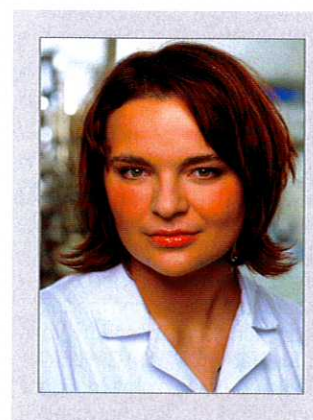


# Skaningowa mikroskopia elektronowa oraz mikroskopia sił atomowych w badaniu wpływu produktów kosmetycznych na uszkodzone łodygi włosowe w obrębie owłosionej skóry głowy



mgr inż. Bożena Tyszczyk\*, mgr Janusz Strzelecki\*\*, mgr Julita Nowakowska\*\*\*, dr n. med. Carmen Vincent\*, dr n. biol. Renata Dębowska\*, dr n. farm. Katarzyna Rogiewicz\*, dr n. farm. Irena Eris\*

\*Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, Warszawa  
kierownik: dr n. biol. Renata Dębowska

\*\*Instytut Fizyki, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu  
dyrektor: prof. dr hab. Włodzimierz Jaskólski

\*\*\*Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa  
kierownik: dr n. biol. Andrzej Czuba

## Wstęp

Zdrowe i piękne włosy to powszechny przedmiot pożądania, a troska o nie jest dzisiaj nie tylko domeną kobiet – coraz częściej na rynek wprowadzane są produkty kosmetyczne dostosowane do potrzeb mężczyzn. Przemysł kosmetyczny stara się wyjść naprzeciw rosnącym wymaganiom konsumentów. Dzisiejszy użytkownik oczekuje produktu najwyższej jakości, o dobrze udokumentowanej, wysokiej skuteczności działania. Sytuacja ta wymusza na laboratoriach kosmetycznych nie tylko tworzenie innowacyjnych produktów, lecz także przeprowadzanie coraz wyższej jakości badań potwierdzających ich działanie.

### ■ Budowa mieszka włosowego (ryc. 1)

Ludzki włos (*capillus, pilus*) składa się z:

- korzenia włosa (*radix pili*) – jego część tkwiąca w mieszku włosowym,

- trzonu lub łodygi włosa (*corpus vel scapulus pili*) – część widoczna na powierzchni skóry [1].

W przekroju poprzecznym włos charakteryzuje się budową warstwową. We włosach właściwych wyróżnia się, patrząc od zewnątrz:

- a) osłonkę zewnętrzną, przezroczystą, utworzoną z bezpostaciowej keratyny, układającej się w formie łusek,

- b) korę, która stanowi ciało włosa, jest również zbudowana z keratyny i stanowi największą część

włosa – jej grubość może się wahać, w zależności od przynależności etnicznej, od 40 do 100  $\mu\text{m}$ ,

- c) rdzeń, który jest przestrzenią centralną, pustą, z wyjątkiem kilku rozproszonych komórek [2].

W dojrzałym włosie część rdzeniowa (*medulla pili*) występuje w formie szczątkowej lub brak jej całkowicie. Kora włosa (*cortex pili*) zbudowana jest ze ściśle przylegających do siebie, ułożonych podłużnie, wrzecionowatych, zawierających barwnik keratynocytów, które tworzą zasadniczą część łodygi włosowej. Kora włosa odpowiada za właściwości mechaniczne włosa. Zewnętrzne warstwy zrogowaciałych komórek naskórka nie przylegają do siebie tak ściśle, jak w warstwie korowej, a nakładając się da-

chówkowato na siebie w postaci łusek, tworzą osłonkę włosa (*cuticula*). Zabezpiecza ona włos przed utratą wody oraz decyduje o jego połysku, co jest związane ze zdolnością tej warstwy do odbijania światła [3].

Korzeń włosa objęty jest strukturą zwaną mieszkem włosowym (*folliculus pili*) [4]. W rozwiniętym w pełni mieszk włosowym, w obrębie skóry owłosionej głowy, można wyróżnić następujące części: brodawkę skórną, opuszkę włosa, miejsce przyczepu mięśnia przywłosnego, lejek (ujście gruczołu łojowego) i ujście mieszka na powierzchni skóry. Zasadniczą część mieszka włosowego tworzy wewnętrzna i zewnętrzna pochewka korzenia włosa. Osłonka wewnętrznej pochewki włosa ma budowę dachówkową, lecz tworzące ją łuskowate keratynocyty zwrócone są w przeciwną stronę niż w osłonce łodygi włosa, dzięki czemu te dwie warstwy złączają się i ściśle przylegają do siebie. Wewnętrzna pochewka korzenia włosa otacza macierzyste włosy w opuszcze i rozciąga się aż do lejka. Pełni ona ważną funkcję, podtrzymując włos w czasie jego wzrostu i zapewnia odpowiednią miękkość łodygi włosowej. Pochewka zewnętrzna korzenia włosa otacza w całości mieszek włosowy i powyżej lejka przechodzi w naskórek. Zgrubienie znajdujące się na pochewce zewnętrznej w miejscu przyczepu mięśnia przywłosnego (bulge) jest miejscem wytwarzania komórek pnia mieszka włosowego. Brodawka skórną składa się z komórek mezenchymalnych, głównie z fibroblastów, i kontroluje proces wzrostu włosa. Przebieg tego procesu zależy od złożonej interakcji pomiędzy brodawką skórną a macierzą włosa, które wspólnie tworzą opuszkę włosa. Proces wzrostu włosa regulowany jest za pomocą cytokin, chemokin oraz czynników wzrostowych naczyń i nerwów. Komórki macierzy włosa, ulegając intensywnym po-

## Skaningowa mikroskopia elektronowa oraz mikroskopia sił atomowych w badaniu wpływu produktów kosmetycznych na uszkodzone łodygi włosowe w obrębie owłosionej skóry głowy

### STRESZCZENIE

Słowa kluczowe: SEM, AFM, morfologia włosa

Celem pracy była ocena przydatności technik mikroskopowych – skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i mikroskopii sił atomowych (AFM) do oceny efektów kuracji produktem kosmetycznym, przeznaczonym do włosów zniszczonych.

W przedstawionym badaniu poddano analizie próbki włosów pobrane od probantów przed kuracją, po pierwszym zastosowaniu oraz po 6 użyciach testowanego kosmetyku. Próbkę przebadano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Zeiss LEO 1430VP oraz mikroskopu sił atomowych Bioscope II firmy Veeco.

Analiza SEM wykazała znaczną poprawę struktury łodyg włosowych oraz obecność filmu ochronnego na ich powierzchni, który zabezpiecza włosy przed negatywnym wpływem środowiska, a także zapobiega mechanicznym uszkodzeniom w czasie codziennych zabiegów pielęgnacyjnych.

Analiza AFM dostarczyła szczegółowych obrazów morfologii włosa, ukazujących uszkodzenia osłonki oraz poprawę struktury łodygi włosowej po zastosowaniu produktu kosmetycznego. W przeprowadzonej analizie wzięto pod uwagę właściwości mechaniczne łodygi włosa: chropowatość powierzchni, średnie tarcie na powierzchni i tarcie na krawędzi łusek, będących zrogowaciałymi komórkami keratynocytów, tworzącymi osłonkę (*cuticula*) łodygi włosa. Zmierzono również wysokość komórek osłonki (ich odstąpienie od powierzchni łodygi). Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie produktu kosmetycznego spowodowało wzrost chropowatości, wzrost średniego tarcia oraz tarcia na krawędzi osłonki włosa w nanoskali. Zaobserwowano także wzrost wysokości komórek osłonki prawdopodobnie w wyniku działania sił solwatacyjnych oddziałujących na przeciwnie naładowane fragmenty łusek osłonki włosa. Różnice w rozkładzie ładunków elektrycznych na powierzchni łodygi włosa mogą być spowodowane zastosowaniem produktu kosmetycznego.

Jakkolwiek przeprowadzone na niewielkiej grupie osób badania miały charakter pilotażowy, w świetle uzyskanych wyników wydaje się, że SEM może być przydatnym narzędziem do wizualnej oceny skuteczności działania produktów kosmetycznych używanych do pielęgnacji włosów. Natomiast w celu uzyskania bardziej dokładnych oznaczeń, należy wziąć pod uwagę zastosowanie techniki AFM, która pozwala na ilościową analizę parametrów badanego obiektu.

## Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy in the study of damaged hair treatment

### SUMMARY

Key words: SEM, AFM, hair morphology

The aim of this study was to evaluate the efficacy of using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) in the study of damaged hair care product.

Analysis was performed for the hair samples collected before the treatment and after first and sixth use of the tested product. The samples were then examined using Zeiss Scanning Electron Microscope LEO 1430VP and Bioscope

II Atomic Force Microscope from Veeco.

SEM analysis shows significant improvement in examined hair stem structure and presence of the film on hair surface, which protects hair from the negative impact of environmental factors and prevents its mechanical damage during daily hair care.

AFM provided highly detailed morphology images of hair in water, showing directly mechanical damage of cuticles and conditioner adhered on the surface. Mechanical parameters of hair were obtained – roughness, mean friction on scanned surface and friction at the cuticle edge. Cuticle height at the edge was also measured. Due to the presence of conditioner roughness and friction at the nanoscale increased. Cuticles height increased after treatment, most likely due to the solvation forces acting at oppositely charged regions of conditioned cuticle. SEM imaging is an excellent tool for visible efficacy assessments of hair care products. For more accurate assessments in ambient conditions it's better to use AFM imaging, because it allows a quantitative analysis of investigated samples.

działom, różnicują się na komórki łodygi włosowej i komórki wewnętrznej pochewki korzenia włosa. Górny brzeg brodawki skórnej zawiera melanocyty, których dendrytyczne wypustki wnikają do macierzy włosa i przekazują melanosomy do keratynocytów łodygi włosowej. Proces melanogenezy w mieszk włosowym odbywa się jedynie w fazie wzrostu włosa, a końcowe zabarwienie włosa zależy od liczby, wielkości, transferu i rozmieszczenia melanosomów [3].

Istnieją dwa typy melaniny: eumelanina (barwnik brązowo-czarny) i feomelanina (barwnik żółto-czerwony). Podstawową rolę melaniny jest ochrona przed szkodliwym promieniowaniem UV, przy czym efekt ochronny zależy głównie od eumelaniny. Feomelanina ma działanie fotouwrażliwiające [5].

Ultrafiolet i promieniowanie widzialne są czynnikami wpływającymi na zniszczenia włosów. Dostępne dane mówią jednak, że stopień zniszczeń jest zależny od ich typu i koloru. Efekt niszczący promieniowania UVB był około 2 do 5 razy silniejszy (w zależności od koloru włosa) w porównaniu do promieniowania UVA i promieniowania widzialnego [6]. Dla wszystkich typów włosów wykazano znaczące zmiany ich koloru. Przeprowadzone badania wskazują na znaczne zniszc-

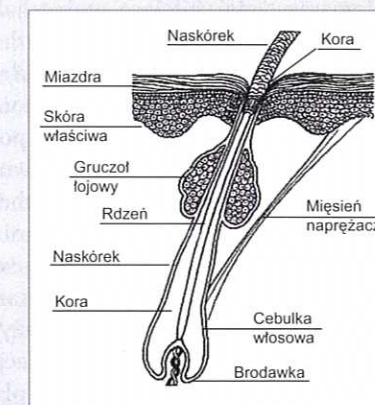
zenie białek budulcowych. Degradacja białek, będących budulcem włosów powodowana jest przez światło o długości fali 254-400 nm [7]. Promieniowanie UVB powoduje rozpad białek, zaś UVA jest odpowiedzialne za zmiany w kolorze włosów. Absorpcja promieniowania przez fotowrażliwe aminokwasy we włosach oraz ich fotochemiczna degradacja jest przyczyną powstawania wolnych rodników. Mają one negatywny wpływ na białka włosów, zwłaszcza keratynę. Melanina może częściowo zniwelować negatywny wpływ wolnych rodników i zablokować ich przedostanie się do struktur keratyny, a dodatkowo pochłania i filtruje niekorzystne promieniowanie UV. Melanina jest zatem istotnym czynnikiem, który w sposób pośredni i bezpośredni chroni białka włosów przed zniszczeniami spowodowanymi szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym [6,7].

### Zmiany strukturalne włosów spowodowane zabiegami pielęgnacyjnymi

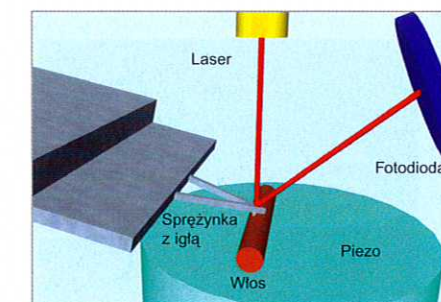
Codzienna pielęgnacja zapewnia włosom atrakcyjny wygląd i pobudza ich wzrost. Jednak w niektórych przypadkach zbyt intensywne lub nieumiejętnie wykonywane zabiegi pielęgnacyjne mogą spowodować znaczne uszkodzenia struktury włosów. Zbyt energiczne czesanie lub

szczotkowanie może spowodować uszkodzenie osłonki, a nawet pozostałych części łodygi włosowej. Dotyczy to części osób mających włosy kręcone, np. rasy negroidalnej, u których takie działanie może spowodować rozszczep węzłowy włosa (*trichorrhexis nodosa*). U kobiet zmiany występują najczęściej na owłosionej skórze głowy, a u mężczyzn – na brodzie i wąsach [1,3,8].

Nadmiernie częste mycie włosów może spowodować ich suchość i łamliwość, a zbyt intensywne używanie suszarek elektrycznych i lokówek może być przyczyną powstania włosów bańkowatych (bubble hair). W takich przypadkach obser-



Ryc. 1  
Budowa włosa [4].  
Hair structure [4].



Ryc. 2  
Schemat mikroskopu sił atomowych.  
Schematic chart of Atomic Force Microscope.

wuje się kruchość i łamliwość włosów, a w badaniu mikroskopowym łodyg włosowych widoczne są obszary pozbawione keratyny, przypominające bańki mydlane. Czasem także łodygi włosowe ulegają odkształceniu, przybierając kształt bumerangu [3].

Farbowanie i stosowanie trwalej ondulacji może w istotny sposób naruszać strukturę łodygi włosowej. Większość farb do włosów zawiera dużą ilość składników o działaniu drażniącym. Niektóre z preparatów barwiących włosy pokrywają powierzchnię łodygi włosa i są zupełnie nieszkodliwe, podczas gdy inne głęboko wnikają w głąb łodygi włosów, powodując jej uszkodzenie. Preparaty rozjaśniające, takie jak nadtlenek wodoru, powodują utlenienie melaniny, równocześnie osłabiając strukturę włosa. Działanie preparatów do trwałej ondulacji polega na rozrywaniu wiązań dwusiarczkowych i innych wiązań chemicznych istotnych dla utrzymania trójwymiarowej struktury włosów oraz tworzenia nowych wiązań w nowych miejscach. Obecnie używane preparaty do trwałej ondulacji zawierają 8% tioglikanu amonu (pH 9,5), który w temperaturze pokojowej częściowo rozrywa lub tylko osłabia wiązania dwusiarczkowe. Po zmniejszeniu liczby tych wiązań włosy są układane i w celu utrwalenia efektu – utleniane 0,5-5% roz-

tworem nadtlenku wodoru. Następnie pokrywające włosy substancje zasadowe są zobojętniane płynem splukującym o odczynie lekko kwaśnym. Obecnie jako czynników redukujących używa się estrów kwasu tioglikolowego, które uważane są za związki o łagodniejszym działaniu na włosy i zabiegi trwałej ondulacji uważane są za bezpieczne. Jeżeli jednak płyn do trwałej ondulacji w czasie zabiegu pozostanie na włosach zbyt długo, ma zbyt wysokie stężenie lub też zabieg wykonywany jest u osoby z włosami o pierwotnie osłabionej strukturze, łodygi włosów mogą ulec poważnemu uszkodzeniu [3].

W przypadku prawidłowo wykonanych, ale wielokrotnie powtarzanych zabiegów farbowania, rozjaśniania i ondulowania włosów, może dojść do znacznego uszkodzenia ich struktury (np. węzłowego rozszczepu włosów) na drodze kumulacji efektów ubocznych. Ponieważ w normalnych warunkach stosowanie substancji kosmetycznych nie powoduje uszkodzenia mieszków włosowych, nowo wyrastające włosy są zupełnie prawidłowe.

#### ■ Badania włosów

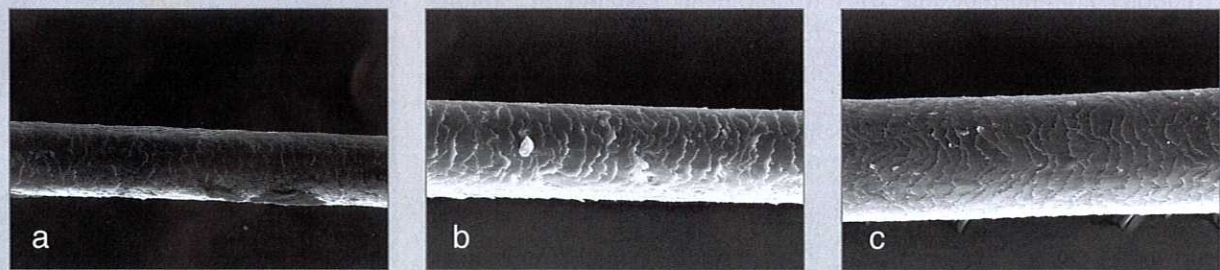
Istnieje wiele metod służących do diagnostyki skóry głowy i włosów. Opierają się na obserwacjach mikro- i makroskopowych łodygi i korzenia włosa oraz owłosionej

skóry głowy. Można podzielić je na inwazyjne (biopsje skóry), półinwazyjne (np. trichogram) oraz nieinwazyjne (fototrichogram, badania z użyciem kamery wideo oraz ilościową i jakościową ocenę włosów wypadających). Nowe techniki to obrazowanie mikroskopem elektronowym (Electron Microscopy of Hair), skaningowym mikroskopem konfokalnym (Confocal Laser Scanning Microscopy) bądź stosowanie optycznego koherentnego tomografu (Optical Coherence Tomography) [9-11].

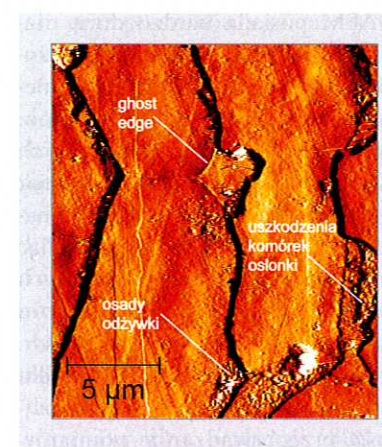
Technikami stosowanymi w kosmologii do oceny kondycji włosów w skali mikro- i nano- są m.in.: mikroskopia sił atomowych oraz skaningowa mikroskopia elektronowa, stosowana przez badaczy już w latach 90. ub. wieku. Obserwacje w skali nano- umożliwiają określenie zmian we właściwościach mechanicznych oraz trybologicznych włosów na poziomie poszczególnych komórek. Stanowią one niezbędne źródło informacji, które pozwala na udoskonalanie i rozwój produktów kosmetycznych oraz wnoszą znaczący wkład w rozwój kosmologii i dermatologii.

#### ■ Skaningowy mikroskop elektronowy (Scanning Electron Microscopy, SEM)

SEM jest rodzajem mikroskopu elektronowego, w którym wiązka



Ryc. 3  
Zmiany morfologii włosów w trakcie kuracji przy zastosowaniu produktu 1581 (pow. 1000 x).  
Morphological changes of the hair during treatment with the product 1581 (mag. 1000 x).



Ryc. 4  
Morfologia komórek osłonki włosa.  
Hair cuticle morphology.

elektronów, skupiona na powierzchni badanej próbki w plamkę o średnicy do 0,1 nm, omiata wybrany prostokątny obszar powierzchni ruchem skanującym, linia po linii [12]. Wiązka elektronów wytworzona w dziale elektronowym, jest przyspieszana w polu elektrycznym i skupiana przez soczewki elektromagnetyczne. Cewki odchylające nadają jej ruch skanujący. Elektrony wiązki wnikają w próbkę na niewielką głębokość (zależnie od rodzaju próbki i energii elektronów), ulegając rozproszeniu. Niewielka liczba elektronów powraca, pozostałe zaś tracą swoją energię w różnego rodzaju oddziaływaniach, przy czym powstają tzw. elektrony wtórne. Emitowane przez próbkę elektrony wtórne lub wstecznie rozproszone zostają wychwycone przez detektor. Sygnał wychodzący z detektora, po wzmocnieniu, steruje jasnością wiązki elektronów poruszającej się po ekranie monitora obrazowego, synchronicznie z ruchem wiązki skanującej próbkę. Uzyskany obraz jest zatem mapą intensywności emisji elektronów wtórnych lub rozproszonych. Zastosowanie detektora promieniowania rentgenowskiego do tworzenia obrazu, sprzężonego

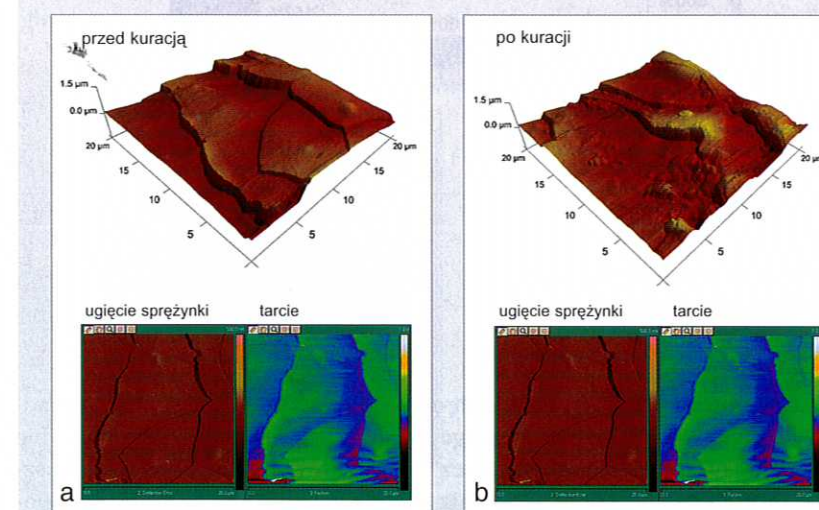
z analizatorem energii tego promieniowania, umożliwia dokonywanie analiz chemicznych wybranych obszarów, a nawet uzyskanie mapy składu chemicznego fragmentów próbki. Obrazy otrzymane SEM rejestruje się coraz częściej cyfrowo, co umożliwia poddawanie ich różnego rodzaju analizom ilościowym.

SEM znalazł zastosowanie we wszystkich niemal dziedzinach nauki i techniki, gdzie potrzebne są informacje o morfologii i składzie makroobiektów: w laboratoriach przemysłowych, kryminalistyce oraz przemyśle elektronicznym (kontrola produkcji układów scalonych) [12].

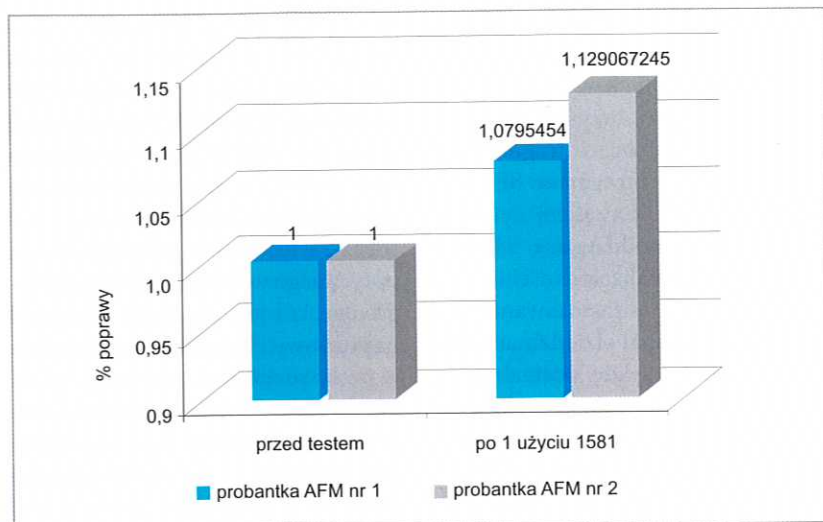
#### ■ Mikroskop sił atomowych (Atomic Force Microscope, AFM)

Mikroskop sił atomowych jest przedstawicielem klasy mikroskopów skaningowych, skanujących powierzchnię próbki za pomocą sondy [13]. W przypadku AFM sonda ma postać ostrza umieszczonego na płaskiej sprężynce (nazywanej też mikrobeltką) o rozmiarach ok. 100 nm. Ostrze to jest przesu-

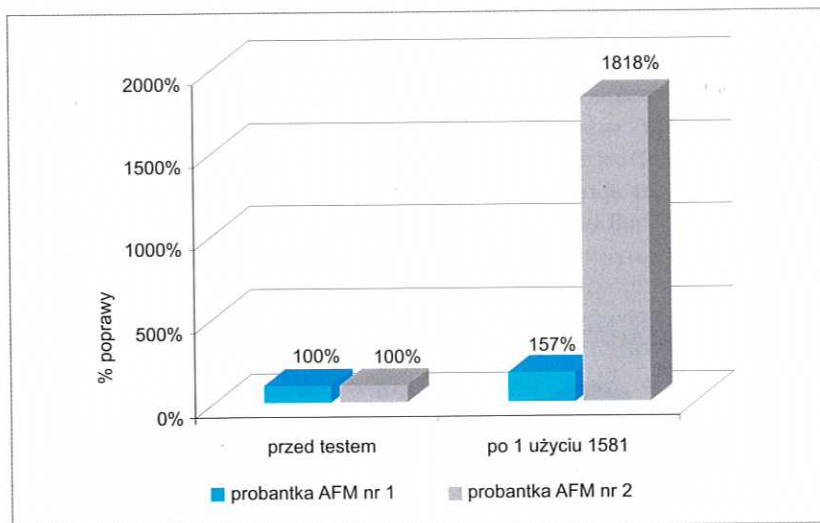
wane po powierzchni próbki i dociskane do niej przez przetwornik piezoelektryczny, umożliwiając przesunięcia z dokładnością poniżej 1 nm (ryc. 2). W wyniku oddziaływań ostrza z nierównościami powierzchni sprężynka ugina się, a poprzez zastosowanie prostego układu optycznego wykonuje się pomiar tego ugięcia i jego zamianę na sygnał napięciowy. Kontroler działający w pętli sprzężenia zwrotnego utrzymuje stałe ugięcie sprężynki poprzez wydłużanie lub skracanie przetwornika piezoelektrycznego podczas skanowania powierzchni. Obraz topografii powierzchni uzyskiwany jest poprzez mapowanie wartości wydłużenia przetwornika w każdym punkcie położenia sondy na próbce. Ponadto rejestrując niewielkie ugięcia sprężynki, można utworzyć dodatkowy obraz, który nie niesie wprawdzie informacji ilościowej o próbce, posiada jednak bardzo dobry kontrast i rozdzielczość. Taki tryb obrazowania, ze względu na bezpośrednie oddziaływanie ostrza z próbką, nazywany jest trybem kontaktowym. Umożli-



Ryc. 5  
Przykładowe obrazy komórek osłonki włosa, uzyskane za pomocą AFM.  
Example images obtained with AFM technique.



Ryc. 6  
Chropowatość włosów.  
Hair roughness.



Ryc. 7  
Tarcie na całej długości włosa.  
Whole hair friction.

wia on również pomiar tarcia między ostrzem a badaną próbką i jego rozkład na powierzchni, poprzez monitorowanie bocznego skręcenia sprężynki. Tym samym podczas skanowania powierzchni możliwe jest jednoczesne rejestrowanie kilku obrazów dostarczających różnego rodzaju informacji (topografia, ugię-

cie sprężynki i tarcie). W przypadku próbek miękkich, które w trybie kontaktowym mogłyby zostać uszkodzone, stosuje się tryby bezkontaktowe i kontaktu przerywanego, w których sprężynka pobudzana jest do drgań, a oddziaływania między igłą a powierzchnią powodują zmiany ich amplitudy i fazy.

AFM posiada bardzo dużą rozdzielczość, umożliwiającą w przypadku niektórych próbek rozróżnienie nawet pojedynczych atomów. Jest to również jedno z nielicznych urządzeń umożliwiających pomiar chropowatości i właściwości mechanicznych w nanoskali, umożliwiając tym samym obserwację istotnych zjawisk ulegających uśrednieniu w pomiarach makroskopowych. Ogromną zaletą AFM w przypadku badań biomedycznych jest możliwość przeprowadzania pomiarów w cieczach i temperaturach fizjologicznych, jak również jego integracja z mikroskopią optyczną i fluorescencyjną. Ograniczeniem tej metody jest natomiast obrazowanie jedynie względnie płaskich próbek i długi czas pozyskiwania pojedynczego obrazu [13].

### Cel pracy

Techniki mikroskopowe są użytecznymi narzędziami pozwalającymi w obiektywny sposób ocenić wpływ zastosowanych środków kosmetycznych na morfologię i topografię włosów. Niniejsza praca koncentruje się na dwóch technikach: skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM). Przedmiotem badań był wpływ produktu do włosów zniszczonych w wyniku zabiegów pielęgnacyjnych na strukturę powierzchni łodygi włosa oraz na zmiany właściwości mechanicznych komórek osłonki włosa, takich jak tarcie na powierzchni włosa, tarcie na krawędziach osłonek, chropowatość oraz wysokość komórek osłonki włosa.

### Materiały i metody

#### ■ Przygotowanie próbek

Włosy do analizy zostały pobrane od ochotników: przed pierwszym zastosowaniem produktu kosmetycznego, po pierwszym zastosowa-

niu oraz po sześciu jego zastosowaniach.

Wykorzystany w badaniu produkt kosmetyczny (1581) miał właściwości odbudowujące i poprawiające strukturę łodygi włosowej. Zawierał w swoim składzie m.in. filtry UV i masło shea. Składnik ten wykorzystywany jest w kosmetyce ze względu na jego doskonałe właściwości odżywcze. Masło shea wygląda na włosy i odżywia skórę głowy, przy czym nie tworzy tłustej warstwy. Ponadto naśladuje budowę chemiczną naturalną warstwę lipidową, wytwarzaną przez skórę. Zawarte w kosmetyku polimery kationowe, pokrywając łodygi włosowe zmieniają ich strukturę, dzięki czemu włosy stają się miękkie w dotyku, łatwe w rozczesywaniu i podatne na modelowanie, zabezpieczają też uszkodzone mechanicznie i chemicznie łodygi włosów.

Kosmetyk nakładany był przez ochotników na świeżo umyte włosy i po kilku minutach spłukiwany.

W trakcie badania ochotnicy zostali poproszeni o niezmienną ogólną pielęgnację włosów, co mogłoby mieć wpływ na wynik testu. Próbkę włosów do analizy SEM pobrano od 8 kobiet w wieku 24-61 lat. Wszystkie ochotniczki miały łodygi włosów o naruszonej ciągłości osłonki, co było spowodowane częstym stosowaniem zabiegów mechanicznych i chemicznych. Włosy użyte do testu zostały zebrane przez probantki podczas czesania z oczyszczonych uprzednio grzebieni i szczotek do włosów. Z każdej partii zebranych włosów losowo wybrano po 3 włosy.

Do analizy SEM próbki włosów o długości ok. 1,5 cm umieszczano na stolikach za pomocą pęsety. Losowo pobierane włosy napyłano stopem złota i palladu. Preparaty analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego LEO 1430VP firmy Zeiss. Obserwacje prowadzono przy powiększeniach:

500, 1000, 2000 i 5000 razy.

Obrazowanie AFM (Bioscope II Veeco) wykonywano w trybie kontaktowym, zbierając jednocześnie dane o topografii powierzchni włosa, kontrolera, ugięciu sprężynki oraz tarcie. Włosy umieszczano w wodzie dejonizowanej, a komorę cieczową stanowiła szalka Petriego z przytwierdzoną do zewnętrznej części dna żelazną płytką. Włos rozprostowany, ale nie naprężony, był przytwierdzony do dna za pomocą dwóch małych magnesów neodymowych. Ze względu na znaczne różnice morfologii różnych odcinków włosa, obrazowanie każdej próbki wykonywano w tym samym miejscu, tj. ok. 1,5 cm od cebulki. Mikrobekę AFM ustawiono prostopadle do kierunku włosa. Włosy każdej osoby obrazowane były osobną sondą pomiarową w celu uniknięcia przenoszenia zanieczyszczeń między próbkami. Losowo pobierano po trzy włosy – dla każdego włosa zarejestrowano 2 obrazy o rozmiarach 20 x 20 µm, pochodzące z różnych miejsc. Przed analizą każdy obraz poddany został zabiegowi odjęcia krzywizny włosa, przybliżonej przez wielomian drugiego stopnia.

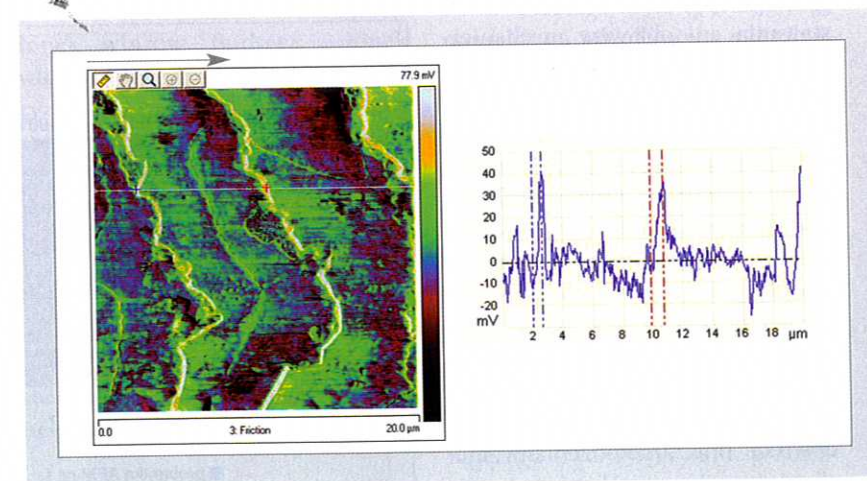
### Wyniki i dyskusja

#### ■ Analiza obrazów SEM

Badanie włosów przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego pozwoliło na ocenę stanu osłonki włosa, która jako warstwa zewnętrzna narażona jest na częste uszkodzenia.

Przed zastosowaniem produktu włosy ochotniczek charakteryzowały się widocznymi uszkodzeniami strukturalnymi oraz, według słów probantek, znaczną tendencją do wypadania. Dachówkowato ułożone komórki keratynocytów (tzw. łuski), z których zbudowane są osłonki włosów, silnie odstawały od powierzchni włosa, na której widoczne były liczne pęknięcia i rozwarstwienia. Krawędzie komórek osłonek były ostro zakończone, popękane i rozwarstwione. Można było dostrzec miejsca, gdzie struktura osłonek włosów była na tyle zniszczona, że odkrywała głębsze warstwy części korowej włosa. Dodatkowo powierzchnia włosów pokryta była mieszkanką różnych drobin i substancji tłuszczowych (ryc. 3 a).

Po pierwszej aplikacji testowanego produktu struktura powierzchni włosów uległa wyraźnej poprawie.

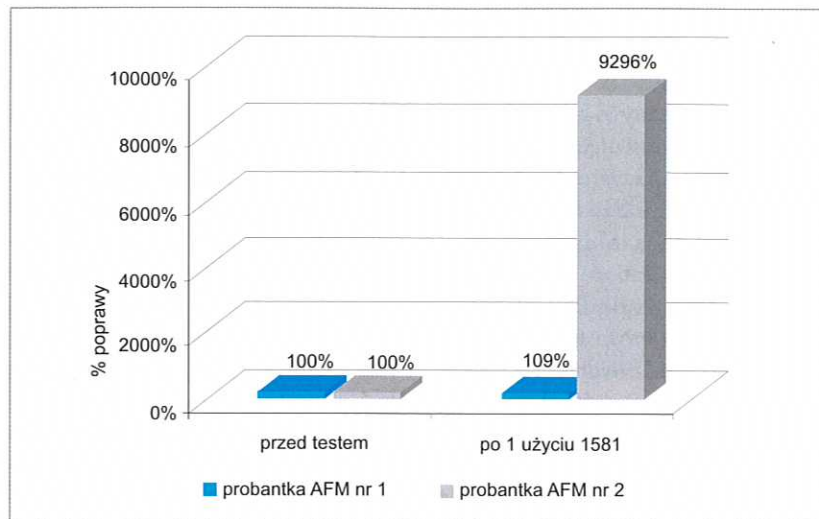


Ryc. 8  
Pomiar wartości tarcia na krawędzi osłonki – strzałka wskazuje kierunek skanowania.  
The evaluation the friction at the cuticle edge.

Zrogowaciałe keratynocyty osłonek włosów stały się bardziej przylegające, a na powierzchni włosa brak było widocznych rozwarstwień (ryc. 3 b). Powierzchnia włosów była pokryta dosyć grubą warstwą kosmetyku, co było związane z jego przyleganiem do uszkodzonych miejsc na powierzchni włosa. Zaobserwowano wnikanie kosmetyku w głąb łodygi włosa w miejscach odstawiania komórek osłonki oraz wypełnianie ubytków powstałych w miejscach ich pęknięć. Pielęgnacyjne składniki produktów kosmetycznych (tzw. kondycjonery) mają ładunek dodatni (np. kationowe środki powierzchniowo czynne), natomiast włosy mają ładunek ujemny, przez co przyciągają dodatnie cząstki środków pielęgnacyjnych. Powoduje to łatwe odkładanie się depozytów tych cząstek na powierzchni włosów. Uszkodzone łodygi włosów charakteryzują się większym ładunkiem ujemnym, dlatego też mają wyższe powinowactwo do kationowych środków powierzchniowo czynnych niż włosy zdrowe [14].

Obserwowane włosy miały gładką powierzchnię. W obrazie mikroskopowym komórki keratynocytów osłonek włosa (tzw. łuski) miały regularny układ. Nie stwierdzono odstawiania ani objawów mechanicznych uszkodzeń osłonek włosów. Po sześciu aplikacjach kosmetyku włosy pokryte były jego cienką warstwą. Obecność produktu stwierdzono jedynie na krawędziach komórek osłonki. Takie usytuowanie kosmetyku zabezpiecza komórki osłonki przed ponownym odstawianiem i pękaniem. Cienka warstwa ochronna nie obciążała włosów, ale skutecznie chroniła je przed negatywnym wpływem czynników środowiska oraz uszkodzeniami mechanicznymi powstałymi w czasie codziennej pielęgnacji (ryc. 3 c).

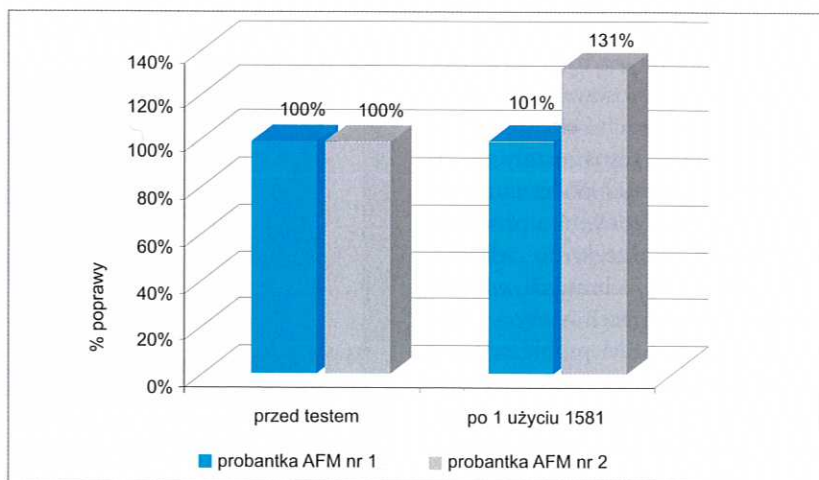
■ **Analiza obrazów AFM**  
W analizie AFM można zaobser-



Ryc. 9  
Tarcie na krawędzi komórek osłonki.  
Friction at the cuticle.

wować szczegóły morfologii włosa, jak również ubytki po odłamanych komórkach osłonek. Obrazowanie pokazuje ponadto osady na powierzchni włosa i tzw. ghost edges, czyli odciski łusek górnych warstw osłonki, które uległy odłamaniu, na warstwach dolnych (ryc. 4 i 5).

**1) Chropowatość włosa**  
Wyznaczenie średniej chropowa-



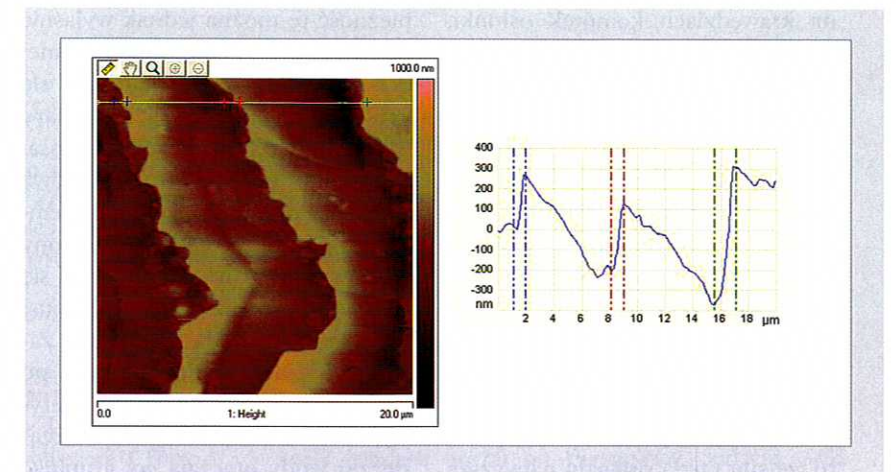
Ryc. 10  
Wysokość osłonki włosa.  
Hair cuticle height.

tości dla każdej próbki włosa wykonano przeznaczonym do tego przez producenta AFM programem. Uzyskany obraz topograficzny stanowił rodzaj mapy, gdzie każdemu punktowi przypisano pewną wysokość. Jeśli wszystkie te wartości zostaną uśrednione, to uzyskuje się średnią wysokość danego obrazu. Różnica między średnią wysokością obrazu a wysokością w każdym punkcie

stanowi miarę chropowatości danej powierzchni. W analizowanych pomiarach wykorzystano jej wartość skuteczną (pierwiastek średniej kwadratu tych różnic).

W czasie skanowania sondą AFM, której ostrze ma rozmiary pojedynczych nanometrów, zaobserwowano obecność grudek kosmetyku osadzonych na powierzchni włosa po jego jednokrotnym użyciu (ryc. 5). W tej skali pojawienie się osadów produktu skutkuje wzrostem pofałdowania powierzchni, a co za tym idzie – również wzrostem jej chropowatości (ryc. 8). Wzrost chropowatości w wyniku kuracji pozwala zatem wnioskować, że produkt kosmetyczny osadził się na powierzchni włosa i utrzymuje się nawet po jego zanurzeniu w wodzie.

Dotyychczasowe publikacje, które omawiały obrazowanie włosa za pomocą AFM, wykazały, że zastosowanie preparatów kondycjonujących powoduje wzrost chropowatości włosa w nanoskali [14,15]. Dzieje się tak dlatego, że preparat kosmetyczny nie pokrywa całej jego powierzchni jednorodnie, lecz po splukaniu formuje grudki, skupione najczęściej w zagłębieniach włosa – u podstawy i na złączeniach warstw osłonki łusek. Dzięki temu następuje wypełnienie ubytków osłonek łusek, powstałych podczas uszkodzeń mechanicznych, termicznych (suszenie, prostowanie) lub chemicznych (farbowanie włosów). Zjawisko to potwierdza również eksperyment przeprowadzony przez badaczy z Politechniki Federalnej w Zurychu i badaczy grupy L'Oréal. Zniszczone w wyniku chemicznego rozjaśniania włosy potraktowano odżywką zawierającą polimer PLL-g-PEG (Poly (l-lysine)-graft-poly (ethylene glycol)). Zastosowane do pomiaru techniki instrumentalne (AFM, spektroskopia XPS-X-ray Photoelectron Spectroscopy oraz Mikroskopia Fluorescenc-



Ryc. 11  
Pomiar wysokości osłonki.  
The evaluation of the cuticle height.

cyjna) wykazały nierównomierną adsorpcję polimeru na próbkach włosów, wzdłuż łodygi włosa. Odżywka koncentrowała się w zagłębieniach pomiędzy kolejnymi warstwami wchodzącymi w skład otoczki włosa [16].

Najnowsze badania potwierdziły wpływ procesu starzenia na topografię i właściwości mechaniczne włosów. Obrazowane AFM włosy pobrane od osób młodych miały regularną budowę, o wyraźnie zaznaczonych krawędziach komórek osłonek włosów. Budowa osłonek włosów osób młodych też charakteryzowała się dużą regularnością, czego nie obserwuje się dla włosów pochodzących od osób w wieku dojrzałym – te włosy miały nieregularną strukturę, z niewyraźnie zarysowanymi krawędziami komórek osłonek. Badania dowiodły również, że wraz z wiekiem wzrasta szorstkość powierzchni osłonki, co potwierdza zmiany w topografii osłonek włosa [17].

**2) Tarcie na powierzchni włosa**

Do oceny tarcia wykorzystano informację o poprzecznym skręceniu sprężynki podczas skanowania

łodygi włosa w kierunku cebulki. Miarą tarcia na powierzchni włosa był poziom napięcia uzyskiwany z układu optycznego. Informacja o średniej wartości tarcia dla zarejestrowanego obrazu z danej próbki była wyznaczana za pomocą programu producenta AFM.

Dla pomiarów prowadzonych w środowisku suchym dotychczasowe badania wykazywały wzrost tarcia na powierzchni włosa po zastosowaniu produktu kosmetycznego. Powodem tego było powstawanie menisku na styku ostrza mikrobalki z osadzoną na włosie warstwą kosmetyku i silnego oddziaływania między nimi [14]. O ile więc kosmetyk kondycjonujący w makroskali działa jak smar, to w nanoskali powoduje przyklejanie ostrza mikrobalki i wzrost tarcia. W środowisku wodnym obserwowano podobny efekt [16,18].

W naszych badaniach zaobserwowano znaczny wzrost tarcia po zastosowaniu produktu kondycjonującego (ryc. 7). Wyniki są zbieżne z danymi z literatury.

**3) Tarcie na krawędzi komórek osłonki**

Pomiaru tarcia dokonano także

na krawędziach komórek osłonki, a więc w miejscach, które mają największy wpływ na gładkość włosów. W tym celu wykonano przekrój zarejestrowanego obrazu lateralnego (tarcowego) i zmierzono wartość tarcia na krawędzi osłonki łuski względem jego średniego poziomu (ryc. 8). Dla każdego obrazu wykonano tyle przekrojów, aby uwzględnić wszystkie znajdujące się na nim krawędzie. Uzyskane wartości zostały następnie uśrednione.

Wykonana analiza wskazuje na to, że siły tarcia osiągały najwyższą wartość właśnie na krawędziach komórek. Tarcie w tych rejonach było modyfikowane przez zastosowanie produktu kosmetycznego. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku pomiarów średniego tarcia całej obrazowanej powierzchni, tarcie na krawędzi tzw. łuski wzrastało po zastosowaniu badanego preparatu (ryc. 9). Fakt ten dowodzi, że badany kosmetyk w największej ilości odkładał się u podstawy komórek osłonki.

#### 4) Wysokość komórek osłonki włosów

Wysokość komórek osłonki analizowano, dokonując przekrojów obrazów topografii keratynocytów osłonki włosów i mierząc ich wysokość od podstawy aż do krawędzi (ryc. 11). Wykonano tyle przekrojów, aby uwzględnić wszystkie znajdujące się na nim krawędzie. Uzyskane wartości uśredniono.

Wyniki analizy wskazują, że we włosach poddanych działaniu kosmetyku komórki osłonki odchylają się bardziej, niż ma to miejsce w przypadku włosów, które nie zostały poddane kuracji (ryc. 10). Fakt ten jest sprzeczny z wynikami uzyskanymi za pomocą SEM. Roz-

bieżność tę można jednak wyjaśnić różnymi warunkami dokonywanej oceny. Pomiary AFM odbywały się w wodzie dejonizowanej, a pomiary SEM w próżni. Powierzchnia włosów, w wyniku pokrycia hydrofobową warstwą lipidów ma ładunek ujemny, natomiast kosmetyk osadzony na powierzchni włosów, aby móc się na niej skutecznie utrzymać, musi mieć ładunek dodatni. Można zatem wysunąć hipotezę, że po umieszczeniu pokrytego kosmetykiem włosów w wodzie polarne cząsteczki wody otaczają go, grupując się i penetrując jego powierzchnię w miejscu, gdzie występuje hydrofilowy produkt kosmetyczny. Obecność wody prowadzi do zrywania wiązań wodorowych w keratynie i wydłużanie jej włókien. Różnice w zawartości wody w różnych obszarach komórek osłonki prowadzić będą do powstawania w nich naprężeń mechanicznych, skutkujących ich odchylaniem się. Ponieważ efekt ten może występować jedynie w wodzie, nie ma to wpływu na gładkość włosów po normalnym zastosowaniu kosmetyku, splukaniu go i wysuszeniu włosów. Dodatkowo odchylanie komórek osłonki sprzyja wypłukaniu zabrudzeń podczas mycia włosów, a także ułatwia przenikanie składników aktywnych w głąb włosów. Wynik ten, podobnie jak pomiary chropowatości i tarcia dowodzi, że zastosowany kosmetyk osadził się na włosie i pozostał na nim również po zanurzeniu w wodzie dejonizowanej.

#### Wnioski

Techniki mikroskopowe pozwalają w sposób obiektywny ocenić zmiany zachodzące w morfologii i topografii włosów. W przeprowa-

dzonym badaniu autorzy zaobserwowali zmiany w chropowatości włosów, tarcu na powierzchni osłonek włosów oraz na ich krawędziach, a także w ich przyleganiu do głębszych warstw części korowej włosów po zastosowaniu danego produktu o właściwościach pielęgnacyjnych. O ile w skali nano (badania techniką AFM) wzrastała chropowatość oraz siły tarcia na powierzchni włosów i jego krawędziach, o tyle w badaniu makroskopowym łodygi włosów były gładkie, miękkie w dotyku oraz bardziej podatne na układanie [15].

#### Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonego badania można powiedzieć, że SEM jest narzędziem umożliwiającym wizualną ocenę skuteczności działania produktu pielęgnacyjnego do włosów. Za pomocą tej techniki można obserwować zmiany w morfologii łodygi włosów po zastosowaniu kosmetyku. W celu wykonania bardziej dokładnych analiz należałoby przeprowadzić badania techniką AFM. Pozwala ona na ilościową ocenę parametrów morfologii osłonek włosów, takich jak chropowatość, tarcie i wysokość.

AFM stosuje się w badaniach małych obiektów (np. analizie poszczególnych komórek wchodzących w skład osłonek włosów, weryfikacji obecności kosmetyku oraz jego rozmieszczenia na włosie), natomiast SEM pozwala na analizę większych obiektów (np. całego włosów) [19].

Zaprezentowane wyniki badań przy zastosowaniu AFM i SEM mogą być przydatne w wiarygodnej ocenie skuteczności stosowania produktów do pielęgnacji włosów.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Jazienicka I., Chodorowska G., Budzińska J.: Włosy – fizjologia i zaburzenia struktury. *Dermatol. Estet.*, 2006, 8(2): 90-94.
2. Placek W.: Kosmetologia i farmakologia skóry. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007: 220-222.
3. Wolf H.: Choroby włosów. w: Braun Falco O., Plewig G., Wolff H., Landthaler M.: *Dermatologia*. Wyd. II, 2010, t. II: 1053-1062.
4. [www.e-diagnoza.pl/zdjecia/images/budowa-wlosa.jpg](http://www.e-diagnoza.pl/zdjecia/images/budowa-wlosa.jpg), link z dn. 25.05.2011.
5. Noszczyk M.: Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2010.
6. Santos Nogueira A.C., Joekes I.: Hair color changes and protein damage caused by ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B*, 2004, 27, 74(2-3): 109-117.
7. Sebetić K., Sjerobabski Masnec I., Cavka V., Biljan D., Krol I.: UV damage of the hair. *Coll Antropol*, 2008, 32(Suppl 2): 163-165.
8. Michałowski R.: Choroby włosów i skóry owłosionej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1975.
9. Michalak I., Poznańska-Kurowska K., Kaszuba A.: *Dermatologia dla kosmetologów*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego, Poznań, 2008: 284-285.
10. Fluhr J.W.: *Practical Aspects of Cosmetic Testing*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011: 227-245.
11. Agache P., Hubert P.: *Measuring the skin*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004: 255-270.
12. Oleś A.: *Metody doświadczalne fizyki ciała stałego*. Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa, 1998.
13. Piórkowska A.: *Zastosowanie mikroskopu sił atomowych w kosmetologii*. Praca magisterska. UMK, Toruń, 2010.
14. Bhushan B.: Nanoscale characterization of human hair and hair conditioners. *Progress in Materials Science*, 2008, 53(4): 585-710.
15. La Torre C., Bhushan B.: Nanotribological characterization of human hair and skin using atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 2005, 105: 155-175.
16. 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: 1938-1945.
17. Jeong K.H., Kim K.S., Lee G.J., Choi S.J., Jeong T.J., Shin M.K.: Investigation of aging effects in human hair using atomic force microscopy. *Skin Res Technol*, 2011, 17(1): 63-68.
18. 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): 37-56.
19. Poletti G., Orsini F., Lenardi C., Barborini E.: A comparative study between AFM and SEM imaging on human scalp hair. *J Microsc*, 2003, 211(Pt3): 249-255.

#### Adres do korespondencji:

Bożena Tyszczyk  
Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris  
ul. Puławska 107A  
02-595 Warszawa