

Penetracja substancji aktywnych przez skórę. Czynniki determinujące to zjawisko i metody jego modyfikacji

Penetration of active substances through the skin. Factors affecting this phenomenon and methods for its modification

STRESZCZENIE

Skóra to największy organ ludzkiego ciała, którego stan zależy od wielu czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Organ ten pełni wiele istotnych funkcji, m.in. izoluje wnętrze organizmu od środowiska zewnętrznego, bierze udział w termoregulacji organizmu oraz percepcji bodźców. Skóra stanowi istotną drogę transportu niektórych substancji aktywnych.

Celem artykułu było przedstawienie mechanizmu przenikania substancji aktywnych przez barierę naskórkową oraz czynników determinujących ten proces.

Istnieje wiele metod mających na celu zwiększenie przenikania cząsteczek przez barierę naskórkową. Część z nich jest związana z substancjami aktywnymi – zwiększenie lipofilowości poprzez modyfikację cząsteczki, wykorzystanie nośników typu nanokapsułki czy liposomy. Pozostałe metody skupiają się na zmianie właściwości lub grubości warstwy rogowej. W pierwszym przypadku wykorzystuje się tzw. promotory przenikania, prąd lub ultradźwięki. W drugim z kolei usuwa się określoną część warstwy rogowej naskórka wykorzystując w tym celu peelingi mechaniczne (mikrodermabrazja, peeling kawitacyjny) oraz chemiczne (tzw. chemexfoliacja).

Na etapie projektowania kosmetyku warto przeprowadzić testy *in vitro* oraz *in vivo*, które mają na celu oszacowanie zdolności penetrujących cząsteczek substancji aktywnej, a także skuteczności jej działania.

Słowa kluczowe: przenikanie substancji aktywnych przez skórę, kosmetyczne substancje aktywne, bariera naskórkowa

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body. Its condition depends on many internal and external factors. The organ performs many important functions, including isolation of the body's interior from the external environment, participation in thermoregulation process of the body and the perception of stimuli. The skin is an important transport route for some active substances.

The aim of the article was to present the mechanism of penetration of active substances through the epidermal barrier and factors determining this process.

There are many methods to increase the penetration of molecules across the epidermal barrier. Some of them are related to the active substance (increasing lipophilicity by modifying the molecule, using carriers such as nanocapsules or liposomes). The other methods focus on changing the properties or thickness of the stratum corneum. In the first case, the so-called permeation promoters, current or ultrasound are being used. In the second, a specific part of the stratum corneum can be removed using mechanical (microdermabrasion, cavitation peeling) and chemical peels (so-called chemexfoliation).

*At the stage of designing a cosmetic, it is worth carrying out *in vitro* and *in vivo* tests to assess the penetrating ability of the active substance molecules, as well as the effectiveness of its action.*

Keywords: penetration of active substances through the skin, cosmetic active ingredients, epidermis barrier

400 Alicja Śliwowska
Wydział Nauk
o Zdrowiu
Państwowa Wyższa
Szkoła Zawodowa
w Koninie
ul. Przyjaźni 1
62-510 Konin
T: +48 63 249 72 00
E: alicja.sliwowska@
konin.edu.pl

otrzymano / received

21.07.2020

poprawiono / corrected

01.08.2020

zaakceptowano / accepted

08.08.2020

WSTĘP

Skóra (łac. *cutis*) stanowi największy organ ludzkiego ciała, osiagający powierzchnię nawet do 2 m². Jej stan zależy od wielu czynników, m.in. uwarunkowań genetycznych, diety i stylu życia, stanu zdrowia oraz nawyków pielęgnacyjnych i stosowanych produktów kosmetycznych. *Cutis* pełni wiele istotnych funkcji, takich jak izolacja ustroju od otaczającego go środowiska, termoregulacja organizmu czy percepcja bodźców pochodzących z zewnątrz. Należy także wspomnieć o udziale skóry w gospodarce wodno-elektrolitowej i tłuszczowej organizmu i jej istotnej roli w reakcji odpornościowej. Co więcej, skóra stanowi istotną drogę transportu niektórych substancji aktywnych. Ten fakt nie pozostaje bez znaczenia dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego [1].

PRZENIKANIE SUBSTANCJI AKTYWNYCH A KOSMETYKI

W świetle aktu prawnego (art. 2, pkt 9, ustawy z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych, Dz. U. poz. 2227) oraz rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) (nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych, zwanego „rozporządzeniem nr 1223/2009”), kosmetykiem nazwać można „każdą substancję lub mieszaninę przeznaczoną do kontaktu z zewnętrznymi częściami ciała ludzkiego (naskórkiem, owłosieniem, paznokciami, wargami oraz zewnętrznymi narządami płciowymi) lub z zębami oraz błonami śluzowymi jamy ustnej, którego wyłącznym lub głównym celem jest utrzymywanie ich w czystości, perfumowanie, zmiana ich wyglądu, ochrona, utrzymywanie w dobrej kondycji lub korygowanie zapachu ciała” [2]. W celu nadania kosmetykowi pożądanego i ukierunkowanego działania pielęgnacyjnego do podłoża kosmetycznego (tak zwanej „bazy kosmetycznej”) dodaje się wybrane składniki (substancje) aktywne. Kosmetyczne substancje aktywne są definiowane jako substancje pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które wykazują określone działanie na fizjologię lub funkcje skóry. W przemyśle kosmetycznym istnieje wiele związków chemicznych, które mogą pełnić rolę aktywnych składników preparatów przeznaczonych do pielęgnacji skóry. Są to m.in. substancje nawilżające, złuszczone, przeciwzapalne, czy depigmentujące. Wiele haseł marketingowych zawiera deklaracje typu „przenika w głąb skóry, wypełnia zmarszczki, odbudowuje kolagen”. Należy jednak pamiętać, że mechanizm przenikania substancji aktywnych przez barierę naskórkową jest bardzo złożony i zależy od wielu czynników. Uważa się, że kosmetyk powinien działać na poziomie naskórka. Tylko nieliczne z kosmetycznych substancji aktywnych zaaplikowanych topikalnie mogą docierać (w bardzo niewielkim stopniu) do skóry właściwej. Takim przykładem jest retinol [1, 3].

Drogi transportu substancji aktywnych przez skórę

Przenikanie substancji aktywnych przez barierę naskórkową może zachodzić drogą intercelularną, transcelularną oraz transfolikularną.

- Transport intercelularny (międzykomórkowy) polega na migracji cząsteczek substancji przez cement międzykomórkowy i jest on typowy dla związków o charakterze lipofilowym.
- Transport transcelularny (przekomórkowy) z kolei jest charakterystyczny dla nierozpuszczalnych w cemencie komórkowym substancji hydrofilowych.
- Trzecim możliwym sposobem penetracji substancji aktywnych do naskórka jest tzw. transport transfolikularny, który polega na wnikaniu substancji aktywnych do skóry wzdłuż torebek włosowych. Ten rodzaj transportu zachodzi w przypadku substancji lipofilowych, dobrze rozpuszczalnych w zawartości gruczołów łojowych, usytuowanych w pobliżu mieszka włosowego.

Należy jednak podkreślić, że droga transfolikularna (przez mieszki włosowe oraz ujścia gruczołów łojowych) ma tutaj niewielkie znaczenie, gdyż powierzchnia wspomnianych przydatków to zaledwie ok. 2% powierzchni skóry. Co więcej, droga przekomórkowa jest dużo mniej istotna, niż droga międzykomórkowa, bowiem znaczna większość kosmetycznych i farmaceutycznych substancji aktywnych to związki lipofilowe [4-8].

Mechanizmy przenikania cząsteczek substancji aktywnych przez skórę

Proces przenikania cząsteczki substancji przez barierę naskórkowo-skórną zachodzi głównie na drodze dyfuzji biernej opisaną przez pierwsze prawo Ficka i przebiega w następujących etapach:

- podział cząsteczek substancji aktywnej pomiędzy podłoże kosmetyczne a *s.corneum* naskórka,
- dyfuzja cząsteczek substancji przez lipofilową warstwę rogową naskórka,
- podział cząsteczek substancji pomiędzy warstwę rogową i ziarnistą naskórka,
- dyfuzja cząsteczek substancji przez kolejne warstwy naskórka o wzrastającej hydrofilowości,
- partycja cząsteczek substancji pomiędzy warstwę podstawną naskórka a górną część skóry właściwej,
- dyfuzja cząsteczek substancji do skóry właściwej [1, 8, 9].

Czynniki wpływające na przeznaskórkową penetrację substancji aktywnych

Istnieje wiele istotnych czynników wpływających na efektywną penetrację substancji aktywnych przez barierę naskórkową. Wśród nich wymienia się między innymi właściwości substancji penetrującej (jej rozmiar, lipofilowość, polarność, rozpuszczalność w lipidach i w wodzie),

właściwości podłoża kosmetycznego (lepkość, pH), obecność promotorów przenikania oraz stan zdrowotny skóry.

Rozmiar cząsteczki substancji aktywnej nie powinien być zbyt duży. W nawiązaniu do tzw. „Reguły 500 Daltonów”, przedstawionej w 2000 roku przez Bosa i Meinardiego, cząsteczka o rozmiarze powyżej 500 Da nie ma zdolności penetracji w głębsze warstwy skóry. Reguła ta powstała w oparciu o analizę masy cząsteczkowej alergenów, najczęściej powodujących kontaktowe zapalenie skóry. Wywnioskowano bowiem, że alergen musi wykazywać zdolność do penetracji skóry, aby wywołać odpowiedź immunologiczną. Przykładem cząsteczki niewielkich rozmiarów, łatwo penetrującej warstwy skóry, jest kwas retinowy o masie 300 Da. Z kolei wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy (5-200 kDa) nie ma zdolności przenikania przez skórę, w związku z czym może wykazywać działanie pielęgnacyjne jedynie na górną część warstwy rogowej. W późniejszych latach zaprezentowano wyniki badań podważające regułę 500 Da. W 2006 roku Chen i wsp. opublikowali pracę naukową, w której opisali transepidermalną penetrację cząsteczek białka o masie 6000 Da. Pomimo tego, do dzisiejszego dnia reguła 500 Da sprawnie funkcjonuje w przewidywaniu zdolności substancji aktywnych do penetracji bariery naskórkowej [1, 10, 11].

Niezwykle ważnym aspektem jest także lipofilowość cząsteczki substancji aktywnej, czyli wielkość charakteryzująca powinowactwo cząsteczki do fazy lipidowej i wodnej. Miarą lipofilowości substancji chemicznej jest stosunek jej równowagowych stężeń w układzie dwóch, niemieszających się rozpuszczalników. W warunkach równowagi termodynamicznej, przy stałym ciśnieniu i w stałej temperaturze stosunek ten ma stałą wielkość i jest nazywany współczynnikiem podziału. Jego wartość jest charakterystyczna dla danej substancji oraz danego układu dwóch rozpuszczalników. Do określenia współczynnika podziału kosmetycznych oraz farmaceutycznych substancji aktywnych wykorzystuje się n-oktanol i wodę. Taki układ rozpuszczalników stanowi model bariery błonowej. Jak już wspomniano, droga międzykomórkowa odgrywa najważniejszą rolę w migracji substancji aktywnych z kosmetyku do głębszych warstw naskórka. W związku z tym, w celu zwiększenia zdolności penetracyjnych cząsteczek hydrofilowych stosuje się ich modyfikację za pomocą m.in. łańcuchów kwasów tłuszczowych. Przykładem takiej modyfikacji jest czysty kwas L-askorbinowy i jego pochodna – palmitynian askorbylu. Oprócz zwiększenia lipofilowości, taka modyfikacja zapewnia także większą stabilność cząsteczki witaminy C [12, 13].

Nie bez znaczenia pozostają także właściwości samego kosmetyku, a konkretnie lepkość podłoża kosmetycznego. Parametr ten ma bowiem wpływ na ilość substancji uwalnianej z podłoża do skóry. Wyniki badań dowodzą, że obniżenie lepkości formy aplikacyjnej pozytywnie wpływa

na zwiększenie ilości substancji aktywnej przenikającej w głąb skóry. Stahl i wsp. przeprowadzili badania uwalniania metronidazolu *in vitro* z różnych form aplikacyjnych (żel, krem oraz maść, zawierające w swoim składzie 1% w/w substancji czynnej). W oparciu o wyniki badań stwierdzono, że największa ilość substancji aktywnej uwalnia się z żelu o najmniejszej lepkości, natomiast najmniej z maści, cechującej się największą lepkością spośród badanych preparatów. Podobne wnioski przedstawiły Olejnik i wsp. prezentując wpływ lepkości podłoża na ilość uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych. Otrzymane wyniki dowiodły, że niezależnie od rodzaju jasmonidu, największa jego ilość uwalnia się z formułacji żelowych, a najmniejsza z tłustych emulsji typu w/o [1, 14-17].

Na biodostępność substancji aktywnej ma także wpływ wartość pH podłoża kosmetycznego. Ma ona bowiem wpływ na to, jaka forma substancji (zdysocjowana lub niezdysocjowana) przeważa w produkcie. W lipidach lepiej rozpuszczają się substancje niezdysocjowane, a przepuszczalność błon biologicznych jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia dysocjacji związków. Tak więc, im łatwiej dana substancja dysocjuje na jony, tym słabsza jest jej penetracja przez barierę naskórkową [1].

Stan zdrowotny skóry to kolejny parametr, który determinuje przenikanie substancji aktywnych z form aplikacyjnych. Zaobserwowano, że proces dyfuzji cząsteczek substancji przebiega szybciej przez cienką bądź uszkodzoną skórę. Zaobserwowano również, że wysoki stopień nawilżenia skóry ułatwia transport substancji aktywnych [8].

METODY ZWIĘKSZANIA PRZENIKANIA SUBSTANCJI AKTYWNYCH PRZEZ BARIERĘ NASKÓRKOWĄ

Im lepsza penetracja substancji aktywnych przez naskórek, tym większa ich efektywność działania. Istnieje kilka metod wykorzystywanych w celu zwiększenia przenikania cząsteczek substancji aktywnych z zaaplikowanego preparatu do skóry.

Pierwsza z nich jest związana z modyfikacją cząsteczek substancji. Należy pamiętać, że substancje hydrofilowe nie migrują z taką łatwością przez cement międzykomórkowy, jak substancje lipofilowe. W związku z powyższym, w celu zwiększenia lipofilowości substancji modyfikuje się jej cząsteczkę poprzez „dołączenie” reszty długołańcuchowego kwasu tłuszczowego. Taka pochodna cechuje się lepszą rozpuszczalnością w tłuszczach, dzięki czemu łatwiej migruje drogą transcelularną i transfolikularną w porównaniu z substancją wyjściową. Dodatek kwasu tłuszczowego nie tylko zwiększa rozpuszczalność substancji aktywnej w tłuszczach, ale także stabilizuje cząsteczkę. Przykładowo, palmitynian askorbylu cechuje się większą trwałością w porównaniu z czystym kwasem L-askorbinowym [8, 9].

Kolejną metodą mającą na celu polepszenie przenikania składników aktywnych jest modyfikacja właściwości warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*). W tym celu często stosuje się okluzję (*lac. oclusio* – zamknięcie, bądź *occludere, oclusum* - zamknąć), która polega na wytworzeniu na skórze powłoki (filmu) redukującej lub całkowicie uniemożliwiającej odparowanie wody z naskórka. Okluzja powoduje więc zwiększenie nawodnienia warstwy rogowej naskórka poprzez uniemożliwienie parowania wody ze skóry, zwiększenie przepływu krwi w naczyniach skórnych oraz podwyższenie temperatury powierzchni skóry. Zjawisko okluzji w kosmetyce ma duże znaczenie w przypadku etapowej pielęgnacji. Dlatego też nie bez znaczenia jest fakt, że po aplikacji serum bogatego w składniki aktywne należy zaaplikować krem, który utworzy warstwę okluzyjną i umożliwi penetrację składników serum do głębszych warstw naskórka. Niekiedy okluzja nie jest zjawiskiem pożądanym, zwłaszcza w przypadku, gdy tworzą ją znaczące ilości węglowodorów ropopochodnych (wazelina, parafina, воск ziemny) na powierzchni skóry problematycznej. W gabinetach beauty rolę okluzyjną pełnią bardzo często maski algowe, które są dobrze tolerowane przez większość rodzajów i typów skór [1, 18, 19].

Inną metodą modyfikacji właściwości warstwy rogowej naskórka jest stosowanie tzw. promotorów przenikania (wchłaniania, sorpcji), zwanych dalej PP. Substancje te przenikają do warstwy rogowej i zwiększają jej przepuszczalność. Promotory wchłaniania mogą działać dwójako – zaburzać uporządkowany układ lipidów międzykomórkowych warstwy rogowej, upłynniać je lub nawet rozpuszczać. PP powinny szybko przenikać do warstwy rogowej skóry i ulegać tam czasowej kumulacji. Co bardzo ważne, zmiany w przepuszczalności *stratum corneum* wywołane przez PP powinny mieć charakter odwracalny, tymczasowy. W przeciwnym razie może dojść do zaburzenia funkcjonowania bariery naskórkowej, jej nadmiernej przepuszczalności, co może prowadzić do podrażnień skóry i nadmiernej, transepidermalnej utraty wody TEWL (*trans epidermal water loss*). Ponadto PP powinny być nieaktywne farmakologicznie, nietoksyczne, niedrażniące i nieuczulające. Nie powinny także wchodzić w niekorzystne interakcje z innymi składnikami preparatu. Najczęściej jako promotory sorpcji wykorzystywane są alkohole (etanol), glikole (glikol propylenowy), nienasycone kwasy tłuszczowe (kwas olejowy), terpeny (mentol) oraz związki powierzchniowo czynne (rzadko). Należy pamiętać, że promotory przenikania stanowią składnik podłoża kosmetycznego, mogą więc wpływać na jego właściwości fizykochemiczne (pH, lepkość, stabilność) [3, 6].

Nieco bardziej inwazyjne są metody polegające na częściowym usunięciu warstwy rogowej naskórka. Metody te dzieli się na chemiczne oraz fizyczne. Pierwsze z nich mają działanie keratolityczne, co skutkuje ścięciem

s.corneum i łatwiejszą penetracją substancji aktywnych do kolejnych warstw naskórka. Takie działanie wykazują różnego rodzaju peelingi chemiczne, m.in. alfa-hydroksykwasy AHA, beta-hydroksykwasy BHA, kwas trichlorooctowy, a także mocznik. Do metod fizycznych z kolei zaliczyć można mikrodermabrazję, peelingi z wykorzystaniem substancji ścierających (drobno- i gruboziarnistych, choć w przypadku skóry twarzy te drugie nie są zalecane ze względu na zbyt agresywne działanie). Częściowe usunięcie warstwy rogowej naskórka wiąże się z uwrażliwieniem skóry na działanie promieniowania słonecznego, i choć fotoprotekcja jest koniecznością przez cały rok, to po tego typu zabiegach należy zachować szczególną ostrożność [20, 21].

Bardzo skuteczne okazują się być metody omijające barierę naskórkową, związane z przerwaniem jej ciągłości. Przykładem tego typu zabiegu jest mezoterapia igłowa, a także mikro- oraz nanoigłowa, w której podaje się substancję aktywną (bądź ich mieszaninę, zwaną często koktajlem) do głębszych warstw naskórka lub skóry właściwej. Samo mikronakłuwanie skóry powoduje miejscowe uszkodzenie drobnych naczyń krwionośnych oraz indukowanie procesów naprawczych prowadzących do uwolnienia czynników wzrostu. Takie działanie ma na celu pobudzenie aktywności fibroblastów i remodelling skóry [22].

W celu zwiększenia przenikania substancji aktywnych przez barierę naskórkową wykorzystuje się także prąd elektryczny oraz ultradźwięki. Przykładem może być jonoforeza, w której czynnikiem zwiększającym wchłanianie leku jest prąd elektryczny przepływający między dwoma elektrodami (anodą i katodą), umieszczonymi na skórze. Substancja ulegająca dysocjacji jest obecna w roztworze i aplikowana w ten sposób, że pozostaje w kontakcie z elektrodą o tym samym ładunku (dodatnim lub ujemnym). W momencie włączenia przepływu prądu jony substancji leczniczej są odpychane od elektrody pod którą się znajdują i migrują do elektrody o przeciwnym ładunku. Metoda ta służy głównie do podania substancji dysocjujących (rozpadających się na jony dodatnie i ujemne), a więc najtrudniej ulegających wchłanianiu. Nie bez znaczenia jest także fakt, że już pod wpływem samego prądu elektrycznego przepuszczalność skóry zwiększa się na skutek zaburzenia układu międzykomórkowych lipidów *stratum corneum*. Kolejna metoda wykorzystywana w celu zwiększenia przenikania przez naskórkowe to sonoforeza (fonoforeza). Pod wpływem działania ultradźwięków w przestrzeniach międzykomórkowych warstwy rogowej powstają mikropory, które zaburzą układ lipidów i powodują zwiększenie przestrzeni międzykomórkowych. Zarówno w przypadku elektroporacji, jak i sonoforezy efekt zaburzenia struktury cementu międzykomórkowego jest tymczasowy, co jest ważne dla prawidłowego funkcjonowania bariery jaką stanowi *s.corneum* [23].

Innym przykładem może być zjawisko elektroporacji, które polega na wytworzeniu kanałów (elektroporów) w międzykomórkowych warstwach lipidowych *stratum corneum* pod wpływem trwających krótko (mikro- do milisekund) impulsów elektrycznych (napięcie 10-1000 V). Utworzone elektropory pozostają otwarte przez czas kilkunastu do kilkudziesięciu sekund, a ich średnica waha się od 40 do 250 mikronów. Takie działanie umożliwia penetrację nieco większych cząsteczek substancji aktywnych drogą międzykomórkową [24].

W celu modyfikacji zdolności penetracyjnych niektórych składników wykorzystuje się struktury nośnikowe. Przykładem są liposomy – pęcherzykowe struktury o wielkości 0,01-1 µm powstające z fosfolipidów. Wnętrze liposomów jest wypełnione fazą wodną, a ich otoczka jest zbudowana analogicznie do błon biologicznych. Taka specyficzna budowa umożliwia „zamknięcie” w ich wnętrzu hydrofilowych substancji, które są słabo rozpuszczalne w lipidach cementu międzykomórkowego, przez co gorzej migrują przez barierę naskórkową. Enkapsulacja cząsteczek wspomnianych substancji ułatwia ich transport przez naskórkowy, a więc zwiększa ich biodostępność. Co więcej, taka modyfikacja jest dobrym rozwiązaniem w przypadku niestabilnych związków, bowiem chroni je przez oksydacją i rozpadem. Liposomy to tylko jeden z wielu przykładów struktur nośnikowych wykorzystywanych w kosmetyce i farmacji. Innymi przykładami nośników substancji kosmetycznych są nanokapsułki. Są to pęcherzykowe systemy, których otoczka jest zbudowana np. z chitozanu czy cyklodekstryn. Cząsteczki substancji są uwalniane z ich wnętrza wskutek stopniowej, enzymatycznej degradacji materiału tworzącego ścianę nanokapsułki [25].

Metody badania

przenikania substancji aktywnych *in vitro*

Teoretyczne oszacowanie przenikania cząsteczek substancji aktywnej przez bariery imitujące skórę *in vitro*, to badania, które prowadzone są na etapie projektowania preparatu kosmetycznego. Jest to możliwe dzięki badaniu ich uwalniania z formułacji kosmetycznych IVRT (*in vitro release test*) wskutek dyfuzji cząstek substancji aktywnej przez bariery imitujące naskórek ludzki. W celu przeprowadzenia tego typu badań należy stworzyć warunki, które w jak najlepszy sposób odzwierciedlać będą te panujące w organizmie ludzkim. Trzeba wziąć pod uwagę m.in. pH wydzielin skórnych, grubość naskórka oraz temperaturę płynów ustrojowych [14].

Uwalnianie substancji aktywnej z badanej formułacji zależy w dużej mierze od grubości i porowatości wykorzystanej membrany, która oddziela badany preparat od medium i chroni przed przedostawaniem się substancji wielocząsteczkowych do płynu akceptorowego. Dodatkowym zadaniem membrany jest utrzymanie formułacji kosmetycznej na miejscu w ciągu trwania całego procesu uwalniania. Błona

dializacyjna imitująca skórę powinna być cienka i wysoce porowata. Powinna być także bierna chemicznie względem badanej emulsji oraz płynu akceptorowego. Najpopularniejsze i najczęściej stosowane są błony utworzone z polimerów naturalnych (azotan celulozy, octan celulozy oraz regenerowana celuloza) oraz polimerów syntetycznych (polietylen, polichlorek winylu). W badaniach IVRT wykorzystuje się również preparowaną skórę zwierzęcą (świni, królika, szczura), jednakże syntetyczne membrany cechują się komercyjną dostępnością, jednorodnością oraz łatwością użycia [1].

Badania *in vitro* przenikania substancji kosmetycznych i farmaceutycznych przez bariery imitujące skórę cieszą się znaczącym zainteresowaniem oraz dynamicznym rozwojem. Należy jednak pamiętać, że nie są one prowadzone na żywym organizmie, lecz w warunkach laboratoryjnych. W związku z powyższym należy uzupełnić je o badania *in vivo* (*łac.* na żywym).

Metody badania

przenikania substancji aktywnych *in vivo*

Istnieje kilka metod umożliwiających ocenę zdolności penetracyjnych kosmetycznych składników aktywnych. Jedną z nich jest tzw. test zdzierania (*stripping test*) polegający na analizie ilości substancji aktywnej przenikającej z aplikowanej formułacji do warstwy rogowej naskórka z wykorzystaniem analizy spektrofotometrycznej. *Stripping test* polega na aplikowaniu preparatu (zawierającego dokładnie znaną ilość badanej substancji aktywnej) na skórę, a następnie usunięciu jego nadmiaru po określonym czasie. Następnie w miejsce aplikacji zostaje przyklejona taśma adhezyjna, której zerwanie powoduje usunięcie komórek górnych warstw naskórka wraz z określoną ilością substancji aktywnej. Stężenie badanej substancji w usuniętej warstwie *s.corneum* jest ustalane w oparciu o pomiar absorbancji roztworu sporządzonego poprzez rozpuszczenie materiału usuniętego z taśmy adhezyjnej w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku [1, 26].

Jak wiadomo, efektywność działania substancji aktywnych zależy w dużej mierze od stopnia ich migracji do głębszych warstw naskórka. Sposobem umożliwiającym ocenę ich działania, a więc i zdolności przenikania przez barierę naskórkową są badania parametrów skóry z wykorzystaniem sond. Badania te mają na celu ocenę skuteczności działania preparatów w oparciu o analizę zmian wartości takich parametrów skóry, jak: nawilżenie, elastyczność oraz przeznaskórkowa (transepidermalna) utrata wody TEWL. Badanie tychże parametrów przeprowadza się z wykorzystaniem aparatury wyposażonej w sondy do badań dermatologicznych [27-29].

W badaniach poziomu TEWL wykorzystuje się tewametr wyposażony w czujniki temperatury i wilgotności środowiska badań. Oba wymienione parametry są niezwykle ważne dla pomiaru TEWL, a ich wahania mogą wpływać

na jakość uzyskanych wyników. W związku z tym, ważne jest, aby prowadzić pomiary zawsze w takich samych warunkach otoczenia (wilgotność 40-60% oraz temperatura powietrza ok. 22°C). Ponadto w badaniu poziomu TEWL istotny jest czas stabilizacji, czyli czas przebywania probanta w pomieszczeniu, w którym prowadzone są badania, przed ich rozpoczęciem. Czas stabilizacji powinien wynosić co najmniej 30 minut. Wyniki analizy TEWL wyrażane są jako szybkość parowania wody w jednostce czasu z określonej powierzchni skóry [27-29].

W celu zbadania poziomu nawilżenia naskórka wykorzystuje się korneometr mierzący zawartość wody w warstwie rogowej naskórka w oparciu o zmiany przewodnictwa elektrycznego i pojemności elektrycznej na głębokości 10-20 µm naskórka. Im wyższe nawilżenie naskórka, tym lepsza jego przewodność elektryczna. Wyniki badania poziomu nawilżenia skóry podawane są w jednostkach korneometru (CU). Wykazano, że nawilżenie naskórka jest ujemnie skorelowane z parametrem TEWL [1, 27-29].

Kolejnym, niezwykle ważnym parametrem skóry jest elastyczność, do analizy której służy kutometr. Jego działanie polega na krótkotrwałej, miejscowej deformacji skóry za pomocą wytworzonego przez sondę podciśnienia. Elastyczność skóry jest oceniana w oparciu o szybkość z jaką zasysana przez sondę skóra wraca do stanu pierwotnego. Ponadto sonda umożliwia ocenę odporność na odkształcenia skóry (opór skóry względem wytworzonego podciśnienia i zasysania do wewnątrz sondy). Kutometr wyposażony jest w optyczny system pomiarowy złożony ze źródła oraz receptorów światła, a także dwóch pryzmatów ustawionych naprzeciwko siebie. Pryzmaty przekazują światło od transmitera do receptora, a intensywność światła zmienia się w zależności od stopnia zassania skóry przez urządzenie [1, 27-29].

W celu uzyskania możliwie wiarygodnych wyników odnośnie skuteczności działania danej substancji aktywnej, należy sporządzić preparat placebo (baza kosmetyczna) oraz produkt wzbogacony jedynie o dokładnie znaną ilość tejże substancji. Takie działanie umożliwia wyeliminowanie wpływu składników bazy kosmetyku na zmianę parametrów skóry podczas analizy otrzymanych wyników. Należy pamiętać, że warunki otoczenia (wilgotność i temperatura powietrza) powinny być takie same przy każdym pomiarze [1, 27-29].

SKÓRA JAKO DROGA TRANSPORTU SUBSTANCJI

Mówiąc o skórze jako drodze transportu substancji aktywnych, znaczna większość specjalistów skupia się na przenikaniu cząsteczek substancji ze środowiska zewnętrznego do skóry. Należy jednak podkreślić, że migracja niektórych substancji następuje także w odwrotną stronę – z wnętrza ustroju na powierzchnię skóry. Przykładem takiej substancji jest woda, a zjawisko jej transepidermalnej utraty jest fizjologiczne. Niestety, gdy zachodzi w zbyt dużym stopniu, skóra

traci nawilżenie. Nadmierna TEWL może być efektem uszkodzonej bariery lipidowej naskórka. W związku z powyższym należy pamiętać, że aby zwiększyć nawilżenie skóry, należy zacząć od wzmocnienia wspomnianej bariery. W tym celu wykorzystuje się preparaty bogate w lipidy podobne do tych występujących w cemencie komórkowym. Dodatkowo należy wzbogacić dietę o zdrowe tłuszcze, które mają pozytywny wpływ na funkcjonowanie całego organizmu, w tym również skóry. Jak w takim razie traktować substancje, którym przypisuje się działanie nawilżające w kosmetykach? Przykładem tego typu substancji jest kwas hialuronowy, jeden z ciekawszych, a zarazem dość kontrowersyjnych składników kosmetycznych. Jest on substancją niezwykle higroskopijną, bowiem jego cząsteczka może związać nawet ok. 250 cząsteczek wody. Niestety ze względu na dużą masę cząsteczkową oraz charakter hydrofilowy, związek ten bardzo słabo przenika przez barierę naskórkową. Jak już wspomniano, jego nawilżające działanie polega na tworzeniu na powierzchni skóry „opatrunku”, który wiąże wodę z otoczenia. Mało- lub ultramałocząsteczkowy kwas hialuronowy (czyli mniejsze fragmenty łańcucha tego biopolimeru, otrzymane na drodze hydrolizy enzymatycznej wielkocząsteczkowego kwasu) nieco łatwiej penetruje barierę naskórkową, ale ze względu na hydrofilowy charakter i wciąż duży rozmiar cząsteczki (3-10 kDa) nadal zachodzi to w niewielkim stopniu w porównaniu z cząsteczkami lipofilowymi o podobnym lub nieco większym rozmiarze [30].

PODSUMOWANIE

Przenikanie substancji aktywnych przez skórę to jeden z ważniejszych czynników decydujących o skuteczności ich działania. Jest to złożony i wieloetapowy proces, który zależy od wielu czynników, zarówno tych związanych z produktem kosmetycznym, jak i samą skórą, jej stanem i fizjologią. W celu wzmocnienia przenikania cząsteczek substancji przez barierę naskórkową stosuje się zabiegi modyfikujące właściwości zarówno samej cząsteczki i preparatu, jak i warstwy rogowej naskórka. Zdolności penetracyjne substancji aktywnych to kluczowy parametr, na który należy zwrócić uwagę już na etapie projektowania produktu kosmetycznego.

LITERATURA

1. Śliwowska A. *Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających jasonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę*. Rozprawa doktorska, Wydział Chemii UAM, Poznań 2017.
2. Dz. U. poz. 2227, art. 2, pkt 9 – Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych / Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczącego produktów kosmetycznych.
3. Amjadi M, Mostaghaci B, Sitti M. Recent advances in skin penetration enhancers for transdermal gene and drug delivery. *Current gene therapy*. 2017;17(2):139-146.
4. Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54:31-40.
5. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route—research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;71(2):173-180.

6. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical science & technology today*. 2000;3(9):318-326.
7. Lee H, Song C, Baik S, Kim D, Hyeon T, Kim DH. Device-assisted transdermal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2018;127:35-45.
8. Malinowska M, Sikora E, Ogonowski J. Transport przez naskórkowy aktywnych składników kosmetycznych. *Wiadomości chemiczne*. 2013;67(3-4):321-344.
9. Jaworska M, Sikora E, Ogonowski J. Czynniki wpływające na penetrację składników aktywnych przez skórę. *Wiadomości Chemiczne*. 2011;65(3-4):301-320.
10. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology*. 2000;9(3):165-169.
11. Chen Y, Shen Y, Guo X, Zhang C, Yang W, Ma M, Wen LP. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display. *Nature biotechnology*. 2006;24(4):455-460.
12. Jafvert CT, Kulkarni PP. Buckminsterfullerene's (C60) octanol – water partition coefficient (K_{ow}) and aqueous solubility. *Environmental science & technology*. 2008;42(16):5945-5950.
13. Li SK, Chantasant D. Skin Permeation Enhancement in Aqueous Solution: Correlation with Equilibrium Enhancer Concentration and Octanol/water Partition Coefficient. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2019;108(1):350-357.
14. Tas C, Özkan Y, Savaser A, Baykara T. In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Il Farmaco*. 2003;58(8):605-611.
15. Maru SM, Gathu LW, Mathenge AW, Okaru AO, Kamau FN, Chepkwony HK. In Vitro Drug Release Studies to Compare the Release of Metronidazole Topical Formulations Through Cellulose Membrane. *East And Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;15(3):57-62.
16. El Gendy AM, Jun HW, Kassem AA. In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations. *Drug development and industrial pharmacy*. 2002;28(7):823-831.
17. Olejnik A, Sliwowska A, Nowak I. Jasmonic acid, methyl jasmonate and methyl dihydrojasmonate as active compounds of topical formulations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018;558:558-569.
18. Leite-Silva VR, Sanchez WY, Studier H, Liu DC, Mohammed YH, Holmes AM, Grice JE. Human skin penetration and local effects of topical nano zinc oxide after occlusion and barrier impairment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016;104:140-147.
19. Zhai H, Maibach HI. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Research and technology*. 2002;8(1):1-6.
20. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert opinion on drug delivery*. 2020;17(2):145-155.
21. Horikoshi T, Matsumoto M, Usuki A, Igarashi S, Hikima R, Uchiwa H, Funasaka Y. Effects of glycolic acid on desquamation-regulating proteinases in human stratum corneum. *Experimental dermatology*. 2005;14(1):34-40.
22. Vedamurthy M. Mesotherapy. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2007;73(1):127.
23. Park J, Lee H, Lim GS, Kim N, Kim D, Kim YC. Enhanced transdermal drug delivery by sonophoresis and simultaneous application of sonophoresis and iontophoresis. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(3):96.
24. Petchsangsa M, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. The combination of microneedles with electroporation and sonophoresis to enhance hydrophilic macromolecule skin penetration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37(8):1373-1382.
25. Pavlačková J, Egner P, Polašková J, Hojerová J, Pindáková L, Mokrejš P, Varaďová V. Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019;18(5):1410-1415.
26. Bashir SJ, Chew AL, Anigbogu A, Dreher F, Maibach HI. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Research and Technology*. 2001;7(1):40-48.
27. Malinauskienė L, Gecaite I, Linauskienė K, Černiauskas K, Dubuske L, Blažienė A. To Test or Not to Test: Patch Testing with the Patient's Own Cosmetics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;145(2):AB69.
28. Khazaka G, Courage W. Device and method for measuring a three-dimensional surface structure US5684573 A. <https://patents.google.com/patent/US5684573A/en>. Dostęp 20.07.2020.
29. Instrukcja Obsługi Aparatu MPA Courage + Khazaka electronic GmbH. <http://www.courage-khazaka.de>. Dostęp 20.07.2020.
30. Zhou M, Gan Y, Yang M, He C, Jia Y. Lipidomics analysis of facial skin surface lipids between forehead and cheek: Association between lipidome, TEWL, and pH. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020; (praca przyjęta do druku).

CITE / SPOSÓB CYTOWANIA

Śliwowska A. Penetracja substancji aktywnych przez skórę. Czynniki determinujące to zjawisko i metody jego modyfikacji. *Aesth Cosmetol Med*. 2020;9(4):399-405.