. *Dermatology Research and Practice* 2014, 2014, 709152, doi:10.1155/2014/709152.
98. Bibi Nitzan, Y.; Cohen, A.D. Zinc in Skin Pathology and Care. *Journal of Dermatological Treatment* 2006, 17, 205–210, doi:10.1080/09546630600791434.
99. Lin, P.-H.; Sermersheim, M.; Li, H.; Lee, P.H.U.; Steinberg, S.M.; Ma, J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients* 2018, 10, 16, doi:10.3390/nu10010016.
100. Fine, J.-D.; Tamura, T.; Johnson, L. Blood Vitamin and Trace Metal Levels in Epidermolysis Bullosa. *Archives of Dermatology* 1989, 125, 374–379, doi:10.1001/archderm.1989.01670150064009.
101. Ewing, C.I.; Gibbs, A.C.; Ashcroft, C.; David, T.J. Failure of Oral Zinc Supplementation in Atopic Eczema. *Eur J Clin Nutr* 1991, 45, 507–510.
102. PN ISO 1444: 2000 Meat and Meat Products - dostęp online: [https://infostore.saiglobal.com/en-gb/standards/pn-iso-1444-2000-926297\\_saig\\_pkn\\_pkn\\_2185591/](https://infostore.saiglobal.com/en-gb/standards/pn-iso-1444-2000-926297_saig_pkn_pkn_2185591/) (28.10.2022).
103. *PN-EN ISO 12966-1:2015-01/AC*; Polski Komitet Normalizacyjny, 2015;
104. EN ISO 8968-1:2014 - Milk and Milk Products - Determination of Nitrogen Content - Part 1: Kjeldahl Principle and Crude Protein Calculation (ISO 8968-1:2014) Available online: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/0532d3e0-84f0-4e03-8dc4-d75d5897ec6f/en-iso-8968-1-2014> (dostęp: 28.10.2022).
105. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* 1999, 26, 1231–1237, doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
106. Wilczynska, A. Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2009, 42, 870–874.
107. Bersuder, P.; Hole, M.; Smith, G. Antioxidants from a Heated Histidine-Glucose Model System. I: Investigation of the Antioxidant Role of Histidine and Isolation of Antioxidants

- by High-Performance Liquid Chromatography. *J Amer Oil Chem Soc* 1998, 75, 181–187, doi:10.1007/s11746-998-0030-y.
108. Oussaief, O.; Jrad, Z.; Adt, I.; Dbara, M.; Khorchani, T.; El-Hatmi, H. Antioxidant Activities of Enzymatic-Hydrolysed Proteins of Dromedary (*Camelus Dromedarius*) Colostrum. *International Journal of Dairy Technology* 2020, 73, 333–340, doi:10.1111/1471-0307.12668.
109. Salar, S.; Jafarian, S.; Mortazavi, A.; Nasiraie, L.R. Effect of Hurdle Technology of Gentle Pasteurisation and Drying Process on Bioactive Proteins, Antioxidant Activity and Microbial Quality of Cow and Buffalo Colostrum. *International Dairy Journal* 2021, 121, 105138, doi:10.1016/j.idairyj.2021.105138.
110. Choi, D.; Min, S.-G.; Jo, Y.-J. Functionality of Porcine Skin Hydrolysates Produced by Hydrothermal Processing for Liposomal Delivery System. *Journal of Food Biochemistry* 2018, 42, e12464, doi:10.1111/jfbc.12464.
111. Hong, G.-P.; Min, S.-G.; Jo, Y.-J. Anti-Oxidative and Anti-Aging Activities of Porcine By-Product Collagen Hydrolysates Produced by Commercial Proteases: Effect of Hydrolysis and Ultrafiltration. *Molecules* 2019, 24, 1104, doi:10.3390/molecules24061104.
112. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* 2012, 9, 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089.
113. Suarez-Arnedo, A.; Figueroa, F.T.; Clavijo, C.; Arbeláez, P.; Cruz, J.C.; Muñoz-Camargo, C. An Image J Plugin for the High Throughput Image Analysis of in Vitro Scratch Wound Healing Assays. *PLOS ONE* 2020, 15, e0232565, doi:10.1371/journal.pone.0232565.
114. Wendorff, W. I.; Haenlein, G.F.W. Sheep Milk – Composition and Nutrition. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*; John Wiley & Sons, Ltd, 2017; pp. 210–221 ISBN 978-1-119-11031-6.
115. Kessler, E.C.; Bruckmaier, R.M.; Gross, J.J. Immunoglobulin G Content and Colostrum Composition of Different Goat and Sheep Breeds in Switzerland and Germany. *J Dairy Sci* 2019, 102, 5542–5549, doi:10.3168/jds.2018-16235.
116. Guiso, M.F.; Battacone, G.; Canu, L.; Deroma, M.; Langasco, I.; Sanna, G.; Tsiplakou, E.; Pulina, G.; Nudda, A. Essential and Toxic Mineral Content and Fatty Acid Profile of Colostrum in Dairy Sheep. *Animals* 2022, 12, 2730, doi:10.3390/ani12202730.
117. Cesarani, A.; Gaspa, G.; Correddu, F.; Cellesi, M.; Dimauro, C.; Macciotta, N.P.P. Genomic Selection of Milk Fatty Acid Composition in Sarda Dairy Sheep: Effect of Different Phenotypes and Relationship Matrices on Heritability and Breeding Value Accuracy. *Journal of Dairy Science* 2019, 102, 3189–3203, doi:10.3168/jds.2018-15333.

118. Correddu, F.; Cesarani, A.; Dimauro, C.; Gaspa, G.; Macciotta, N.P.P. Principal Component and Multivariate Factor Analysis of Detailed Sheep Milk Fatty Acid Profile. *Journal of Dairy Science* 2021, *104*, 5079–5094, doi:10.3168/jds.2020-19087.
119. Wilms, J.N.; Hare, K.S.; Fischer-Tlustos, A.J.; Vahmani, P.; Dugan, M.E.R.; Leal, L.N.; Steele, M.A. Fatty Acid Profile Characterization in Colostrum, Transition Milk, and Mature Milk of Primi- and Multiparous Cows during the First Week of Lactation. *Journal of Dairy Science* 2022, *105*, 4692–4710, doi:10.3168/jds.2022-20880a.
120. Mieremet, A.; Helder, R.; Nadaban, A.; Gooris, G.; Boiten, W.; El Ghalbzouri, A.; Bouwstra, J.A. Contribution of Palmitic Acid to Epidermal Morphogenesis and Lipid Barrier Formation in Human Skin Equivalents. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, *20*, 6069, doi:10.3390/ijms20236069.
121. Kovács, D.; Camera, E.; Póliska, S.; Cavallo, A.; Maiellaro, M.; Dull, K.; Gruber, F.; Zouboulis, C.C.; Szegedi, A.; Törőcsik, D. Linoleic Acid Induced Changes in SZ95 Sebocytes—Comparison with Palmitic Acid and Arachidonic Acid. *Nutrients* 2023, *15*, 3315, doi:10.3390/nu15153315.
122. Sheng, Y.; Sun, X.; Han, J.; Hong, W.; Feng, J.; Xie, S.; Li, Y.; Yan, F.; Li, K.; Tian, B. N-Acetylcysteine Functionalized Chitosan Oligosaccharide-Palmitic Acid Conjugate Enhances Ophthalmic Delivery of Flurbiprofen and Its Mechanisms. *Carbohydrate Polymers* 2022, *291*, 119552, doi:10.1016/j.carbpol.2022.119552.
123. Zhou, B.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Permatasari, F.; Xu, Y.; Wu, D.; Yin, Z.; Luo, D. Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Cytokines Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$ , and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  via a NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism in HaCaT Keratinocytes. *Mediators of Inflammation* 2013, *2013*, 530429, doi:10.1155/2013/530429.
124. Danby, S.G.; AlEnezi, T.; Sultan, A.; Lavender, T.; Chittock, J.; Brown, K.; Cork, M.J. Effect of Olive and Sunflower Seed Oil on the Adult Skin Barrier: Implications for Neonatal Skin Care. *Pediatric Dermatology* 2013, *30*, 42–50, doi:10.1111/j.1525-1470.2012.01865.x.
125. Danby, S.G.; Andrew, P.V.; Taylor, R.N.; Kay, L.J.; Chittock, J.; Pinnock, A.; Ulhaq, I.; Fasth, A.; Carlander, K.; Holm, T.; et al. Different Types of Emollient Cream Exhibit Diverse Physiological Effects on the Skin Barrier in Adults with Atopic Dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology* 2022, *47*, 1154–1164, doi:10.1111/ced.15141.
126. Olejnik, A.; Gornowicz-Porowska, J.; Jenerowicz, D.; Polańska, A.; Dobrzyńska, M.; Przystański, J.; Sansone, A.; Ferreri, C. Fatty Acids Profile and the Relevance of Membranes as the Target of Nutrition-Based Strategies in Atopic Dermatitis: A Narrative Review. *Nutrients* 2023, *15*, 3857, doi:10.3390/nu15173857.

127. Jiang, S.J.; Zhou, X.J. Examination of the Mechanism of Oleic Acid-Induced Percutaneous Penetration Enhancement: An Ultrastructural Study. *Biol Pharm Bull* 2003, *26*, 66–68, doi:10.1248/bpb.26.66.
128. Mack Correa, M.C.; Mao, G.; Saad, P.; Flach, C.R.; Mendelsohn, R.; Walters, R.M. Molecular Interactions of Plant Oil Components with Stratum Corneum Lipids Correlate with Clinical Measures of Skin Barrier Function. *Exp Dermatol* 2014, *23*, 39–44, doi:10.1111/exd.12296.
129. Simard, M.; Tremblay, A.; Morin, S.; Martin, C.; Julien, P.; Fradette, J.; Flamand, N.; Pouliot, R.  $\alpha$ -Linolenic Acid and Linoleic Acid Modulate the Lipidome and the Skin Barrier of a Tissue-Engineered Skin Model. *Acta Biomaterialia* 2022, *140*, 261–274, doi:10.1016/j.actbio.2021.11.021.
130. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Gröne, H.-J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J.A.; Sandhoff, R. 1-O-Acylceramides Are Natural Components of Human and Mouse Epidermis[S]. *Journal of Lipid Research* 2013, *54*, 3312–3321, doi:10.1194/jlr.M040097.
131. Breiden, B.; Sandhoff, K. The Role of Sphingolipid Metabolism in Cutaneous Permeabilitybarrier Formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2014, *1841*, 441–452, doi:10.1016/j.bbalip.2013.08.010.
132. Hansen, H.S.; Jensen, B. Essential Function of Linoleic Acid Esterified in Acylglucosylceramide and Acylceramide in Maintaining the Epidermal Water Permeability Barrier. Evidence from Feeding Studies with Oleate, Linoleate, Arachidonate, Columbinat and  $\alpha$ -Linolenate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1985, *834*, 357–363, doi:10.1016/0005-2760(85)90009-8.
133. Burr, G.O.; Burr., M.M. A New Deficiency Disease Produced by the Rigid Exclusion of Fat from the Diet. *Nutrition Reviews* 1973, *31*, 148–149, doi:10.1111/j.1753-4887.1973.tb06008.x.
134. Zouboulis, C.C.; Baron, J.M.; Böhm, M.; Kippenberger, S.; Kurzen, H.; Reichrath, J.; Thielitz, A. Frontiers in Sebaceous Gland Biology and Pathology. *Exp Dermatol* 2008, *17*, 542–551, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00725.x.
135. Lovászi, M.; Mattii, M.; Eyerich, K.; Gács, A.; Csányi, E.; Kovács, D.; Rühl, R.; Szegedi, A.; Kemény, L.; Stähle, M.; et al. Sebum Lipids Influence Macrophage Polarization and Activation. *British Journal of Dermatology* 2017, *177*, 1671–1682, doi:10.1111/bjd.15754.
136. Ottaviani, M.; Camera, E.; Picardo, M. Lipid Mediators in Acne. *Mediators Inflamm* 2010, *2010*, 858176, doi:10.1155/2010/858176.

137. Downing, D.T.; Stewart, M.E.; Wertz, P.W.; Strauss, J.S. Essential Fatty Acids and Acne. *J Am Acad Dermatol* 1986, *14*, 221–225, doi:10.1016/s0190-9622(86)70025-x.
138. Letawe, C; Boone, M; Piérard, G.E. Digital Image Analysis of the Effect of Topically Applied Linoleic Acid on Acne Microcomedones. *Clinical and Experimental Dermatology* 1998, *23*, 56–58, doi:10.1046/j.1365-2230.1998.00315.x.
139. Stobiecka, M.; Król, J.; Brodziak, A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals* 2022, *12*, 245, doi:10.3390/ani12030245.
140. Cichosz, G.; Hanna, C.; Adam, A.; Magdalena, B.M. Natural Antioxidants in Milk and Dairy Products. *International Journal of Dairy Technology* 2017, *70*, 165–178, doi:10.1111/1471-0307.12359.
141. El-Fattah, A.A.; Azzam, M.; Elkashef, H.; Elhadydy, A. Antioxidant Properties of Milk: Effect of Milk Species, Milk Fractions and Heat Treatments. *International J. of Dairy Science* 2019, *15*, 1–9, doi:10.3923/ijds.2020.1.9.
142. Ashokbhai, J.K.; Basaiawmoit, B.; Sakure, A.; Das, S.; Patil, G.B.; Mankad, M.; Hati, S. Purification and Characterization of Antioxidative and Antimicrobial Peptides from Lactic-Fermented Sheep Milk. *J Food Sci Technol* 2022, *59*, 4262–4272, doi:10.1007/s13197-022-05493-2.
143. Schurink, M.; van Berkel, W.J.H.; Wichers, H.J.; Boeriu, C.G. Novel Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity. *Peptides* 2007, *28*, 485–495, doi:10.1016/j.peptides.2006.11.023.
144. Kong, S.; Choi, H.-R.; Kim, Y.-J.; Lee, Y.-S.; Park, K.-C.; Kwak, S.-Y. Milk Protein-Derived Antioxidant Tetrapeptides as Potential Hypopigmenting Agents. *Antioxidants (Basel)* 2020, *9*, 1106, doi:10.3390/antiox9111106.
145. Jogi, R.; Tager, M.J.; Perez, D.; Tsapekos, M. Bovine Colostrum, Telomeres, and Skin Aging. *J Drugs Dermatol* 2021, *20*, 538–545, doi:10.36849/JDD.5851.
146. Zava, S.; Barello, C.; Pessione, A.; Garoffo, L.P.; Fattori, P.; Montorfano, G.; Conti, A.; Giunta, C.; Pessione, E.; Berra, B.; et al. Mare's Colostrum Globules Stimulate Fibroblast Growth in Vitro: A Biochemical Study. *J Med Food* 2009, *12*, 836–845, doi:10.1089/jmf.2008.0139.
147. Shi, S.; Li, Q.; Liu, Y.; Zhang, R.; Chen, H. SPARC Promotes Fibroblast Proliferation, Migration, and Collagen Production in Keloids by Inactivation of P53. *Journal of Dermatological Science* 2023, *109*, 2–11, doi:10.1016/j.jdermsci.2023.01.002.



148. Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Picardo, M.; Cardinali, G. Bovine Colostrum Induces the Differentiation of Human Primary Keratinocytes. *The FASEB Journal* 2020, *n/a*, doi:10.1096/fj.201900103RRR.
149. Flis, Z.; Szatkowski, P.; Pielichowska, K.; Molik, E. The Potential of Sheep or Camel Milk Constituents to Contribute to Novel Dressings for Diabetic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, *24*, 17551, doi:10.3390/ijms242417551.
150. Kshirsagar, A.Y.; Vekariya, M.A.; Gupta, V.; Pednekar, A.S.; Mahna, A.; Patankar, R.; Shaikh, A.; Nagur, B. A Comparative Study of Colostrum Dressing Versus Conventional Dressing in Deep Wounds. *J Clin Diagn Res* 2015, *9*, PC01–PC04, doi:10.7860/JCDR/2015/12004.5739.
151. Sun, X.; Kaufman, P.D. Ki-67: More than a Proliferation Marker. *Chromosoma* 2018, *127*, 175–186, doi:10.1007/s00412-018-0659-8.
152. La Russa, D.; Di Santo, C.; Lizasoain, I.; Moraga, A.; Bagetta, G.; Amantea, D. Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ -Stimulated Gene 6 (TSG-6): A Promising Immunomodulatory Target in Acute Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, *24*, 1162, doi:10.3390/ijms24021162.
153. Voza, F.A.; Huerta, C.T.; Le, N.; Shao, H.; Ribieras, A.; Ortiz, Y.; Atkinson, C.; Machuca, T.; Liu, Z.-J.; Velazquez, O.C. Fibroblasts in Diabetic Foot Ulcers. *Int J Mol Sci* 2024, *25*, 2172, doi:10.3390/ijms25042172.
154. Theocharidis, G.; Thomas, B.E.; Sarkar, D.; Mumme, H.L.; Pilcher, W.J.R.; Dwivedi, B.; Sandoval-Schaefer, T.; Sîrbulescu, R.F.; Kafanas, A.; Mezghani, I.; et al. Single Cell Transcriptomic Landscape of Diabetic Foot Ulcers. *Nat Commun* 2022, *13*, 181, doi:10.1038/s41467-021-27801-8.
155. Mehra, R.; Singh, R.; Nayan, V.; Buttar, H.S.; Kumar, N.; Kumar, S.; Bhardwaj, A.; Kaushik, R.; Kumar, H. Nutritional Attributes of Bovine Colostrum Components in Human Health and Disease: A Comprehensive Review. *Food Bioscience* 2021, *40*, 100907, doi:10.1016/j.fbio.2021.100907.
156. Palma, L.; Marques, L.T.; Bujan, J.; Rodrigues, L.M. Dietary Water Affects Human Skin Hydration and Biomechanics. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2015, *8*, 413–421, doi:10.2147/CCID.S86822.
157. Zhang, J.; Yu, H.; Man, M.; Hu, L. Aging in the Dermis: Fibroblast Senescence and Its Significance. *Aging Cell* 2023, *23*, e14054, doi:10.1111/accel.14054.

158. Takayama, Y.; Kitsunai, K.; Mizumachi, K. Factors in Bovine Colostrum That Enhance the Migration of Human Fibroblasts in Type I Collagen Gels. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2001, *65*, 2776–2779, doi:10.1271/bbb.65.2776.
159. Del Rosso, J.Q.; Levin, J. The Clinical Relevance of Maintaining the Functional Integrity of the Stratum Corneum in Both Healthy and Disease-Affected Skin. *J Clin Aesthet Dermatol* 2011, *4*, 22–42.
160. Dull, K.; Lénárt, K.; Dajnoki, Z.; Póliska, S.; Uchiyama, E.; Hendrik, Z.; Szegedi, A.; Törőcsik, D. Barrier Function-Related Genes and Proteins Have an Altered Expression in Acne-Involved Skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2023, *37*, 1415–1425, doi:10.1111/jdv.19062.
161. Yamamoto, A.; Takenouchi, K.; Ito, M. Impaired Water Barrier Function in Acne Vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1995, *287*, 214–218, doi:10.1007/BF01262335.
162. Mueller, E.A.; Trapp, S.; Frentzel, A.; Kirch, W.; Brantl, V. Efficacy and Tolerability of Oral Lactoferrin Supplementation in Mild to Moderate Acne Vulgaris: An Exploratory Study. *Curr Med Res Opin* 2011, *27*, 793–797, doi:10.1185/03007995.2011.557720.
163. Choi, C.W.; Choi, J.W.; Park, K.C.; Youn, S.W. Facial Sebum Affects the Development of Acne, Especially the Distribution of Inflammatory Acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013, *27*, 301–306, doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04384.x.
164. Kim, J.; Ko, Y.; Park, Y.-K.; Kim, N.-I.; Ha, W.-K.; Cho, Y. Dietary Effect of Lactoferrin-Enriched Fermented Milk on Skin Surface Lipid and Clinical Improvement of Acne Vulgaris. *Nutrition* 2010, *26*, 902–909, doi:10.1016/j.nut.2010.05.011.
165. Kuhara, T.; Yamauchi, K.; Tamura, Y.; Okamura, H. Oral Administration of Lactoferrin Increases NK Cell Activity in Mice via Increased Production of IL-18 and Type I IFN in the Small Intestine. *J Interferon Cytokine Res* 2006, *26*, 489–499, doi:10.1089/jir.2006.26.489.
166. Wakabayashi, H.; Uchida, K.; Yamauchi, K.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H.; Yamaguchi, H. Lactoferrin given in Food Facilitates Dermatophytosis Cure in Guinea Pig Models. *J Antimicrob Chemother* 2000, *46*, 595–602, doi:10.1093/jac/46.4.595.
167. Wakabayashi, H.; Kurokawa, M.; Shin, K.; Teraguchi, S.; Tamura, Y.; Shiraki, K. Oral Lactoferrin Prevents Body Weight Loss and Increases Cytokine Responses during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2004, *68*, 537–544, doi:10.1271/bbb.68.537.
168. Chan, H.; Chan, G.; Santos, J.; Dee, K.; Co, J.K. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Efficacy and Safety of Lactoferrin with Vitamin E and

Zinc as an Oral Therapy for Mild to Moderate Acne Vulgaris. *Int J Dermatol* 2017, 56, 686–690, doi:10.1111/ijd.13607.

169. Park, J.W.; Hwang, S.R.; Yoon, I.-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules* 2017, 22, 1259, doi:10.3390/molecules22081259.

## Wykaz tabel


Tabela 1. Skład colostrum bydlęcego, koziego i owczego (%) .....	8
Tabela 2. Formulacja kremu z colostrum.....	15
Tabela 3. Zawartość (%) kwasów tłuszczowych w colostrum owczym.....	24
Tabela 4. Aktywność antyoksydacyjna colostrum owczego metody ABTS i DPPH.....	26
Tabela 5. Zmiany parametrów skóry po ośmiu tygodniach leczenia w grupach używających kremu z colostrum i placebo w postaci kremu bazowego, wyrażone jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe.....	36
Tabela 6. Zmiany parametrów skóry po ośmiu tygodniach leczenia wyrażone jako średnia $\pm$ SD oraz mediana.....	41
Tabela 7 (a i b). Dane dotyczące subiektywnej oceny uczestników w zakresie poprawy badanych parametrów.....	43

## Wykaz wykresów i rycin

Wykres 1. Procent inhibicji rodnika ABTS przez colostrum owcze w czasie.....	27
Wykres 2. Wpływ colostrum na żywotność fibroblastów skóry ludzkiej 1BR.3.N .....	29
Wykres 3. Wpływ colostrum na żywotność keratynocytów z naskórka noworodków.....	29
Wykres 4. Wpływ colostrum na żywotność fibroblastów pochodzących od pacjentów (dHF) z owrzodzeniami stopy cukrzycowej.....	30
Wykres 5. Wyniki testu zamykania rany dla komórek dHF stymulowanych colostrum owczym.....	32
Wykres 6. Ekspresja genów Ki67, IL-6, PTGS-2 i TSG-6 w komórkach dHF po 48-godzinnym traktowaniu colostrum owczym.....	33
Wykres 7. Wyniki oceny fotografii wykonanych przed i po badaniu.....	37
Wykres 8. Odsetek osób które odnotowały poprawę parametrów skóry po 8 tygodniach stosowania kremu placebo i kremu z colostrum.....	38
Wykres 9. Procent uczestników, którzy zadeklarowali poprawę (niebieski), brak zmiany (szary) i pogorszenie (granatowy) w zakresie zmian skórnych.....	44
Rycina 1. Wyniki testu zamykania rany dla komórek dHF stymulowanych colostrum owczym. Reprezentatywne fotografie ran w trzech wybranych punktach czasowych.....	32

## Załączniki

### Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/128/2019).

	<b>Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym</b>
	Tel.: 022/ 57 - 20 -303 Fax: 022/ 57 - 20 -165
e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl	

---

**KB/128/2019**

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
w dniu 24 czerwca 2019 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

**Dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska**  
Klinika Diabetologii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt : „ Ocena bezpieczeństwa i skuteczności leczenia ran przewlekłych w zespole stopy cukrzycowej z użyciem allogenicznych komórek macierzystych, izolowanych z tkanki tłuszczowej .”

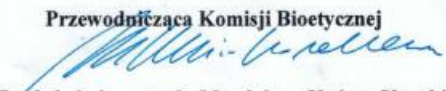
**wyraża następującą  
opinię**

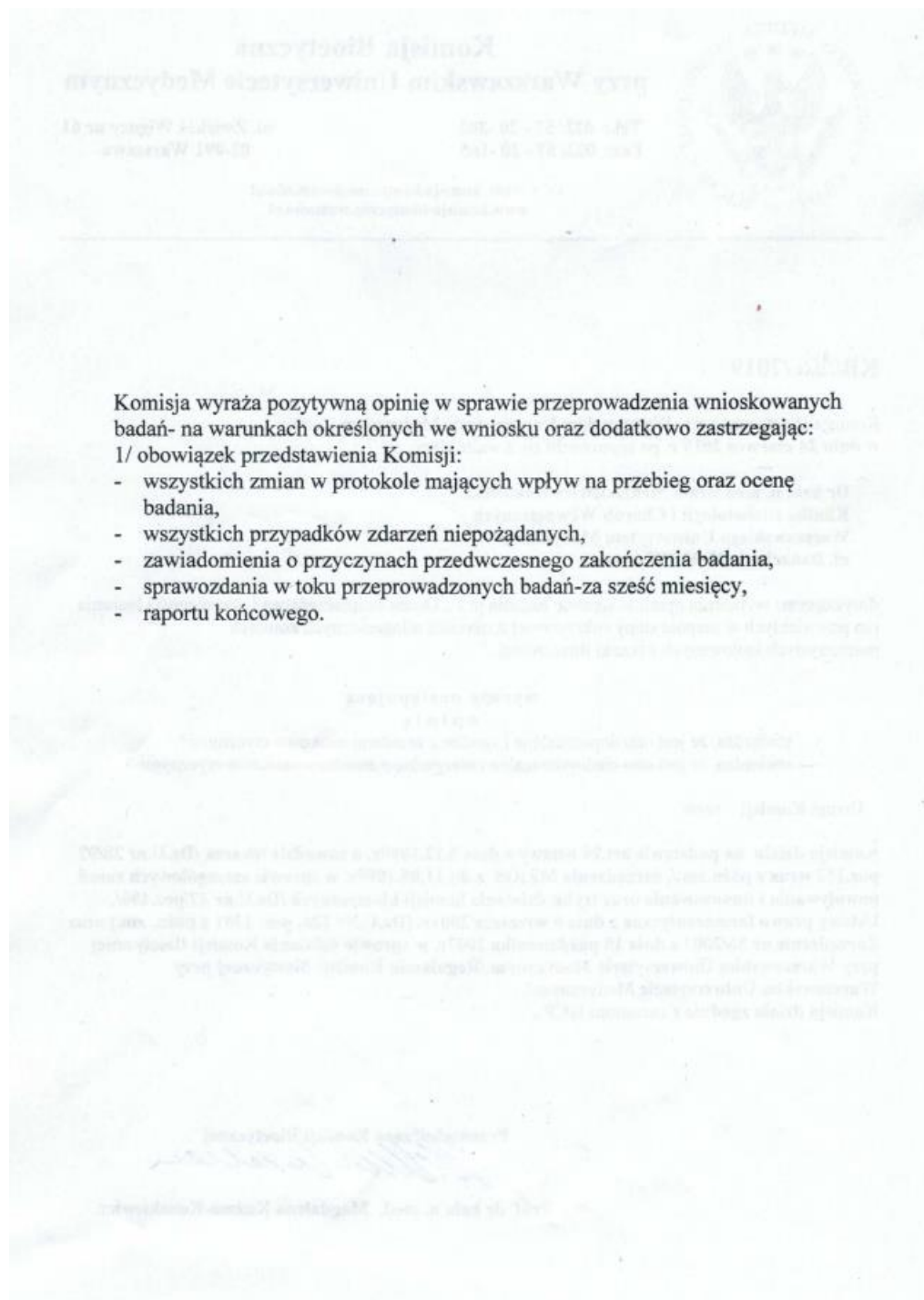
- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*

**Uwagi Komisji – verte**

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

**Przewodnicząca Komisji Bioetycznej**  
  
**Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz**





## Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

**KB/3/A2021**

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
w dniu 18 stycznia 2021 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

**Dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska**  
**Klinika Diabetologii i Chorób Wewnętrznych**  
**Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**  
**ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa**

**dotyczącym:** akceptacji zmian w dokumentacji obejmujących:

-Protokół badania wersja 2.0 z 23.12.2020

do badania pt. „ Ocena bezpieczeństwa i skuteczności leczenia ran przewlekłych w zespole stopy cukrzycowej z użyciem allogenicznych komórek macierzystych,izolowanych z tkanki tłuszczowej .”

### wyraża następującą opinię

- stwierdza, że są one dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- stwierdza, że są one niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*

**Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.**

**Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .**

W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

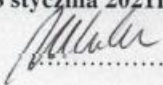
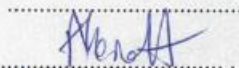
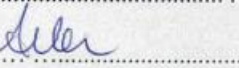
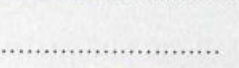
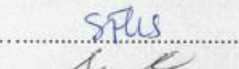
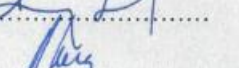
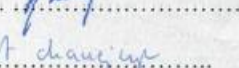
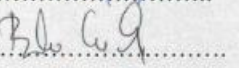




Przewodniczący Komisji Bioetycznej

  
Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

\*niepotrzebne skreślić



strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim  
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....~~3.19~~..... z dnia 18 stycznia 2021r.

1. Prof. dr hab. n.mcd. Magdalcna Kuźma –Kozakiewicz 
2. Dr hab. n. med. Tomasz Grzela 
3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk 
4. Dr hab. n. med. Urszula Ambroziak 
5. Dr hab. n.med. Maciej Siński 
6. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis 
7. Prof. dr hab.n.med Tomasz Jakimowicz 
8. Dr n. med. Leszek Kraj 
9. Mec. Danuta Lewandowska 
10. Dr n .farm. Agata Maciejczyk 
11. Dr hab. n.med. Barbara Grzechocińska 
- ....
12. Dr n. med. Artur Hącia 
13. Mgr Anna Iasińska 

**Lista obecności  
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej  
w dniu 18 stycznia 2021**

1. Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz
2. Dr hab. n. med. Tomasz Grzela
3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk
4. Dr hab. n. med. Urszula Ambroziak
5. Dr hab. n.med. Maciej Siński
6. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis
7. Prof. dr hab.n.med Tomasz Jakimowicz
8. Dr n. med. Leszek Kraj
- 9.Mec. Danuta Lewandowska
10. Dr n .farm. Agata Maciejczyk
11. Dr hab. n.med. Barbara Grzechocińska
- ....
12. Dr n. med. Artur Hącia
13. Mgr Anna Jasińska
- 14.Iwona Siudalska

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....

**SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ  
przy WARSZAWSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM, ul. Żwirki i Wigury 61  
w dniu 18 stycznia 2021r.**

1. Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma Kozakiewicz-Przewodnicząca KB  
Katedra i Klinika Neurologii  
ul. Banacha 1a,  
02-097 Warszawa  
specjalizacja: neurologia
2. Dr hab. n.med. Tomasz Grzela -nieobecny  
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
ul. Chałubińskiego 5,  
02-004 Warszawa  
specjalizacja: chirurgia i immunologia
3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk  
Klinika Pediatrii  
ul. Żwirki i Wigury 63a,  
02-091 Warszawa  
specjalizacja: pediatria
4. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis  
Zakład Farmakologii  
ul. Chełmska 30/34  
00-725 Warszawa  
specjalizacja: biolog, n. farmaceutyczne
5. Mec. Danuta Lewandowska  
specjalizacja: prawnik
6. Dr hab. n. med. Barbara Grzechocińska  
I Klinika Położnictwa i Ginekologii  
Pl. Starynkiewicza 1/3  
02-015 Warszawa  
Specjalizacja: ginekolog
7. Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Tomasz Jakimowicz  
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej,  
Naczyniowej i Transplantacyjnej  
ul. Banacha 1a  
02-097 Warszawa  
Specjalizacja: chirurgia ogólna, chirurgia naczyniowa, transplantologia kliniczna
8. Dr hab. n. med. Maciej Siński -nieobecny  
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii  
ul. Banacha 1a,  
02-097 Warszawa  
specjalizacja: kardiologia, choroby wewnętrzne

9. Dr n. farm. Agata Maciejczyk  
Specjalizacja: farmaceutka
10. Dr n. med., dr n. teol. Artur Hącia  
Kolegium Fizjologiczno-Teologiczne OO. Dominikanów w Krakowie  
Mazowiecki Szpital Wojewódzki „Drewnica”  
ul. Rychlińskiego 1,  
05-091 Ząbki  
specjalizacja: psychiatria, duchowny
11. Dr n. med. Leszek Kraj  
Klinika Onkologii,  
ul. Banacha 1a,  
02-097 Warszawa  
specjalizacja: onkologia kliniczna,
12. Dr hab. n. med. Urszula Ambroziak  
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii  
ul. Banacha 1a,  
02-097 Warszawa  
specjalizacja: endokrynologia, choroby wewnętrzne
13. Mgr Anna Jasińska  
specjalizacja: pielęgniarka
14. inż. Iwona Siudalska -sekretarz  
Sekretariat Komisji Bioetycznej  
Tel.22 5720303  
ul. ul. Żwirki I Wigury 61,  
02-091 Warszawa

**Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (RNN/13/22/KE).**

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W ŁODZI  
Pl. Hallera 1B, 90-647 Łódź, tel. 0 785 911 596, 42 272-52-43, [bioetyka@umed.lodz.pl](mailto:bioetyka@umed.lodz.pl)

**UCHWAŁA**  
**KOMISJI BIOETYCZNEJ O PROJEKCIE EKSPERYMENTU MEDYCZNEGO**  
**Numer RNN/13/22/KE z dnia 11 stycznia 2022 r.**

*(przy korespondencji dotyczącej niniejszej decyzji prosimy powoływać się każdorazowo na powyższy numer i datę Uchwały)*

**Główny badacz i wykonawca:**

**Dr n.med. Anna Erkiert – Polgaj, mgr inż. Kinga Kazimierska**, Zakład Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej, Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, Katedra Kosmetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

**Tytuł badania:**

**Ocena wpływu preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na wybrane parametry skóry z objawami starzenia.**

Na podstawie ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t. j. Dz. U. z 2020 r. poz. 514, z późn. zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad, powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. nr 47 poz. 480), zarządzenia nr 8/2015 z 16 lutego 2015 r. z późn. zm. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie wprowadzenia Regulaminu pracy Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz zarządzenia nr 87/2020 z dnia 14 września 2020 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie powołania Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi po przeanalizowaniu wniosku, zapoznaniu się z projektem opinii dotyczącej zgłoszonego badania, w głosowaniu tajnym, Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (wypełniając zobowiązania ICH GCP) uchwała, co następuje:

**§ 1**

1. Opiniuje wniosek **pozytywne, bez zastrzeżeń**, na podstawie złożonych dokumentów, których wykaz określa załącznik nr 1. Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

**§ 2**

Opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu. Każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, zdarzeniach niepożądanych oraz nieprzewidzianych okolicznościach.

*Odwołanie od niniejszej uchwały wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi do Odwoławczej Komisji Bioetycznej, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały wyrażającej opinię.*

Przewodniczący Komisji Bioetycznej  
przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

prof.dr hab.n.med. Józef Drzewoski

Lista obecności na posiedzeniu Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi  
w dniu 11 stycznia 2022 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Zawód, specjalność	Miejsce pracy	Podpis
1.	Prof. dr hab. n. med. Józef Drzewoski Przewodniczący Komisji	Lekarz medycyny, internista, diabetolog farmakolog kliniczny	Emerytowany profesor Uniwersytetu Medycznego w Łodzi	
2.	Ks. dr hab. Jan Wolski Z-ca Przewodniczącego Komisji	Duchowny, bioetyk	Wyższe Seminarium Duchowne w Łodzi	
3.	Prof. dr hab. n. med. Andrzej Głabiński	Lekarz medycyny, neurolog	Klinika Neurologii i Udarów Mózgu UM w Łodzi	
4.	Prof. dr hab. n. med. Iwona Kłoszewska	Lekarz medycyny psychiatra	Klinika Psychiatrii Wieku Podeszłego i Zaburzeń Psychotycznych UM w Łodzi	
5.	Prof. dr hab. n. med. Agata Karowicz-Bilińska	Lekarz medycyny położnik, ginekolog	Klinika Patologii Ciąży i Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi	
6.	Prof. dr hab. n. med. Janusz Piekarski	Lekarz medycyny, chirurg onkolog	Klinika Chirurgii Onkologicznej UM w Łodzi	
7.	Prof. dr hab. n. med. Henryk Stepień	Lekarz medycyny, endokrynologia	Zakład Immunoendokrynologii UM w Łodzi	
8.	Dr hab. n. med. prof. UM Marta Woldańska- Okońska	Rehabilitacja medyczna	Klinika Rehabilitacji i Medycyny Fizykalnej UM w Łodzi	
9.	Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman	Lekarz medycyny, pediatria, immunologia kliniczna	Klinika Pediatrii, Kardiologii Prewencyjnej i Immunologii Wieków Rozwojowego UM w Łodzi	
10.	Dr n. praw. Rafał Budzisz	Prawnik	Uniwersytet Łódzki w Łodzi	
11.	Dr n. med. Beata Barwińska	Pielęgniarka	Wojewódzka Stacja Ratownictwa Medycznego W Łodzi	
12.	Mgr Elżbieta Piotrowska- Rutkowska	Farmaceutka	Naczelna Izba Aptekarska, ul. Długa 16 w Warszawie	
13.	Dr n. med. Elżbieta Jaszczuk	Lekarz medycyny, anestezjologia i intensywna terapia	Przedstawicielka Okręgowej Rady Lekarskiej w Łodzi	

**Załącznik 3. Ankieta subiektywnej oceny stanu skóry – osoby ze skórą dojrzałą.**

**Ankieta przed zastosowaniem kremu z colostrum**

Imię i nazwisko:.....

Wiek:.....

**INSTRUKCJA:**

*Bardzo prosimy o zaznaczenie swoich odpowiedzi we właściwych kratkach za pomocą znaku X lub V*

1. Proszę ocenić stan Pani/Pana skóry:

STWIERDZENIA	Zdecydowanie tak	Bardzo	Srednio	Trochę	Zdecydowanie nie
	5	4	3	2	1
Zmarszczki płytkie/powierzchniowe					
Zmarszczki głębokie					
Przebarwieniami posłoneczne i pozapalne					
koloryt skóry wyrównany					
skóra jest zregenerowana					
skóra w dobrej kondycji					
skóra jest gładka i delikatna					
nawilżona:					
natłuszczona					
miękka					
rozświetlona					
jedwabista					
elastyczna/jędrna					
szorstka					
ściągnięta					
zaczerwieniona					
nadwrażliwa/tkliwa					

**Ankieta po 8 tygodniach stosowania kremu z colostrum**

Imię i nazwisko:.....

Wiek:.....

**INSTRUKCJA:**

- *Bardzo prosimy o zaznaczenie swoich odpowiedzi we właściwych kratkach za pomocą znaku X lub V.*

1. Proszę ocenić stan Pani skóry po 8 tygodniach stosowania kremu:

STWIERDZENIA	Zdecydowa nie tak	Bardzo	Średnio	Trochę	Zdecydo wanie nie	Nie dotyczy
	5	4	3	2	1	
<b>Moja skóra posiada:</b>						
Zmarszczki płytkie/powierzchniowe						
Zmarszczki głębokie						
Przebarwieniami posłoneczne i pozapalne						
Koloryt skóry jest wyrównany						
<b>Moja skóra jest:</b>						
zregenerowana						
w dobrej kondycji						
gładka i delikatna						
nawilżona						
natuszczona						
miękką						
rozświetlona						
jedwabista						
elastyczna/jędrna						
szorstka						
ściągnięta						
zaczerwieniona						
nadwrażliwa/tkliwa						

Czy poleciliby Pani ten preparat innej osobie?

tak           ↑  
nie            ↑



2. Proszę ocenić formę aplikacji kremu (opakowanie) :

OPINIA	Zdecydowanie tak	Tak	Nie potrafię ocenić	Raczej nie	Zdecydowanie nie
krem jest łatwy w aplikacji:					
krem dobrze się dozuje z pojemnika:					
1 doza (pompka) kremu wystarcza na aplikację na całą twarz:					
krem roluje się („wałkuje”) na skórze:					
zapach kremu podoba mi się:					
krem zmienił kolor w trakcie stosowania:					
krem zmienił konsystencję w trakcie stosowania:					
krem zmienił zapach w trakcie stosowania:					

3. Czy bezpośrednio po aplikacji lub w trakcie stosowania testowanego produktu wystąpiły u Pani którekolwiek z poniższych reakcji? Jeśli tak, to proszę zaznaczyć w tabeli ich intensywność.

STWIERDZENIA	Lekkie działanie niepożądane	O średniej intensywności	O dużej intensywności
pieczenie, podrażnienie oczu/spojówek:			
łzawienie oczu:			
podrażnienie skóry wokół oczu:			
uczucie suchości i ściągnięcia skóry:			
łuszczenie się skóry:			
uczucie pieczenia skóry:			
wysypka:			
zaczerwienienie skóry			
ogólny dyskomfort:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Jak długo utrzymywały się wskazane objawy? .....

Inne działania niepożądane nie wymienione:.....

Czy w związku z wystąpieniem u Pani reakcji niepożądaney na testowany kosmetyk przerwał(a) Pani jego stosowanie?:

tak     ↑  
nie     ↑

**Załącznik 4. Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (RNN/44/23/KE).**

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W ŁODZI  
Pl. Hallera 1B, 90-647 Łódź, tel. 0 785 911 596, 42 272-52-43, [bioetyka@umed.lodz.pl](mailto:bioetyka@umed.lodz.pl)

**UCHWAŁA  
KOMISJI BIOETYCZNEJ O PROJEKCIE EKSPERYMENTU MEDYCZNEGO  
Numer RNN/44/23/KE z dnia 14 lutego 2023 r.**

*(przy korespondencji dotyczącej niniejszej decyzji prosimy powoływać się każdorazowo na powyższy numer i datę Uchwały)*

**Główny badacz i wykonawca:**

**Dr n.med. Anna Erkiert-Polguj, mgr inż. Kinga Kazimierska**, Zakład Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej; Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, Katedra Kosmetologii, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

**Tytuł badania:**

**Ocena działania preparatu kosmetycznego zawierającego colostrum owcze na skórę trądzikową.**

Na podstawie ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t. j. Dz. U. z 2022 r. poz. 1731, z późn. zm.), ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz.1977 z późn. zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz.1994), ustawy z dnia 07 kwietnia 2022 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. z 2022 r. poz. 974 ze zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480), zarządzenia nr 55/2022 z 26 maja 2022 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie wprowadzenia Regulaminu pracy Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz zarządzenia nr 57/2017 z dnia 5 września 2017 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie powołania Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi po przeanalizowaniu wniosku, zapoznaniu się z projektem opinii dotyczącej zgłoszonego badania, w głosowaniu tajnym, Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (wypełniając zobowiązania ICH GCP) uchwała, co następuje:

**§ 1**

1. Opiniuje wniosek **pozytywnie, bez zastrzeżeń**, na podstawie złożonych dokumentów, których wykaz określa załącznik nr 1. Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

**§ 2**

Opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu. Każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, zdarzeniach niepożądanych oraz nieprzewidzianych okolicznościach.

*Odwwołanie od niniejszej uchwały wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi do Odwoławczej Komisji Bioetycznej, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały wyrażającej opinię.*

Przewodniczący Komisji Bioetycznej  
przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

prof.dr hab.n.med. Józef Drzewoski

- Znowelizowana podstawa prawna z dnia 3 lutego 2023 r. o działaniu Komisji Bioetycznych dodaje rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 26 stycznia 2023 r. w sprawie komisji bioetycznej i Odwoławczej Komisji Bioetycznej (Dz.U.poz.218)

## Lista obecności na posiedzeniu Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

w dniu 14 lutego 2023 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Zawód, specjalność	Miejsce pracy	Podpis
1.	Prof. dr hab. n. med. Józef Drzewoski Przewodniczący Komisji	Lekarz medycyny, internista, diabetolog farmakolog kliniczny	Emerytowany profesor Uniwersytetu Medycznego w Łodzi	
2.	Ks. dr hab. Jan Wolski Z-ca Przewodniczącego Komisji	Duchowny, bioetyk	Wyższe Seminarium Duchowne w Łodzi	
3.	Prof. dr hab. n. med. Andrzej Głabiński	Lekarz medycyny, neurolog	Klinika Neurologii i Udarów Mózgu UM w Łodzi	
4.	Prof. dr hab. n. med. Iwona Kłoszewska	Lekarz medycyny psychiatra	Klinika Psychiatrii Wieku Podeszłego i Zaburzeń Psychotycznych UM w Łodzi	<i>nie uspr.</i>
5.	Prof. dr hab. n. med. Agata Karowicz-Bilińska	Lekarz medycyny położnik, ginekolog	Klinika Patologii Ciąży i Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi	<i>nie uspr.</i>
6.	Prof. dr hab. n. med. Janusz Piekarski	Lekarz medycyny, chirurg onkolog	Klinika Chirurgii Onkologicznej UM w Łodzi	
7.	Prof. dr hab. n. med. Henryk Stępień	Lekarz medycyny, endokrynologia	Zakład Immunoendokrynologii UM w Łodzi	
8.	Dr hab. n. med. prof. UM Marta Woldańska- Okońska	Rehabilitacja medyczna	Klinika Rehabilitacji i Medycyny Fizycznej UM w Łodzi	
9.	Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman	Lekarz medycyny, pediatria, immunologia kliniczna	Klinika Pediatrii, Nefrologii i Immunologii UM w Łodzi	
10.	Dr n. prawn. Rafał Budzisz	Prawnik	Uniwersytet Łódzki w Łodzi	
11.	Dr n. med. Beata Barwińska	Pielegniarka	Wojewódzka Stacja Ratownictwa Medycznego W Łodzi	<i>nie uspr.</i>
12.	Mgr Elżbieta Piotrowska- Rutkowska	Farmaceutka	Naczelna Izba Aptekarska, ul. Długa 16 w Warszawie	
13.	Dr n. med. Elżbieta Jaszczuk	Lekarz medycyny, anestezjologia i intensywna terapia	Przedstawicielka Okręgowej Rady Lekarskiej w Łodzi	

**Załącznik 5. Ankieta subiektywnej oceny stanu skóry - osób ze skórą trądzikową**

**Załącznik nr 7 – Wzór ankiet dla probantów.**

**Ankieta przed zastosowaniem kremu z colostrum**

Imię i nazwisko:.....Wiek:.....

Rodzaj cery (tłusta, sucha, normalna, mieszana - tłusta część środkowa +suche policzki, tłusta część środkowa + normalna skóra na policzkach):.....

**INSTRUKCJA:**

*Bardzo prosimy o zaznaczenie swoich odpowiedzi we właściwych kratkach za pomocą znaku X lub V*

Proszę ocenić stan Pani/Pana skóry w poszczególnych obszarach twarzy w skali od 1 do 5

*(5- zdecydowanie tak; 4- bardzo; 3-średnio; 2- trochę; 1- zdecydowanie nie)*

STWIERDZENIA	Obszar twarzy																			
	Czoło					Nos					Broda					Policzki				
Moja skóra posiada:	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
Zaskórniki																				
Grudki																				
Krosty																				
Rumienie po zmianach																				
Przebarwienia																				
Trwałe blizny potrądzikowe																				
STWIERDZENIA	Czoło					Nos					Broda					Policzki				
Moja skóra jest:	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
sucha																				
ściągnięta																				
zaczerwieniona																				
nadwrażliwa/tkliwa																				
nawilżona																				
łojotokowa																				
w dobrej kondycji																				

Ankieta po 10 tygodniach stosowania kremu z colostrum

Imię i nazwisko:.....Wiek:.....

**INSTRUKCJA:**

- *Bardzo prosimy o wpisanie swoich odpowiedzi we właściwych kratkach wskazując czy nastąpiła poprawa ↑ (o ile %) lub pogorszenie ↓ (o ile %)*

1. Proszę ocenić stan Pani/ Pana skóry po 10 tygodniach stosowania kremu:

STWIERDZENIA	czoło		nos		broda		policzki	
	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %
Moja skóra posiada:								
Zaskórniki								
Grudki								
Krosty								
Rumienie po zmianach trądzikowych								
Przebarwienia								
Trwałe blizny potrądzikowe								
STWIERDZENIA	czoło		nos		broda		policzki	
Moja skóra jest:	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %	↑ o ile %	↓ o ile %
sucha								
ściągnięta								
zaczzerwieniona								
nadwrażliwa/tkliwa								
nawilżona								
fojotokowa								
w dobrej kondycji								

Czy polecił(a)by Pani/Pan ten preparat innej osobie?

tak

nie


**Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej [P1-P4]**

**Publikacja I [P1]:**

Kazimierska K, and Urszula Kalinowska-Lis. 2021. "Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology" *Molecules* 26, no. 11: 3253.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26113253>.

Review

# Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology

Kinga Kazimierska and Urszula Kalinowska-Lis \* 

Department of Cosmetic Raw Material Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Poland; kinga.kazimierska@stud.umed.lodz.pl

\* Correspondence: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl; Tel.: +48-422725575

**Abstract:** Milk and colostrum have high biological potential, and due to their natural origin and non-toxicity, they have many uses in cosmetics and dermatology. Research is ongoing on their potential application in other fields of medicine, but there are still few results; most of the published ones are included in this review. These natural products are especially rich in proteins, such as casein,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, lactoferrin, immunoglobulins, lactoperoxidase, lysozyme, and growth factors, and possess various antibacterial, antifungal, antiviral, anticancer, antioxidant, immunomodulatory properties, etc. This review describes the physico-chemical properties of milk and colostrum proteins and the natural functions they perform in the body and compares their composition between animal species (cows, goats, and sheep). The milk- and colostrum-based products can be used in dietary supplementation and for performing immunomodulatory functions; they can enhance the effects of certain drugs and can have a lethal effect on pathogenic microorganisms. Milk products are widely used in the treatment of dermatological diseases for promoting the healing of chronic wounds, hastening tissue regeneration, and the treatment of acne vulgaris or plaque psoriasis. They are also increasingly regarded as active ingredients that can improve the condition of the skin by reducing the number of acne lesions and blackheads, regulating sebum secretion, ameliorating inflammatory changes as well as bestowing a range of moisturizing, protective, toning, smoothing, anti-irritation, whitening, soothing, and antiaging effects.

**Keywords:** milk; colostrum; casein;  $\beta$ -lactoglobulin;  $\alpha$ -lactalbumin; lactoferrin; growth factors; skin; regeneration; antimicrobial; cosmetics



**Citation:** Kazimierska, K.; Kalinowska-Lis, U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules* **2021**, *26*, 3253. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253>

Academic Editors: Maria José Rodríguez-Lagunas and Malen Massot-Cladera

Received: 17 April 2021

Accepted: 26 May 2021

Published: 28 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Although milk is known to be used as a raw material in the food industry, it is also widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries due to its considerable biological potential. It has also been the subject of detailed analyses and discussions of its individual components and their properties [1,2].

Milk contains the nutrients required for the growth and development of the neonate. It contains a colloidal dispersion of specific proteins as micelles, fats organized in emulsified globules, as well as lactose, various minerals, and vitamins in solution [3].

The composition of milk varies between species. The largest differences can be found between the protein content of individual species. Sheep milk and sheep colostrum is distinguished by the highest total protein and fat content, being almost one and a half that of cow or goat milk and colostrum (Table 1).

The initial milk, or colostrum, is produced by the mammary glands during pregnancy and immediately after delivery for about five days [4–6]. Colostrum is yellow, has a slightly acidic pH of about 6.4, and a higher density than later milk. Due to its intended use, it has a much higher content of biologically active substances that affect the immune system of neonates.

**Table 1.** Composition of bovine, goat, and sheep colostrum and milk (%) [3,7–13].

Component	Colostrum			Milk		
	Bovine	Goat	Sheep	Bovine	Goat	Sheep
Lactose	3.6	3.39–4.24 <sup>a</sup>	3.3	4.6	4.1	4.8; 4.9 <sup>b</sup>
Minerals	0.9	0.85–0.9 <sup>a</sup>	0.9	0.7	0.8	0.94; 1 <sup>b</sup>
Proteins	7.1	3.53–5.69 <sup>a</sup>	11.8	3.4	2.9	5.5
Fats	5.1	3.88–8.21 <sup>a</sup>	13	3.7	4.5	6; 7.4 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> the minimum and maximum values from the test are given; <sup>b</sup> given values from two sources.

Bovine colostrum is several times richer in caseins,  $\beta$ -lactoglobulins,  $\alpha$ -lactalbumin, immunoglobulins, GMP (glycomacropeptide) lactoferrin, and growth factors than milk. For example, the immunoglobulins content ranges from 20 to 150 g/L in colostrum, but in the milk, only from 0.5 to 1.0 g/L. Only the content of lactoperoxidase and lysozyme remains at a similar level to both raw materials. Of all the types of colostrum presented, goat colostrum is the richest source of  $\beta$ -lactoglobulin. In goat colostrum, as in sheep colostrum, the content of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, IgG, IgM, IgA, and lactoferrin is much higher than in milk of the same species. Sheep milk is rich in casein in comparison to goat and bovine milk; its content, equal to 4.6 g/L, is almost twice as high as in goat's and cow's milk (2.5 g/L and 2.7–2.8 g/L, respectively) (Table 2). Therefore, colostrum from each of the mentioned species could be used as a raw material supplying proteins, especially those with biologically active properties.

The main source of active molecules of milk consists of casein and whey proteins, which demonstrate a range of antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties, among others [14]. Most biologically active proteins need to undergo proteolysis to achieve their full properties [15,16]. Proteolysis naturally occurs in the digestive tract, but it can also be initiated by the enzymes naturally found in milk, as well as by coagulants or lactic acid bacteria, which are often used in the food industry [15].

## 2. Bioactive Proteins of Milk

### 2.1. Casein

It belongs to the family of milk proteins containing phosphorus (phosphoprotein) and sugar (glycoprotein) residues; it consists of about 20 protein components. Caseins precipitate from raw, skimmed milk at a temperature of 20 °C at a pH of 4.6. The proteins of the four casein fractions ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein) account for 80% of the total protein content in bovine milk. While 95% of the casein content is naturally self-assembled into casein micelles, i.e., spherical colloidal particles, approximately 10% is present in the form of single molecules as soluble casein. These two states, *viz.* molecular and micellar casein, exist in equilibrium [17]. Caseins can form dual-binding models that exploit their amphiphilic nature; interactions exist between hydrophobic regions of the proteins, with calcium phosphate clusters being linked to phosphoserine clusters [18].

#### 2.1.1. Biological Properties of Casein

The phosphoproteins contained in casein regulate the calcium and phosphate metabolism in the body. Improvement in bone mineralization in experimental animals was observed in postmenopausal models [19]. In addition, casein proteins inhibit tooth decay by increasing the calcium phosphate content in the plaque [20] (Table 2).  $\alpha$ -Casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha_{S1}$ -casein,  $\alpha_{S2}$ -casein and  $\kappa$ -casein can transform into biologically active molecules. For example,  $\alpha$ -casein forms an opioid, casomorphine, and  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins are precursors of immunopeptides. In Figure 1, the bioactive peptides that are released from casein and their properties are shown [14,16,21].



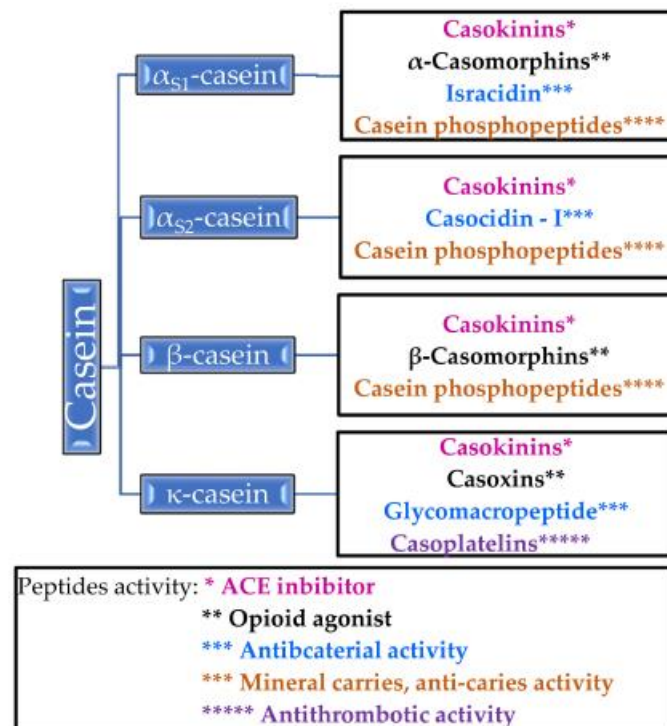


Figure 1. Peptides released from casein and their activity.

It is worth paying attention to casein phosphopeptides, which exhibit the properties of mineral carriers and anti-carriers—they form complexes with calcium ions and other mineral ions, thanks to which they increase the absorption of calcium in the intestines [14]. Unlike  $\beta$ -casomorphins, which are opioid agonists, casoxins are opioid antagonists [14,21]. Antithrombotic activity has been demonstrated for casoplatelins and antimicrobials in *in vivo* studies, especially against *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Listeria monocytogenes* [14]. Several of the listed peptides are described in more detail in Section 2.1.2.

Table 2. Major bioactive protein components of bovine, goat, sheep colostrum, and milk.

Proteins	Colostrum			Milk			[Ref]
	Bovine	Goat	Sheep	Bovine	Goat	Sheep	
Casein (g/L)	2.6	n.d.	n.d.	* 2.7; 2.8	2.5	4.6	[14], * [22]
κ-casein (%)	n.d.	n.d.	n.d.	* 12	** 20.4	* 9.1–10.2 <sup>a</sup>	* [23,24], ** [22]
αS1-casein (%)	n.d.	n.d.	n.d.	* 37	** 5.6	* 33.9–39.9 <sup>a</sup>	* [23,24], ** [22]
αS2-casein (%)	n.d.	n.d.	n.d.	* 10	** 19.2	* 12–16.4 <sup>a</sup>	* [23,24], ** [22]
β-casein (%)	n.d.	n.d.	n.d.	* 35	** 54.8	* 37–42.3 <sup>a</sup>	* [23,24], ** [22]
β-lactoglobulin (mg/mL)	* 7.9–30	* 9.3–49.8	** 4–19	*** 3.3	**** 3.07	**** 5.97	* [25], ** [26], *** [14], **** [27]
α-lactalbumin (mg/mL)	* 3	** 2.77	*** 1.5–2	* 1.2	**** 1.27	**** 0.95	* [14], ** [25], *** [26], **** [27]
Immunoglobulins (g/L)	20–150	n.d.	n.d.	0.5–1	n.d.	n.d.	[14]
IgG	* 15–180	** 50–60	*** 45–69	* 0.35; ** 0.59 <sup>b</sup>	** 0.1–0.4	**** 0.35–1.62	* [28–34], ** [22], *** [35], **** [36]
IgM	* 4.2; ** 5 <sup>b</sup>	* 1.6–5.2	*** 1.3–21.20	* 0.05	* 0.01–0.04	*** 0.2	* [13,37], ** [28–34], *** [38]
IgA	* 3.5; ** 3.9 <sup>b</sup>	** 0.9–2.4	*** 3.5	** 0.14	** 0.03–0.08	*** 0.2	* [28–34], ** [13,37], *** [38]
Glycomacro-peptide (g/L)	2.5	n.d.	n.d.	1.2	n.d.	n.d.	[14]
Lactoferrin (g/L)	* 0.8; *** 1.5–5 <sup>b</sup>	** 0.38	** 0.74	* 0.02–0.2; 0.02–0.75 <sup>b</sup>	* 0.098–0.15	* 0.14	* [39–42], ** [36], *** [43]
Lactoperoxidase (g/L)	* 0.02; *** 0.011–0.045 <sup>b</sup>	** 0.062–0.204	n.d.	* 0.03; *** 0.013–0.03 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	* [14], ** [8], *** [6]
Lysozyme (mg/L)	* 0.14–0.7	n.d.	n.d.	** 0.37–0.6	** 0.25	** 1–4	* [44], ** [13]
Serum albumin (g/L)	* 1.3	n.d.	n.d.	* 0.3	** 0.26–0.3	** 0.55–0.6	* [14], ** [45]
Growth factors (μg/L)	50 μg–40 mg/L	n.d.	n.d.	<1 μg–2 mg/L	n.d.	n.d.	[14]
IGF-I	* 0.049–2 <sup>a</sup>	n.d.	*** 0.199–0.265; ** 50–500 <sup>b</sup>	* <0.002–0.101	**** 11–16.8 <sup>a</sup>	** "low"	* [46–58], ** [59], *** [60], **** [61–63]
IGF-II	** 0.15–0.6 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	** 0.002–0.1 <sup>a</sup>	* 106	n.d.	* [62], ** [46,51,56]
EGF	* 0.004–0.008; 0.3242 <sup>b</sup>	n.d.	** 1.7–2.3	<0.002; 0.155 <sup>b</sup>	n.d.	** <0.0008	* [64,65], ** [66]
TGF-β1	0.0124–0.0426	n.d.	n.d.	0.0008–0.0035	n.d.	n.d.	[49]
TGF-β2	0.15–1.15; 0.3 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	0.013–0.07; 0.066 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	[48,67]

n.d.: no data; <sup>a</sup> the minimum and maximum values from the test are given; <sup>b</sup> found different values; \*, \*\*, \*\*\* and \*\*\*\* refer to the corresponding [Ref] in the last column.

### 2.1.2. Properties of Casein Peptides

Casokinins are fragments of  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein; these are believed to exhibit antihypertensive effects by acting as angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitors [9]. Casokinins are mainly produced by the action of trypsin or chymotrypsin on  $\beta$ - and  $\alpha_{S1}$ -casein [21]. ACE is an enzyme that catalyzes the conversion angiotensin I to the strong vasoconstrictor angiotensin II, thereby increasing blood pressure. Casokinins inhibit the action of ACE and thus lowers blood pressure in in vivo and in vitro studies [68–70].

Caseinomacropeptide (CMP) is split from casein by rennin during milk coagulation. It inhibits the aggregation of blood platelets and the binding of the human fibrinogen  $\gamma$ -chain to fibrinogen receptors on the platelet surface [14].

$\kappa$ -casein is a donor of glycomacropeptide (GMP) and can be obtained by the action of chymosin [9]. GMP has been found to inactivate microbial toxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, inhibit the adhesion of cariogenic *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, and hemagglutination by four strains of influenza virus in in vitro tests. It also modulates immune system responses, promotes the growth of *Bifidobacteria*, suppresses gastric hormone activities, and regulates blood circulation through antihypertensive and antithrombotic activity [71,72].

GMP hydrolysate (GHP) has been found to increase the level of hepatic glycogen and ameliorate hepatic insulin resistance in high-fat diet (HFD)-fed mice, suggesting that GHP may improve the insulin sensitivity of insulin target organs [73]. GHP could reduce the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in macrophages [74].

GHP has been found to demonstrate effective hypoglycemic activity and to ameliorate dyslipidemia and inflammation in diabetic mice. GHP supplementation could influence the composition and diversity of gut microbiota, with potentially beneficial effects on the insulin signaling pathway and host metabolism. Hence, GHP may support the prevention and management of type 2 diabetes [75].

### 2.1.3. Casein as Nanocarrier for Some Drugs

As casein micelles act as carriers to provide newborns with nutrients such as calcium, phosphate, and protein, it has been proposed that they may be used to deliver vitamins, minerals, and antibacterial substances. Such drug delivery systems may improve the efficiency of drugs and avoid their toxic effects.

It has been shown that the micelles not only have an affinity for vitamin D2 but also protect it from light by absorbing its radiation on its surface, thus protecting drugs such as ergocalciferol from degradation [76].

In addition to its strong surface activity, particle stabilizing effect, and good adhesion strength, casein can form films; however, these films show poor flexibility and water resistance and are easily decomposed under the influence of bacteria, which limits their further use [77]. In order to improve the properties of casein, core-shell structural casein-based ZnO nanocomposites have been created by double in situ polymerization. The resulting nanocomposite film demonstrates improved thermal stability, lower water absorption rate, and excellent antibacterial properties against *E. coli* [77].

It has been found that  $\beta$ -casein also forms complexes with other biologically significant substances, protecting them and increasing their bioavailability. For example, binding resveratrol to  $\beta$ -casein in a casein micelle significantly improves its bioavailability. Both the existing cis- and trans-resveratrol isomers can be trapped in the micelle, and the beta-casein-resveratrol complex has a much better protective effect during storage than  $\beta$ -casein micelles [78].

A particularly interesting and innovative example of the use of casein as a carrier is the creation of a complex with platinum. The clinical application of platinum-based anticancer drugs is greatly limited by their severe toxicity; however, a platinum(II) complex of bipyridine morpholine dithiocarbamate with nanoparticles composed of  $\beta$ -casein and chitosan demonstrated improved cytotoxicity and cellular uptake against colorectal cancer

HCT116 cells, suggesting that this novel drug delivery system could enable the drugs to function in stable aqueous solutions and to be of use in targeted oral delivery applications. The nanoparticles demonstrated good colloidal stability and low cytotoxicity [79].

### 2.2. $\alpha$ -Lactalbumin

$\alpha$ -Lactalbumin is a hydrophilic albumin and globular protein. A single peptide chain consists of 123 amino acids. It accounts for about 20% of bovine whey proteins [80]. This albumin is a coenzyme in lactose biosynthesis and has the function of transporting calcium metal ions [44].

#### Biological Properties of $\alpha$ -Lactalbumin

$\alpha$ -Lactalbumin is a good source of opioid peptides. It has the ability to reduce stress and depressive moods by increasing brain tryptophan and serotonin levels [81–83].

Native  $\alpha$ -lactalbumin does not show antibacterial activity, unlike peptides isolated from  $\alpha$ -lactalbumin: LDT1 (1–5), LDT2 (17–31) S-S (109–114), LDC (61–68), and S-S (75–80). The first two peptides are formed under the influence of trypsin, and the third by chymotrypsin [84]. They have been found to be active mostly against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus lentus*, and *Bacillus subtilis* BGA [84].

The HAMLET/BAMLET (human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells/bovine  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells) complex with oleic acid can penetrate tumor and immature cells, interfering with mitochondria, nucleosomes, and proteosomes, and activating apoptotic cancer cell pathways [85,86]. It has been reported to have comparable cytotoxic activity against lung cancer, kidney, and bladder carcinoma cell lines [44,87,88]. These findings suggest that such cytotoxic aggregates of apo- $\alpha$ -lactalbumin could be potential antitumor drugs.

### 2.3. $\beta$ -Lactoglobulin

$\beta$ -Lactoglobulin belongs to whey proteins and constitutes about 50% of these proteins [89]. Its content in colostrum is much higher than in milk and amounts to 7.9–30 mg/mL [6]. Structurally, it is a globular protein containing five cysteine residues, four of which are involved in the formation of disulfide bridges stabilizing the quaternary structure [44].  $\beta$ -Lg is a rich source of calcium ion binding peptides [90].

Regarding its thermal stability, a temperature of 72 °C did not cause significant changes in the structure of the  $\beta$ -Lactoglobulin molecule in mixtures of other substances derived from milk; however, heating for 30 s at 100 °C resulted in significant changes, i.e., partial denaturation of particles [91]. This globulin is a carrier of retinol and fatty acids and is known to bind vitamin D and stimulate lipase activity [40–42]. In addition, when heated to 70–80 °C, it loses the ability to actively bind palmitic acid, vitamin D, and retinol [92].

#### Biological Properties of $\beta$ -Lactoglobulin

Hernandez-Ledesma et al. isolated several antioxidant peptides by hydrolysis with Corolase PP. Their antioxidant activity was slightly higher than that of butylated hydroxyanisole (BHA) [93].

The  $\beta$ -Lg molecule also demonstrates significant antioxidant activity in milk, which, among others, has been attributed to the presence of sulfur-containing amino acids such as methionine [89–91]. These amino acids are also believed to exert antitumor effects [94]. Their activity is believed to be associated with the fact that methionine is a precursor of cysteine, which is needed for the formation of glutathione (GSH): a thiol antioxidant that scavenges reactive oxygen species, resulting in the formation of oxidized glutathione. Decreased amounts of GSH and a decreased GSH/GSSG ratio in tissues are biomarkers of oxidative stress. Chronic oxidative stress may lead to chronic inflammation and cancer development and progression [95].

The protein demonstrates antimicrobial effects by inhibiting the adhesion of pathogens to surfaces and thus preventing their colonization [80,96]. Bactericidal activity has been

shown against both Gram-positive bacteria, such as *B. subtilis* and *S. aureus*, and Gram-negative ones, such as *E. coli* and *Bordetella bronchiseptica* [80]. Other studies also indicate that  $\beta$ -Lg chemically modified with 3-hydroxyphthalic anhydride, may be effective in inhibiting *Chlamydia trachomatis* infection; in addition, 3-HP- $\beta$ -lactoglobulin is active against herpes simplex virus HSV-1 and -2 [97].

#### 2.4. Lactoferrin

One of the bioactive whey proteins is Lactoferrin (LF). It was first isolated in 1939 from cow milk and later from human milk in 1960 [98]. It demonstrates a similar iron-binding capacity to transferrin proteins [44]. Lactoferrin is a monomeric glycoprotein; its polypeptide chain consists of two spherical lobes connected by a hinge region [99].

It is resistant to high temperatures and proteolytic enzymes [100]. LF can be found in saliva, bile, pancreatic fluid, amniotic fluid, and tears, but the highest concentration is found in human or porcine milk [44]. It is a component of neutrophils, from which it is released into the bloodstream during trauma, infection, and inflammation [101–103].

In milk, LF is mainly synthesized by glandular epithelial cells [103]. Its concentration ranges from 20 to 200 mg/L in cow milk, 140 mg/L in sheep milk, and 98–150 mg/L in goat milk [13,39,40]. Higher levels are found in the colostrum than in milk; for example, the level is around 0.8 g/L in cow colostrum [41].

##### 2.4.1. Biological Properties of Lactoferrin

Lactoferrin is a protein that is found in many body fluids such as colostrum, milk, tears, nasal secretions, saliva, and genital secretions. It is also produced in large quantities in neutrophils [42]. Lactoferrin demonstrates bactericidal, bacteriostatic, antiviral, antifungal, antiparasitic, anticancer and antioxidant properties [41,100,104–114]. In addition, several clinical studies have confirmed that bovine lactoferrin is an immune modulator that stimulates the phagocytic activity of multinucleated leukocytes [107] and reduces the production of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in cell cultures [106]. The mechanisms of action of lactoferrin related to individual types of its activity were presented in Table 3.

**Table 3.** Mechanisms of lactoferrin action.

Kind of Activity	Mechanism of Action	[Ref.]
Antibacterial	- Reducing the concentration of iron ions that are necessary to bacterial growth and proliferation (chelation of iron via LF) - Interacting with lipoteichoic acid (LTA) of the cell walls of G(+) bacteria, disintegrating them and increasing their permeability	[102,115,116]
Antifungal	- Binding to lipopolysaccharide (LPS) of the walls of G(-) bacteria and disintegrating them. - Damaging cell membranes of fungi and altering their permeability - Sequestration of iron - Membrane destabilization	[117–119]
Antiviral	- Blocking the host's cell surface receptors due to the LF's affinity for glycosaminoglycans- Direct interacting with capsid or viral envelope proteins	[113,120,121]

Table 3. Cont.

Kind of Activity	Mechanism of Action	[Ref.]
Antiparasitic	- Targets the host cell entry	[122–126]
	- Sequestration of iron- Probably linked to sequestration of iron	
Antioxidant	- Acts additively or synergistically with the antiparasitic compounds used in therapy	[109,115,127]
	- Inhibiting the propagation of hydroxyl radicals by sequestering cationic iron and copper	
Anticancer	- Reducing the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ in cell cultures	[104]
	- Stimulating the phagocytic activity of multinucleated leukocytes	
Immunomodulatory	- Reducing the production of interleukin (IL)-6 in cell cultures	[98,103,104]
	- T-cell maturation	
	- Stimulation of NK (natural killer cells) cells	
	- Reducing pro-inflammatory cytokines	

The protein exerts antibacterial activity by chelating iron and removing it from the microbial growth environment [128]. It is also involved in the direct destruction of the sheaths and disruption of bacterial cell metabolism by inhibiting adhesion to host tissues [129], inhibition of biofilm formation by some bacteria [130], and stimulating the immune system to fight pathogens [112].

It has been proven to have a protective effect on intestinal epithelial cells and on the growth of beneficial intestinal microflora while inhibiting the growth of pathogenic bacteria such as *E. coli*, and especially those of the Enterobacteriaceae family [108].

It should be mentioned that the glycoprotein increases the sensitivity of bacteria to certain antibiotics such as vancomycin or penicillin, which reduces the supply of effective doses of individual drugs [131]. Diarra et al. showed that a mixture of lactoferrin and penicillin doubled the inhibitory activity against *S. aureus* [131].

Van der Kraan et al. isolated and characterized a new peptide, lactoferrampin, which, together with lactoferricin, a peptide derived from the hydrolysis of lactoferrin, showed antimicrobial properties against *E. coli*, *L. amonocytogenes*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aureoginosa*, and *Candida albicans* [110].

Many clinical studies have found lactoferrin to have antiviral properties. It effectively inhibits the development of infection caused by hepatitis B and C [132], type I and II herpes simplex virus [128,133], HIV [134], human cytomegalovirus, HPV virus, enterovirus, influenza virus, and parainfluenza virus, and rotavirus [109,111,127,135].

The protein also prevents the formation of free radicals regulating the production and release of cytokines and tumor necrosis factor (TNF) [101]. Lactoferrin can serve as an antioxidant by sequestering cationic iron and copper and thereby inhibiting the propagation of hydroxyl radicals [136]. Lactoferrin has potential antioxidant properties due to the ability to sequester free iron ions [137].

### 2.5. Lactoperoxidase (LPO)

LPO is a glycoprotein that occurs naturally in milk, colostrum, and many other secretions [14]. It catalyzes the oxidation reaction of thiocyanates in the presence of hydrogen peroxide, thereby generating intermediates with a broad spectrum of antimicrobial activity [138–140]. Lactoperoxidase acts as a natural antibacterial agent as an element of non-specific cellular immunity [100,141]. Its concentration is 13–30 mg/L in cow colostrum and 11–45 mg/L in milk [6]. In vitro studies showed that LPO has bactericidal activity

against Gram-negative bacteria such as *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., and bacteriostatic properties against Gram-positive ones such as *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. It has also demonstrated activity against *Candida* spp. and the protozoan *Plasmodium falcipari*, and has been found to inactivate HIV type 1 and poliovirus [142–146].

#### 2.6. Immunoglobulins

They are high molecular globulins that can be divided into five classes, i.e., IgG, IgA, IgM, IgE, and IgD. Each class has a similar structure composed of four polypeptide subunits [147]. In bovine milk and colostrum, the primary immunoglobulins are IgG, whereas in human milk, 90% of all immunoglobulins are sIgA; therefore, there are differences in the specifics of the action of total immunoglobulins [148]. The protective effects of immunoglobulins are presented below, as exemplified by Igs from bovine milk and colostrum. It is believed that the Igs in milk transport immunity from the mother to the neonate [44]. By binding antigens and stimulating phagocytosis or activating the complement system, immunoglobulins prevent pathogen adhesion, inhibit bacterial metabolism, and also neutralize toxins. Immunoglobulins thus participate in the destruction of pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *C. albicans*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri*, *S. mutans*, *Helicobacter pylori*, and *Cryptosporidium parvum* [149,150].

The physical properties of Igs have a key influence on their natural antimicrobial properties and the possibilities of their further use. Igs are thermolabile, especially at high temperatures. Heating milk at 100 °C for 30 s damages the structure of Ig proteins, while heating at 72 °C for 15 s allows for mild pasteurization and maintains their active properties with no structural changes [91]. Therefore, extensive use of immunoglobulins is possible.

#### 2.7. Lysozyme

Lysozyme is a hydrolase found at high concentrations in tears and chicken egg whites, from which it is obtained on an industrial scale, mainly by direct crystallization. Other methods for its preparation, like sequential dilution diafiltration using a UF membrane, affinity chromatography, adsorption, or molecular imprinted particles (Lys-MIP), are also known but used only in laboratory practice due to high costs [151,152]. Lysozyme stimulates the non-specific humoral immune response [141,153]. Its content has been found to vary from 0.37–0.6 mg/L in cow milk, 0.25 mg/L in goat milk, to 1–4 mg/L in sheep milk [13], and to range from 0.07–0.6 mg/L cow milk and 0.14–0.7 mg/L in colostrum [44].

Lysozyme exerts its antimicrobial activity by catalyzing the hydrolysis of the  $\beta$ -1,4 bonds in peptidoglycan, a component of bacterial cell walls; it is active against Gram-positive bacteria and demonstrates synergistic bactericidal activity with lactoferrin against *S. epidermis* [44]. Lysozyme is also called an endogenous antibiotic due to its supportive effect on bactericidal and bacteriostatic drugs [105]. The formation of a complex of lysozyme with oleic acid shows promising bactericidal effects against *Streptococcus pneumoniae* [154], and the lysozyme-ZnO nanoparticles complex demonstrates synergistic activity against *E. coli* and *S. aureus* [155]. Lysozyme applications in the industry could expand with the increased production of lysozyme afforded by the use of transgenic animals, whose milk contains levels as high as 25 mg/L [44].

#### 2.8. PRP (Proline-Rich Peptide)

It is a complex composed of a mixture of 32 peptides of various molecular masses ranging from 500–3000 kDa. This group of similar molecules demonstrates a broad spectrum of regulatory activity supporting the development of the immune system, inducing the maturation and differentiation of murine thymocytes, and affecting humoral and cellular immune responses. PRP consists of proline residues (25%) and hydrophobic amino acids (40%) [156]. It possesses homology to three protein precursors: annexin,  $\beta$ -casein, and a hypothetical  $\beta$ -casein homolog [157].

PRP was first isolated from ovine colostrum and was subsequently found in human and cow colostrum [156]. PRP exhibits immunomodulatory properties, inducing maturation and differentiation of thymocytes, the proliferation of pheochromocytoma cells increases the viability of fibroblast cells and inhibits  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis [158]. It has been found to influence precognitive functions in animal models, and hence to exert a potential influence on central nervous system processes. Clinical studies on the effects of sheep colostrum PRP administration in patients with Alzheimer's disease (trade name Colostrin Tm; ReGen Therapeutics Ltd., London, UK) found it to have a beneficial effect on disease symptoms and everyday functioning in AD patients and a negligible number of very mild side effects [159].

### 2.9. Growth Factors

Growth factors, which are generally considered a subset of cytokines, are signaling proteins that stimulate cell growth, differentiation, survival, inflammation, and tissue repair. They can be secreted by neighboring cells, tissues and glands, and even cancer cells. All cells need a range of growth factors to maintain proliferation and viability [160–162]. The first information about the presence of growth factors in milk and colostrum was recorded in 1997 by Pakkanen and Aalto and later by Gauthier et al. in 2006 [141,163]. The following growth factors are known to be present in milk: BTC (Betacellulin GF), EGF (Epidermal GF), FGF-1, FGF-2 (Fibroblast GF), IGF-1 and IGF-2 (Insulin-like GF), TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 (Transforming GF), and PDGF (Platelet-derived GF) [101]. Of these, the most prevalent are epidermal (EGF), insulin-dependent (IGF), and transformative (TGF) growth factors [141], with concentrations of 2–155 ng/mL for EGF, 2–101 ng/mL for IGF-I, 2–107 ng/mL for IGF-II and 13–71 ng/mL for TGF- $\beta$ 2, and <4 ng/mL for BTC, TGF- $\beta$ 1, FGF1, and FGF2 [163].

Growth factors demonstrate a multilevel effect on individual cells and tissues. EGF and BTC stimulate the proliferation of epidermis, epithelium, and embryonic cells, and promote wound healing, bone reconstruction and inhibit gastric secretion [163]. TGF- $\beta$  is responsible for embryo development and repair and the formation of bone, cartilage, and epithelial tissue; it also regulates the immune system [163]. Some supplements have been designed with the aim of increasing immunity and treating conditions such as childhood Crohn's disease, e.g., Nestle Modulen IBD containing TGF- $\beta$ 2 from milk [164–166]. IGF, which includes IGF-I and IGF-II, stimulates the proliferation of many cells and also regulates metabolic functions, e.g., glucose uptake or glycogen synthesis [163]. Due to their wide range of action, these growth factors have been included in studies on treating epilepsy [167]. Playford et al. [168] suggest that cow colostrum-based products that contain growth factors can be used to counteract side effects when using nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Gauthier et al. [163] described a positive effect of growth factors on the digestive system, skeletal system, and skin.

Particularly important in the context of this article seems to be the study, the results of which indicate that FGF, IGF-1, and EGF are important mitogens in wound healing and that EGF, in particular, is capable of stimulating the epithelium. IGF-1 and EGF may play a significant role in both the early and late wound environment, while FGF may play the most important role in early tissue repair [169].

### 3. Milk- and Colostrum-Based Products in Cosmetics and Dermatology

Recent years have seen a growth in interest in natural products, and milk- and colostrum-based products are now widely used in the cosmetics and pharmaceutical industries. In this chapter, their impact on skin conditions when used as a dietary supplement or topically applied in the form of creams, ointments, etc., will be discussed. These data are summarized in Table 4. This section will also present the effect of milk or milk-derived ingredients on skin cells (fibroblasts and/or keratinocytes) *in vitro*.



### 3.1. Impact of Supplementation with Milk- and Colostrum-Based Products on Skin Conditions

Substances derived from colostrum and milk, especially proteins, have been shown to have great therapeutic potential in the treatment and prevention of many diseases, and there is a growing demand for those based on colostrum. A number of colostrum-supplemented powders, capsules, lozenges, beverages, and chewing gums are available on the market. The products are used not only as wound healing factors and antioxidants, anti-inflammation, tissue growth agents but also to enhance the immune system, repair damaged gastrointestinal tissues, or encourage the differentiation and proliferation of epidermal cells, among others [5,43].

The milk protein most commonly used as a supplement is lactoferrin, possibly due to its broad spectrum of proven biological properties (Section 2.4.1). This has been found to induce a significant improvement in the skin condition of patients with psoriasis and acne vulgaris, including a reduction in the number of inflammatory lesions and an overall improvement in the clinical picture [90,170–172].

One study compared the effect of consuming fermented milk enriched with lactoferrin (200 mg daily) by patients with acne vulgaris in the course of skin inflammation. Two groups of 18 patients, one consuming enriched milk and the other unenriched milk (placebo), were tested for skin hydration, sebum, pH, and skin surface lipid content at the beginning of the study and after 12 weeks. The group of patients taking lactoferrin-enriched milk demonstrated a 38.6% improvement in inflammation reduction, 31.1% lower sebum content, 23.1% fewer total lesions, and 20.3% lower acne severity compared to the placebo group. Although both groups displayed a decrease in lipid level on the skin surface, the lactoferrin-receiving group also demonstrated a decrease in the triacylglycerol content of the lipids; this was found to correlate with the reduction in acne lesions and the severity of acne. The hydration and pH of the skin remained unchanged after supplementation [90].

Twice daily administration of lactoferrin (100 mg) as a dietary supplement was found to result in an overall improvement in acne lesions in patients with mild to moderate common acne [170]. Twice daily administration of capsules containing lactoferrin with vitamin E and zinc for three months was found to reduce the number of acne lesions, reduce blackheads and inflammatory changes, and better regulate sebum secretion. The preparation was found to be both safe and effective [173].

In addition, an orally administered preparation based on milk proteins, rich in growth factors, alpha-lactalbumin, lactoferrin, and immunoglobulins in reducing skin lesions has been found safe for use in patients with plaque psoriasis [171].

Lactoferrin supplementation was also found to inhibit the increase in transepidermal water loss, reduction in skin hydration, aberrant epidermal hyperplasia, and cell apoptosis in hairless mice orally administered lactoferrin and exposed to UVB radiation [172].

The vitamins, minerals, and amino acids contained in colostrum are known to bestow many health-promoting effects on human skin. Ascorbic acid (vitamin C) is involved in the production of collagen and L-carnitine; it also maintains healthy skin, heals wounds, and possesses antioxidant activity. In addition, niacin (vitamin B3) maintains healthy skin, biotin (B7) strengthens hair and nails, vitamin E possesses antiaging and antioxidant activity, and retinol (vitamin A) encourages skin cell production and has antiaging properties. The various minerals present, such as zinc and copper, take part in neutralizing the harmful effects of free radicals, regeneration processes, and wound healing.

The amino acids also have positive effects: proline has antiaging properties (reduces wrinkles and sagging), forms collagen, and heals tissue, threonine produces collagen and elastin in the skin, methionine has an antioxidant effect, synthesizes collagen in nails and hair and arginine stimulates wound healing [43].

**Table 4.** Clinical studies with milk- or colostrum-based products.

Product Used	Type of Disease or Healthy Skin (Number of Patients)	Result of the Study	[Ref.]
Topically applied milk-based products			
bovine colostrum preparation (supported antibiotic therapy)	difficult-to-heal wounds caused by buttock erythematosis and by erosion erythema	significant improvement in wound healing	[174]
ointments containing 10% and 20% lactoferrin	moderate psoriatic plaque (n = 22)	improvement in elevation, redness, and scaling of psoriatic lesions	[114]
soap containing 5% Podolian cow milk	healthy skin	good cleansing and antibacterial properties	[175]
creams with skimmed donkey milk encapsulated in nanoliposomes	healthy skin (n = 15)	satisfactory moisturizing properties; antiaging effects	[176]
cream containing 30% horse colostrum	seborrheic acne (n = 12)	complete skin regeneration	[177]
cream containing 20% horse colostrum and 10% horse milk (plus mint and benzocaine)	contact skin lesions (n = 5)	resolution of contact skin lesions and pain immediately after application	[177]
cream containing 20% horse colostrum and 10% horse milk (plus mint and benzocaine)	hyperthermia sunburn skin (n = 30)	immediate relief of pain and skin tension (within 24 h); the appearance of a normal tan, without any scale-off skin effect	[177]
cream containing 20% horse colostrum and 10% horse milk (plus mint and benzocaine)	2° degree and 3° fire burns (n = 8)	rapid pain relief; rebuilding the epithelium in a week	[177]
emulsion with 20% horse colostrum	moderate atopic dermatitis (n = 7)	reduction in erythema and pruritus; softening, moisturizing, soothing, and anti-inflammatory effects	[177]
liposomal gel containing 20% horse colostrum	ulcerative skin lesions (n = 10)	improvement of skin healing and repair	[177]
cosmetic formulations based on a combination of horse colostrum and horse milk	healthy skin	antiaging, moisturizing, protective, tensio-distensive, tonic, smoothing, anti-irritant, emollient, bleaching, decongestant, and sebostatic effects	[177]
fermented (by lactic acid bacteria) horse colostrum	atopic dermatitis (atopy and psoriasis)	alleviating symptoms; moisturizing and anti-inflammatory effects	[178]
fermented colostrum	acne	improvement related to the antibacterial effect	[179]
formulations containing bovine or equine colostrum (plus hyaluronic acid or its salt and olive oil or vitamin E)	healthy skin of elderly volunteers	improvement elasticity and tension; moisturizing and antioxidant effects; reduction in skin sagging and liver spots	[180]
cosmetic formulation based on colostrum albumin (plus arbutin)	healthy skin with discoloration	whitening properties	[181]
Milk-based products used as supplements			
fermented milk enriched with lactoferrin	acne vulgaris (n = 18)	reduction in inflammation, sebum content, and the severity of acne lesions	[90]
lactoferrin	mild to moderate common acne	overall improvement in acne lesions	[170]
capsules containing lactoferrin (plus vitamin E and zinc)	acne	reduction in the number of acne lesions, blackheads, and inflammatory changes; regulation of sebum secretion	[173]

### 3.2. Influence of Milk or Milk-Derived Ingredients on Skin Cells In Vitro

Skim bovine colostrum has been found to increase canine skin fibroblast proliferation. Bovine colostrum stimulated fibroblast growth at all doses (0.1, 0.3, and 1 mg/mL) after 24 h incubation. Proliferation was found to increase from 19% to 32% compared to negative controls, and the effect remained significant after 48 h for the 0.3 and 1 mg/mL doses [182].

The fat fractions isolated from mare's colostrum were found to have a stronger effect on fibroblast proliferation in vitro than those from milk. The different lipid pattern of the

two substances, specifically the higher levels of adipophilin and lactadherin in colostrum fat globules, is believed to have affected skin wound repair efficiency. Colostrum also contains higher levels of total lipids, linoleic and linolenic acids, gangliosides, and glycolipids when compared to milk [5,183].

Colostrum has a positive effect on the healing process of skin wounds. This may be due to the participation of growth factors and/or other immune regulatory factors [5].

Peptides from milk protein hydrolysates, typically with a molecular weight of 800 Da and containing mainly hydrophobic aromatic amino acids, have been found to promote growth in human skin cells in vitro. Treatment promoted growth efficacy by 108% in keratinocytes cultured in a medium supplemented with 300 µg/mL of one peptide fraction for 12 days [184].

Other studies have examined the effect of donkey colostrum and mature milk, human colostrum and mature milk, and β-casein and β-casomorphine-7 on the growth and inflammatory response of the skin fibroblast culture. Exposure of skin fibroblasts to donkey milk and human colostrum resulted in a decrease in proinflammatory transcriptional factor NF-κB p65 activity. The opposite effect was noticed for β-casein and β-casomorphine-7. Moreover, it was proved that the tested products and β-casein lead to the activation of growth-regulating kinases (Akt 1/2/3 kinase, Erk kinase, INK kinase, and Stat-1 kinase), especially the p-Erk pathway. Accordingly, it can be concluded that casein amino acids may be responsible for the activation and proliferation of the cell cycle initiated by Erk. It suggests that noncasein bioactive peptides of donkey and human milk may be responsible for anti-inflammatory properties and may be useful in wound healing, regenerative, and aesthetic dermatology [185].

Recently, Kovacs et al. showed that colostrum promotes cell cycle withdrawal by increasing the expression of kinase inhibitors and promotes the transition of keratinocytes from proliferation to differentiation. Colostrum also has the ability to induce the expression of early and late differentiating markers (keratin 1, involucrin, and filaggrin) and the synthesis of caspase 14 and bleomycin hydrolase: two major enzymes involved in the maturation of filaggrin. Bovine colostrum has been found to promote keratinocyte section and final differentiation in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) skin counterparts, the latter being a more physiologically representative system. Colostrum appears to stimulate cell differentiation via the PI3K/PLC-γ1/PKCα (3-phosphatidylinositol kinase/phospholipase Cγ2/protein kinase Cα) pathways associated mainly with tyrosine kinase receptors; this suggests that colostrum may be used in the treatment of skin diseases characterized by a perturbed barrier function, such as cutaneous dryness in elderly or UVR-exposed subjects [186].

### 3.3. Topical Applications of Milk or Colostrum Containing Products

The properties of milk proteins make them promising candidates researchers are trying to use them to create a skin substitute for the treatment of burn wounds. A preliminary study showed that the application of bioactive milk proteins, lactoferrin, and whey proteins on a synthetic polymer (polycaprolactone) scaffold increased the growth, spread, and infiltration of keratinocytes and fibroblasts. Hence, it could be effectively used to heal wounds [187].

Milk proteins have also been used directly on the skin for therapeutic purposes. Topical application of bovine colostrum preparations resulted in significant improvement in the treatment of difficult-to-heal wounds caused by buttock erythematosis and by erosion erythema when administered as support for systemic antibiotic therapy [174].

An ointment consisting of *Gundelia* (*Gundelia tournefortii* L.) extract with milk cream (GT/MC 4:1) was found to support the healing of second-degree burn in a rat model. Thirty-six male Wistar rats with second-degree burns on the skin were divided into three groups: one treated with silver sulfadiazine drug, another treated with *G. tournefortii* L. extract composite with milk cream, and one untreated group. Of the three, the GT/MC ointment group demonstrated the most effective healing. After 21 days of treatment, the

wound area was reduced, and the wound healing process was improved significantly. Thus, such an ointment could aid in the healing of burn wounds [188].

Bovine lactoferrin may be considered as a topical treatment option for the treatment of psoriatic plaque. This is confirmed by studies conducted on a group of 22 patients with moderate plaque psoriasis who used ointments containing 10% and 20% lactoferrin. The psoriatic lesions treated with lactoferrin demonstrated improvements in elevation, redness, and scaling; however, the 20% ointment did not appear to be more effective than the 10% [114].

Podolian cow milk has also been used as a raw material for skincare products in the form of liquid hand soap. The product was found to demonstrate good cleansing and antibacterial properties. The most effective was the soap containing 5% of Podolian milk, which reduced bacterial hand contamination by 98%. The antibacterial activity of the product derived from the presence of some milk protein, as well as various enzymes, such as lysozyme (0.25 mg/L), lactoferrin, and lactoperoxidase [175].

Another study compared the effects of creams with nanoliposomes encapsulated with skimmed donkey milk with placebo on untreated skin in fifteen healthy volunteers. Shortly after application, the creams demonstrated satisfactory moisturizing properties, which were maintained throughout the entire period. Transepidermal water loss slightly decreased only after four weeks, and the pH value was similar after each of the treatments. The creams may contribute to additional antiaging effects [176]. The formulations containing the skimmed donkey milk are described in detail in the Serbian patent (P-2016/0289; No 57752) [189].

Scientific publications regarding the external application of colostrum to the skin are sparse. However, many patents relating to colostrum-based dermocosmetics are pending.

In accordance with the patent US5750149A [177], formulations containing horse colostrum together with horse milk have been clinically tested. The studies investigated preparations with different ratios of colostrum to milk content, i.e., 30% horse colostrum, 20% horse colostrum and 10% horse milk, 10% horse colostrum and 20% horse milk, and 3% horse colostrum and 20% horse milk. When applied to the skin, the formulations were effective in the treatment of sunburns, burns from fire, contact lesions, skin diseases such as acne, seborrhea dermatitis, irritation, keratosis defects (psoriasis and ichthyosis), including atopic dermatitis and itching, among others [177].

In addition, twice-daily topical application of a cream containing 30% of horse colostrum led to resolution of cutaneous lesions in twelve patients aged 16–27, affected by seborrheic acne, with the skin being completely regenerated [177].

Twice-daily topical treatment, i.e., every 12 h, with a cream containing 20% horse colostrum and 10% horse milk, with the addition of mint and benzocaine, resolved contact skin lesions within 24 h in five test subjects, with the pain disappearing immediately after application [177]. The same cream, based on 20% horse colostrum and 10% horse milk plus mint and benzocaine, was applied twice-daily in adult patients with hyperthermia sunburn skin; the same extract was also applied to children but with the addition of chamomile extract instead of peppermint. The study group consisted of thirty people. The results indicated that pain subsided immediately, skin tension dropped over the course of 24 h, and a normal tan appeared, without any scale-off skin effect in the following days [178]. The cream was also found to be effective in the treatment of 2° degree and 3° fire burns. Similarly, in a group of eight patients, pain weakened quickly, and the epithelium was restored within one week [177].

Application of 20% horse colostrum emulsion (twice a day for 30 days) resulted in greater softening, moisturizing, soothing, and anti-inflammatory effects than observed for commonly available emulsions in seven patients with moderate atopic dermatitis compared to a control group of 10 healthy people. No side effects were observed, and erythema and pruritus decreased [177].

A liposomal gel containing 20% horse colostrum resulted in total or partial improvement of skin healing and skin repair in ten patients with ulcerative skin lesions treated twice daily for 20 days [177].

Irrespective of the composition, cosmetic formulations based on a combination of horse colostrum and horse milk demonstrate a number of skin benefits, including antiaging, moisturizing, protective, tensio-distensive, tonic, smoothing, anti-irritant, emollient, bleaching, decongestant, and sebostatic activities [177].

Another interesting patent study concerns the use of fermented horse colostrum in the case of atopic dermatitis. In this case, the colostrum was treated with lactic acid bacteria: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (ATCC 11842), *Streptococcus thermophilus* (ATCC 19258), and *Lactobacillus rhamnosus GG*, (ATCC 53103). The results indicate excellent moisturizing and anti-inflammatory properties, suggesting that the substance in question can be used to alleviate symptoms associated with atopic dermatitis, such as atopy and psoriasis [178].

A Korean patent describes the use of fermented colostrum as an anti-acne treatment. The specific active substance contained in colostrum, resulting from fermentation, appears to demonstrate excellent antibacterial effects against acne bacteria [179].

Another product containing bovine or equine colostrum, hyaluronic acid or its salt, and other substances such as olive oil (*Olea europae*) or vitamin E was found to reduce skin sagging, improve skin elasticity and tension, and demonstrate moisturizing and antioxidant properties when applied to the facial skin of elderly participants. Treatment also appeared to reduce the appearance of liver spots to a slight degree [180].

One patent presents a method of producing whitening cosmetics in which colostrum albumin is combined with arbutin, a whitening agent [181].

#### 4. Conclusions

The broad spectrum of biological properties of milk and colostrum is undoubtedly related to their rich composition, especially in whey proteins, such as  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme, immunoglobulins. Milk proteins enjoy unflagging interest among medical scientists not only because of their activities but also because of their natural origin and non-toxicity. These ingredients are considered in treating skin diseases, restoring immunity, fighting cancer, and combating microorganisms. Despite the multitude of studies on milk raw materials, there are few clinical trials confirming their effectiveness. Milk-based products appear to be used more often as dietary supplements than as medications.

It is also important to note that differences in the composition of milk between animal species may influence their therapeutic value. As bovine milk has been quite exhaustively studied, future research should be directed towards the milk from other species: sheep, goats, or camels.

Among milk raw materials, colostrum deserves special attention. Its complex composition has been found to be safe for use in people and to give excellent results in rebuilding immunity, as well as its use as a therapeutic agent in dermatology and an active ingredient of cosmetics. Topically applied formulations containing colostrum support healing processes of burn wounds, ulcers, and sunburns. They also appear to be effective at treating skin diseases, such as acne vulgaris, plaque psoriasis, and contact lesions. However, most research concerns the synergistic effects yielded by the combination of milk-derived ingredients/products and other active substances, like vitamin E, zinc, arbutin, hyaluronic acid, which does not allow for unequivocal conclusions about the action of the milk-based products themselves. Therefore, clinical trials are needed on a separated from a single milk ingredient or milk/colostrum products without any other active additives.

**Funding:** This research was funded by the Medical University of Lodz (grant No. 503/3-066-02/503-31-001).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Jenness, R. Composition of Milk. *Fundam. Dairy Chem.* **1988**, *1*–38. [\[CrossRef\]](#)
- Audic, J.-L.; Chaufer, B.; Daufin, G. Non-Food Applications of Milk Components and Dairy Co-Products: A Review. *Lait* **2003**, *83*, 417–438. [\[CrossRef\]](#)
- Luisa, B.G. *Handbook of Milk Composition*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995; ISBN 978-0-08-053311-7.
- Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [\[CrossRef\]](#)
- Vollmer, D.; West, V.; Lephart, E. Enhancing Skin Health: By Oral Administration of Natural Compounds and Minerals with Implications to the Dermal Microbiome. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McGrath, B.A.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Kelly, A.L. Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Sci. Technol.* **2016**, *96*, 133–158. [\[CrossRef\]](#)
- Bergman, A.J.; Turner, C.W. The Composition of the Colostrum of the Dairy Goat. *J. Dairy Sci.* **1937**, *20*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
- Harjanti, D.W.; Ciptaningtyas, R.; Al-Baarri, A.N.; Kusumanti, E. Isolation and Identification of Lactoferrin and Lactoperoxidase from the Colostrum of Indonesian Eitawa Crossbred Goat. *Adv. Sci. Lett.* **2017**, *23*, 3321–3324. [\[CrossRef\]](#)
- Rashida, K.; Ahmed, T.; Mirza, B. Comparative Analysis of Quality of Milk Collected from Buffalo, Cow, Goat and Sheep of Rawalpindi/Islamabad Region in Pakistan. *Asian J. Plant Sci.* **2004**, *3*. [\[CrossRef\]](#)
- Haenlein, G.F.W. *Nutritional Value of Dairy Products of Ewe and Goat Milk*; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1996.
- Wendorff, W.L.; Haenlein, G.F.W. Sheep Milk—Composition and Nutrition. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 210–221. [\[CrossRef\]](#)
- Anifantakis, E.M. *Comparison of the Physico-Chemical Properties of Ewes' and Cows' Milk*; FIL-IDF Secretariat General; International Dairy Federation: Belgium, Brussels, 1986.
- Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. Physico-Chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 88–113. [\[CrossRef\]](#)
- Park, Y.W. (Ed.) *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*; Wiley-Blackwell: Ames, IA, USA, 2009; ISBN 978-0-8138-1982-2.
- Gobetti, M.; Stepaniak, L.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Di Cagno, R. Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 223–239. [\[CrossRef\]](#)
- Clare, D.A.; Swaisgood, H.E. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 1187–1195. [\[CrossRef\]](#)
- Cheema, M.; Hristov, A.N.; Harte, F.M. The Binding of Orally Dosed Hydrophobic Active Pharmaceutical Ingredients to Casein Micelles in Milk. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 8670–8679. [\[CrossRef\]](#)
- Horne, D.S. Analytical Methods | Light Scattering Techniques. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed.; Fuquay, J.W., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 133–140. ISBN 978-0-12-374407-4.
- Byun, J.S.; Lee, S.S. Effect of Soybeans and Sword Beans on Bone Metabolism in a Rat Model of Osteoporosis. *Ann. Nutr. Metab.* **2010**, *56*, 106–112. [\[CrossRef\]](#)
- Milan, A.M.; Waddington, R.J.; Embery, G. Fluoride Alters Casein Kinase II and Alkaline Phosphatase Activity in Vitro with Potential Implications for Dentine Mineralization. *Arch. Oral Biol.* **2001**, *46*, 343–351. [\[CrossRef\]](#)
- Meisel, H. Biochemical Properties of Bioactive Peptides Derived from Milk Proteins: Potential Nutraceuticals for Food and Pharmaceutical Applications. *Livest. Prod. Sci.* **1997**, *50*, 125–138. [\[CrossRef\]](#)
- Park, Y.; Haenlein, G.F.W.; Wendorff, W. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017; ISBN 978-1-119-11027-9.
- Moatsou, G.; Samolada, M.; Katsabeki, A.; Anifantakis, E. Casein Fraction of Ovine Milk from Indigenous Greek Breeds. *Lait* **2004**, *84*, 285–296. [\[CrossRef\]](#)
- Al-Saadi, J.M.S.; Deeth, H.C. Preparation and Functional Properties of Protein Coprecipitate from Sheep Milk. *Int. J. Dairy Technol.* **2011**, *64*, 461–466. [\[CrossRef\]](#)
- Levieux, D.; Morgan, F.; Geneix, N.; Masle, L.; Bouvier, F. Caprine Immunoglobulin G, Beta-Lactoglobulin, Alpha-Lactalbumin and Serum Albumin in Colostrum and Milk during the Early Post Partum Period. *J. Dairy Res.* **2002**, *69*, 391–399. [\[CrossRef\]](#)
- Perez, M.D.; Sanchez, L.; Aranda, P.; Ena, J.M.; Oria, R.; Calvo, M. Synthesis and Evolution of Concentration of Beta-Lactoglobulin and Alpha-Lactalbumin from Cow and Sheep Colostrum and Milk throughout Early Lactation. *Cdl. Md. Biol.* **1990**, *36*, 205–212. [\[PubMed\]](#)
- Ruprichova, L.; Kralova, M.; Borkovcova, I.; Vorlova, L.; Bedanova, I. Determination of Whey Proteins in Different Types of Milk. *Acta Veterinaria Brno* **2014**, *83*, 67–72. [\[CrossRef\]](#)
- Feeney, S.; Morrin, S.T.; Joshi, L.; Hickey, R.M. The Role of Immunoglobulins from Bovine Colostrum and Milk in Human Health Promotion. In *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2018; pp. 291–314. ISBN 978-1-119-38533-2.
- Atkinson, D.J.; von Keyserlingk, M.A.G.; Weary, D.M. Benchmarking Passive Transfer of Immunity and Growth in Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 3773–3782. [\[CrossRef\]](#)
- Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2003; ISBN 978-0-12-227235-6.
- Stelwagen, K.; Carpenter, E.; Haigh, B.; Hodgkinson, A.; Wheeler, T.T. Immune Components of Bovine Colostrum and Milk. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 3–9. [\[CrossRef\]](#)

32. Kehoe, S.I.; Jayarao, B.M.; Heinrichs, A.J. A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4108–4116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Mesmin, C.; Fenaile, F.; Becher, E.; Tabet, J.-C.; Ezan, E. Identification and Characterization of Apelin Peptides in Bovine Colostrum and Milk by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 5222–5231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Recio, I.; de la Fuente, M.A.; Juárez, M.; Ramos, M. Bioactive Components in Sheep Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2009; pp. 83–104. ISBN 978-0-8138-2150-4.
35. Tabatabaei, S.; Nikbakht, G.; Vatankeh, M.; Sharifi, H.; Alidadi, N. Variation in Colostral Immunoglobulin G Concentration in Fat Tailed Sheep and Evaluation of Methods for Estimation of Colostral Immunoglobulin Content. *Acta Veterinaria Brno* **2013**, *82*, 271–275. [\[CrossRef\]](#)
36. Navarro, E.; Galan-Malo, P.; Pérez, M.D.; Abecia, J.-A.; Mata, L.; Calvo, M.; Sánchez, L. Lactoferrin and IgG Levels in Ovine Milk throughout Lactation: Correlation with Milk Quality Parameters. *Small Rumin. Res.* **2018**, *168*, 12–18. [\[CrossRef\]](#)
37. Hernández-Castellano, L.E.; Almeida, A.M.; Renaut, J.; Argüello, A.; Castro, N. A Proteomics Study of Colostrum and Milk from the Two Major Small Ruminant Dairy Breeds from the Canary Islands: A Bovine Milk Comparison Perspective. *J. Dairy Res.* **2016**, *83*, 366–374. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Farrell, H.M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G.T.; Brown, E.M.; Butler, J.E.; Creamer, L.K.; Hicks, C.L.; Hollar, C.M.; Ng-Kwai-Hang, K.F.; Swaisgood, H.E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1641–1674. [\[CrossRef\]](#)
39. Madureira, A.R.; Pereira, C.I.; Gomes, A.M.P.; Pintado, M.E.; Xavier Malcata, E. Bovine Whey Proteins—Overview on Their Main Biological Properties. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1197–1211. [\[CrossRef\]](#)
40. Smithers, G.W. Whey and Whey Proteins—From 'Gutter-to-Gold'. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 695–704. [\[CrossRef\]](#)
41. Wang, B.; Timilsena, Y.P.; Blanch, E.; Adhikari, B. Lactoferrin: Structure, Function, Denaturation and Digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 580–596. [\[CrossRef\]](#)
42. Mulder, A.M.; Connellan, P.A.; Oliver, C.J.; Morris, C.A.; Stevenson, L.M. Bovine Lactoferrin Supplementation Supports Immune and Antioxidant Status in Healthy Human Males. *Nutr. Res.* **2008**, *28*, 583–589. [\[CrossRef\]](#)
43. Mehra, R.; Singh, R.; Nayan, V.; Buttar, H.S.; Kumar, N.; Kumar, S.; Bhardwaj, A.; Kaushik, R.; Kumar, H. Nutritional Attributes of Bovine Colostrum Components in Human Health and Disease: A Comprehensive Review. *Food Biosci.* **2021**, *40*, 100907. [\[CrossRef\]](#)
44. McSwaneey, P.L.H.; Fox, P.F. (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2013; ISBN 978-1-4614-4713-9.
45. Hernández-Ledesma, B.; Ramos, M.; Gómez-Ruiz, J.A. Bioactive Components of Ovine and Caprine Cheese Whey. *Small Rumin. Res.* **2011**, *101*, 196–204. [\[CrossRef\]](#)
46. Blum, J.W.; Hammon, H. Colostrum Effects on the Gastrointestinal Tract, and on Nutritional, Endocrine and Metabolic Parameters in Neonatal Calves. *Livest. Prod. Sci.* **2000**, *66*, 151–159. [\[CrossRef\]](#)
47. Campbell, P.G.; Baumrucker, C.R. Insulin-like Growth Factor-I and Its Association with Binding Proteins in Bovine Milk. *J. Endocrinol.* **1989**, *120*, 21–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Elfstrand, L.; Lindmark-Månsson, H.; Paulsson, M.; Nyberg, L.; Åkesson, B. Immunoglobulins, Growth Factors and Growth Hormone in Bovine Colostrum and the Effects of Processing. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 879–887. [\[CrossRef\]](#)
49. Ginjala, V.; Pakkanen, R. Determination of Transforming Growth Factor-B1 (TGF-B1) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in Bovine Colostrum Samples. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 195–207. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Hadsell, D.L.; Baumrucker, C.R.; Kensing, R.S. Effects of Elevated Blood Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Concentration upon IGF-I in Bovine Mammary Secretions during the Colostrum Phase. *J. Endocrinol.* **1993**, *137*, 223–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Malven, P.V.; Head, H.H.; Collier, R.J.; Buonomo, F.C. Periparturient Changes in Secretion and Mammary Uptake of Insulin and in Concentrations of Insulin and Insulin-like Growth Factors in Milk of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **1987**, *70*, 2254–2265. [\[CrossRef\]](#)
52. Marcotty, C.; Frankene, F.; Van Beeumen, J.; Maghuin-Rogister, G.; Hennen, G. Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) from Cow Colostrum: Purification and Characterization. *Growth Regul.* **1991**, *1*, 56–61.
53. Oda, S.; Satoh, H.; Sugawara, T.; Matsunaga, N.; Kuhara, T.; Katoh, K.; Shoji, Y.; Nihei, A.; Ohta, M.; Sasaki, Y. Insulin-like Growth Factor-I, GH, Insulin and Glucagon Concentrations in Bovine Colostrum and in Plasma of Dairy Cows and Neonatal Calves around Parturition. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **1989**, *94*, 805–808. [\[CrossRef\]](#)
54. Ontsouka, C.E.; Bruckmaier, R.M.; Blum, J.W. Fractionized Milk Composition during Removal of Colostrum and Mature Milk. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2005–2011. [\[CrossRef\]](#)
55. Sejrsen, K.; Pedersen, L.O.; Vestergaard, M.; Purup, S. Biological Activity of Bovine Milk: Contribution of IGF-I and IGF Binding Proteins. *Livest. Prod. Sci.* **2001**, *70*, 79–85. [\[CrossRef\]](#)
56. Skaar, T.C.; Vega, J.R.; Pyke, S.N.; Baumrucker, C.R. Changes in Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins in Bovine Mammary Secretions Associated with Pregnancy and Parturition. *J. Endocrinol.* **1991**, *131*, 127–133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Sparks, A.L.; Kirkpatrick, J.G.; Chamberlain, C.S.; Waldner, D.; Spicer, L.J. Insulin-like Growth Factor-I and Its Binding Proteins in Colostrum Compared to Measures in Serum of Holstein Neonates. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2022–2029. [\[CrossRef\]](#)
58. Vacher, P.-Y.; Blum, J.W. Age-Dependency of Insulin-like Growth Factor I, Insulin, Protein and Immunoglobulin Concentrations and Gamma-Glutamyl-Transferase Activity in First Colostrum of Dairy Cows. *Milchwissenschaft* **1993**, *48*, 423–426.
59. Simmen, F.A.; Simmen, R.C.; Reinhart, G. Maternal and Neonatal Somatomedin C/Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF Binding Proteins during Early Lactation in the Pig. *Dev. Biol.* **1988**, *130*, 16–27. [\[CrossRef\]](#)

60. Hall, D.G.; Holst, P.J.; Shutt, D.A. The Effect of Nutritional Supplements in Late Pregnancy on Ewe Colostrum Production Plasma Progesterone and IGF-1 Concentrations. *Aust. J. Agric. Res.* **1992**, *43*, 325–337. [\[CrossRef\]](#)
61. Prosser, C.G.; Royle, C.; Fleet, I.R.; Mephram, T.B. The Galactopoietic Effect of Bovine Growth Hormone in Goats Is Associated with Increased Concentrations of Insulin-like Growth Factor-I in Milk and Mammary Tissue. *J. Endocrinol.* **1991**, *128*, 457–463. [\[CrossRef\]](#)
62. Prosser, C.G.; Fleet, I.R.; Davis, A.J.; Heap, R.B. Mechanism of Secretion of Plasma Insulin-like Growth Factor-I into Milk of Lactating Goats. *J. Endocrinol.* **1991**, *131*, 459–466. [\[CrossRef\]](#)
63. Prosser, C.G.; Fleet, I.R.; Corps, A.N.; Froesch, E.R.; Heap, R.B. Increase in Milk Secretion and Mammary Blood Flow by Intra-Arterial Infusion of Insulin-like Growth Factor-I into the Mammary Gland of the Goat. *J. Endocrinol.* **1990**, *126*, 437–443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Yagi, H.; Suzuki, S.; Noji, T.; Nagashima, K.; Kuroume, T. Epidermal Growth Factor in Cow's Milk and Milk Formulas. *Acta Paediatr.* **1986**, *75*, 233–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Iacopetta, B.J.; Griew, F.; Horisberger, M.; Sunahara, G.I. Epidermal Growth Factor in Human and Bovine Milk. *Acta Paediatr.* **1992**, *81*, 287–291. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Gow, C.B.; Singleton, D.J.; Silvapulle, M.J.; Moore, G.P.M. Lack of Effect of Epidermal Growth Factor Treatment in Late-Pregnant Ewes on Subsequent Lactation. *J. Dairy Res.* **1991**, *58*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Pakkanen, R. Determination of Transforming Growth Factor-Beta 2 (TGF-Beta 2) in Bovine Colostrum Samples. *J. Immunoass.* **1998**, *19*, 23–37. [\[CrossRef\]](#)
68. Gobetti, M.; Minervini, F.; Rizzello, C.G. Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antimicrobial Bioactive Peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **2004**, *57*, 173–188. [\[CrossRef\]](#)
69. Gobetti, M.; Minervini, F.; Rizzello, C.G. Bioactive Peptides in Dairy Products. In *Handbook of Food Products Manufacturing*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 489–517. ISBN 978-0-470-11355-4.
70. FitzGerald, R.J.; Meisel, H. Milk Protein-Derived Peptide Inhibitors of Angiotensin-I-Converting Enzyme. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 33–37. [\[CrossRef\]](#)
71. Brody, E.P. Biological Activities of Bovine Glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, S39–S46. [\[CrossRef\]](#)
72. Manso, M. Casein Macropeptides from Cheese Whey: Physicochemical, Biological, Nutritional, and Technological Features for Possible Uses. *Food Rev. Int.* **2004**, *20*, 329–355. [\[CrossRef\]](#)
73. Song, J.; Gao, J.; Du, M.; Mao, X. Casein Glycomacropeptide Hydrolysates Ameliorate Hepatic Insulin Resistance of C57BL/6J Mice Challenged with High-Fat Diet. *J. Funct. Foods* **2018**, *45*, 190–198. [\[CrossRef\]](#)
74. Li, T.; Gao, D.; Du, M.; Cheng, X.; Mao, X. Casein Glycomacropeptide Hydrolysates Inhibit PGE2 Production and COX2 Expression in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells via Akt Mediated NF-KB and MAPK Pathways. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12188460/> (accessed on 27 May 2020).
75. Yuan, Q.; Zhan, B.; Chang, R.; Du, M.; Mao, X. Antidiabetic Effect of Casein Glycomacropeptide Hydrolysates on High-Fat Diet and STZ-Induced Diabetic Mice via Regulating Insulin Signaling in Skeletal Muscle and Modulating Gut Microbiota. *Nutrients* **2020**, *12*, 220. [\[CrossRef\]](#)
76. Semo, E.; Kesselman, E.; Danino, D.; Livney, Y.D. Casein Micelle as a Natural Nano-Capsular Vehicle for Nutraceuticals. *Food Hydrocoll.* **2007**, *21*, 936–942. [\[CrossRef\]](#)
77. Ma, J.; An, W.; Xu, Q.; Fan, Q.; Wang, Y. Antibacterial Casein-Based ZnO Nanocomposite Coatings with Improved Water Resistance Crafted via Double in Situ Route. *Prog. Org. Coat.* **2019**, *134*, 40–47. [\[CrossRef\]](#)
78. Cheng, H.; Dong, H.; Liang, L. A Comparison of  $\beta$ -Casein Complexes and Micelles as Vehicles for Trans-/Cis-Resveratrol. *Food Chem.* **2020**, *330*, 127209. [\[CrossRef\]](#)
79. Razmi, M.; Divsalar, A.; Saboury, A.A.; Izadi, Z.; Haertle, T.; Mansuri-Torshizi, H. Beta-Casein and Its Complexes with Chitosan as Nanovehicles for Delivery of a Platinum Anticancer Drug. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 362–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Chatterton, D.E.W.; Smithers, G.; Roupas, P.; Brodtkorb, A. Bioactivity of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin—Technological Implications for Processing. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1229–1240. [\[CrossRef\]](#)
81. Markus, C.R.; Olivier, B.; De Haan, E.H. Whey Protein Rich in  $\alpha$ -Lactalbumin Increases the Ratio of Plasma Tryptophan to the Sum of the Other Large Neutral Amino Acids and Improves Cognitive Performance in Stress-Vulnerable Subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *75*, 1051–1056. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Garg, S.; Nurgali, K.; Mishra, V.K. Food Proteins as Source of Opioid Peptides—A Review. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23*, 893–910. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Tyagi, A.; Daliri, E.B.-M.; Kwami Oforu, E.; Yeon, S.-J.; Oh, D.-H. Food-Derived Opioid Peptides in Human Health: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8825. [\[CrossRef\]](#)
84. Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Hunziker, P. Isolation and Identification of Three Bactericidal Domains in the Bovine  $\alpha$ -Lactalbumin Molecule. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 439–448. [\[CrossRef\]](#)
85. Mok, K.H.; Pettersson, J.; Orrenius, S.; Svanborg, C. HAMLET, Protein Folding, and Tumor Cell Death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
86. Mossberg, A.-K.; Hun Mok, K.; Morozova-Roche, L.A.; Svanborg, C. Structure and Function of Human  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells (HAMLET)-Type Complexes. *FEBS J.* **2010**, *277*, 4614–4625. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



87. Gustafsson, L.; Leijonhufvud, I.; Aronsson, A.; Mossberg, A.-K.; Svanborg, C. Treatment of Skin Papillomas with Topical Alpha-Lactalbumin-Oleic Acid. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2663–2672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Mossberg, A.-K.; Wullt, B.; Gustafsson, L.; Månsson, W.; Ljunggren, E.; Svanborg, C. Bladder Cancers Respond to Intravesical Instillation of HAMLET (Human Alpha-Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells). *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1352–1359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Creamer, L.K.; Harris, D.P. *Relationship between Milk Protein Polymorphism and Physico-Chemical Properties*; New Z.D.R.L.; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1997.
90. Kim, J.; Ko, Y.; Park, Y.-K.; Kim, N.-I.; Ha, W.-K.; Cho, Y. Dietary Effect of Lactoferrin-Enriched Fermented Milk on Skin Surface Lipid and Clinical Improvement of Acne Vulgaris. *Nutrition* **2010**, *26*, 902–909. [\[CrossRef\]](#)
91. Boghawaththa, D.; Chandrapala, J.; Vasiljevic, T. Thermal Denaturation of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin in Different Protein Mixtures in Relation to Antigenicity. *Int. Dairy J.* **2019**, *91*, 89–97. [\[CrossRef\]](#)
92. Liu, H.C.; Chen, W.L.; Mao, S.J.T. Antioxidant Nature of Bovine Milk Beta-Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 547–555. [\[CrossRef\]](#)
93. Hernández-Ledesma, B.; Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Amigo, L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from  $\alpha$ -Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 588–593. [\[CrossRef\]](#)
94. McIntosh, G.H.; Royle, P.J.; Le Leu, R.K.; Regester, G.O.; Johnson, M.A.; Grinstead, R.L.; Kenward, R.S.; Smithers, G.W. Whey Proteins as Functional Food Ingredients? *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 425–434. [\[CrossRef\]](#)
95. Wanders, D.; Hobson, K.; Ji, X. Methionine Restriction and Cancer Biology. *Nutrients* **2020**, *12*, 684. [\[CrossRef\]](#)
96. Pan, Y.; Shiell, B.; Wan, J.; Coventry, M.J.; Michalski, W.P.; Løeb, A.; Roginski, H. The Molecular Characterisation and Antimicrobial Properties of Amidated Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Int. Dairy J.* **2007**, *17*, 1450–1459. [\[CrossRef\]](#)
97. Oevermann, A.; Engels, M.; Thomas, U.; Pellegrini, A. The Antiviral Activity of Naturally Occurring Proteins and Their Peptide Fragments after Chemical Modification. *Antivir. Res.* **2003**, *59*, 23–33. [\[CrossRef\]](#)
98. Czosnykowska-Lukacka, M.; Orczyk-Pawilowicz, M.; Broers, B.; Królak-Olejnik, B. Lactoferrin in Human Milk of Prolonged Lactation. *Nutrients* **2019**, *11*, 2350. [\[CrossRef\]](#)
99. Rahman, M.; Kim, W.-S.; Kumura, H.; Shimazaki, K. Bovine Lactoferrin Region Responsible for Binding to Bifidobacterial Cell Surface Proteins. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 863–868. [\[CrossRef\]](#)
100. Steijns, J.M.; van Hooijdonk, A.C.M. Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)
101. Bobbarala, V. *A Search for Antibacterial Agents*; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; ISBN 978-953-51-0724-8.
102. Baker, E.N.; Baker, H.M. Molecular Structure, Binding Properties and Dynamics of Lactoferrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2531. [\[CrossRef\]](#)
103. Legrand, D.; Pierce, A.; Ellass, E.; Carpentier, M.; Mariller, C.; Mazurier, J. Lactoferrin Structure and Functions. *Bioact. Compon. Milk* **2008**, 163–194. [\[CrossRef\]](#)
104. Orsi, N. The Antimicrobial Activity of Lactoferrin: Current Status and Perspectives. *Biomaterials* **2004**, *17*, 189–196. [\[CrossRef\]](#)
105. Zelechowska, P.; Agier, J.; Brzezińska-Błaszczak, E. Endogenous Antimicrobial Factors in the Treatment of Infectious Diseases. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2016**, *41*, 419–425. [\[CrossRef\]](#)
106. Zimecki, M.; Spiegel, K.; Waszczyk, A.; Kübler, A.; Kruzel, M.L. Lactoferrin Increases the Output of Neutrophil Precursors and Attenuates the Spontaneous Production of TNF-Alpha and IL-6 by Peripheral Blood Cells. *Arch. Immunol. Exp.* **1999**, *47*, 113–118.
107. Yamauchi, K.; Wakabayashi, H.; Hashimoto, S.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H.; Tomita, M. Effects of Orally Administered Bovine Lactoferrin on the Immune System of Healthy Volunteers. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *443*, 261–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Takase, M. Lactoferrin Research, Technology and Applications. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1241–1251. [\[CrossRef\]](#)
109. Van der Strate, B.W.; Beljaars, L.; Molema, G.; Harmsen, M.C.; Meijer, D.K. Antiviral Activities of Lactoferrin. *Antivir. Res.* **2001**, *52*, 225–239. [\[CrossRef\]](#)
110. Van der Kraan, M.I.A.; Groenink, J.; Nazmi, K.; Veerman, E.C.L.; Bolscher, J.G.M.; Nieuw Amerongen, A.V. Lactoferrin: A Novel Antimicrobial Peptide in the N1-Domain of Bovine Lactoferrin. *Peptides* **2004**, *25*, 177–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Valenti, P.; Seganti, L. Antiviral Activity of Milk Proteins: Lactoferrin Prevents Rotavirus Infection in the Enterocyte-like Cell Line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.* **1997**, *186*, 83–91. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Siqueiros-Cendón, T.; Arévalo-Gallegos, S.; Iglesias-Figueroa, B.F.; Garcia-Montoya, I.A.; Salazar-Martinez, J.; Rascón-Cruz, Q. Immunomodulatory Effects of Lactoferrin. *Acta Pharm. Sin.* **2014**, *35*, 557–566. [\[CrossRef\]](#)
113. Seganti, L.; Di Biase, A.M.; Marchetti, M.; Pietrantonio, A.; Tinari, A.; Superti, F. Antiviral Activity of Lactoferrin towards Naked Viruses. *Biomaterials* **2004**, *17*, 295–299. [\[CrossRef\]](#)
114. Saraceno, R.; Gramiccia, T.; Chimenti, S.; Valenti, P.; Pietropaoli, M.; Bianchi, L. Topical Lactoferrin Can Improve Stable Psoriatic Plaques. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* **2014**, *149*, 335–340.
115. Superti, F. Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients* **2020**, *12*, 2562. [\[CrossRef\]](#)
116. Drago-Serrano, M.E.; de la Garza-Amaya, M.; Luna, J.S.; Campos-Rodríguez, R. Lactoferrin-Lipopolysaccharide (LPS) Binding as Key to Antibacterial and Antidotoxic Effects. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
117. Wakabayashi, H.; Uchida, K.; Yamauchi, K.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H.; Yamaguchi, H. Lactoferrin given in Food Facilitates Dermatophytosis Cure in Guinea Pig Models. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 595–602. [\[CrossRef\]](#)

118. Fernandes, K.E.; Carter, D.A. The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms of Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2. [CrossRef] [PubMed]
119. Leboffe, L.; Giansanti, E.; Antonini, G. Antifungal and Antiparasitic Activities of Lactoferrin. *Anti Infect. Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 114–127. [CrossRef]
120. Berlutti, F.; Pantanella, E.; Natalizi, T.; Frioni, A.; Paesano, R.; Polimeni, A.; Valenti, P. Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. *Molecules* **2011**, *16*, 6992–7018. [CrossRef]
121. Redwan, E.M.; Üversky, V.N.; El-Fakharany, E.M.; Al-Mehdar, H. Potential Lactoferrin Activity against Pathogenic Viruses. *Comptes Rendus Biol.* **2014**, *337*, 581–595. [CrossRef] [PubMed]
122. Shakibaei, M.; Prevert, U. Dual Interaction of the Malaria Circumsporozoite Protein with the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) and Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1699–1711. [CrossRef] [PubMed]
123. Cirioni, O.; Giacometti, A.; Barchiesi, F.; Scalise, G. Inhibition of Growth of *Pneumocystis Carinii* by Lactoferrins Alone and in Combination with Pyrimethamine, Clarithromycin and Minocycline. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 577–582. [CrossRef] [PubMed]
124. León-Sicaïros, N.; Reyes-López, M.; Ordaz-Pichardo, C.; de la Garza, M. Microbicidal Action of Lactoferrin and Lactoferricin and Their Synergistic Effect with Metronidazole in *Entamoeba Histolytica*. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84*, 327–336. [CrossRef]
125. Weinberg, G.A. Iron Chelators as Therapeutic Agents against *Pneumocystis Carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 997–1003. [CrossRef]
126. Jønsen, H.; Hancock, R. Antimicrobial Properties of Lactoferrin. *Biochimie* **2009**, *91*, 19–29. [CrossRef]
127. Superti, F.; Berlutti, F.; PAESANO, R. Structure and Activity of Lactoferrin—A Multi Functional Protective Agent for Human Health. *Iron Metab. Dis.* **2008**, *8*, 1–32.
128. Andersen, J.H.; Jønsen, H.; Gutteberg, T.J. Lactoferrin and Lactoferricin Inhibit Herpes Simplex 1 and 2 Infection and Exhibit Synergy When Combined with Acyclovir. *Antivir. Res.* **2003**, *58*, 209–215. [CrossRef]
129. Hendrixson, D.R.; Qiu, J.; Shewry, S.C.; Pink, D.L.; Petty, S.; Baker, E.N.; Plaut, A.G.; St Geme, J.W. Human Milk Lactoferrin Is a Serine Protease That Cleaves Haemophilus Surface Proteins at Arginine-Rich Sites. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 607–617. [CrossRef]
130. Singh, H.; Ye, A.; Horne, D. Structuring Food Emulsions in the Gastrointestinal Tract to Modify Lipid Digestion. *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 92–100. [CrossRef]
131. Diarra, M.S.; Pétitclerc, D.; Lacasse, P. Effect of Lactoferrin in Combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus Aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 1141–1149. [CrossRef]
132. Ishii, K.; Takamura, N.; Shinohara, M.; Wakui, N.; Shin, H.; Sumino, Y.; Ohmoto, Y.; Teraguchi, S.; Yamauchi, K. Long-Term Follow-up of Chronic Hepatitis C Patients Treated with Oral Lactoferrin for 12 Months. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **2003**, *25*, 226–233. [CrossRef]
133. Andersen, J.H.; Jønsen, H.; Sandvik, K.; Gutteberg, T.J. Anti-HSV Activity of Lactoferrin and Lactoferricin Is Dependent on the Presence of Heparan Sulphate at the Cell Surface. *J. Med. Virol.* **2004**, *74*, 262–271. [CrossRef]
134. Berkhout, B.; Floris, R.; Recio, I.; Visser, S. The Antiviral Activity of the Milk Protein Lactoferrin against the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Biomaterials Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **2004**, *17*, 291–294. [CrossRef]
135. Brock, J.H. The Physiology of Lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* **2002**, *80*, 1–6. [CrossRef]
136. Firestein, G.S.; Stanford, S.M. Mechanisms of Inflammation and Tissue Repair. In *Goldman's Cecil Medicine*, 26th ed.; Goldman, L., Schafer, A., Eds.; Elsevier: Alpharetta, GA, USA, 2019; Chapter 42; pp. 212–216. ISBN 978-0-323-55087-1.
137. Larkins, N. Potential Implications of Lactoferrin as a Therapeutic Agent. *Am. J. Vet. Res.* **2005**, *66*, 739–742. [CrossRef]
138. Fox, F.; Kelly, A.L. Indigenous Enzymes in Milk: Overview and Historical Aspects—Part 1 | Request PDF. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 500–516. [CrossRef]
139. Garcia, H.S.; López-Hernandez, A.; Hill, C.G. 4.47—Enzyme Technology—Dairy Industry Applications. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed.; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, VT, USA, 2011; pp. 567–574. ISBN 978-0-08-088504-9.
140. Ozer, B. Natural Anti-Microbial Systems | Lactoperoxidase and Lactoferrin. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd ed.; Batt, C.A., Tortorello, M.L., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2014; pp. 930–935. ISBN 978-0-12-384733-1.
141. Pakkanen, R.; Aalto, J. Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 285–297. [CrossRef]
142. Seifu, E.; Buys, E.; Donkin, E. Significance of the Lactoperoxidase System in the Dairy Industry and Its Potential Applications: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 137–154. [CrossRef]
143. Shin, K.; Hayasawa, H.; Lönnnerdal, B. Inhibition of *Escherichia Coli* Respiratory Enzymes by the Lactoperoxidase-Hydrogen Peroxide-Thiocyanate Antimicrobial System. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 489–493. [CrossRef]
144. Belding, M.E.; Klebanoff, S.J.; Ray, C.G. Peroxidase-Mediated Virucidal Systems. *Science* **1970**, *167*, 195–196. [CrossRef]
145. Purdy, M.A.; Tenovuo, J.; Pruitt, K.M.; White, W.E. Effect of Growth Phase and Cell Envelope Structure on Susceptibility of *Salmonella Typhimurium* to the Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide System. *Infect. Immun.* **1983**, *39*, 1187–1195. [CrossRef]
146. El-Fakharany, E.M.; Abd-Elhamid, A.I.; El-Deeb, N.M. Preparation and Characterization of Novel Nanocombination of Bovine Lactoperoxidase with Dye Decolorizing and Anti-Bacterial Activity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8530. [CrossRef]
147. Hurley, W.L.; Theil, P.K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* **2011**, *3*, 442–474. [CrossRef]
148. Czosnykowska-Lukacka, M.; Lis-Kuberka, J.; Królak-Olejnik, B.; Orczyk-Pawłłowicz, M. Changes in Human Milk Immunoglobulin Profile During Prolonged Lactation. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*. [CrossRef]

149. Gapper, L.W.; Copestake, D.E.J.; Otter, D.E.; Indyk, H.E. Analysis of Bovine Immunoglobulin G in Milk, Colostrum and Dietary Supplements: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 93–109. [CrossRef] [PubMed]
150. Korhonen, H. Milk-Derived Bioactive Peptides: From Science to Applications. *J. Funct. Foods* **2009**, *1*, 177–187. [CrossRef]
151. Chiang, B.H.; Su, C.K.; Tsai, G.J.; Tsao, G.T. Egg White Lysozyme Purification by Ultrafiltration and Affinity Chromatography. *J. Food Sci.* **2006**, *58*, 303–306. [CrossRef]
152. Cegielska-Radziejewska, R.; Lesnierowski, G.; Kijowski, J. Properties and Application of Egg White Lysozyme and Its Modified Preparations—A Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2008**, *58*, 5–10.
153. Benkerroum, N. Antimicrobial Activity of Lysozyme with Special Relevance to Milk. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*. [CrossRef]
154. Clementi, E.A.; Wilhelm, K.R.; Schleucher, J.; Morozova-Roche, L.A.; Hakansson, A.P. A Complex of Equine Lysozyme and Oleic Acid with Bactericidal Activity against *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80649. [CrossRef]
155. Tripathy, N.; Ahmad, R.; Bang, S.H.; Min, J.; Hahn, Y.-B. Tailored Lysozyme-ZnO Nanoparticle Conjugates as Nanoantibiotics. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9298–9301. [CrossRef] [PubMed]
156. Janusz, M.; Woszczyzna, M.; Lisowski, M.; Kubis, A.; Macała, J.; Gotszalk, T.; Lisowski, J. Ovine Colostrum Nanopeptide Affects Amyloid Beta Aggregation. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 190–196. [CrossRef]
157. Kruzel, M.L.; Janusz, M.; Lisowski, J.; Fischleigh, R.V.; Georgiades, J.A. Towards an Understanding of Biological Role of Colostrinin Peptides. *J. Mol. Neurosci.* **2001**, *17*, 379–389. [CrossRef]
158. Boldogh, I.; Aguilera-Aguirre, L.; Bacsı, A.; Choudhury, B.K.; Saavedra-Molina, A.; Kruzel, M. Colostrinin Decreases Hypersensitivity and Allergic Responses to Common Allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2008**, *146*, 298–306. [CrossRef]
159. Leszek, J.; Inglot, A.D.; Janusz, M.; Byczkiewicz, E.; Kiejna, A.; Georgiades, J.; Lisowski, J. Colostrinin Proline-Rich Polypeptide Complex from Ovine Colostrum—a Long-Term Study of Its Efficacy in Alzheimer’s Disease. *Med. Sci. Monit.* **2002**, *8*, P193–P196. [PubMed]
160. Mailloux, A.W.; Zhang, L.; Moscinski, L.; Bennett, J.M.; Yang, L.; Yoder, S.J.; Bloom, G.; Wei, C.; Wei, S.; Sokol, L.; et al. Fibrosis and Subsequent Cytopenias Are Associated with Basic Fibroblast Growth Factor-Deficient Pluripotent Mesenchymal Stromal Cells in Large Granular Lymphocyte Leukemia. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24014875/> (accessed on 8 July 2020).
161. Fiore, M.; Chaldakov, G.N.; Aloe, L. Nerve Growth Factor as a Signaling Molecule for Nerve Cells and Also for the Neuroendocrine-Immune Systems. *Rev. Neurosci.* **2009**, *20*, 133–145. [CrossRef] [PubMed]
162. Galazios, G.; Papazoglou, D.; Tsikouras, P.; Kolios, G. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Pregnancy. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **2009**, *22*, 371–378. [CrossRef]
163. Gauthier, S.F.; Pouliot, Y.; Maubois, J.-L. Growth Factors from Bovine Milk and Colostrum: Composition, Extraction and Biological Activities. *Lait* **2006**, *86*, 99–125. [CrossRef]
164. Mehra, R.; Marnila, P.; Korhonen, H. Milk Immunoglobulins for Health Promotion. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1262–1271. [CrossRef] [PubMed]
165. Struff, W.; Sprotte, G. Bovine Colostrum as a Biologic in Clinical Medicine: A Review—Part II: Clinical Studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *46*, 211–225. [CrossRef]
166. Triantafyllidis, J.K.; Merikas, E.; Georgopoulos, E. Current and Emerging Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Drug Des. Dev. Ther.* **2011**, *5*, 185–210. [CrossRef]
167. Song, Y.; Pimentel, C.; Walters, K.; Boller, L.; Ghiasvand, S.; Liu, J.; Staley, K.J.; Berdichevsky, Y. Neuroprotective Levels of IGF-1 Exacerbate Epileptogenesis after Brain Injury. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [CrossRef]
168. Playford, R.J.; Macdonald, C.E.; Johnson, W.S. Colostrum and Milk-Derived Peptide Growth Factors for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 5–14. [CrossRef]
169. Bhora, F.Y.; Dunkin, B.J.; Batzri, S.; Aly, H.M.; Bass, B.L.; Sidawy, A.N.; Harmon, J.W. Effect of Growth Factors on Cell Proliferation and Epithelialization in Human Skin. *J. Surg. Res.* **1995**, *59*, 236–244. [CrossRef]
170. Mueller, E.A.; Trapp, S.; Frenzel, A.; Kirch, W.; Brantl, V. Efficacy and Tolerability of Oral Lactoferrin Supplementation in Mild to Moderate Acne Vulgaris: An Exploratory Study. *Curr. Med. Res. Opin.* **2011**, *27*, 793–797. [CrossRef] [PubMed]
171. Poulin, Y.; Pouliot, Y.; Lamiot, E.; Aattouri, N.; Gauthier, S. Safety and Efficacy of a Milk-Derived Extract in the Treatment of Plaque Psoriasis: An Open-Label Study. *J. Cutan. Med. Surg.* **2006**, *9*, 271–275. [CrossRef] [PubMed]
172. Murata, M.; Satoh, T.; Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Abe, E.; Nomura, Y. Oral Administration of Bovine Lactoferrin Attenuates Ultraviolet B-Induced Skin Photodamage in Hairless Mice. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 651–658. [CrossRef]
173. Chan, H.; Chan, G.; Santos, J.; Dee, K.; Co, J.K. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Efficacy and Safety of Lactoferrin with Vitamin E and Zinc as an Oral Therapy for Mild to Moderate Acne Vulgaris. *Int. J. Dermatol.* **2017**, *56*, 686–690. [CrossRef]
174. Pukacka, M.; Pukacki, P.; Zaba, R.; Adamski, Z.; Mrozewicz, B. Use of Bovine Colostrum in Dermatology in the Department of Dermatology and Venerology of Poznan. *Dermatol. Prakt.* **2015**, *7*, 61–64.
175. Cosentino, C.; Elshafie, H.S.; Labella, C.; D’Adamo, C.; Pecora, G.; Musto, M.; Paolino, R.; Camele, L.; Freschi, P. Study on the Protective Effect of an Innovative Cow Milk-Based Product against Some Human Skin-Bacterial Pathogens. *J. Biol. Res.* **2018**, *91*. [CrossRef]
176. Kocic, H.; Stankovic, M.; Yirant, M.; Lotti, T.; Arsic, I. Favorable Effect of Creams with Skimmed Donkey Milk Encapsulated in Nanoliposomes on Skin Physiology. *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*, e13511. [CrossRef]









177. Gobbi, R.M. Pharmaceutical and Dermocosmetic Compositions Containing Equine Colostrum. U.S. Patent No. 5750149, 12 May 1998.
178. Kwak, T.; Kim, K.I.; Kim, J.H.; Jung, M.G.; An, Y.; Park, S.J. Composition for Improving Atopic Skin of Fermented Product of Colostrum. KR Patent No. 20200034217A, 31 March 2020.
179. Kwak, T.; Kim, K.; Kim, J.H.; Jung, M.G.; Seo, S.A.; Seo, H.R. A Cosmetic Composition of Fermented Colostrum Product for Anti-Acne. KR Patent No. 20190060556A, 3 June 2019.
180. Gobbi, R.M. Cosmetic Compositions Containing Hyaluronic Acid and Colostrum. WO Patent 2007009790A1, 25 January 2007.
181. Park, S.M.; Lee, Y. HWhitening Functional Cosmetics Using Colostrum and Arbutin and Preparation Method Thereof. KR Patent 100619289B1, 12 April 2007.
182. Torre, C.; Jeusette, I.; Serra, M.; Brazis, P.; Puigdemont, A. Bovine Colostrum Increases Proliferation of Canine Skin Fibroblasts. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2058S–2060S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Zava, S.; Barello, C.; Pessione, A.; Garoffo, L.P.; Fattori, P.; Montorfano, G.; Conti, A.; Giunta, C.; Pessione, E.; Berra, B.; et al. Mare's Colostrum Globules Stimulate Fibroblast Growth in Vitro: A Biochemical Study. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 836–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Amiot, J.; Germain, L.; Turgeon, S.; Lemay, M.; Ory-Salam, C.; Auger, E.A. Peptides from Milk Protein Hydrolysates to Improve the Growth of Human Keratinocytes in Culture. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 619–626. [[CrossRef](#)]
185. Kocić, H.; Langerholc, T.; Kostić, M.; Stojanović, S.; Najman, S.; Krstić, M.; Nesic, I.; Godić, A.; Wollina, U. The Regenerative Potential of Donkey and Human Milk on the Redox-Sensitive and Proliferative Signaling Pathways of Skin Fibroblasts. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Picardo, M.; Cardinali, G. Bovine Colostrum Induces the Differentiation of Human Primary Keratinocytes. *FASEB J.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Hewitt, E.; Mros, S.; McConnell, M.; Cabral, J.D.; Ali, A. Melt-Electrowriting with Novel Milk Protein/PCL Biomaterials for Skin Regeneration. *Biomed. Mater.* **2019**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Javanmardi, S.; Safari, I.; Aghaz, E.; Khazaei, M. Wound Healing Activities of Gundelia Tournefortii L. Extract and Milk-Cream Ointment on Second-Degree Burns of Rat Skin. *Int. J. Low Extrem. Wounds* **2020**, 1534734620921589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Kocić, H.D.; Arsić, I.; Šmelcerović, A.; Knežević, D.; Godić, A.D. Process for Producing Cream and Serum with Partly Skimmed Donkey's Milk and L-Arginine Encapsulated in Phospholipid Nanospheres. RS Patent 20160289A1, 31 December 2018.

**Publikacja 2 [P2]:**

**Kazimierska K**, Szabłowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośła K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(15):8091. <https://doi.org/10.3390/ijms25158091>.

Article

# Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care

 Kinga Kazimierska <sup>1</sup>, Ilona Szablowska-Gadomska <sup>2</sup>, Stefan Rudziński <sup>2</sup>, Katarzyna Kośla <sup>3</sup>,  
Elżbieta Pluciennik <sup>4</sup>, Łukasz Bobak <sup>5</sup>, Aleksandra Zambrowicz <sup>5</sup> and Urszula Kalinowska-Lis <sup>1,\*</sup>
<sup>1</sup> Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; kinga.kazimierska@student.umed.lodz.pl

<sup>2</sup> Laboratory for Cell Research and Application, Center for Preclinical Research and Technology, Medical University of Warsaw, Banacha 1b, 02-097 Warsaw, Poland; ilona.szablowska-gadomska@wum.edu.pl (I.S.-G.); stefan.rudziński@wum.edu.pl (S.R.)

<sup>3</sup> Department of Molecular Carcinogenesis, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; katarzyna.kosla@umed.lodz.pl

<sup>4</sup> Department of Functional Genomics, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; elzbieta.pluciennik@umed.lodz.pl

<sup>5</sup> Department of Functional Food Products Development, Wrocław University of Environmental and Life Science, 51-640 Wrocław, Poland; lukasz.bobak@upwr.edu.pl (L.B.); aleksandra.zambrowicz@upwr.edu.pl (A.Z.)

<sup>\*</sup> Correspondence: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl

**Abstract** Colostrum is gaining popularity in cosmetic products. The present study compared the composition and selected biological properties of colostrum from Polish sheep (colostrum 1) and Swiss sheep (colostrum 2), particularly those that can affect healthy or diseased skin. The antioxidant activity of the colostrums was measured using ABTS and DPPH assays. The effect on the proliferation of human skin fibroblasts, neonatal epidermal keratinocytes, and human diabetic fibroblast (dHF) cells isolated from diabetic foot ulcers was also assayed in vitro by MTT and Presto Blue tests, respectively. The colostrum simulated dHF cell proliferation by up to 115.4%. The highest used concentration of colostrum 1 stimulated normal fibroblast proliferation by 191.2% (24 h) and 222.2% (48 h). Both colostrums inhibited epidermal keratinocyte viability. The influence of the colostrums on the expression of genes related to proliferation (*Ki67*) and immune response (*IL-6*, *PTGS-2*, *TSG-6*) in dHF cells were compared. Colostrum 1 increased the rate of wound closure (scar test). Analysis of total fat, protein and fatty acid content found the Polish colostrum to be a richer source of fat than the Swiss colostrum, which contained a larger amount of protein. Both colostrums exhibit properties that suggest they could be effective components in cosmetic or medicinal formulations for skin care, especially supporting its regeneration, rejuvenation, and wound healing.

**Keywords:** antioxidant; cosmetic ingredients; fibroblasts; keratinocytes; gene expression; proliferation; scar test; sheep colostrum; skin diseases



**Citation:** Kazimierska, K.; Szablowska-Gadomska, I.; Rudziński, S.; Kośla, K.; Pluciennik, E.; Bobak, Ł.; Zambrowicz, A.; Kalinowska-Lis, U. Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8091. <https://doi.org/10.3390/ijms25158091>

Academic Editors: Elżbieta Budzisz and Paulina Mucha

Received: 2 July 2024

Revised: 18 July 2024

Accepted: 23 July 2024

Published: 25 July 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Colostrum, the so-called first milk, is a thick, yellow secretion of the mammary glands produced by mammals in the first few hours after giving birth. Sheep colostrum and mature milk provide essential nutrients and bioactive components critical for the growth and development of newborn lambs prior to weaning [1]. The composition and biological activities of milk vary widely among species and breeds, being influenced by genetics, environmental conditions, and dietary factors [2]. However, the key functional elements in milk are proteins, which can be categorized into three primary groups: caseins, whey proteins, and milk fat globule membrane proteins [2–4]. Among these, the predominant proteins in milk are caseins, which provide crucial amino acids necessary for the growth of newborns [4,5]. Milk fat globule membrane proteins enable the transport of fats and

proteins, cell signaling, metabolic regulation, and other key biological functions [6,7]. Whey proteins, which constitute about 20% of total milk protein content [8], are essential for providing neonatal protection via antioxidant properties, immune-enhancing effects, and anti-inflammatory activities [3,9].

Colostrum is also notably rich in fats, carbohydrates, and proteins, and its complex composition provides essential micronutrients (vitamins and minerals), antimicrobial agents (including lactoferrin and lysozymes), and growth factors [2,10]. It contains essential minerals including selenium (Se), which are vital for preventing nutritional shortfalls in nursing lambs; without these, they could suffer myodegenerative conditions. For example, selenium deficiency can result in white muscle disease [2,11–13]. Furthermore, other important minerals in colostrum, such as magnesium (Mg), manganese (Mn), zinc (Zn), and copper (Cu), have significant roles in protecting the integrity of cellular membranes from oxidative stress [2,13,14].

However, there is little research on sheep colostrum compared to bovine colostrum [15–20]. The present study compares the content and certain biological activities between colostrum of Polish and Swiss origin. It is hypothesized that differences in the environment between Poland's continental climate and Switzerland's alpine regions may influence the nutritional and biological profiles of colostrum, and thus its potential therapeutic value. The analysis focuses on the total protein level and lipid compositions, which are vital for its therapeutic efficacy, particularly in skin care and human health.

The study examines the impact of colostrum on the growth of diabetic human fibroblast cells, a critical area of research given the challenges associated with wound healing in diabetic conditions. This aim is to explore how colostrum can potentially accelerate cell regeneration and improve wound healing outcomes in diabetic patients.

The research explores the capacity of colostrum to promote the growth of fibroblasts and keratinocytes, key cells involved in skin health and wound healing, and assesses its antioxidant properties. It also examines its potential to enhance tissue repair and manage scar formation, crucial aspects of post-operative care and injury recovery, in scar test models.

The proposed *in vitro* tests aim to check whether colostrum will be a good choice as an active component in cosmetic and medicinal preparations with rejuvenating properties, delaying skin aging, regenerating and accelerating wound healing, etc. Moreover, parallel tests on colostrum from two sources (Polish and Swiss) will allow us to compare their properties and indicate the better one.

## 2. Results

### 2.1. Fat, Protein and Fatty Acid Analysis

Noticeable differences in total fat and protein content were found between freeze-dried colostrum 1 and 2 (Table 1). Colostrum 2 had higher protein content (43.68%) than colostrum 1 (34.14%), while colostrum 1 had a much higher fat content (38.05%) than colostrum 2 (26.63%).

**Table 1.** Content (%) of fat and protein in lyophilised colostrum 1 and 2.

	Colostrum 1			Colostrum 2		
	M	SD	SE	M	SD	SE
Fat (%)	38.05 <sup>a</sup>	0.50	0.17	26.63 <sup>a</sup>	0.75	0.25
Protein (%)	34.14 <sup>b</sup>	0.23	0.12	43.68 <sup>b</sup>	0.37	0.18

M—mean value; SD—standard deviation, SE—standard error, <sup>a</sup> n = 9; <sup>b</sup> n = 4 (n—number of independent measurements).

Distinct differences in the concentrations of specific fatty acids were noted between colostrum 1 and 2 (Table 2). Colostrum 2 was characterized by a significantly higher PUFA (polyunsaturated fatty acids) content and a slightly higher SPA (saturated fatty acids)

content than colostrum 1, but a significantly lower MUFA (monounsaturated fatty acids) content than colostrum 1.

**Table 2.** Fatty acid content (%) in lyophilized colostrum 1 and 2.

			Colostrum 1			Colostrum 2		
			M	SD	SE	M	SD	SE
Caprylic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	C8:0	0.00	0.00	0.00	0.36	0.02	0.01
Capric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	C10:0	0.00	0.00	0.00	1.35	0.06	0.03
Lauric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	C12:0	2.34	0.39	0.23	2.59	0.19	0.11
Myristic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	C14:0	11.17	1.17	0.68	13.04	0.65	0.38
Pentadecylic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	C15:0	1.09	0.07	0.04	1.52	0.45	0.26
Palmitic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	C16:0	37.41	0.16	0.09	37.14	0.96	0.56
Palmitoleic acid	9-cis-Hexadecenoic acid	C16:1	2.04	0.30	0.17	1.17	0.02	0.01
Margaric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	C17:0	1.32	0.28	0.16	0.89	0.16	0.09
Stearic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	C18:0	10.65	0.80	0.469	11.86	0.72	0.41
Oleic acid	cis-9-octadecenoic acid	18:1 (n-9)	29.11	1.26	0.73	23.46	0.58	0.33
Linoleic acid (LA)	all-cis-9,12-octadecadienoic acid	18:2 (n-6)	2.98	0.18	0.11	3.97	0.22	0.13
Conjugated linoleic acid (CLA)	(9Z,11E)-Octadeca-9,11-dienoic acid	CLA	0.76	0.06	0.04	1.64	0.05	0.03
Alpha-linolenic acid (ALA)	all-cis-9,12,15-octadecatrienoic acid	18:3 (n-3)	1.12	0.04	0.02	1.01	0.042	0.022
		SFA	63.98	1.11	0.64	68.75	0.78	0.45
		MUFA	31.16	0.98	0.56	24.63	0.59	0.34
		PUFA	4.86	0.15	0.08	6.62	0.21	0.12

M=mean value; SD=standard deviation, SE=standard error; (n = 3).

The predominant saturated fatty acids (SFA) in both colostrums were palmitic, myristic, and stearic acids. Both colostrum 1 and colostrum 2 contained almost identical amounts of palmitic acid, 37.41% and 37.14%, respectively, while colostrum 2 had slightly higher levels of myristic acid (11.17% vs 13.04%) and stearic acid (10.65% vs 11.86%). Caprylic and capric acids were absent from colostrum 1, but were present in very small amounts in colostrum 2: 0.36% and 1.35%, respectively.

Among monounsaturated fatty acids (MUFA), both oleic acid and palmitoleic acid were more abundant in colostrum 1 than in colostrum 2. The oleic acid content was 29.11% and 23.46% in colostrum 1 and 2, respectively, and the palmitoleic acid content was 2.02% and 1.17%.

Polyunsaturated fatty acids (PUFA), including linoleic acid (LA), conjugated linoleic acid (CLA), and alpha-linolenic acid (ALA), accounted for only 4.86% and 6.62% of all fatty acids contained in colostrum 1 and 2, respectively. Among these, LA predominated, amounting to 2.98% and 3.97% in colostrum 1 and 2, respectively (Table 2).

## 2.2. ABTS and DPPH Free Radical Scavenging Activity Assays

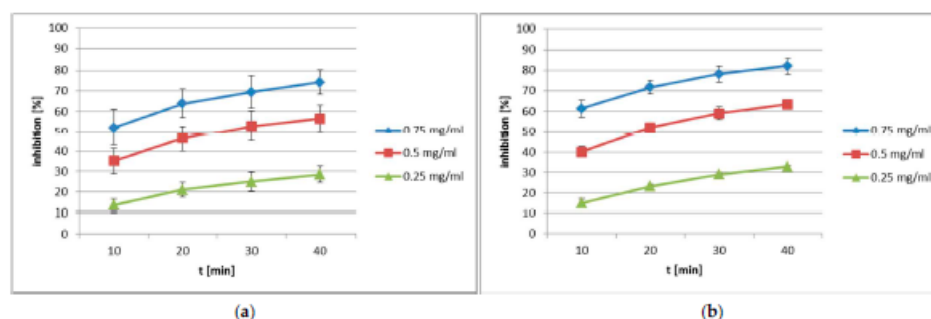
In the DPPH assay, colostrum 1 and colostrum 2 exhibited moderate antioxidant activity, with EC<sub>50</sub> values of 0.988 mg/mL and 0.806 mg/mL, respectively (Table 3). In the ABTS assay, both colostrum 1 and 2 demonstrated around two times stronger anti-radical activity than anti-DPPH activity, with EC<sub>50</sub> values of 0.515 mg/mL (after 30 min) and 0.477 mg/mL (after 40 min) for colostrum 1, and 0.455 mg/mL (after 30 min) and 0.424 mg/mL (after 40 min) for colostrum 2. The antioxidant potential was around one hundred times lower than for the antioxidative standard used, i.e., ascorbic acid, for which the EC<sub>50</sub> value was 0.0053 mg/mL. Colostrum 2 exhibited slightly higher activity than colostrum 1, determined by both DPPH and ABTS assay.



**Table 3.** Antioxidant activity of colostrum 1 and colostrum 2 expressed as EC<sub>50</sub> [mg/mL]. The values represent the mean ± standard deviation of three independent measurements (n = 3).

	ABTS				DPPH
	EC <sub>50</sub> [mg/mL] ± SD				EC <sub>50</sub> [mg/mL] ± SD
	10 min	20 min	30 min	40 min	30 min
Colostrum 1	0.727 ± 0.051	0.574 ± 0.034	0.515 ± 0.048	0.477 ± 0.048	0.988 ± 0.137
Colostrum 2	0.625 ± 0.051	0.512 ± 0.033	0.455 ± 0.043	0.424 ± 0.053	0.806 ± 0.155
Ascorbic acid	0.0053 ± 0.0007				0.0026 ± 0.0003

Additionally, the percentage inhibition of the ABTS radical by colostrum 1 and 2 (0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, and 0.75 mg/mL) was measured every 10 min over a period of 40 min (Figure 1). The greatest increase in inhibition was observed in the first 10 min: colostrum 1 demonstrated 13.5%, 35.0%, and 51.8% inhibition at concentrations of 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, and 0.75 mg/mL, respectively, while 2 demonstrated 15.1%, 40.1%, and 61.2% inhibition. This increase leveled out between 10 and 40 min for both colostrum 1 and 2, amounting to only around 20 p.p. for 0.75 mg/mL and 0.5 mg/mL, and around 15 p.p. for 0.25 mg/mL.

**Figure 1.** Percentage of ABTS radical inhibition by colostrum 1 (a) and colostrum 2 (b) over time (n = 3).

### 2.3. Inhibition of Tyrosinase Activity

To investigate the potential skin-whitening effect of colostrum 1 and 2, their ability to inhibit tyrosinase activity was tested using ascorbic acid as a reference standard. Samples with a concentration of 1 mg/mL were assessed (Table 4). Colostrum 1 demonstrated weak inhibition (23.4%), around four times lower than ascorbic acid; however, this value was approximately three times higher than for colostrum 2 (7.0%).

**Table 4.** Inhibition of tyrosinase activity (%) by colostrum 1 and 2.

Colostrum 1	Colostrum 2	Ascorbic Acid
M ± SD	M ± SD	M ± SD
23.4% ± 0.6%	7.0% ± 2.0%	96.0% ± 2.2%

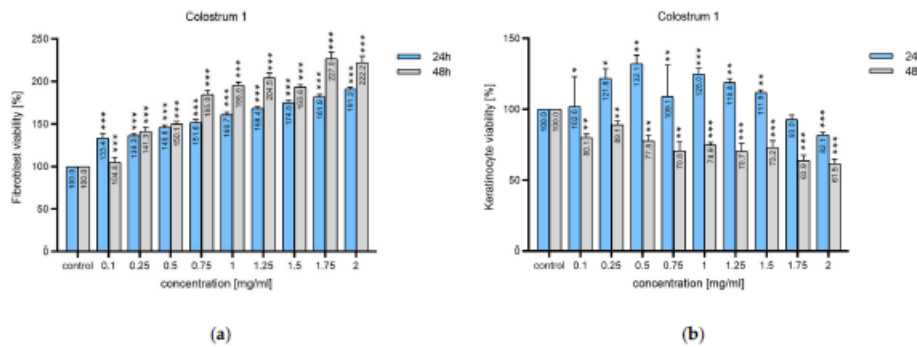
M—mean value; SD—standard deviation; (n = 4).

Although this study found that colostrum 1 has some inhibitory activity, the level was not significant compared to ascorbic acid. Therefore, neither colostrum 1 nor colostrum 2 appear to be a good source of whitening substances for possible skin therapy or care.

#### 2.4. Proliferation of Fibroblasts and Keratinocytes

The effect of colostrum 1 and 2 on human skin fibroblast 1BR.3.N and human neonatal epidermal keratinocytes in relation to dose and time was determined by MTT assay.

After 24-h and 48-h incubation, all concentrations of colostrum 1 significantly increased fibroblast growth in a dose-dependent manner when compared to untreated cells (Figure 2a). The highest increase in proliferation, 91.2% (24 h) and 122.2% (48 h), was observed for colostrum 1 at a concentration of 2 mg/mL.



**Figure 2.** The effect of colostrum 1 on the cell viability of: (a) 1BR.3.N human skin fibroblasts; (b) human neonatal epidermal keratinocytes ( $n = 6$ ); \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

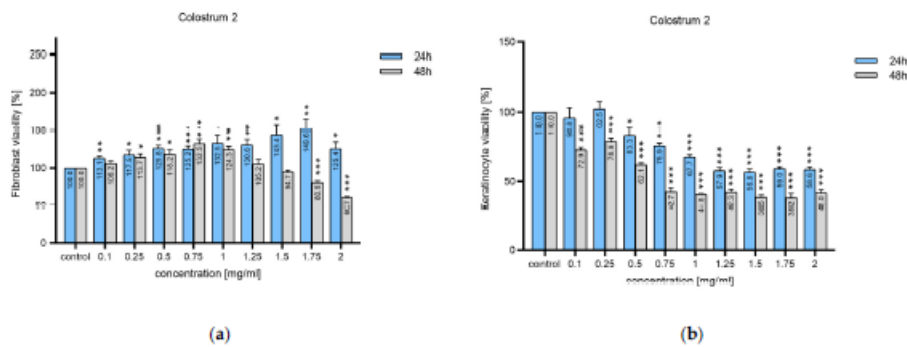
Human epidermal keratinocytes exhibited varying sensitivity to colostrum 1 (Figure 2b). Incubation for 24 h at low concentrations (up to 0.5 mg/mL) slightly increased cell viability by 32.1%, whereas high concentrations (2 mg/mL) reduced viability by up to 82.1%. After 48 h, the effect of decreasing keratinocyte viability was already evident at the lowest dose of 0.1 mg/mL, and increasing the concentration resulted in additional suppression of keratinocyte cell viability, i.e., a reduction of around 40% at 2 mg/mL.

For colostrum 2, after 24 h of incubation, fibroblast proliferation increased with increasing concentration (Figure 3a). However, a smaller increase (from 13.1% to 49.6%) was measured compared to colostrum 1. Incubation for 48 h resulted in a slight increase in proliferation (around 20%) from 0.25 mg/mL to 1 mg/mL, while incubations with 1.75 mg/mL and 2 mg/mL reduced cell viability by 19.4% and 39.3%, respectively.

Incubation for 24 h inhibited human keratinocyte cell proliferation by 16.7% to 41.4% relative to untreated cells, at concentrations from 0.5 to 2 mg/mL; also, 48-h incubation reduced proliferation by 27.1% to 58.0% compared to controls at concentrations from 0.1 to 2 mg/mL (Figure 3b).

#### 2.5. Proliferation of Diabetic Human Fibroblasts

The effect of colostrum 1 and 2 on diabetic human fibroblasts showed mixed trends depending on the cells sample material; the results are presented in Figure 4. Cells cultured with colostrum 1 after 24 h showed mixed tendencies: the values were either lower than controls, viz. dHF1014 (97.3%) and dHF1029 (96.3%), or slightly higher, viz. dHF1022 (101.4%) and dHF1008 (102.2%). After 48 h in culture with colostrum 1, all cells showed higher proliferation rates, especially dHF1022 (107.7%,  $p < 0.001$ ) and dHF1029 (110.8%,  $p < 0.01$ ). For colostrum 2, an increase in proliferation rate was observed already after 24 h, with significant results noted for dHF1014 (105.4%,  $p < 0.05$ ) and dHF1008 (104.3%,  $p < 0.01$ ). After 48 h, the cultured cells showed an even higher increase in proliferation rates: dHF1014 (115.4%,  $p < 0.01$ ); dHF1022 (109.4%,  $p < 0.05$ ).

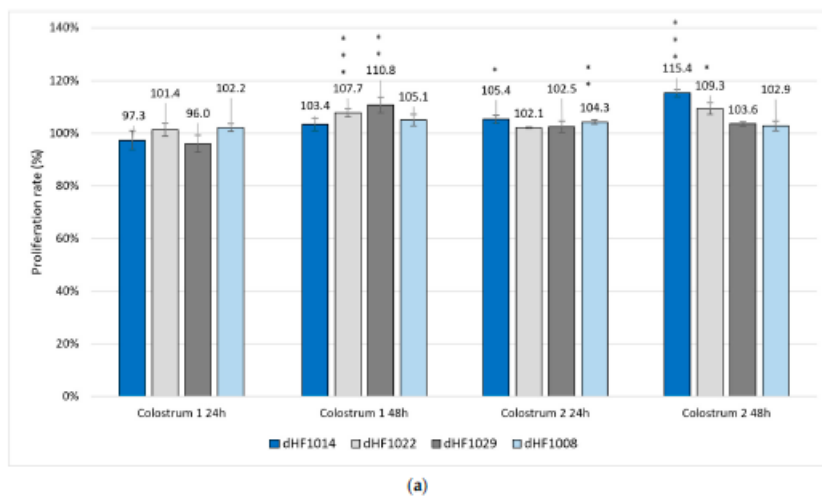


**Figure 3.** The effect of colostrum 2 on the cell viability of (a) 1BR.3.N human skin fibroblasts; (b) human neonatal epidermal keratinocytes (n = 6); \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

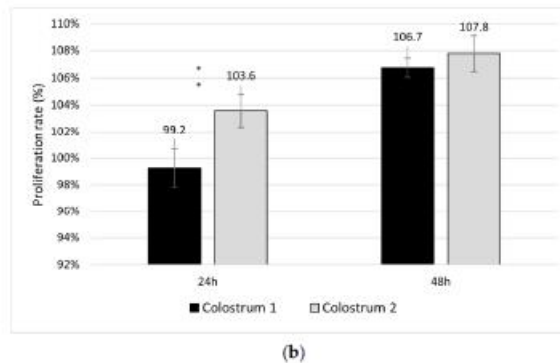
Generally, the dHF cells tended to achieve higher proliferation rates than the control culture after a 48-h culture; however, dHF cells treated with colostrum 2 showed higher proliferation after 24 h (Figure 4b).

2.6. Scar Test Assay

dHF cells cultured with colostrum 1 showed an increased wound closure rate. Cells treated with colostrum 1 proliferated and migrated faster than the cells in the control culture, covering 40% of the initial scar area after 16 h of culture and 20% of the initial scar area after 28 h. Meanwhile, cells treated with colostrum 2 covered 40% of the initial scar area in 28 h and 20% after 40 h of culture (Figure 5).



**Figure 4.** Cont.



**Figure 4.** Presto Blue proliferation test results for diabetic human fibroblasts (dHF): (a) four different dHF cells samples ( $n = 3$ ) cultured with either colostrum 1 or colostrum 2; (b) cumulative results of Presto Blue proliferation tests ( $n = 12$ ). Proliferation rate was calculated with a dHF cultured in standard dHF medium as the control. The proliferation rate of stimulated dHF cells ranged from 96.0% (dHF1029—cultured with colostrum 1 after 24 h) to 115.4% (dHF1014 cultured with colostrum 2 after 48 h). SEMs were calculated. The statistical significance was calculated with Fisher's test and Student's *t*-test. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

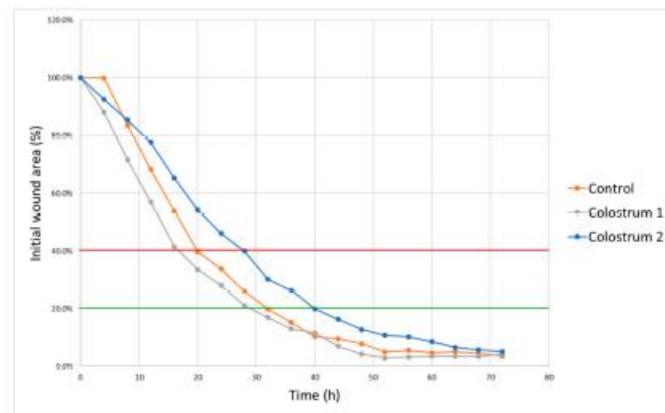
### 2.7. Gene Expression

dHF cells cultured with colostrum 1 showed higher expression of *Ki67* (fold change = 1.53;  $p < 0.0001$ ) and *TSG-6* (fold change = 1.44;  $p < 0.001$ ) genes than the control culture (Figure 6a); in contrast, dHF cells cultured with colostrum 2 showed lower levels of *IL-6* (fold change = 0.82;  $p < 0.05$ ), *PTGS-2* (fold change = 0.65;  $p < 0.0001$ ) and significantly higher levels of *TSG-6* (fold change = 3.3;  $p < 0.0001$ ) (Figure 6b).

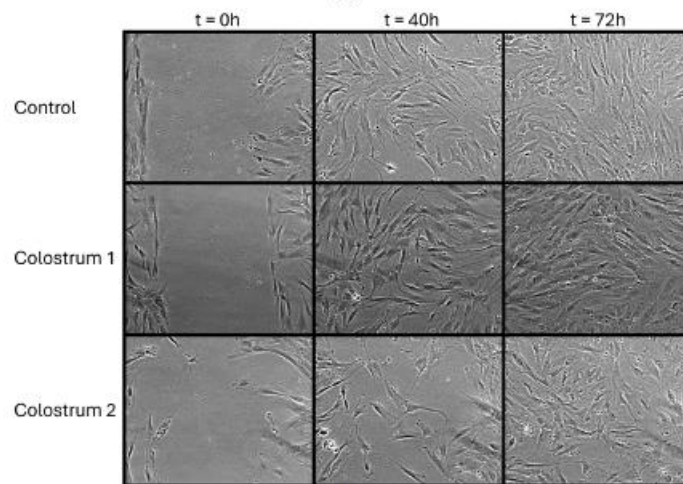
The effects of colostrum 1 and colostrum 2 on the expression of genes related to proliferation (*Ki67*) and immune response (*IL-6*, *PTGS-2*, and *TSG-6*) were also compared in dHF cells from four patients. It was found that colostrum 1 significantly increased the expression of *Ki67* ( $p < 0.05$ ) and *PTGS-2* ( $p < 0.001$ ) genes compared to colostrum 2, while the latter demonstrated stronger stimulation of *TSG-6* expression ( $p < 0.0001$ ). No significant differences in expression levels were observed for *IL-6* (Figure 6c).

Both colostrum 1 and 2 were found to enhance dHF proliferation rate in Presto Blue assay after a 48-h cell culture. However, differences in *Ki67* expression levels suggested that colostrum 1 has a higher potential to stimulate proliferation in dHF than colostrum 2 over longer periods. The observed differences in dHF response to colostrum 1 and 2 may stem from the different levels of LTF protein.

Colostrum 2 significantly increased the expression of *TSG-6* in dHF cell culture compared to controls and colostrum 1; this may suggest that colostrum 2 has anti-inflammatory properties [21]. The lack of any significant change and the lower levels of *IL-6* and *PTGS-2* expression may indicate that colostrum contains *TSG-6*-related stimulants.

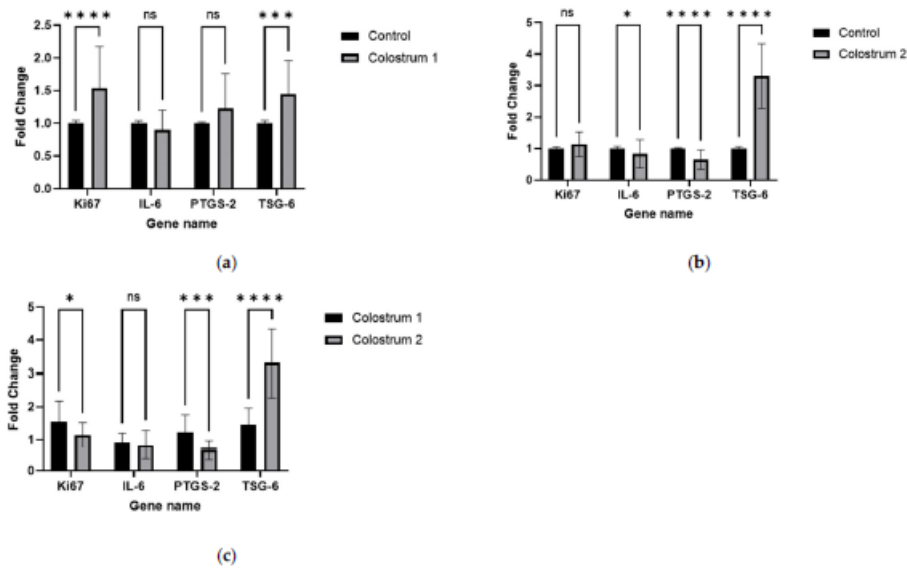


(a)



(b)

**Figure 5.** Scar test results for dHF cells stimulated with either colostrum 1 or colostrum 2 ( $n = 4$ ). (a) dHF cells stimulated with colostrum 1 closed the scar to 40% of the initial scar area (red line) after 18 h of culture and 20% (green line) after 28 h of culture. Colostrum 2 did not increase the speed of dHF migration compared to control culture. (b) Representative photographs of wounds in three selected timepoints. In the scar test, colostrum 1 had a stronger impact on scar closure rate. It was shown that ovine colostrum has the potential to enhance wound healing processes in diabetic foot ulcers.



**Figure 6.** Expression of *Ki67*, *IL-6*, *PTGS-2*, and *TSG-6* in dHF after 48 h treatment with either colostrum 1 or colostrum 2 ( $n = 4$ ). Panels: (a) dHF cells treated with colostrum 1 vs. control; (b) dHF cells treated with colostrum 2 vs. control; (c) colostrum 1 vs. colostrum 2. Statistical significance was determined in GraphPad program with the Mann–Whitney U-test with Holm–Šidák correction for multiple comparisons; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ ; ns means no significance.

### 3. Discussion

In this study, we analyzed the composition of sheep colostrum originating from Polish and Swiss animals. Further, the antioxidative properties of both colostrum were compared and their ability to inhibit the tyrosinase activity as well as the pro-proliferative impact on three types of human skin cells: neonatal epidermal keratinocytes, skin fibroblasts, and diabetic fibroblasts. Additionally, the pro-regenerative attributes of both colostrum were analyzed by scar tests and gene expression of diabetic fibroblasts.

#### 3.1. Analysis of the Composition of Colostrum

The results of present study on protein and fat content in sheep colostrum differ from the results of other researchers. Wendorff et al. reported lower protein (11.8%) and fat (13.0%) content [22]. Different results were also observed in a study on ten sheep breeds, in which the protein and fat content ranged from 13.75% to 22.49% and from 4.04% to 13.64%, respectively [23]. In a study by Guiso et al., the average amounts of protein and fat in colostrum were 16% and 7.8%, respectively. In later milk, the protein and fat content dropped to 5.5% and 5.8% [11].

Such discrepancies could be attributed to various factors, including the form of colostrum (liquid or solid), the period after giving birth, sheep breeds, their diet, and breeding conditions. The content of ingredients in the liquid form of colostrum is lower than in its more concentrated form after lyophilization. Therefore, the solid form (freeze-dried) of our colostrum (1 and 2) may explain their much higher (by about 2–3 times) content of fat and protein than that reported in the literature [22,23]. Furthermore, our colostrums were obtained during the initial 12 h of lactation, a period when concentrations

of substances like protein and fat are markedly higher than in later milk [22]. The protein and fat content can also vary significantly between breeds, and can be influenced by diet and environmental conditions [11,22,23].

Both colostrum samples demonstrated similar fatty acid profiles as noted in previous studies [11,24,25]. Guiso et al. report the following proportions of specific fatty acids: 37% monounsaturated fatty acids (MUFA), 58% saturated fatty acids (SFA), and 6% polyunsaturated fatty acids (PUFA) [11]. In comparison, the MUFA, SFA, and PUFA concentrations were 31.16%, 63.98%, and 4.86%, respectively, in colostrum 1 and 24.63%, 68.75%, and 6.62% in colostrum 2. A similar fatty acid profile was noted for bovine colostrum: 65.6% SFA and 27.5% MUFA [26].

Among the fatty acids, both in colostrum 1 and 2, oleic acid and palmitic acid were the dominant components with the highest contents: 22.11% and 23.46% and 37.41% and 37.14%, respectively. Topical application of oleic acid may compromise the integrity of the lipid barrier, as evidenced by research on olive oil, which is also predominantly composed of oleic acid [27–29]. Its topical application by healthy individuals significantly compromised the integrity of the stratum corneum and induced mild erythema [27].

Specific fatty acids such as CLA and long-chain PUFAs present in our samples are known for their anti-inflammatory and immunomodulatory properties [30–32]. The high levels of CLA in colostrum 2 may make it beneficial in reducing inflammation and helpful in the treatment of autoimmune diseases such as atopic dermatitis [33]. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) have an inhibitory effect on the growth of *P. acnes* NCTC737 and *S. aureus* ATCC43300 bacteria [34]. This may indicate a beneficial effect of colostrum in the treatment of acne vulgaris.

### 3.2. Antioxidant Activity of Colostrum

Milk hydrophilic antioxidants include, among others, caseins, whey proteins (lactoferrin,  $\beta$ -lactoglobulin), peptides, minerals, vitamins, and nitrogen compounds of low molecular weight. Milk is also rich in antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, lactoperoxidase, glutathione peroxidase, and catalase. Lipophilic antioxidants include conjugated linoleic acid (CLA), carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, vitamins A and D3, phospholipids, and coenzyme Q10. The antioxidant capacity of milk varies between species of animal, diet, and the phase of lactation [35,36].

Among the tested milk samples of various mammals (sheep, cows, buffaloes, camels, and goats), sheep milk displayed the strongest DPPH radical scavenging capacity (%), amounting to 27.28%. This milk also had the highest content of total protein and fat [37].

Another study revealed the KGL3A-fermented sheep milk was a source of antioxidative peptides. The milk fractions showed antioxidative properties ranging from 18.4 to 34.6% (ABTS assay) [38].

In the present study, the 50% inhibition of ABTS and DPPH radicals by colostrum was observed for the following concentrations: 0.477 mg/mL and 0.988 mg/mL (colostrum 1) and 0.424 mg/mL and 0.806 mg/mL (colostrum 2), respectively.

### 3.3. Colostrum's Impact on Tyrosinase Activity

Few studies have examined the potential of sheep colostrum and milk, or bovine colostrum, as tyrosinase inhibitory factors.

Nevertheless, one study compared tyrosinase inhibition by proteins, protein hydrolysates, individual peptides, and amino acids derived from industrial proteins ( $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and ovalbumin). It was found that the peptides containing arginine and/or phenylalanine together with valine, alanine, and/or leucine were more effective inhibitors than those containing aspartic or glutamic acid residues [39]. Milk proteins such as k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin are known to inhibit melanogenesis and their hydrolysates are antioxidant peptides [40]. Donkey milk is a promising skin whitening and antiphotaging agent, showing a good inhibitory effect on melanin synthesis, tyrosinase activity, and related gene expression [41].

Although we may presume that either colostrum 1 or 2 are sources of whitening agents for prospective skin care, we did find in our research that colostrums have a slight tendency to decrease tyrosinase activity.

#### 3.4. *The Effect of Colostrum on Proliferation of Fibroblasts and Keratinocytes*

Assessment of the effect of colostrum on stimulating the growth of the basic skin cells building the dermis and epidermis, fibroblasts and keratinocytes, as well as diabetic human fibroblasts (dHF) can serve as a model for effectiveness in supporting skin wound healing, its regenerative capacity, skin rejuvenation, and even delaying skin aging.

Bovine colostrum has been found to stimulate canine fibroblast growth *in vitro*. The effect of this colostrum was very similar to the effect of sheep colostrum 2 on human fibroblast cells in our study. The highest concentrations of bovine colostrum used, i.e., 0.3 mg/mL and 1 mg/mL, stimulated the growth of canine fibroblasts by 12% and 32% compared to the negative control after 48 h of incubation [42].

The protective effect of bovine colostrum on skin aging was determined based on telomere length and the rate of their shortening, this being a biomarker of aging, as well as by examining changes in the proliferation of human fibroblasts under standard conditions and under oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The results indicate that bovine colostrum can improve the condition of aging skin by increasing the rate of fibroblast cell proliferation and protecting against telomere length erosion, even in the presence of an oxidative stress factor [43].

Among three fractions (whey, casein, and fat globule) isolated from mare colostrum, the fat globule fraction stimulated fibroblasts strongest, probably due to the presence of lactadherin [44].

To date, the effects of any milk or colostrum on diabetic human fibroblasts (dHF) have not been studied. Our study found that proliferation on stimulated dHF cells ranged from 96.0% to 115.4%, with a lower rate compared to 1BR.3.N human skin fibroblasts, which reached up to 227% after 48 h. This may be related to the origin of dHF cells which were isolated from wounds of patients with complex metabolic disorders. These characteristics implicate the lower proliferative potential of dHF cells and can influence the outcome of the Presto Blue assay. It is possible that higher doses of colostrum would be required to achieve similar effects in dHF cells as in healthy cells, although this requires further research.

Moreover it should be noted that prolonged increases in fibroblast proliferation are not always desirable, as it can result in keloid scar formation [45]. Therefore, further and longer observations with colostrum are needed, especially in a clinical setting.

Different biological effects have been noted for keratinocytes. Colostrum 1 (24 h) was found to stimulate cell proliferation but only to a concentration of 1.5 mg/mL. In contrast, the remaining concentrations of colostrum 1 and all those of colostrum 2 inhibited keratinocyte proliferation at both incubation times. A similar inhibitory effect was demonstrated by bovine colostrum on human primary keratinocytes. The growth arrest was presumably caused by upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors that suggest the possibility of using colostrum for reducing the proliferation of keratinocytes in the treatment of skin diseases characterized by a disturbed skin barrier and altered differentiation [46].

#### 3.5. *Scar Test Assay*

Colostrum 1 was found to exhibit potential to enhance wound healing processes in diabetic foot ulcers, probably due to its high levels of antioxidative agents and lactoferrin (LTF) protein, which may stimulate fibroblast proliferation and migration [47]. So far, no studies have examined the effect of colostrum from sheep or other animals on scar testing, which could open up an entirely new area for research. Taking into account the results of gene expression analysis, it could prove beneficial to test the dHF reaction to colostrum(s) following prior inflammatory priming.



Studies have compared the effectiveness of bovine colostrum powder dressings and conventional dressings for deep wounds. The results show that colostrum dressings were safe and promoted wound healing by shortening healing time and reducing pain as well as the number of dressing changes. Therefore, they can be used supportively in the treatment of deep wounds [48]. Bovine colostrum effectively supported wound healing, probably thanks to the presence of transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), fibroblast growth factor (FGF), and insulin-like growth factor (IGF-1) [48,49].

### 3.6. Gene Expression

Very few studies have examined the effects of colostrum on gene expression and biological activity, and the existing ones have employed differing methodologies and sample types; as such, it is difficult to directly compare their findings with those of the present study. For example, most existing research has focused on bovine colostrum in liquid form, whereas the present study used freeze-dried sheep colostrum.

Research indicates that colostrum contains numerous bioactive components that can affect the gene expression and biological activity [50,51]. Two such components are the growth factors IGF-1 and EGF, which stimulate cell growth and proliferation. IGF-1 activates the IGF-1 receptor, inducing intracellular signaling that promotes DNA synthesis and cell division [52]. Immunomodulatory proteins such as lactoferrin (LTF) have anti-inflammatory, antibacterial, and immunomodulatory properties, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and increasing the expression of anti-inflammatory mediators [53,54]. Proline-rich polypeptides (PRPs) help regulate immune responses, reducing excessive inflammation [55]. Cytokines and chemokines, such as IL-10, can suppress the expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  [51,56]. Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) regulates cell proliferation and differentiation; it also plays a key role in wound healing by stimulating fibroblast proliferation and extracellular matrix protein synthesis [50,57].

Colostrum 1 strongly increased *Ki67* expression, indicating a strong proliferative effect. Although colostrum 2 also increased cell proliferation, its effect on *Ki67* expression was less pronounced than that of colostrum 1; this may suggest differences in the bioactive composition of the two samples. Those differences in expression are coherent with the scar test assay results, where dHF cells stimulated with colostrum 1 were first to reach the 40% and 20% breakpoints. Even though no drastic differences between colostrum samples were observed over the course of the full-length observation, this initial burst in migration and proliferation speed of dHF cells, together with increased *Ki67* expression, suggests that colostrum 1 has greater proliferation-promoting effects.

The observed reduction in *IL-6* expression by colostrum 2 indicates potential anti-inflammatory effects, which is supported by the significant decrease in *PTGS-2* expression. *PTGS-2* (*COX-2*) is an enzyme associated with the inflammatory process, and its reduction suggests a coordinated anti-inflammatory response [58,59].

The increase in *TSG-6* expression by colostrum 1 also suggests beneficial anti-inflammatory effects. *TSG-6* is a protein that protects tissues from inflammatory damage. Nevertheless, colostrum 2 yielded an exceptionally high increase in *TSG-6* expression, further underscoring the higher anti-inflammatory properties of this colostrum, and possibly the presence of stronger *TSG-6* stimulants.

Previous research has demonstrated that bovine colostrum contains growth factors such as IGF-1 and EGF, which can stimulate the proliferation of intestinal epithelial cells, supporting observations of increased *Ki67* expression by colostrum 1 [50]. Additionally, bovine colostrum has been found to reduce the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, which is consistent with the results regarding colostrum 2 and its anti-inflammatory effects [51].

Since dHF can be burdened with diabetes-related "metabolic memory", the increased expression of anti-inflammatory genes, such as *TSG-6*, and the decreased expression of the pro-inflammatory *IL-6* gene may suggest that colostrum has a beneficial effect on the

dysregulated inflammatory properties of dHFs [60]. In addition, a fibroblast population subcluster in diabetic ulcer wound tissue demonstrated increased *TSG-6* expression which was strongly related with positive healing processes [61].

In summary, colostrum 1 shows stronger proliferative effects (higher stimulation of *Ki67*), while colostrum 2 exhibits stronger anti-inflammatory properties (higher stimulation of *TSG-6*). These differences may result from variations in protein composition, including levels of lactoferrin and other bioactive components, and may indicate different future applications for either colostrum. Those pilot observations regarding the reaction of dHF to stimulation with colostrum(s) can be fully understood and interpreted in combination with the proteomic analysis of colostrum. Such analyses are currently being conducted by the authors and will be published in the near future. However, the properties shown in this study indicate that colostrum 1 could have higher potential in acute wound healing applications, whereas colostrum 2 could find use in the management of chronic wounds, thanks to their ability to activate the expression of different genes in dHF cells.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Colostrum Samples

Sheep colostrum from two sources, Polish and Swiss, was used in the research.

Colostrum 1 (Polish origin) was collected from Lacaune sheep living on a farm in central Poland. Colostrum 1 was collected during the first 12 h of sheep lactation and immediately frozen. The tested batch was a mixture of colostrum from approximately 20 sheep. It was stored at  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  for a few days and then freeze-dried. Colostrum 1 was not pasteurized.

Colostrum 2 (Swiss origin) was obtained as a commercially available product: Swiss Sheep Colostrum Vivienne Swiss Formula. Colostrum 2 is sheep colostrum from Swiss-controlled organic farms; it is collected only within the first 12 h after birth, pasteurized by the manufacturer at temperatures up to  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and freeze-dried.

##### 4.2. Freeze-Drying

Frozen colostrum 1 was subjected to sublimation drying (lyophilization) using a Free-Zone 18L apparatus (Labconco, Kansas City, MO, USA). The process began at a temperature of  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for the first hour, then the shelf temperature was gradually increased to  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $0.05\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and maintained under these conditions for the next 48 h. The process pressure was kept constant at 0.230 mBar.

##### 4.3. Fat Analysis

The fat content of sheep colostrum was determined using the Soxhlet method. Fat was extracted using a Büchi B-811 extraction system (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). A 3 g sample of sheep colostrum was extracted for 40 extraction cycles using hexane as a solvent [62].

##### 4.4. Protein Analysis

Approximately 1 g of sheep colostrum was weighed into mineralization flasks, two Kjeldahl copper catalyst tablets ( $3.5\text{ g K}_2\text{SO}_4 + 0.4\text{ g CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) were added, and 25 mL of concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added, followed by sample mineralization. Protein nitrogen was distilled and titrated with a standardized HCl solution using the Kjeltec 9 system (FOSS; Hillerød, Denmark). The protein conversion factor used was  $\text{N}\cdot 6.25$  [63].

##### 4.5. Fatty Acid Analysis

The extracted lipids (approximately 50 mg) were placed in a hydrolysis tube; 4 mL of 0.5 M NaOH solution in methanol and 4 mL of BF<sub>3</sub> (14% solution in methanol) were added. The solution was heated in a heating block for 0.5 h at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After the elapsed time, the obtained esters were extracted with 6 mL of hexane. The hexane layer was dried through a layer of anhydrous magnesium sulfate, evaporated to dryness in a stream of nitrogen, and

the residue was dissolved in 1.5 mL of hexane and subjected to chromatographic analysis (Agilent 6890N Series GC), using a 88% cyanopropyl and 12% aryl polysiloxane column (HP-88, 100 m 0.25 mm 0.25  $\mu$ m) and MS detector (Agilent 5973 MS Detector).

#### 4.6. ABTS Free Radical Scavenging Activity Assay

The antioxidant activity assay was carried out using the slightly modified ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] radical cation decolorization method [64]. The ABTS<sup>•+</sup> stock solution was prepared by mixing equal volumes of 7.00 mM ABTS solution [96.02 mg (0.1750 mmol) in 25 mL water/methanol (1:1)] with 2.45 mM potassium persulfate solution: 16.56 mg (0.06126 mmol) in 25 mL water/methanol (1:1). This mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. The ABTS<sup>•+</sup> stock solution (0.25 mL) was then diluted with water (5 mL) to give an absorbance of the negative control about 0.7 at 734 nm.

The measurement was performed for the following colostrum concentrations: 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.75 mg/mL, and 1.00 mg/mL. The highest colostrum concentration of 1 mg/mL was obtained by dissolving 100 mg of colostrum in 100 mL of distilled water. The suspension was heated at 30 °C for about 30 min with constant stirring. Lower concentrations were obtained by appropriate dilution of a solution with a concentration of 1 mg/mL with distilled water.

Following this, 5 mL of the test solution at a particular concentration was combined with 0.25 mL of the ABTS<sup>•+</sup> stock solution and then the absorbance of the mixture was measured at 734 nm (Shimadzu Spectrophotometer UV-1800, Kyoto, Japan). The absorbance of each solution was assayed after 10 min, 20 min, 30 min, and 40 min. Ascorbic acid was used as a standard (assayed only after 10 min). The results were expressed as EC<sub>50</sub>, the concentration of sample at which 50% of maximum scavenging activity was recorded, which was calculated from the calibration curve.

#### 4.7. DPPH Radical Scavenging Activity

The DPPH [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl] (Merck Life Science Sp.z.o.o.; Poznan; Poland) radical scavenging activity was determined as reported previously [65–67]. For this purpose, 10 mL of the colostrum sample at various concentrations (0.25; 0.5; 0.75; and 1.0 mg/mL) was mixed with 10 mL of an ethanol solution of DPPH (125 mM) in a 1:1 ratio. The mixtures were incubated for 60 min in darkness at room temperature. For the control, distilled water was used rather than the sample. The absorbance of solution was read at 517 nm using a Shimadzu spectrophotometer UV-1800 (Kyoto, Japan). The DPPH radical scavenging activity (%) was calculated according to this formula:

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100\%$$

where A indicates absorbance of DPPH solution without the colostrum sample; B indicates absorbance of DPPH solution with the colostrum sample; and C indicates absorbance of the colostrum sample.

#### 4.8. Inhibition of Tyrosinase Activity

Tyrosinase inhibition was measured according to two reported methods [68,69]. A starting tyrosinase solution was prepared by adding 0.5 mL of fungal tyrosinase (167 U/mL; Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznan, Poland) the solution containing 25.45 mL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). Following this, 1.5 mL of tyrosinase solution, 1 mL of colostrum solution (1 mg/mL), and 3.5 mL of phosphate buffer were mixed to form the appropriate solution. The colostrum concentration of 1 mg/mL was obtained by dissolving 100 mg of colostrum in 100 mL of distilled water. The suspension was heated at 30 °C for about 30 min with constant stirring. The mixture was then incubated for 5 min at 30 °C. After this time, 5 mL of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) was added to initiate the enzymatic reaction. Absorbance at 477 nm was measured for 20 min to monitor L-DOPA formation by

Shimadzu spectrophotometer UV-1800 (Kyoto, Japan). Ascorbic acid (1 mg/mL) served as a positive control that was used for comparison. The inhibition rate was calculated as follows:

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{[(A - B) - (C - D)]}{A - B} \times 100\%$$

where A indicates the absorbance of the solution with tyrosinase without sample, B indicates the absorbance of the solution without sample and tyrosinase, C indicates the absorbance of the solution with sample and tyrosinase, and D indicates the absorbance of the solution with sample and without tyrosinase.

#### 4.9. Proliferation of Fibroblasts and Keratinocytes

The influence of colostrum on cell viability was tested using 1BR.3.N human skin fibroblast (cat. no. 90020508, ECACC) and human neonatal epidermal keratinocytes (cat. no. SCCE020, Merck Life Science Sp.z.o.o., Poznan, Poland). The cells were cultured at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere, with the usage of appropriate media recommended by manufacturer.

For the viability assessment, the cells were seeded on 96-well plates, 8000 cells per well; six replicates were made for each concentration in full culture medium. The next day, the medium was changed to starving with an appropriate colostrum concentration. Colostrum was weighed and pre-dissolved in MEM medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (without FBS) for 2 mg/mL working solution; this was vortexed and incubated for approx. 30 min in a water bath at 37 °C to form a homogeneous suspension. This was then filtered through syringe filters with a pore diameter of 0.22 µm. After filtration, dilutions of both tested batches of colostrum in culture medium were prepared—0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75; and 2 mg/mL—and applied to cells.

The MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Thermo Fisher Scientific, Naarden, The Netherlands) viability assay was performed after 24 and 48-h incubation. Briefly, the cell culture medium was extracted and replaced with 110 µL of MTT solution in PBS (Thermo Fisher Scientific, Naarden, The Netherlands). After incubation for three hours at 37 °C, the MTT solution was extracted and 100 µL DMSO (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Canada) was added. The formazone crystals were allowed to dissolve for 10 min at room temperature on the cradle, and the absorbance was read at 570 nm with an Infinite F50 Tecan plate reader (Life Sciences, Mannedorf, Switzerland).

The raw absorbance measures were normalized against negative control without cells and the cellular viability was presented as a percentage of positive controls, i.e., wells with cells but without colostrum. The significance of the difference in the viability of the treated and untreated cells was analyzed with the two-sided *t*-test. The difference was considered statistically significant at *p* < 0.05.

#### 4.10. Diabetic Human Fibroblast Culturing

Diabetic human fibroblasts (dHF) were isolated from tissue samples collected from wounds of four patients with diabetic foot ulcers. All patients providing samples provided their informed consent to provide material for the research study (approval no. KB/128/2019 and KB/3/A2021).

The samples were expanded in standard dHF medium consisting of high-glucose DMEM medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% antibiotic–antimycotic solution (Corning, Amsterdam, The Netherlands) in standard culture condition (5%CO<sub>2</sub>/37 °C). Then, cells were harvested after appropriate culturing time depending on the planned analyses.

#### 4.11. Diabetic Human Fibroblast Proliferation Assay

For the proliferation assay, the cells were seeded on the 96-well plate (20,000 cells/cm<sup>2</sup>) and cultured for three days. Then, the culture medium was changed to dHF medium

supplemented with 1 mg/mL of either colostrum 1 or colostrum 2. Standard dHF medium was used as a control. The cells were cultured for 48 h, during which time a proliferation assay was performed twice, i.e., after 24 h and 48 h. For the proliferation assay, Presto Blue Cell Viability reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as a 10% addition to dHF standard medium. The cells were incubated for one hour at 37 °C. After the incubation, the medium was transferred to a new 96-well plate and the fluorescence was measured (excitation/emission = 540 nm/590 nm) on a plate reader (Spark, Tecan, Switzerland). To calculate the proliferation rate, the mean blank value was subtracted from the fluorescence intensity values. The mean value of fluorescence intensity was calculated for each cell sample separately. To calculate the proliferation rate, the fluorescence values for stimulated cells were divided by the mean of the fluorescence of the controls and are shown as the percentage of the proliferation rate.

#### 4.12. Scar Test

For the scar test, the dHF cells were plated onto 24-well plates using Culture-Inserts 2 Well (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany)—32,000 cells/inserts well. The cells were cultured for three days to allow them to adhere to the culture plate. On day three, the Culture-Inserts were removed and the culture medium was changed to either standard dHF medium, medium supplemented with 1 mg/mL of colostrum 1, or colostrum 2. The cells were then placed in a Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc., USA) inverted microscope with the live chamber providing the needed culture conditions—5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, and humidity. Scar images were acquired at four-hour intervals for a total observation period of 72 h. Each scar had up to four acquisition points set. Only a brightfield channel was used.

#### Image Analysis

Scar images were analyzed using ImageJ software [70] with the Wound Healing Size Tool macro [71]. Images were analyzed only on the brightfield channel. Before using the Wound Healing Size Tool, the brightness was adjusted to reduce the noise and improve reproducibility between the stack images. This adjustment was performed using auto adjustment set on the darkest frame, and the following macro was used:

```
run("Bandpass Filter...", "filter_large = 40 filter_small = 3 suppress = None tolerance = 5 autoscale saturate process"); run("Subtract Background...", "rolling = 50 light stack"); run("Make Binary", "method = Default background = Default calculate black").
```

The acquired results were collected and analyzed collectively for each well. The wound closure rate was calculated as the percentage of the no-cell area at time  $T = 0$  h.

#### 4.13. Gene Expression Analysis

The dHF cells from four patients were plated in T25 flasks and cultured in standard dHF medium. On day three after plating, the culture medium was changed to either fresh standard dHF medium or dHF medium supplemented with 1 mg/mL of colostrum 1 or colostrum 2. The cells were incubated at 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> for 48 h. Then, cells were collected using Accutase Cell Detachment Solution (Becton Dickinson, MA, USA). The cell count and viability were assessed on the ADAM automated cell counter (NanoEnTék Inc., Seoul, Republic of Korea). The cells were then washed in PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and centrifuged at 12,000 × *g* for one minute. The PBS was discarded and the dry cell pellets were quickly placed at −80 °C.

##### 4.13.1. RNA Isolation and cDNA Synthesis

The total RNA was isolated from frozen cell pellets using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was assessed with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNA templates were synthesized using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol.

#### 4.13.2. qPCR

The qPCR reaction was performed using 30 ng of cDNA template per well. Each sample was analyzed in triplicate using TaqMan™ Fast Advanced Master Mix for qPCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with the following Taq Man assays: as housekeeping gene, *18S rRNA* (Hs99999901\_s1); as genes of interest, *Ki67* (Hs01032443\_m1), *IL-6* (Hs00174131\_m1), *PTGS-2* (Hs00153133\_m1), and *TSG-6* (Hs00200180\_m1) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The single plex reaction was carried out on 7500 Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a fast cycle program.

#### 4.13.3. qPCR Data Analysis

The data were collected from Fast 7500 software 7500 Fast as Ct values and then exported. Ct values were used to calculate fold changes for each gene/sample pair according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [72,73].

#### 4.14. Statistical Analysis

For dHF proliferation assay, the standard error of measurement (SEM) was calculated for each patient. The significance of the differences between test and control samples were determined based on Fisher's test and Student's *t*-test, with the *p*-value threshold = 0.05. The same procedures were carried out for all four cell samples as one group.

qPCR results were analyzed with GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA). Tests used Mann-Whitney U with a set *p*-value threshold *p* = 0.05; data were presented as mean ± standard deviation (SD).

### 5. Conclusions

Due to its biological properties, sheep colostrum has the potential to be used as an active ingredient in cosmetic and medicinal preparations for skin care and treatment. Sheep colostrum may exhibit anti-aging, regenerative, and anti-inflammatory effects on the skin and accelerate wound healing.

The possible rejuvenating and regenerative effects of colostrum on the skin, as well as the delaying of aging processes, may be predicted by its antioxidant properties, high ability to stimulate the growth of fibroblasts, and moderate of keratinocytes. Cells divisions slow down in (photo)aging skin, so providing colostrum ingredients that could stimulate dermal proliferation is crucial for skin regeneration.

Based on in vitro tests performed on dHF; it can be concluded that sheep colostrum may also have a beneficial effect on wound healing processes in diseased skin. It was shown in this study that depending on its origin, colostrum stimulated in vitro diabetic human fibroblast (dHF) proliferation (*Ki67*) and migration, as well as increased the expression of anti-inflammatory genes (*TSG-6*) while decreasing the expression of the pro-inflammatory *IL-6* gene. However, further studies, e.g., proteomic analysis or animal model observations, should be performed to confirm those results.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.K. (Kinga Kazimierska) and U.K.-L.; methodology, K.K. (Kinga Kazimierska), E.P., I.S.-G. and A.Z.; formal analysis, K.K. (Kinga Kazimierska), S.R., K.K. (Katarzyna Kośla) and U.K.-L.; investigation, K.K. (Kinga Kazimierska), I.S.-G., S.R., L.B., K.K. (Katarzyna Kośla) and U.K.-L.; writing—original draft preparation, K.K. (Kinga Kazimierska), I.S.-G., E.P., K.K. (Katarzyna Kośla) and U.K.-L.; writing—review and editing, K.K. (Kinga Kazimierska) and U.K.-L.; visualization, E.P., S.R. and U.K.-L.; supervision, U.K.-L.; project administration, U.K.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Medical University of Lodz, grant No. 503/3-066-02/503-31-001.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the Bioethics Committee of Medical University of Warsaw, Poland (approval no. KB/128/2019 of 24 June 2024).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article; further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Milani, F.X.; Wendorff, W.L. Goat and Sheep Milk Products in the United States (USA). *Small Rumin. Res.* **2011**, *101*, 134–139. [\[CrossRef\]](#)
- Arslan, A.; Kaplan, M.; Duman, H.; Bayraktar, A.; Ertürk, M.; Henrick, B.M.; Frese, S.A.; Karav, S. Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 651721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kazimierska, K.; Kalinowska-Lis, U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules* **2021**, *26*, 3253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Scumaci, D.; Trimboli, F.; Dell’Aquila, L.; Concolino, A.; Pappaianni, G.; Tammè, L.; Vignola, G.; Luciani, A.; Morelli, D.; Cuda, G.; et al. Proteomics-Driven Analysis of Ovine Whey Colostrum. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Beck, K.L.; Weber, D.; Phinney, B.S.; Smilowitz, J.T.; Hinde, K.; Lönnerdal, B.; Korf, I.; Lemay, D.G. Comparative Proteomics of Human and Macaque Milk Reveals Species-Specific Nutrition during Postnatal Development. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2143–2157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pisanu, S.; Ghisaura, S.; Pagnozzi, D.; Falchi, G.; Bios, G.; Tanca, A.; Roggio, T.; Uzzau, S.; Addis, M.F. Characterization of Sheep Milk Fat Globule Proteins by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis/Mass Spectrometry and Generation of a Reference Map. *Int. Dairy J.* **2012**, *24*, 78–86. [\[CrossRef\]](#)
- Vanderghem, C.; Blecker, C.; Danthine, S.; Deroanne, C.; Haubruge, E.; Guillonneau, E.; De Pauw, E.; Francis, F. Proteome Analysis of the Bovine Milk Fat Globule: Enhancement of Membrane Purification. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 885–893. [\[CrossRef\]](#)
- Roncada, P.; Piras, C.; Soggiu, A.; Turk, R.; Urbani, A.; Bonizzi, L. Farm Animal Milk Proteomics. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 4259–4274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, X.; Liu, X.; Li, F.; Yue, X. The Differential Composition of Whey Proteomes in Hu Sheep Colostrum and Milk during Different Lactation Periods. *Animals* **2020**, *10*, 1784. [\[CrossRef\]](#)
- Kehoe, S.L.; Jayarao, B.M.; Heinrichs, A.J. A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 4108–4116. [\[CrossRef\]](#)
- Guiso, M.E.; Battacone, G.; Canu, L.; Deroma, M.; Langasco, L.; Sanna, G.; Tsiplakou, E.; Pulina, G.; Nudda, A. Essential and Toxic Mineral Content and Fatty Acid Profile of Colostrum in Dairy Sheep. *Animals* **2022**, *12*, 2730. [\[CrossRef\]](#)
- Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Skalickova, S.; Fernandez, C.; Ruttkey-Nedecky, B.; Malevu, T.D.; Sochor, J.; Baron, M.; Melcova, M.; Zidkova, J.; et al. A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species—A Critical Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dande, N.D.; Nande, P.J. Nutritional Composition of Bovine Colostrum: Palatability Evaluation of Food Products Prepared Using Bovine Colostrum. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neuro. Dis.* **2020**, *10*, 8. [\[CrossRef\]](#)
- Khan, I.T.; Nadeem, M.; Imran, M.; Ullah, R.; Ajmal, M.; Jaspal, M.H. Antioxidant Properties of Milk and Dairy Products: A Comprehensive Review of the Current Knowledge. *Lipids Health Dis.* **2019**, *18*, 41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bagwe, S.; Tharappel, L.J.P.; Kaur, G.; Buttar, H.S. Bovine Colostrum: An Emerging Nutraceutical. *J. Complement. Integr. Med.* **2015**, *12*, 175–185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Elfstrand, L.; Lindmark-Månsson, H.; Paulsson, M.; Nyberg, L.; Åkesson, B. Immunoglobulins, Growth Factors and Growth Hormone in Bovine Colostrum and the Effects of Processing. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 879–887. [\[CrossRef\]](#)
- Gauthier, S.; Pouliot, Y.; Maubois, J.-L. Growth Factors from Bovine Milk and Colostrum: Composition, Extraction and Biological Activities. *Dairy Sci. Technol.* **2006**, *86*, 99–125. [\[CrossRef\]](#)
- Hernández-Castellano, L.E.; Almeida, A.M.; Renaut, J.; Argüello, A.; Castro, N. A Proteomics Study of Colostrum and Milk from the Two Major Small Ruminant Dairy Breeds from the Canary Islands: A Bovine Milk Comparison Perspective. *J. Dairy Res.* **2016**, *83*, 366–374. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jensen, R.G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* **2002**, *85*, 295–350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McGrath, B.A.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Kelly, A.L. Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Sci. Technol.* **2016**, *96*, 133–158. [\[CrossRef\]](#)
- Day, A.J.; Milner, C.M. TSG-6: A Multifunctional Protein with Anti-Inflammatory and Tissue-Protective Properties. *Matrix Biol.* **2019**, *78–79*, 60–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wendorff, W.L.; Haenlein, G.F.W. Sheep Milk—Composition and Nutrition. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 210–221. ISBN 978-1-119-11031-6.
- Kessler, E.C.; Bruckmaier, R.M.; Gross, J.J. Immunoglobulin G Content and Colostrum Composition of Different Goat and Sheep Breeds in Switzerland and Germany. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 5542–5549. [\[CrossRef\]](#)

24. Cesarani, A.; Gaspa, G.; Correddu, F.; Cellesi, M.; Dimauro, C.; Macciotta, N.P.P. Genomic Selection of Milk Fatty Acid Composition in Sarda Dairy Sheep: Effect of Different Phenotypes and Relationship Matrices on Heritability and Breeding Value Accuracy. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3189–3203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Correddu, F.; Cesarani, A.; Dimauro, C.; Gaspa, G.; Macciotta, N.P.P. Principal Component and Multivariate Factor Analysis of Detailed Sheep Milk Fatty Acid Profile. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 5079–5094. [\[CrossRef\]](#)
26. Wilms, J.N.; Hare, K.S.; Fischer-Tlustos, A.J.; Vahmani, P.; Dugan, M.E.R.; Leal, L.N.; Steele, M.A. Fatty Acid Profile Characterization in Colostrum, Transition Milk, and Mature Milk of Primiparous and Multiparous Cows during the First Week of Lactation. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 4692–4710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Danby, S.G.; AlEnezi, T.; Sultan, A.; Lavender, T.; Chittock, J.; Brown, K.; Cork, M.J. Effect of Olive and Sunflower Seed Oil on the Adult Skin Barrier: Implications for Neonatal Skin Care. *Pediatr. Dermatol.* **2013**, *30*, 42–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Danby, S.G.; Andrew, P.V.; Taylor, R.N.; Kay, L.J.; Chittock, J.; Pinnock, A.; Ulhaq, I.; Fasth, A.; Carlander, K.; Holm, T.; et al. Different Types of Emollient Cream Exhibit Diverse Physiological Effects on the Skin Barrier in Adults with Atopic Dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2022**, *47*, 1154–1164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Olejnik, A.; Gornowicz-Porowska, J.; Jenerowicz, D.; Polańska, A.; Dobrzyńska, M.; Przysławski, J.; Sansone, A.; Ferreri, C. Fatty Acids Profile and the Relevance of Membranes as the Target of Nutrition-Based Strategies in Atopic Dermatitis: A Narrative Review. *Nutrients* **2023**, *15*, 3857. [\[CrossRef\]](#)
30. Menon, S.; Jain, S.; Nagpal, R.; Kumar, M.; Mohania, D.; Yadav, D.; Marotta, F.; Yadav, M.; Yadav, H. Immunomodulatory Potential of Conjugated Linolenic Acid. In *Dietary Components and Immune Function*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 217–226. ISBN 978-1-60761-060-1.
31. Bhattacharya, A.; Banu, J.; Rahman, M.; Causey, J.; Fernandes, G. Biological Effects of Conjugated Linoleic Acids in Health and Disease. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 789–810. [\[CrossRef\]](#)
32. den Hartigh, L.J. Conjugated Linoleic Acid Effects on Cancer, Obesity, and Atherosclerosis: A Review of Pre-Clinical and Human Trials with Current Perspectives. *Nutrients* **2019**, *11*, 370. [\[CrossRef\]](#)
33. Tang, L.; Cao, X.; Li, X.; Ding, H. Topical Application with Conjugated Linoleic Acid Ameliorates 2, 4-Dinitrofluorobenzene-Induced Atopic Dermatitis-like Lesions in BALB/c Mice. *Exp. Dermatol.* **2021**, *30*, 237–248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Desbois, A.P.; Lawlor, K.C. Antibacterial Activity of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 4544–4557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Stobiecka, M.; Król, J.; Brodziak, A. Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals* **2022**, *12*, 245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Cichosz, G.; Czeczot, H.; Ambroziak, A.; Bielecka, M.M. Natural Antioxidants in Milk and Dairy Products. *Int. J. Dairy Technol.* **2017**, *70*, 165–178. [\[CrossRef\]](#)
37. El-Fattah, A.A.; Azzam, M.; Elkashef, H.; Elhadydy, A. Antioxidant Properties of Milk: Effect of Milk Species, Milk Fractions and Heat Treatments. *Int. J. Dairy Sci.* **2019**, *15*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
38. Ashokbhai, J.K.; Basaiawmoit, B.; Sakure, A.; Das, S.; Patil, G.B.; Mankad, M.; Hati, S. Purification and Characterization of Antioxidative and Antimicrobial Peptides from Lactic-Fermented Sheep Milk. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 4262–4272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Schurink, M.; van Berkel, W.J.H.; Wichers, H.J.; Boeriu, C.G. Novel Peptides with Tyrosinase Inhibitory Activity. *Peptides* **2007**, *28*, 485–495. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Kong, S.; Choi, H.-R.; Kim, Y.-J.; Lee, Y.-S.; Park, K.-C.; Kwak, S.-Y. Milk Protein-Derived Antioxidant Tetrapeptides as Potential Hypopigmenting Agents. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Li, A.; He, H.; Chen, Y.; Liao, F.; Tang, J.; Li, L.; Fan, Y.; Li, L.; Xiong, L. Effects of Donkey Milk on UVB-Induced Skin Barrier Damage and Melanin Pigmentation: A Network Pharmacology and Experimental Validation Study. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1121498. [\[CrossRef\]](#)
42. Torre, C.; Jeusette, I.; Serra, M.; Brazis, P.; Puigdemont, A. Bovine Colostrum Increases Proliferation of Canine Skin Fibroblasts. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2058S–2060S. [\[CrossRef\]](#)
43. Jogi, R.; Tager, M.J.; Perez, D.; Tsapekos, M. Bovine Colostrum, Telomeres, and Skin Aging. *J. Drugs Dermatol.* **2021**, *20*, 538–545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Zava, S.; Barello, C.; Pessione, A.; Garoffio, L.P.; Fattori, P.; Montorfano, G.; Conti, A.; Giunta, C.; Pessione, E.; Berra, B.; et al. Mare's Colostrum Globules Stimulate Fibroblast Growth in Vitro: A Biochemical Study. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 836–845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Shi, S.; Li, Q.; Liu, Y.; Zhang, R.; Chen, H. SPARC Promotes Fibroblast Proliferation, Migration, and Collagen Production in Keloids by Inactivation of P53. *J. Dermatol. Sci.* **2023**, *109*, 2–11. [\[CrossRef\]](#)
46. Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Picardo, M.; Cardinali, G. Bovine Colostrum Induces the Differentiation of Human Primary Keratinocytes. *FASEB J.* **2020**, *34*, 6302–6321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



47. Flis, Z.; Szatkowski, P.; Pielichowska, K.; Molik, E. The Potential of Sheep or Camel Milk Constituents to Contribute to Novel Dressings for Diabetic Wounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17551. [CrossRef] [PubMed]
48. Kshirsagar, A.Y.; Vekariya, M.A.; Gupta, V.; Pednekar, A.S.; Mahna, A.; Patankar, R.; Shaikh, A.; Nagur, B. A Comparative Study of Colostrum Dressing Versus Conventional Dressing in Deep Wounds. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, *9*, PC01-PC04. [CrossRef] [PubMed]
49. Bhora, F.Y.; Dunkin, B.J.; Batzri, S.; Aly, H.M.; Bass, B.L.; Sidawy, A.N.; Harmon, J.W. Effect of Growth Factors on Cell Proliferation and Epithelialization in Human Skin. *J. Surg. Res.* **1995**, *59*, 236–244. [CrossRef] [PubMed]
50. Playford, R.J.; Macdonald, C.E.; Johnson, W.S. Colostrum and Milk-Derived Peptide Growth Factors for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 5–14. [CrossRef] [PubMed]
51. Hagiwara, K.; Kataoka, S.; Yamanaka, H.; Kirisawa, R.; Iwai, H. Detection of Cytokines in Bovine Colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2000**, *76*, 183–190. [CrossRef] [PubMed]
52. Poreba, E.; Durzyska, J. Nuclear Localization and Actions of the Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) System Components: Transcriptional Regulation and DNA Damage Response. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* **2020**, *784*, 108307. [CrossRef]
53. Siqueiros-Cendón, T.; Arévalo-Gallegos, S.; Iglesias-Figueroa, B.F.; García-Montoya, I.A.; Salazar-Martínez, J.; Rascón-Cruz, Q. Immunomodulatory Effects of Lactoferrin. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 557–566. [CrossRef] [PubMed]
54. Krugel, M.L.; Zimecki, M.; Actor, J.K. Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1438. [CrossRef] [PubMed]
55. Zabłocka, A.; Siednienko, J.; Mitkiewicz, M.; Gorczyca, W.A.; Lisowski, J.; Janusz, M. Proline-Rich Polypeptide Complex (PRP) Regulates Secretion of Inflammatory Mediators by Its Effect on NF- $\kappa$ B Activity. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, 16–20. [CrossRef] [PubMed]
56. Brenmoehl, J.; Ohde, D.; Wirthgen, E.; Hoeflich, A. Cytokines in Milk and the Role of TGF- $\beta$ . *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *32*, 47–56. [CrossRef] [PubMed]
57. Shi, X.; Young, C.D.; Zhou, H.; Wang, X.-J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1666. [CrossRef]
58. Sty, A.C.F.; Sangild, P.T.; Skovgaard, K.; Thymann, T.; Bjerre, M.; Chatterton, D.E.W.; Purup, S.; Boye, M.; Heegaard, P.M.H. Spray Dried, Pasteurised Bovine Colostrum Protects against Gut Dysfunction and Inflammation in Preterm Pigs. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63*, 280–287. [CrossRef] [PubMed]
59. Stoy, A.C.F. The Effect of Bovine Colostrum Products on Intestinal Dysfunction and Inflammation in a Preterm Pig Model of Necrotizing Enterocolitis. Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark, 2012.
60. Voza, F.A.; Huerta, C.T.; Le, N.; Shao, H.; Ribieras, A.; Ortiz, Y.; Atkinson, C.; Machuca, T.; Liu, Z.-J.; Velazquez, O.C. Fibroblasts in Diabetic Foot Ulcers. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2172. [CrossRef] [PubMed]
61. Theocharidis, G.; Thomas, B.E.; Sarkar, D.; Mumme, H.L.; Pilcher, W.J.R.; Dwivedi, B.; Sandoval-Schaefer, T.; Strulescu, R.F.; Kafanas, A.; Mezghani, L.; et al. Single Cell Transcriptomic Landscape of Diabetic Foot Ulcers. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 181. [CrossRef] [PubMed]
62. PN ISO 1444:2000; Meat and Meat Products—Determination of Free. Polish Committee for Standardization: Szczecin, Poland, 2013. Available online: [https://infostore.saiglobal.com/en-gb/standards/pn-iso-1444-2000-926297\\_saig\\_pkn\\_pkn\\_2185591/](https://infostore.saiglobal.com/en-gb/standards/pn-iso-1444-2000-926297_saig_pkn_pkn_2185591/) (accessed on 28 October 2022).
63. EN ISO 8968-1:2014; —Milk and Milk Products—Determination of Nitrogen Content—Part 1: Kjeldahl Principle and Crude Protein Calculation. ISO: Geneva, Switzerland, 2014. Available online: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/0532d3e0-84f0-4e03-8dc4-d75d5897ec6f/en-iso-8968-1-2014> (accessed on 28 October 2022).
64. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef] [PubMed]
65. Bersuder, P.; Hole, M.; Smith, G. Antioxidants from a Heated Histidine-Glucose Model System. I: Investigation of the Antioxidant Role of Histidine and Isolation of Antioxidants by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 181–187. [CrossRef]
66. Oussaief, O.; Jrad, Z.; Adt, L.; Dbara, M.; Khorchari, Y.; El-Hatmi, H. Antioxidant Activities of Enzymatic-Hydrolysed Proteins of Dromedary (*Camelus Dromedarius*) Colostrum. *Int. J. Dairy Technol.* **2020**, *73*, 333–340. [CrossRef]
67. Salar, S.; Jafarian, S.; Mortazavi, A.; Nasirae, L.R. Effect of Hurdle Technology of Gentle Pasteurisation and Drying Process on Bioactive Proteins, Antioxidant Activity and Microbial Quality of Cow and Buffalo Colostrum. *Int. Dairy J.* **2021**, *121*, 105138. [CrossRef]
68. Choi, D.; Min, S.-G.; Jo, Y.-J. Functionality of Porcine Skin Hydrolysates Produced by Hydrothermal Processing for Liposomal Delivery System. *J. Food Biochem.* **2018**, *42*, e12464. [CrossRef]
69. Hong, G.-P.; Min, S.-G.; Jo, Y.-J. Anti-Oxidative and Anti-Aging Activities of Porcine By-Product Collagen Hydrolysates Produced by Commercial Proteases: Effect of Hydrolysis and Ultrafiltration. *Molecules* **2019**, *24*, 1104. [CrossRef] [PubMed]
70. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [CrossRef]
71. Suarez-Armedo, A.; Figueroa, F.T.; Clavijo, C.; Arbeláez, P.; Cruz, J.C.; Muñoz-Camargo, C. An Image J Plugin for the High Throughput Image Analysis of in Vitro Scratch Wound Healing Assays. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232565. [CrossRef] [PubMed]

72. Winer, J.; Jung, C.K.S.; Shackel, I.; Williams, P.M. Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes In Vitro. *Anal. Biochem.* **1999**, *270*, 41–49. [[CrossRef](#)]
73. Schmittgen, T.D.; Zakrajsek, B.A.; Mills, A.G.; Gorn, V.; Singer, M.J.; Reed, M.W. Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 194–204. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



**Publikacja 3 [P3]:**

**Kazimierska K**, Erkiert-Polguj A, Kalinowska-Lis U. The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Applied Sciences*. 2024; 14(7):2862.

<https://doi.org/10.3390/app14072862>.

Article

# The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study

Kinga Kazimierska <sup>1</sup>, Anna Erkiert-Polguj <sup>2</sup>  and Urszula Kalinowska-Lis <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Łódź, 90-419 Łódź, Poland; kinga.kazimierska@stud.umed.lodz.pl

<sup>2</sup> Department of Cosmetology and Aesthetic Dermatology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Łódź, 90-419 Łódź, Poland; anna.erkiert-polguj@umed.lodz.pl

\* Correspondence: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl

**Abstract:** Colostrum, the first milk produced by mammals, is rich in various bioactive components that provide numerous health benefits to newborns, such as growth factors, hormones, immunoglobulins, cytokines, and enzymes. Topical application of bovine or equine colostrum has been found to improve regeneration, accelerate cutaneous wound healing, and have moisturizing, protective, and anti-aging properties. The aim of this study was to examine the effect of a cosmetic preparation containing sheep colostrum on skin with signs of aging in mature women. Fifty-two women, aged 40–70, were randomized into two groups to receive either colostrum or placebo cream. The participants applied the cream for eight weeks. Skin hydration, TEWL, sebum, erythema, and tone were measured using a standardized Courage + Khazaka electronic GmbH Multi Probe Adapter; skin elasticity was measured with a cutometer, and images were taken by FotoMedicus. The treatment increased skin moisture, reduced TEWL, and improved skin firmness. These findings were confirmed by the subjective survey. The participants reported, *inter alia*, improved skin softness and less redness and hypersensitivity. Sheep colostrum cream was more effective at improving skin conditions than placebo cream. Colostrum creams can improve certain aspects of skin quality, especially the hydrolipid barrier, and overall rejuvenation.

**Keywords:** colostrum; skin; hydration; TEWL; firmness; mature skin; placebo-controlled



Citation: Kazimierska, K.; Erkiert-Polguj, A.; Kalinowska-Lis, U. The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 2862. <https://doi.org/10.3390/app14072862>

Academic Editors: José Machado and Jinschul Kim

Received: 8 January 2024

Revised: 14 February 2024

Accepted: 26 March 2024

Published: 28 March 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

As people age, their skin undergoes changes that result in reduced dermal hydration, elasticity, thickness, and density. These changes can be caused by various factors, including genetics and lifestyle, as well as environmental factors such as sun exposure, pollution, and smoking. As a result, there is a growing interest in the use of natural products to improve skin health [1].

Colostrum is the first milk produced by humans and other mammals after giving birth. It is rich in various bioactive components, such as growth factors, hormones, immunoglobulins, cytokines, and enzymes, which provide numerous health benefits to newborns. Colostrum contains high levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which stimulates cell growth and differentiation, and epidermal growth factor (EGF), which promotes the growth and repair of skin tissue. Additionally, colostrum contains several other growth factors that have been shown to play a crucial role in skin regeneration and repair, including transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF), and fibroblast growth factor (FGF) [2,3]. In addition to its growth factor content, colostrum also contains several other bioactive components that provide various health benefits. For example, it contains lactoferrin, which has antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory properties, and has been shown to promote wound healing. Colostrum also contains proline-rich

polypeptides (PRPs), which modulate the immune system and have been shown to improve skin barrier function [4].

Most of the studies concerning dairy foods have focused on bovine milk, the most common milk used in human nutrition. However, sheep colostrum contains higher levels of various bioactive molecules, such as immunoglobulins and growth factors, compared to bovine colostrum [5,6]. For example, sheep colostrum has been shown to have higher levels of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), which plays a crucial role in tissue repair and regeneration [7].

Several studies have confirmed that colostrum influences skin health. Topical application of bovine colostrum improved skin regeneration and accelerated cutaneous wound healing [8]. Bovine colostrum promotes wound healing and reduces scar formation in rats [9]. Subsequent research suggests that exosomes sourced from bovine colostrum possess remarkable structural and functional stability, making them a promising natural remedy for mending age-related and sun-induced skin injuries [10].

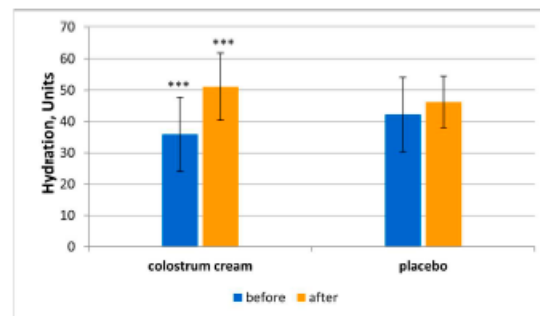
One study found a cosmetic preparation containing a mixture of horse colostrum and horse milk to demonstrate a number of benefits for healthy and diseased skin. The effects included various anti-aging, moisturizing, protective, and smoothing effects, as well as pain relief, greater skin tension, and epithelial regeneration. It was found to be suitable for both healthy and diseased skin [11].

However, little is known about the effect of sheep colostrum on the skin. Therefore, the aim of the present study was to examine the effects of a cosmetic preparation containing 15% sheep colostrum lyophilizate on skin with signs of aging.

## 2. Results

### 2.1. Instrumental Measurement of Skin Parameters

The corneometry test demonstrated a statistically significant enhancement of skin hydration in the group receiving the cream with sheep colostrum (the colostrum cream group): mean skin hydration increased substantially from 35.9 to 51.1 units (Figure 1, Table 1). In contrast, in the placebo group receiving the cream without colostrum (placebo group), only a slight, insignificant change in hydration was noted (from 42.2 to 46.2 units).



**Figure 1.** Skin hydration before and after treatment in the colostrum cream and placebo groups; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

In order to accurately describe this skin parameter, the median and the interquartile range (median (25%; 75%)) of the percentage of changes between the first and second measurements for both groups were calculated (Table 2). The results indicate a significantly higher chance of improving skin hydration in the colostrum cream group (45.5%), compared to the placebo group (9.5%).

**Table 1.** Changes in skin parameters after eight weeks of treatment in the colostrum cream and placebo groups, expressed as mean  $\pm$  SD.

Skin Parameter	Group	Measurement I (Week 0)	Measurement II (Week 8)	Statistical Significance (p)
Hydration	Colostrum cream (n = 30)	35.9 $\pm$ 11.8 [U]	51.1 $\pm$ 10.7 [U]	p < 0.0001
	Placebo (n = 18)	42.2 $\pm$ 11.9 [U]	46.2 $\pm$ 8.3 [U]	NS (p = 0.147)
TEWL	Colostrum cream (n = 30)	21.1 $\pm$ 12.3 [U]	15.3 $\pm$ 5.4 [U]	p = 0.021
	Placebo (n = 16)	20.8 $\pm$ 9.0 [U]	16.1 $\pm$ 6.2 [U]	p = 0.030
Erythema	Colostrum cream (n = 30)	351.9 $\pm$ 83.2 [U]	361.6 $\pm$ 92.5 [U]	NS (p = 0.254)
	Placebo (n = 18)	336.2 $\pm$ 78.1 [U]	359.0 $\pm$ 82.1 [U]	NS (p = 0.115)
Melanin content	Colostrum cream (n = 30)	111.7 $\pm$ 33.7 [U]	109.8 $\pm$ 33.3 [U]	NS (p = 0.520)
	Placebo (n = 18)	107.6 $\pm$ 31.0 [U]	104.5 $\pm$ 26.1 [U]	NS (p = 0.517)
Sebum	Colostrum cream (n = 28)	40.9 $\pm$ 35.0 [U]	39.0 $\pm$ 26.2 [U]	NS (p = 0.684)
	Placebo (n = 18)	42.1 $\pm$ 35.5 [U]	39.7 $\pm$ 27.8 [U]	NS (p = 0.689)
Firmness R0	Colostrum cream (n = 29)	0.201 $\pm$ 0.026 [U]	0.177 $\pm$ 0.021 [U]	p < 0.0001
	Placebo (n = 16)	0.207 $\pm$ 0.029 [U]	0.177 $\pm$ 0.031 [U]	p = 0.001
Firmness F0	Colostrum cream (n = 29)	32.6 $\pm$ 4.6 [U]	27.1 $\pm$ 3.0 [U]	p < 0.0001
	Placebo (n = 16)	31.6 $\pm$ 4.1 [U]	26.7 $\pm$ 3.5 [U]	p < 0.0001

**Table 2.** Percentage changes in skin parameters over the course of treatment in the colostrum cream and placebo groups, expressed as median and interquartile range, i.e., median (25%; 75%).

Skin Parameter	Colostrum Cream Group	Placebo Group	Statistical Significance (p)
Hydration	45.5 (12.3; 82.0) [%]	9.5 (−15.0; 34.3) [%]	p = 0.008
TEWL	−18.2 (−34.1; 2.8) [%]	−19.1 (−40.6; 2.9) [%]	NS (p = 0.854)
Erythema	4.6 (−5.2; 10.0) [%]	2.3 (−5.0; 13.4) [%]	NS (p = 0.823)
Melanin content	−3.5 (−10.0; 7.4) [%]	0.6 (−16.8; 12.1) [%]	NS (p = 0.865)
Sebum	5.4 (−34.6; 99.5) [%]	−6.1 (−38.1; 100.8) [%]	NS (p = 0.536)
Firmness R0	−10.8 (−17.6; −5.7) [%]	−15.7 (−23.5; −4.8) [%]	NS (p = 0.448)
Firmness F0	−17.2 (−25.5; −5.1) [%]	−15.9 (−24.7; −6.7) [%]	NS (p = 0.652)

The two groups demonstrated similar mean TEWL values before the application of the creams: *viz.*, colostrum 21.1 g/h/m<sup>2</sup> and placebo 20.8 g/h/m<sup>2</sup>. After eight weeks of treatment, the TEWL values in both groups improved by about five units, i.e., from a normal level (15–25 g/h/m<sup>2</sup>) to a healthy condition (10–15 g/h/m<sup>2</sup>) [12]. These changes were statistically significant in both groups, p < 0.05 (Figure 2, Table 1).

Skin firmness, assessed by the R0 and F0, improved in both groups over the course of the experiment. R0 represents the passive response of the skin to force, and F0 represents the firmness of the skin at the time of suction [13,14]. Mean R0 values decreased from 0.201 to 0.177 units in the colostrum cream group and from 0.207 to 0.177 units in the placebo group (Figure 3, Table 1). Similarly, mean F0 values decreased from 32.6 to 27.1 units in the colostrum cream group and from 31.6 to 26.7 units in the placebo group (p < 0.001) (Figure 4, Table 1).

No significant changes in erythema, melanin content, or sebum were observed at the end of this study in either the colostrum cream or placebo groups. Detailed data are presented in Tables 1 and 2.

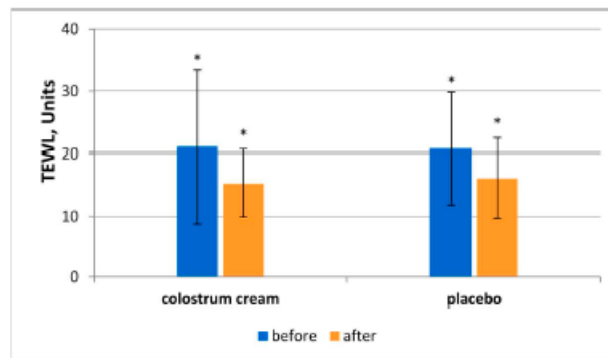


Figure 2. TEWL before and after treatment in the colostrum cream and placebo groups; \*  $p < 0.05$ .

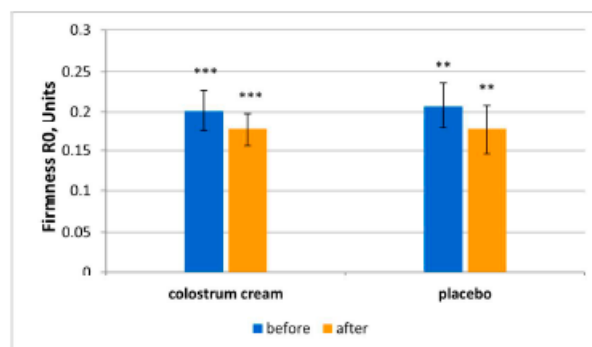


Figure 3. Skin firmness (R0) before and after treatment in the colostrum cream and placebo groups; \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$ .

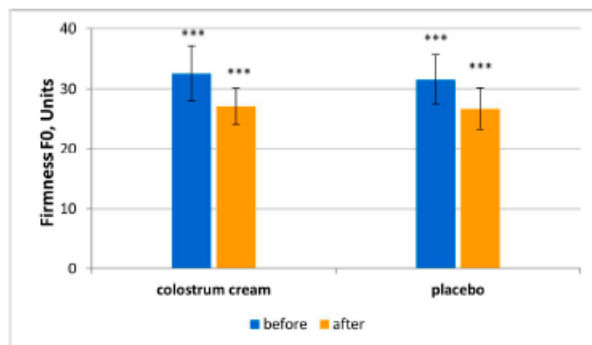
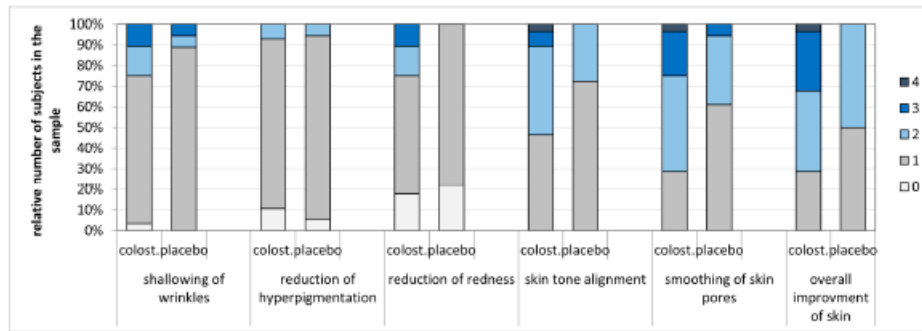


Figure 4. Skin firmness (F0) before and after treatment in the colostrum cream and placebo groups; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 2.2. Photodocumentation

It is important to note that the researchers assessed blinded photos they did not know whether the subjects belonged to the placebo group or the colostrum cream group.

Significant intergroup differences were found for reduction in redness and smoothing of skin pores,  $p < 0.05$ . Assuming a score of 4, 3, or 2 indicated improvement, and 1 or 0 indicated no improvement (Figure 5), improved redness was observed by 25.0% in the colostrum cream group and 0% in the placebo group, and improved smoothing of skin pores was observed in 71.4% of colostrum and 38.9% in placebo.



**Figure 5.** Comparison of the results of photo documentation between the colostrum cream and placebo groups.

In the colostrum cream group, major improvements were noted in “overall improvement”, noted by 71.4% of participants, and “skin tone alignment”, noted by 53.6%.

It is worth emphasizing that for each considered parameter, a greater improvement was observed in the colostrum cream group than in the placebo group.

Exemplary pictures of subjects before (left) and after (right) eight weeks of using the colostrum cream was shown in Figure S1.

## 2.3. Subjective Assessment of Skin Parameters

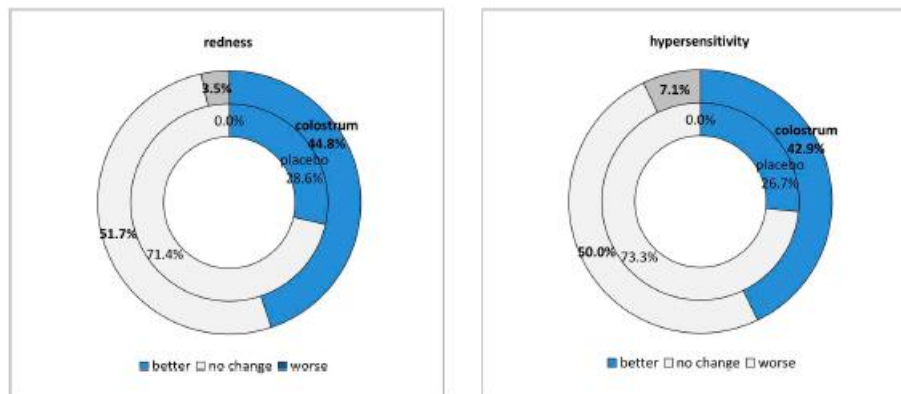
The results of the subjective assessment of skin parameters were presented as the percentage of subjects whose skin improved, worsened, or remained unchanged (Figure 6). Overall, more subjects in the colostrum cream group noted an improvement in skin condition (27.6–55.2%) than in the placebo group (17.6–40.0%). In the colostrum cream group, about 50% of the subjects reported an improvement in skin hydration, regeneration, and softness, as well as a reduction in redness and skin hypersensitivity. A statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference in softness was found between the colostrum cream and placebo groups. The subjective and objective measurements obtained similar results in terms of skin hydration and elasticity.

Among the colostrum cream group, three subjects with oily skin reported reduced sebum secretion after treatment. Indeed, these observations were consistent with the recorded sebum measurements, which improved from 126 units to 76 units in one participant, and from 142 to 100 units and 150 to 102 units in the others.





Figure 6. Cont.



**Figure 6.** Changes in subjective evaluation of skin parameters; placebo group in the center ring; colostrum cream group in the outer ring.

#### 2.4. Side Effects of the Creams Used

Three subjects in the colostrum cream group and two subjects in the placebo group reported side effects such as dryness and tightness of the skin, skin redness, and a burning sensation. These symptoms subsided after a dozen or so minutes after applying the creams. Presumably, they were related to the fragrance present in both preparations. It was unlikely that the colostrum was responsible, as side effects were noted in both the colostrum and placebo groups.

Of the 52 subjects in this study, two from the placebo group were lost to follow-up for various reasons other than the treatment, and another two from the colostrum cream group due to adverse effects (skin dryness and irritation).

### 3. Discussion

Our study describes a preliminary evaluation of the use of cosmetic cream containing 15% sheep's colostrum lyophilizate on mature skin compared to placebo cream.

In a study of 15 healthy volunteers, nanoliposomes encapsulated with skimmed donkey milk creams demonstrated good results in hydration and epidermal water loss improvement, although the effects were not significantly better than placebo cream. Our research was conducted on a much larger group (forty-eight women finished the study), and in comparison to placebo cream, the colostrum one was significantly better at hydration improvement [15].

In addition, in seven patients with moderate atopic dermatitis, a 20% horse colostrum emulsion was found to demonstrate greater softening, moisturizing, soothing, and anti-inflammatory effects than commonly available emulsions when applied twice daily for 30 days; in addition, the treatment resulted in reduced erythema and pruritus, with no observed side effects [11]. Furthermore, cosmetic formulations combining horse colostrum and horse milk demonstrated various benefits, including anti-aging, moisturizing, protective, tensio-dilative, tonic, smoothing, anti-irritant, emollient, bleaching, decongestant, and sebostatic activities [11,16].

Lastly, products consisting of bovine or equine colostrum, hyaluronic acid or its salt, and inter alia olive oil (*Olea europea*) or vitamin E were found to reduce skin aging, improve skin elasticity and tension, and demonstrate moisturizing and antioxidant properties in the facial skin of elderly participants [16].

Hence, colostrum-based creams appear to effectively promote skin health. The increased skin hydration observed in our colostrum group can be attributed to the high levels of lipids, growth factors, vitamins, and minerals in sheep colostrum, which are present in greater amounts than in colostrum bovium. These substances promote the hydration, and nourishment of the skin [17,18]. The product also has a positive effect on skin hydration; the fatty acids in colostrum have beneficial effects on skin barrier function, manifested as a reduction in TEWL. Various myristic, palmitic, stearic, palmitoleic, oleic, and linoleic fatty acids are distributed throughout the stratum corneum. It is important to emphasize that while all acids are present in colostrum in high amounts, palmitic acid is both the main FFA in the epidermis and in the colostrum used in this study [19].

Our findings indicate a significantly better reduction in redness and improved smoothing of skin pores in the colostrum than in the placebo group. Also, the colostrum group reported better effects in the survey, including shallower wrinkles, softer skin, and lower hypersensitivity. Similarly, skin firmness was found to objectively improve, as measured by the cutometer.

The beneficial regenerative properties of colostrum could be due to the effects of its ingredients on fibroblasts or their antioxidative properties. Previous bovine colostrum studies noted increased fibroblast proliferation and migration and a slower telomere shortening rate, indicating delayed cellular aging. Under conditions of oxidative stress *in vitro*, colostrum appears to exert a protective effect against telomere length erosion and oxidative stress, thus preventing skin inflammation and textural changes [20,21].

In the context of the discussed study, it is worth mentioning the effect of colostrum or milk of various origins on skin cell lines. In particular, bovine colostrum stimulates keratinocyte proliferation and migration, suggesting its positive re-epithelializing effect at the wound site [22]. As bovine colostrum has the ability to induce the differentiation of keratinocytes, it may be helpful in the treatment of skin diseases characterized by impaired barrier function, such as dry skin in the elderly or people exposed to UV radiation [23]. The study conducted on skin fibroblast culture shows that donkey milk may be useful in the treatment of inflammatory skin diseases as well as in wound healing, regenerative, and aesthetic dermatology [24]. Mare's colostrum, especially its fat fraction [25] and bovine colostrum [26], strongly stimulates the proliferation of fibroblast culture. It is believed that they may affect the effectiveness of skin wound healing.

The *in vivo* wound healing ability of multifunctional bovine colostrum-conjugated nanofibrous dressings was confirmed in a rat wound model. Probably, high levels of immunoglobulins, lactoferrin, hormones, and cytokines played a significant role in wound healing [27].

Consideration should also be given to reports on the oral supplementation of dairy substances and products. Routine four-week intake of fermented milk products loaded with various lactic acid bacteria strains resulted in increased skin hydration [28]. Other evidence suggests that continuous supplementation with sphingomyelin (SM), a phospholipid found in milk fat globules, has the potential to boost skin hydration and elasticity [29].

An oral formula with high levels of milk proteins, growth factors, alpha-lactalbumin, lactoferrin, and immunoglobulins was found to diminish skin lesions in individuals with plaque psoriasis [30]. The same proteins are present in sheep colostrum [3].

An oral administration of bovine lactoferrin prevented transepidermal water loss, irregular epidermal thickening, cell apoptosis, and increased skin hydration in UVB-radiated hairless mice [31].

Many of the health-promoting effects on human skin have been attributed to the vitamins, minerals, and amino acids present in bovine colostrum [32]. Collagen production, wound healing, and antioxidant activity are believed to be supported by ascorbic acid (vitamin C), niacin (B3), biotin (B7), vitamin E, and retinol (A), while minerals like zinc and copper contribute to neutralizing free radicals and tissue regeneration. In addition, various amino acids, such as proline, threonine, methionine, and arginine, also promote skin health by

supporting anti-aging and wound healing activities [32]. It is also important to emphasize that sheep colostrum is as rich in minerals as bovine colostrum, and richer in protein [3].

Although toxicological studies on our raw material, sheep colostrum, have not been assessed, they were carried out on colostrum of bovine origin. Toxicological evaluations of an ultrafiltered bovine colostrum product, i.e., a mixture of native colostrum and a unique subset of concentrated low-molecular-weight proteins ( $\leq 10$  kDa), confirmed its safety [33]. Studies on rats fed for 90 days with food enriched with 3% and 10% bovine colostrum also confirmed the safety of the colostrum, as no biochemical, physical, or histopathological abnormalities were observed in rats [34]. It is worth mentioning that before conducting this eight-week study on volunteers, the potential sensitizing and irritating effects of our cream with 15% sheep colostrum were tested on a group of 25 people. The results of this study showed that the cosmetic preparation did not cause any side effects in dermatological tests.

Side effects of topical use colostrum can be the result of an allergy to colostrum components. Anaphylaxis after a cream with bovine colostrum was described [35], but what is worth noticing is that sheep milk is characterized by a lower content of frequent allergens [3,36].

#### 4. Materials and Methods

The research was registered at clinicaltrials.gov, where it received the identifier: NCT06305923.

##### 4.1. Preparation of Cosmetic Formulations: Colostrum Cream and Placebo Cream

###### 4.1.1. Colostrum Raw Material

The raw material was collected within the first 24 h after the birth of the sheep, then frozen and lyophilized. The manufacturing process of sheep colostrum was based on rigorous quality control protocols to ensure the safety and efficacy of the end product, making it suitable for various applications, including skincare.

###### 4.1.2. Colostrum Cream

The formulation of the cream was developed specifically for this study. The content of individual components is described in Table 3. The formulation used in this study is an O/W type emulsion.

**Table 3.** Cosmetic formulation of the cream based on sheep colostrum.

Phase	INCI Name	Function	Percentage
IA	Aqua	Solvent	fill 100.0
	Acrylates/C10–30 alkyl Acrylate Crosspolymer	Thickener	0.2
IB	Pentylene Glycol	Humectant, maintenance booster	3.0
II	Isononyl Isononanoate	Emollient	7.0
	Cetearyl Oliviate, Sorbitan Oliviate	Emulsifier	4.5
	Glyceryl Stearate Citrate	Co-emulsifier	2.0
	Tripelargonin	Emollient	7.0
	Helianthus Annus Seed Oil, Tocopherol	Antioxidant	0.1
III	Parfum	Fragrance	0.7
	Colostrum	Active ingredient	15.0
	Aqua, Sodium Lactate	Humectant, pH regulator	0.5
	Aqua, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate	Preservative	1.5
IV	Aqua, Citric Acid	pH regulator	1.3–1.5

A water phase (I) was prepared as follows: the thickening agent (Acrylates/C10–30 alkyl Acrylate Crosspolymer) was sprinkled into the water, left to ensure complete wetting, and then mixed; it was then heated to 70–75 °C and entered phase IB (Pentylene Glycol).

The ingredients of fatty phase II were then heated to 75 °C and mixed to obtain a homogeneous liquid. Phase II was combined with phase I and homogenized under vacuum.

After the mixture cooled to below 40 °C, the phase III ingredients, including the active ingredient, colostrum, were added successively with continuous mixing. Finally, citric acid solution (phase IV) was added to adjust the pH to the range of 4.7–5.2.

#### 4.1.3. Placebo Cream

The placebo cream was prepared using the same process and ingredients as the colostrum cream, but without the colostrum. Its composition included: Aqua, Acrylates/C10–30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Pentylene Glycol, Isononyl Isononanoate, Cetearyl Oliviate, Sorbitan Oliviate, Tripelargonin, Helianthus Annuus Seed Oil, Tocopherol, Parfum, Aqua, Sodium Lactate, Aqua, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Aqua, and Citric Acid.

The resulting products were subjected to a series of tests in accordance with the requirements of Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products by an accredited laboratory. The scope of testing includes microbiological purity testing, testing of the effectiveness of the preservative system used, stability and compatibility testing with packaging, as well as dermatological testing (semi-open test). The tests confirmed the safety of the products, which have been approved for use in humans.

#### 4.2. Selection of Participants

The research was carried out on a group of 52 healthy volunteers, selected in accordance with the guidelines of the Helsinki Declaration of 1964, with subsequent additions and with the approval of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz No. RNN/275/21/KE of 14 December 2021. We obtained written informed consent from each subject to participate in this study. The inclusion and exclusion criteria are as follows in Table 4.

**Table 4.** Inclusion and exclusion criteria for selecting the participants.

Inclusion	Female
	Age between 40 and 70
Inclusion	Signs of skin aging: wrinkles, loss of skin elasticity, discolorations, dryness
	Signed informed consent
Exclusion	Pregnant or breastfeeding
	Allergic to milk proteins
	Suffer from neoplasms, contagious infections, autoimmune diseases
	Suffer from face skin diseases
	Have had an aesthetic procedure on the skin of the face during the last two months
Have been treated with isotretinoin or other oral retinoids during the last six months	

In total, 52 subjects participated in this study. Two people from the placebo group were lost to follow-up because of random reasons, and two from the colostrum cream group did not complete the study due to adverse effects (dryness and irritation of the skin).

The age of the subjects who completed the study ranged from 40 to 70 years. The mean age of the group was 50.4 years, the median was 48.0 years, and the interquartile range (45.5, 54.0).

Participants were enrolled randomly in the colostrum cream (32 people) or placebo groups (20 people) and were not informed which group they belonged to.

Participants were given the creams and asked to apply one–two doses in the evening after nighttime facial cleaning. They were also asked to use sunscreen during the day.

#### 4.3. Instrumental Measurements of Skin Parameters

During the first visit and after eight weeks of everyday use of the tested cream, the skin parameters were measured three times on both cheeks, and the results were averaged.

The skin was measured at standardized temperature and humidity using a Courage + Khazaka electronic GmbH Multi Probe Adapter with the use of the following probes

1. Corneometer<sup>®</sup> CM825 probe: measuring skin hydration based on water content in the stratum corneum;
2. Tewameter<sup>®</sup> TM probe: assessing transepidermal water loss;
  - Mexameter<sup>®</sup> MX18 probe: measuring the level of hemoglobin (erythema) and melanin, the two main dyes responsible for skin color;
  - Sebumeter<sup>®</sup> SM 815 probe: measuring skin sebum level, independent of water content;
3. Cutometer<sup>®</sup> MPA 580 probe: measuring the viscoelastic properties of the skin. The R0 and F0 parameters were chosen. R0 represents the passive response of the skin to force, lower values indicate greater firmness. F0—firmness of the skin at the time of suction. Lower values indicate more elastic skin.

#### 4.4. Photodocumentation

The skin was subjected to photodocumentation at the first and last visit with the use of the Photomedicus system. The photos were taken in standard light with standardized face positions. The photos were compared using the following scale: 0 means no improvement (the same as the initial picture), 1—slight improvement, 2—moderate improvement, 3—marked improvement (marked improvement in appearance from the initial condition, but not completely optimal), and 4—greatest possible improvement (optimal aesthetic result).

#### 4.5. Subjective Assessment of the Skin

All participants, i.e., in both groups, subjectively assessed their skin condition after eight weeks of treatment. Participants rated smoothing of shallow wrinkles, skin tone alignment, regeneration, hydration, elasticity, softness, redness reduction, and hypersensitivity reduction; they indicated either improvement, deterioration, or no change. Finally, the results in each group were presented as the percentage of subjects with improved, worsened, or unchanged skin.

#### 4.6. Statistical Analysis

The mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD) or median and interquartile range (median (25%; 75%)) were applied as appropriate for the description of parameters. Changes in skin parameters compared to baseline were calculated based on the following formula:  $((x(t_1) - x(t_0))/x(t_0)) \cdot 100$ .

Differences in skin parameters over time were evaluated using the paired *t*-test for normally distributed data and Wilcoxon's signed rank test for non-normal data. For unpaired data, the *t*-test or Mann-Whitney test were used, depending on the distribution. The Chi-square test, or Fisher's exact test where appropriate, was used to compare differences between categorical variables. *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

### 5. Conclusions

The study of the effect of sheep colostrum cream on mature skin, in comparison to placebo cream, is highly innovative research because no cosmetic preparation with colostrum of sheep origin has previously been tested.

This study also indicates that the issue of preparing an appropriate placebo cream is crucial. Our placebo product, with the same composition as our colostrum cream but without an active component, also slightly improved hydration and TEWL in subjects. However, the placebo cream should not improve skin condition, but on the other hand, it should ensure comfortable application to patients throughout the study period.

Sheep colostrum cream demonstrates greater effectiveness in improving skin conditions compared to placebo cream. Its use results in substantial enhancements in hydration, TEWL, and elasticity, suggesting potential dermatological and aesthetic applications.

The subjective assessment of skin condition and photo documentation confirm the results of the objective measurements, revealing that the colostrum cream demonstrates significant activity in, *inter alia*, improving skin softness, smoothing skin pores, and reducing redness.

## 6. Patents

As a result of the work described in this manuscript, the Polish patent application No. P446801, “Cosmetic composition, method of its production, and application” was filed on 22 November 2023.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app14072862/s1>, Figure S1: Exemplary pictures of subjects before (left) and after (right) eight weeks of using the colostrum cream.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.K. and U.K.-L.; methodology, A.E.-P.; formal analysis, K.K., A.E.-P. and U.K.-L.; investigation, K.K., A.E.-P. and U.K.-L.; data curation, A.E.-P. and U.K.-L.; writing—original draft preparation, K.K., A.E.-P. and U.K.-L.; writing—review and editing, A.E.-P. and U.K.-L.; visualization, U.K.-L.; supervision, U.K.-L.; project administration, U.K.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Medical University of Lodz, grants No. 503/3-066-02/503-31-001 and 503/3-066-01/503-31-001.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of Medical University of Lodz, Poland (protocol code RNN/275/21/KE, date of approval 14 December 2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Acknowledgments:** We would like to thank Łukasz Bobak from the Wrocław University of Environmental and Life Science for the lyophilization of the colostrum.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Zhang, S.; Duan, E. Fighting against Skin Aging. *Cell Transpl.* **2018**, *27*, 729–738. [CrossRef] [PubMed]
- Playford, R.J.; Weiser, M.J. Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses. *Nutrients* **2021**, *13*, 265. [CrossRef] [PubMed]
- Kazimierska, K.; Kalinowska-Lis, U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules* **2021**, *26*, 3253. [CrossRef] [PubMed]
- Kusumaningrum, C.E.; Widyasari, E.M.; Sriyani, M.E.; Wongso, H. Pharmacological Activities and Potential Use of Bovine Colostrum for Peptide-Based Radiopharmaceuticals: A Review. *Pharmacia* **2021**, *68*, 471–477. [CrossRef]
- Madureira, A.R.; Pereira, C.L.; Gomes, A.M.P.; Pintado, M.E.; Xavier Malcata, F. Bovine Whey Proteins—Overview on Their Main Biological Properties. *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 1197–1211. [CrossRef]
- Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. Physico-Chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 88–113. [CrossRef]
- Hall, D.G.; Holst, P.J.; Shutt, D.A. The Effect of Nutritional Supplements in Late Pregnancy on Ewe Colostrum Production Plasma Progesterone and IGF-1 Concentrations. *Aust. J. Agric. Res.* **1992**, *43*, 325–337. [CrossRef]
- Kim, H.; Kim, D.E.; Han, G.; Lim, N.R.; Kim, E.H.; Jang, Y.; Cho, H.; Jang, H.; Kim, K.H.; Kim, S.H.; et al. Harnessing the Natural Healing Power of Colostrum: Bovine Milk-Derived Extracellular Vesicles from Colostrum Facilitating the Transition from Inflammation to Tissue Regeneration for Accelerating Cutaneous Wound Healing. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, 2102027. [CrossRef] [PubMed]
- Hong, J.P.; Park, S.W. The Combined Effect of Recombinant Human Epidermal Growth Factor and Erythropoietin on Full-Thickness Wound Healing in Diabetic Rat Model. *Int. Wound J.* **2014**, *11*, 373–378. [CrossRef]
- Han, G.; Kim, H.; Kim, D.E.; Ahn, Y.; Kim, J.; Jang, Y.; Kim, K.; Yang, Y.; Kim, S.H. The Potential of Bovine Colostrum-Derived Exosomes to Repair Aged and Damaged Skin Cells. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 307. [CrossRef]
- Gobbi, R.M. Pharmaceutical and Dermocosmetic Compositions Containing Equine Colostrum 1998, US5750149A. U.S. Patent US 5,750,149, 12 May 1998.
- Miller, T. Chapter 14—Clinical Testing to Uphold an Anti-Aging Claim. In *Skin Aging Handbook*; Dayan, N., Ed.; Personal Care & Cosmetic Technology; William Andrew Publishing: Norwich, NY, USA, 2009; pp. 363–389. ISBN 978-0-8155-1584-5.
- Ohshima, H.; Kinoshita, S.; Oyobikawa, M.; Futagawa, M.; Takiwaki, H.; Ishiko, A.; Kanto, H. Use of Cutometer Area Parameters in Evaluating Age-Related Changes in the Skin Elasticity of the Cheek. *Skin Res. Technol.* **2013**, *19*, e238–e242. [CrossRef] [PubMed]

14. Mosquera, T.; Peña, S.; Álvarez, P.; Noriega, P. Changes in Skin Elasticity and Firmness Caused by Cosmetic Formulas Elaborated with Essential Oils of *Aristeguietia glutinosa* (Matico) and *Ocotea quixos* (Ishpingo). A Statistical Analysis. *Cosmetics* **2020**, *7*, 95. [\[CrossRef\]](#)
15. Kocic, H.; Stankovic, M.; Tirant, M.; Lotti, T.; Arsic, I. Favorable Effect of Creams with Skimmed Donkey Milk Encapsulated in Nanoliposomes on Skin Physiology. *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*, e13511. [\[CrossRef\]](#)
16. Gobbi, R.M. Cosmetic Compositions Containing Hyaluronic Acid and Colostrum 2007. WO2007009790A1, 25 January 2007.
17. Playford, R.J.; Macdonald, C.E.; Johnson, W.S. Colostrum and Milk-Derived Peptide Growth Factors for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 5–14. [\[CrossRef\]](#)
18. Moatsou, G.; Sakkas, L. Sheep Milk Components: Focus on Nutritional Advantages and Biofunctional Potential. *Small Rumin. Res.* **2019**, *180*, 86–99. [\[CrossRef\]](#)
19. Knox, S.; O'Boyle, N.M. Skin Lipids in Health and Disease: A Review. *Chem. Phys. Lipids* **2021**, *236*, 105055. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Jogi, R.; Tager, M.J.; Perez, D.; Tsapekos, M. Bovine Colostrum, Telomeres, and Skin Aging. *J. Drugs Dermatol.* **2021**, *20*, 538–545. [\[PubMed\]](#)
21. Takayama, Y.; Kitsunai, K.; Mizumachi, K. Factors in Bovine Colostrum That Enhance the Migration of Human Fibroblasts in Type I Collagen Gels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2776–2779. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Kovacs, D.; Cardinali, G.; Aspite, N.; Picardo, M. Bovine Colostrum Promotes Growth and Migration of the Human Keratinocyte HaCaT Cell Line. *Growth Factors* **2009**, *27*, 448–455. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Picardo, M.; Cardinali, G. Bovine colostrum induces the differentiation of human primary keratinocytes. *FASEB J.* **2020**, *34*, 6302–6321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Kocic, H.; Langerholc, T.; Kostic, M.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Krstic, M.; Nestic, I.; Godic, A.; Wollina, U. The Regenerative Potential of Donkey and Human Milk on the Redox-Sensitive and Proliferative Signaling Pathways of Skin Fibroblasts. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
25. Zava, S.; Baello, C.; Pessione, A.; Garoffo, L.P.; Fattori, P.; Montorfano, G.; Conti, A.; Giunta, C.; Pessione, E.; Berra, B.; et al. Mare's colostrum globules stimulate fibroblast growth in vitro: A biochemical study. *J. Med. Food* **2009**, *12*, 836–845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Torre, C.; Jeusette, I.; Serra, M.; Brazis, P.; Puigdemont, A. Bovine Colostrum Increases Proliferation of Canine Skin Fibroblasts. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2058S–2060S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Kaur, T.; Joshi, A.; Singh, N. Natural cocktail of bioactive factors conjugated on nanofibrous dressing for improved wound healing. *Biomater. Adv.* **2022**, *143*, 213163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Kimoto-Nira, H.; Nagakura, Y.; Kodama, C.; Shimizu, T.; Okuta, M.; Sasaki, K.; Koikawa, N.; Sakuraba, K.; Suzuki, C.; Suzuki, Y. Effects of Ingesting Milk Fermented by *Lactococcus Lactis* H61 on Skin Health in Young Women: A Randomized Double-Blind Study. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 5898–5903. [\[CrossRef\]](#)
29. Higurashi, S.; Haruta-Ono, Y.; Urazono, H.; Kobayashi, T.; Kadooka, Y. Improvement of Skin Condition by Oral Supplementation with Sphingomyelin-Containing Milk Phospholipids in a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 6706–6712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Poulin, Y.; Pouliot, Y.; Lamiot, E.; Aattouri, N.; Gauthier, S. Safety and Efficacy of a Milk-Derived Extract in the Treatment of Plaque Psoriasis: An Open-Label Study. *J. Cutan. Med. Surg.* **2006**, *9*, 271–275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Murata, M.; Satoh, T.; Wakabayashi, H.; Yamauchi, K.; Abe, E.; Nomura, Y. Oral Administration of Bovine Lactoferrin Attenuates Ultraviolet B-Induced Skin Photodamage in Hairless Mice. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 651–658. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Mehra, R.; Singh, R.; Nayan, V.; Buttar, H.S.; Kumar, N.; Kumar, S.; Bhardwaj, A.; Kaushik, R.; Kumar, H. Nutritional Attributes of Bovine Colostrum Components in Human Health and Disease: A Comprehensive Review. *Food Biosci.* **2021**, *40*, 100907. [\[CrossRef\]](#)
33. Thiel, A.; Glávits, R.; Murbach, T.S.; Endres, J.R.; Reddeman, R.; Hirka, G.; Vértési, E.; Béres, E.; Szakonyiné, I.P. Toxicological evaluations of colostrum ultrafiltrate. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *104*, 39–49. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Davis, P.E.; Greenhill, N.S.; Rowan, A.M.; Schollum, L.M. The safety of New Zealand bovine colostrum: Nutritional and physiological evaluation in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 229–236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Porcaro, E.; Caminiti, L.; Crisafulli, G.; Guglielmo, E.; Pajno, G.B. Anaphylaxis to Cutaneous Exposure to Bovine Colostrum Based Cream. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2019**, *37*, 9–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Pandya, A.J.; Gokhale, A.J.; Mallik, J.M. Overview of Functionality of Goat and Sheep Milk. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2020**, *9*, 2750–2764. [\[CrossRef\]](#)

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





**Publikacja 4 [P4]:**

Erkiert-Polguj A, **Kazimierska K**, Kalinowska-Lis U. Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin. *Applied Sciences*. 2024; 14(5):2199. <https://doi.org/10.3390/app14052199>.

IF: 2,7; MNiSW: 100.

Communication

## Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin

 Anna Erkiert-Polguj<sup>1</sup> , Kinga Kazimierska<sup>2</sup> and Urszula Kalinowska-Lis<sup>2,\*</sup> 
<sup>1</sup> Department of Cosmetology and Aesthetic Dermatology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; anna.erkiert-polguj@umed.lodz.pl

<sup>2</sup> Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, 90-419 Lodz, Poland; kinga.kazimierska@stud.umed.lodz.pl

\* Correspondence: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl

**Abstract:** Colostrum, the first secretion of mammalian breasts after giving birth, contains a wealth of components believed to have a beneficial effect on human skin, including lactoferrin, immunoglobulin (Ig)A, beta-carotene, fat-soluble vitamins, and zinc. The present study examines the effect of a cosmetic preparation containing 15% lyophilisate of sheep colostrum on acne skin. A group of 27 volunteers with mild or moderate acne applied the cream twice a day for eight weeks. Before and after using the cream, the level of skin hydration, sebum level, and TEWL were measured using a standardized Courage-Khazaka Multi Probe Adapter. The participants also completed a survey rating the effects of using the cosmetic preparation. Regular application of the cream with sheep colostrum resulted in an objective improvement in hydration and TEWL and a reduction in sebum; this is extremely desirable for acne-prone skin. Three-quarters of the participants reported that the tested cream reduced acne lesions (blackheads, papules, pustules, and erythema) by around 40%. Moreover, the cosmetic preparation improved hydration by 40% and reduced seborrhea by 29% in 82% of subjects and kept the skin in good condition in 90%. As the cream improves the hydrobarrier and overall condition of the skin, it could serve as an addition to local acne treatment, e.g., with retinoids.

**Keywords:** acne; sheep colostrum; skin; hydration; sebum; TEWL.



**Citation:** Erkiert-Polguj, A.; Kazimierska, K.; Kalinowska-Lis, U. Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 2199. <https://doi.org/10.3390/app14052199>

Academic Editor: Alessio Adamiano

Received: 25 January 2024

Revised: 28 February 2024

Accepted: 28 February 2024

Published: 6 March 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Acne is a multifactorial inflammatory disease affecting the pilosebaceous follicles of the skin. It predominantly affects teenagers, but it is not uncommon among adults [1]. The condition not only impacts physical appearance but also significantly lowers self-confidence, both during active outbreaks and post-recovery due to potential scarring [2]. Effective treatment requires regular and gentle care for such sensitive skin.

The pathogenic factors of acne include increased sebum secretion, follicular epidermal hypercornification, *Cutibacterium acnes* colonization, and inflammation; the condition is characterized by the development of blackheads, inflammatory pimples, papules, and scars [3]. Typically, acne treatment includes both topical and systemic approaches, with the decision based on symptom severity. Although acne is not deemed an infectious disease, the regimen often includes antibiotics such as clindamycin, lymecycline, doxycycline, erythromycin, or tetracycline, each with a potential to enhance bacterial resistance [4,5]. The imperative to seek and develop alternative non-antibiotic therapies for acne has escalated due to the growing concerns over antibiotic resistance and adverse effects to treatment. Other prevalent treatments, such as retinoids, benzoyl peroxide, azelaic acid, and salicylic acid, have known systemic effects and can cause local skin irritation [6]. In the most severe cases, oral retinoids are used [7]. Although the skin barrier is affected in the course of acne, the choice of treatment may worsen its function [8].

Colostrum is the first milk produced by humans and other mammals immediately after giving birth. It is rich in various bioactive components, including several growth factors involved in skin regeneration and repair [9,10]. It also contains lactoferrin, which may have an important role in acne treatment because of its antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties [11]. Proline-rich polypeptides (PRPs) from colostrum modulate the immune system and have been shown to improve skin barrier function [12]. The author of the patent reports that in patients ( $n = 12$ ) with seborrheic acne who used the cream with 30% equine colostrum, the skin lesions completely disappeared, and their skin recovered entirely [13]. The authors of another invention claim that their antiacne ingredient, a product of bovine colostrum fermentation, has an effect related to its antibacterial activity [14].

The composition of sheep colostrum, particularly in the immediate postpartum period, is markedly richer than that of cow colostrum, with significantly higher concentrations of fat (13.0% vs. 5.1%), protein (11.8% vs. 7.1%), and total solids (28.9% vs. 15.6%). The lactose content in sheep colostrum is slightly lower than in bovine colostrum (3.3% vs. 3.6%), and the amount of minerals is comparable (0.9%) in both types of colostrum [15]. Notably, sheep colostrum contains the highest levels of IgG and IgA when compared to bovine and caprine colostrum, which can play a role in regulating the immune response [11,12]. Lysozyme, another component of sheep colostrum, is effective in breaking down the cell walls of acne-causing bacteria. Given that the lysozyme content in sheep's milk is significantly higher than in bovine and caprine milks, it can be inferred that sheep colostrum's lysozyme levels are even more pronounced. Also, lactoperoxidase acts as a natural antibacterial agent as an element of non-specific cellular immunity [11]. Sheep colostrum is also significantly richer in EGF (epidermal growth factor) than bovine colostrum; its topical application was earlier described in acne lesions, as well as in the treatment of scars [16,17].

Hence, the aim of the present study was to assess the effects of a cosmetic cream containing 15% sheep colostrum lyophilisate on acne skin.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Preparation of Colostrum Cream

The colostrum cream was prepared as described previously [18]. The active component in the cream is 15% sheep colostrum lyophilisate.

INCI: Aqua, Sheep Colostrum, Isononyl Isononanoate, Tripelargonin, Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat, Pentylene Glycol, Glyceryl Stearate Citrate, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Citric Acid, Parfum, Sodium Lactate, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Helianthus Annus Seed Oil, and Tocopherol.

### 2.2. Selection of Participants

The research was carried out on a group of 30 volunteers with mild or moderate acne. The group was formed in accordance with the guidelines of the Helsinki Declaration of 1964, with subsequent additions. The study received the approval of the Bioethics Commission No. RNN/44/23/KE of 14 February 2023.

The exclusion criteria comprised pregnancy and lactation, active viral lesions on facial skin, active fungal and bacterial diseases, or participation in other dermatological therapies during the study period.

The study participants were asked not to use any other cosmetic treatments and not to change cosmetic preparations for daily care during the study, except changing the cream for colostrum cream. The participants were asked to use the cream twice a day, once in the morning and once in the evening, after cleansing their face: all participants pledged to comply with the recommendations. Written informed consent was obtained from each participant before enrolment.

In total, 30 subjects, aged 18–27, participated in the study. Two were lost to follow up due to different reasons, and one did not complete the study due to adverse effects (dryness and irritation of the skin).

### 2.3. Instrumental Measurement of Skin Parameters

Skin condition was assessed before the treatment and after eight weeks of everyday use. The skin parameters were measured three times, i.e., on the forehead, cheek, and chin.

The amount of sebum on the skin, hydration, and changes in transepidermal water loss (TEWL) were measured with an MPA 580 apparatus (Courage and Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany). The measurements were carried out under constant conditions (temperature of 20 °C and humidity of 45% ± 5%) once the participants had been acclimatized to ambient conditions for 15 min.

Hydration of the skin was measured via a corneometer, which measures the change in dielectric constant due to skin surface hydration. TEWL was measured via Tewameter by assessing the gradient of water evaporation from the skin. Sebum measurement was conducted via Sebumeter; the mat tape of the Sebumeter in contact with the skin becomes transparent because of sebum on the skin; then, the transparency of the tape is measured.

### 2.4. Subjective Assessment

The participants were also asked complete a questionnaire in which they evaluated the effects of the eight-week treatment. They rated skin symptoms such as blackheads, papules, pustules, and erythema, as well as skin hydration, seborrhea, and overall skin condition. They indicated the percentage of either improvement, deterioration, or no change.

### 2.5. Statistical Analysis

The data were processed as mean and standard deviation (mean ± SD) or median and interquartile range (median [25–75%]) as appropriate. The differences occurring in skin parameters over time were evaluated using the Wilcoxon signed-rank test. *p*-values < 0.05 were considered as statistically significant.

## 3. Results

The study was completed by 27 participants.

### 3.1. Instrumental Measurement of Skin Parameters

After eight-week application, the cream with colostrum yielded a significant improvement in skin hydration on the forehead and cheeks, improved TEWL values on the cheeks and chin, and caused a reduction in seborrhea on the forehead. These parameters were also found to improve in the remaining parts of the face, but without statistical significance. The tested skin parameters are presented in Table 1 and Figure 1.

**Table 1.** Changes in skin parameters after eight weeks of treatment expressed as mean ± SD and median (25–75%).

Face Area	Measurement I (Week 0)	Measurement II (Week 8)	Statistical Significance ( <i>p</i> )
<b>Hydration</b>			
Forehead	50.7 ± 13.8	56.6 ± 10.0	<i>p</i> = 0.036
	51.0 (42.2–58.2)	58.5 (53.2–61.0)	
Cheeks	43.2 ± 12.8	49.3 ± 11.4	<i>p</i> = 0.013
	41.0 (38.5–52.0)	50.0 (41.5–55.7)	
Chin	50.1 ± 10.9	54.9 ± 19.7	NS ( <i>p</i> = 0.171)
	50.0 (41.5–54.2)	52.0 (40.7–60.0)	
<b>TEWL</b>			
Forehead	17.3 ± 9.1	16.8 ± 6.1	NS ( <i>p</i> = 0.876)
	15.5 (10.0–20.5)	15.0 (13.0–18.5)	
Cheeks	20.1 ± 6.5	16.5 ± 6.2	<i>p</i> = 0.013
	18.5 (14.7–25.0)	15.0 (13.0–16.2)	

Table 1. Cont.

Face Area	Measurement I (Week 0)	Measurement II (Week 8)	Statistical Significance ( <i>p</i> )
Chin	26.4 ± 11.9 22.0 (17.7–33.0)	18.9 ± 8.4 16.0 (14.0–20.0)	<i>p</i> < 0.001
<b>Sebum</b>			
Forehead	132.8 ± 67.8 120.5 (81.5–199.7)	91.7 ± 41.0 84.0 (61.0–101.2)	<i>p</i> = 0.002
Cheeks	63.3 ± 62.1 51.5 (22.2–69.2)	69.2 ± 52.7 64.0 (35.0–83.7)	NS ( <i>p</i> = 0.264)
Chin	110.2 ± 65.3 89.5 (62.7–145.0)	103.1 ± 56.2 90.0 (60.5–134.2)	NS ( <i>p</i> = 0.207)

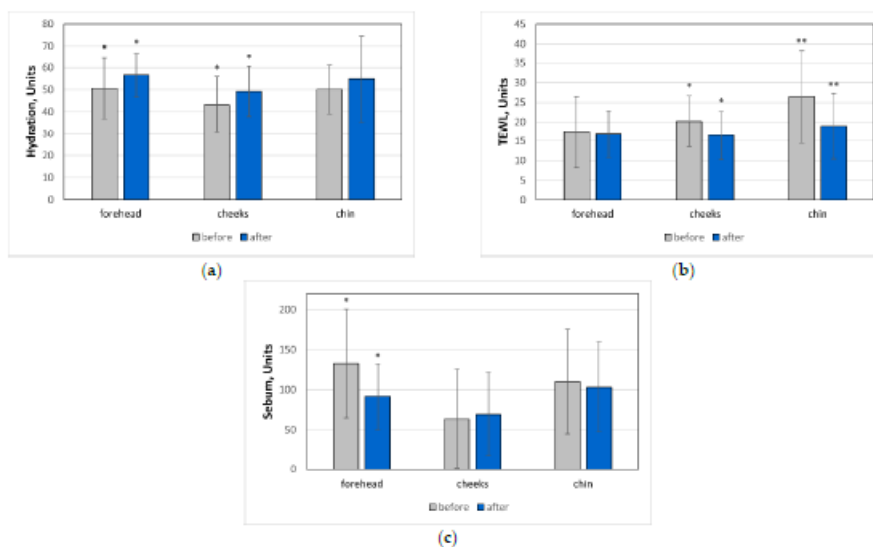


Figure 1. Instrumental measurements of skin hydration (a), TEWL (b), and sebum (c) before and after treatment. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01.

### 3.2. Subjective Assessment of Skin Parameters

The subjects assessed their skin symptoms, e.g., blackheads, papules, pustules, and erythema, as well as skin hydration, seborrhea and overall skin condition after eight weeks of treatment. The results are provided in Tables 2 and 3.

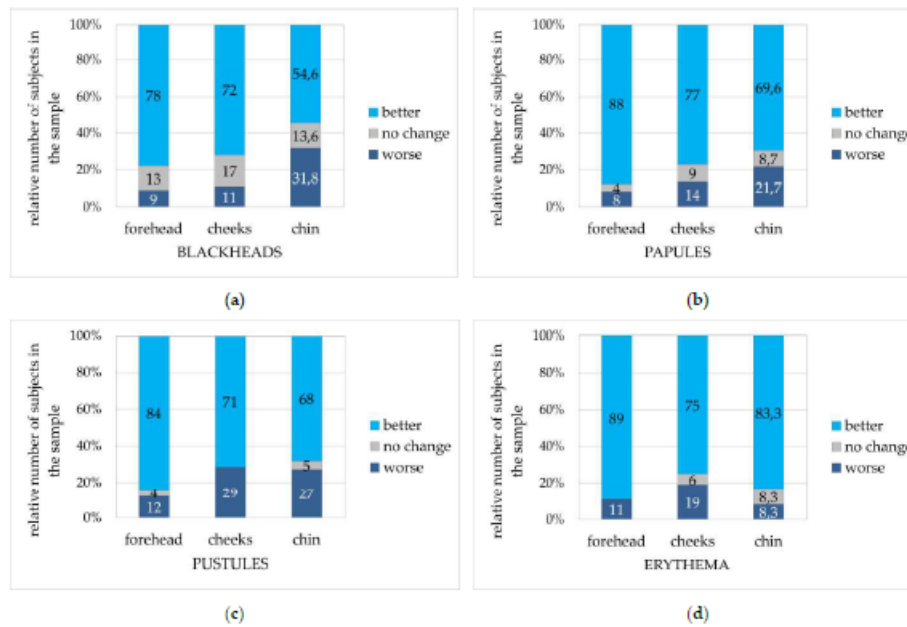
Improvements were noted with regard to the numbers of blackheads (68.3% of participants), papules (78.1%), pustules (74.5%), and erythema (82.4%) for the whole face, i.e., forehead, chin, and cheeks (Figure 2). The mean improvement noted, where present, was 37.5% (reduction of blackheads), 39.2% (reduction of papules), 43.4% (reduction of pustules), and 38.5% (reduction of erythema) for the whole face (forehead, chin, and cheeks) (Table 2).

Improvement was noted in skin hydration (81.5% of participants), seborrhea (82.4%), and overall skin condition (89.7%) for the whole face (forehead, chin, and cheeks) (Figure 3).

The mean improvement, where present, was 39.6% (increase in hydration), 28.7% (reduction of sebum), and 39.1% (overall skin condition) for the whole face (forehead, chin, and cheeks) (Table 3).

**Table 2.** Subjective assessment by participants of their skin symptoms such as blackheads, papules, pustules, and erythema.

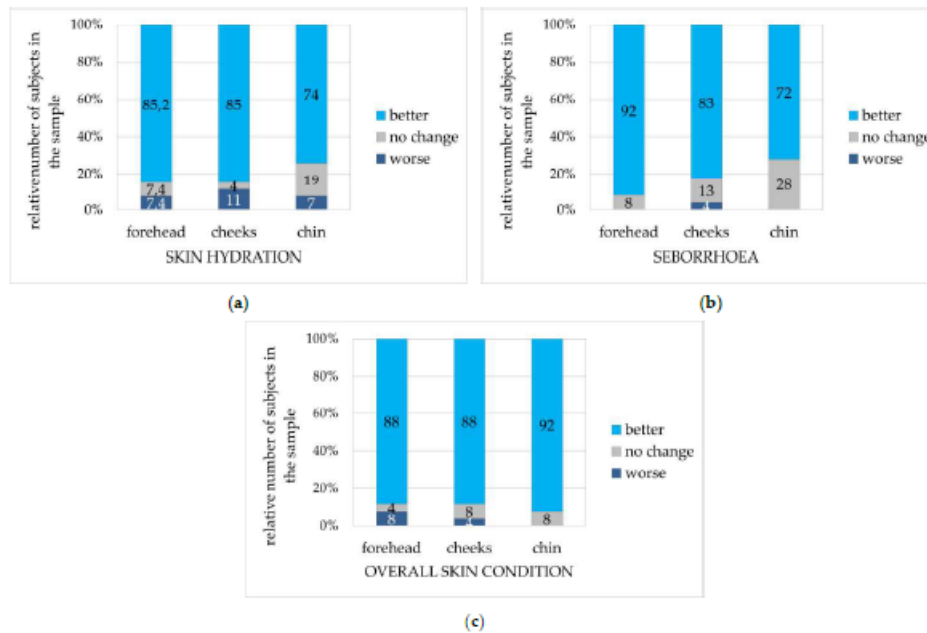
	BLACKHEAD			PAPULES			PUSTULES			ERYTHEMA		
	Forehead	Chin	Cheeks	Forehead	Chin	Cheeks	Forehead	Chin	Cheeks	Forehead	Chin	Cheeks
Mean improvement in the group declaring improvement (group size)	33.3% (N = 18)	38.8% (N = 12)	40.4% (N = 13)	32.6% (N = 21)	43.2% (N = 16)	41.8% (N = 17)	37.6% (N = 21)	44.3% (N = 15)	48.3% (N = 15)	40.4% (N = 16)	31.5% (N = 10)	43.5% (N = 12)
Group size with no changes	N = 3	N = 3	N = 3	N = 1	N = 2	N = 2	N = 1	N = 1	N = 0	N = 0	N = 1	N = 1
Mean deterioration in the group declaring deterioration (group size)	12.5% (N = 2)	10.7% (N = 7)	10.0% (N = 2)	15.0% (N = 2)	16.0% (N = 5)	30.0% (N = 3)	10.0% (N = 3)	19.5% (N = 6)	30.8% (N = 6)	10.0% (N = 2)	10.0% (N = 1)	8.3% (N = 3)
Group size with no symptoms	N = 4	N = 5	N = 9	N = 3	N = 4	N = 5	N = 2	N = 5	N = 6	N = 9	N = 15	N = 11



**Figure 2.** Percentage of subjects who declared improvement (blue), no change (grey), and deterioration (navy blue) in terms of skin lesions such as blackheads (a), papules (b), pustules (c), and erythema (d).

**Table 3.** Subjective assessment by participants of their skin hydration, seborrhea, and overall skin condition.

	SKIN HYDRATION			SEBORRHOEA			OVERALL SKIN CONDITION		
	Forehead	Chin	Cheeks	Forehead	Chin	Cheeks	Forehead	Chin	Cheeks
Mean improvement in the group declaring improvement (group size)	37.5% (N = 23)	38.0% (N = 20)	43.2% (N = 23)	32.5% (N = 23)	24.1% (N = 18)	29.6% (N = 20)	39.7% (N = 23)	33.9% (N = 24)	43.8% (N = 23)
Group size with no changes	N = 2	N = 5	N = 1	N = 2	N = 7	N = 3	N = 1	N = 2	N = 2
Mean deterioration in the group declaring deterioration (group size)	20.0% (N = 2)	15.0% (N = 2)	36.7% (N = 3)	0.0% (N = 0)	0.0% (N = 0)	10.0% (N = 1)	22.5% (N = 2)	0.0% (N = 0)	20.0% (N = 1)
Group size with no symptoms	N = 0	N = 0	N = 0	N = 2	N = 2	N = 3	N = 1	N = 1	N = 1

**Figure 3.** Percentage of subjects who declared improvement (blue), no change (grey), and deterioration (navy blue) in terms of skin hydration (a), seborrhea (b), and overall skin condition (c).

#### 4. Discussion

This study examines the efficacy of a cosmetic preparation containing sheep colostrum on acne-prone skin, with particular emphasis on the potential dermatological benefits arising from its bioactive components. The outcome of the study was measured by subjective (participants' opinions) and objective (measurements of epidermal barrier function) methods. Our cream is a cosmetic, and for this category, subjective opinions are especially important. The volunteers assessed the antiacne effects as improving their skin in the light of skin lesion and epidermal barrier function.

Acne can be treated topically with agents such as benzoyl peroxide, retinoids, and oral isotretinoin, as well as with photodynamic therapy, chemical exfoliation therapy, and laser

therapy. However, such treatments, and acne itself, can increase the rate of water loss from the epidermis, resulting in skin dryness and inflammation and greater skin sensitivity [19]. Acne skin samples were found to demonstrate an altered expression of epidermal molecules with a key role in maintaining barrier function [8], and acne patients demonstrated higher TEWL and lower hydration compared to a healthy group [20].

Our findings indicate that treatment resulted in greater skin hydration on the forehead and cheeks, which may indicate that the bioactive colostrum components (including growth factors, vitamins, and lipids) enhance water-retention capacity. Accordingly, the reduction in TEWL observed on the chin and cheeks suggests an improvement in hydrolipid barrier integrity, likely mediated by lipids and proteins that strengthen the stratum corneum [13,21]. Mueller et al. [22] propose that lactoferrin, a key component of colostrum, improves skin health by reducing acne lesions, enhancing hydration, diminishing TEWL, and lowering sebum production.

Sebum plays the key role in the development of acne. Acne begins just before puberty, when the sebaceous glands enlarge, and reaches its maximum occurrence in early adolescence. Although patients with acne demonstrate greater sebum secretion in the whole face than in controls, its level does not correlate with lesion count [23]. In our study, most patients had a normal skin type rather than an oily skin type, according to Sebumeter guidelines [23]. Another study involving over 900 patients found sebum to have a clear influence on inflammatory lesions and that male acne patients are more influenced by sebum content than female acne patients [24]. Our results indicate that treatment was associated with a notable reduction in sebum production on the forehead, a critical factor in acne pathogenesis. This can be attributed to the regulatory effects of the lipid, cytokine, and immunoglobulin components on the sebaceous glands [25–28]. It is important to note that the greatest sebum content was observed on the forehead; as no significant changes were found in other facial regions, this may suggest that sebum production was normalized and that its content was not simply reduced.

The study participants reported improvements in inflammatory acne lesions, which is consistent with the documented anti-inflammatory properties of colostrum, including its constituent immunoglobulins, lactoferrin, lactoperoxidase, and cytokines [22,29]. Skin regeneration and repair was also enhanced by the presence of growth factors such as IGF-1, EGF, and TGF, potentially accelerating the healing of acne-related scarring and erythema [11]. Another component, lactoferrin, known for its anti-inflammatory and antibacterial properties, demonstrates the ability to regulate cytokine secretion, inhibit inflammatory responses, and reduce levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-8 [30]. This indicates its potential in alleviating acne-related inflammation and improving overall skin condition. It can also reduce redness, most likely by inhibiting the activity of key inflammatory proteins [30]. The effectiveness of lactoferrin in reducing inflammation induced by *Cutibacterium acnes* is in line with the overall beneficial impact of sheep colostrum on the skin, especially for inflammatory problems like acne [30].

The positive outcomes observed in this study are in line with previous research on horse colostrum and the growth factor-enriched protein fraction from bovine milk, suggesting that colostrum of other origins may also have therapeutic potential [13,31,32]. Indeed, previous research indicating that colostrum-derived products have significant antimicrobial and anti-inflammatory effects further supports their use in managing acne-prone skin [14]. Together, these findings emphasize the role of bioactive proteins, enzymes, and growth factors in modulating the immune response of the skin and its microbial environment.

Although this study presents promising results, it may have some limitations. Considerable variability was noted in the responses among participants. As such, there is a need for further studies based on larger, more diverse cohorts to broaden the applicability of the findings.



## 5. Conclusions

The tested colostrum-based cream appears suitable for the care of acne-prone skin. It maintains the skin in good condition by reducing sebum secretion and providing adequate hydration. Its use resulted in a reduced number of skin lesions typical of acne-affected skin, i.e., blackheads, papules, and pustules.

Colostrum cream may appropriately complete the care of acne skin during dermatological therapies, e.g., with retinoids, through its potential for improving the epidermal barrier function.

## 6. Patents

As a result of the work described in this manuscript, Polish patent application No. P446801 “Cosmetic composition, method of its production and application” was filed on 22 November 2023.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.K. and U.K.-L.; methodology: A.E.-P.; formal analysis: K.K., A.E.-P. and U.K.-L.; investigation: A.E.-P.; data curation: A.E.-P. and U.K.-L.; writing—original draft preparation: K.K., A.E.-P. and U.K.-L.; writing—review and editing: A.E.-P. and U.K.-L.; visualization: U.K.-L.; supervision: U.K.-L.; project administration: U.K.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Medical University of Lodz, grant nos. 503/3-066-02/503-31-001 and 503/3-066-01/503-31-001.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of Medical University of Lodz, Poland (protocol No. RNN/44/23/KE of 14 February 2023).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data are contained within the article.

**Acknowledgments:** We would like to thank Lukasz Bobak from the Wrocław University of Environmental and Life Science for lyophilization of the colostrum.

**Conflicts of Interest:** The authors K.K. and U.K.-L. are the inventors in Polish patent application No. P446801. The authors declare conflict of interest.

## References

1. Wolkenstein, P.; Machovcová, A.; Szepietowski, J.C.; Tennstedt, D.; Veraldi, S.; Delarue, A. Acne Prevalence and Associations with Lifestyle: A Cross-Sectional Online Survey of Adolescents/Young Adults in 7 European Countries. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2018**, *32*, 298–306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Hazarika, N.; Archana, M. The Psychosocial Impact of Acne Vulgaris. *Indian. J. Dermatol.* **2016**, *61*, 515–520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Leung, A.K.; Barankin, B.; Lam, J.M.; Leong, K.E.; Hon, K.L. Dermatology: How to Manage Acne Vulgaris. *Drugs Context* **2021**, *10*, 2021-8-6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Marson, J.W.; Baldwin, H.E. An Overview of Acne Therapy, Part 1: Topical Therapy, Oral Antibiotics, Laser and Light Therapy, and Dietary Interventions. *Dermatol. Clin.* **2019**, *37*, 183–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Baldwin, H. Oral Antibiotic Treatment Options for Acne Vulgaris. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2020**, *13*, 26–32. [\[PubMed\]](#)
6. Tan, A.U.; Schlosser, B.J.; Paller, A.S. A Review of Diagnosis and Treatment of Acne in Adult Female Patients. *Int. J. Womens Dermatol.* **2017**, *4*, 56–71. [\[CrossRef\]](#)
7. Vasam, M.; Korutla, S.; Bohara, R.A. Acne Vulgaris: A Review of the Pathophysiology, Treatment, and Recent Nanotechnology Based Advances. *Biochem. Biophys. Rep.* **2023**, *36*, 101578. [\[CrossRef\]](#)
8. Dull, K.; Lenart, K.; Dajnoki, Z.; Poliska, S.; Uchiyama, E.; Hendrik, Z.; Szegedi, A.; Töröcsik, D. Barrier function-related genes and proteins have an altered expression in acne-involved skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2023**, *37*, 1415–1425. [\[CrossRef\]](#)
9. Audic, J.-L.; Chaufer, B.; Daufin, G. Non-Food Applications of Milk Components and Dairy Co-Products: A Review. *Lait* **2003**, *83*, 417–438. [\[CrossRef\]](#)
10. Luisa, B.G. *Handbook of Milk Composition*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995; ISBN 978-0-08-053311-7.
11. Kazimierska, K.; Kalinowska-Lis, U. Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology. *Molecules* **2021**, *26*, 3253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [\[CrossRef\]](#)

13. Gobbi, R.M. Pharmaceutical and Dermocosmetic Compositions Containing Equine Colostrum. U.S. Patent 5750149A, 12 May 1998.
14. Kwak, T.; Kim, K.; Kim, J.H.; Jung, M.G.; Seo, S.A.; Seo, H.R. A Cosmetic Composition of Fermented Colostrum Product for Anti-Acne. KR Patent No. 20190060556A, 3 June 2019.
15. Park, Y.; Haenlein, G.F.W.; Wendorff, W. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2017; ISBN 978-1-119-11027-9.
16. Kim, H.K.; Yeo, I.K.; Li, K.; Kim, B.J.; Kim, M.N.; Hong, C.K. Topical epidermal growth factor for the improvement of acne lesions: A randomized, double-blinded, placebo-controlled, split-face trial. *Int. J. Dermatol.* **2014**, *53*, 1031–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Stoddard, M.A.; Herrmann, J.; Moy, L.; Moy, R. Improvement of Atrophic Acne Scars in Skin of Color Using Topical Synthetic Epidermal Growth Factor (EGF) Serum: A Pilot Study. *J. Drug Dermatol.* **2017**, *16*, 322–326.
18. Kazimierska, K.; Erkiert-Polguj, A.; Kalinowska-Lis, U. The efficacy of a cosmetic preparation containing sheep colostrum on mature skin. *Appl. Sci.* **2024**, *under review*.
19. Del Rosso, J.Q.; Levin, J. The clinical relevance of maintaining the functional integrity of the stratum corneum in both healthy and disease-affected skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2011**, *4*, 22–42. [[PubMed](#)]
20. Yamamoto, A.; Takenouchi, K.; Ito, M. Impaired water barrier function in acne vulgaris. *Arch. Dermatol. Res.* **1995**, *287*, 214–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Mastrofrancesco, A.; Picardo, M.; Cardinali, G. Bovine Colostrum Induces the Differentiation of Human Primary Keratinocytes. *FASEB J.* **2020**, *34*, 6302–6321. [[CrossRef](#)]
22. Mueller, E.A.; Trapp, S.; Prentzel, A.; Kirch, W.; Brantl, V. Efficacy and Tolerability of Oral Lactoferrin Supplementation in Mild to Moderate Acne Vulgaris: An Exploratory Study. *Curr. Med. Res. Opin.* **2011**, *27*, 793–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Youn, S.-W.; Park, E.-S.; Lee, D.-H.; Huh, C.-H.; Park, K.-C. Does facial sebum excretion really affect development of acne? *Brit. J. Dermatol.* **2005**, *153*, 919–924. [[CrossRef](#)]
24. Choi, C.W.; Choi, J.W.; Park, K.C.; Youn, S.W. Facial sebum affects the development of acne, especially the distribution of inflammatory acne. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2013**, *27*, 301–306. [[CrossRef](#)]
25. Kim, J.; Ko, Y.; Park, Y.-K.; Kim, N.-I.; Ha, W.-K.; Cho, Y. Dietary Effect of Lactoferrin-Enriched Fermented Milk on Skin Surface Lipid and Clinical Improvement of Acne Vulgaris. *Nutrition* **2010**, *26*, 902–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kuhara, T.; Yamauchi, K.; Tamura, Y.; Okamura, H. Oral Administration of Lactoferrin Increases NK Cell Activity in Mice via Increased Production of IL-18 and Type 1 IFN in the Small Intestine. *J. Interferon Cytokine Res.* **2006**, *26*, 489–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wakabayashi, H.; Uchida, K.; Yamauchi, K.; Teraguchi, S.; Hayasawa, H.; Yamaguchi, H. Lactoferrin given in Food Facilitates Dermatophytosis Cure in Guinea Pig Models. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 595–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wakabayashi, H.; Kurokawa, M.; Shin, K.; Teraguchi, S.; Tamura, Y.; Shiraki, K. Oral Lactoferrin Prevents Body Weight Loss and Increases Cytokine Responses during Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 537–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chan, H.; Chan, G.; Santos, J.; Dee, K.; Co, J.K. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Efficacy and Safety of Lactoferrin with Vitamin E and Zinc as an Oral Therapy for Mild to Moderate Acne Vulgaris. *Int. J. Dermatol.* **2017**, *56*, 686–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Su, Y.; Cui, W.; Wei, H. Influence of Lactoferrin on Propionibacterium Acnes-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Dermatol. Ther.* **2020**, *33*, e14483. [[CrossRef](#)]
31. Poulin, Y.; Pouliot, Y.; Lamiot, E.; Aattouri, N.; Gauthier, S. Safety and Efficacy of a Milk-Derived Extract in the Treatment of Plaque Psoriasis: An Open-Label Study. *J. Cutan. Med. Surg.* **2006**, *9*, 271–275. [[CrossRef](#)]
32. Cosentino, C.; Elshafie, H.S.; Labella, C.; D'Adamo, C.; Pecora, G.; Musto, M.; Paolino, R.; Camele, I.; Freschi, P. Study on the Protective Effect of an Innovative Cow Milk-Based Product against Some Human Skin-Bacterial Pathogens. *J. Biol. Res.* **2018**, *91*. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Oświadczenie kandydata ubiegającego się o nadanie stopnia doktora



Załącznik nr 4  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 10.09.2024.....

Kinga Kazimierska - Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

**PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIwersYTETU\***

### OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Świadomy/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że prezentowana przeze mnie rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w żadnej wyższej uczelni, instytucie badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

10.09.2024 Kinga Kazimierska-Gęca  
(data i podpis Kandydata)

## Oświadczenia współautorów

P1



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 10.09.2024r

Kinga Kazimierska-Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

### OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup>: Kazimierska, Kinga, and Urszula Kalinowska-Lis. 2021. "Milk Proteins—Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology" *Molecules* 26, no. 11: 3253. <https://doi.org/10.3390/molecules26113253> przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Kinga Kazimierska	65%	współudział w przygotowaniu planu i koncepcji pracy, zebranie literatury naukowej, udział w przygotowaniu manuskryptu i jego finalnej korekcie	Kinga Kazimierska-Gęca
Urszula Kalinowska-Lis	35%	współudział w przygotowaniu planu i koncepcji badań, nadzór merytoryczny, udział w przygotowaniu manuskryptu, wykonanie finalnej korekty pracy, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego oraz rozwiązywanie problemów naukowych poruszanych przez recenzentów	Urszula Kalinowska-Lis

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

P2

Łódź, 10.09.2024r

Kinga Kazimierska-Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

## OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup> :Kinga Kazimierska, Ilona Szablowska-Gadomska, Stefan Rudziński, Katarzyna Kośla, Elżbieta Płuciennik, Łukasz Bobak, Aleksandra Zambrowicz, and Urszula Kalinowska-Lis. 2024. "Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care" *International Journal of Molecular Sciences* 25, no. 15: 8091. <https://doi.org/10.3390/ijms25158091>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Kinga Kazimierska	40%	przegląd literatury, udział w koncepcji badań, udział w części badawczej, opracowanie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu i jego finalnej korekcie	Kinga Kazimierska-Gęca
Urszula Kalinowska-Lis	20%	przygotowanie planu i koncepcji badań, nadzór merytoryczny, udział w przygotowaniu manuskryptu, wykonanie finalnej korekty pracy, pełnienie funkcji autora korespondencyjnego oraz rozwiązywanie problemów naukowych poruszanych przez recenzentów	Urszula Kalinowska-Lis

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

P2



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, .....

Kinga Kazimierska - Gęca  
(Imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

**OŚWIADCZENIE**

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup>:

Kazimierska K, Szablowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośla K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. *Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(15):8091.*

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
dr n. med. inż. Iłona Szablowska-Gadomska	12%	Przygotowanie metodologii badań; przeprowadzenie doświadczeń; analiza i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu	Iłona Szablowska-Gadomska
mgr Stefan Rudziński	8%	Przeprowadzenie doświadczeń; analiza i interpretacja wyników; wizualizacja wyników	Stefan Rudziński

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

P2



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 09.04.2024

Kinga Kazimierska - Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

**OŚWIADCZENIE**

**Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>**

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup>:

*Kazimierska K, Szablowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośla K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(15):8091.*

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
dr n.med. Katarzyna Kośla	5	przeprowadzenie części badań, napisanie części artykułu	<i>Katarzyna Kośla</i>
dr hab. n.med. Elżbieta Płuciennik	5	ustalenie metodyki badań, napisanie części artykułu	<i>Elżbieta Płuciennik</i>

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

P2



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 05 września 2024

Kinga Kazimierska - Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

**OŚWIADCZENIE**

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup>:

*Kazimierska K, Szablowska-Gadomska I, Rudziński S, Kośła K, Płuciennik E, Bobak Ł, Zambrowicz A, Kalinowska-Lis U. Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(15):8091. przedstawia się jak poniżej:*

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
dr Ilona Szablowska-Gadomska			
mgr Stefan Rudziński			
dr n.med. Katarzyna Kośła			
dr hab. n.med. Elżbieta Płuciennik			
dr inż. Łukasz Bobak	5%	Przygotowanie estrów metylowych; analizy chromatograficzne	
dr hab. inż. Aleksandra Zambrowicz	5%	Określenie podstawowego składu chemicznego; suszenie sublimacyjne	
dr hab. n.farm. Urszula Kalinowska - Lis			

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony



P3



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, .10.09.2024r

Kinga Kazimierska-Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

### OŚWIADCZENIE

#### Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup> :

Kazimierska, Kinga, Anna Erkiert-Polguj, and Urszula Kalinowska-Lis. 2024. "The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study" *Applied Sciences* 14, no. 7: 2862.

<https://doi.org/10.3390/app14072862>

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Kinga Kazimierska	40%	przegląd literatury, udział w koncepcji badań, udział w części badawczej, opracowanie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu	Kinga Kazimierska-Gęca
Anna Erkiert-Polguj	30%	metodologia badań, przeprowadzenie badań, analiza i interpretacja wyników, opracowanie części manuskryptu, wykonanie finalnej korekty pracy	Anna Erkiert-Polguj
Urszula Kalinowska-Lis	30%	przygotowanie planu i koncepcji badań, nadzór merytoryczny, udział w przygotowaniu manuskryptu, wizualizacja wyników, wykonanie finalnej korekty pracy	Urszula Kalinowska-Lis

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

P4



Załącznik nr 7  
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora  
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 10.09.2024r

Kinga Kazimierska-Gęca  
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ  
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU\*

#### OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii<sup>1</sup>

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy<sup>2</sup> Anna Erkiert-Polguj,, Kinga Kazimierska, and Urszula Kalinowska-Lis. 2024. "Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin" *Applied Sciences* 14, no. 5: 2199. <https://doi.org/10.3390/app14052199> przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Anna Erkiert-Polguj	45%	udział w koncepcji badań, metodologia badań, przeprowadzenie badań, analiza i interpretacja wyników, opracowanie części manuskryptu, wykonanie finalnej korekty pracy	Anna Erkiert-Polguj
Kinga Kazimierska	25%	przegląd literatury, udział w opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptu	Kinga Kazimierska-Gęca
Urszula Kalinowska-Lis	30%	przygotowanie planu i koncepcji badań, nadzór merytoryczny, udział w przygotowaniu manuskryptu, wizualizacja wyników, wykonanie finalnej korekty pracy	Urszula Kalinowska-Lis

<sup>1</sup> W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

<sup>2</sup> Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

## Całkowity dorobek naukowy



Łódź, 04-09-2024

JM01.545.154.2024

### Spis publikacji – mgr inż. Kinga Kazimierska

Punktacja została wykonana na podstawie spisu publikacji przedstawionego przez osobę zainteresowaną, przy użyciu list Impact Factor i ministerialnych za rok publikacji artykułu.

łącznie 26 cytowań (24 bez autocytowań), indeks Hirscha wynosi 1 (Źródło: ISI Web of Science Core Collection).

łącznie 35 cytowań (31 bez autocytowań), indeks Hirscha wynosi 1 (Źródło: Scopus).

### 1. Punktacja wg list ministerialnych oraz współczynnik impact factor prac umieszczonych w dysertacji:

Prace	Oznaczenie autorstwa	Impact Factor	Punkty ministerialne	Typ publikacji
Erkiert-Polguj Anna, Kazimierska Kinga, Kalinowska-Lis Urszula: Assessment of the Impact of a Cosmetic Product with Sheep Colostrum on Acne Skin, Applied Sciences-Basel, MDPI, vol. 14, nr 5, 2024, Numer artykułu: 2199, s. 1-9, DOI:10.3390/app14052199		2,5	100	oryginal
Kazimierska Kinga, Szablowska-Gadomska Ilona, Rudziński Stefan, Kośla Katarzyna, Płuciennik Elżbieta, Bobak Łukasz, Zambrowicz Aleksandra, Kalinowska-Lis Urszula: Biologically Active Sheep Colostrum for Topical Treatment and Skin Care, International Journal of Molecular Sciences, MDPI, vol. 25, nr 15, 2024, Numer artykułu: 8091, s. 1-21, DOI:10.3390/ijms25158091	pierwszy	4,9	140	oryginal
Kazimierska Kinga, Erkiert-Polguj Anna, Kalinowska-Lis Urszula: The Efficacy of a Cosmetic Preparation Containing Sheep Colostrum on Mature Skin: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study, Applied Sciences-Basel, MDPI, vol. 14, nr 7, 2024, Numer artykułu: 2862, s. 1-13, DOI:10.3390/app14072862	pierwszy	2,5	100	oryginal

Kazimierska Kinga, Kalinowska-Lis Urszula Anna: Milk Proteins - Their Biological Activities and Use in Cosmetics and Dermatology, Molecules, MDPI, vol. 26, nr 11, 2021, Numer artykułu: 3253, s. 1-22, DOI:10.3390/molecules26113253	pierwszy	4,927	140	pogląd
<b>SUMA</b>		<b>14,827</b>	<b>480</b>	

mgr Monika Błaszczyk  
 Oddział Bibliografii i Bibliometrii  
 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
 punktacja@umed.lodz.pl

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI  
 Centrum Informacyjno-Biblioteczne  
 Oddział Bibliografii i Bibliometrii  
 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 2  
 tel. 42 272-54-21, 272-54-22  
 e-mail: punktacja@umed.lodz.pl

*Błaszczyk Monika*

