

Badania składników kosmetycznych

dr Renata M. Dębowska
Centrum Badawcze Dr Irena Eris

Konieczność badania skuteczności działania preparatów kosmetycznych jest dla rzetelnych producentów, dbających zarówno o swą renomę jak i o zadowolenie dobrze poinformowanego klienta, sprawą priorytetową. Nie wszystkie jednak badania leżą w zasięgu możliwości firm kosmetycznych, a prowadzenie własnych badań *in vitro* podczas pracy nad kosmetykiem jest wręcz unikalne.

Firmy kosmetyczne prześcigają się we wprowadzaniu na rynek nowości i nieustannie walczą o klienta, zachwalając walory swoich produktów. Czy właściwości preparatów opisywane w reklamach są jednak rzeczywiście prawdziwe? Czy nie zadajemy sobie często pytania: w jakim stopniu dany środek jest naprawdę skuteczny?

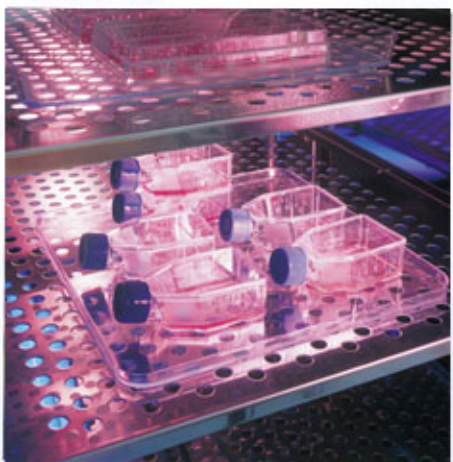
In vivo, in vitro, ex vivo

Według zmienionych niedawno przepisów Unii Europejskiej, aby nadać kosmetykowi określenie „nawilżający”, „ujędrniający” czy „wygładzający zmarszczki” należy udowodnić jego sugerowane działanie. Zanim preparat pojawi się na rynku powinien zostać przebadany nie tylko pod kątem bezpieczeństwa stosowania, ale także pod kątem skuteczności działania. Badania tego typu prowadzone są w ramach podobnych schematów jak w medycynie czy farmacji. Ich zasadniczą i najważniejszą częścią są badania na skórze człowieka (*in vivo*). Jednakże warto także prowadzić doświadczenia na hodowlach komórek skóry (*in vitro*) lub tzw. metodą *ex vivo*, polegającą na badaniu materiału tkankowego po-

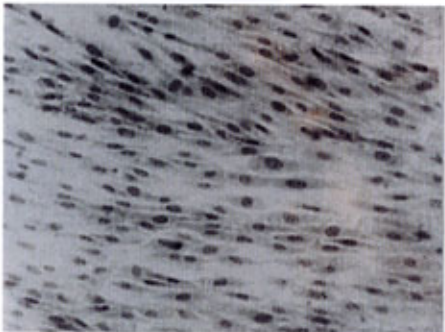
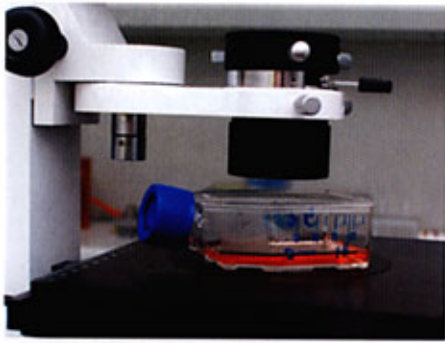
branego drogą biopsji od osób uczestniczących w badaniu preparatu. Wymaga to jednak zgody Komisji Etycznej, dlatego też badania metodą *ex vivo* wykonuje się stosunkowo rzadko, zazwyczaj w przypadkach testowania preparatów przeznaczonych dla tzw. „skóry problemowej”. Dwie ostatnie metody są bardzo kosztowne i prowadzi je jedynie kilka firm europejskich, m.in. L’Oreal, Clarins, Yves Rocher, Dior i Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena Eris.

Badania *in vitro* można przeprowadzać na gotowych, kupowanych modelach tkankowych, np. odtworzonym naskórku, komórkach naskórka, skóry właściwej czy śródbłonna. W zależności od potrzeb prowadzi się hodowle wybranych linii komórek ▶ Skuteczność działania składników rozjaśniających przebarwienia oraz czynników ochronnych ocenia się na komórkach barwnikowych skóry (**melanocytach**) ▶ działanie czynników wyszczuplających można śledzić na hodowlach komórek tłuszczowych (**adipocytach**), składniki nawilżające bada się na komórkach naskórka (**keratynocytach i korneocytach**) ▶ dobrym modelem do badania składników przeciwmarszczkowych i zapo-

biegających starzeniu się skóry są **fibroblasty skóry właściwej** ▶ wpływ składników chroniących skórę przed promieniowaniem UV bada się zarówno na **komórkach barwnikowych**,



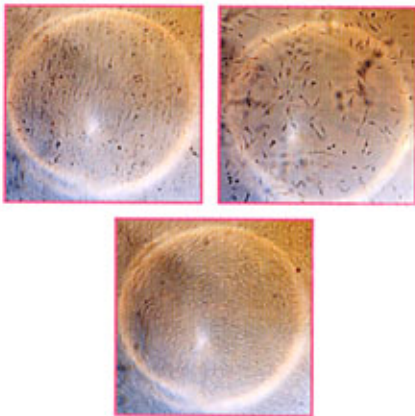
Fot. 1, 2. Hodowla fibroblastów



Fot. 3, 4. Obserwacje w mikroskopie świetlnym

ich szybsze starzenie się i śmierć). Jest to pewna analogia do procesu starzenia się skóry – z wiekiem komórki skóry są gorzej odżywiane.

Komórki z różnych warstw skóry pod wpływem określonego czynnika zmieniają swoją morfologię, co można po-



Fot. 5, 6, 7. Obserwacje w mikroskopie świetlnym

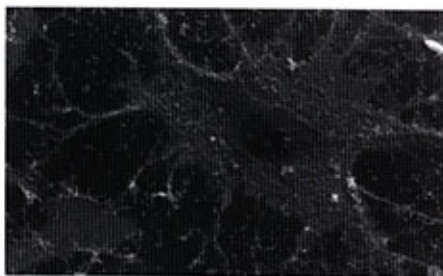
twierdzić zdjęciami w mikroskopie świetlnym, skaningowym czy elektronowym. Już bardzo podstawowe obserwacje wzrostu i zdolności do proliferacji komórek mogą być obrazem ciekawych zjawisk zachodzących pod wpływem różnych czynników kosmetycznych. Przeprowadza się też wiele oznaczeń biochemicznych

(np. aktywności enzymów) i molekularnych (np. szybkości naprawy uszkodzonego materiału genetycznego, zdolności do syntezy kolagenu), które świadczą o większych lub mniejszych możliwościach przeżycia w niekorzystnych warunkach środowiska.

Badania te pozwalają na określenie działania konkretnego składnika, jednakże



Fot. 8. Fibroblasty młode (mikroskop skaningowy)



Fot. 9. Fibroblasty starzejące się (mikroskop skaningowy)

w kosmetykach często pojawiają się kompleksy substancji aktywnych. Czy teoretycznie opracowane zestawienie substancji również wywoła taką samą reakcję komórek skóry? Jeśli obserwujemy śmierć komórek już przy bardzo niskich stężeniach substancji w kompleksie, sugeruje to niewłaściwe działanie nie tyle substancji aktywnych, co ich połączeń. Badania *in vitro* pozwalają zatem stwierdzić, że stosowane do tej pory niektóre składniki kosmetyków w pewnych połączeniach mogą oddziaływać na komórki w sposób wręcz szkodliwy lub ocenić, które składniki mogą działać synergicznie, nie prowadząc do uszkodzeń komórek skóry. Mianem synergizmu określa się zjawisko połączenia kilku substancji w kompleksie, który daje efekt wyższy, nie będący tylko sumą działania poszczególnych składników. Kompleksy te są niezwykle cennymi i poszukiwanymi substancjami aktywnymi

kosmetyków, lecz ich opracowywanie jest niezwykle trudne.

Laboratorium *in vitro*

Posiadając własne laboratorium badań *in vitro* można:

- ▶ badać składniki nowe, nie stosowane do tej pory w kosmetykach (np. Foliacyna)
- ▶ potwierdzać aktywności wielu składników badanych wcześniej przez producentów
- ▶ wybierać najlepiej działające czynniki
- ▶ określać skutecznie optymalnie działające stężenia wybranych składników (dużo nie zawsze znaczy lepiej)
- ▶ badać synergiczne działanie kilku składników
- ▶ opracowywać nowe kompleksy składników aktywnie działających na skórę (przykład – Kinederm[®], Neoblock[®]).

Co może być w przyszłości kosmetycznym hitem? Na pewno nie będzie to jeden składnik. Przyszłościowymi rozwiązaniami będą raczej wielokierunkowo działające połączenia znanych obecnie związków czy substancji, które mogą mieć zupełnie inne właściwości niż składniki wyjściowe. Sukcesem w walce ze starzeniem się skóry jest poznanie molekularnych przyczyn istniejącego zjawiska i możliwości zastosowania tych badań w praktyce. Pomimo, iż eksperymenty trwają czasem całymi latami, wydaje się, że rozpoczęła się nowa era badań i poszukiwania dowodów skuteczności działania kosmetyków w nowoczesnie pojętej kosmologii.

Ocena działania kosmetyków przy pomocy technik *in vitro* jest bardzo przydatnym, wręcz niezbędnym narzędziem w produkcji dobrych i skutecznych preparatów. Są to badania bardzo kosztowne, długotrwałe i nie od razu przynoszące producentowi oczekiwane rezultaty. Jednak firmy liczące się na rynku decydują się ponosić te koszty, gdyż są one niezbędne w procesie tworzenia preparatów najwyższej jakości. □

jak i **fibroblastach** ► **na komórkach śródblonka naczyniowego** można oceniać aktywność składników wzmacniających pękające naczynka.

Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe zakłada się z komórek pobranych z wycinka zdrowej skóry. Z niewielkiego fragmentu skóry (0,5 cm) mechanicznie izolowane są odpowiednie warstwy, które poddawane są następnie działaniu enzymów trawiących tkanki i przenoszone na odpowiednie podłoża hodowlane, umożliwiające wzrost określonej linii komórek. Wszystkie czynności wykonuje się w warunkach sterylnych, w laboratoryjnej komorze typu laminar. Wyprowadzone linie hodowane są w specjalnych naczyniach (stąd też pochodzi nazwa *in vitro* – w szkło), w komorach o temperaturze 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla i stałej wilgotności (75%). Hodowle prowadzi się w standardowych pożywkach zawierających antybiotyki oraz surowicę zwierzęcą jako źródło substancji utrzymujących komórki przy życiu.

Do każdej pożywki hodowlanej dodaje się określone substancje, potencjalnie modyfikujące wzrost i funkcje komórek (np. czynniki stymulujące, wzrostowe). Wyniki takiego badania porównuje się z próbą kontrolną – z komórkami hodowanymi w tych samych warunkach, ale nie poddanymi działaniu żadnego składnika. Następnie sprawdza się wpływ konkretnego składnika na komórki młode, które dzięki większej liczbie aktywnych receptorów i większej łatwości przekazywania sygnałów są bardziej podatne na działanie czynników wzrostowych oraz na komórki dojrzałe i starzejące się, których aktywność podziałowa obniża się.

Różne czynniki odżywcze mają różne mechanizmy oddziaływania. Niektóre substancje działają na wszystkie komórki, inne wyłącznie na komórki starsze lub uszkodzone. Wpływ określonych substancji można zbadać, np. po naświetleniu komórek promieniowaniem UV, które, m.in. generuje wolne rodniki, sprzyja produkcji enzymów proteolitycznych rozkładających włókna kolagenowe i hamuje syntezę inhibitorów proteaz. Fibroblasty wydzielają do pożywki liczne substancje, których analiza dostarcza danych o kondycji komórek i ich aktywności metabolicznej.

Zachowanie się komórek w obecności określonego czynnika oceniane jest na podstawie podziału tychże komórek, co odzwierciedla ich aktywność życiową. Dla lepszego zobrazowania tego zjawiska, komórki hoduje się w zmodyfikowanej pożywce, bardzo ubogiej w podstawowe składniki odżywcze, co sprawia, że spowolnieniu ulegają wszystkie procesy życiowe i komórki szybciej tracą zdolność do podziałów (oznacza to