

İn Vitro Üç Boyutlu İnsan Deri Modeli Kullanılarak Etkinlik Yararlılık Talebi^{†¶}

COSMETIC EFFICACY CLAIMS IN VITRO USING A THREE-DIMENSIONAL HUMAN SKIN MODEL

K. SCHLOTMANN*, M. KAETEN*, A.F. BLACK**, O. DAMOUR**, M. WALDMANN-LAUE*, T. FÖRSTER*

* Henkel KgaA, Department of Skin Biochemistry, 40225 Düsseldorf, Germany,

** Laboratoire des Substituts Cutanés, CNRS UPR 412, Hôpital E. Herriot, 69367 Lyon Cedex 07, France

©Schlotmann K, Kaeten M, Black AF, Damour O, Waldmann-Laue M, Förster T. *Cosmetic Efficacy Claims In Vitro Using A Three-Dimensional Human Skin Model. International Journal of Cosmetic Science, 2001; 23(5):309-318.*

Özet

İşlenmemiş materyaller ve kozmetik formüllerinin test edilmesinde kullanılan insan derisi eşdeğeri bir doku oluşturularak başarılı şekilde kullanılmaktadır. Bu yeniden oluşturulan deriyi in vivo normal insan derisinin yapısına daha yakın üreten bir dokuyu oluşturmak için beraberce kültürde üretilen ve epidermis ve dermis arasında komplike ilişkilerin gözönüne alındığı dermal fibroblastlar ve insan keratinositindeki bir kollajen –glikozaminoglikan-chitosan biopolimer ile desteklenir. Diğer yanda, dermal veya deri eşdeğerinde dermal ve epidermal yanıtlar ayrı ayrı değerlendirilebilir.

Etkinlik testinde tek tabakalı hücre kültürleri ve epidermis modelleriyle karşılaştırıldığında; üç boyutlu modelin önemli avantajları vardır. 1. Biyoaktifleri içeren krem formülünün tekrarlanan uygulamalarıyla uzun süreli yetiştirilmenin olasılığı, 2. Dermis ve epidermis arasındaki etkilerinin ilgisinde insan cildinin benzerliği. Bu benzerlikler, sitokeratin 10, filaggrin ve transglutaminaz gibi keratinosit farklılaşma (gelişme markırlarının görülmesini, bazal laminanın proteinlerini (laminin, kollajen tip IV) ve elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerini içerir.

Seçilmiş biyoaktiflerin yararlığı değişik son noktalar kullanılarak belirlendi; örneğin: dermal ve deri eşdeğerlerinde kollajen sentezinin stimülasyonu, pozitif bir kontrol olarak vitamin C ile karşılaştırmalı olarak gösterildi. İmmunofloresans teknikleri kullanarak deri eşdeğerleri üzerinde deri nemliliği için önemli gelişme markırı filaggrin stimülasyonunu gösterdik. Sonuçlar yararlılığın önemi için kullanılabilir. Ör. Kuru ve yaşlı derinin tedavisi

Anahtar Kelimeler: Kollajen, Etkinlik talebi, Filaggrin, Onarılmış deri

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:25-33

Summary

A tissue engineered human skin equivalent is successfully used for the testing of raw materials and cosmetic formulations. This reconstructed skin is supported by a collagen-glycosaminoglycan-chitosan biopolymer in which human keratinocytes and dermal fibroblasts were co-cultured to form a tissue that closely reproduces the in vivo architecture of normal human skin and takes into account the complex interactions between epidermis and dermis. On the other hand dermal and epidermal responses can be assessed separately in the dermal or skin equivalent.

The three-dimensional model has important advantages compared to monolayer cell cultures and epidermis models in efficacy testing: (i) the possibility of long-term cultivation with repeated application of cream formulations containing bioactives and (ii) the similarity to human skin concerning the interaction between dermis and epidermis. These similarities include the expression of keratinocyte differentiation markers such as cytokeratin 10, filaggrin and transglutaminase, as well as proteins of the basal lamina (laminin, collagen type IV) and extracellular matrix proteins such as elastin.

The efficacy of selected bioactives was determined using different endpoints, for example, stimulation of collagen synthesis in the dermal and skin equivalents was shown in comparison to vitamin C as a positive control. On skin equivalents using immunofluorescence techniques we also demonstrated stimulation of the differentiation marker filaggrin, which is important for skin moisturization. The results could be used for claim substantiation, e.g. for the treatment of dry and aged skin.

Key Words: Collagen, Efficacy claims, Filaggrin, Reconstructed skin

T Klin J Cosmetol 2002, 3:25-33

Yeniden oluşturulan deri modelleri, farmasotik ve kozmetik endüstri ve dermatolojik araştırma için giderek artan bir öneme sahip olmaktadır.

Yaygın yanıklar ve kronik yaralar (1-3)'in tedavisi için orijinal olarak geliştirilmiş ve şimdi de sıklıkla kozmetik formüllerin ve biyoaktif içeriklerin (4-8)

yararlılığının ve güvenilirliğinin değerlendirilmesinde hayvan deneylerine alternatif olarak da kullanılmaktadır.

Değişik dermal substratlar (9-13) kullanarak hava-sıvı seviyesinde keratinosit kültürlerinde son yıllarda çok sayıda insan derisi benzerleri geliştirilmiştir. Günümüzde epidermis ve epitelyal modeller; ticari olarak MatTek Corp., Ashland, MA, U.S.A. ve Skinethik, Nice, France'den temin edilebilir ama test amaçlı epidermis ve dermis içeren deri modelleri sadece Organogenesis, Canton, MA, U.S.A.'den sağlanabilir.

İnsan tıbbında uygulanması için kollajen, chitosan ve glikozaminoglikandan temel alan biyomateryallerin kullanımı için Collombel ve ark. (14) tarafından bir patent başvurusu yapıldı. Bu tekniğin temelinde, bu grup üç boyutlu bir dermal ve deri eşdeğeri geliştirdi ve ham materyallerin (18) yararlılık testinde olduğu kadar, in vitro (15-17) öngörülen kutanoz toksisite ve fototoksisite için kullanımı tanımladı. Bu modelin büyük bir avantajı fibroblast konsantrasyonu azaltan ve insan ekstrasellüler matriksinin önemli bir yeniden sentezine yol açan herhangi bir kimyasal çapraz bağdan yoksun tamamen biyolojik matrikstir (19). Epidermis ve dermisi içeren deri eşdeğeri, epidermis ve dermis arasındaki karmaşık ilişkilerde göz önüne alınır. Diğer yanda, dermal veya deri eşdeğerinde dermal ve epidermal yanıtlar ayrı ayrı değerlendirilebilir. Epidermal gelişme markerları; normal derideki gibi deri eşdeğerinde de esas olarak dağılmıştı ve dermal-epidermal bileşkenin major proteinleri bulunmaktadır (20). Ekstrasellüler matriks proteinleriyle ilgilenildiğinde, elastik fibrillerin tespit edildiği ilk modeldir (21).

Çalışmamızda gösterildiğine göre, histolojik yapıları ve sitokeratin 10, filagrin, in vivo lucrin ve transglutaminaz kadar bazal lamina proteinleri (laminin, kollajen tip IV) ve elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri gibi gelişme marker'larının varlığını yüksek derecede ilgilendiren insan derisine benzeyen bir kollajen-chitosan-GAG matriksinden temel alan

keratinositlerin yetiştirilmesiyle, deri eşdeğerleri elde edilmiştir.

Uzun süreli yetiştirme çalışmaları ile, histolojik yapının en az 28 gün korunduğunu gösterebiliyorduk.

Bu çalışmanın amacı; kozmetik ürünler için yararlılık testlerinde bir gereç olarak bu yeniden oluşturulmuş insan deri modelinin gücünü göstermektir. Bu model, in vitro yararlılık testleri için birçok olasılıklar sunar. Örnek olarak; derinin yaşlanması sürecinde rol oynayan filagrin ve kollajen gibi önemli deri proteinlerinin sentezinin stimülasyonunda aktif içerikler içeren formüllerin etkisini gösteriyoruz. Sonuçlar yararlılığın önemi için kullanılabilir. Ör. kuru ve yaşlı derinin tedavisi.

Materyel ve Metodlar

Hücre Kültürleri

Keratinosit ve fibroblastlar insan ön kol derisinden izole edildi. Fibroblastlar Glutamax I (L-alanyl-L-glutamin)'li, sodyum pyruvate'lı, Dulbecco'nun modifiye Eagle's ortamında (DMEM), 4.5 mg L⁻¹ glukoz ve %10 buzağı yenidoğan serumu (Hyclone, Erembodegem, Belgium), 25 µgr mL⁻¹ gentamisin (Sigma, Taufkirchen, Germany) ve 100 IU mL⁻¹ penisilin G (Sigma) eklenir. Piridoxin (Gibco BRL, Karlsruhe, Germany) de üretildi. Keratinositler; yenidoğan buzağı serumu (NCF, yenidoğan clone II, Hyclone), epidermal growth faktör (EGF) (Sigma), insülin (Sigma), hidrokortizone (sigma), triiodo-L-thyronine (Sigma), adenin (Sigma), cholera toxin (Sigma); antibiyotikler eklenmiş DMEM Glutamax ve Ham's F12 (Sigma) (3:1) karışımında üretilerek üçüncü pasajda kullanıldı.

Dermal Eşdeğerlerin Hazırlanması

Dermal eşdeğer (DE); daha önce tanımlandığı üzere (14) hazırlanan chitosan-çapraz bağlı-kollajen-matriks'den yapılmış biyopolimerin üzerine cm²'ye 2x10⁵ fibroblastlık bir süspansiyon eklenerek üretildi. DE'nin; 37°C'de %5 CO₂ atmosfer basınçta 50 µgr mL⁻¹ askorbik asit içeren bir vasatta 14 gün boyunca kültürü yapıldı. Vasat hergün değiştirildi.

Deri Eşdeğerlerinin Hazırlanması

İnsan keratinositleri 14 günlük DE'de cm^2 'de 200.000 hücrelik bir yoğunlukta ekildi ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lık askorbik asitli tam bir vasatta 7 gün boyunca su altı şartlarında kültürü yapıldı. Deri eşdeğerleri (SE) kalan 14 gün için hava sıvı seviyesine; modifiye keratinosit vasatda (DMEM-Ham'ın F12, NCS, hidrokortizon, insülin askorbik asit ve antibiyotikli) yükseltildi. Vasat haftada 3 gün değiştirildi.

Uzun süreli yetiştirme çalışmaları için, deri eşdeğerlerinin, hava-sıvı seviyesinde 28 güne kadar kültürleri yapıldı.

Histoloji

SE ve DE; %4 tampone formalinde fikse edildi ve parafin içine gömüldü. Kesitler $4 \mu\text{m}$ kalınlığında kesildi ve (HE) Hematoksilen Eozinle boyandı.

İmmunohistokimyasal Analiz

DE ve SE, OCT Tissue-Tek (Leica, Nussloch, Germany)'ye yerleştirildi. Leica kriyotom CM3050 (Leica)'la $4 \mu\text{m}$ kalınlığında frozen kesitler elde edildi, havada kurutuldu ve asetonda fikse edildi. Fare monoklonal anti-human filagrin antikor ($1/50$ dilüsyon) (TEBU, Frankfurt a.m., Germany) kullanılarak immunofloresans çalışmaları yapıldı.

Ek immunohistokimyasal çalışmalar için, şu monoklonal fare (mm) ve polyklonal tavşan (pr) antikorları kullanıldı: anti-human kollajen tip IV (mm, $1/50$ dilüsyon) (DAKO, Hamburg, Germany), anti-human elastin (pr, $1/40$ dilüsyon) (NOVOTEC, Lyon, France), anti-human laminin (mm, $1/500$ dilüsyon) (Sigma), anti-human sitokeratin 10 (mm, $1/50$ dilüsyon) (DAKO) ve anti-human transglutaminaz (mm, $1/20$ dilüsyon) (TEBU).

İkinci antikor FITC-konjuge tavşan anti-fare IgG ($1/20$ dilüsyon) veya FITC-konjuge domuz anti-tavşan IgG ($1/20$ dilüsyon) idi. Biyopolimer yapının nonspesifik boyamasını azaltmak için ikinci antikor %0.1 Evans mavisiyle karıştırıldı (22). Primer antikor kontrol amaçlı bırakıldı.

Dermal ve Deri Eşdeğerleri Üzerinde Test Maddelerinin ve Krem Formüllerinin Uygulanması

Kollajen sentezi stimülasyonu dikkate alındığında, ham materyallerin sistemik test edilmesi için dermal eşdeğerlerin 21 gün su altı koşullarda kültürü yapıldı. Aktif içerik olarak, değişik konsantrasyonlarda Oksitlenmiş koenzim A (Lion Corporation, Tokyo, Japan) ve askorbik asit (Sigma) kullanıldı. Test maddeleri vasatta sulandırıldı ve 6 gün boyunca enkübe edildi. Test maddelerini içeren vasat, hafta sonları hariç hergün değiştirildi.

Topikal uygulamayla kollajen sentezinin stimülasyonu için $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ askorbik asit (Sigma) içeren bir jelin $5 \mu\text{L}$ ($=3.8 \text{ mg cm}^{-2}$)'si veya mature deri eşdeğerleri üzerine 10 gün boyunca günde 4 kere ticari bir retinol krem uygulandı ve bir fırça ile yayıldı.

Filagrin sentezi stimülasyonu için, alg ekstraktı (IGV, Postdam, Germany) içeren ticari bir krem formülünün $5 \mu\text{L}$ 'si ($=3.8 \text{ mg cm}^{-2}$) mature deri eşdeğerleri üzerine uygulandı.

Plasebo formülasyonları ise aktif içerik olmadan hazırlandı.

Kollajen Sentezinin Ölçümü

Kollajen sentezinin ölçümü; Diegelmann ve Peterkofsky (23)'nin modifiye metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca 9 gün boyunca kültürlerin tedavisinden sonra, deri eşdeğerlerinin, 24 saat boyunca $5 \mu\text{Ci mL}^{-1}$ ^3H prolin (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) ile kültürü yapıldı. Deri eşdeğerleri ultrasonla homojenize edildi (Branson Sonic Power Company Connecticut, USA). Non-kollajenik proteinlerdeki bağlanmamış radyoaktivitenin ölçümü; Kollajenaz tip VII (Sigma) ve santrifüjle (3500 r.p.m. ; 10 dk.) kollajenin spesifik bir degradasyonundan sonra pellet'te gerçekleştirildi. Kollajenik proteinlerdeki radyoaktivite; su yüzeyinde ölçüldü.

VOLUME 23
NUMBER 5
OCTOBER 2001
S.312

Normal insan derisi

Deri eşdeğeri

Şekil 1. Normal insan derisinin ve bir deri eşdeğerinin histolojik yapısı (H&E boyanma).

Sonuçlar

Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analiz

H & E ile boyanan parafin kesitleri, yeniden oluşturulan deri modelinde karakteristik bir epidermal stratifikasyon açığa çıkardı. Stratum bazale, stratum spinozum, stratum granulozum ve stratum korneumu içeren bütün hücre tabakaları vardı (Şekil 1).

İmmunohistokimyasal analiz açığa çıkardığına göre, bazal membranın proteinleri olduğu kadar, dermal matriksin de epidermal gelişme markerları olarak, insan derisine benzer olarak tanımlanır ve dağılır (Şekil 1, Tablo 1).

Deri eşdeğerlerinde olduğu kadar normal insan

Tablo 1. Normal insan derisi ve deri eşdeğerinde gelişme marker'larının, dermo-epidermal bileşke proteinlerinin ve elastinin dağılımı

Marker	Normal insan derisi	Deri eşdeğeri
Epidermis		
Sitokeratin K 10	+	+
Filaggrin	+	+
Transglutaminaz	+	++
Bazal lamina		
Kollajen tip IV	+	+
Laminin	+	+
Dermis		
Elastin	+	+

derisinde, sitokeratin 10 epidermisin suprabazal tabakalarında tanımlanır, bu arada, keratin filamentlerinin agregasyonundan sorumlu ve doğal nemlendirici faktörün (NMF) prekürsörü olan filaggrin, deri eşdeğerleri ve insan derisinde stratum korneumun alt tabakalarında yerleşmiştir. Korneositlerin, kornifiye zarfının oluşumu için önemli olan transglutaminaz insan deri ve deri eşdeğerlerinin stratum granulozumunda ve sonradan da epidermisin üst suprabazal tabakalarında ek olarak bulundu. Bu fenomen; diğer birçok epidermis modelleri için de ayrıca tanımlandı (24). İnsan derisi ve deri eşdeğerinde, laminin ve kollajen tip IV de bazal laminanın önemli proteinleri olarak bulunuyordu. Doku esnekliğinden sorumlu bir matriks proteini, elastin de, deri eşdeğerinde olduğu kadar insan derisinin dermal bölümünde de tanımlanır ve iyi organize olmuştur.

Uzun Süreli Yetiştirme

Deri eşdeğerlerinin histotipik yapısı 35 günlük keratinosit kültürüne karşılık gelecek şekilde, hava-sıvı arayüzeyinde hiç olmazsa 28 güne kadar korunabildi. Epidermisin incilmesi ve stratum korneumun kalınlaşması gözlemlenebildi. Ama stratum bazalenin hücreleri halen aynı paralel yönde organize edilmişti ve epidermisin bütün tabakaları mevcuttu (Şekil 3).

Normal insan derisi

Deri eşdeğeri

Sito-
keratin 10

Filaggrin

Trans-
glutaminaz

Şekil 2. Normal insan derisinde ve deri eşdeğerinde ayrışım belirteçlerinin (sitokeratin 10, filaggrin ve transglutaminaz); dermo-epidermal bileşke proteinleri (kollajen IV ve laminin) ve elastin'in lokalizasyonu.

Deri Eşdeğerlerinde Filaggrin Sentezinin Stimülasyonu

İmmunohistokimyasal analiz; alg ekstraktı (Şekil 4) içeren formülle tedavi edilen deri eşdeğerlerinde, filaggrin üretiminin kuvvetli bir stimülasyonunu açığa çıkarır. Sonuçları değerlendirmek için filaggrin boyalı bölgenin kalınlığının ölçümü kullanıldı. Test formülünün uygulanmasından sonra, plasebo kontrol ile (Şekil 5) karşılaştırıldığında filaggrin'in tanımlanmasının belirgin olarak %64'e kadar yükseldiği gösterilebilmiştir.

Dermal ve Deri Eşdeğerlerinde Kollajen Sentezinin Stimülasyonu

Dermal eşdeğerde, vasat'da askorbik asitin sistemik uygulanması; kollajen'in sentezini %63'e kadar arttırdı (Şekil 6). Oksidize Koenzim A, kollajen sentezini 1 mm'de stimüle etti.

Deri eşdeğerlerinde, kollajen sentezi 50 µgr mL⁻¹ vitamin C içeren jel formülü veya stabilize retinol içeren bir krem formülü uygulamasından sonra stimüle oldu. Pozitif bir kontrol olarak askorbik asit; tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında; %40'lık bir kollajen içeriğine

Normal insan derisi

Deri eşdeğeri

Kollajen IV

Laminin

Elastin

Şekil 2. devamı

ulaşmıştır. Retinol kremle tedavi; %59'luk bir gelişme sağlamıştır (Şekil 7).

Tartışma

Uzun Süreli Yetiştirme

Uzun süreli yetiştirme sırasında, deri eşdeğerlerinde stratum korneumun kalınlaşması ve epiderminin incilmesi gözlemlendi. Bu iyi bilinen bir fenomendir, çünkü yeniden oluşturulan deri eşdeğerleri, korneositlerin anormal ayrılmasına neden olan, deskuamasyon bozukluğunu gösterir (25). Bununla beraber, deri eşdeğerlerinin yapısı 28 güne kadar hava-sıvı arayüzeyinde inkübasyonda korunabildiğinden; krem formüllerinin modelin

tepesine birçok kere uygulanması 14 güne kadar olasıdır. Birçok vakada aktif bir içeriğin optimal etkisi; bir kremin yinelenen uygulanmasıyla elde edilebileceğinden bu çok önemlidir.

Deri Eşdeğerlerinde Filagrin Sentezi

Filagrin'ler türler arasında aminoasitlerin kompozisyonu ve boyutları açısından değişikliklerin olduğu yüksek oranda temel polipeptidlerdir. Filagrin (filaman çökerten protein); stratum korneumun aşağı tabakalarında yüksek moleküler ağırlıklı öncü profilagrinden türemiştir. Bir filagrin-keratin kompleksi oluşturulduktan sonra, keratin lifleri arasında filagrinle katalize edilen

14 gün

Plasebo kontrol (---- bazal membran)

28 gün

Alg ekstraktlı krem formülü

Şekil 3. Hava sıvı arayüzünde (H&E boyama) 28 gün yetiştirilmeden sonra deri eşdeğerinin yapısındaki histolojik değişiklikler.

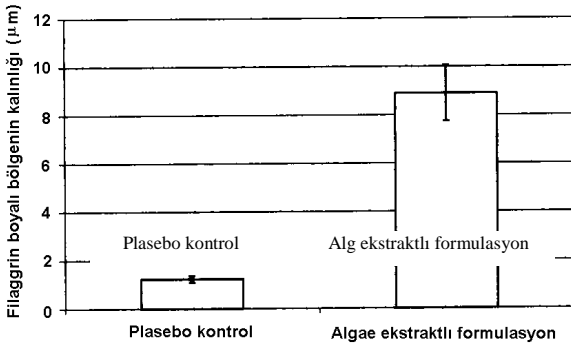
Şekil 4. Plasebo ve alg ekstraktı içeren krem formülüyle tedaviden sonra, deri eşdeğerlerindeki filaggrin. Deri eşdeğerleri 10 gün içinde 4 kere tedavi edildi. Kesitler; filaggrin/profilaggrin'e karşı bir antikor ile boyandı. Boyanmış bölgenin kalınlığı, alg ekstraktı ile tedaviden sonra arttı.

disülfid bağları oluşur. Korneositlerin stabil keratin ağ örgüsü, cildin bariyer fonksiyonu için önemli olduğundan diğer faktörlerle beraberdir. Filaggrin sonradan proteolize olur ve aminoasitlerinden bazıları, doğal nemlendirici faktörü (NMF) oluşturmak için metabolize olur. Böylece, su deride saklanabilir ve deri kuruluştan korunur (26). Beraberce ele alındığında, filaggrin derinin differensiasyon sürecinde, tam bir bariyer fonksiyonunun oluşmasında ve derinin nemlendirilmesinde önemli bir rol oynar.

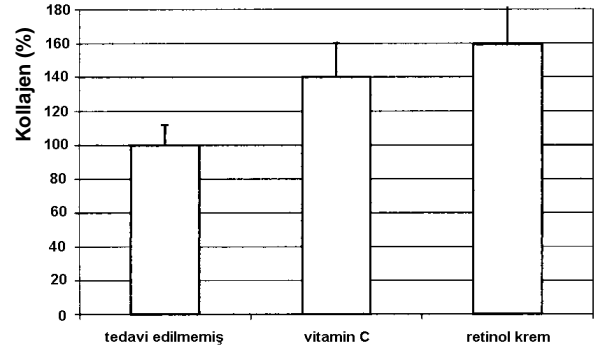
olabileceğini öne sürdüler. Filaggrindeki azalma, atopik deri ve psöriazis gibi kuru deriyle beraber görülen deri bozukluklarında da gözlemlendi ve bu hastalıklarda, kuru deri için bir neden olabileceği düşünüldü (28,29). Derinin aminoasit içeriği de yaşlanma sırasında azalmaktadır (30).

Literatürde; yaşlı ve kuru deride filaggrin sentezini ilgilendiren bazı raporlar vardır. Horii ve ark. (27), değişen derecelerde kserozis şiddetiyle beraber hidrasyon ve çıkarılabilir aminoasit içeriğinde bir azalma gözlemlenildi ve azalmış aminoasit miktarının, epidermisteki düşük profilaggrin sentezinin bir sonucu

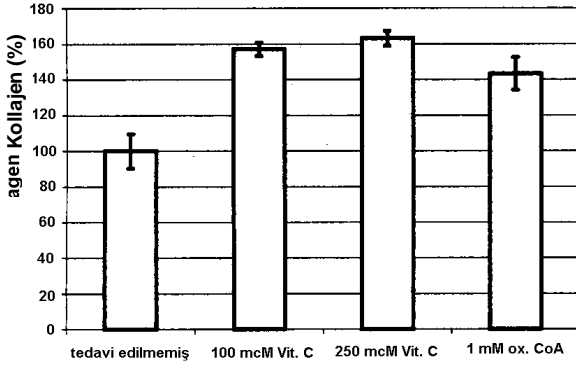
Bizim in vitro çalışmamızda, aktif bir içerik olarak alg ekstraktı içeren bir krem formülüyle, filaggrin tanımlanmasının arttığını gösterdik. Böyle bir krem kuru deri ve yaşlı deride, kutanöz yaşlanmanın belirtilerini geri çevirebilmek veya deriyi yaşlanmaktan korumak amacıyla tedavide kullanılabilir. Bundan sonraki basamak; in vitro görülebilen bu etkilerin, in vivo duruma aktarılabilmesini araştırmaktır.



Şekil 5. Alg ekstraktı içeren formülüyle tedaviden sonra deri eşdeğerlerindeki filaggrin boyalı bölgenin kalınlığı. Deri eşdeğerleri 10 gün içinde kremle 4 kere tedavi edildi.



Şekil 7. Askorbik asit içeren jel veya retinol kremle tedaviden sonra, deri eşdeğerlerinde kollajen sentezinin stimülasyonu. Deri eşdeğerleri, krem formülüyle topikal olarak 10 gün içinde 4 kere tedavi edildi. Kollajen sentezi, bağlı olmayan radyoaktif prolinle belirlendi.



Şekil 6. Askorbik asit ve oksitlenmiş koenzim A ile tedaviden sonra dermal bir eşdeğerde kollajen sentezinin stimülasyonu. 21 günlük dermal eşdeğerler, aktif içerik içeren vasatta 6 günden fazla enkübe edildi.

Dermal ve Deri Eşdeğerlerinde Kollajen Sentezi

Kollajen, bağ dokularının en büyük yapısal unsurunu temsil eder ve derinin dermal bölümünde büyük oranlarda bulunur. Kollajen molekülleri; derinin fonksiyonel bütünlüğünü sağlamak için karakteristik lifleri birleştiren fibroblastlardan sekrete edilir. Kollajen, bir yetişkinin derisinde dermal kollajenin %80'ini temsil ederken, kollajen III %15'ini oluşturur (31). Kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma sırasında, deri özellikle çarpıcı değişiklikler gösterir. Kollajen içeriğinin, bir yetişkinin yaşamı boyunca, yaklaşık %1'lik bir oranla yaşlanma sırasında azaldığı gösterilmiştir (32). Kollajenin azalmış sentezine ek olarak, yaşlanmış fibroblastlar belirgin olarak artmış

kollajenaz aktivitesi gösterirler (33). Bu süreçler dermiste kollajen kaybına yol açarlar. Derinin direnç gerginliğinde azalma, sarkma ve buruşukluğa neden olurlar.

Böylece amacımız, esnekliği arttırmak ve buruşuklukları azaltmak için kollajen sentezini stimüle etmektir. Askorbik asit (Vitamin C) diğer nedenler arasında, kollajen biyosentezi için esansiyel enzimler olan lysyl hydroxylase ve prolyl hydroksilaz için esansiyel kofaktör olduğundan, kollajen sentezi üzerinde pozitif bir etkisi olduğu tanımlanmıştır (34). Böylece biz bu molekülü, çalışmalarımızda pozitif bir kontrol olarak seçtik ve dermis modelinde sistemik uygulamayla kollajen tedavisinde bir artış gösterdik. Oksitlenmiş koenzim A gibi diğer aktif içerikleri kullanarak, dermal modellerde kollajen içeriklerde bir gelişme gözledik.

Dermal eşdeğerler, 3 hafta içinde relatif olarak kolayca üretildiklerinden, 3D yapıdaki fibroblastlar üzerinde suda eriyen maddelerin etkilerini değerlendirmek için yararlı bir tarama modeli sunarlar.

Seçilmiş maddeler için, deri eşdeğerlerinde, kollajen sentezinin etkisi krem formülünün topikal uygulamayla değerlendirilebilir. Bu modeller bariyer fonksiyonu sağlarlar, böylece penetrasyon yeteneği olanlar gibi diğer faktörler de göz önüne alınabilir. Çalışmamızda krem formülündeki stabilize retinol gibi, jel formülündeki vitamin C de deri eşdeğerlerinde kollajen sentezi stimülasyonunda etkiliydi.

Bu sonuçlar, bir kollajen jelde fibroblastları içeren bir dermal eşdeğerde bütün trans-retinol asidin kollajen sentezini stimüle ettiğini gösteren Jutley ve ark.'ın (35) gözlemleriyle uyumluydu. Bu gözlemler, retinoidlerin topikal uygulanmasından sonra in vivo gözlenenlerle benzerdi (36). Test sistemimizde, bu etkiyi, retinol içeren formül için gösterebildik. Bu krem formülüyle in vivo çalışmalar, FOITS metodunu kullanarak (veriler gösterilmemiştir) 8 haftalık uygulamadan sonra buruşukluklarda belirgin azalma gösterdi. Bu azalma retinol ve türevlerinin örneğin tanımlandığı üzere MMP-1 sentezindeki azalma etkilerine rağmen, kollajen sentezinin stimülasyonuna atfedilebilir.

Özet olarak, in vitro çalışmalarda, yeniden oluşturulan insan derisinde, deri koruyucu ürünlerin, in vivo artmış deri esnekliği, yumuşaklık ile fasiyal çizgilerin ve buruşuklukların azalmasıyla sonuçlanacak filagrin ve kollajen sentezi gibi deride doğal süreçleri stimüle edebileceklerini gösterebildik.

KAYNAKLAR

- Damour O, Dantzer E, Poincignon F, Vescovelli C, Marichy J, Collombel C and Echinard C. Controles physicochimiques et experimentaux d'un derme artificiel a base de collagene. Ann MBCI 1988; 195-9.
- Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit M, Rouselle P, Berthod F, Sahuc F and Collombel C. A dermal substrate made of collagen-GAG-Chitosan for deep burn coverage: first clinical uses. Clin Mater 1994; 15:273-6.
- Wilkins LM, et al. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnol Bioeng 1994; 43:747-56.
- Damour O, Augustin C and Black AF. Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. Med Biol Eng Comput 1998; 36:825-32.
- Majmudar G and Smith M. In vitro screening techniques in dermatology. A review of tests, models, and markers. Cosmetics Toiletries 1998; 113:69-76.
- Pittermann W, Hörner V, Förster TH and Kietzmam M. Use of natural and artificial skin models in cosmetic research. SÖFW-Journal 1997; 123:666-70.
- Augustin C, Frei V, Perrier E, Huc A and Damour O. An in vitro selection of new cosmetic active compounds: From screening tests on monolayered fibroblast culture to efficiency study on 3-D dermal equivalent. J Appl Cosmetol 1997; 15:1-11.
- Ponec M. In vitro cultured human skin cells as alternatives for skin irritancy screening. J Cosmet Sci 1992; 14:245-64.
- Régnier M, Asselineau D and Lenoir MC. Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro: an alternative to animals in skin pharmacology. Skin Pharmacol 1990; 3:70-85.
- Ponec M. Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. Toxicol In Vitro 1991; 5:597-606.
- Parenteau N, Nolte C, Bilbo P et al. Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications. J Cell Biochem 1991; 45:245-51.
- Tinois E, Tillier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M and Thivolet J. In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes growth on the human type IV collagen film o a bilayered dermal substitute. Exp Cell Res 1991; 193:310-9.
- Rosdy M and Clauss LC. Terminal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined vasat on inert filter substrates at the air-liquid interface. J Invest Dermatol 1990; 97:409-14.
- Collombel C, Damour O, Gagnieu C, Marichy C and Poincignon F. Biomedical materials based on collagen - contg. Chitosane and glycosaminoglycan. French Patent 2616318 CNRS. Lyon (1988). European Patent 296078 (1989), US Patent 5166187 (1989).
- Augustin C and Damour O. Development of a kit for predicting cutaneous toxicity in vitro using three-dimensional dermal equivalent: phase I reproducibility of dermal equivalent. Cell Eng Inc Mol Eng 1995; 1:58-62.
- Augustin C, Collombel C and Damour O. Use of in vitro dermal equivalent and skin equivalent kits for evaluation cutaneous toxicity of cosmetic products. In Vitro Toxicol 1997a; 1:21-9.
- Augustin C, Collombel C and Damour O. Use of in vitro dermal equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. Photodermal Photoimmunol Photomed 1997b; 13:27-36.
- Frei V, Perrier E, Orly I and Huc A. Activation of fibroblast metabolism in a dermal and skin equivalent model: a screening test for activity of peptides. Int J Cosmet Sci 1998; 20:159-73.
- Berthod F, Hayek D, Damour O and Collombel C. Collagen synthesis by fibroblast cultured within a collagen sponge. Biomaterials 1993; 14:749-54.
- Saintigny G, Bonnard M, Damour O and Collombel C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. Acta Derm Venereol (Stockh) 1993; 73:175-80.
- Duplan-Perrat F, Damour O, Montrocher C, Peyrol S, Grenier G, Jacob M-P and Braye F. Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent. J Invest Dermatol 2000; 114:365-70.
- Kieny HK and Mauger A. Immunofluorescence localisation of extracellular matrix components during muscle morphogenesis. J Exp Zool 1984; 232:327-41.
- Diegelmann R and Peterkofsky B. Collagen biosyntheses during connective development in chick embryo. Develop Biol 1972; 28:443-53.
- Boelsma E, Gibbs S, Faller C and Ponec M. Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. Acta Derm Venereol 2000; 80:82-8.
- Vičanová J, Mommaas AM, Mulder AA, Koerten HK and Ponec M. Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. Cell Tissue Res 1996; 286:115-22.
- Harding CR, Watkinson A and Rawlings AV. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. Int J Cosmet Sci 2000; 22:21-52.
- Hori I, Nakayama Y, Obata M and Tagami H. Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. Br J Dermatol 1889; 121:587-92.
- Seguchi T, Chang-Yi C, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K and Tezuka. Decreased expression of filagrin in atopic skin. Arch Dermatol Res 1996; 288:442-6.
- Fedi AM, Leoncini P, Farella V and Lotti T. Study of filagrin in psoriasis. G Ital Dermatol Venereol 1989; 124:141-5.
- Jacobson TM, Yüksel KU, Geestin JC, Gordon JS, Lane AT and Gracy RW. Effects of aging and xerosis on the amino acid composition of human skin. J Invest Dermatol 1990; 95:296-300.
- Bornstein P and Sage H. Structurally distinct collagen types. Ann Rev Biochem 1980; 49:957.
- Shuster S, Black MM and McVitie E. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. Br J Dermatol 1975; 93:639-43.
- West MD, Pereira-Smith O and Smith JR. Replicative senescence of human skin fibroblast correlates with a loss of regulation and over expression of collagenase activity. Exp Cell Res 1989; 184:138-47.
- Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. Yale J Biol Med 1985; 58:553-9.
- Jutley JK, Wood EJ and Cunliffe WJ. Influence of retionic acid and TGF-beta on dermal fibroblast proliferation and collagen production in monolayer cultures and dermal equivalents. Matrix 1993; 13:235-41.
- Schwartz E, Cruickshank FA, Mezick JA and Kligman LH. Topical all-trans retinoic acid stimulates collagen synthesis in vivo. J Invest Dermatol 1991; 96:975-8.

*A part of the paper was presented at the 21st IFSCC Congress, 11-14 September 2000, in Berlin, Germany

*Orijinal İngilizce şekli Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.

Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.