

Malwina Zasada

**Aktywność retinolu w terapii anti-aging przy zastosowaniu promotorów
transepidermalnego przenikania**

Activity of retinol in anti-aging therapy using the transepidermal penetration promoters

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor

Prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Budzisz

Promotor pomocniczy

Dr n. med. Anna Erkiert-Polguj

Łódź 2020

STRESZCZENIE

Dynamicznie rozwijający się przemysł kosmetyczny stawia coraz więcej wyzwań w celu zapewnienia wielowymiarowych danych dotyczących jakości gotowego preparatu kosmetycznego. Opracowywanie receptury, kolejno badanie wpływu zastosowanej bazy, jak i stężenia składnika aktywnego, pozwala na ocenę jakościową gotowego preparatu. Niemniej, pojawia się pytanie, dotyczące stabilności zastosowanego składnika aktywnego w gotowym produkcie, w tym retinolu, którego użycie rośnie na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat. Jako składnik aktywny charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie oraz niestabilnością w obecności światła. Pojawianie się rumienia, suchości, swędzenia, podrażnienia i pieczenia po zastosowaniu miejscowym retinolu, często doprowadza do przerwania kuracji czy też nie jest rekomendowane dla skóry wrażliwej. Pomimo uzasadnionej skuteczności zastosowania w zabiegach dermatologicznych, brak jest doniesień o efektach kuracji kosmetycznej, przy zastosowaniu różnych stężeń retinolu.

Podjęta tematyka dotyczyła zaprojektowania składu recepturowego produktu kosmetycznego w różnych formach: lipidowej, lamelarnej oraz ciekłokrystalicznej, w których ta ostatnia jest nowością. Zaproponowane formuły w swoim składzie zawierały różne stężenia retinolu: 0.15%, 0.3% oraz 0.5%, których zależność pomiędzy składem ilościowym a efektem klinicznym, jak i komórkowym została oceniona zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto, przedmiotem badań było opracowanie spektrofotometrycznej metody oznaczania zawartości retinolu w preparatach medycznych. Preparaty badano pod kątem stabilności, zaś testowanie produktu końcowego poprzedzono pomiarem pH, lepkości, a także ekspozycją na źródło światła z lampy ksenonowej oraz przeprowadzeniem badań czystości mikrobiologicznej (według PN-EN ISO 17516:2014). Oceniono także skuteczności zakonserwowania opracowanych preparatów kosmetycznych (PN-EN ISO 11930:2012). Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nr RNN/210/17/KE z 13 czerwca 2017 oraz nr KE/229/19 z 12 lutego 2019.

Producenci nieczęsto wskazują konkretne stężenie zastosowanego składnika aktywnego. Ponadto, chociaż retinol może być skuteczny w leczeniu starzenia się skóry i fotostarzenia, na jego stabilność i skuteczność będzie miał wpływ wybór bazy stosowanej w preparacie. Co więcej, wiele z dostępnych produktów wykazuje działanie drażniące w trakcie trwania kuracji, a często nawet już po pierwszej aplikacji.

Celem pierwszego etapu badań było opracowanie metody spektrofotometrycznej do oceny ilości retinolu w dziewięciu, autorsko opracowanych produktach kosmetycznych. Badaniu poddano serum lipidowe, lamelarne i ciekłokrystaliczne, o stężeniach 0.15%, 0.3% i 0.5%. Wyniki uzyskane przy pomocy zaproponowanej metody spektrofotometrycznej udowodniły, że każdy z przygotowanych preparatów z retinolem przechowywany w temperaturze pokojowej jest stabilny. Mimo że stężenie retinolu w serum lipidowym zostało określone z dużą dokładnością, metoda ma pewne ograniczenia związane z różnicami między lipidową bazą kosmetyczną, a bardziej złożonymi podłożami kosmetycznymi, tj. serum lamelarne i ciekłokrystaliczne. Niemniej opisana metoda spektrofotometryczna UV stanowi skuteczne narzędzie do szybkiego i dokładnego oznaczania zawartości retinolu w preparatach lipidowych. Należy sądzić, że tę metodę można zastosować w badaniach innych preparatów na bazie retinolu, np. leków oraz do określania efektywnego okresu przechowywania produktów zawierających retinol. Potwierdzono również, że produkty nie naruszają w sposób niekontrolowany naturalnego płaszcza hydrolipidowego naskórka, tj. wykazują kwaśne pH. Stwierdzono również, że serum ciekłokrystaliczne ma większą lepkość aniżeli lamelarne i lipidowe z powodu reorganizacji molekularnej. Ze względu na specyficzną strukturę, zastosowanie formuły ciekłokrystalicznej może zwiększać przepuszczalność w kontakcie ze skórą, a parametry lepkości przyczynią się do przedłużonego kontaktu postaci kosmetyku ze skórą. Prowadząc tym samym do zwiększenia efektywności działania i retencji wody w warstwie rogowej naskórka.

Istotnym obszarem w projektowaniu i produkcji kosmetyków stają się badania naukowe. Interdyscyplinarne podejście do zagadnienia daje możliwość nie tylko określenia bezpieczeństwa stosowanego produktu, ale i jego stabilności oraz skuteczności działania na poziomie biologicznym i komórkowym. W niniejszej rozprawie, w celu przeprowadzenia badań *in vitro*, wykorzystano zrekonstruowaną tkankę ludzkiego naskórka zawierającą normalne ludzkie keratynocyty (NHEK). Ekspresję mRNA EGF (czynnik wzrostu naskórka), TGM1 (transglutaminaza-1) i IL-6 (interleukina 6), mierzono po 10 dniach ekspozycji. Przeprowadzono analizę histopatologiczną i kwantyfikację mRNA. Wszystkie formuły ciekłokrystaliczne indukowały wyższą ekspresję mRNA EGF niż formuła lipidowa. Co ciekawe, stwierdzono, że ekspresja TGM1 nie jest wzrastająca wraz ze wzrostem stężenia retinolu. Niższe stężenia mogą zwiększać ekspresję TGM1, zwiększając w ten sposób tworzenie ochronnej warstwy zrogowiałej otoczki. W badaniu wykazano, że ekspresja TGM1 była najwyższa dla 0.3% serum ciekłokrystalicznego z retinolem, a kolejno dla serum z 0.15%,

0.5% i 0.3% lipidowego. Uzyskane wyniki sugerują, że formuła ciekłokrystaliczna może być uważana za bardziej korzystną, ponieważ indukuje mniej prozapalne działanie objawiające się obniżoną ekspresją IL-6, w porównaniu z konwencjonalną formułą lipidową. Badanie histologiczne ujawniło zmiany w strukturze naskórka, dotyczące głównie hiperkeratyzacji warstwy rogowej. Wyniki potwierdzają hipotezę, że formuła ciekłokrystaliczna może okazać się bardziej skuteczna niż konwencjonalne podłoża, tj. serum lipidowe oraz indukować mniej prozapalne działanie w zastosowaniu z retinolem. Ponadto stwierdzono, że ekspresja EGF koreluje znacząco ze stężeniem retinolu w formule ciekłokrystalicznej: 0.5% > 0.3% > 0.5% ($p < 0.05$). Wyniki badań *in vitro* sugerują, że tym samym wyższe stężenia retinolu w formule ciekłokrystalicznej mogą powodować wyższą regenerację komórek naskórka. Ponadto, bazując na porównaniu 0.3% retinolu w nowo opracowanej bazie do konwencjonalnej potwierdza, że zastosowane podłoże ma wpływ na efekty pielęgnacji.

Wiodącym celem badań było sprawdzenie różnic w efektywności działania retinolu w formule ciekłokrystalicznej w badaniach *in vivo*. Badaniami objęto łącznie 101 kobiet, o średniej wieku 46 lat (zakres od 33 do 65 lat), w tym 28 ochotników otrzymujących *placebo*. Przeprowadzono przed przystąpieniem do badań testy płatkowe z zastosowaniem autorsko opracowanych podłoży, wyniki były negatywne. Co oznacza, że produkt nie wywołał żadnych reakcji drażniących ani alergicznych u badanych. Ocenę efektywności i istotności zmian oceniano po lewej i prawej stronie. W badaniu *split-face*, każdy z ochotników otrzymał dwa oznaczone, testowane preparaty z różną zawartością składnika aktywnego, ale z jednakową bazą kosmetyczną. Ocenę parametrów skóry twarzy przeprowadzono z wykorzystaniem sond Cutometer®, Corneometer®, Sebumeter®, Mexameter®, oceny fotograficznej oraz skali VAS (ang. Visual Analogue Scale), jak i ankiet autorstwa własnego przeprowadzonych wśród grupy badanej.

Grupa kontrolna stosowała opracowane serum lipidowe, lameralne i ciekłokrystaliczne, bez retinolu (*placebo*), potwierdzając bezpieczeństwo i skuteczność nawilżającą opracowanych baz kosmetycznych. Dowiedziono, że retinol w formule ciekłokrystalicznej jest bezpieczny i zapewnia znaczące korzyści kliniczne związane z ujednoceniem koloru skóry, wzrostem elastyczności oraz nawilżenia. Efekt terapeutyczny przy zastosowaniu retinolu w ciekłokrystalicznej formule serum nie jest istotnie wprost proporcjonalny do zastosowanego stężenia 0.15%, 0.3% i 0.5%. Nie wykazano znamienych statystycznie zmian w różnicy efektywności mierzonych parametrów pomiędzy stronami twarzy. Wykazano, że wpływ na parametry skóry dojrzałej, serum ciekłokrystalicznego z retinolem zależy od czasu trwania

pielęgnacji, zarówno dla niższych, jak i wyższych zastosowanych stężeń. Uzyskane wyniki pomiędzy kolejnymi punktami pomiaru wykazały znamienne statystycznie różnice. Dowiedziono, że zarówno w stężeniu 0.15%, 0.3% i 0.5%, również przy zastosowania zabiegu sonoforezy, retinol w formule ciekłokrystalicznej daje możliwość przeprowadzenia 2 miesięcznej terapii bez wskazywania silnych efektów ubocznych, z nieznacznym ich nasileniem dla 0.5% \geq 0.3% = 0.15%. Udowodniono, że formuła ciekłokrystaliczna może kompensować uczucie suchości na skórze, niezależnie od zastosowanego stężenia retinolu. Obiektywna ocena skuteczności badanych preparatów stanowi istotne źródło wiedzy na temat stosowanych metod oraz wykorzystywanych formułacji kosmetycznych z retinolem w celu pielęgnacji skóry dojrzałej. Formuły oparte na niższych stężeniach retinolu mogą być stosowane w celu zapewnienia równej aktywności, przy jednoczesnym mniejszym ryzyku powodowania reakcji nadwrażliwości w warunkach *in vivo*. Badanie potwierdziło bezpieczeństwo opracowanej formuły kosmetycznej i dobrą jej tolerancję również w połączeniu z sonoforezą, dodatkowym fizycznym promotorem przenikania.

Wyniki przeprowadzonych badań mogą wskazywać na zasadne stosowanie procedury z zastosowaniem retinolu w stężeniu 0.3% jako promującego najskuteczniejsze i bezpieczne działanie, co dowiedziono zarówno w wynikach badań *in vitro* oraz *in vivo*. Interesującym jest, że przy zastosowaniu wyższych stężeń, tj. 0.5% retinolu warto rekomendować mniejszą częstotliwość stosowania, sugerując jednocześnie połączenie z zabiegami, jako skuteczną i dobrze tolerowaną.

Uzyskane wyniki wskazują na istotę rzetelnego i interdyscyplinarnego podejścia do oceny aktywności formuł kosmetycznych. Zastosowana metodyka badań wskazuje na dokładną analizę produktów kosmetycznych zawierających w składzie retinol, w nowo opracowanej formule ciekłokrystalicznej. W części doświadczalnej potwierdzono, że zaprojektowano formułacje kosmetyczne wykazujące pożądane spektrum działania. Wyniki badań dostarczają informacji niezbędnych w projektowaniu produktów kosmetycznych zawierających w swoim składzie retinol, czy też inne rozpuszczalne w tłuszczach związki. Ponadto, mogą pomóc w lepszym poznaniu wymagań stawianym nowo opracowywanym preparatom kosmetycznym z wykorzystaniem, m.in. promotorów przelnaskórkowego przenikania.

SUMMARY

The dynamically developing cosmetics industry poses more and more challenges to provide multidimensional data on the quality of the finished cosmetic product. Development of the recipe, followed by the study of the impact of the base used and the concentration of the active ingredient, allows the qualitative assessment of the finished preparation. However, the question arises about the stability of the active ingredient used in the finished product, including retinol, the use of which has been increasing over the past several years. As an active ingredient, it is characterized by poor water solubility and instability in the presence of light. The appearance of erythema, dryness, itching, irritation and burning after using topical retinol often leads to discontinuation of treatment or is not recommended for sensitive skin. Despite the justified effectiveness of use in dermatological procedures, there are no reports of the effects of cosmetic treatment using different concentrations of retinol.

The topics discussed concerned the design of the formulation of a cosmetic product in various forms: lipid, lamellar and liquid crystal, in which the latter is new. The proposed formulas contained various retinol concentrations: 0.15%, 0.3% and 0.5%, whose interdependence between quantitative composition and clinical as well as cellular effect was assessed in both *in vitro* and *in vivo* tests. Besides, the subject of the study was to develop a spectrophotometric method for determining retinol content in medical preparations. The products were tested for stability, and testing of the final product was preceded by the measurement of pH, viscosity, as well as exposure to the light source from the xenon lamp and conducting microbiological purity tests (according to PN-EN ISO 17516: 2014). The effectiveness of preserving developed cosmetic preparations was also assessed (PN-EN ISO 11930: 2012). The study was conducted after obtaining the consent of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz No. RNN / 210/17 / KE from June 13 2017 and No. KE / 229/19 from February 12 2019.

Manufacturers do not often indicate the specific concentration of active ingredient used in the cosmetic. Also, although retinol may be effective in treating skin aging and photoaging, its stability and effectiveness will be affected by the choice of base used in the formulation. What's more, many of the available products shows an irritating effect during the treatment, and often even after the first application.

The goal of the first stage of research was to develop a spectrophotometric method to assess the amount of retinol in nine proprietary cosmetic products. Lipid, lamellar and liquid crystal serum with concentrations of 0.15%, 0.3% and 0.5% were tested. The results obtained using the proposed spectrophotometric method have proved that each of the prepared preparations with retinol stored at room temperature is stable. Although the retinol concentration in the lipid serum has been determined with high accuracy, the method has some limitations related to the differences between the lipid cosmetic base and more complex cosmetic bases, i.e. lamellar and liquid crystal serum. However, the described UV spectrophotometric method is an effective tool for fast and accurate determination of retinol content in lipid preparations. It should be assumed that this method can be used in the study of other preparations based on retinol, e.g. medicines, and to determine the effective shelf life of products containing retinol. It has also been confirmed that the products do not uncontrollably affect the natural hydrolipid layer of the epidermis, i.e. show an acidic pH. It has also been found that liquid crystal serum has a higher viscosity than lamellar and lipid serum due to molecular reorganization. Due to the specific structure, the use of a liquid crystal formula can increase the permeability in contact with the skin, and viscosity parameters will contribute to prolonged contact of the cosmetic form with the skin. Thus, leading to increased efficiency and water retention in the stratum corneum.

Scientific research is becoming an important area in the design and production of cosmetics. The interdisciplinary approach to the issue gives the opportunity not only to determine the safety of the product used, but also its stability and effectiveness at the biological and cellular level. In this dissertation, reconstructed human epidermal tissue containing normal human keratinocytes (NHEK) was used for in vitro studies. Expression of IL-6 (Interleukin 6), TGM1 (Transglutaminase-1), and EGF (Epidermal Growth Factor) mRNA was measured after 10 days of exposure. Histopathological analysis and mRNA quantification were performed. All liquid crystal formulas induced higher EGF mRNA expression than the lipid formula. Interestingly, it was found that TGM1 expression is not increasing with increasing retinol concentration. Lower concentrations may increase TGM1 expression, thereby increasing the formation of a protective cornified envelope. The study showed that TGM1 expression was the highest for 0.3% liquid crystal serum with retinol, and then for serum with 0.15%, 0.5% and 0.3% lipid. The results obtained suggest that the liquid crystal formula may be considered more beneficial because it induces a less pro-inflammatory effect manifested in reduced expression of IL-6, compared to the conventional lipid formula. Histological examination revealed changes

in the structure of the epidermis, mainly related to hyperkeratinization of the stratum corneum. The results support the hypothesis that the liquid crystal formula may prove to be more effective than conventional media, i.e. lipid serum, and induce a less pro-inflammatory effect when used with retinol. Besides, EGF expression was found to correlate significantly with the concentration of retinol in the liquid crystal formula: 0.5% > 0.3% > 0.15% ($p < 0.05$). The results of *in vitro* studies suggest that these higher concentrations of retinol in the liquid crystal formula may cause higher regeneration of epidermal cells. In addition, based on a comparison of 0.3% retinol in a newly developed base to a conventional one, it confirms that the applied medium has an impact on the effects of care.

The main goal of the research was to evaluate the differences in the effectiveness of retinol in the liquid crystal formula *in vivo*. The study included a total of 101 women, with an average age of 46 (range 33 to 65), including 28 volunteers receiving *placebo*. Before testing, patch tests using the author's developed products were negative. This means that the product did not cause any irritating or allergic reactions in the subjects. The assessment of effectiveness and significance of changes was assessed on the left and right side. In the split-face study, each volunteer received two marked, tested preparations with different content of active ingredient, but with the same cosmetic base. The assessment of facial skin parameters was carried out using Cutometer®, Corneometer®, Sebumeter®, Mexameter®, photographic assessment and VAS (Visual Analogue Scale) as well as self-made surveys conducted among the study group.

The control group used the developed lipid, lamellar and liquid crystal serum without retinol (*placebo*), confirming the safety and moisturizing effectiveness of the cosmetic bases developed. It has been proven that retinol in the liquid crystal formula is safe and provides significant clinical benefits related to the unification of skin color, increased flexibility, and hydration.

The therapeutic effect of using retinol in the liquid crystal serum formula is not significantly proportional to the concentration of 0.15%, 0.3%, and 0.5%. There were no statistically significant changes in the difference in effectiveness of the measured parameters between the sides of the face. It has been shown that the effect on the parameters of mature skin, liquid crystal serum with retinol depends on the duration of care, both for lower and higher concentrations used. The results obtained between successive measurement points showed statistically significant differences. It has been proved that in the concentration of 0.15%, 0.3% and 0.5%, also with the use of sonophoresis, retinol in the liquid crystal formula allows performing 2 months of therapy without indicating strong side effects, with a slight severity for

0.5% \geq 0.3% = 0.15%. It has been demonstrated that the liquid crystal formula can compensate for the feeling of dry skin, regardless of the retinol concentration used. An objective assessment of the effectiveness of tested preparations is an important source of knowledge about the methods used and the cosmetic formulations used with retinol to care for photoaged skin. Formulas based on lower retinol concentrations can be used to ensure equal activity while reducing the risk of hypersensitivity reactions in vivo. The study confirmed the safety of the developed cosmetic formula and its good tolerance also in combination with sonophoresis, an additional physical penetration promoter.

The results of the conducted tests may indicate a reasonable use of the procedure using retinol in a concentration of 0.3%, as promoting the most effective and safe action, which has been proved both in the results of in vitro and in vivo tests. It is interesting that when using higher concentrations, i.e. 0.5% retinol, it is worth recommending a lower frequency of use, while suggesting a combination with treatments as effective and well-tolerated.

The obtained results indicate the essence of a reliable and interdisciplinary approach to assessing the activity of cosmetic formulas. The research method used indicates a thorough analysis of cosmetic products containing retinol in the newly developed liquid crystal formula. In the experimental part, it was confirmed that cosmetic formulations were designed to display the desired spectrum of action. Research results provide information necessary for the design of cosmetic products containing retinol or other fat-soluble compounds. Besides, they can help to better understand the requirements for newly developed cosmetic preparations usage, among others transepidermal penetration promoters.