

Zastosowanie modeli sztucznej skóry do badań kosmetyków innowacyjnych

Anna OLEJNIK, Joanna GOŚCIAŃSKA, Izabela NOWAK - Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Poznań

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 2, 76-81

Wstęp

Innowacyjne preparaty kosmetyczne wdrażane przez przemysł kosmetyczny są testowane pod kątem określenia działania drażniącego, fototoksycznego i genotoksycznego ich poszczególnych składników za pomocą badań *in vitro* oraz *in vivo*. Ocena działania kosmetyków metodą *in vitro* jest bardzo przydatnym, wręcz niezbędnym narzędziem w procesie tworzenia produktów najwyższej jakości. Są to badania bardzo kosztowne oraz długotrwałe i nie od razu przynoszą producentowi oczekiwane rezultaty.

Skóra człowieka jest najlepszym modelem stosowanym w testach *in vitro* [1]. Tkanki ludzkiej skóry mogą być pozyskiwane podczas sekcji zwłok, biopsji lub operacji plastycznych. Jednakże jest wiele prawnych i etycznych ograniczeń, regulujących wykorzystanie skóry człowieka w badaniach toksyczności produktów kosmetycznych. Unia Europejska zakazała czerpania korzyści finansowych wynikających ze stosowania ludzkich tkanek w testach *in vitro* czyniąc je mało powszechnymi. Dotychczas alternatywnym rozwiązaniem, które pozwalało zastąpić skórę człowieka, było zastosowanie skóry zwierzęcej (np. królika, myszy, szczura). Biorąc pod uwagę skuteczność i wiarygodność testów na zwierzętach, pozwalających na odróżnianie substancji drażniących od niedrażniących zawartych w preparatach kosmetycznych, najbardziej precyzyjnymi okazały się testy Dreize'a wykonywane na skórze królików albinosów [2]. Od połowy lat osiemdziesiątych XX w., rozpoczęto dążenie do stopniowego zmniejszania liczby testów przeprowadzanych na zwierzętach, co było przełomowym momentem dla Europy. Takie działanie było efektem nacisków ze strony grup zajmujących się opieką nad zwierzętami, opinii publicznej oraz debat etycznych. W 1986 r. dyrektywa UE dotycząca ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych (Dyrektywa 86/609/EEC) zakazała przeprowadzania testów na zwierzętach, gdy zatwierdzone zostaną inne metody alternatywne.

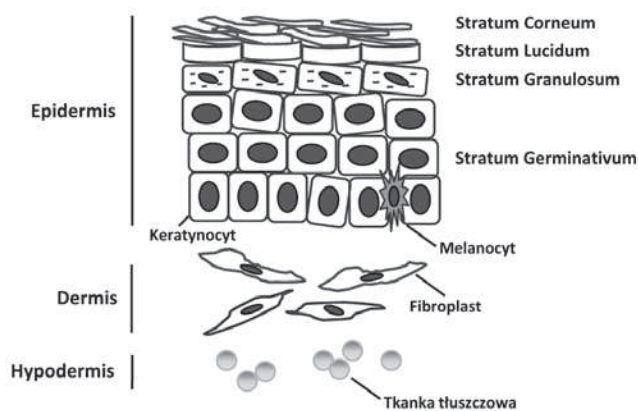
Zgodnie z 7. poprawką do Dyrektywy Kosmetycznej Unii Europejskiej (Dyrektywa 76/768/EEC), od 2009 r. obowiązuje całkowity zakaz testowania na zwierzętach składników preparatów kosmetycznych dla oznaczenia ich potencjalnego działania na zdrowie człowieka [2].

Zatem przemysł kosmetyczny stał się pionierem w ograniczaniu liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach bezpieczeństwa substancji chemicznych i przyczynił się do rozwoju metod alternatywnych, które mogą być stosowane zarówno w laboratoriach naukowych jak i przemysłowych [3].

W ostatnich latach opracowano wiele różnych modeli sztucznej skóry, które obecnie są dostępne komercyjnie [1]. Muszą one naśladować właściwości skóry w możliwie jak największym stopniu. Z punktu widzenia prawa, substytuty skóry mogą być stosowane w testach *in vitro*, jeśli są zwalidowane, co oznacza, że powinny być skuteczne, wiarygodne i opracowane zgodnie z międzynarodowo uznanymi procedurami. Jeśli modele sztucznej skóry wykorzystywane są w celu zbadania potencjalnego działania drażniącego substancji chemicznych zawartych w preparatach kosmetycznych, muszą zachowywać funkcje fizjologiczne skóry [2].

Skóra człowieka składa się z trzech podstawowych warstw: naskórka (epidermis), skóry właściwej (dermis) i tkanki podskórnej (rys. 1). Struktura skóry człowieka w obrębie naskórka i skóry

właściwej, które zasadniczo różnią się grubością, wytrzymałością oraz elastycznością warunkuje ich wyspecjalizowane funkcje [4]. Dwie funkcje skóry człowieka są szczególnie ważne: zapobieganie wysuszeniu oraz ochrona przed szkodliwym wpływem środowiska zewnętrznego, np. bakteriami, związkami chemicznymi, czy promieniowaniem ultrafioletowym. Modele sztucznej skóry, które są obecnie intensywnie badane na całym świecie, powinny zachowywać funkcje barierowe i wykazywać te same reakcje względem zagrożeń środowiskowych, co naturalna skóra człowieka.



Rys. 1. Budowa skóry [4]

Dotychczas najbardziej wartościowymi modelami substytutów skóry stosowanymi do oceny działania uczulającego na skórę różnych substancji chemicznych, okazały się metody wykorzystujące hodowle komórkowe i modele tkankowe: EpiSkin[®], EpiDerm[®] oraz SkinEthic[®], które zyskały akceptację Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM). Naskórek stworzony w warunkach *in vitro* zachowuje wszystkie funkcje ochronne, a profil lipidowy tych modeli jest niemal identyczny z profilem w warunkach *in vivo*.

Głównym celem artykułu jest przegląd dostępnych na rynku modeli substytutów skóry (EpiSkin[®], EpiDerm[®], SkinEthic[®], EpiDermFT[®]) pod kątem ich struktury, budowy warstwy lipidowej oraz zastosowań.

Modele sztucznej skóry

Modele naskórka, skóry właściwej i pełnej grubości ekwiwalenty skóry dają możliwość poznania procesów zachodzących w skórze. Powinny one spełniać następujące kryteria:

- muszą być zbudowane z funkcjonalnej warstwy rogowej zawierającej lipidy, z położoną poniżej warstwą żywych komórek
- żywotność komórek w modelu powinna być na tyle duża, aby pozwolić na dobre rozróżnienie kontrolnych substancji dających wyniki pozytywne i negatywne
- wyniki badań uzyskane przy zastosowaniu danego modelu powinny być powtarzalne dla szerokiego zakresu różnych rodzajów substancji chemicznych w określonych warunkach doświadczalnych.

Modele ludzkiego naskórka

- EpiSkin[®]
Prace nad modelem naskórka zostały zapoczątkowane przez E. Tinoisa w latach 80. ub.w. Obecnie EpiSkin[®] jest wytwarzany

w laboratorium inżynierii tkanek w Lyonie, a komercjalizacją produktu zajmuje się spółka zależna Grupy L'Oréal, znana dzięki swym badaniom nad rekonstrukcją naskórka i błon śluzowych [5]. Model EpiSkin® jest dostępny nie tylko dla świata naukowego, ale również dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i chemicznego.

EpiSkin® jest substytutem naskórka, ponieważ składa się z warstwy podstawnej, kolczystej, ziarnistej oraz rogowej. Stanowi on jednak uproszczony model, gdyż warstwa rogowa jest grubsza i bardziej przepuszczalna w porównaniu z jego naturalnym odpowiednikiem [6].

Przygotowanie modelu naskórka EpiSkin® polega na pokryciu dna naczynia hodowlanego mieszaniną liofilizowanych kolagenów I i III, mających za zadanie imitować skórę właściwą. Następnie kolejno nakłada się kolagen IV, który ma stanowić substytut błony podstawnej oraz wysiewa się keratynocyty. Hodowlę prowadzi się aż do uzyskania ciągłej warstwy komórek wypełniających dno naczynia. W celu indukowania dalszych podziałów i różnicowania komórek, hodowlę umieszcza się na granicy faz: pożywka (która zawiera wyższe stężenie jonów wapnia) – powietrze. Przeprowadzone dotychczas eksperymenty wykazały, że po ok. 7-10 dniach otrzymuje się wysoko zorganizowaną strukturę imitującą żywy naskórek, zbudowany z kolagenu typu IV i VII, integryny, lamininy oraz hemidesmosomów [7, 8]. Badania potwierdziły również obecność w modelu EpiSkin®, takich samych lipidów, jak w naskórku fizjologicznym (m.in. fosfolipidów, ceramidów, glukosfingolipidów, cholesterolu). Jednakże skład lipidów w przypadku substytutu naskórka charakteryzuje się wyższą zawartością dwu- i trójglicerydów oraz ceramidów [1]. Dodatkowo są one nierównomiernie rozłożone, co ma wpływ na poziom penetracji i absorpcji.

• EpiDerm®

Model naskórka EpiDerm® został po raz pierwszy opisany przez grupę badawczą Cannona w 1994 r. [9]. Produkowany jest przez firmę MatTek Corporation mającą swoją siedzibę w Ashland w stanie Massachusetts w Stanach Zjednoczonych. EpiDerm® wykorzystywany jest w laboratoriach takich firm jak: Clairol, Johnson&Johnson, Procter&Gamble, Revlon, Unilever czy Dr Eris.

Model naskórka EpiDerm® ma trójwymiarową strukturę zbliżoną do EpiSkin®, zbudowaną z 8-12 warstw komórek imitujących warstwę podstawną, kolczystą, ziarnistą oraz rogową. Hodowla modelu naskórka EpiDerm® przebiega podobnie jak EpiSkin®, jednakże komórki nie są wysiewane na błonę kolagenową, lecz na nylonową siatkę pokrytą kolagenem. EpiDerm® zawiera wszystkie najważniejsze klasy lipidów w ilościach zbliżonych do występujących w naturalnych odpowiednikach. Badania wykazały wyższą zawartość glukozyloceramidów i niższy poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych w odniesieniu do naskórka ludzkiego [1]. Dodatkowo dowiedziono, że po około 14 dniach hodowli substytutu naskórka, warstwa rogowa staje się grubsza niż w naturalnym naskórku, co naukowcy powiązali z brakiem możliwości złuszczenia się keratocytów [10, 11].

• SkinEthic®

Firma Societe SkinEthic Laboratories założona przez Martina Rosdy w 1992 r. powstała z myślą o opracowaniu ekwiwalentu sztucznej skóry [1]. Opracowany przez nią SkinEthic® to naskórek zrekonstruowany na bazie ludzkich keratynocytów, posiadający trójwymiarową budowę. Struktura naskórka jest bardzo zbliżona do naturalnego odpowiednika i składa się z warstwy zrogowaciałej (*stratum corneum*), warstwy ziarnistej (*stratum granulosum*), warstwy kolczystej (*stratum spinosum*). Badania z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego wykazały obecność dobrze wykształconych hemidesmosomów. Mimo dużego podobieństwa modelu SkinEthic® do fizjologicznego naskórka, zidentyfikowano kropelki lipidowe we wszystkich warstwach modelu, których nie obserwuje się w naturalnej epidermie. Największe stężenie kropelek lipidowych wykryto w warstwie podstawnej (*stratum basale*). Warstwa zrogowaciała modelu SkinEthic® jest zdecydowanie grubsza niż w naturalnym naskórku [1].

Pełnej grubości substytuty skóry

Dostępne komercyjnie pełnej grubości substytuty skóry charakteryzują się złożoną strukturą zbudowaną z odpowiednika skóry właściwej wraz z fibroblastami, błony podstawnej oraz odpowiednika naskórka zawierającego keratynocyty.

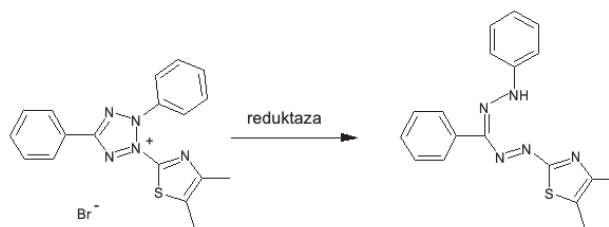
Najbardziej dostępnym substytutem skóry jest EpiDermFT® produkowany przez firmę MatTek Corporation. Zbudowany jest z odpowiednio zróżnicowanego naskórka zawierającego wszystkie warstwy. W EpiDermFT® w dobrze wykształconej błonie podstawnej i skórze właściwej wykryto obecność żywych fibroblastów [6]. Liczne badania wykazały, że podobnie jak w odpowiednikach naskórka, w warstwie nabłonkowej obecne są wszystkie markery różnicowania keratynocytów. Dodatkowo zaobserwowano, że zawartość i profil lipidów budujących warstwę rogową jest zbliżony do spotykanego *in vivo*. Na uwagę zasługuje fakt, że zachodzą interakcje pomiędzy naskórkiem a skórą właściwą, które mają znaczący wpływ na procesy zachodzące w skórze [6].

Zaletą modelu EpiDermFT® jest możliwość przechowywania go w warunkach laboratoryjnych przez 28 dni, co pozwala na wielokrotną aplikację badanej formułacji kosmetycznej w takich odstępach czasowych, jak podczas stosowania danego produktu. Należy jednak pamiętać, że, podobnie jak w przypadku modeli naskórka, warstwa rogowa nie ulega złuszczeniu i staje się grubsza. Ma to wpływ na wyniki badań przenikalności związków chemicznych i nie odzwierciedla w pełni warunków *in vivo*.

Zastosowanie modeli sztucznej skóry

Ocena działania drażniącego na skórę

W badaniach oceny właściwości drażniących substancji chemicznych obecnych w kosmetyku wykorzystuje się wyżej opisane modele 3D zrekonstruowanego ludzkiego naskórka typu EpiSkin®, EpiDerm®, SkinEthic®. Dla określenia własności cytotoksycznych składników danego preparatu przeprowadza się ilościowy test kolorymetryczny MTT, który polega na redukcji soli tetrazoliowej przez komórki aktywne metabolicznie. W pierwszym etapie testowany produkt należy nałożyć na model naskórka tak, aby równomiernie pokrywał jego powierzchnię (minimalna ilość 25 mg/cm²). W zależności od użytego modelu zrekonstruowanego naskórka czas ekspozycji może trwać od 10 min. do 6 dni, przy zachowaniu temperatury inkubacji 37°C. W celu pomiarów żywotności komórek stosuje się najczęściej test badania redukcji MTT, który pozwala na otrzymanie dokładnych i powtarzalnych wyników. Inkubowaną uprzednio próbkę skóry umieszcza się w roztworze MTT o stężeniu 0,3-1 mg/ml w temperaturze 20-28°C. Tkanka reaguje z MTT i w wyniku działania reduktazy powstaje sól formazonu o barwie fioletowej.



Po trzech godzinach przeprowadza się ekstrakcję wytrąconego fioletowego produktu przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika, np. izopropanolu, i oznacza stężenie formazanu poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali wynoszącej od 545-595 nm. Brak fioletowego zabarwienia w próbkach świadczy o zmniejszonej żywotności komórek [12].

Testy fototoksyczności

Testy te wykonywane są w celu ustalenia potencjalnej fototoksyczności badanego produktu kosmetycznego po aplikacji na modele

sztucznego naskórka. Preparat kosmetyczny umieszcza się w sześciu próbkach zrekonstruowanego naskórka (wielkość 0,5 cm²). Następnie, przygotowane w ten sposób hodowle komórkowe inkubuje się w temperaturze 37°C przez 24 h, po czym trzy tkanki poddaje się działaniu promieniowania UVA (6 J/cm²), a pozostałe trzy przechowuje się w ciemni w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie testowany produkt jest wymywany, a hodowle komórkowe są ponownie inkubowane przez 24 h. w temp. 37°C. Po tych operacjach zostaje określona żywotność i histologia napromieniowanych i nie-napromieniowanych tkanek. Modele sztucznego naskórka powinny być zdolne do odróżnienia fototoksycznych i niefototoksycznych związków [13, 14].

Testy przenikalności substancji

Testy przeprowadzane są w celu określenia wnikania produktu kosmetycznego przez odpowiedni model naskórka. Produkt kosmetyczny jest aplikowany na dwóch próbkach zwierających substytut skóry. Równocześnie eksperyment przeprowadzany jest na ślepej próbie. Medium umieszczone u podstawy tkanek jest pobierane do dalszej analizy w następujących odstępach czasowych – po 1, 2, 3, 6 i 24 h. Po upływie doby jedna tkanka poddawana jest badaniom histologicznym, a druga pomiarom żywotności komórek. Ilość substancji, która przeniknęła przez model naskórka, jest mierzona w funkcji czasu [15].

Podsumowanie

Badania *in vitro* z zastosowaniem modeli sztucznej skóry są dla światowych koncernów kosmetycznych, dbających o swoją renomę oraz zadowolenie klienta, sprawą priorytetową. Stąd też znajomość preparatyki, morfologii oraz właściwości komercyjnie dostępnych substytutów skóry jest obecnie niezbędna.

Literatura

1. Netzlaff F., Lehr C.-M., Wertz P.W., Schaefer U. F.: *The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005, **60**, 167-178.
2. Gibbs S.: *In vitro Irritation Models and Immune Reactions*. Skin Pharmacology and Physiology 2009, **22**, 103-113.
3. Bazela K.: *Alternative methods and safety assessment of cosmetic products and cosmetic ingredients*. Cosmetics 2009, **3**, 2, 53-56.
4. Brohem C. A., da Silva Cardeal L. B., Tiago C., Soengas M. S., de Moraes Barros S. B., Maria-Engler S. S.: *Artificial skin in perspective: concept and applications*. Pigment Cell Melanoma Research, 2010, DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x.
5. ICCVAM: Evaluation of EPISKIN™, EPIDERM™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In Vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. 2002, NIH Publication No. 02-4502.
6. Gójniczek K., Garnarczyk A., Pytel A.: *Hodowle komórek in vitro w kosmologii*. Wiadomości Lekarskie 2005, **LVIII**, 1-2.
7. Roguet R., Cohen C., Lecraire J., Tessonnaud J., Gagne C., Teissier M.H.: *Use of standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics*. International Journal of Cosmetic Science 2000, **22**, 409-419.
8. Robles C., Courtellemint P., Tolle M., Guillot J.P., Duteil X.P.: *An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy*. Toxicology in Vitro 1998, **12**, 295-304.
9. Cannon C. L., Neal P. J., Southee J. A., Kubilus J., Klausner M.: *New epidermal model for dermal irritancy testing*. Toxicology In Vitro 1994, **8**, 4, 889-891.
10. Schlotmann K., Kaeten M., Black A.F., Damour O., Waldmann-Laue M., Förster H.: *Cosmetic efficacy claims in vitro using a three-dimensional human skin model*. International Journal of Cosmetic Science 2000, **23**, 309-318.

11. Ponc M., Kempenaar J., Werheim A.: *Lack of desquamation-the Achilles heel of the reconstructed epidermis*. International Journal of Cosmetic Science 2002, **24**, 263-272.
12. Kandarová H., Hayden P., Klausner M., Kubilus J., Sheasgreen J.: *An in vitro skin Test (SIT) using the EpiDerm reconstructed human epiderma (RHE) model*. Journal of Visualized Experiments 2009.
13. Medina J., Elsaesser C., Picarles V., Grenet O., Kolopp M., Chibout S., and de Fraissinette A.: *Assessment of the phototoxic potential of compounds and finished topical products using a human reconstructed epidermis*. In Vitro & Molecular Toxicology 2001, **14**, 3, 157-168.
14. Bernard F-X., Barrault C., Deguercy A., De Wever B., Rosdy M.: *Development of a highly sensitive in vitro phototoxicity assay using the SkinEthic reconstructed human epidermis*. BIOalternatives, Gençay, France. SkinEthic Laboratories, Nice, France. Cell Biology and Toxicology 2000, **16**, 6, 391-400.
15. Garcia N., Doucet O., Bayer M., Fouchard D., Zastrow L. and Marty J. P.: *Characterization of the barrier function in a reconstructed human epidermis cultivated in chemically defined medium*. International Journal of Cosmetic Science 2002, **24**, 25-34.

Mgr Anna OLEJNIK jest doktorantką w Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra chemii uzyskała w 2008 r., a w 2009 r. ukończyła studia w zakresie chemii kosmetycznej na tej samej uczelni. W pracy badawczej zajmuje się oznaczaniem niskocząsteczkowych peptydów w formułacjach kosmetycznych oraz badaniem ich przenikania przez błony syntetyczne. Jest współautorką 2. publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, 6. artykułów w recenzowanych wydawnictwach zbiorowych oraz 6. prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Dr Joanna GOŚCIAŃSKA jest adiunktem w Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień magistra uzyskała w 2005 r., a tytuł doktora w 2009 r. na Wydziale Chemii UAM. Jej tematyka badawcza koncentruje się wokół syntezy, modyfikacji i charakterystyki mezoporowatych sit molekularnych i tlenków metali. Dodatkowo zajmuje się analitycznymi metodami badania preparatów kosmetycznych. Jest współautorką 12. publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, 8. artykułów w recenzowanych wydawnictwach zbiorowych oraz 24. prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Prof. UAM dr hab. Izabela NOWAK jest profesorem nadzwyczajnym i kierownikiem Pracowni Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu. W ramach stypendium TEMPUS przebywała w latach 1992-1993 na Uniwersytecie w Reading, U.K., gdzie napisała pracę magisterską. W 1993 r. otrzymała tytuł magistra chemii, zaś w 1997 r. stopień naukowy doktora w zakresie chemii. Odbyła także staż podoktorski w Leverhulme Centre for Catalysis w Liverpool. W 2006 r. otrzymała stopień naukowy doktora habilitowanego za badania nad syntezą, charakterystyką i katalitycznymi właściwościami nanoporowatych materiałów w procesach utleniania w fazie ciekłej. Jej obecne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy i modyfikacji uporządkowanych materiałów, ich właściwościach teksturalnych/strukturalnych/powierzchniowych/kwasowo-zasadowych/redoks, heterogenicznie katalizowanych syntezach wysokowartościowych chemikaliów oraz nowoczesnych strategiach syntez dla celów kosmetycznych. Jest współautorem ponad 80. prac naukowych, 3. patentów i przedstawiła ponad 140. prezentacji na sympozjach i konferencjach naukowych.