Využití alternativních metod při zkoušení kosmetických přípravků

RNDr. Kristina Kejlová
NRC pro kosmetiku
Státní zdravotní ústav Praha

Legislativa KP
Kosmetická směrnice 76/768/EEC

- **http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics**
- **7. dodatek Kosmetické směrnice (2003/15/ES)**
  - zákaz testů finálních výrobků na zvířatech od 11.9.2004
  - zákaz uvádět na trh výrobky, jejichž ingredience byly zkoušeny poté, co existuje validovaná alternativní metoda
  - konečné termíny pro ukončení zkoušek ingrediencí na zvířatech : 11.3.2009 většina zkoušek, 2013 toxicita po opakované dávce, toxicita pro reprodukci a toxikokinetika
- **Zákon 246/1992 Sb. o ochraně zvířat proti týrání**
  - novela (z. 77/2004) zapracovala nad rámec 7. dodatku zákaz zkoušek KP i ingrediencí, v ČR žádné testy KP na zvířatech

Cíle EU v oblasti KP

- **ochrana zdraví spotřebitele**
- **bezpečnost výrobků a jejich ingrediencí**
  - i látky a ingredience, které přinášejí benefit pro člověka, je nutno zkoušet a ověřovat jejich bezpečnost (např. UV filtry)
- **zkoušky lokální tolerance finálních výrobků**
  - kožní dráždivost
  - oční dráždivost
  - fototoxicita
  - senzibilizace

Sekvenční metoda hodnocení bezpečnosti KP

- vyhodnocení toxikologického profilu ingrediencí
- vyloučení korozivních vlastností, toxicity ingrediencí
- bezpečnost zapracované koncentrace

Sekvenční metoda stanovení bezpečnosti KP

- **míra expozice osob při aplikaci**
  - místo (kolem očí, intimní oblast), frekvence, koncentrace, množství, plocha
- **cílová skupina osob**
  - kůže atopická, reaktivní-citlivá, normální, suchá, mastná, aknózní, opálená-spálená
  - děti do 3 let, děti nad 3 roky, dospívající, dospělí, starší osoby
- **profesionální použití, běžné použití, předvídatelné chyby použití**

Sekvenční metoda stanovení bezpečnosti KP

- **vyhodnocení výsledků alternativních metod**
- **vyhodnocení humánních dat**
  - testy jednorázové a opakované aplikace u cílových skupin osob před uvedením na trh
  - testy dlouhodobého užívání – „in use" testy
  - klinické a instrumentální stanovení funkce
  - dotazníková šetření – vyhodnocení užívání přípravku po uvedení na trh („post-marketing" data)
  - monitoring nežádoucích účinků

Biologické metody in vitro

- **Test cytotoxicity**

  buněčná linie fibroblastů 3T3 - Neutral Red Uptake Test (NRU)
- **Test kožní iritace**

  3D modely lidské kůže
- **Test oční iritace**

  HET-CAM - chorioalantoidní membrána - kuřecí embryo, NRU, 3T3 Neutral Red Release (NRR)
- **Test fototoxicity**

  3T3 NRU test/ 3D modely lidské kůže
- **Penetrace/absorpce**

  prasečí kůže ex vivo

Alternativní metody v legislativě
Nař. 440/2008/ES / OECD / ECVAM / ICCVAM

- **Akutní toxicita:** B.1 metoda fixní dávky, stanovení třídy akutní toxicity (OECD 420,423). Test cytotoxicity 3T3/NHK (ICCVAM Draft)
- **Kožní leptavost:** B.40 EpiSkin/ EpiDerm, TERtest (OECD 430, 431)
- **Kožní dráždivost:** EPISKIN, EpiDerm, SkinEthic (ESAC St. 2007/8)
- **Fototoxicita:** B.41 3T3 NRU test (OECD 432)
- **Oční dráždivost - screening:** Organotypické modely BCOP (bovinní), ICE (kuřecí) oko (ICCVAm +ESAC St.2007)
- HET-CAM, cytotoxicita: 3T3, NHK.. (REACH, příloha x) pro pozitivní klasifikaci lze použít i prevalidované metody
- **Kožní absorpce a penetrace in vitro:** B.45 (OECD 428)
- **Genotoxicita / Mutagenita**

  Genové mutace:

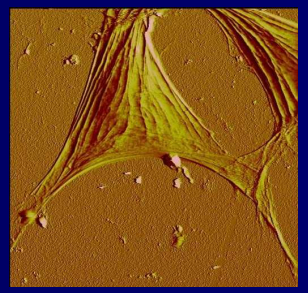
  B.13/14 Zkouška na reversní mutace u bakterií (OECD 471)
  B.10 Zk.na chromozomové aberace u savců *in vitro* (OECD 473)
  Klastogenicita + aneugenicita: In vitro mikronukleus test (OECD 487 - draft, ESAC Statement 2006)

Cytotoxicita 3T3 Balb/c

- Snížení životnosti narostlé buněčné kultury po 24 hod aplikaci testovanému vzorku
- EC_{50} – cytotoxická koncentrace látky snižující životnost buněčné kultury na 50% (ingredience)
- Nejvyšší necytotoxická koncentrace (finální KP)

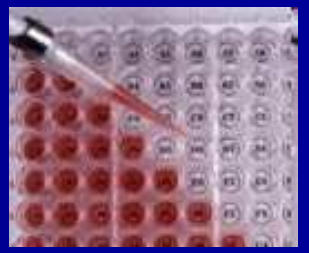
Test cytotoxicity KP

Myší fibroblasty Balb/c 3T3

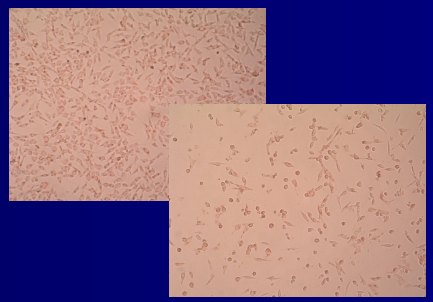


Pasážování buněk

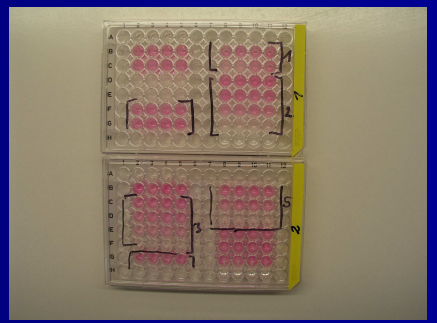
Monolayer 96-j. destičky



Aplikace ředěných vzorků 24 h



Barvení neutrální červení



Měření fluorimetr

Nejvyšší necytotoxické koncentrace kosmetických prostředků (μg/ml)

Obvyklé rozmezí hodnot:

šampon	1 – 100
zubní pasta	100 – 2000
EDT, EDP, voda po holení	100 – 1000
sprchový gel	10 – 50
kondicioner	50 – 250
pěna na holení	100 – 250
tělové mléko	100 – 500
ústní voda	500 – 2000
tonik	500 – 2000
vlasová voda	1000 – 2000

Cytotoxicita - šampony

Kategorie	*Nejvyšší necytotox. konc. (mg/ml)*
Proti lupům **- ammonium lauryl sulfate 10-20%** **- sodium lauryl sulfate 10-35%** **- zinc pyrithione 2%** **- salicylic acid 2%** **- piroctone olamine 1%**	1-10
Běžný šampon, proti lupům s ketoconazolem **- sodium lauryl sulfate 5-20%** **- ketoconazole 0.5%**	10-50
Jemný šampon, pro časté použití - **panthenol, rostlinné extrakty**	50-100

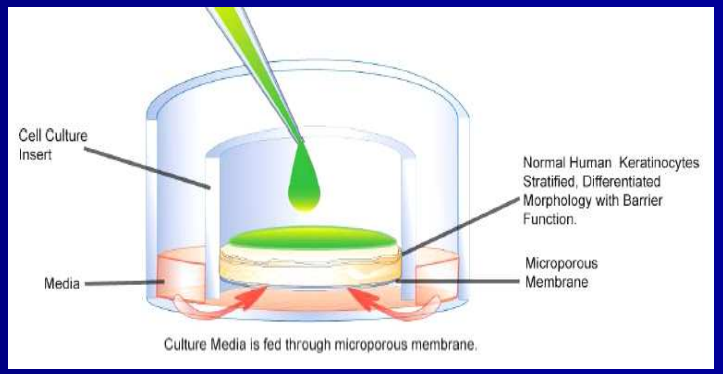
Cytotoxicita – zubní pasty

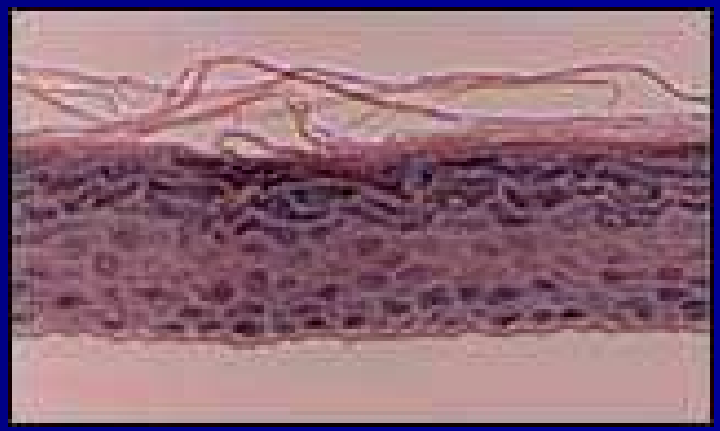
Kategorie	*Nejvyšší necytotoxická koncentrace (µg/ml)*
Bělicí, antibakteriální pasta - hydrated silica 20% - éterické oleje - triclosan - sorbitol 30-40% - glycerin 10-40%	100
Běžná pasta	250-500
Jemná pasta -anorganické soli uhličitan vápenatý hydrogenfosforečnan vápenatý	1000-2500

Kožní dráždivost
3D modely lidské kůže

- normální lidské epidermální keratinocyty od 1 dárce, metabolicky aktivní
- 8-12 vrstev epidermis
- 10-15 vrstev stratum corneum

- **zkoušky:**
  - **leptavost**
  - **dráždivost**
  - **fototoxicita**





Komerčně dostupné 3D modely kůže

Reconstructed human epidermal models - RHE modely

EPISKIN model, 1991
L´Oreal, Francie

SkinEthic RHE,1994
SkinEthic, Francie

- cenově příznivé
- respektuje etické otázky
- vhodné pro screeningové testování

EpiDerm, 1993
MatTek Corporation, USA

Reconstructed human full thickness models

EpiDerm FT model
MatTek Corporation
(2002)

AST2000 FT model
Cell Systems, D
(2003)

Phenion FT model
Henkel, D
(2006)

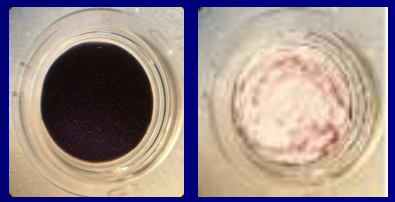
EpiDerm™ - dráždivé účinky na kůži

60 MINUT
EXPOZICE

42 HODIN
POST- INKUBACE

MTT TEST

EpiDerm (0.63 cm^2)
25 mg/ 30 µl aplikace



Endpoint - MTT assay:

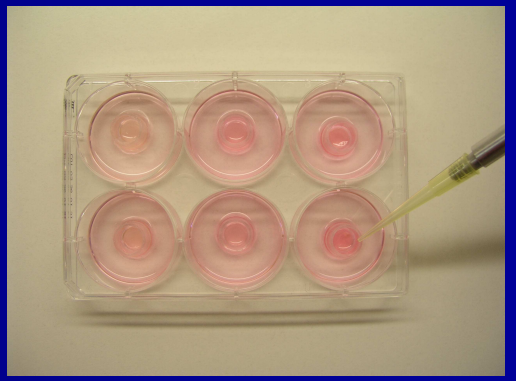
1 mg/ml MTT, redukce žlutého barviva na modrý formazan

Životnost > 50% negativní kontroly: nedráždí
Životnost ≤ 50% negativní kontroly: dráždí

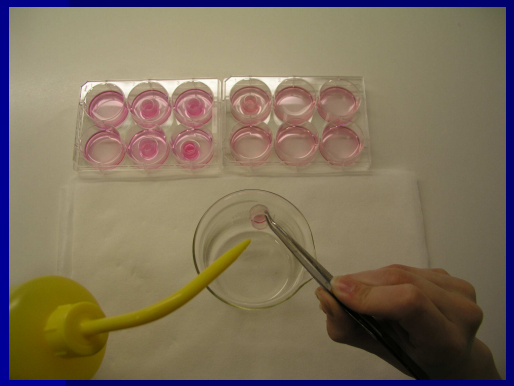
EpiDerm™ – kožní dráždivost

1. příjem tkání

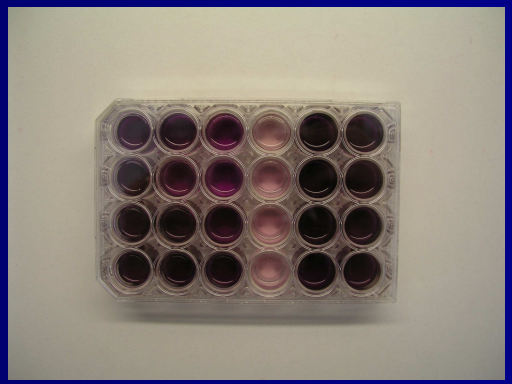
2. aplikace vzorků



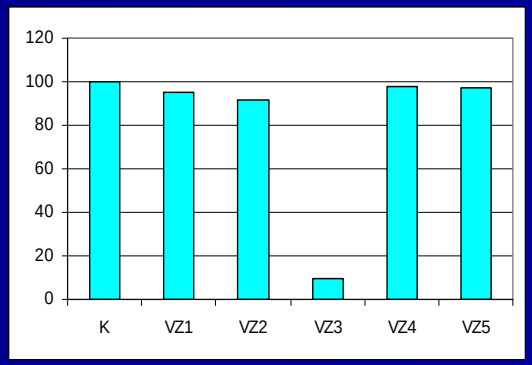
3. oplach a inkubace



4. barvení MTT

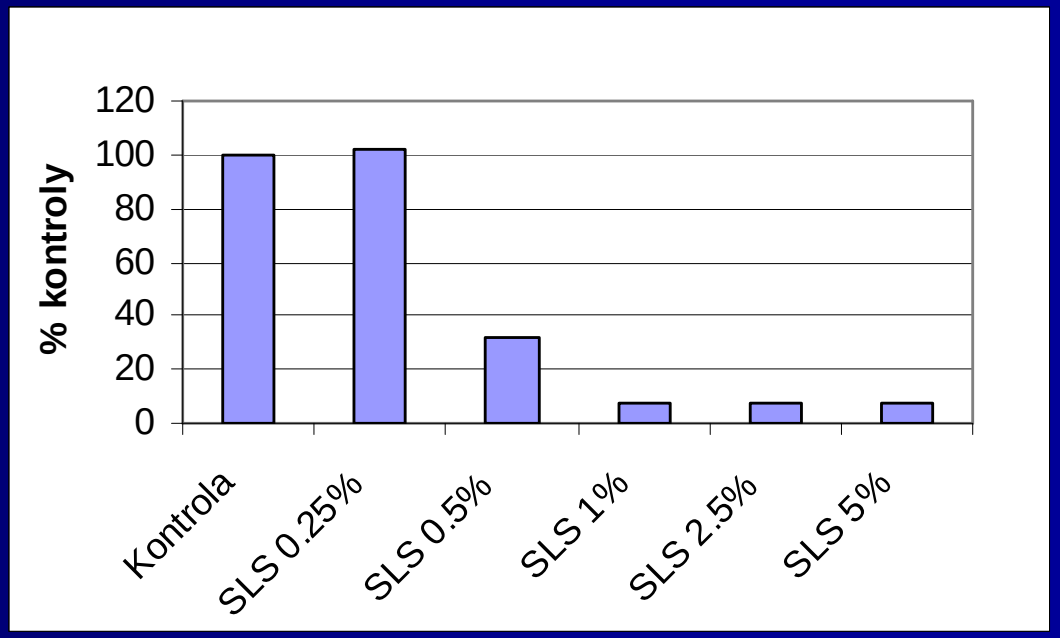


5. výpočet životnosti



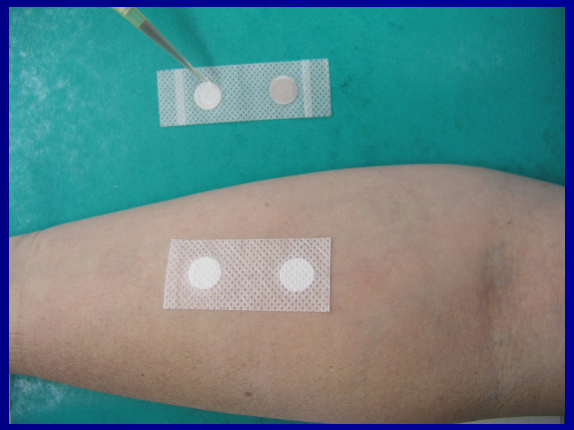
EpiDerm™ – kožní dráždivost SLS

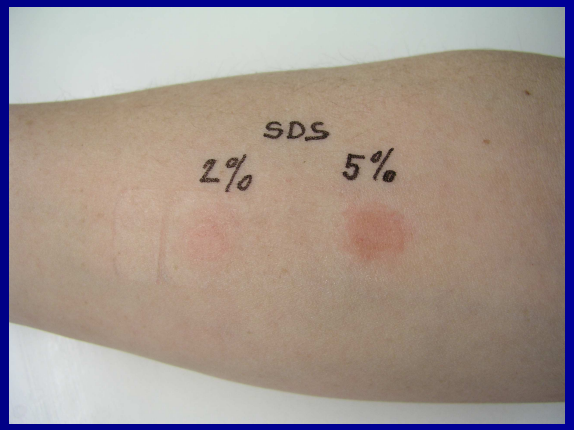
- laurylsíran sodný (SLS)
- životnost vůči kontrole (voda)



Kožní dráždivost – epikutánní test jednorázový uzavřený

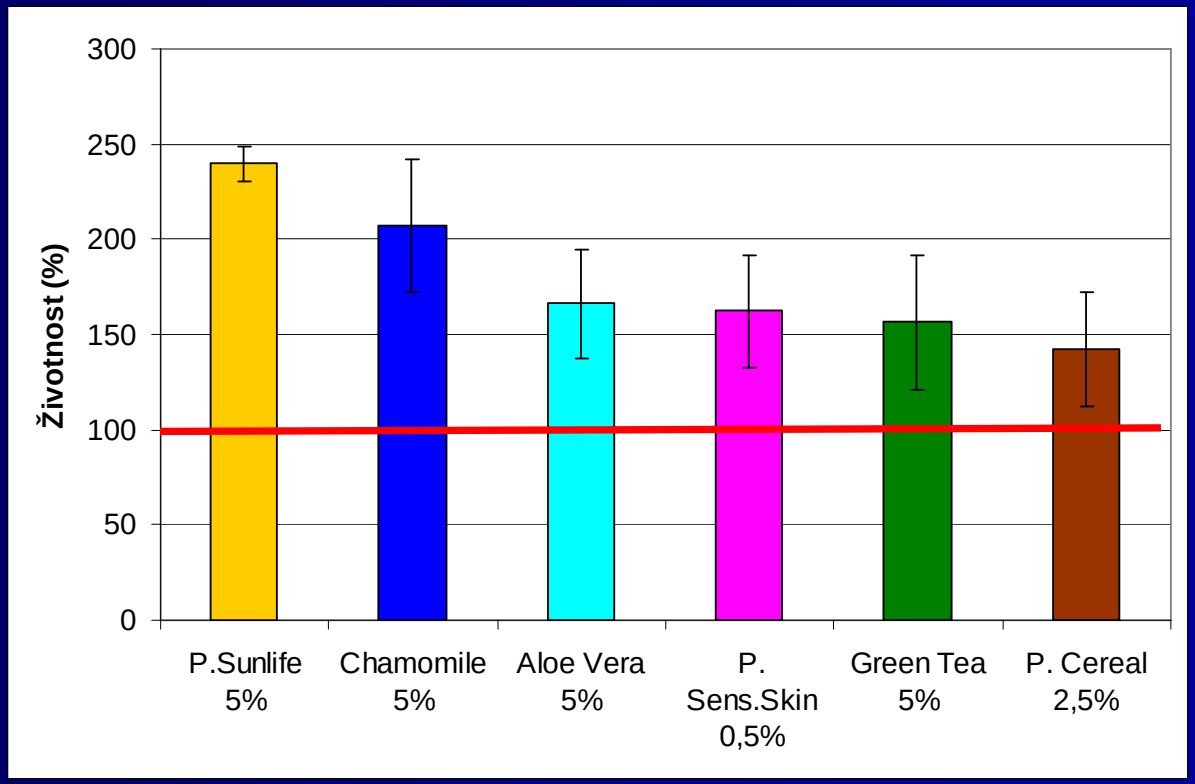
- aplikace SLS 2% a 5% v semiokluzi po dobu 4 hod.
- odečet reakce 30 min., 24 hod a 48 hod po odstranění testované látky
- senzitivní jedinci reakce i na 0,5% SLS





EpiDerm™ - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- Aloe Vera, Chamomile, Pronalen Sunlife, Pronalen Sensitive Skin, Green Tea, Pronalen Cereal
- 3D model EpiDerm, SLS 0,75%

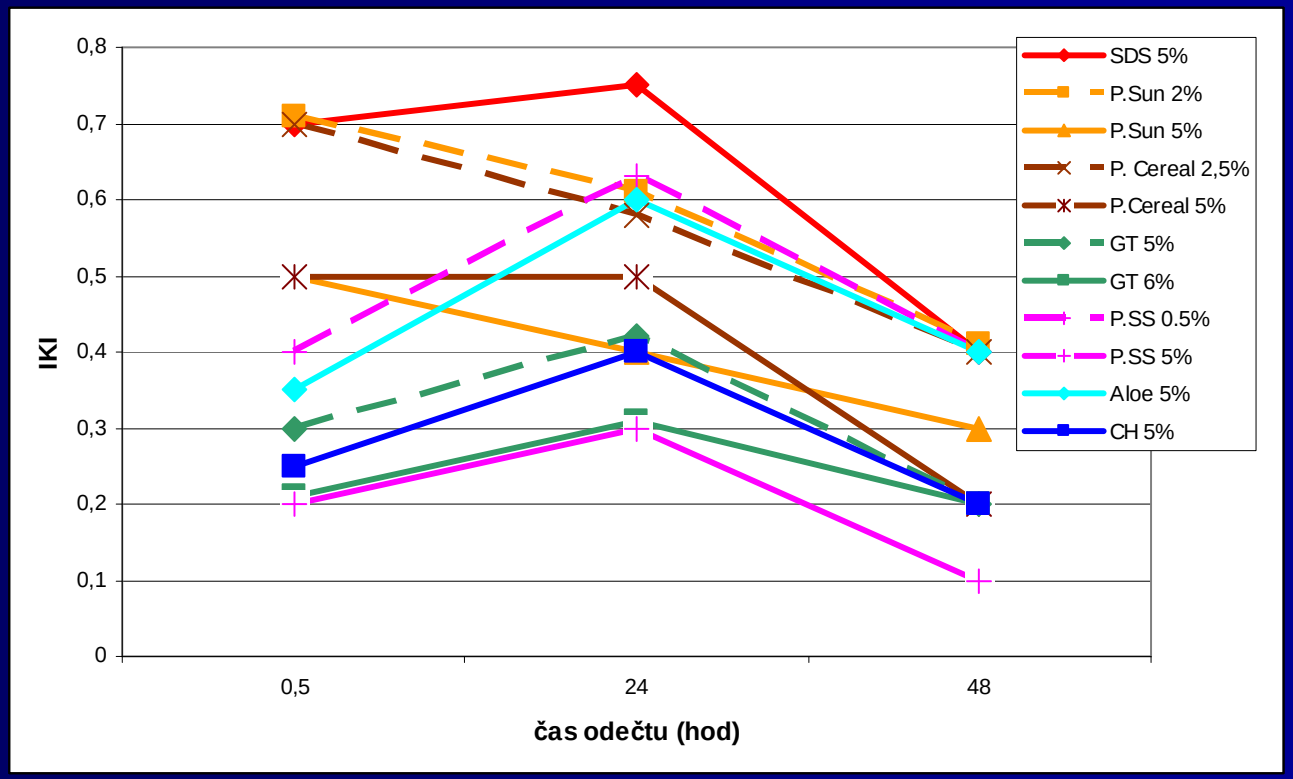


Klinická studie - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- potvrzení výsledků in vitro v klinické studii
- jednorázový uzavřený epikutánní test
- skupina 20 dobrovolníků
- aplikace samotného SLS a SLS v kombinaci s ingrediencemi v koncentracích doporučených výrobcem na 4 hodiny
- odečet reakcí (erytém, edém) po 0.5, 24 a 48 hod
- výpočet IKI – Index kožní iritace, průměrné skóre reakcí pro celou skupinu dobrovolníků

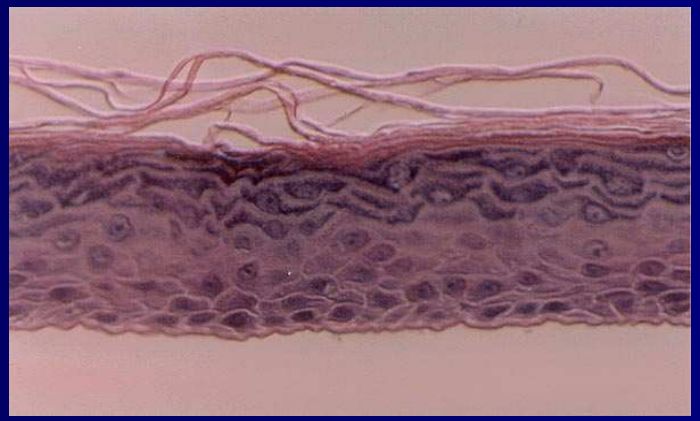
Klinická studie - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- nejvýraznější snížení indexu kožní iritace (IKI) u Pronalenu Sensitive Skin, Green Tea a Chamomile



3D modely tkání MatTek, USA
k průkazu lokální tolerance / funkce

EpiDerm



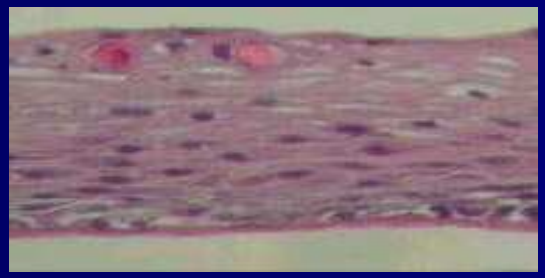
kožní dráždivost
fototoxicita
perkutánní absorpce
mikronukleus test

EpiOcular

oční dráždivost

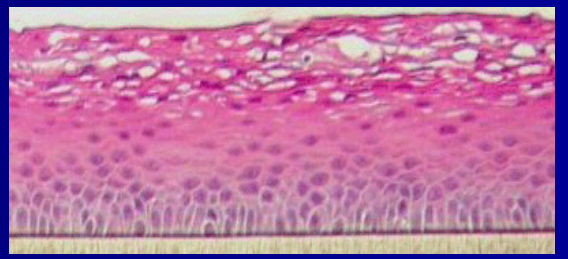
Další 3D modely tkání MatTek, USA

EpiOral



iritace pro sliznice

EpiVaginal



prostředky pro intimní hygienu

MelanoDerm

bělení / tmavnutí kůže

Dráždivé/leptavé účinky na oči

- 3D modely oční rohovky
  - EpiOcular™, MatTek

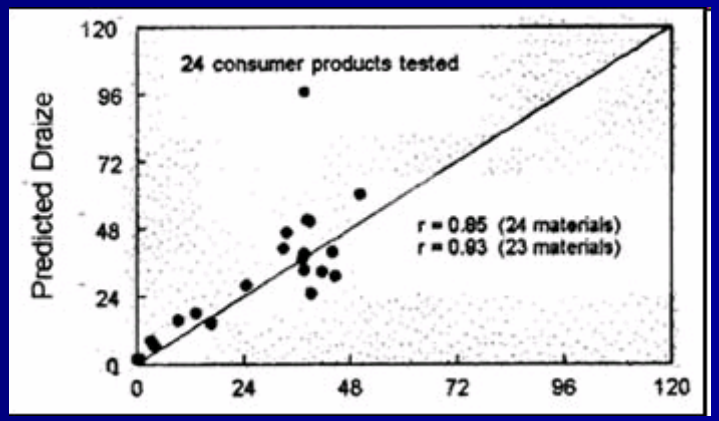
- HET-CAM
  - test na chorioalantoidní membráně fertilizovaného slepičího vejce
- buněčné kultury
  - buňky 3T3 – Neutral Red Uptake (NRU) a Neutral Red Release (NRR)

Oční iritace – 3D modely

- model EpiOcular
- lidské keratinocyty – skvamozní epitelium modelující rohovku
- korelace predikce s výsledky Draizova testu

EpiOcular

Králičí rohovka

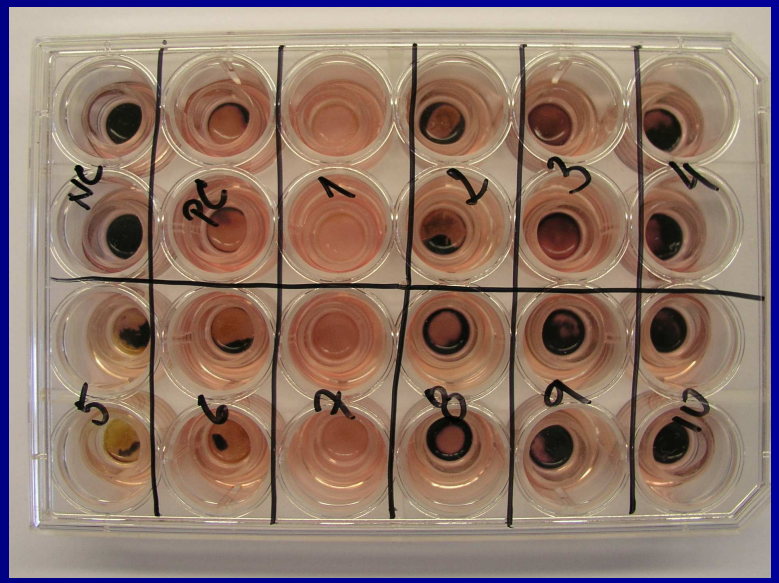


Oční iritace – EpiOcular™

- aplikace tekutých i tuhých látek, nerozpustných ve vodě

– **chemické látky**
(aplikace 30 min, cut-off 60% životnost oproti kontrole)

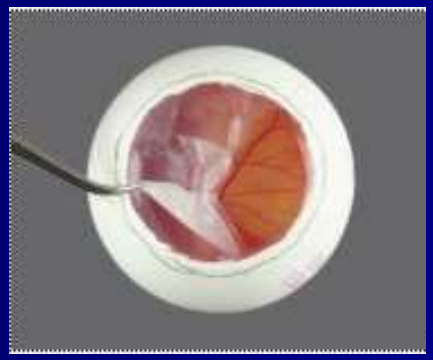
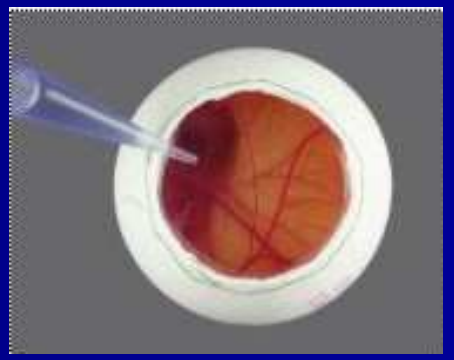
– **formulace**
(ředění 20%, aplikace 3 časy – výpočet ET_{50})



klasifikace dle ET_{50}:
nedráždí >256-26.5 min
mírně dráždí <26.5-11.7 min
středně dráždí<11.7-3.45 min
silně dráždí <3.45 min

Oční iritace - HET – CAM
(Hen´s Egg Test - Chorioallantoic Membrane)

- fertilizovaná vejce (8-10 dní), aplikace látek na membránu
- sledování změn (5 min.): hemoragie, lýza, koagulace

Oční iritace - HET-CAM
Výpočet iritačního skóre a potenciálu

- **sledování prvního výskytu:** hemoragie (H), lýzy (L) a koagulace (C) po dobu 300 s (tj. 5 min)

- **výpočet iritačního skóre:**

$$IS = \frac{(301 - H) \times 5}{300} + \frac{(301 - L) \times 7}{300} + \frac{(301 - C) \times 9}{300}$$

- **výpočet iritačního potenciálu:** průměr IS

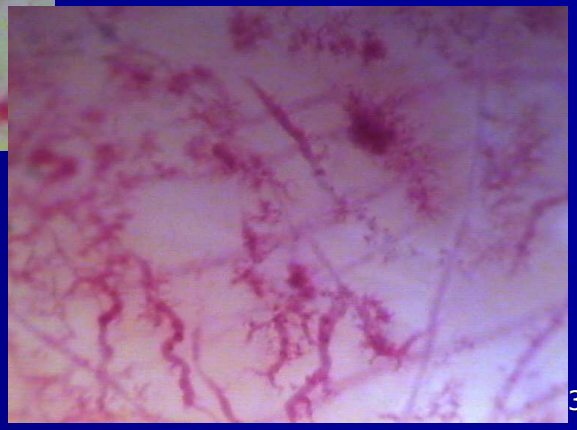
0 – 0,9	žádná iritace
1 – 4,9	lehká iritace
5 – 8,9	mírná iritace
9 – 21	silná iritace

Oční iritace - HET- CAM
Změny po aplikaci šamponu pro děti

neporušená membrána

hemoragie, lýza
30 s

90 s

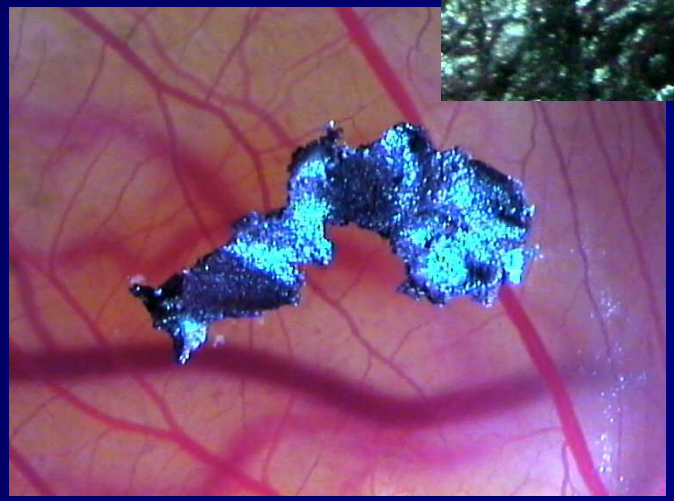


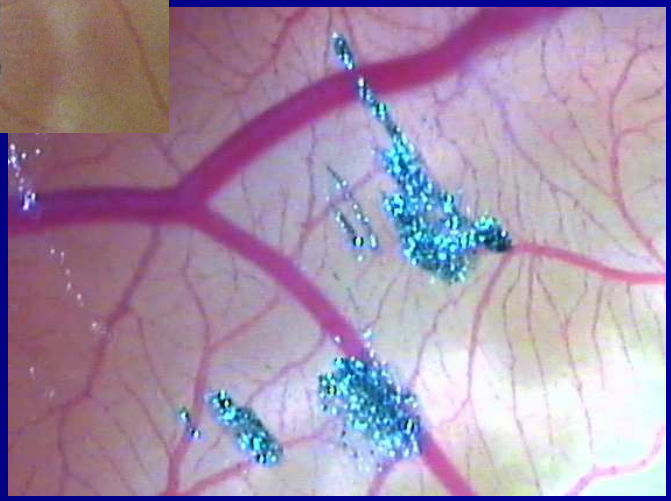
iritační potenciál 8,3

mírná iritace

Oční iritace HET-CAM

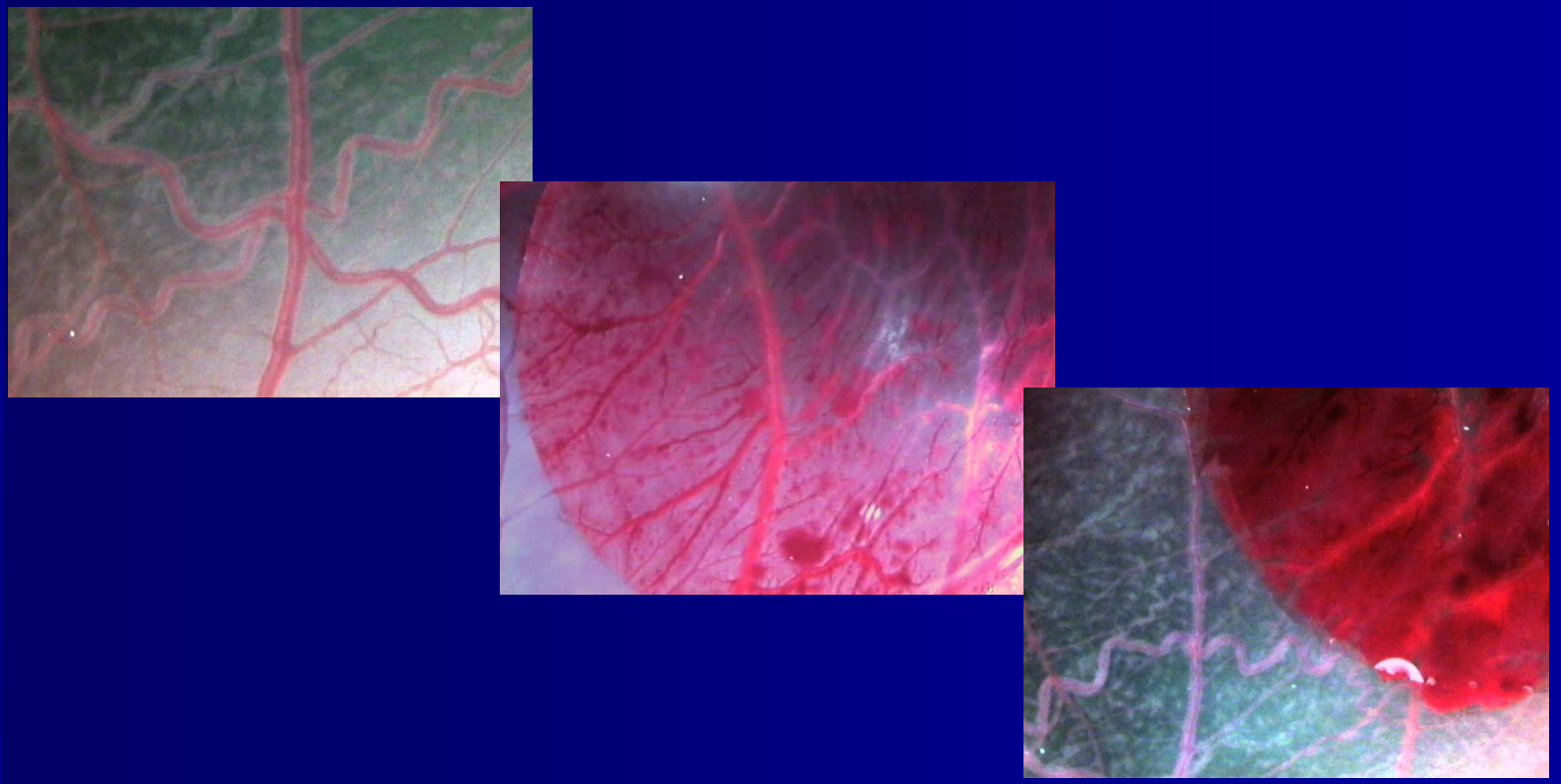
- oční stíny, řasenky – žádná iritace





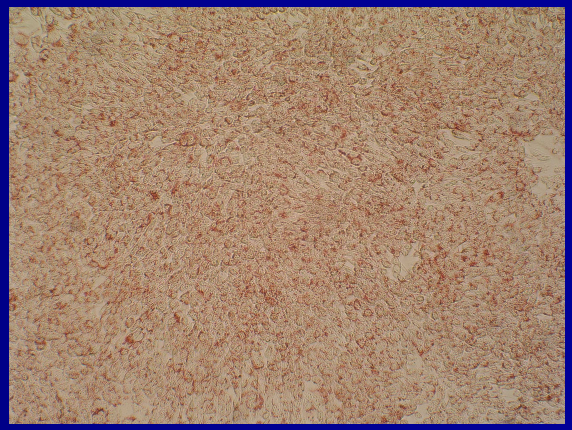
Oční iritace HET-CAM

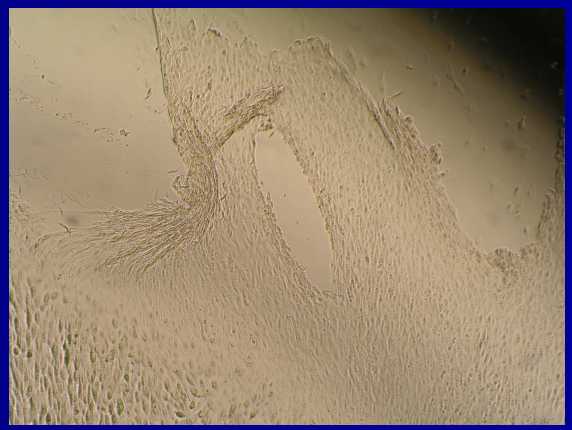
- rozpouštědlo lepidla na umělé řasy
  iritační potenciál 17,2 - silná iritace



Oční iritace - Neutral Red Release

- surfaktanty, chemické látky rozpustné ve vodě
- monolayer buněk obarven neutrální červení (NR)
- aplikace látky 1 min
- uvolnění NR po destrukci membrán
- výpočet NRR_{50}





Oční iritace – tenzidové přípravky

- kombinace testu cytototoxicity NRR a NRU, EpiOcular, HET-CAM

	NRR	EpiOcular	NRU	HET-CAM
	NRR50 (mg/ml)	ET50 (min.)	EC50 (µg/ml)	Iritační skóre
Dětský šampon	332.4 ± 105.8	44.9	382.8 ± 33.9	4.8 ± 2.5
Šampon proti lupům s pyrithionem zinečnatým	60.1 ± 6.1	16.1	9.8 ± 3.7	8.8 ± 3.1
Sprchový gel s pantenolem	83.1 ± 26.1	32.4	56.4 ± 9.6	16.5 ± 1.6
Šampon pro běžné použití	172.0 ± 44.4	38.3	15.3 ± 1.6	10.9 ± 2.0
Ekologické tekuté mýdlo	544.4 ± 174.5	84.4	193.6 ± 78.0	7.6 ± 1.9
Šampon proti lupům s piroctonem olaminu	85.4 ± 30.4	41.8	59.6 ± 4.0	10.0 ± 2.0
Sprchový šampon pro běžné použití	51.7 ± 18.0	33.5	51.2 ± 3.7	7.8 ± 0.6
Dětské tekuté mýdlo	343.1 ± 63.3	41.9	61.2 ± 3.7	15.4 ± 1.5
Sprchový gel s minerálními solemi	131.9 ± 52.8	38.5	99.3 ± 18.9	8.8 ± 0.7

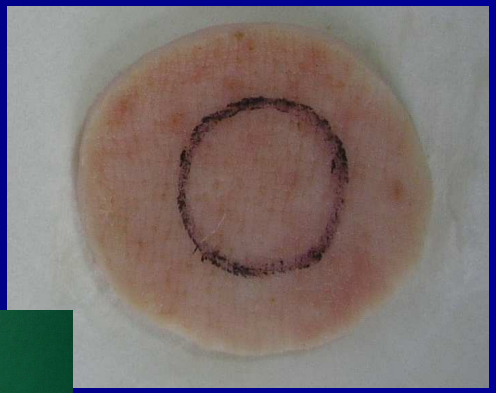
Kožní absorpce a penetrace

- důležitá informace pro hodnocení bezpečnosti ingrediencí
- výpočet Margins of Safety (hranice bezpečnosti)
- doporučeno zkoušení ingredience zapracované ve finálním výrobku
- in vitro: využití prasečí kůže ex vivo

Kožní absorpce a penetrace in vitro

terče ze hřbetní části kůže prasete

značení aplikačního pole

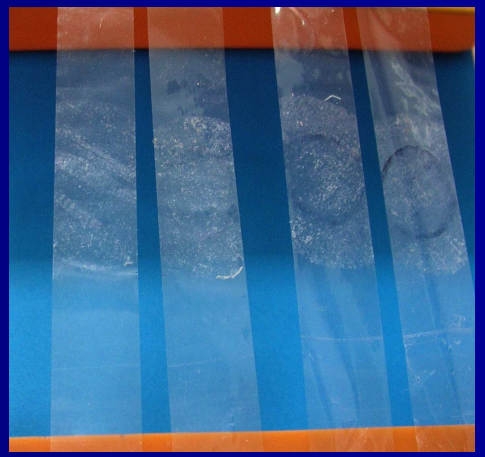


difuzní komůrka, 34°C
aplikace 24 hodin

Kožní absorpce a penetrace in vitro

stripování vrstev (16 stripů lepenkou)

zpracování stripů



tepelné oddělení epidermis od dermis

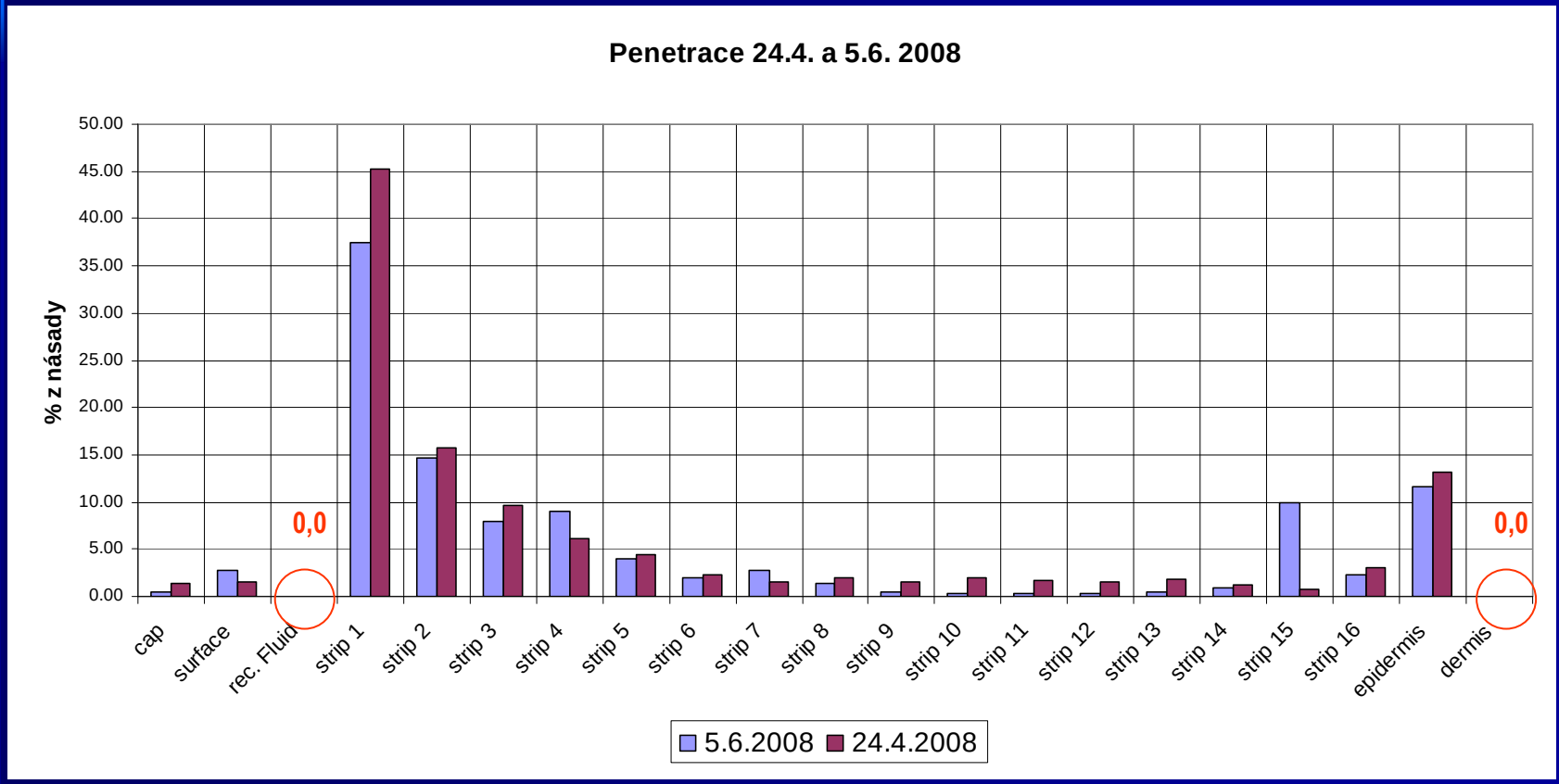
Kožní absorpce a penetrace in vitro

zpracování dermis

HPLC analýza

po extrakci 13 frakcí v isopropanolu 24 hod.

UV filtr - kožní absorpce a penetrace in vitro



Fototoxicita
Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro

- fotoaktivní látka + světlo = toxicita
  projevy – erytém, edém, pigmentace

- 8 konc. látky na dvou destičkách, jedna ozářená 5J UVA, druhá ve tmě
- výpočet: fotoiritační faktor PIF
- porovnání cytotoxických koncentrací látky snižujících životnost buněčné kultury na 50% v přítomnosti a nepřítomnosti záření

$$PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

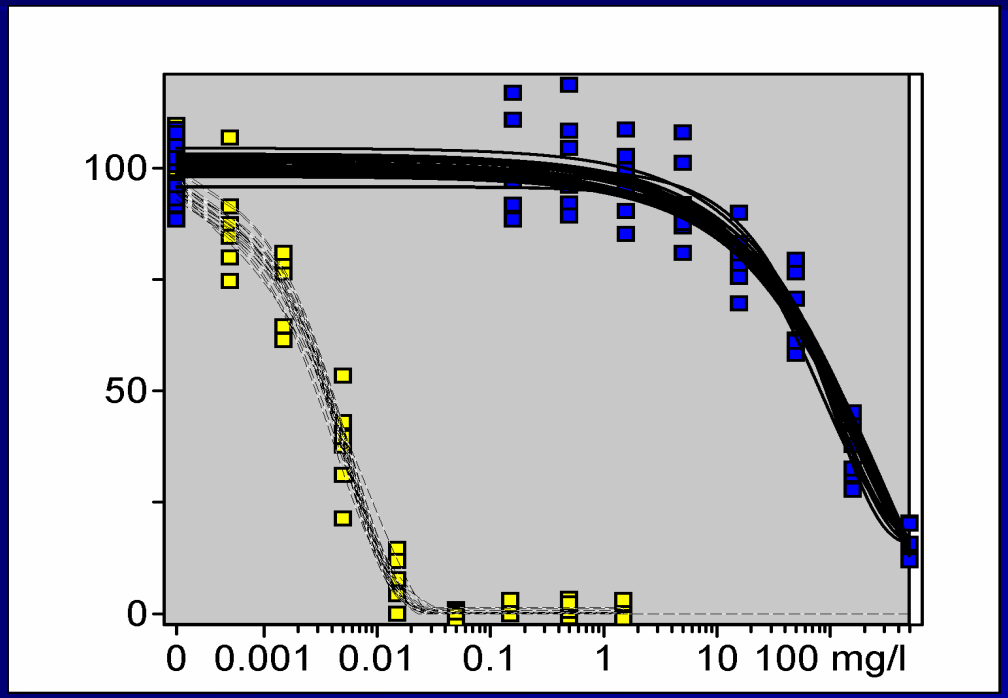
Látka je fototoxická : PIF ≥ 5
Pravděpodobně fototoxická : PIF ≥ 2

Hodnocení fototoxicity
COLIPA/BGVV software

Ftalocyanin FC 1009-1

ED 50 (mg/ l) :

+light	- light
0.003517	106.8



	CutOff	Mean	Phototoxic Probability
MPE	0.100	0.755	1.000
PIF	2.000	30572.07	1.000

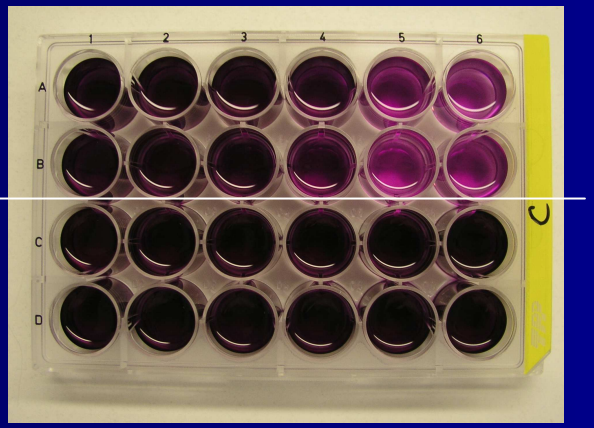
EpiDerm™ – zkouška fototoxicity

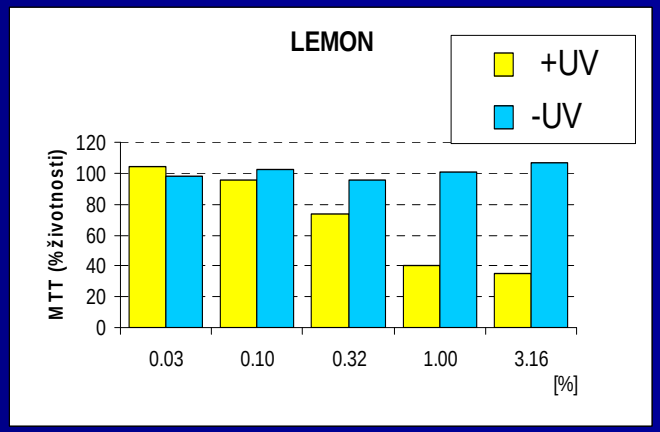
- 5 koncentrací látky na 4 tkáních, dvě ozářené 6J UVA, dvě ve tmě
- Látka je fototoxická,

  pokud aspoň v jedné koncentraci po ozáření je životnost tkání snížena nejméně o **30%** oproti životnosti tkáně exponované stejné koncentraci, ale bez ozáření.

UV +

UV -





Fototoxicita bergamotových olejů
Obsah fotoaktivních látek

Fotoaktivní složka	Bergamot A	Bergamot B	Bergamot C	Bergamot D
Bergapten	-	-	0,13	0,18
Bergaptol	-	-	0,3	stopy
Bergamoten	-	-	0,86	0,83
Isopimpinelin	-	-	stopy	-
Neral	-	-	0,48	0,43
Geranial	-	-	0,04	-

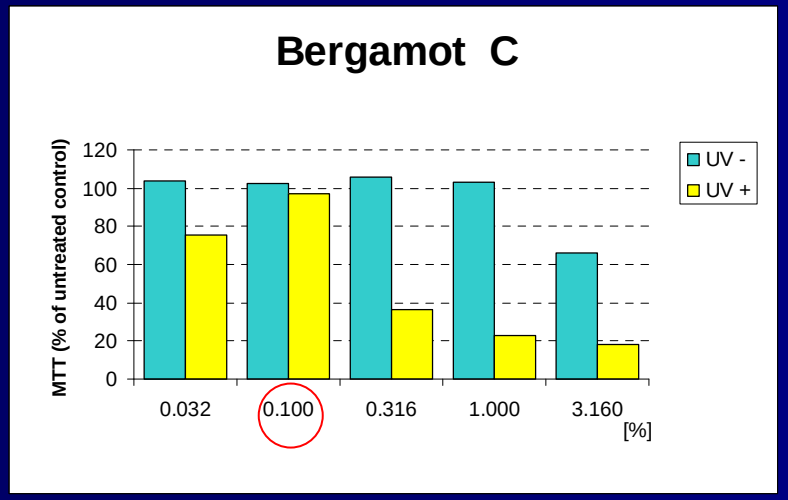
Fototoxicita bergamotových olejů
3T3 NRU zkouška fototoxicity

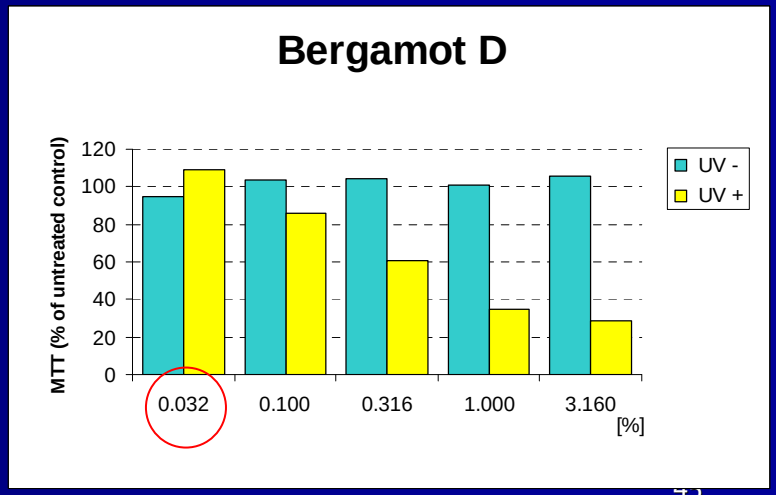
	PIF	klasifikace
Bergamot A	1.07	NF
	0.91	NF
Bergamot B	1.31	NF
	1.11	NF
Bergamot C	1.65	NF
	2.38	PF
Bergamot D	2.6	PF
	3.4	PF

NF – nefototoxický, PF – pravděpodobně fototoxický

Fototoxicita bergamotových olejů
3D modely kůže

- bergamoty A a B (furokumarin-free) nefototoxické
- bergamoty C a D fototoxické
- nejvyšší nefototoxická koncentrace 0,1 % (C) a 0,03% (D)





Fototoxicita bergamotových olejů
Photopatch test u dobrovolníků

- ověření nefototoxické koncentrace
- aplikace 1h v okluzi, ozáření 6J (UVA)
- bergamoty A a B (1%) – reakce 0/5
- bergamot C (0,1%) reakce 5/5
- bergamot D (0,03%) reakce 5/5
- z kožních modelů nelze přímo odhadnout bezpečnou koncentraci
- nutný bezpečnostní faktor 10

Fototoxicita éterických olejů
Fotoaktivní látky /fototoxicita

	Neral	Geranial	Citrapten	Oxypeuc.	3T3 NRU PT	3D model	max. nefotox. konc.
Pomeranč A	0.10	0.27	n.d.	n.d.	PF	F	1%
Pomeranč B	0.12	0.29	n.d.	n.d.	PF	F	0,1%
Pomeranč bez terpenu C	0.45	0.88	n.d.	n.d.	F	F	0,1%
Citron A	1.80	4.06	<0.01	n.d.	PF	F	1%
Citron B	1.95	3.24	0.05	<0.01	F	F	0,1%
Citron bez terpenu C	14.5	21.74	0.11	0.06	F	F	0,1%

Fototoxicita éterických olejů
Photopatch test u dobrovolníků

Éterický olej (ve vodě)	počet pozitivních fototoxických reakcí v různých intervalech		
	24 h	*48 h*	*72 h*
Pomeranč A (1%)	3/5	2/5	2/5
Pomeranč A (0.1%)	0/5	0/5	0/5
Pomeranč B (0.1%)	0/5	0/5	0/5
Pomeranč B (0.01%)	0/5	0/5	0/5
Pomeranč bez terpenu C (0.1%)	0/5	0/5	0/5
Pomeranč bez terpenu C (0.01%)	0/5	0/5	0/5
Citron A (1%)	4/5 dráždí 3/5	4/5 dráždí 2/5	4/5 dráždí 2/5
Citron A (0.1%)	0/5	0/5	0/5
Citron B (0.1%)	0/5	0/5	0/5
Citron B (0.01%)	0/5	0/5	0/5
Citron bez terpenu C (0.1%)	0/5	2/5	2/5
Citron bez terpenu C (0.01%)	0/5	0/5	0/5

Fototoxicita - glycerinová mýdla

varování „může vyvolat fotosenzibilitu“

3T3 NRU zkouška fototoxicity

Název	*obsah silic*	*PIF*	*Fototox.*
Litsea	Litsea cubeba 0,18%	1,275	NE
Grapefruit	Citrus paradis 0,31%	1,219	NE
Pomeranč	Citrus sinensis 0,26%	1,238	NE
Vánoční pohoda	Citrus sinensis 0,044% Litsea cubeba 0,03%	1,015	NE

Závěry

- alternativní testy nedílnou součástí hodnocení bezpečnosti KP
- kožní dráždivost – možnost ověření epikutánním testem u lidí
- fototoxicita - startovací koncentrace pro zkoušky u lidí, bezpečnostní faktor 10
- oční dráždivost – baterie testů nutná pro MoA (Mode of Action), snášenlivost pro oční okolí možné ověřit až následně in-use testem

Děkuji za pozornost.

RNDr. Kristina Kejlová
Státní zdravotní ústav Praha
tel. +420 267082327
e-mail: kejlova@szu.cz