



**ANTYAGE LED® to pierwsze urządzenie wyposażone w lampy typu RGB LEDS w Medycynie Estetycznej i Anti-Aging**

**bezpieczny • skuteczny • kompaktowy • łatwy w użyciu**

- ❖ Najsilniejsze LEDY dla optymalnego natężenia światła 319 mW/cm<sup>2</sup> dla skrócenia trwania zabiegu i osiągania najlepszych wyników
- ❖ Najbardziej skuteczne długości fali światła od 400 nm do 850 nm dla szerokiej gamy zastosowań
- ❖ Duże panele 600 cm<sup>2</sup>
- ❖ Największy z możliwych wybór programów zabiegowych
- ❖ Nowoczesność  
możliwa zdalna aktualizacja systemu
- ❖ Brak części zużywalnych
- ❖ Łatwy w użyciu i ergonomiczny
- ❖ Dwie technologie w jednym urządzeniu  
zintegrowany Cryo-Applicator pozwala uniknąć obrzęku i nadać skórze zdrowego blasku
- ❖ Najwyższy standard jakości
- ❖ Certyfikat CE

**OPTOPOL**  
handlowy

OPTOPOL Handlowy Sp. z o.o.  
ul. Łukowska 2A, 04-113 Warszawa  
tel./fax: +48 22 612 10 00  
www.dermatologia.optopol.com.pl  
www.optopol.com.pl



## Zastosowanie modeli ludzkiego naskórka do oceny drażniącego skórę potencjału produktów kosmetycznych\*



dr n. biol. Karolina Bazela, dr n. biol. Renata Dębowska,  
dr n. farm. Irena Eris

Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris,  
Laboratorium Kosmetyczne Dr Irena Eris, Warszawa

## Dermaproject

GENOSYS<sup>®</sup> DTS

Marki Genosys/DTS to seria rollerów i linia profesjonalnych kosmetyków - innowacyjna, opatentowana technologia odmładzania skóry - skuteczna i bezinwazyjna alternatywa m.in. dla lasera.



Seria kilku zabiegów pomaga zredukować zmarszczki, dając efekt podniesionej i napiętej skóry. Zmniejsza blizny, przebarwienia, rozstępny, leczy łysienie.



### PARTNER

94-024 Łódź, ul. Wygodna 23  
Tel: 42 689 83 30, 42 689 83 33, Fax: 42 689 83 55  
Email: info@dermaproject.pl, www.dermaproject.pl

Prowadzimy szkolenia, także w Państwa firmie i wystawiamy certyfikaty. Kontakt z doradcą: +48 509 941 608  
Jesteśmy wyłącznym dystrybutorem marek Genosys i DTS na Polskę.

Podrażnienie skóry, któremu powszechnie towarzyszy rumień, obrzęk skóry, przesuszenie, łuszczenie się i świąd, należy do najczęściej obserwowanych u ludzi działań niepożądanych. Zwykle źródłem podrażnienia jest substancja chemiczna. Do głównych mechanizmów patologicznych obserwowanych podczas reakcji skóry na czynnik drażniący można zaliczyć: naruszenie bariery skórnej, indukcję kaskady cytokinowej, a także stres oksydacyjny [1-3]. Interleukina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) jest uznawana za kluczowy czynnik pobudzający skórną reakcję zapalną. Istnieje hipoteza mówiąca, że IL-1 $\alpha$  jest wydzielana przez uszkodzone keratynocyty podczas interakcji między czynnikiem drażniącym a barierą naskórka [1-4].

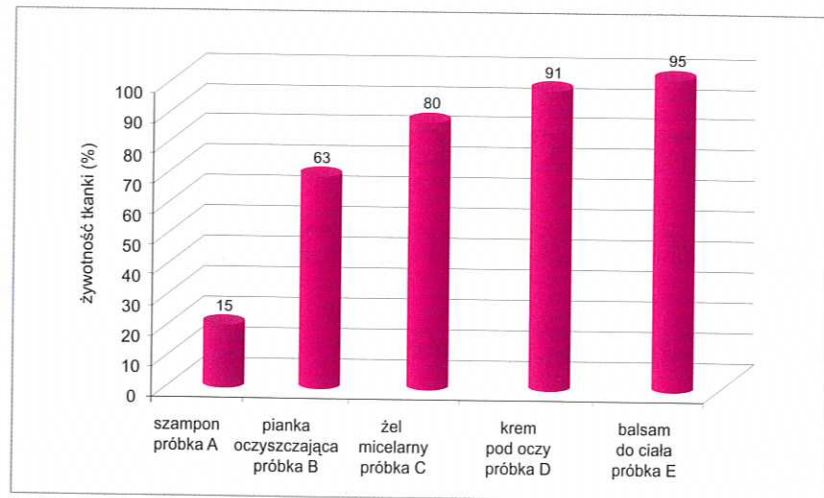
Jeszcze do niedawna identyfika-

cja czynników drażniących opierała się wyłącznie na testach z wykorzystaniem zwierząt, do których należy przeprowadzany z nakładaniem produktu na skórę królika test Draize'a - standardowy, wprowadzony 60 lat temu w ramach testów bezpieczeństwa użytkowania leków i produktów chemicznych. Zgodnie z prawem UE, od 2004 r. obowiązuje zakaz testowania produktów kosmetycznych na zwierzętach, a od roku 2009 - całkowity zakaz wykonywania testów z wykorzystaniem zwierząt, dla substancji chemicznych stosowanych do produkcji kosmetyków (dla badań toksyczności dawki powtarzalnej, toksykokinetyki i toksycznego wpływu na rozrodczość - od roku 2013) [6]. Dlatego testy bezpieczeństwa stosowania produktów kosmetycznych, przeprowadzane za pomocą metod in

vitro, stanowią obecnie obszar intensywnych badań i rozwoju. Ponadto do opracowania alternatywnych metod oceny potencjalnego toksycznego wpływu substancji na zdrowie człowieka przyczyniło się wprowadzenie rozporządzenia REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) [7].

Rozwój inżynierii tkankowej oraz molekularnych technik badawczych doprowadził do opracowania różnorodnych modeli in vitro służących ocenie właściwości substancji chemicznych. Wśród modeli tkankowych przydatnych do określenia potencjału drażniącego danej substancji chemicznej znajdują się odpowiedniki ludzkiego naskórka. Modele naskórka dotychczas ocenione przez Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (European Centre for the Valida-





Ryc. 1

Żywotność modelu naskórka po aplikacji testowanych produktów kosmetycznych.

*Tissue viability after exposure to test formulations.*

tion of Alternative Methods – ECVAM) to: EpiSkin™, EpiDerm™ oraz SkinEthic™. Naskórek odtworzony w warunkach in vitro jest w pełni zróżnicowany, a jego profil lipidowy jest niemal identyczny jak in vivo. Zachowanie funkcji bariery skórnej przez modele naskórka umożliwia ocenę wpływu badanej substancji na fizjologię skóry [3,8].

W niniejszej pracy przedstawiono ocenę potencjału drażniącego wybranych kosmetyków z wykorzystaniem testów in vitro. W tym celu przetestowano pięć różnych wyrobów kosmetycznych, stosując dostępny na rynku model naskórka EpiDerm™.

## Materiał i metody

Model naskórka EpiDerm™ uzyskano od firmy MatTek Corporation z siedzibą w Ashland (MA, USA). Został opracowany w oparciu o prawidłowe ludzkie keratynocyty naskórka (NHEK), pochodzące z okolic skóry napletka noworodków. Wykazuje jednolite i wysoce odtwarzalne właściwości morfologiczne oraz charakterystykę wzro-

nianową w komórkach aktywnych metabolicznie). Żywotność komórkową obliczano dla każdej tkanki (modelu naskórka) jako procent średniej wartości tkanek kontroli negatywnej

$$\% \text{ żywotności} = 100 \times \frac{\text{OD (próbka)}}{\text{OD (kont. neg.)}}$$

próbka – testowany produkt

OD – gęstość optyczna

kont. neg. (kontrola negatywna)

– tkanka poddana działaniu soli fizjologicznej [10-11].

Wydzielanie IL-1 $\alpha$  w pożywce hodowlanej zmierzono po 42-godzinnej ekspozycji na testowany produkt, za pomocą ilościowego testu immunoenzymatycznego ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), zgodnie z SOP: „In vitro skin Irritation Test: Human Epidermis Model EpiSkin; wersja: 1.2, wrzesień 2005”. Stężenie IL-1 $\alpha$  oszacowano wyłącznie dla tkanek o żywotności >50% [12]. Do obliczenia korelacji między wynikami badań in vitro a efektem in vivo zastosowano Model Progностyczny, zgodnie z SOP sprawdzoną przez ECVAM [10-12]. Potencjał drażniący (efekt cytotoxyczny) badanej substancji jest prognozowany, jeżeli żywotność modelu naskórka pozostaje na poziomie poniżej 50%. Stężenie graniczne zdefiniowane dla IL-1 $\alpha$  wynosi 50 pg/ml. Substancja badana jest klasyfikowana jako czynnik drażniący (R38) skórę, jeżeli żywotność modelu naskórka wynosi 50%, a ilość uwolnionej IL-1 $\alpha$   $\geq$ 50 pg/ml. Natomiast jeśli próbka testowa wykazuje żywotność >50%, a ilość wydzielonej IL-1 $\alpha$  wynosi <50 pg/ml, próbka jest klasyfikowana jako niedrażniąca skóry (brak klasyfikacji). Model Przewidywania, zestawiający badania in vitro (żywotność naskórka oraz uwalnianie IL-1 $\alpha$ ) z klasyfikacją substancji (drażniący/niedrażniący), przedstawiono w tabeli 1 [10-12].

## Wyniki

W celu oceny zdolności wyrobów kosmetycznych do wywołania podrażnień skóry wykonano badanie pięciu zakodowanych produktów kosmetycznych, metodą podwójnej ślepej próby, z zastosowaniem modelu zrekonstruowanego naskórka ludzkiego EpiDerm™. Przebadano wpływ testowanych kosmetyków na żywotność komórkową (ryc. 1) oraz uwalnianie IL-1 $\alpha$  (ryc. 2).

Wyniki badań żywotności tkanek po aplikacji testowanych wyrobów kosmetycznych zaprezentowano na rycinie 1. Próbka A (szampon) spowodowała bardzo znaczny (o 85%) spadek żywotności komórek, dlatego została zaliczona do substancji drażniących skórę. Wynik ten można tłumaczyć stosunkowo wysoką zawartością detergentów oraz środków powierzchniowo czynnych (laurylosiarczanu sodu (SLS) i betainy kokamidopropylowej (CAPB) w badanej próbce kosmetyku. Próbka B (pianka oczyszczająca), zawierająca betainę kokamidopropylową, wywołała reakcję słabszą (37-procentową redukcję żywotności tkanki). Roztwór C (żel micelarny), zawierający środek powierzchniowo czynny – polisorbato 20 (monolaurynian polioxyetylenosorbitolu) oraz kompozycję zapachową z potencjalnymi alergenami, spowodował 20-procentowy spadek żywotności komórek. Natomiast wpływ próbek D (krem pod oczy) i E (emulsja do ciała) na żywotność komórek naskórka był nieznaczny.

Następnym krokiem w przypadku próbek B-E, które spowodowały redukcję żywotności komórek do poziomu >50%, był pomiar uwalniania IL-1 $\alpha$  (ryc. 2). Wydzielanie IL-1 $\alpha$  dla produktów do splukiwania (pianka oczyszczająca i żel micelarny) wykazało poziom niewiele przekraczający punkt graniczny (50 pg/ml). Próbki D i E spowodowały

## Zastosowanie modeli ludzkiego naskórka do oceny drażniącego skóry potencjału produktów kosmetycznych

### STRESZCZENIE

**Słowa kluczowe:** ocena potencjału drażniącego skórę, ocena bezpieczeństwa kosmetyku, model EpiDerm™

Ocena bezpieczeństwa wyrobów kosmetycznych stanowi ważne zagadnienie dla producentów kosmetyków. Potencjalne działanie drażniące można przewidzieć za pomocą systemów badań in vitro, pod warunkiem zachowania przez te modele złożoności bariery czynnościowej skóry in vivo. Celem prezentowanej pracy była ocena potencjału drażniącego różnych wyrobów kosmetycznych na modelu zrekonstruowanego naskórka ludzkiego EpiDerm™. W badaniu wykazano, że testy in vitro, stanowiąc alternatywę dla badań z zastosowaniem zwierząt, pozwalają na wstępną ocenę bezpieczeństwa danego wyrobu kosmetycznego. Jednak w celu oceny użyteczności modeli zrekonstruowanego naskórka ludzkiego w prognozowaniu podrażnienia skóry in vivo niezbędne są dalsze badania.

### Skin model dermal irritancy testing of cosmetics

#### SUMMARY

**Key words:** skin irritation testing, safety assessment of cosmetics, EpiDerm™ model

The potential of cosmetic formulations to induce skin irritation is an important consideration for cosmetics producers. Irritation potential may be predicted by in vitro systems, provided they are sufficiently complex to mimic skin barrier in vivo. The objective of this work was to evaluate dermal irritation potential of different cosmetic formulations using human epidermis model EpiDerm™. Our study showed that in vitro tests, being alternative to animal testing, allow for preliminary assessment of cosmetic formulations irritating potential. However, further studies are required to evaluate the usefulness of in vitro epidermis models to predict in vivo skin irritation.

umiarkowane uwalnianie IL-1 $\alpha$ . Zgodnie z Modelem Przewidywania (tabela 1), produkty A-C sklasyfikowano jako substancje drażniące skórę. W tabeli 2 przedstawiono sumaryczne wyniki żywotności i uwalniania IL-1 $\alpha$  dla testowanych produktów, a także ich klasyfikację in vivo.

## Dyskusja

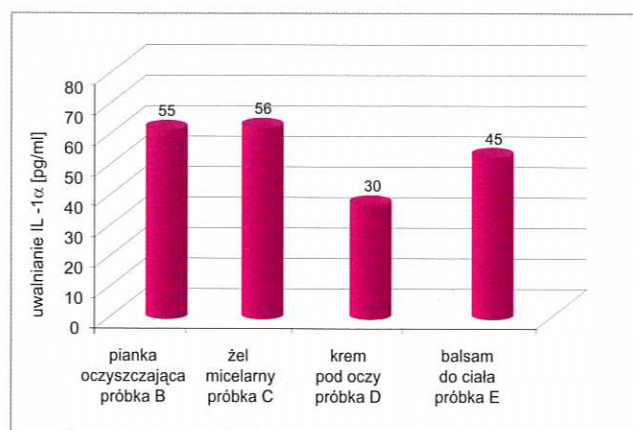
Zgodnie z najnowszym rozporządzeniem UE, producent wyrobów kosmetycznych ma obowiązek przeprowadzenia oceny bezpieczeństwa wprowadzanego na rynek wyrobu. Niezbędną składową tej oceny jest

badanie gotowego produktu kosmetycznego pod kątem potencjału drażniącego skórę.

Ocena drażniących właściwości kosmetyków może obecnie odbywać się metodami in vitro, które są alternatywne wobec badań z wykorzystaniem zwierząt i – co ważne – uzyskały pełną akceptację UE.

Badania właściwości drażniących przeprowadzane są in vitro na modelach ludzkiego naskórka. W chwili opublikowania niniejszego artykułu modelami in vitro zweryfikowanymi przez ECVAM, służącymi do prognozowania właściwości drażniących skórę były modele: EpiDerm™, EpiSkin™ i SkinEthic™.





Ryc. 2  
Uwalnianie IL-1α po aplikacji testowanych wyrobów kosmetycznych.  
Tissue IL-1α release after exposure to test formulations.

Zastosowanie modeli naskórka w badaniach podrażnień skóry obejmuje miejscową aplikację gotowego produktu kosmetycznego (lub jego poszczególnych składników) na powierzchnię modelu oraz późniejszą ocenę wpływu danego materiału na żywotność komórek naskórka przy użyciu testu MTT. Test ten opiera się na redukcji żółtej soli tatrazoliowej bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylo-2-tetraazoliowego do fioletowego barwnika formazanu przez enzym mitochondrialny – dehydrogenazę bursztynianową, obecną wyłącznie w aktywnych metabolicznie komórkach. Jeżeli badany produkt kosmetyczny działa cytotoksycznie na komórki naskórka, obserwuje się spadek aktywności tego enzymu. Test MTT stanowi obecnie standard pomiaru stopnia cytotoxyczności danej substancji. Jednak w niektórych przypadkach czułość testu może zostać zwiększona poprzez oznaczenie innych punktów końcowych, takich jak interleukina 1α (IL-1α) oraz dehydrogenaza mleczanowa (LDH) [3-4].

W 2007 r. ECVAM zatwierdził dwie metody alternatywne: EpiSkin i EpiDerm SIT (Skin Irritation Test – SIT), mogące zastąpić testy dzia-

nia drażniącego przeprowadzane in vivo na skórze królika. Model EpiSkin™ mi testu in vivo na skórze królika. Na podstawie powyższych badań w grudniu 2008 r. ECVAM dokonał naukowej oceny zmodyfikowanego testu EpiDerm SIT, uznając, że charakteryzuje się wystarczającą dokładnością i wiarygodnością do przewidywania działania drażniącego skórę [15-16].

W prezentowanym badaniu, w celu określenia drażniącego skórę potencjału działania przetestowanych wyrobów kosmetycznych, przeprowadzono zmodyfikowany test EpiDerm SIT. Produkty A-C, czyli wyroby kosmetyczne wymagające spłukania z powierzchni skóry, sklasyfikowano jako drażniące, podczas gdy wyroby D-E (produkty, które pozostawia się na skórze) okazały się niedrażniące. Jak wspomniano wcześniej, czas ekspozycji, czyli działania testowanej substancji na powierzchnię naskórka, w metodzie EpiDerm SIT został wydłużony do 60 minut. Według autorek, w protokole badania produktów do spłukiwania powinno się uwzględnić ich realne zastosowanie kosmetyczne, a czas ekspozycji powinien być krótszy niż 60 minut i/lub próbki należy analizować po ich rozcieńczeniu.

Spostrzeżenia autorek są zgodne z aktualnymi rekomendacjami producenta modelu EpiDerm™ Mat-

te, które powodują podrażnienia skóry (R38, zbliżone do kategorii 2 GHS) oraz niepowodujące takich podrażnień (nieklasyfikowane). Natomiast uznano, że model EpiDerm™ w wiarygodny sposób identyfikuje czynniki drażniące skórę, podczas gdy wyniki negatywne wymagają potwierdzenia [13, 14]. Biorąc pod uwagę odporność bariery czynnościowej modelu EpiDerm™, zdecydowano o przedłużeniu czasu ekspozycji naskórka na substancję chemiczną z 15 do 60 minut. Przyczyniło się to do zwiększenia czułości testu EpiDerm SIT oraz jego lepszej korelacji z wynika-

niem testu in vivo na skórze królika.

Kryteria interpretacji badań in vitro	Klasyfikacja substancji
średnia żywotność tkanki ≤ 50%	drażniąca skórę (R38)
średnia żywotność tkanki > 50% oraz stężenie IL-1α ≥ 50 pg/ml	drażniąca skórę (R38)
średnia żywotność tkanki > 50% oraz stężenie IL-1α < 50 pg/ml	niedrażniąca skóry

Produkt kosmetyczny	Kryteria interpretacji badań in vitro		Klasyfikacja
	Żywotność tkanki (% kontroli)	Uwalnianie IL-1α (pg/ml)	
szampon – A	15		drażniący skórę (R38)
pianka oczyszczająca – B	63	55	drażniący skórę (R38)
żel micelarny – C	80	56	drażniący skórę (R38)
krem pod oczy – D	91	30	niedrażniący skóry
balsam do ciała – E	95	45	niedrażniący skóry

Tek, który brał czynny udział w procesie weryfikacji testów podrażnienia skóry. MatTek sugeruje, że metoda EpiDerm SIT jest użyteczna w identyfikacji substancji niebezpiecznych, podczas gdy badanie potencjału drażniącego substancji w wielu punktach czasu – 2, 5 i 18 godzin (MTT protokół ET-50) – znajduje zastosowanie w przypadku opracowywania nowych for-

muł wyrobów. Dlatego w celu potwierdzenia potencjalnego działania drażniącego na skórę badanych preparatów A-C należałoby przeprowadzić testy obejmujące kolejne punkty czasowe [17].

### Wnioski

Wyniki badań własnych wskazują, że alternatywne testy in vitro na

modelu EpiDerm™ mogą być stosowane jako wstępna metoda oceny wystąpienia podrażnienia skóry po aplikacji produktu pielęgnacyjnego. Jednak adaptacja testów przeprowadzanych na modelach ludzkiego naskórka do przewidywania podrażnień skóry in vivo, powodowanych produktami kosmetycznymi o różnorodnych recepturach i zastosowaniach, wymaga dalszych badań.

### PIŚMIENNICTWO

- Basketter D., Darlenski R., Fluhr J.W.: Skin irritation and sensitization: mechanism and new approaches for risk assessment. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, 21: 191-202.
- Fluhr J.W., Darlenski R., Angelova-Fischer I., Tsankov N., Basketter D.: Skin irritation and sensitization: mechanism and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, 21: 124-135.
- Wells T., Basketter D.A., Schröder K.R.: In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, 2004, 18: 231-243.
- Gibbs S.: In vitro skin irritation models and immune reactions. *Skin Pharmacol Physiol*, 2009, 22: 103-113.
- Draize J.H., Woodand G., Calvery H.O.: Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1944, 82: 337-390.
- 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.
- Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006, *Official Journal L396*, 30/12/2006.
- Macfarlane M., Jones P., Goebel C., Dufour E., Rowland J., Araki D. i in.: A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: skin irritation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 54(2): 188-196.
- http://www.mattek.com/pages/products/epiderm.
- EpiDerm2007 SOP, Version 7:0 (October 2007) In vitro Skin Irritation Test: Human Skin Model, EpiDerm-200. Available under download study document, at <http://ecvam.jrc.it>.
- ECVAM (2007) Performance Standards for Applying Human Skin Models to In Vitro Skin Irritation Testing. Available un-



- der download study document, at <http://ecvam.jrc.it>.
12. EPISKIN SOP, Version 1.2 (September 2005). Validation of the EPISKIN Irritation Test - 42 Hour Assay for the prediction of acute Skin Irritation of chemicals. Determination of IL-1 $\alpha$  concentration in the culture medium. Available under download study document, at <http://ecvam.jrc.it>.
  13. ECVAM 2007: Statement of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) on the Validity of In Vitro Tests for Skin Irritation. Downloadable from <http://ecvam.jrc.it/>.
  14. ECVAM 2007: Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL-1 $\alpha$ . Downloadable from <http://ecvam.jrc.it/>.
  15. ESAC 2008: Statement on the Scientific Validity of in vitro Tests for Skin Irritation Testing, November 2008. Downloadable from <http://ecvam.jrc.it/>.
  16. EU 2009: B.46 Guideline. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Model Test.
  17. <http://www.mattek.com/pages/products/epiderm/skin-irritation/>.

\*„Skin model dermal irritancy”. Personal Care Europe, June 2010: 31-33.

---

**Ādres do korespondencji:**

Karolina Bazela

Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, Laboratorium Kosmetyczne

ul. Puławska 107 A, 05-595 Warszawa

e-mail: [karolina.bazela@eris.pl](mailto:karolina.bazela@eris.pl)