

Badania *in vitro* i *in vivo* we współczesnej kosmetologii

Badania *in vitro* w kosmetologii - hodowle komórkowe

Dr n. biol. Karolina Bazela
Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris

Termin *in vitro* pochodzi z języka łacińskiego i dosłownie znaczy „w szkle”. Używany jest do określenia badań procesów biologicznych w warunkach sztucznych, poza żywym organizmem. Hodowle komórkowe (kultury komórkowe) to procesy prowadzone *in vitro*, mające na celu utrzymanie przy życiu i namnożenie komórek organizmów żywych. Mogą to być zarówno hodowle bakterii czy drożdży, jak i hodowle komórek roślinnych i zwierzęcych, w tym ludzkich.

Hodowle komórkowe mogą mieć bardzo różnorodne zastosowania. Wykorzystuje się je do badań podstawowych w biologii i medycynie – to dzięki modelom komórkowym możliwe jest poznanie fizjologii i patologii naszego organizmu. Ponadto hodowle komórkowe znajdują wykorzystanie w badaniach wpływu nowych związków chemicznych (np. potencjalnych leków, produktów kosmetycznych) na organizm żywy. W przemyśle biotechnologicznym dzięki hodowłom możliwa jest produkcja substancji stosowanych jako leki, np. przeciwciał, białek enzymatycznych, skomplikowanych związków organicznych lub wektorów wirusowych do terapii genowej.

Skórę, największy organ naszego organizmu, tworzą komórki o wyspecjalizowanych funkcjach, m.in. komórki naskórka (keratynocyty), komórki skóry właściwej (fibroblasty), komórki barwnikowe (melanocyty). Komórki każdej z warstw skóry można wyodrębnić (wyizolować) i utrzymywać przy życiu (hodować) w warunkach laboratoryjnych. Umiejętność izolacji komórek z niewielkich wycinków ludzkiej skóry i utrzymania wzrostu takich hodowli w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) doprowadziła

do zainteresowania praktycznym wykorzystaniem tych osiągnięć. Badania surowców kosmetycznych z użyciem modeli komórkowych czy ekwiwalentów skóry są prowadzone od lat przez światowe koncerny kosmetyczne. W Polsce jedyną firmą kosmetyczną wykonującą tego typu badania jest Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena Eris.



Ryc. 30.1. Pracownia hodowli komórkowych – komora z laminarnym przepływem powietrza umożliwia pracę w warunkach sterylnych

Zgodnie z 7 poprawką do Dyrektywy Kosmetycznej UE od roku 2004 obowiązuje zakaz przeprowadzania testów gotowych produktów kosmetycznych na zwierzętach. Natomiast do roku 2009 (w przypadku pewnych obszarów badań do roku 2011) muszą ustać wszelkie testy substancji kosmetycznych na zwierzętach, nawet jeśli do tej pory nie będą dostępne testy alternatywne. Kluczową rolę w rozwoju i walidacji alternatywnych metod badań odgrywa Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM – *European Centre for the Validation of Alternative Methods*). Niektóre z testów na hodowlach komórkowych uzyskały już aprobatę ECVAM – za pomocą badań *in vitro* można obecnie ocenić wpływ preparatów kosmetycznych na organizm ludzki w takich obszarach, jak wchłanianie przez skórę, działanie żrące na skórę oraz ostra fototoksyczność. Trwa walidacja alternatywnych testów na podrażnienia skóry oraz oczu.

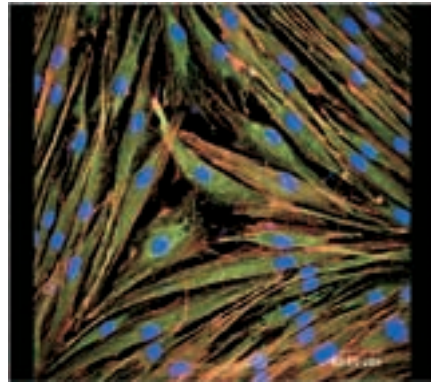
Badania na izolowanych z organizmu żywego komórkach pozwoliły znaleźć odpowiedź na wiele pytań odnośnie do budowy i funkcjonowania skóry człowieka. W kosmetologii badania na hodowlach komórkowych służą poznaniu mechanizmów działania substancji czynnych na komórki skóry. Już na etapie badań *in vitro* jesteśmy w stanie ocenić bezpieczeństwo stosowania substancji aktywnej, czyli wyeliminować stężenia, które będą działać toksycznie dla komórek skóry. Na etapie badań na hodowlach komórkowych wybierzemy również kompleksy substancji aktywnych o działaniu synergicznym, czyli więcej niż sumującym się.



Ryc. 30.2. Inkubator do hodowli komórkowych – temperatura 37°C, 5%CO₂

Modele sztucznej skóry są obecnie niezastąpione w badaniu przenikalności substancji aktywnych w głąb skóry – dzięki takim testom wiemy, czy np. substancja wybielająca dotrze do komórek barwnikowych skóry. Badania składników aktywnych prowadzone na hodowlach komórkowych pozwalają ocenić nie tylko bezpieczeństwo użycia danej substancji, ale i poznać jej molekularny mechanizm działania. Na komórkach naskórka badane są substancje czynne chroniące przed szkodliwym wpływem środowiska zewnętrznego, np. przed promieniowaniem ultrafioletowym. Hodowle izolowanych fibroblastów są doskonałym modelem do badań surowców o działaniu przeciwzmarszczkowym.

Obecnie w laboratoriach prowadzi się nie tylko hodowle jednego typu komórek (keratynocytów czy fibroblastów). Powstają kultury wspólne komórek



Ryc. 30.3. Komórki skóry właściwej (fibroblasty) w mikroskopie konfokalnym

(kokultury, np. komórek naskórka z komórkami barwnikowymi), a także modele skóry pełnej grubości – z wielowarstwowym naskórkiem, zawierającym np. melanocyty, oraz z warstwą skóry właściwej. Taka „sztuczna skóra” jest modelem „prawidłowej” skóry. Jednak w organizmie żywym skóra powiązana jest szeregiem zależności z wieloma innymi tkankami, czego nie możemy, na dzień dzisiejszy, odzwierciedlić w modelu *in vitro*. Dlatego kolejnym etapem badań produktu kosmetycznego są testy aplikacyjne na skórze człowieka.

Badania skuteczności działania oraz bezpieczeństwa stosowania produktów kosmetycznych na skórze człowieka

Dr n. med. Carmen Vincent
Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris

Każdy preparat kosmetyczny przed wejściem na rynek powinien zostać przebadany nie tylko pod względem bezpieczeństwa stosowania, ale także pod kątem skuteczności działania deklarowanego przez producenta. Tego rodzaju badania prowadzone są metodą *in vivo*, czyli w testach aplikacyjnych na skórze człowieka. Wykonywane są zazwyczaj przez wyspecjalizowane ośrodki badawcze, które świadczą tego typu usługi dla różnych firm kosmetycznych i farmaceutycznych. Niektóre fir-

my kosmetyczne posiadają własne pracownie badań aplikacyjnych, dzięki czemu mogą oceniać skuteczność działania kosmetyków już na etapie opracowywania ich receptur, co istotnie wpływa na jakość produktów finalnych. W Polsce badania takie prowadzi Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris w Warszawie.

Badania metodą *in vivo* prowadzone są u zdrowych ochotników (tzw. probantów), których dobiera się pod względem płci, wieku i rodzaju cery oraz ewentualnych problemów z cerą. Przed każdym testem przeprowadzane jest badanie dermatologiczne, podczas którego oceniany jest rodzaj i stan skóry, skłonność do odczynów alergicznych, zbierane są informacje na temat przebytych lub aktualnych chorób skóry i ich leczenia, a także na temat ogólnego stanu zdrowia probanta.

Przed przystąpieniem do badania każdy ochotnik podpisuje formularz świadomej zgody na udział w badaniu, a osoba prowadząca badanie udziela mu szczegółowych informacji na temat celu badania i sposobu jego przeprowadzenia. Każdy probant otrzymuje także stosowne dokumenty, tj. pisemną instrukcję, jak należy stosować dany kosmetyk, oraz ankietę, którą wypełnia w trakcie stosowania preparatów. Pozwala to na poznanie opinii przyszłych klientów na temat danego kosmetyku oraz umożliwia podjęcie szybkich kroków zmierzających do polepszenia walorów kosmetyku i proponowanych usług. Zależnie od rodzaju testowanego produktu oraz spodziewanych efektów badania mogą trwać kilka godzin, dni lub tygodni. Przed rozpoczęciem stosowania testowanego preparatu oraz w trakcie trwania testu i po jego zakończeniu przeprowadza się badania aparaturowe – mierzy się wybrane parametry skóry. Po zakończonym badaniu ochotnicy odpowiadają na pytania i przekazują własne wrażenia odnośnie do stosowanej „kuracji”.

Kondycję skóry ocenia się za pomocą nieinwazyjnych metod badania, takich jak: pomiar **poziomu nawilżenia, natłuszczenia, elastyczności, gładkości skóry, intensywności zabarwienia skóry (ilości melaniny i stopnia zaczerwienienia skóry) oraz pomiar przesnaskórkowej utraty wody (TEWL)**. Oceniany jest także **stopień nasilenia rumienia i intensywność zabarwienia plam barwnikowych**. Wykonuje się również badania sensoryczne – np. takie, w trakcie których wybierana jest kompozycja

zapachowa do danego produktu lub serii kosmetycznej. Badania wykonywane są w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach. Przy ocenie wyników pomiaru uwzględnia się wiele zmiennych, np. temperaturę i wilgotność powietrza. Badania można przeprowadzać metodą „pół na pół” tzn. ochotnik otrzymuje dwa opakowania testowanych preparatów, zawierające badane produkty kosmetyczne różniące się składem lub zawierające różne stężenia składników aktywnych. Dodatkowo stosuje się metodę tzw. podwójnej ślepej próby, tzn. ani osoba biorąca udział w badaniu, ani osoba prowadząca badanie nie wie, czym różnią się oceniane preparaty.

Techniki badawcze

Pomiary wykonywane są na skórze twarzy oraz na wewnętrznej stronie przedramienia lub innych wybranych częściach ciała, tak aby uwzględnić specyfikę danego preparatu kosmetycznego. Wszystkie pomiary odbywają się w pokoju pomiarowym, gdzie są kontrolowane i ściśle określone warunki wilgotności i temperatury.

1. Nawilżenie skóry

Wilgotność warstwy rogowej naskórka jest odzwierciedleniem stopnia nawilżenia skóry. Aby ją określić, wykorzystujemy własności elektryczne skóry. Badanie polega na pomiarze pojemności elektrycznej skóry. Wartość ta zależy od zawartości wody w skórze. Jest to szybka metoda oceny stopnia nawilżenia skóry.

2. Natłuszczenie skóry

Do pomiaru natłuszczenia skóry wykorzystuje się metodę opartą na fotometrii tłustej plamy. Aparat oznacza poziom zawartości tłuszczu za pomocą folii z tworzywa sztucznego. W metodzie tej mierzy się przepuszczalność światła zwilżonej tłuszczem powierzchni. Wynik otrzymujemy w jednostkach mg sebum na cm² powierzchni skóry. Badanie to pokazuje, jak funkcjonują gruczoły łojowe skóry i ma zastosowanie przede wszystkim do oceny działania kosmetyków matujących i przeciwtrądzikowych.

3. Elastyczność skóry

Do pomiaru elastyczności skóry służy sonda, której zasada działania jest bardzo prosta, tzn. po-



Ryc. 30.4A, B, C. Aparatura pomiarowa stosowana do badań *in vivo* kondycji skóry

przez specjalny otwór znajdujący się na powierzchni aparatu pod ciśnieniem jest zasysana skóra. Sonda zassie więcej skóry wiotkiej, a mniej skóry jędrnej. Wyniki otrzymywane są w postaci bezwymiarowych współczynników elastyczności skóry (R). Elastyczność skóry jest parametrem, który zmniejsza się wraz z wiekiem. Wykorzystywany jest on w ocenie produktów przeciwzmarszczkowych i ujędrniających, przeznaczonych głównie dla osób po 35 r.ż.

4. Gładkość

Powierzchnia skóry pokryta jest bruzdami biegnącymi w różnych kierunkach. Pomiedzy bruzdami znajdują się wzniesienia, które tworzą obraz powierzchni skóry zmieniający się w zależności od jej stanu i działania czynników zewnętrznych. Do oceny gładkości skóry wykorzystuje się metodę polegającą na odwzorowaniu wyglądu skóry za pomocą promieni ultrafioletowych. Specjalną kamerą wykonuje się zdjęcie mikrotopograficzne powierzchni naskórka wraz ze wszystkimi jego zagłębieniami i nierównościami. Umożliwia to oznaczenie takich parametrów, jak szorstkość i gładkość skóry, stopień złuszczenia naskórka, długość, szerokość i głębokość zmarszczek, oraz określenie ogólnej kondycji skóry. Za pomocą tego badania oceniany jest efekt przeciwzmarszczkowy danego preparatu.

5. Stopień zabarwienia skóry

Badanie to polega na kolorymetrycznej ocenie stopnia zaczerwienienia (pochodzącego od hemoglobiny) i intensywności zabarwienia brązowo-brunatnego skóry (związanego z zawartością melaniny w skórze). Badanie przeprowadza się za pomocą specjalnej sondy, która mierzy stopień intensywności zabarwienia skóry i podaje wynik w postaci liczbowej. To badanie jest szczególnie przydatne przy ocenie działania kosmetyków wybielających lub przeznaczonych dla cery naczyniowej i osób z trądzikiem różowatym.

6. TEWL

Do pomiaru przeskórkowej utraty wody służy aparat mierzący szybkość parowania wody z powierzchni skóry. Badanie to pozwala na określenie długości utrzymywania się odpowiedniego, prawidłowego stopnia nawilżenia skóry. Pomiar musi być przeprowadzany w ściśle określonych warunkach. Stopień utraty wody przez naskórek informuje nas o tym, czy naskórek ma dobre właściwości ochronne i czy pokrywający go płaszcz hydrolipidowy skutecznie chroni skórę przed przesuszeniem. Badanie takie wykorzystuje się w ocenie kosmetyków o właściwościach nawilżających i ochronnych oraz kosmetyków przeznaczonych dla cery wrażliwej i alergicznej.