

Magdalena Jurzak, Anna Goździalska, Jerzy Jaśkiewicz

Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

Bezpieczne stosowanie współczesnych kosmetyków

Streszczenie: Skóra składa się z wielu warstw i wiele typów komórek, pełniąc ważne dla organizmu funkcje. Prawidłowa budowa i funkcjonowanie poszczególnych warstw skóry warunkuje prawidłowe funkcjonowanie i wygląd skóry jako narządu. Rosnące zapotrzebowanie rynku na produkty kosmetyczne wyznacza kierunek rozwoju bardzo dynamicznej dziedziny, jaką jest kosmetologia. Badania wprowadzanych na rynek nowych składników aktywnych zawartych w kosmetykach, wymagają potwierdzenia nie tylko skuteczności działania danej substancji czynnej, możliwości różnokierunkowego zastosowania ale również określenia natychmiastowych i długotrwałych skutków oraz działań niepożądanych. Ocena bezpieczeństwa zarówno pojedynczych składników czynnych kosmetyków, ich kompleksów, jak i gotowego produktu – kosmetyku obejmuje badania *in vitro*, badania *ex vivo* oraz badania *in vivo*. Wielokierunkowe badania zarówno pojedynczych składników czynnych kosmetyków, ich kompleksów, a także gotowych produktów kosmetycznych prowadzone z zastosowaniem nowoczesnych technologii: analizy ekspresji genów (transkryptomiki), genomiki, proteomiki czy metabolomiki mogą dać solidne podstawy naukowe nie tylko dla poszukiwania nowych składników czynnych kosmetyków, badań ich bezpieczeństwa, ale mogą przyczynić się także do zrozumienia mechanizmów prowadzących do wystąpienia wielu chorób skóry o niejasnej dotychczas etiopatogenezie (np. łuszczyca).

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo kosmetyków, hodowle komórek *in vitro*, testy alternatywne

Abstract: Skin consists of multiple layers and multiple cell types, performing the important functions of the body. Proper structure and functioning of the various layers of the skin condition for the proper functioning and appearance of the skin as an organ. The growing demand for cosmetic products paves the way for a very dynamic field, which is cosmetology. The study placed on the market for new active ingredients contained in cosmetics, subject to confirmation not only the effectiveness of the active substance, the possibility various use but also determine the immediate and long-term effects and side effects. Safety assessment of both the single active ingredients of cosmetics, their complexes, and the finished product - the cosmetic covers the study *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies. Multidirectional testing of both individual active ingredients of cosmetics, their complexes, and finished cosmetic products carried out with the use of modern technology to the analysis of gene expression (transcriptomics), genomics, proteomics and metabolomics can provide a sound scientific basis not only for the search for new active ingredients of cosmetics, studies of security, but can also contribute to the understanding of the mechanisms leading to the occurrence of many diseases of the skin of unknown etiology previously (eg, psoriasis).

Key words: safety of cosmetics, *in vitro* cell cultures, alternative tests

Wprowadzenie

Współczesny rynek kosmetyczny ma bardzo bogatą ofertę produktów. Mnogość firm i preparatów, zarówno polskich, jak i zagranicznych sprawia, że klient ma możliwość wyboru kosmetyku, który spełni wszystkie jego oczekiwania. Specjaliści od marketingu i reklamy dbają o wizerunek firmy, aby zachęcić do kupna właśnie ich produktów, natomiast producenci w oparciu o laboratoria badawcze dbają o nowatorskie rozwiązania technologiczne, modyfikację istniejących składników czynnych kosmetyków lub/i pozyskanie unikatowych, nowych składników. Współczesny przemysł kosmetyczny rozwija się bardzo szybko i prężnie. Specjaliści z różnych dziedzin (dermatolodzy, biolodzy, chemicy, farmaceuci, biotechnolodzy) współpracują w dużych koncernach, aby uzyskać produkty, które pozwolą skórze jak najdłużej zachować młody i zdrowy wygląd. Tylko ciągły rozwój tych dziedzin pozwala na nowe odkrycia.

Badania kosmetyków należą do obowiązkowych elementów produkcji. Wyniki badań mają pośredni wpływ na zdrowie konsumentów, szczególnie jeśli dotyczą nowych składników czy kompleksów substancji aktywnych. Kwestię tę reguluje szereg przepisów i rozporządzeń prawnych. Producent musi spełnić określone przepisami wymogi, zanim kosmetyk zostanie dopuszczony do sprzedaży. Ponadto przepisy unijne nakazują producentom dokumentowanie badaniami skuteczności i bezpieczeństwa działania produktów.

Wprowadzenie do badań hodowli komórkowych jest dużym osiągnięciem kosmologii, jednak pozostaje wątpliwość, czy badania te obejmują wszystkie problemy związane z zastosowaniem kosmetyku. Otwartym zagadnieniem jest również przenikanie substancji aktywnych z kosmetyku do skóry. Na proces ten ma wpływ wiele czynników i trudno je wszystkie uwzględnić w badaniach, a są one niezwykle istotne, decydują bowiem o przydatności takich badań i ich celowości. Od ich wyników zależy, czy testowane związki znajdą zastosowanie w kosmetykach, które nie mogą działać szkodliwie na ludzkie zdrowie. Celem stosowania kosmetyków jest przecież utrzymywanie w czystości, pielęgnowanie, ochrona, perfumowanie czy upiększanie ciała.

Ważną kwestią staje się więc nie tylko receptura produktów kosmetycznych, ale i znajomość budowy ludzkiej skóry. Skóra jest podstawowym narządem, z którym pracują kosmetyczki, kosmetolodzy, dermatolodzy, specjaliści opracowujący receptury kosmetyczne. Znajomość budowy skóry i podstawowych mechanizmów jej funkcjonowania ułatwia nie tylko wybór odpowiednich kosmetyków w celu pielęgnacji czy upiększania, ale także za-

stosowanie odpowiednich produktów kosmetycznych wspomagających leczenie niektórych dermatoz.

Budowa skóry

Skóra człowieka pełni wiele funkcji fizjologicznych. Wśród najważniejszych wymienia się udział w integracji ze środowiskiem zewnętrznym i ochronę narządów wewnętrznych przed działaniem szkodliwych czynników środowiskowych. Ponadto skóra bierze czynny udział w termoregulacji, przemianie materii, procesach wydzielniczych, resorpcji oraz gospodarce wodno-elektrolitowej. Zarówno proste mechanizmy obronne, takie jak swoista struktura warstwy rogowej, obecność płaszcza wodno-lipidowego, kwaśnego pH skóry czy właściwe jej nawilżenie, jak i procesy immunologiczne, angażujące skórny układ odpornościowy SIS (*skin immune system*), stanowią sprawny element systemu kontroli odpornościowej człowieka. Skóra odgrywa zatem istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu [2, 11, 25, 26, 27].

Skóra zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Naskórek nie ma naczyń krwionośnych i limfatycznych. W skórze właściwej i tkance podskórnej rozmieszczone są przydatki skóry – mieszki włosowe, gruczoły potowe ekrynowe i apokrynowe, gruczoły łojowe oraz naczynia krwionośne, limfatyczne i zakończenia nerwowe. Każda z warstw skóry pełni określone funkcje biologiczne, warunkując prawidłowe funkcjonowanie skóry jako narządu [5, 7, 13].

Naskórek jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym, tworzącym najbardziej zewnętrzną warstwę skóry. W skład naskórka wchodzi warstwy: podstawna, kolczysta, ziarnista i zrogowaciała. Głównymi komórkami naskórka są keratynocyty (stanowiące 90–95% wszystkich komórek naskórka), które w różnych warstwach naskórka różnią się zaawansowaniem procesu keratynizacji [26]. Keratynizacja (rogowacenie) to genetycznie zaprogramowany, ściśle regulowany proces, obejmujący wiele morfologicznych i metabolicznych zmian w keratynocytach, tj. proliferację, dyferencjację, migrację i apoptozę.

Końcowym etapem keratynizacji naskórka jest wytworzenie martwego keratynocytu warstwy zrogowaciałej (tzw. korneocytu), charakteryzującego się specyficzną budową błony komórkowej (koperty korneocytu) składającej się z warstwy wewnętrznej białkowej (białka inwolukryna i lorikryna) oraz zewnętrznej warstwy lipidowej. Podczas keratynizacji zachodzi biosynteza cytokeratyn, charakterystycznych dla każdej z warstw naskórka, zapewniająca-

cych nie tylko wytrzymałość mechaniczną, odporność na czynniki chemiczne, ale także wiązanie wody przez korneocyty. Ponadto korneocyty zawierają w cytoplazmie naturalny czynnik nawilżający NMF, powstający podczas keratynizacji z białka profilagryny. Korneocyty warstwy zrogowaciałej spojone są ze sobą lipidowym cementem międzykomórkowym, którego składniki (głównie ceramidy i steroidy) powstają z prekursorów podczas enzymatycznych przekształceń w przestrzeni pozakomórkowej w czasie rogowacenia. Kontrolowana enzymatyczna degradacja korneodesmosomów umożliwia fizjologiczne złuszczenie martwych korneocytów warstwy zrogowaciałej. Prawidłowy proces keratynizacji (ortokeratoza) zapewnia prawidłową budowę warstwy zrogowaciałej naskórka, a tym samym ochronę przed nadmierną przesuszeniem utratą wody (TEWL) oraz wnikaniem do organizmu m.in. różnych związków chemicznych [5, 13, 15, 26].

Oprócz komórek nabłonkowych – keratynocytów, w skład naskórka wchodzi także komórki Langerhansa, odpowiedzialne za reakcje immunologiczne, melanocyty (komórki barwnikowe) oraz komórki neuroendokrynowe Merkla [26]. Naskórek spoczywa na błonie podstawnej, która oddziela go od skóry właściwej. Skóra właściwa, wypuklając się do naskórka, tworzy brodawki skóry, zaś naskórek, wypuklając się do skóry właściwej, tworzy soпле naskórkowe, zaś przebieg granicy skórno-naskórkowej jest falisty. W skórze właściwej wyróżnia się warstwę brodawkową, zlokalizowaną bezpośrednio pod naskórkiem, składającą się z rozmieszczonych w nieuporządkowany sposób włókien kolagenowych głównie typu III. Warstwa siateczkowata skóry właściwej zbudowana z grubych włókien kolagenowych, głównie typu I ułożonych równolegle do powierzchni skóry. Białka kolagenowe, elastyna tworząca włókna sprężyste oraz glikozoaminoglikany (kwas hialuronowy) i proteoglikany (głównie siarczany heparanu i siarczany dermatanu), stanowią macierz pozakomórkową tkanki łącznej skóry właściwej, w której zakotwiczone są komórki głównie fibroblasty [2].

Tkanka tłuszczowa, wchodząca w skład tkanki podskórnej wraz ze szkieletem chrzęstno-kostnym nadaje zewnętrzny kształt powłokom skórnym. Tkanka podskórna łączy skórę właściwą z głębiej położonymi strukturami (powięziami, ścięgnami, mięśniami i kośćmi), amortyzuje bodźce mechaniczne, stanowi warstwę termoizolacyjną. Triacyloglicerole wypełniające adipocyty stanowią rezerwę energetyczną ustroju, komórki tłuszczowe syntezują estrogeny, a ściany komór tłuszczowych tworzą rusztowanie wzdłuż, którego ku powierzchni biegają naczynia krwionośne i nerwy [5, 7, 13].

Prawidłowa budowa i funkcjonowanie poszczególnych warstw skóry warunkuje prawidłowe funkcjonowanie i wygląd skóry jako narządu. Cechami

zdrowej skóry są: gładkość wynikająca z prawidłowo zbudowanej warstwy zrogowaciałej naskórka (keratynocyty), sprężystość wynikająca z prawidłowego funkcjonowania fibroblastów, układu włókien kolagenowych i elastynowych zanurzonych w macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej skóry właściwej. Równomierne zabarwienie skóry wynika z właściwego funkcjonowania melanocytów, komórek produkujących melaninę. Napięcie skóry zależy nie tylko od uwodnienia skóry właściwej, ale także od prawidłowej budowy komórek warstwy zrogowaciałej i właściwym składem ich otoczenia (NMF, cement międzykomórkowy) [7, 13, 26]. Zdrowa skóra jest wolna od uszkodzeń związanych z nieprawidłową pielęgnacją czy złym wpływem środowiska, dobrze toleruje zmiany temperatury i wilgotności otoczenia, prawidłowo reaguje na większość produktów pielęgnacyjnych [2]. Nieprawidłowa pielęgnacja powoduje nadmierne wysuszenie skóry, zaburzenia wydzielania łoju (skóra przetłuszczona lub odtłuszczona). Coraz częściej występuje także problem skóry/cery wrażliwej będącej często efektem stosowania niewłaściwych kosmetyków [26]. Każdy człowiek stosuje kosmetyki, często różnych kategorii, bez względu na wiek, rodzaj skóry/cery (normalna, sucha, tłusta, mieszana) czy stan skóry/cery (odwodniona, naczyniowa, dojrzała, wrażliwa, alergiczna) [21].

Kosmetykiem jest każda substancja lub preparat przeznaczone do zewnętrznego kontaktu z ciałem człowieka: skórą, włosami, wargami, paznokciami, zewnętrznymi narządami płciowymi, zębami i błonami śluzowymi jamy ustnej, których wyłącznym lub podstawowym celem jest utrzymanie ich w czystości, pielęgnowanie, ochrona, perfumowanie, zmiana wyglądu ciała lub ulepszenie jego zapachu [40].

Współczesne kosmetyki zawierają najczęściej kompleksy substancji współdziałających ze sobą pod względem właściwości fizycznych i chemicznych, zapewniając efektywność działania. Jako składniki czynne kosmetyków stosuje się witaminy, lipidy, substancje nawilżające, substancje czynne/wyciągi roślinne, jony metali, substancje złuszczone (alfahydroksykwas AHA, betahydroksykwas BHA, polihydroksykwas PHA), peptydy (sygnalowe, transportujące, hamujące neuroprzekazniki), przeciwutleniacze, czynniki wzrostu (roślinne cytokininy), substancje chroniące przed słońcem, środki przeciw zmarszczkom [21, 28].

Podstawowym składnikiem każdego kosmetyku jest podłoże (baza), warunkująca formę fizykochemiczną podłoża, tj. pastę, roztwór, hydrożel, emulsję O/W (olej w wodzie), emulsję W/O (woda w oleju), lipożel. Substancje czynne (witaminy, lipidy itp.) oraz inne dodatki, m.in. środki konserwujące, ściągające, kompleksujące, koemulgatory, kwasy i zasady, środki

promieniochronne (filtry przeciwsłoneczne), barwiące, zapachowe – stanowią często o przeznaczeniu kosmetyku [6, 24].

Ostateczny efekt działania kosmetyku po aplikacji miejscowo na skórę uwarunkowany jest aktywnością związku czynnego w stosunku do receptorów lub jego zdolnością reagowania na poziomie molekularnym, ale przede wszystkim kinetyką wnikania i dystrybucji w skórze, warunkującą uzyskanie określonego stężenia składnika czynnego wywierającego pożądaną efekt biologiczny w obszarze docelowym. Powierzchnia skóry, warstwa rogowa naskórka, żywe warstwy naskórka i skóry właściwej są głównymi miejscami działania kosmetyków. Większość substancji aktywnych zawartych w kosmetykach ochronnych i pielęgnacyjnych nie powinna penetrować głębiej niż do warstwy zrogowaciałej naskórka [6, 38].

Środki przeciw zmarszczkom [21] to najbardziej zróżnicowana pod względem substancji czynnych kategoria kosmetyków [11, 26, 28].

Różnorodność substancji czynnych kosmetyków przeciwzmarszczkowych, przeznaczonych do pielęgnacji skóry/cery dojrzałej, zdolnych do optymalnej regulacji funkcji biologicznych skóry ma na celu rewitalizację skóry. Rewitalizacja kosmetyczna osiągnięta jest poprzez stymulację odnowy naskórka, poprawę napięcia, elastyczności kolorytu skóry przez zastosowanie w kosmetykach składników biologicznie czynnych [4].

Do nowoczesnych składników aktywnych w kosmetykach rewitalizujących, regenerujących i przeciwzmarszczkowych należą peptydy. Niskocząsteczkowe peptydy stosowane w kosmetykach wykazują różny mechanizm działania oraz wpływ na skórę. Zalicza się do nich peptydy sygnałowe, peptydy transportujące oraz peptydowe inhibitory neurotransmiterów [11]. Według producentów peptydy sygnałowe to najczęściej fragmenty kolagenu lub elastyny, które dostarczane do żywych warstw skóry stanowią sygnał do biosyntezy nowych składników macierzy pozakomórkowej, w szczególności białek kolagenowych, glikozaminoglikanów, proteoglikanów oraz glikoprotein niekolagenowych (elastyna, fibronektyna). Efektem zwiększenia biosyntezy składników ECM skóry właściwej jest poprawa napięcia i jędrności skóry [12, 17].

Najczęściej stosowanymi w kosmetykach peptydami sygnałowymi są niskocząsteczkowe peptydy otrzymywane syntetycznie i biotechnologicznie, m.in.: tripeptyd-1, tripeptyd-3/5, tripeptyd-10, tetrapeptyd-9, tetrapeptyd-11, pentapeptyd-4/3, heksapeptyd-11 [4].

Peptydy wpływające na przewodnictwo nerwowo-mięśniowe, według producentów osłabiają skurcz mięśni mimicznych twarzy i zmniejszają zmarszczki mimiczne. Ich mechanizmy działania są różnorodne, jednak

w efekcie zmniejszają ilość acetylocholinę w szczelinie synaptycznej synaps nerwowo-mięśniowych. Do najczęściej stosowanych w kosmetykach peptydów hamujących przekazanie nerwowo-mięśniowe zalicza się niskocząsteczkowe peptydy, m.in.: acetylo-heksapeptyd-3 (SNAP-6, INCI: Acetyl Hexapeptide-8, Argirelina), oktapeptyd (SNAP-8, INCI: Acetyl Octapeptide-3), pentapeptyd-3 (INCI: Pentapeptide-3, Leuphasyl) [10, 12, 16, 17].

Peptydy transportujące, ze względu na swoją budowę strukturalną i przestrzenną, wykazują zdolność do wiązania innych substancji, m.in. zwiększając ich rozpuszczalność, trwałość, biodostępność. Najczęściej stosowanymi są di-, tri- i tetra peptydy, o dobrej rozpuszczalności w wodzie. Głównymi związkami transportowanymi przez peptydy są jony metali (Zn^{2+} , Cu^{2+}). Miedź jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych. Miedź chodzi w skład wielu metaloenzymów, pełniących istotną rolę podczas procesów fizjologicznych w obrębie skóry [22]. Do najbardziej znanych peptydów transportujących jony miedzi stosowanych w kosmetyce należą: tripeptyd glicylo-histydyl-lizyna (GHK) oraz tripeptyd glicylo-glicylo-histydyna (GGH) [9, 36, 37, 41]. Aby zwiększyć efektywność przenikania tych cząsteczek przez warstwę rogową naskórka, do cząsteczek tych dołączane są reszty kwasów tłuszczowych najczęściej palmitolowa (PAL-GHK) [18, 38].

Kolejnymi nowocześniejszymi substancjami czynnymi stosowanymi w kosmetykach są rekombinowane cząsteczki białkowe, oligopeptydy i polipeptydy, otrzymywane biotechnologicznie, które stanowią grupę około 20 biologicznie aktywnych cząsteczek. Większość z nich posiada w różnym stopniu homologiczną sekwencję aminokwasów do naturalnych ludzkich cytokin i czynników wzrostu. Stosowane są w kosmetykach regenerujących i rewitalizujących (środki przeciwzmarszczkowe). Ich mechanizm działania wykazuje podobieństwo do procesów reparacyjnych zachodzących podczas uszkodzenia skóry z udziałem czynników wzrostu, głównie naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), transformującego czynnika wzrostu typu β (TGF β) [11].

Zarówno składniki biologicznie czynne kosmetyków, jak i same kosmetyki powinny znacząco poprawiać wygląd skóry (m.in. nawilżenie, elastyczność, sprężystość, koloryt), ale przede wszystkim nie wywoływać efektów ubocznych, zarówno wczesnych (podrażnienie, alergia, fototoksyczność), jak i odległych (fotokancerogenność, fotoalergia) [1, 3, 32, 33, 34].

Ocena bezpieczeństwa pojedynczych składników czynnych kosmetyków i gotowego produktu – kosmetyku obejmuje badania *in vitro*, badania *ex vivo* oraz badania *in vivo* [26].

Badania *in vitro* możliwe są dzięki wykorzystaniu dwuwymiarowych jednorodnych hodowli komórek izolowanych ze skóry ludzkiej (keratynocyty, fibroblasty, melanocyty, komórki Langerhansa), linii komórkowych uzyskanych poprzez m.in. modyfikację genetyczne komórek, immortalizację komórek czy dzięki wykorzystaniu kokultur różnych typów komórek (keratynocyty z melanocytami, keratynocyty z komórkami układu odpornościowego). Hodowle dwuwymiarowe *in vitro* umożliwiają badanie wpływu ksenobiotyków na zmiany ekspresji genów, zmiany aktywności enzymów komórkowych pod wpływem ksenobiotyków, badanie zmian ilości uwalnianych przez komórki cytokin i czynników wzrostu oraz określenie optymalnych dla komórek skóry stężeń ksenobiotyków, które mają być zawarte w kosmetyku. Hodowle dwuwymiarowe komórek skóry *in vitro* to najbardziej uproszczony model tkanek budujących skórę, umożliwiający badanie morfologii i metabolizmu komórek na poziomie molekularnym, jednakże nieodzwierciedlający zależności między warstwami komórek czy całymi warstwami skóry i niepozwalający na powierzchniowe nakładanie substancji (aplikacja kosmetyku na skórę) [14].

Trójwymiarowe hodowle komórek skóry 3D: ekwiwalent naskórka, skóry właściwej oraz ekwiwalent pełnej grubości skóry, umożliwiają badanie bariery warstwy rogowej naskórka, analizę oddziaływań międzykomórkowych w warstwach budujących skórę w warunkach fizjologicznych oraz pod wpływem czynników środowiskowych, a także badanie interakcji między naskórkiem i skórą właściwą, wpływających na kondycję skóry w odpowiedzi na działanie czynników egzogennych w warunkach fizjologicznych i podczas np. procesu starzenia się skóry. Dzięki trójwymiarowym ekwiwalentom skóry możliwe stało się badanie funkcji barierowych naskórka i zdolności przenikania kosmetyku (i jego poszczególnych składników) [23, 29, 30, 35].

Obecnie do celów badań kosmetyków i ich składników, komercyjnie dostępne są dwa ekwiwalenty naskórka *EpiSkin* (Imedex, Francja) oraz *EpiDerm* (MatTek Corp, USA) oraz jeden ekwiwalent pełnej grubości skóry *EpiDermFT* (MatTek Corp, USA). Do badań wykorzystuje się kokultury komórek jedno- i wielowarstwowe *MelanoDerm* (MatTek Corp, USA). Kokultury keratynocytów z melanocytami: ras białej, czarnej, kaukaskiej i azjatyckiej, są doskonałym modelem do obserwacji różnic w przebiegu melanogenezy u poszczególnych ras oraz badań nad związkami chemicznymi wpływającymi na pigmentację skóry, np. substancjami fotoochronnymi, związkami przyspieszającym melanogenezę i związkami stosowanymi w redukcji przebarwień (hiperpigmentacji) na skórze [14].

Badania *ex vivo* polegają na ocenie działania składników i gotowych kosmetyków na fragmentach ludzkiej skóry w warunkach laboratoryjnych. Testy *ex vivo* z wykorzystaniem skóry ludzkiej stosuje się także przy badaniu przenikalności substancji kosmetycznych w głąb skóry. Metoda *ex vivo* polega na ocenie materiału biopsyjnego pobranego od osób uczestniczących w badaniu kosmetyku. Jednak nie jest zbyt często stosowana, gdyż poza wspomnianymi wysokimi kosztami, jako badanie na materiale biologicznym, wymaga zgody Komisji Bioetycznej. W badaniu ocenia się między innymi fazy wzrostu komórek poddanych działaniu składników lub kompleksów aktywnych, zdolności proliferacyjne, aktywność enzymów komórkowych. Obserwacja tych cech pozwala na określenie, czy badane składniki kosmetyczne wpływają pozytywnie na komórki. Jednak metoda ta jako inwazyjna jest stosowana w wyjątkowych przypadkach, na przykład podczas opracowywania receptur preparatów o specjalnym przeznaczeniu [26, 39].

Badania *in vivo* to badania z udziałem ochotników (tzw. probantów) – dobieranych zwykle pod względem wieku i rodzaju cery, zgodnie z przeznaczeniem kosmetyku, uprzednio poddawanych badaniu lekarskiemu (dermatologicznemu) obejmującemu zdiagnozowanie rodzaju i stanu skóry, skłonności do reakcji alergicznych oraz po przeprowadzeniu wywiadu dotyczącego aktualnych i przebytych chorób skóry, ich leczenia oraz określenia ogólnego stanu zdrowia probanta [26].

Testy *in vitro* stosowane są nie tylko z powodu możliwości poznawczych, ale także z obustrzeń prawnych dotyczących eksperymentów *in vivo* w dziedzinie kosmetologii.

Dyrektywa Unii Europejskiej 2003/15/WE (7 Poprawka do Dyrektywy Kosmetycznej 76/768/WE) nałożyła na przemysł kosmetyczny rygorystyczne terminy wprowadzające zakaz testowania kosmetyków i składników kosmetycznych na zwierzętach: od września 2004 r. obowiązuje zakaz testowania na zwierzętach gotowych produktów kosmetycznych oraz zakaz testowania na zwierzętach składników lub ich kombinacji, jeśli odpowiednia metoda alternatywna została zaadoptowana do załącznika V Dyrektywy 67/548/EC. Od marca 2009 r. obowiązuje zakaz wykonywania testów na zwierzętach składników kosmetyków, z wyjątkiem badań toksyczności dawki powtarzanej (przewlekłej/podprzewlekłej), toksykokinetyki oraz toksycznego wpływu na rozrodczość. Od marca 2013 r. obowiązywać będzie całkowity zakaz wykonywania testów substancji chemicznych na zwierzętach pod warunkiem, że dostępne będą odpowiednie metody alternatywne [1, 8].

Prawodawstwo polskie zakazuje przeprowadzania testów kosmetyków na zwierzętach, wprowadzania do obrotu kosmetyków: testowanych na zwierzę-

tach, zawierających składniki lub ich kombinacje testowane na zwierzętach, przeprowadzania na zwierzętach testów składników kosmetyków lub kombinacji tych składników. Zakaz ten obowiązuje od momentu zastąpienia testów na zwierzętach przez jedną lub więcej uznanych i przyjętych w Unii Europejskiej metod alternatywnych [40].

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 kancerogenego, toksycznego wpływu na rozród oraz toksykokinetyki. Obecnie określenie większości z wymienionych parametrów toksykologicznych możliwe jest tylko po wykonaniu testów na zwierzętach [1, 3, 32, 33, 34].

Procedury przeprowadzania testów kosmetyków, składników kosmetyków lub ich kombinacji, mają na uwadze postęp nauki w rozwoju metod alternatywnych.

Metody alternatywne mają na celu zastąpienie doświadczeń wykonywanych na zwierzętach eksperymentami przeprowadzonymi poza organizmem (*in vitro*) lub za pomocą analizy komputerowej (*in silico*) [8]. Metody alternatywne to metody spełniające wszystkie lub którąkolwiek z zasad 3R (ang.): *replacement* – zastąpienie zwierząt w eksperymencie przez modele badawcze „nieodczuwające cierpień”, *reduction* – zmniejszenie liczby zwierząt, na których trzeba przeprowadzić badania oraz *refinement* – doskonalenie metod w kierunku zmniejszenia cierpień zwierząt w eksperymencie. Metody alternatywne to nie tylko metody *in vitro*, ale również ulepszone, zmodyfikowane metody *in vivo* [8, 31].

Najważniejszym źródłem informacji o metodach alternatywnych jest organizacja powołana przez Komisję Europejską – Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), które odgrywa kluczową rolę w rozwoju i walidacji metod alternatywnych na terenie Unii Europejskiej. ECVAM dysponuje pełną listą 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 [19]. Ponadto organizacja ta stworzyła bazę danych metod alternatywnych (ECVAM DataBase Service

on Alternative Methods, gdzie dostępne są aktualne, szczegółowe protokoły dla metod alternatywnych [20].

Wybrane alternatywne metody badania składników czynnych kosmetyków

Ocena własności żrących substancji opiera się na badaniu własności cytotoksycznych przy pomocy ilościowego testu kolorymetrycznego MTT, polegającego na redukcji soli tetrazolowej przez dehydrogenazy mitochondrialne, aktywne w żywych komórkach. Obecnie na potrzeby oceny właściwości żrących substancji oficjalnie zatwierdzono wykorzystanie dwóch modeli naskórka EpiSkin i EpiDerm. Inne modele: Corrositex, SkinEthic, są na etapie walidacji. Alternatywą dla testów na modelach naskórka jest test przezskórnej oporności elektrycznej (tER) wykonywany na fragmentach skóry szczura.

Ocena własności fototoksycznych prowadzona jest na hodowli fibroblastów mysich Balb/c 3T3. Zasada metody badawczej opiera się na zdolności żywych komórek do wychwytu, wbudowywania i wiązania przyżyciowego czerwieni obojętnej NRU (*Neutral Red Uptake*) przez 3 godziny.

Ocena mutacji genowych oraz aberracji chromosomów (działanie mutagenne/genotoksyczne) możliwa jest przy użyciu szeregu testów alternatywnych dostępnych w ustawodawstwie unijnym. W ocenie bezpieczeństwa produktów kosmetycznych i ich składników najczęściej wykorzystywany jest test Ames (bakterie *Salmonella typhimurium*). Jednakże w licznych przypadkach test Ames daje wynik fałszywie pozytywny, który nie koreluje z wynikami testów *in vivo*. Dlatego też do oceny mutagenności wciąż wymagane jest wykonanie testów na zwierzętach.

Badanie toksyczności ostrej polega na dwutygodniowej obserwacji efektu jednorazowego podania badanej substancji zwierzęciu (lub kilkakrotnego jej podania w ciągu pierwszej doby). Parametrem służącym do określenia toksyczności ostrej jest dawka letalna LD50, czyli dawka substancji, która powoduje zgon 50% zwierząt biorących udział w eksperymencie. 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 określa się poprzez zastosowanie testu miejscowych węzłów chłonnych LLNA (*Local Lymph Node Assay*) myszy. Czynniki uczulające aplikowane na skórę zwierzęcia powodują pierwotną proliferację

limfocytów w węzle chłonnym odprowadzającym limfę z miejsca aplikacji środka chemicznego, a proliferacja proporcjonalna jest do zastosowanej dawki (oraz potencjału alergenu). Ostatecznie określa się stosunek proliferacji limfocytów przy pomocy inkorporacji ³H tymidyny do DNA w grupach zwierząt poddanych działaniu środka do proliferacji w grupie kontrolnej zwierząt (otrzymującej nośnik), nazywany wskaźnikiem stymulacji. Test LLNA wykonywany jest na zwierzętach, jednakże udoskonalenie tej metody pozwoliło na znaczącą redukcję liczby zwierząt biorących udział w eksperymencie.

Testy oceniające działanie drażniące skórę wykonywane są, podobnie jak badania własności żrących, na modelach naskórka (EpiSkin, Epiderm, SkinEthic). 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 przez pomiary mediatorów reakcji zapalnej (uwalnianych z komórek pod wpływem działania substancji) z zastosowaniem genomiki, transkryptomiki, proteomiki oraz metabolomiki.

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

Metody oceniające działanie drażniące oko opierają się na wykorzystaniu izolowanej rogówki wołu BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*), królika IRE (*Isolated Rabbit Eye*) i kurczaka ICE (*Isolated Chicken Eye*). Analiza uszkodzeń rogówki opiera się na pomiarze przepuszczalności światła przez rogówkę, gdzie 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*), CAMVA (*Chorioallantoic-Membrane Vascular Assay*). Metody te wykorzystują błonę kosmówkowo-omoczniovą jaja kurzego, w którym ocenie podlega morfologia błony przez ocenę obecności i nasilenie zmian, tj. obrzęk, wybroczyny krwawe, martwica, 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.

Dotychczas nie zatwierdzono metod alternatywnych dla badań toksyczności przewlekłej, działania kancerogennego, toksyczności reprodukcyjnej oraz toksykokinetyki [19, 20].

Podsumowanie

Wprowadzanie do obrotu nowych kosmetyków nie stwarza przesadnie wielu trudności prawno-formalnych. Ważne jest jednak nie tylko wprowadzenie kosmetyku do sprzedaży, ale i pozyskanie jak największego rynku zbytu i, oczywiście, zadowolenia klientów, co przekłada się na zysk finansowy. Aby klienci byli zadowoleni, produkt musi być wiarygodny. Nie wystarczy więc, by kosmetyk nie szkodził, co jest naczelną i oczywistą zasadą. Kosmetyk musi wykazywać działanie sugerowane przez producenta. Informacje o działaniu kosmetyku umieszczane na opakowaniach, ulotkach, w reklamach i artykułach sponsorowanych nie mogą być więc zmyślane i nieprawdziwe. Przepisy Unii Europejskiej wymagają, aby producent udowodnił działanie produkowanego przez siebie kosmetyku, dlatego firmy muszą rzetelnie i prawdziwie przedstawiać działania swych produktów, nie posiłkując się jedynie czystą reklamą – tak, aby klienci byli dokładnie poinformowani. Aby kosmetyk był bezpieczny i skuteczny, należy nie tylko starannie przygotować jego recepturę (skład, stężenia, łączenie ze sobą składników aktywnych), ale i starannie go przebadać. Wszelkie informacje na temat bezpieczeństwa stosowania zawartych w kosmetyku substancji, z uwzględnieniem oceny pod względem toksykologicznym, producent wedle obowiązującej Ustawy musi przechowywać w dokumentacji i udostępnić w razie kontroli. Przepisy unijne zabraniają przeprowadzania testów na zwierzętach, dlatego część firm przeprowadza badania kosmetyków *in vivo*, polegające na stosowaniu przez określony czas na zdefiniowanej grupie probantów, testowanych kosmetyków i zbieraniu ich subiektywnych opinii oraz na pomiarach, na przykład, stopnia nawilżenia, natłuszczenia, elastyczności, jędrności skóry, redukcji zmarszczek. Metoda ta nie wymaga dużych nakładów finansowych i jest stosunkowo prosta. Niektóre firmy europejskie, takie jak Clarins, Dior, L’Oreal, Yves Rocher, ale też i polskie Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris, poszerzyły jednak badania laboratoryjne kosmetyków o badania *ex vivo* i *in vitro*. Metody te stwarzają pełniejsze możliwości oceny skuteczności preparatów i poszczególnych składników aktywnych, wymagają jednak większej precyzji i środków finansowych.

Bibliografia

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, 169.
2. Adamski Z., Kaszuba A., *Dermatologia dla kosmetologów*, AM Poznań, Poznań 2008.
3. 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, *AtIA* 33, Suppl. 1, 2005.
4. Antończak P., Jurzak M., Adamczyk K., Niskocząsteczkowe peptydy sygnałowe stosowane w rewitalizacji skóry, *Dermatol Klin* 2012, 14 (2): 93–96.
5. Arct J., Pytkowska K., Budowa i fizjologia skóry, *Wiad Pol Tow Kosmetol* 2002, 5: 3–10.
6. Arct J. Chełkowska M., Czy możliwe jest przewidywanie zdolności wnikania w skórę aktywnych składników produktów kosmetycznych?, *Wiad PTK*, 4, 3/4: 36–42.
7. Baumann L., *Cosmetic dermatology*, The McGraw–Hill Companies, Hong Kong 2002.
8. Bazela K., Metody alternatywne a ocena bezpieczeństwa kosmetyków i ich składników, *SÖFW-Journal* 2009, 3/2: 48–56.
9. Buffoni F., Pino R., Dal Pozzo A., Effect of tripeptide-copper complexes on the process of skin wound healing and on cultured fibroblasts, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995, 330 (3): 345–360.
10. Cullander C., Guy R.H., Routes of delivery: case studies (6). Transdermal delivery of peptides and proteins, *Adv Drug Deliv* 1992, 8: 291–329.
11. Dover J. S., *Kosmeceutyki*, Urban & Partner, Wrocław 2006.
12. Fields K., Falla T.J., Rodan K., Bush L., Bioactive peptides: signaling the future, *J Cosmet Dermatol* 2009, 8 (1): 8–13.
13. Freinkel R.K., Woodley D.T., *The biology of the skin*, The Parthenon Publishing Group, New York 2001.
14. Gojniczek K., Gancarczyk A., Pytel A., Hodowle komórek in vitro w kosmologii, *Wiad Lek* 2005, 1–2: 71–77.
15. Gojniczek K., Jurzak M., Boryka M., Gancarczyk A., Rogowacenie naskórka jako efekt proliferacji, różnicowania i apoptozy keratynocytów, *Pol J Cosmetol* 2007, 3: 146–155.
16. Goldstein M., Linter K., Peptides, amino acids and proteins in skin care?, *Cosmetic&Toiletres*, 2007, 122 (10), 26–34.
17. Gorouhi F., Maibach H.I., Role of topical peptides in preventing or treating aged skin, *Int J Cosmet Sci* 2009, 31 (5): 327–345.

18. Gruchlik A., Chodurek E. Nowak M., Dzierżewicz Z., Zastosowanie peptydów wiążących miedź w dermatologii kosmetycznej, *Dermatol Klin* 2009, 11 (3): 175–178.
19. www.ecvam.jrc.it
20. www.ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu
21. Kategorie kosmetyków wg rozporządzenia Ministra Zdrowia z 16 czerwca 2003 r. w sprawie określenia kategorii produktów będących kosmetykami, *Dz.U.* z 2003 r., Nr 125, poz. 1168.

22. Kleszczewska E., Jabłońska-Trypuć A., Aktywność biologiczna miedzi i cynku oraz ich znaczenie w metabolizmie skóry, *Med Estet Ant-Aging* 2007, 3, 11–21.
23. Lee J.K., Kim D.B., Kim J.I., Kim P.Y., In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants, *Toxicol in Vitro* 2000, 14: 345–349.
24. Łubkowska B., Grobelna B., Maćkiewicz Z., Przenikanie składników aktywnych przez skórę, *Pol J Cosmetol* 2012, 15 (1): 33–38.
25. Martini M.C., Kosmetologia i farmakologia skóry, PZWL, Warszawa 2007.
26. Noszczyk M., Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska, PZWL, Warszawa 2010.
27. Peters I.B., Kosmetyka, REA, Warszawa 2002.
28. Petsitis X., Kipper K., Kosmetyka ozdobna i pielęgnacja twarzy, *MedPharm Polska*, Wrocław 2007.
29. Roguet R., Cohen C., Lecraire J., Tessonnaud, Gagne C., Teissier MH, Use of standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. *Int J Cosmet Sci* 2000, 22: 409–419.
30. Roguet R., Cohen C., Robles C., Courtellemint P., Tolle M., Guillot J.P., Duteil X.P., An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. *Toxicol in Vitro* 1998, 12: 295–304.
31. Russel B., Russel W.M.S., Burch R.I., The principles of humane experimental technique, Methuen and Co Ltd., London 1959.
32. SCCP 6th Revision: the SCCP'S Notes of guidance for the testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 19 December 2006.
33. 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.
34. 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.
35. Schlotmann K., Kaeten M., Black A.F., Damour O., Waldmann-Lae M., Förster H., Cosmetic efficacy claim in vitro using a three-dimensional human skin model, *Int J Cosmet Sci* 2000; 23: 309–318.
36. Siméon A., Emonard H., Hornebeck W., Maquart F.X., The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures, *Life Sci* 2000, 67 (18): 2257–2265.
37. Siméon A., Wegrowski Y., Bontemps Y., Maquart F.X., Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+), *J Invest Dermatol* 2000, 115 (6): 962–968.
38. Starzyk E., Arct J., Lipofilowość i absorpcja przeznaskórkowa w kosmetyce, *Wiad PTK*, 6, 3: 12–17.
39. Stokłosowa S., Hodowla komórek i tkanek, PWN, Warszawa 2004.

40. Ustawa o kosmetykach z 30 marca 2001 r. o kosmetykach, Dz.U. Nr 42, poz. 473 z późn. zm., art. 2 pkt 1.
41. Wegrowski Y., Maquart F.X., Borel J.P., Stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺, *Life Sci* 1992, 51 (13): 1049–1056.

Jagoda Drag¹, Anna Gawędzka^{1,3}, Magdalena Jurzak^{1,2}

1 Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego

2 Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

3 Zakład Farmakologii i Biofizyki Akademii Wychowania Fizycznego

Hodowla skóry – techniki molekularne w kosmetologii

Streszczenie: Naskórek jest tkanką ulegającą ciągłej odnowie i regeneracji. Utrzymanie odpowiedniej równowagi i odnowy naskórka możliwe jest dzięki właściwościom regeneracyjnym komórek macierzystych, prekursorów keratynocytów. Komórki macierzyste naskórka biorą również udział w procesie gojenia się ran, a także w patogenezie nowotworów skóry. Wyhodowane ludzkie keratynocyty i komórki macierzyste naskórka mogą być przeszczepiane w postaci opatrunków w leczeniu oparzeń, chronicznych owrzodzeń oraz różnych chorób skóry. Komórki macierzyste naskórka stanowią cel terapii genowej oraz materiał do testowania nowych leków. W skórze właściwej licznie występują fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę kolagenu i elastyny zapewniających elastyczność skóry. Główną funkcją fibroblastów jest utrzymanie strukturalnej integralności tkanek łącznych poprzez wydzielanie prekursorów macierzy zewnątrzkomórkowej, ponadto zawierają błonowe białka uczestniczące w procesach adhezji, integrujące komórki i składniki substancji międzykomórkowej. Fibroblasty są materiałem wykorzystywanym do przeszczepów w leczeniu oparzeń, blizn oraz trudno gojących się ran. Funkcje keratynocytów i fibroblastów są szeroko wykorzystywane w hodowlach komórek i tkanek. Uzyskane *in vitro* komórki stosowane są w transplantologii. W kosmetologii wykorzystuje się hodowle jednego typu komórek (keratynocytów czy fibroblastów), kokultury, a także tzw. modele skóry, np. model naskórka czy model skóry pełnej. Modele skóry znalazły zastosowanie do badania wpływu substancji kosmetycznych na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów. Hodowle komórkowe pozwalają na obserwacje wpływu różnych czynników na zachowanie się komórek skóry zdrowej oraz w warunkach patologicznych takich, jak bielactwo, czerniak lub łuszczyca.

Słowa kluczowe: skóra, hodowla fibroblastów, komórki macierzyste skóry

Abstract: The epidermis is a continuously tissue renewal and regeneration. Maintaining the right balance and skin health is possible thanks to regenerative properties of stem cells, the precursors of keratinocytes. Epidermal stem cells are also involved in wound healing and in the pathogenesis of skin cancers. Cultured human keratinocytes and the epidermal stem cells may be transplanted in the form of wound dressings for the treatment of burns, chronic ulcers and various skin conditions. Epidermal stem cells are a target for gene therapy, and the material for testing new drugs. In the dermis there are numerous fibroblasts, responsible for the synthesis of collagen and elastin, providing flexibility to the skin. The main function of fibroblasts is to maintain the structural integrity of the connective tissue through extracellular matrix secretion of the precursors, they also contain membrane proteins involved in adhesion processes, and integrating the components of the cell matrix. Fibroblasts are the material used for transplantation in the treatment of burns, scars and wounds difficult to heal. The functions of keratinocytes and fibroblasts are widely used in cell cultures and tissue. Cells obtained *in vitro* are used in transplantation. In cosmetology cultures used one type of cells (keratinocytes and fibroblasts), co-culture, as well as the so-called. models

such as skin epidermis model or full-skin model. Skin models have been used to study the effect of cosmetic ingredients for gene expression, protein synthesis and testing activity of many enzymes. Cell cultures allow the observation of various factors influence the behavior of cells in the skin of healthy and pathological conditions such as vitiligo, psoriasis, or melanoma.

Key words: skin, fibroblast culture, skin stem cells

Skóra jest organem nieustannie się zmieniającym, który zawiera wiele wyspecjalizowanych komórek i struktur. Chroni organizm przed zakażeniami drobnoustrojami, czynnikami mechanicznymi, termicznymi, chemicznymi, promieniowaniem świetlnym oraz zapewnia homeostazę. Zbiera informacje sensoryczne z otoczenia, odgrywa aktywną rolę w układzie odpornościowym oraz bierze udział w magazynowaniu i przemianie materii. Zrozumienie złożoności funkcji skóry wiąże się z budową trzech warstw skóry, tj. naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej.

Naskórek jest tkanką ulegającą ciągłej odnowie i regeneracji, cechuje ją bardzo zwarta budowa komórkowa, którą w około 80% stanowią keratynocyty będące na różnych etapach rogowacenia. Proces różnicowania tych komórek tworzy wyraźnie wyodrębnione warstwy, takie jak warstwa podstawna z aktywnie dzielącymi się komórkami, warstwa kolczysta składająca się z wielokątnych komórek zawierających rozbudowany cytoszkielet, warstwa ziarnista zawierająca kilka pokładów spłaszczonych komórek zawierających ziarnistości, w których znajdują się substancje regulujące proces rogowacenia, warstwa jasna zbudowana z komórek obumierających oraz warstwa zrogowaciała, utworzona przez kilka do kilkudziesięciu pokładów korneocytów. Na każdym etapie różnicowania się keratynocytów, przejście z warstwy podstawnej naskórka do warstwy rogowej trwa średnio 30 dni, w którym to czasie dochodzi do ekspresji keratyn oraz innych markerów, takich jak inwolukryna, kornifina czy lorykryna. Keratynocyty odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu bariery naskórkowej, a wraz z komórkami Langerhansa – także w procesach immunologicznych skóry. W połączeniu z melanocytami (komórkami barwnikowymi) uczestniczą w procesach syntezy barwnika w skórze. Komórki Merkla zlokalizowane w warstwie podstawnej produkują neurotransmitery i odpowiadają za kontakt z włóknami nerwowymi i za odbieranie wrażeń czuciowych [4, 7, 20].

W skórze właściwej wyróżnić można warstwę brodawkową oraz warstwę siateczkową. Warstwa brodawkowa uwypukla się w obręb naskórka tworząc brodawki skórne. Spełnia ważną rolę w metabolizmie skórno-naskórkowym. W warstwie siateczkowej znajdują się włókna kolagenowe i elastynowe, substancja podstawowa oraz komórki mięśni gładkich. W składzie komórkowym w skórze właściwej licznie występują fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę włókien kolagenowych, siateczkowych i sprężystych za-

pewniających elastyczność, jędrność i odpowiednie napięcie skóry. Poziome włókna kolagenu i pionowe włókna elastyny tworzą siateczkę, stanowiącą rusztowanie dla struktury naskórka. Fibroblasty odpowiadają za wytwarzanie składników substancji podstawowej takich jak proteoglikany oraz białka niekolagenowe. Komórki te utrzymują strukturalną integralność tkanek łącznych poprzez wydzielanie błonowych białek uczestniczących w procesach adhezji, integrując w ten sposób komórki i składniki substancji międzykomórkowej. Fibroblasty syntetyzują w formie proenzymu stromielizynę oraz żelatynazę, a także inhibitory kolagenaz. W ten sposób, produkując zarówno elementy substancji pozakomórkowej, jak i degradujące ją enzymy, fibroblasty mogą nie tylko wytwarzać i kształtować macierz w okresie rozwoju organizmu, ale także przebudowywać ją w razie potrzeby. Szczególnie ważna jest synteza wspomnianych składników w procesie gojenia się ran, oparzeniach oraz w fizjologicznym starzeniu się skóry.

Tkanka podskórna jest najgłębszą i najgrubszą warstwą skóry. Składa się głównie z adipocytów i dlatego ma istotne znaczenie dla izolacji cieplnej organizmu. Jednocześnie funkcjonuje jako amortyzator, chroniąc niżej położone tkanki przed wstrząsami i urazami [4, 7, 17, 19].

Prawidłowe funkcjonowanie oraz wygląd skóry są bezpośrednio związane ze stanem odżywienia oraz unerwienia, a także z obecnością wyspecjalizowanych komórek, takich jak keratynocyty i fibroblasty. Czynniki wpływającymi na proliferację keratynocytów są p63 (czynnik transkrypcyjny, zapobiega różnicowaniu się komórek macierzystych naskórka do keratynocytów), witamina A i jej analogii, naskórkowy czynnik wzrostu oraz TNF α . Czynniki sprzyjającymi różnicowaniu keratynocytów są stężenie jonów wapnia, z gradientem zwiększającym się od warstwy podstawnej do warstwy rogowej, witamina D3, regulująca ekspresję genów zaangażowanych w różnicowanie keratynocytów, katepsyna E oraz kortyzol. Do keratynocytów dociera najwięcej szkodliwego promieniowania ultrafioletowego, stąd na nich określa się ochronny wpływ substancji kosmetycznych. Komórki naskórka wykorzystywane są także do badania ekspresji genów, syntezy białek i aktywności enzymów [2, 11, 19, 23].

Fibroblasty były pierwszymi komórkami adherentnymi, które udało się hodować *in vitro*. W hodowlach pierwotnych uzyskanych z komórek różnych typów, to zwykle fibroblasty wykazywały najintensywniejszy wzrost i przetrwały komórki adherentne innych typów. Wykorzystując fibroblasty poznano szkodliwy wpływ promieni UVA na materiał genetyczny i utratę zdolności fibroblastów do regeneracji skóry. Określono, że za negatywny skutek działania promieni UV odpowiedzialna jest nadmierna aktywacja metalopro-

teinaż, które niszczą włókna kolagenowe, przez co następuje zmniejszenie ogólnej ilości kolagenu w skórze, w konsekwencji prowadząc do obniżenia jędrności skóry i tworzenia głębokich zmarszczek. W warunkach fizjologicznych metaloproteinazy kontrolują skład macierzy zewnątrzkomórkowej, podtrzymując prawidłową regenerację skóry. Fibroblasty w hodowlach służą jako podłoże dla innych komórek (tzw. kokultury), do oceny wpływu czynników chemicznych na żywe komórki, a także są stosowane jako model w badaniach kosmetycznych i w terapiach kosmetycznych do usuwania blizn i zmarszczek, oraz w badaniach medycznych jako komórki gospodarze dla stosowanych w terapiach wirusów. Fibroblasty są dobrym materiałem do badania wpływu składników kosmetyków na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów [7, 17, 25].

Stały postęp w badaniach zaciera granice pomiędzy poszczególnymi dziedzinami nauki, co sprawia, że staje się ona coraz bardziej interdyscyplinarna. Bez wykorzystania wiedzy z dziedzin takich, jak inżynieria, technika czy informatyka, nie jest możliwy rozwój w badaniach biologii molekularnej. Duża liczba danych oraz technik, jakie ewoluowały na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci, przyczyniła się do rozwoju specyficznych obszarów zainteresowań w biologii komórki. Genomika zajmuje się poznaniem i analizą genomu, transkryptomika zespołem wszystkich mRNA (transkryptomem), proteomika białkami, a metabolomika badaniem metabolitów obecnych w organizmie, tkance czy komórce. Postęp w dziedzinach biologii molekularnej, a w tym także w kosmetyce, przyniosło zsekwencjonowanie ludzkiego genomu. Przede wszystkim stworzyło możliwość porównania cech prawidłowej i patologicznie zmienionej tkanki na poziomie genomu. Jedną z największych korzyści wynikających z zsekwencjonowania genomu jest rozwój techniki mikromacierzy (microarray). W genomice mikromacierze najczęściej są wykorzystywane do oceny ekspresji genów, lecz mogą także być przydatne w identyfikacji mutacji. Proteomika zajmuje się ustaleniem wzoru ekspresji białek i ich sekwencji oraz modyfikacji potranslacyjnych. Oznaczanie poziomu białka uzupełnia informacje uzyskane z analizy mRNA, ekspresja genów może bowiem być modulowana na poziomie zarówno transkrypcji, jak i translacji. Proteomika zajmuje się głównie dwoma działaniami, takimi jak charakterystyka ekspresji białek i charakterystyka funkcji białek na podstawie oceny aktywności białek i ich oddziaływania między sobą. Najczęściej stosowanymi metodami są immunoblotting, immunoprecypitacja, histochemia i mikromacierze białkowe. Dzięki lepszemu poznaniu wzajemnych zależności między białkami, ta gałąź proteomiki może służyć do znalezienia nowych celów dla terapii ukierunkowanej, ocenić mechani-

zmy oporności na dany lek, wpływ składników chemicznych i kosmetyków lub monitorować odpowiedź na terapię ukierunkowaną. Cytomika z kolei służy do oceny zróżnicowania fenotypów komórek w próbcie, na podstawie wyróżnienia w niej różnych typów komórek znajdujących się w różnych stanach funkcjonalnych. Metody w obszarze cytomiki pozwalają ocenić wiele parametrów w jednej komórce z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, która obecnie umożliwia analizę ekspresji do 17 białek w jednej komórce.

Podsumowując – rozwój technik biologii molekularnej, biotechnologii oraz metod badawczych w dziedzinie inżynierii tkankowej, w połączeniu z zaawansowanymi narzędziami bioinformatycznymi, dostarczyły znaczną ilość danych, które przyczyniły się do opracowania metod prewencji oraz profilaktyki w zakresie funkcjonowania skóry. Przydatność wymienionych dziedzin znalazła zastosowanie w wyjaśnieniu mechanizmów gojenia się ran, kancerogenezie, przeszczepów komórek, terapii genowej oraz badaniach toksykologicznych [1].

Poszukiwanie nowych możliwości, badań, narzędzi oraz modeli doświadczalnych w kosmetologii zostało wymuszone przez ograniczenia prawne dotyczące badań na zwierzętach. Od września 2004 r. obowiązuje zakaz testowania gotowych produktów kosmetycznych na zwierzętach, a od marca 2009 r. zakaz testowania składników lub kombinacji składników. W UE zabronione jest również wprowadzanie do obrotu produktów kosmetycznych i ich składników, które były testowane na zwierzętach, niezależnie od pochodzenia tych produktów. Wprowadzenie powyższych ograniczeń pobudziło zainteresowanie w przemyśle kosmetycznym poszukiwaniem metod alternatywnych, takich jak hodowle *in vitro* komórek skóry, do badań wpływu surowców kosmetycznych i kosmetyków na skórę. Hodowle *in vitro* komórek skóry (keratynocytów i fibroblastów) są najlepszym obecnie dostępnym modelem skóry oraz najodpowiedniejszym narzędziem do badań w kosmetologii [8].

Zależnie od rodzaju prowadzonych doświadczeń w kosmetologii wykorzystuje się jednorodne hodowle *in vitro* komórek izolowanych ze skóry ludzkiej (keratynocyty, fibroblasty, melanocyty, komórki Langerhansa), linie komórkowe (komórki modyfikowane genetycznie, komórki immortalizowane, komórki w różnym stadium transformacji czy różnicowania), kokultury różnych typów komórek (keratynocyty z melanocytami, keratynocyty z komórkami układu odpornościowego). Hodowle komórek skóry, zarówno jednorodne, jak i kokultury komórek, np. keratynocytów z melanocytami, są doskonałym modelem do badań podstawowych w kosmetologii. Umożliwiają prowadzenie na poziomie komórkowym i molekularnym badań nad działaniem ksenobiotyków zawartych w kosmetykach oraz nad wpływem czynników zewnętrznych

(np. promieniowanie UV) na fizjologię skóry. Dzięki hodowłom komórkowym możliwa jest również obserwacja zmian poziomu uwalnianych przez komórki cytokin i interleukin po zastosowaniu czynnika aktywnego, co pozwala na dalsze badania ewentualnych reakcji alergicznych lub odpowiedzi układu immunologicznego na działanie drażniące ksenobiotyków. Doświadczenia na hodowlach komórkowych *in vitro* pozwalają na określenie optymalnych dla komórek skóry stężeń ksenobiotyków. W wielu laboratoriach kosmetycznych na świecie badania nad czynnikami aktywnymi przeprowadza się na liniach komórkowych. W porównaniu z komórkami pochodzącymi z izolacji są one bardziej wytrzymałe i łatwiejsze w hodowli [7, 17, 18].

Wyhodowane ludzkie keratynocyty mogą być przeszczepiane w postaci opatrunków w leczeniu oparzeń, chronicznych owrzodzeń oraz różnych chorób skóry. Komórki macierzyste naskórka stanowią cel terapii genowej oraz materiał do testowania nowych leków. Fibroblasty są materiałem wykorzystywanym w transplantologii w leczeniu oparzeń, blizn oraz trudno gojących się ran. W kosmetyce wykorzystuje się tzw. modele skóry, np. model naskórka czy model skóry pełnej. Modele skóry znalazły zastosowanie do badania wpływu substancji kosmetycznych na ekspresję genów, syntezę białek i badanie aktywności wielu enzymów [4, 7, 17].

Techniki biologii molekularnej szeroko wykorzystywane w ocenie funkcji i budowy komórek skóry to reakcja PCR, RT-PCR, metody immunoblotingu (Western Blot, Northern Blot) oraz metody immunoenzymatyczne (np. ELISA). Dodatkowo panele badań poszerza się o cytometrię przepływową, techniki chromatograficzne oraz nanotechnologie [18].

Spośród technik biologii molekularnej najczęściej wykorzystuje się reakcję PCR, RT-PCR oraz metody takie, jak Western Blot i ELISA.

Reakcja RT-PCR dzieli się na dwa zasadnicze etapy: reakcję odwrotnej transkrypcji z udziałem odwrotnej transkryptazy oraz amplifikacja cDNA. Reakcja odwrotnej transkrypcji (*Reverse Transcription*, RT) umożliwia utworzenie cDNA na matrycy RNA, który jest stabilniejszy niż RNA oraz może być amplifikowany za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Reakcja syntezy cDNA może być przeprowadzona z zastosowaniem heksamerów, oligo(dT) lub startera specyficznego dla analizowanego genu. Otrzymany cDNA może być wykorzystany do oceny ekspresji genu na poziomie mRNA w reakcji PCR z użyciem specyficznych starterów [13].

Metoda Western Blot (Immunoblotting) pozwala na detekcję określonego rodzaju białka w mieszaninie białek. Możliwe jest także jednoczesne określenie wielkości białka względem znanego standardu białkowego. Isto-

tą techniki jest przeniesienie białek rozdzielonych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym na membranę, immunodetekcji przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych i uwidocznieniu powstałego kompleksu antygen–przeciwciało. Najczęściej stosowanymi znacznikami kompleksu antygen–przeciwciało są enzymy, z których najczęściej wykorzystuje się peroksydazę chrzanową (*horseradish peroxidase*, HRP), fosfatazę alkaliczną (*alkaline phosphatase*, AP) lub oksydazę glukozową. Metody immunodetekcji powstałych kompleksów antygen–przeciwciało dzieli się na bezpośrednie i pośrednie. Pierwsza z nich wykorzystuje połączenie znacznika z przeciwciałem pierwszorzędowym. W metodzie pośredniej znacznik przyłączony jest do przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko przeciwciału I – rzędowemu, przez co następuje wzmocnienie sygnału pochodzącego od znacznika [12, 22].

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) jest jednym z najpowszechniej stosowanych testów w badaniach biomedycznych, zarówno naukowych, jak i diagnostycznych. Służy do wykrycia określonych białek w badanym materiale z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Zasada działania testu polega na wiązaniu przeciwciała monoklonalnego, związane z określonym enzymem, które rozpoznaje dane białko zawarte w materiale badanym, a które zostało wcześniej unieruchomione na powierzchni płytki. Po dodaniu przeciwciał tworzą się kompleksy immunologiczne, w wyniku czego przeciwciało zostaje także unieruchomione. Niezwiązane przeciwciała są wypłukiwane, następnie dodawany jest substrat dla enzymu związanego z przeciwciałami. Zachodzi reakcja enzymatyczna, czemu towarzyszy powstanie barwnego produktu. Jego wykrycie świadczy o obecności danego białka w materiale badanym, a mierząc ilość powstałego produktu można przeprowadzić analizę ilościową [21].

Przydatność technik biologii molekularnej w kosmetologii wykorzystywana jest na szeroką skalę, co zostało pokrótce ukazane w poniższych przykładach.

Arcydzięgiel (*Angelica dahurica*) jest źródłem furokumaryny, psoralenu, które są potencjalnymi substancjami o właściwościach wybielających. Skład ekstraktu z rośliny został poddany analizie chromatograficznej, a następnie wykorzystując hodowlę komórek nowotworowych czerniaka B16 sprawdzono hamujące działanie wyizolowanych składników na proces melanogenezy. Mechanizm działania wybielającego rośliny powiązано ze spadkiem poziomu ekspresji tyrozynazy. Potwierdzenie przypuszczeń uzyskano poprzez oznaczenie ekspresji tyrozynazy z wykorzystaniem techniki RT-PCR. Na podstawie wyników, autorzy sugerują, że po weryfikacji wyników w warun-

kach *in vivo*, wyciągi z arcydzięgla będą mogły zostać użyte jako nowy składnik wybielający w kosmetykach [3].

Wykorzystanie technik RT-PCR oraz Western Blot pozwoliło na wyjaśnienie mechanizmu zmian degeneracyjnych w procesie złuszczenia keratynocytów pod wpływem miejscowego użycia retinoidów. W tym celu wykorzystano wstępnie hodowle ludzkich keratynocytów, które były inkubowane z kwasem retinowym przez 24 godziny, po tym czasie przeprowadzono oznaczenia ekspresji mRNA oraz białek – desmogleiny (DSG) 1, desmokoliny (DSC) 1 oraz korneodesmozyny. Uzyskane wyniki sugerują, że kwas retinowy spowodował spadek poziomu ekspresji transkryptów dla DSG1 and DSC1, wzrost degradacji korneodesmosomów i w konsekwencji łuszczenie się korneocytów [15].

Wykorzystanie komórek czerniaka B16 umożliwiło zbadanie wpływu ośmiu pochodnych witaminy E na proces melanogenezy i hamujący wpływ na ekspresję i aktywność tyrozynazy, związanej bezpośrednio z tym procesem. Z przeprowadzonych badań z wykorzystaniem techniki odwrotnej transkrypcji wykazano hamujący wpływ dwóch pochodnych witaminy E na ekspresję tyrozynazy oraz białka związanego z tyrozynazą (TRP-2). Te odkrycia sugerują, że zarówno d- β -tokoferol i d- χ -tokoferol mogą być użyteczne jako efektywne składniki kosmetyków wybielających o mniejszej toksyczności dla skóry, aby zapobiec lub poprawić pigmentację skóry w takich zmianach skórnych, jak plamy i piegi spowodowane przez promieniowanie UV [24].

W hodowli ludzkich fibroblastów oraz keratynocytów inkubowanych z ekstraktem z alg (*Chlorella vulgaris*) zbadano wpływ składników glonu na restrukturyzację skóry oraz właściwości ochronne przeciwko promieniowaniu UV. Dla realizacji zamierzonych celów analizowano poziomy ekspresji kolagenu, elastyny, tioredoksyny (TX1 i TX2) oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz wykorzystując techniki RT-PCR, Western Blot, real-time PCR oraz minichipów. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania w kosmetykach glonu *Chlorelli vulgaris* jako składnika o właściwościach antycellulitowych, przeciwzmarszczkowych oraz przeciw starzeniu się skóry [9].

Wpływ promieniowania na proces starzenia się skóry przez remodeling skórnej macierzy zewnątrzkomórkowej był analizowany z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (myszy C57/BL6) poddanego naświetlaniu przez okres 182 dni promieniami UVB. Zamierzeniem autorów był poznanie zmian dotyczących ilości i jakości kwasu hialuronowego. Pomiar stężenia kwasu hialuronowego wykonano testem ELISA, analiza na poziomie molekularnym z wykorzystaniem techniki RT-PCR (*reverse transcription*, PCR) obejmowa-

ła ekspresję genów dla syntaz HAS1 do HAS3, czynników wzrostu (TGF)- β 1, T β 1R-II), hialuronidaz (HYAL1, HYAL2) i in. Przeprowadzone badania wykazały znaczną utratę kwasu hialuronowego pod wpływem UV, spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę HA oraz spadek ekspresji czynników wzrostu [5].

Wykorzystując kompilacje analiz różnych typów, w tym technikę RT-PCR, wykazano po raz pierwszy obecność w skórze dekarboksylazy glutaminianu (GAD), która katalizuje syntezę neuroprzebieźnika GABA. Wykazano ekspresję mRNA oraz białka GAD67 zarówno w skórze myszy, jak i w hodowli ludzkich fibroblastów skóry. Wykazano, że GABA stymuluje syntezę kwasu hialuronowego oraz zwiększa przeżywalność fibroblastów w odpowiedzi na działanie czynników stresu oksydacyjnego [10].

Fotouszkodzenie skóry jest wywołane szeregiem reakcji prowadzących do produkcji reaktywnych form tlenu zwiększających ekspresję metaloproteinaz, które są odpowiedzialne za niszczenie włókien kolagenowych i elastyny. Koenzym Q10 jest uważany za czynnik redukujący powstawanie reaktywnych form tlenu oraz uszkodzeń DNA wywołanych przez promieniowanie UV. Badania pokazały inhibicyjny wpływ koenzymu Q10 na poziomy MMP-1, PGE-2 oraz Il-6 (testy ELISA) w hodowli ludzkich fibroblastów skóry, co potwierdziło ochronny wpływ koenzymu na skórę w procesie fotostarzenia [6].

Poziom nawilżenia i spójność warstwy rogowej naskórka to ważne czynniki wpływające na wygląd skóry. Obecność akwaporyn oraz innych białek tworzących otoczkę rogową przyczynia się do zwiększenia spójności keratocytów, co polepsza utrzymanie prawidłowego stanu nawilżenia. Brazylijscy naukowcy badali wpływ ekstraktu z *Piptadenia colubrina* na ekspresję genów kodujących wspomniane białka. Eksperymenty prowadzono w warunkach *in vitro* inkubując hodowlę ludzkich keratynocytów z badanym ekstraktem. Następnie przy użyciu metody Real Time PCR mierzono poziom ekspresji genów dla akwaporyny-3, lorykryny, inwolukryny oraz filagryny. Uzyskane wyniki, sugerują, że badany ekstrakt z *Piptadenia colubrina* przyczynia się do wzrostu nawodnienia naskórka i indukuje ekspresję genów dla białek otoczki rogowej, co przyczynia się do wzrostu kohezji w obrębie warstwy rogowej, a tym samym pozwala zatrzymywać wodę i substancje nawilżające w skórze. Autorzy podkreślają przydatność zastosowania rośliny jako wartościowego surowca w kosmetologii [16].

Katepsyna jest zaangażowana w mechanizmy regulatorowe w obrębie skóry i posiada zdolność do degradacji włókien kolagenowych. W eksperymentach *in vivo* i *in vitro* badano rolę katepsyn B, D, G i K w zjawisku fo-

tostarzenia. Metody immunohistochemiczne posłużyły do wykrycia zmian zachodzących w skórze pod wpływem długotrwałej ekspozycji na promieniowanie UV. Technika Western blot analizowano natomiast poziom ekspresji katepsyn w fibroblastach, w których wcześniej indukowano fotostarzenie. Za pomocą metody RT-PCR określono poziom mRNA dla tych enzymów w skórze i w fibroblastach. Uzyskane wyniki sugerują, że katepsyny można zastosować jako marker zjawiska starzenia się skóry [26].

Korzystny efekt hormonu wzrostu w procesie gojenia się ran jest powiązany ze stymulacją IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1). Badania przeprowadzone na hodowli fibroblastów oraz keratynocytów, prowadzonych w różnych stężeniach hormonu wzrostu pozwoliły na ocenę proliferacji fibroblastów, migracji keratynocytów oraz poziomu nowosyntetyzowanego IGF-1 (technika RT-PCR). Uzyskane wyniki sugerują, że hormon wzrostu wzmacnia miejscową produkcję IGF-1, który aktywuje proliferację fibroblastów oraz migrację keratynocytów, co może zostać wykorzystane w miejscowym leczeniu ran [14].

Poznanie mechanizmów kontrolujących procesy syntezy, regeneracji i starzenia się skóry jest kluczowe w zrozumieniu fizjologii oraz patologii skóry, a także w umiejętnym zastosowaniu syntetycznych i naturalnych kosmetyków utrzymujących dobrą kondycję skóry. Wykorzystanie technik biologii molekularnej, biotechnologii oraz metod inżynierii tkankowej pozwoliło na realizację tych zadań, co istotnie wpłynęło na wyjaśnienie takich mechanizmów, jak gojenie się ran czy kancerogeneza, z jednoczesnym poszukiwaniem metod terapeutycznych licznych schorzeń skóry.

Bibliografia

1. Adamczyk A., Zastosowania współczesnych osiągnięć biologii molekularnej w medycynie, *Onkologia Info* 2010, 7, 2: 58–66.
2. Bikle D.D., Vitamin D regulated keratinocyte differentiation, *J Cell Biochem* 2004, 1: 92 (3): 436–44.
3. Cho Y.H., Kim J.H., Park S.M., Lee B.C., Pyo H.B., Park H.D., New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica*, *Cosmet Sci* 2006, 57 (1): 11–21.
4. Chomiczewska D., Trznadel-Budźko E., Kaczorowska A., Rotsztejn H., Znaczenie komórek Langerhansa w układzie immunologicznym skóry, *Pol Merk Lek* 2009, 26: 153, 173.
5. Dai G., Freudenberger T., Zipper P., Melchior A., Grether-Beck S., Rabausch B., de Groot J., Twarock S., Hanenberg H., Homey B., Krutmann J., Reifemberger J.,

- Fischer J.W., Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases, *Am J Pathol* 2007, 171 (5): 1451–1461.
6. Fuller B., Smith D., Howerton A., Kern D. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids, *J Cosmet Dermatol* 2006, 5 (1): 30–38.
 7. Gojniczek K., Garnarczyk A., Pytel A., Hodowle komórek in vitro w kosmetologii, *Wiad Lek* 2005, 58 (1–2): 71–77.
 8. www.kosmopedia.org/o_kosmetykach/kosmetyki_a_testy_na_zwierzet.
 9. www.osmosisskincare.com/research/files/chlorella-extract-on-skin.pdf.
 10. Ito K., Tanaka K., Nishibe Y., Hasegawa J., Ueno H., GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1770 (2): 291–296.
 11. Kawakubo T., Yasukochi A., Okamoto K., Okamoto Y., Nakamura S., Yamamoto K., The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes, *Biological Chemistry* 2011, 392 (6): 571–585.
 12. Kłyszewko-Stefanowicz L., *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa 2005: 181–198.
 13. Korcz A., Lipiński D., Mikołajczyk-Stecyna J., Słomski R., Synteza cDNA na matrycy RNA, [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008: 176–182.
 14. Lee S.W., Kim S.H., Kim J.Y., Lee Y., The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration, *Reconstr Aesthet Surg* 2010, 63 (4): 364–369.
 15. Moon Young K., Sang Eun L., Jae Yong Ch., Soo-Chan K., Retinoid Induces the Degradation of Corneodesmosomes and Downregulation of Corneodesmosomal Cadherins: Implications on the Mechanism of Retinoid-induced Desquamation, *Ann Dermatol* 2011, 23 (4): 439–447.
 16. Pereda Mdel C., Dieamant Gde C., Eberlin S., Werka R.M., Colombi D., Queiroz M.L., Di Stasi L.C., Expression of differential genes involved in the maintenance of water balance in human skin by *Piptadenia colubrina* extract, *J Cosmet Dermatol* 2010, 9 (1): 35–43.
 17. Piķuła M., Trzonkowski P., *Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie*, *Post Hig Med Dosw (online)* 2009, 63: 449–456.
 18. Potargowicz E., *Perspektywy biologii molekularnej w kosmetologii*, *Pol J Cosmetol* 2011, 14 (1): 2–16.
 19. Proksch E., Brandner J., Jensen J.M., The skin: an indispensable barrier, *Exper Dermatol* 2008, 17 (12): 1063–1072.
 20. Sawicki W., *Histologia*, PZWL, Warszawa 2005: 515–522.
 21. Stryer L., *Biochemia*, PWN, Warszawa 2003: 61–62.
 22. Szalata M., Pławski A., Słomski R., *Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym*, [w:] *Analiza DNA – teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008: 503–511.

23. Truong A.B., Kretz M., Ridky T.W., Kimmel R., Khavari P.A., P63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes, *Genes & Develop* 2006, 20 (22): 3185–3197.
24. Yuto K., Yuri O., Kouichi A., Comparison of the inhibitory effects of vitamin E analogues on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells, *Cytotechnology* 2009, 59 (3): 183–190.
25. Zegarska B., Woźniak M., Wpływ estrogenu na zmiany zachodzące w skórze, *Przeegl Menop* 2007, 4: 233–238.
26. Zheng Y., Lai W., Wan M., Maibach H.I., Expression of cathepsins in human skin photoaging, *Skin Pharmacol Physiol* 2011, 24 (1): 10–21.