

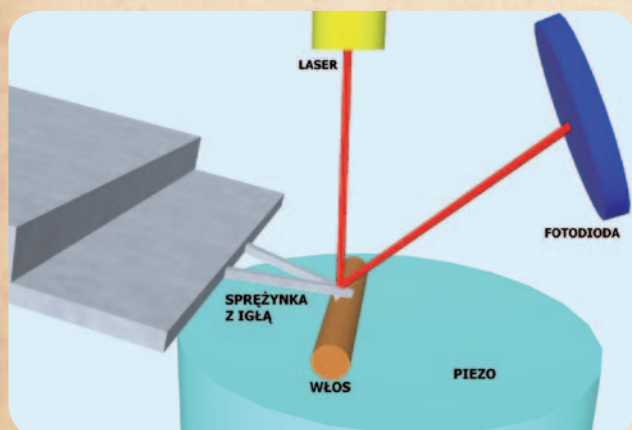
ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII SIŁ ATOMOWYCH we współczesnej kosmetologii

Bożena Tyszczyk

Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris

W ostatnich latach obserwuje się ogromny wzrost zainteresowania praktycznym wykorzystaniem w przemyśle kosmetycznym wielu najnowszych technik pomiarowych, które umożliwiają weryfikację skuteczności działania zarówno surowców, jak i gotowych formułacji kosmetycznych. Współczesny konsument oczekuje bowiem nie tylko zapewnień o korzystnym wpływie oferowanych przez producentów kosmetyków na jego urodę, ale także szuka potwierdzenia tych zapewnień w badaniach naukowych. Taka sytuacja wpływa na zacieśnienie współpracy pomiędzy jednostkami naukowymi, a partnerami przemysłowymi i owocuje pojawianiem się coraz to nowych metod pomiarowych o ogromnym potencjale do wykorzystania w kosmetologii.

Jedną z najnowszych technik wykorzystywanych obecnie w potwierdzaniu skuteczności działania produktów kosmetycznych jest Mikroskopia Sił Atomowych (AFM, ang. Atomic Force Microscopy). AFM jest przedstawicielem klasy mikroskopów skaningowych, skanujących powierzchnię próbki za pomocą sondy (Rysunek 1) [1]. Sonda ta ma postać ostrza umocowanego na płaskiej sprężynie (tzw. mikrobelle). Ostrze sondy przemieszczając się po powierzchni próbki powoduje zmiany położenia sprężynki i jej odkształcenia. Każde ugięcie się sprężynki jest rejestrowane przez układ optyczny, a następnie wynik tego pomiaru jest przetwarzany na sygnał napięciowy. Obraz topografii powierzchni próbki uzyskuje się poprzez mapowanie wartości wydłużenia przetwornika w każdym punkcie położenia sondy na próbce. Dodatkowo rejestrowane jest każde nawet niewielkie ugięcie sprężynki, co pozwala na wygenerowanie obrazu topograficznego próbki w bardzo wysokiej rozdzielczości.



Rys. 1. Schemat budowy mikroskopu sił atomowych (AFM).

Mikroskop AFM może pracować w trzech trybach: kontaktowym, bezkontaktowym oraz trybie kontaktu przerywanego. Tryb oddziaływania sondy z próbką, w którym oddziaływanie to jest bezpośrednie nazywane jest trybem kontaktowym. W czasie skanowania powierzchni próbki możliwe jest jednocześnie zbieranie różnego typu informacji, takich jak: topografia próbki, ugięcie sprężynki czy tarcie między ostrzem sondy, a próbką. Tryb

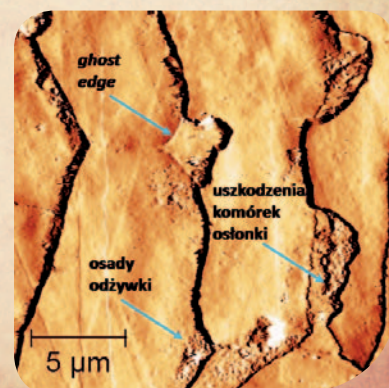
kontaktu przerywanego i tryb bezkontaktowy stosowane są wówczas, gdy bezpośredni kontakt sondy z próbką mógłby prowadzić do jej uszkodzenia (próbki o małej twardości).

Zaletą AFM w dziedzinie badań biomedycznych jest możliwość prowadzenia badań w cieczach i temperaturze fizjologicznej [1].

Mikroskopia AFM w badaniu kondycji łodyg włosowych

Jednym z przykładów zastosowania AFM w kosmetologii jest badanie zmian w morfologii łodyg włosowych, zachodzących pod wpływem stosowania produktu kondycjonującego. Do badania wykorzystano próbki włosów zebrane przez wyselekcjonowanych probantów o włosach zniszczonych w wyniku zabiegów fryzjerskich i pielęgnacyjnych. Ostonka włosa, jako warstwa najbardziej zewnętrzna łodygi włosa jest najbardziej narażona na tego typu zniszczenia. Próbkę do analizy pobrano przed zastosowaniem produktu kosmetycznego oraz po jednokrotnym zastosowaniu odżywki do włosów zniszczonych.

Badania nad zmianami w kondycji łodyg włosowych prowadzono dwoma technikami - skaningową mikroskopią elektronową (Scanning Electron Microscopy - SEM) i opisaną powyżej mikroskopią sił atomowych (AFM). Skaningowa mikroskopia elektronowa umożliwia jedynie wizualną obserwację zmian zachodzących w morfologii analizowanych próbek. Jest to technika makroskopowa, która nie daje wyników ilościowych o zachodzących w badanym materiale zmianach. Z tego powodu zastosowano technikę uzupełniającą - AFM. Jest to technika niezwykle precyzyjna pozwalająca na uzyskanie wyników w skali nano (rysunek 2).



Rys. 2. Morfologia komórek ostonki włosa w mikroskopie sił atomowych po zastosowaniu odżywki do włosów

W trakcie badania możliwe było zgromadzenie takich danych jak: chropowatość, tarcie na powierzchni otoczki włosa oraz na jej krawędziach (potocznie zwanych łuskami) oraz ich wysokości (czyli stopnia odstawania od powierzchni łodygi włosa).

Chropowatość

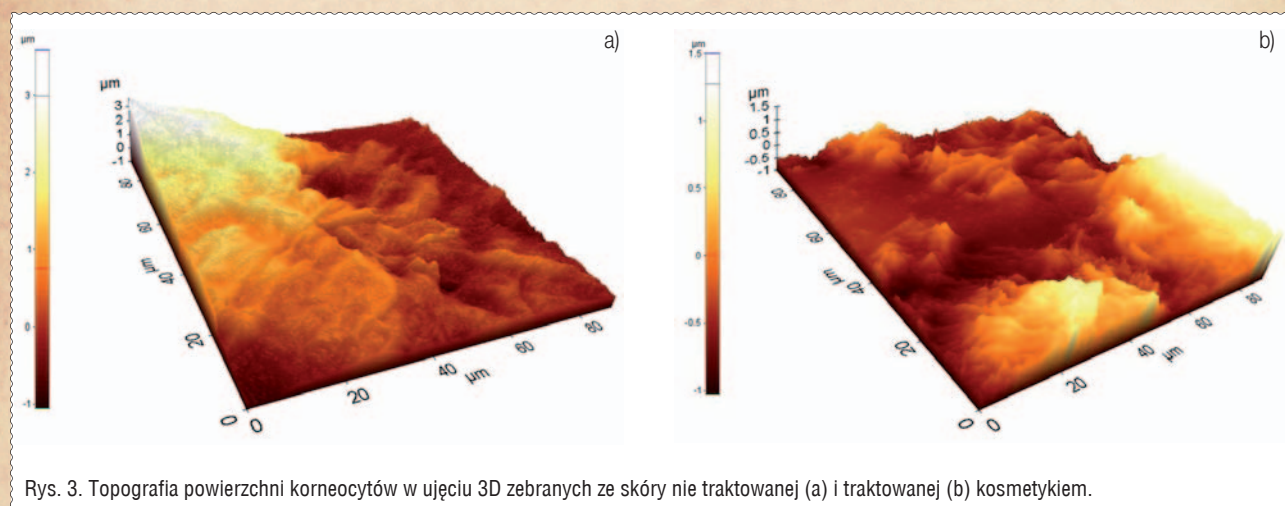
W celu wyznaczenia średniej chropowatości dla każdej próbki wyznaczono obraz topografii, gdzie każdemu punktowi przypisano konkretną wysokość. Za średnią chropowatość włosa uznano różnicę pomiędzy średnią wysokością uzyskanego obrazu, a wysokością w danym punkcie. Obraz zeskanowanej powierzchni włosa wykazał obecność cząsteczek kosmetyku na powierzchni otoczek włosów. W skali nano pojawienie się takich depozytów skutkuje wzrostem pośladowania powierzchni, a co za tym idzie - wzrostem jej chropowatości. Obserwacja ta jest zgodna z dotychczasowymi badaniami tego parametru [2,3]. Cząstki kosmetyku skupiały się głównie w zagłębieniach otoczki włosa - u podstawy i pomiędzy warstwami komórek otoczek włosów. Uzupełniały one ubytki powstałe m.in. w wyniku procesów termicznych (suszenie, prostowanie), chemicznych (farbowanie, rozjaśnianie) i mechanicznych (modelowanie, czesanie) towarzyszących codziennej pielęgnacji włosów.

Podobnie jak w przypadku trucia na powierzchni otoczek również na ich krawędziach wartości tarcia wzrastały po zastosowaniu odżywki. Potwierdza to tworzenie się depozytów odżywki u podstaw warstw otoczek.

Wysokość komórek osłonki analizowano za pomocą przekrojów obrazu ich topografii. Mierzono wysokość od podstawy komórek po ich krawędzie. Stwierdzono, iż po zastosowaniu kosmetyku pielęgnacyjnego wzrastała wysokość łusek włosa. Pomiary wykonano w wodzie dejonizowanej. Powierzchnia włosa ma ładunek ujemny, zaś osadzająca się na nich odżywka - dodatni. Pod wpływem wody jej polarne cząsteczki otaczają i penetrują w miejscu gdzie skupia się hydrofilowy produkt kosmetyczny. Odchylanie się komórek osłonek włosa może zachodzić także pod wpływem naprężeń mechanicznych powstałych na skutek różnic w zawartości wody w poszczególnych obszarach osłonek włosa.

Mikroskopia AFM w badaniu komórek naskórka *ex vivo*

Innym przykładem wykorzystania mikroskopii sił atomowych w kosmetologii może być analiza komórek warstwy rogowej naskórka (korneocytów) w teście *ex vivo*. Technika mikroskopii sił atomowych stosuje się do oceny różnic w topografii, elastyczności oraz siły adhezji korneocytów.



Rys. 3. Topografia powierzchni korneocytów w ujęciu 3D zebranych ze skóry nie traktowanej (a) i traktowanej (b) kosmetykiem.

Tarcie

Do oceny tarcia mierzonego na powierzchni osłonek wykorzystano pomiar napięcia uzyskiwany z układu optycznego. Średnia wartość tarcia wyznaczana była za pomocą programu komputerowego opracowanego przez producenta mikroskopy AFM. Po zastosowaniu produktu kondycjonującego stwierdzono wzrost tarcia zarówno w środowisku suchym jak i mokrym. Wytlumaczeniem tego zjawiska opisanego w literaturze [4,5] jest fakt, że preparat kosmetyczny w skali nano powoduje przyklejanie się ostrza mikrobekki do powierzchni włosa, co przejawia się wzrostem tarcia.

Tarcie na krawędziach komórek osłonki („łusek”) oceniano poprzez analizę wartości tarcia zarejestrowanego na przekrojach obrazu tarcowego. Zestawiano wielkość tarcia na krawędziach komórek względem tarcia średniego. Uzyskane wyniki wskazują na fakt, że siły tarcia na osłonkach włosa osiągają swoje maksymalne wartości właśnie na krawędziach.

Materiał badawczy zostaje pobrany z powierzchni skóry ochotników metodą tape-stripping. Polega ona na zebraniu komórek naskórka za pomocą specjalnych krążków wykonanych z taśmy adhezyjnej. Analizowane komórki zbudowane są głównie z kreatyny i mają średnicę ok. 4 μm oraz grubość około 0,1 μm. Próbkę do badań pobrano od kobiety 30 letniej przed rozpoczęciem kuracji kosmetycznej oraz po 5 dniach stosowania kremu nawilżającego.

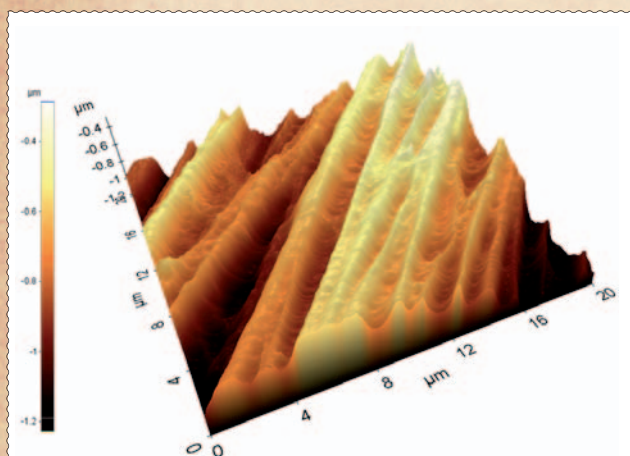
Pierwszą ocenianą cechą korneocytów była zmiana w morfologii samych komórek (Rysunek 3). Efektem działania kosmetyku było wygładzenie powierzchni korneocytów.

Drugim analizowanym parametrem był pomiar wielkości Modułu Young'a. Jest to współczynnik określający sprężystość (elastyczność) badanego materiału. Moduł Young'a korneocytów wyznaczono na podstawie zarejestrowanych krzywych „siła-odległość” - czyli zależności wychylenia sprężyny w funkcji względnego położenia skanera piezoelektrycznego, na

którym umieszczono próbki. Wychylenie sprężynki odzwierciedla wielkość siły działającej między ostrzem sondy, a powierzchnią badanej próbki. Do wyznaczenia wielkości Modułu Young'a posłużono się modelem JKR (Johnson-Kendall-Roberts) [6] przy założeniu głębokości indentacji wynoszącej 10 nm (zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi badań nad korneocytami) [7].

Uzyskane wyniki badań wskazują na istnienie statystycznie istotnych różnic we właściwościach mechanicznych korneocytów pobranych po kuracji kosmetycznej w porównaniu do próbek kontrolnych. Korneocyty kontrolne (nie traktowane produktem kosmetycznym) były sztywniejsze w stosunku do korneocytów pobranych po 5 dniach kuracji kosmetycznej. Wykazano, że w przypadku korneocytów pobranych po kuracji kosmetycznej można wyróżnić dwie frakcje Modułu Young'a - o sztywności zbliżonej do kontroli oraz sztywniejsze. Frakcje o wyższych wartościach Modułu Young'a znajdowały się na powierzchni komórek.

Trzecią analizowaną wartością był pomiar sił adhezji, który polega na oszacowaniu wielkości siły jaka jest potrzebna do oderwania ostrza AFM od badanej powierzchni - w tym przypadku od powierzchni korneocytów. Wyniki badań wykazały na podobny, jak w przypadku wartości Modułu Young'a, rozkład sił adhezyjnych działających pomiędzy ostrzem skanera, a powierzchnią komórek. Dla próbek pobranych po kuracji kosmetycznej



Rys. 4. Obraz 3D topografii żywych komórek skóry właściwej

pojawia się frakcja charakteryzująca się silniejszymi oddziaływaniami ostrza z ich powierzchnią.

Analiza AFM korneocytów pobranych metodą tape-stripping wykazała, że po kuracji kosmetycznej stają się one bardziej gładkie, sztywniejsze oraz silniej do siebie przylegają.

Mikroskopia AFM w badaniu komórek skóry właściwej in vitro

Komórki skóry właściwej można także analizować techniką AFM w warunkach in vitro. Przebadano żywe komórki skóry właściwej wyizolowane z wycinków skóry pochodzących od kobiet w wieku: 20, 40 i 60 lat. Dla każdej grupy wiekowej przebadano komórki kontrolne (hodowane w samej pożywce) oraz komórki hodowane w obecności peptydów stosowanych w preparatach przeciwzmarszczkowych. Celem badania była ocena wpływu peptydów na topografię komórek (Rysunek 4) oraz wyznaczenie ich Modułu Young'a.

Oznaczanie Modułu Young'a prowadzono w komorze cieczowej, która umożliwia wykonywanie badań w warunkach fizjologicznych (w pożywce, w której komórki były hodowane). Analiza polegała na zbieraniu i ocenie krzywych siłowych. Monitorowane były wychylenia ramienia z ostrzem od skanera piezoelektrycznego z próbką. Wychylenie to odpowiada sile działającej pomiędzy końcem ostrza, a powierzchnią próbki. Właściwości elastyczne powierzchni charakteryzuje zależność pomiędzy intendancją, a naciskającą siłą. Większość materiałów odkształca się w sposób elastyczny lub plastyczny. Szczególnie podatne na takie odkształcenia są tkanki żywe m.in. komórki. W przypadku braku deformacji powierzchni próbki wartość indentacji wynosi zero. W przypadku komórek obserwuje się małe wychylenie ramienia z ostrzem, co jest spowodowane ugięciem tej elastycznej powierzchni pod wpływem działającej siły (powstaje indentacja). Wielkość indentacji wyliczana jest dzięki porównaniu wartości uzyskanych dla idealnie twardych materiałów (np. szkło w naczyniu hodowlanym) z tymi uzyskanymi dla materiału elastycznego (żywe komórki). Obrazowanie AFM badanych komórek wykonano w trybie kontaktowym.

Wstępne wyniki wskazują na wzrost wartości Modułu Young'a w przypadku komórek hodowanych w obecności peptydu i pochodzących od osób 20 i 40-letniej, przy czym najlepiej zareagowały na stymulację składnikiem kosmetycznym komórki pochodzące od osoby 40-letniej.

Podsumowanie

Opisane powyżej przykłady zastosowania mikroskopii sił atomowych są najnowszymi opisanymi przykładami wykorzystania tej techniki w kosmetologii. Badania metodą mikroskopii sił atomowych umożliwiają rzetelne i niezwykle precyzyjne określenie wpływu produktów kosmetycznych (preparaty do pielęgnacji włosów oraz emulsje kosmetyczne w/o i o/w), bądź poszczególnych składników aktywnych stosowanych w przemyśle kosmetycznym na kondycję skóry i włosów.



Literatura:

- Piórkowska A.: Zastosowanie mikroskopu sił atomowych w kosmetologii. Praca magisterska. UMK, Toruń, 2010.
- Bhushan B.: Nanoscale characterization of human hair and hair conditioners. Progress in Materials Science, 2008, 53 (4).
- La Torre C., Bhushan B.: Nanotribological characterization of human hair and skin using atomic force microscopy. Ultramicroscopy, 2005, 105.
- Lee S., Zürcher S., Dorcier A., Luengo G.S., Spencer N.D.: Adsorption and Lubricating Properties of Poly(l-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) on Human Hair Surfaces. ACS Applied Materials & Interfaces, 1, 2009, 9.
- La Torre C., Bhushan B.: Nanotribological effects of silicone type, silicone deposition level, and surfactant type on human hair using atomic force microscopy. J Cosm Sci, 2006, 57 (1).
- Johnson K.L., Kendall K., Roberts A.D., Proc. Soc. London Ser. A. 324, 1971, 301.
- Gaikwad R.M., Vasilyev S.I., Datta S., Sokolov I.: Atomic Force Microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction. Skin Research and Technology, 2010 (16), 82.