

K. Bazela*

Metody alternatywne a ocena bezpieczeństwa kosmetyków i ich składników

Słowa kluczowe: metody alternatywne, ocena bezpieczeństwa kosmetyków

Streszczenie

Komisja Europejska nałożyła na przemysł kosmetyczny terminy przejściowe, po upływie których w krajach Unii Europejskiej ma obowiązywać całkowity zakaz testowania kosmetyków i ich składników na zwierzętach. Dnia 11 marca tego roku wszedł w życie kolejny z zakazów - zakaz wykonywania testów składników kosmetyków na zwierzętach. Zakaz testów na zwierzętach pozostaje jednym z najbardziej kontrowersyjnych tematów dla branży kosmetycznej. Przepisy prawne dotyczące testów z wykorzystaniem zwierząt oraz oceny bezpieczeństwa produktów kosmetycznych i substancji chemicznych są niejednoznaczne i trudne w interpretacji. Pomimo licznych programów badawczych prowadzonych w laboratoriach Unii, dla większości parametrów toksykologicznych nie zatwierdzono jeszcze metod alternatywnych.

Poniższy artykuł przedstawia metody alternatywne użyteczne dla oceny bezpieczeństwa składników kosmetycznych oraz gotowych produktów kosmetycznych.

■ Ustawodawstwo Unii Europejskiej a metody alternatywne

Dyrektywa 2003/15/WE czyli 7. Poprawka do Dyrektywy Kosmetycznej 76/768/WE nałożyła na przemysł kosmetyczny rygorystyczne terminy wprowadzające zakaz testowania kosmetyków i składników kosmetycznych na zwierzętach (1):

1. od września 2004 r.

- zakaz testowania na zwierzętach gotowych produktów kosmetycznych,
- zakaz testowania na zwierzętach składników lub ich kombinacji jeśli odpowiednia metoda alternatywna została zaadoptowana do załącznika V Dyrektywy 67/548/EC

2. od marca 2009 r.

- zakaz wykonywania testów na zwierzętach składników kosmetyków, z wyjątkiem badań toksyczności dawki powtarzanej (przewlekłej/podprzewlekłej), toksykokinetyki, toksycznego wpływu na rozrodczość

3. od marca 2013 r.

- całkowity zakaz wykonywania testów substancji chemicznych na zwierzętach pod warunkiem, że dostępne będą odpowiednie metody alternatywne.

Duży wpływ na rozwój i walidację metod alternatywnych wywiera wprowadzone w 2007r. rozporządzenie REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals). Celem projektu jest rejestra-

cja wszystkich substancji chemicznych obecnych na rynku Unii Europejskiej. Inicjatywa ta z pewnością przyspieszy rozwój nowych metod alternatywnych oraz walidację już istniejących, gdyż dla rejestracji substancji niezbędne jest przeprowadzenie oceny bezpieczeństwa. Jednakże wobec faktu, że dla większości parametrów toksykologicznych nie są dostępne odpowiednie metody alternatywne, ocena bezpieczeństwa będzie nadal wymagała testów z udziałem zwierząt.

Przemysł kosmetyczny stał się pionierem w ograniczaniu liczby zwierząt wykorzystywanych w badaniach bezpieczeństwa substancji chemicznych. Według ostatniego Sprawozdania Komisji dla Rady i Parlamentu Europejskiego (Bruksela, 2008) na temat liczby i rodzaju zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych w latach 2003-2006 łączna liczba zwierząt w badaniach bezpieczeństwa kosmetyków znacząco spadła. Do oceny toksykologicznej substancji chemicznych wykorzystywanych jest tylko 8% łącznej liczby zwierząt, na których wykonywane są eksperymenty, z czego zaledwie 0,5% to badania bezpieczeństwa kosmetyków (2).

■ Metody alternatywne - definicja

Definicja metod alternatywnych zaproponowana została w 1959r przez Williama Russela i Rexa Burcha, członków brytyjskiej organizacji Universities Federation for Animal Welfare. Mając na celu humanitarne traktowanie zwierząt uczestniczących w badaniach nauko-

wych stworzyli oni zasadę „3R”: *reduction* (zmniejszenie), *refinement* (doskonalenie) oraz *replacement* (zastąpienie).

Zmniejszenie oznacza takie zaplanowanie badań, by pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników przy użyciu jak najmniejszej liczby zwierząt. Badania na zwierzętach podlegają ciągłemu doskonaleniu i rozwojowi, by zapewnić zwierzętom humanitarne traktowanie. Kolejnym celem jest zastępowanie eksperymentów z użyciem zwierząt modelami badawczymi „nie odczuwającymi” cierpień czyli modelami *in vitro* i *in silico*.

Zgodnie z powyższą definicją metody alternatywne to nie tylko metody *in vitro*, ale również ulepszone, zmodyfikowane metody *in vivo* (3).

■ Walidacja metod alternatywnych

Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM ang. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*) odgrywa kluczową rolę w rozwoju i walidacji metod alternatywnych na terenie Unii Europejskiej. Organizacja ta, powołana przez Komisję Europejską w 1992 r., pozostaje najważniejszym źródłem informacji o metodach alternatywnych. ECVAM stanowi punkt wymiany informacji na temat testów alternatywnych, koordynuje współpracę między ustawodawcami, przemysłem i grupami chroniącymi prawa zwierząt.

Na stronie internetowej ECVAM:

<http://ecvam.jrc.it/>

dostępna jest pełna lista metod alternatywnych: zawartych w ustawodawstwie UE (Część B Aneksu V do Dyrektywy 67/548/EEC), zwalidowanych przez ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), lecz nie zawartych jeszcze w ustawodawstwie UE oraz metod w trakcie rozwoju i walidacji.

Ponadto organizacja ta stworzyła bazę danych metod alternatywnych ECVAM DataBase Service on Alternative Methods (DB-ALM):

<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>, gdzie dostępne są aktualne, szczegółowe protokoły dla metod alternatywnych.

Proces rozwoju, walidacji i implementacji do ustawodawstwa nowej metody alternatywnej jest długi - trwa średnio od 6 do 8 lat. Dotychczasowe doświadczenia w zakresie wdrażania metod alternatywnych do ustawodawstwa pozwalają przypuszczać, że wyznaczony przez Komisję Europejską termin całkowitego zakazu wykonywania testów na zwierzętach może być nie dotrzymany.

■ Ocena bezpieczeństwa kosmetyku a metody alternatywne

Zgodnie z Dyrektywą Kosmetyczną 76/768/WE producent kosmetyku zobowiązany jest przeprowadzić ocenę bezpieczeństwa produktu wprowadzanego na rynek. Ocena ta, zgodnie z wytycznymi SCCP (Komitetu Naukowego ds. Produktów Konsumenckich przy Komisji Europejskiej) powinna zawierać dane dotyczące toksyczności ostrej, własności żrących i drażniących (skórę i oczy), własności uczulających skórę, absorpcji przez skórę oraz mutagenności/genotoksyczności. Ponadto ocena bezpieczeństwa może obejmować dane dotyczące toksyczności przewlekłej, fototoksyczności, działania kancerogennego, toksycznego wpływu na rozród oraz toksykokinetyki. Obecnie określenie większości z wymienionych parametrów toksykologicznych możliwe jest tylko po wykonaniu testów na zwierzętach (1, 4-7).

■ Metody alternatywne dostępne w UE dla celów regulacyjnych

Działanie żrące skórę

Test działania żrącego na skórę opiera się na wykorzystaniu modeli 3D naskórka (EC B.40, OECD 431; EC B.40, OECD 431). Naskórek stworzony w warunkach *in vitro* zachowuje funkcje barierowe, a profil lipidowy tych modeli jest niemal identyczny jak *in vivo*. Ocena własności żrących opiera się na badaniu własności cytotoksycznych przy pomocy ilościowego testu kolorymetrycznego MTT polegającego na redukcji soli tetrazoliowej przez komórki aktywne metabolicznie. Obecnie na potrzeby tego testu oficjalnie zatwierdzono wykorzystanie dwóch modeli naskórka EpiSKIN™ i EpiDerm™,

kolejne modele (CORROSITEX, SkinEthic™) są na etapie walidacji

Alternatywą dla testów na modelach naskórka jest test przezskórnej oporności elektrycznej (TER) wykonywany na fragmentach skóry szczura (EC B.40, OECD 430).

Działanie fototoksyczne

Badanie własności fototoksycznych prowadzone jest na hodowli fibroblastów mysich Balb/c 3T3 (EC B.41, OECD 432). Ocenie podlega żywotność komórek przy użyciu testu wychwytu czerwieni obojętnej (NRU, Neutral Red Uptake). Oprócz testów działania fototoksycznego substancji kosmetycznych metoda ta znalazła zastosowanie w ocenie skuteczności filtrów przeciw promieniowaniu UV.

Działanie mutagenne/genotoksyczne

Ocena mutacji genowych oraz aberracji chromosomów możliwa jest przy użyciu szeregu testów alternatywnych dostępnych w ustawodawstwie unijnym (EC B.13/14, OECD 471; EC B.17, OECD 476; EC B.10, OECD 473; OECD 487). W ocenie bezpieczeństwa produktów kosmetycznych i ich składników najczęściej wykorzystywany jest test Ames'a (bakterie *Salmonella typhimurium*) (EC B.13/14, OECD 471). Jednakże w licznych przypadkach test Ames'a daje wynik fałszywie pozytywny, który nie koreluje z wynikami testów *in vivo*. Dlatego też, według opinii SCCP, do oceny mutagenności wciąż wymagane jest wykonanie testów na zwierzętach.

Unia Europejska zatwierdziła ponadto dwie inne metody, w których liczba zwierząt użytych do eksperymentu została znacznie zredukowana – jest to **badanie toksyczności ostrej** oraz **własności uczulających**. Według definicji metod alternatywnych metody te zgodne są z kryterium redukcji oraz udoskonalenia, wciąż jednak wymagają eksperymentów z udziałem zwierząt.

Toksyczność ostra

Badanie toksyczności ostrej polega na dwutygodniowej obserwacji efektu jednorazowego podania badanej substancji zwierzęciu (lub kilkakrotnego jej podania w ciągu pierwszej doby) (EC.B1bis, OECD

420; ECB.1tris, OECD 423; OECD 425). Parametrem służącym do określenia toksyczności ostrej jest dawka letalna LD₅₀, czyli dawka substancji, która powoduje zgon 50% zwierząt. Klasyczny sposób określania LD₅₀ polegał na podaniu różnych dawek substancji sześciu lub siedmiu grupom liczącym po 20 zwierząt. Obecnie stosuje się metodę stopniowania dawki wymagającą użycia średnio 16 zwierząt, jednakże ECVAM prowadzi walidację testu, który pozwoliłby zredukować liczbę zwierząt do 6.

Działanie uczulające skórę

Działanie uczulające skórę określa się poprzez ocenę tempa proliferacji limfocytów przy pomocy inkorporacji ³H tymidyny do DNA (test LLNA, Local Lymph Node Assay (EC B.42, OECD 429)). Choć test LLNA wciąż jest wykonywany na zwierzętach, udoskonalenie tej metody pozwoliło na znaczącą redukcję ich liczby.

- **Metody alternatywne zwalidowane przez ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), lecz nie zawarte jeszcze w ustawodawstwie UE.**

Do metod tych zaliczamy: **testy działania drażniącego na skórę, ocenę absorpcji przezskórnej *in vitro*, ocenę działania genotoksycznego i embriotoksycznego** (4-7).

Działanie drażniące skórę

Testy działania drażniącego skórę wykonywane są, podobnie jak badania własności żrących, na modelach naskórka. Badanie własności drażniących substancji chemicznych oraz gotowych wyrobów kosmetycznych opiera się również na ocenie działania cytotoksycznego na komórki naskórka (test MTT). Różnice między testami dotyczą czasu ekspozycji modelu na działanie substancji oraz czasu, po którym przeprowadzana jest ocena. Czułość testu działania drażniącego skórę może zostać zwiększona poprzez oznaczenie sekrecji jednego z mediatorów reakcji zapalnej interleukiny 1α. Walidację ESAC uzyskały dotychczas modele EpiSKIN™, EpiDerm™ oraz SkinEthic™.

Wchłanianie przez skórę

Do oceny wchłaniania substancji chemicznych przez skórę wykorzystuje się model perfuzji (komora Franz'a). Testuje się użyteczność wycinków skóry zwierzęcej, ludzkiej oraz modeli 3D z wykorzystaniem substancji chemicznej znakowanej radioaktywnie lub fluorescencyjnie (OECD 428).

- **Metody w trakcie rozwoju i walidacji:**

Dotychczas nie zatwierdzono metod alternatywnych dla: **działania drażniącego na oko, toksyczności przewlekłej, działania kancerogennego, toksyczności reprodukcyjnej oraz toksykokinetyki** (4-7).

Działanie drażniące oko

W trakcie rozwoju i walidacji znajduje się szereg testów pozwalających ocenić działanie **drażniące oko**. Choć żadna z tych metod nie jest jeszcze obecna w prawodawstwie unijnym, są one często prowadzone na potrzeby przemysłu kosmetycznego, a ich użycie jest w UE honorowane.

Metody te opierają się na wykorzystaniu izolowanej rogówki (wołu, królika, kurczaka) pochodzącej z materiału pozyskanego z rzeźni. Analiza uszkodzeń rogówki opiera się na pomiarze przepuszczalności światła przez rogówkę, substancja chemiczna podlegająca ocenie znakowana jest fluorescencyjnie.

Oprócz powyższych metod *ex vivo* do często wykonywanych testów należy test HET-CAM (Hen's Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane) – na błonie kosmówkowo-omoczniowej jaja kurzego, w którym ocenie podlega morfologia błony kosmówkowo-omoczniowej – liza, koagulacja oraz stan naczyń krwionośnych. Testy te dają miarodajne wyniki dla substancji silnie drażniących, natomiast w przypadku słabego potencjału drażniącego konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań z udziałem zwierząt. Ponadto trwają badania nad wykorzystaniem do oceny działania drażniącego oko modelu 3D rogówki (EpiOcular™) oraz analizy komputerowej (Q)SAR (Quantitative Structure-Activity Relationship).

Dla badań **toksyczności przewlekłej, działania kancerogennego, toksyczności reprodukcyjnej** oraz **toksykinetyki** nie zatwierdzono dotychczas metod alternatywnych. Choć w laboratoriach unijnych toczą się, finansowane z różnych źródeł, badania w tych obszarach, nie ulega wątpliwości, że ich wyniki nie będą znane w roku 2013.

Nadal pracuje się nad rozwojem szeregu metod, które spełniają już jedną z zasad 3R, ale wciąż wymagają użycia zwierząt m.in. ocena toksyczności ostrej (droga doustna, inhalacyjna, podanie przez skórę), działanie uczulające na skórę. Dobrym przykładem są tu prace nad zastąpieniem wykonywanego na myszach testu LLNA. ECVAM prowadzi procedurę walidacji testu *in vitro* z wykorzystaniem komórek dendrytycznych krwi (analiza ekspresji CD86 markera aktywacji tych komórek) oraz metod wykorzystujących modelowanie komputerowe (programy DEREK, CASE). Szacuje się, że wyniki tych badań będą znane po roku 2010.

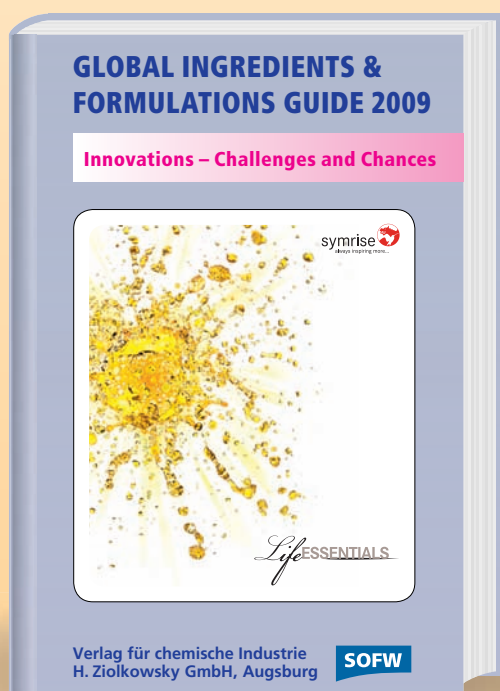
■ Podsumowanie

W ciągu ostatniego dziesięciolecia nastąpił znaczący postęp w rozwoju i walidacji metod alternatywnych służących ocenie bezpieczeństwa substancji chemicznych, w tym substancji używanych do produkcji kosmetyków. Obecnie metody te znajdują zastosowanie głównie do identyfikacji zagrożenia (np. rozróżnienia substancji drażniących od nie drażniących, ang. *hazard identification*). Natomiast ocena bezpieczeństwa (ang. *risk assessment*) składników kosmetycznych powoduje spore trudności.

Największy sukces odniesiono w rozwoju metod alternatywnych służących ocenie toksyczności miejscowej oraz dla testów oceniających krótkoterminowe działanie substancji. W większości są to metody polegające na redukcji liczby zwierząt w eksperymencie (kryterium *reduction*) oraz oparte na ich humanitarnym traktowaniu (kryterium *refinement*). Brak jest metod alternatywnych dla oceny efektów długoterminowych substancji chemicznych oraz testów oceniających ich wpływ na funkcjonowanie całego organizmu. Metod alternatyw-

Global Ingredients & Formulations Guide 2009

Innovations – Challenges and Chances



- REACH • economic solutions • new ingredients
- new trends • neue technologies • new formulation techniques • formulations • company index
- suppliers

In critical times it is even more important to consider innovations. Only innovative companies can master the crisis and keep their position in the global market place.

A German proverb says: "Necessity is the mother of invention". This saying gains new meaning these days. At all times humans had to face crisis and overcame it with new ideas.

Today the motto must be: "Innovation masters crisis". This is also true for cosmetic and personal care products. To neglect research and development in these days for cost saving reasons, can be fatal in the future. Innovative competitors can gain ground and strengthen their market position. Therefore for all producers of cosmetic and personal care products it is essential to know all innovations in formulation techniques and ingredients.

The **GI&FG 2009** focusses on this subject (see content overleaf).

• 532 Pages • 10th Edition • German Version available also

ORDER FORM

Order-No. 500-1059

____ Copy(ies) **Global Ingredients & Formulations Guide 2009** · Innovations – Challenges and Chances ISBN: 978-3-87846-272-9
Price: € 75.- / sFr 130.- (+ Shipping and Handling)

Company _____ Customer-No. _____
Name _____ Tel. _____
Street / P.O. Box _____ Fax _____
Zip Code, City _____ E-mail _____
VAT Id. No. (if EU) _____ Date, Signature _____

PAYMENT

Credit card Visa Amex Mastercard

Invoice/Bank Transfer

Card-No. _____

Exp. Date _____

Name of Card Holder _____

Send your order to:

· Verlag für chemische Industrie, H. Ziolkowsky GmbH
· P.O. Box 10 25 65 · 86015 Augsburg · Germany
· Tel: +49 (0)821 3 25 83-27 (Ruth Wudeneh)
· Fax: +49 (0)821 3 25 83-23 · E-Mail: wudeneh@sofw.com

Order online: www.sofw.com/books

nych spełniających kryterium *replacement* zasady 3R, czyli całkowicie eliminujących doświadczenia z udziałem zwierząt, jest zdecydowanie najmniej.

Literatura

- (1) 76/768/EEC-Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official Journal L262, 27/09/1976, p. 169
- (2) Sprawozdanie na temat opracowania, uznawania i prawnego przyjmowania metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach w branży produktów kosmetycznych (2007), Sprawozdanie Komisji dla Rady i Parlamentu Europejskiego, Bruksela, 2.7.2008, KOM (2008) 416
- (3) Russel B., Russel W.M.S. and Burch R.L. The principles of humane experimental technique. Methuen and Co Ltd., London, UK, 1959
- (4) Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, A Report Prepared in the Context of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive for Establishing the Timetable for Phasing Out Animal Testing, ATLA 33, Suppl. 1, 2005
- (5) SCCP/1005/06: The SCCP's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, adopted by the SCCP during the 10th plenary meeting of 19th December 2006
- (6) SCCP/1111/07: Memorandum on Actual Status of Alternative Methods on the Use of Experimental Animals in the Safety Assessment of Cosmetic Ingredients in the European Union, 19 June 2007
- (7) SCCP 6th Revision: The SCCP'S Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 19 December 2006

*Adres do korespondencji z autorem:

Karolina Bazela,
Centrum Naukowo-Badawcze
Dr Irena Eris,
ul. Puławska 107A, 02-595 Warszawa,

karolina.bazela@eris.pl

Global Ingredients & Formulations Guide 2009 – Content

Innovation and REACH

REACH in Practice, 5th International Fresenius Chemicals Policy Conference (C.S. Koch)

Innovation and Economic Solutions

Feasibility Studies Regarding Manufacturing of Submicron Systems Using a New "Rotor/Rotor"-Processing facility (G. Kutz, V. Salzman, M. Weber, A. Lewandowski)

Innovation and New Ingredients

Luvigel® Advanced (Polyquaternium-86) – A New Cationic Thickener with Styling and Conditioning Benefits (P. Hoessel, J. Baslan, S. Nguyen-Kim)

Novel Graft Polymer Boosts SPF Performance (L. Marlier, J. Cincotta, T. Martin, W. Van Drunen)

Delivering Softening Benefits from a Shampoo System (T. Gao, J.-M. Tien, A. Bidaye, S. Cardinali, and J. Kinney)

SKINASENSYL® – The Innovation from Neurocosmetics Research for Calming Hypersensitive Skin (J. Ivosevic-Zaper)

A Patented Multifunctional Ester for Personal Care Applications (L. Bouldin, D. Smith, M.K. Smith, R.J. Smith)

OLEOSOMES – Natural Emulsifying Systems (D.C. Long, J. Ferguson)

Cococin™ – The Nourishment Factor®: A Natural Reservoir of Nutrients for Beauty from the Inside and Out (L. Prakash and M. Majeed)

Polyether-Modified Silicones for Cosmetic Applications (J. Newton, I. Vervier, B. Durand, and S. Masse)

Interleukin-1 Alpha – An Epidermal Cytokine Critical for Skin Renewal (I. Pomytkin)

MIRAGE Borosilicate Pigments – Highlights for Decorative Cosmetics (K. Steinbach, U. Schmidt)

Dermofeel® sensolv: A Skin-Feel Like Silicon – But Without Silicon

Symbio®muls GC: The New Natural "One-Fits-All-W/O-Emulsifier"

Dermofeel® P-30: Natural Hair Care – A Paradoxon?

Innovation and New Trends

Matrix Proteins of the Papillary Dermis – Primary Targets of Intrinsic Dermal Aging? (D. Boudier, V. Dubreuil, L. Marchand, N. Guichard, B. Closs)

A New Generation of Green Surfactants and Emulsifiers

Solving Low pH Formulating Challenges with Naturally Derived Thickeners (D. Peterson, M. Tolchinsky)

Innovation and New Technologies

3D In Vitro Technology: Modelled Skin Helps Animals in Reaching Relief (C. Rüffer)

Molecular Biological Mechanisms of Skin Aging (W. Voss, G. Schlippe)

Beneficial Fatty Oils for Promoting Healthy Skin

A New Strategy in Anti-Aging Cosmetics: DORMINS – Give your skin and hair a rest (V. Maienschein)

Innovation and Formulation Techniques

HYBRID – Photostable UVA Protection; For sun protection and daily care products

A Formulation Strategy for High SPF Sun Care Products (J. Hewitt)

Formulations

• Disclaimers for the formulations • Skin Care • Hair Care • Body Care • Decorative Cosmetic

Company Index

Contact addresses, company description, product range, service

Subject Index

Suppliers' Directory

K. Bazela*

Alternative methods and safety assessment of cosmetic products and cosmetic ingredients

Keywords: alternative methods, safety assessment of cosmetic products

Abstract

The European Commission imposed transition periods on the cosmetic industry. After their expiration, a complete ban of animal testing of cosmetic products and their ingredients will be in force for the member states of the European Union. On 11th March of this year a new ban went into force - a ban on animal testing of cosmetic ingredients. The prohibition of animal testing remains one of the most controversial topics for the cosmetic industry. The legal regulations regarding animal testing and the safety assessment of cosmetic products and chemical substances are ambiguous and difficult to interpret. Despite many research programmes conducted in the European Union's laboratories, alternative methods for most toxicological parameters have not yet been approved. The article quoted below presents alternative methods which are useful in the safety assessment of cosmetic ingredients and finished cosmetic products.

■ European Union legislation and alternative methods

Directive 2003/15/WE, i.e. the 7th Amendment to the Cosmetics Directive 76/768/WE imposed rigorous time limits on the cosmetics industry, establishing a ban on animal testing of cosmetics and cosmetic ingredients (1).

1. As of September 2004:

- a ban on animal testing of finished cosmetic products,
- a ban on animal testing of ingredients or their combination if a relevant alternative method is adopted in the Annex V to Directive 67/548/EC

2. As of March 2009:

- a ban on animal testing of cosmetic ingredients, with the exception of repeated-dose toxicity (chronic / sub-chronic), toxicokinetics and reproductive toxicity testing.

3. As of March 2013:

- a complete ban on animal testing of chemical substances under the condition that relevant alternative methods will be available.

The regulation concerning Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals (REACH), introduced in 2007, has a big impact on the development and validation of alternative methods. The aim of the project is to register all chemical substances existing on the European Union market. This initiative will surely accelerate the development of new alternative methods and the validation of

those which are already in place, as safety assessment is indispensable for the registration. However, in the light of the fact that for most toxicological parameters there are no available adequate alternative methods, safety assessment will continue to require animal testing.

The cosmetic industry became the pioneer in limiting the number of animals used in safety assessment of chemical substances. According to the latest Report of the European Commission for the European Council and the European Parliament (Brussels, 2008) on the number and type of animals used for experimental purposes in the years 2003-2006, the total number of animals used for safety assessment of cosmetics has dropped significantly. Only 8% of animals used for experimental purposes are involved in toxicological assessment of chemical substances, out of which only 0.5% constitute cosmetics' safety assessment (2). Connected most often to the information about novelties, competitors' activity etc., and enables relatively fast reaction to the changing market situation. At present we should adopt the other way of understanding this term - the access to the information should enable to overtake the competitors' activity, especially full innovation in a scope of formulation of cosmetics and modern conceptions of their activity.

■ Alternative methods - definition

The definition of alternative methods was brought forward in 1959 by William Russel and Rex Burch, members of the

British organisation Universities Federation for Animal Welfare. With the objective of assuring humanitarian treatment of animals participating in scientific research, they introduced the principle of "3R": *reduction, refinement and replacement*.

Reduction means planning research in a way which allows for obtaining credible results while using the smallest possible number of animals. Animal testing is subject to continuous *refinement* and development in order to ensure humanitarian treatment of animals. The next objective is to *replace* experiments involving animal testing with research models which "do not feel" pain or with *in vitro* and *in silico* models.

According to the above definition, alternative methods are not only *in vitro* methods, but also the improved and modified *in vivo* methods (3).

■ Validation of alternative methods

The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) plays a key role in the development and validation of alternative methods within the European Union. This organisation, established by the European Commission in 1992, remains the most important source of information about alternative methods. ECVAM acts as the point of information exchange on alternative testing, coordinates co-operation between legislators, the industry and animal rights groups.

The website of ECVAM:

<http://ecvam.jrc.it/>

provides a complete list of alternative methods: those contained in the legislation of the European Union (Part B of Annex V to Directive 67/548/EEC), those validated by ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) but not yet contained in the legislation of the European Union and methods which are under development or in the process of validation.

Moreover, the organisation has established a DataBase Service on Alternative Methods (DB-ALM):

<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>,

where the current, detailed protocols for alternative methods are available.

The process of development, validation and implementation into the legislation of a new alternative method is a long one – it lasts approximately 6 to 8 years. Previous experience with the implementation of alternative methods into the legislation leads to the assumption that the European Commission's time limit of the complete ban on animal testing may not be met.

■ Safety assessment of cosmetic products and alternative methods

According to the Cosmetics Directive 76/768/WE, the producer of a cosmetic product is obliged to conduct a safety assessment of the product being introduced to the market. This assessment, in line with the guidelines laid down by the SCCP (the European Commission's Scientific Committee on Consumer Products) should contain data on acute toxicity, corrosive or irritant properties (to skin and eyes), skin-sensitizing properties, skin absorption and mutagenicity/genotoxicity. Moreover, safety assessment can include data on chronic toxicity, phototoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity and toxicokinetics. Currently, it is possible to determine the majority of the listed toxicological parameters only after the performing animal testing (1, 4-7).

■ Alternative methods available in the European Union for regulation purposes

Until now, the European Union legislation provided for alternative methods enabling the assessment of **skin corrosion, phototoxicity and mutagenicity / genotoxicity** (4-7).

Skin corrosion

Tests for skin corrosion properties are based on 3D models of the epidermis (EC B.40, OECD 431; EC B.40, OECD 431). Epidermis created in *in vitro* conditions retains its barrier functions and their lipid

profile is almost identical to *in vivo*. The assessment of corrosive properties is based on cytotoxic properties with the use of MTT colorimetric assay, involving the reduction of tetrazolium salt by metabolically active cells. Currently, the use of two types of epidermis, EpiSKIN™ and EpiDerm™, has been officially approved for the purpose of this test and other models (CORROSITEX, SkinEthic™) are in the process of validation.

An alternative to tests using epidermis models is the Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER), performed on rat skin fragments (EC B.40, OECD 430).

Phototoxicity

Phototoxicity tests are performed on mouse fibroblast cultures Balb/c 3T3 (EC B.41, OECD 432). The viability of cells is evaluated with the use of Neutral Red Uptake (NRU) assay. Apart from phototoxicity tests of cosmetic substances, this method is also applied in the assessment of UV filters effectiveness.

Mutagenicity / genotoxicity

The assessment of gene mutations and chromosome aberrations is possible with the use of several alternative tests available within the European Union legislation (EC B.13/14, OECD 471; EC B.17, OECD 476; Ec B.10, OECD 473; OECD 487). The Ames test (*Salmonella typhimurium* bacteria) is the most often used assay in the assessment of safety of cosmetic products and their ingredients (EC B.13/14, OECD 471). However, it has been observed that in many cases the Ames test gives a falsely positive result, which does not correlate with the *in vivo* tests' results. Therefore, in the view of the SCCP, animal testing is still required for mutagenicity assessment.

Moreover, the European Union has approved two other methods, where the number of animals involved in the experiment is significantly reduced – namely, the **acute toxicity test** and the **sensitizing properties test**. According to the alternative methods' definition, these methods conform to the criteria of reduction and refinement, but they still necessitate experiments involving animals.

Acute toxicity

The test for acute toxicity involves a 2 week observation of the effect of administering an animal with a single dose of the tested substance (or administering several doses within the first 24 hours) (EC.B1 bis, OECD 420; ECB.1 tris, OECD 423; OECD 425). The parameter used for determining acute toxicity is the LD₅₀ lethal dose, i.e. a dose of the substance which causes death in 50% of the animals. The standard way to determine the LD₅₀ was to administer different doses of a substance to six or seven groups of 20 animals each. Currently, the method used is one of sequential administration of the dose, requiring the participation of an average of 16 animals. However, the ECVAM is in the process of validating a test which would allow for reducing the number of animals to 6.

Skin sensitization

Skin-sensitizing properties are determined by assessing the rate of proliferation of lymphocytes with the incorporation of ³H thymidine into the DNA – Local Lymph Node Assay (LLNA) (EC B.42, OECD 429). Although the LLNA assay is still performed on animals, the refinement of this method has allowed for a significant reduction of their number.

- Alternative methods validated by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), but not yet contained in the European Union legislation

These methods include: **tests for skin irritating properties**, the **assessment of *in vitro* dermal absorption** as well as the assessment of genotoxic and embryotoxic properties.

Skin irritation

Tests for skin irritating properties are performed, similarly to corrosive substances tests, on models of the epidermis. The testing for irritating properties of chemical substances and finished cosmetic products is also based on the assessment of cytotoxic action on the epidermal cells (MTT assay). The differences between the tests lie in the duration of a model's exposition to the substance and

the time after which the assessment is made. The sensitivity of a skin irritation test can be increased by labelling the secretion of one of the mediators of inflammatory reaction of interleukin 1 α .

Until now, the EpiSKINTM, EpiDermTM and SkinEthicTM models have been validated by ESAC.

Dermal absorption

In order to assess dermal absorption of chemical substances, the perfusion model is used (Franz chamber). The usability of slices of animal and human skin as well as 3D models is tested with the use of a chemical substance labelled radioactively or with fluorescence (OECD 428).

- Methods in the process of development and validation:

Until now, there are no approved alternative methods for: eye irritation, chronic toxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity and toxicokinetics (4-7).

Eye irritation

Several tests enabling the assessment of eye irritation are currently being developed and validated. Although none of these methods are contained in the European Union legislation yet, they are often applied in the cosmetic industry and their use is accepted in the European Union.

The methods in question are based on the use of an isolated cornea (of ox, rabbit, chicken) originating from a material obtained from a slaughterhouse. The analysis of corneal damage consists of measuring light transmission by the cornea. The chemical substance is marked with fluorescent labels.

On top of the above-mentioned *ex vivo* methods, popular tests include the HET-CAM assay – Hen's Egg Test on the Chorio-Allantoic Membrane, assessing the morphology of the chorio-allantoic membrane – lysis, coagulation and the condition of blood vessels.

These tests provide reliable results for strongly irritating substances, however in the case of weak irritating potential it is

necessary to perform additional tests with the participation of animals.

Moreover, the use of a 3D model of the cornea (EpiOcularTM) and (Q)SAR computer analysis (Quantitative Structure-Activity Relationship) in the assessment of eye irritating properties is currently being researched.

Alternative methods for **chronic toxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity** and **toxicokinetics** have not been approved yet. Although studies in these areas (financed from different sources) are in progress in the laboratories of the European Union, it is clear that their results will not be known in 2013.

A series of other methods, already meeting one of the 3R principles, are under development but still require the use of experimental animals – including acute toxicity assessment (routes of delivery: oral, inhalation and dermal), skin-sensitizing properties. A good example is the work in progress on the replacing of the LLNA assay performed on mice. ECVAM is in the process of validating an *in vitro* test with the use of dendritic cells (analysis of CD86 expression of the activation marker of these cells) and methods using computer modelling (DEREK, CASE programmes). It is estimated that the results of these studies will be available after 2010.

■ Summary

During the last decade there was a significant progress in the development and validation of alternative methods aimed at assessing the safety of chemical substances, including substances used in the production of cosmetic products. Today these methods are applied mainly in hazard identification (for example, the distinction between irritating and non-irritating substances). On the other hand, the risk assessment of cosmetic ingredients causes substantial difficulties.

The biggest success was achieved in the development of alternative methods aimed at assessing local toxicity and short-term substance activity. In major-

ity, these methods are based on the reduction of the number of animals used in an experiment (*reduction* criterion) and on their humanitarian treatment (*refinement* criterion). There is a lack of alternative methods to be used in the assessment of the long-term effects of chemical substances or in tests assessing their impact on the functioning of the organism (systemic toxicity).

Alternative methods meeting the replacement criterion of the 3R principle – thus completely eliminating experiments with the use of animal testing – are the fewest in number.

- (6) SCCP/1111/07: Memorandum on Actual Status of Alternative Methods on the Use of Experimental Animals in the Safety Assessment of Cosmetic Ingredients in the European Union, 19 June 2007
- (7) SCCP 6th Revision: The SCCP's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 19 December 2006

*Authors address:

Karolina Bazela,
Centrum Naukowo-Badawcze
Dr Irena Eris,

ul. Puławska 107A,
02-595 Warszawa,
POLAND

karolina.bazela@eris.pl

Bibliography

- (1) 76/768/EEC-Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official Journal L262, 27/09/1976,p. 169
- (2) Sprawozdanie na temat opracowania, uznawania i prawnego przyjmowania metod alternatywnych wobec testów na zwierzętach w branży produktów kosmetycznych (2007), Sprawozdanie Komisji dla Rady i Parlamentu Europejskiego, Bruksela, 2.7.2008, KOM (2008) 416
- (3) Russel B., Russel W.M.S. and Burch R.L. The principles of humane experimental technique. Methuen and Co Ltd., London, UK, 1959
- (4) Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects, A Report Prepared in the Context of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive for Establishing the Timetable for Phasing Out Animal Testing, ATLA 33, Suppl. 1, 2005
- (5) SCCP/1005/06: The SCCP's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, adopted by the SCCP during the 10th plenary meeting of 19th December 2006



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY





Człowiek - najlepsza inwestycja

"Nauka, wiedza, kwalifikacje - upowszechnianie osiągnięć nauki w zakresie kosmologii"
Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Wydawnictwa Wyższej Szkoły Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia w Warszawie



Wydawnictwa Wyższej Szkoły Zawodowej
Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia w Warszawie

NOWOŚCI WRZEŚNIA:

- „Cosmetology Today” nr 2-2009
- „Zarządzanie Salonem Zdrowia i Urody”
Hoa Le-Aiken, Jacek Arct (monografia)

www.cosmetology.edu.pl

Wydawnictwa Wyższej Szkoły Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia
ul. Podwale 13, 00-252 W-wa, tel: 022 392 89 74, fax: 022 397 78 26, redakcja@wvskpz.pl