

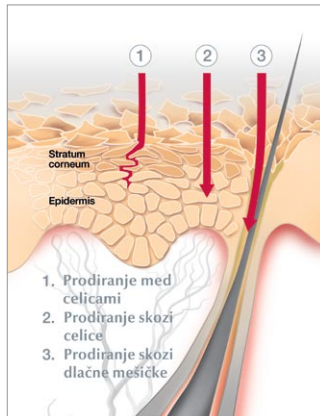
Losjoni, ki okrepijo bariero kože pred prodiranjem alergenov cvetnega prahu v dlačne mešičke

J. Lademann¹, H. Richter¹, S. Schanzer¹, A. Patzelt¹, W. Sterry¹, A. Filbry², K. Bohnsack², F. Rippke², M. Meinke¹

¹Oddelek za dermatologijo in alergije, Charite – univerzitetna klinika, Berlin, Nemčija | ²Beiersdorf AG, Hamburg, Nemčija

Uvod

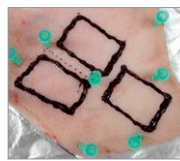
Možne poti prodiranja v kožo



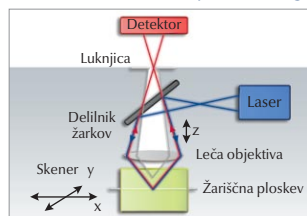
1. Prodiranje med celicami
2. Prodiranje skozi celice
3. Prodiranje skozi dlačne mešičke

Ozadje: Poznavanje poti prodiranja topično nanešenih snovi ali nevarnih snovi iz okolja je pomembno za stimulacijo ali preprečevanje prodiranja snovi skozi bariero naše kože. V preteklosti je veljalo, da je medcelična pot znotraj lipidnih

plasti okrog korneocitov edina pot prodiranja topično nanešenih snovi. Nedavno pa je bilo ugotovljeno, da tudi dlačni mešički predstavljajo učinkovito in hitro pot prodiranja skozi bariero kože [1]. Dlačni mešički so posebej zanimivi za prenos topično nanešenih aktivnih snovi in za strategije zaščite. V njih se nahajajo matične celice in dendritične celice. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da rezervoar dlačnih mešičkov



Slika 2: Ocena predela svinjskega uhlja z nanešenim testnim izdelkom, obkroženega z barvo za steklo



Slika 3: Princip delovanja konfokalne mikroskopije

lahko primerjamo z rezervoarjem porožene plasti (stratum corneum – SC) na več delih telesa. Snovi, ki prodrejo v dlačne mešičke, se v njih zadržijo do desetkrat dlje kot v poroženi plasti. Zato je mogoče pričakovati, da imajo dlačni mešički pomembno vlogo pri razvoju alergij.

Cilji: V tej študiji smo raziskovali zaščitne lastnosti losjonov, ki okrepijo bariero kože, še posebej v povezavi z dlačnimi mešički. Prodiranje alergenov na predelih, kjer so bili predhodno uporabljeni losjoni, smo primerjali s prodiranjem alergenov na koži, kjer ni bil uporabljen noben izdelek.

Material in metode

Priprava alergenov cvetnega prahu, označenih s FITC: Alergene cvetnega prahu smo označili s fluorescentnim barvilom, kar podrobno opisuje Jacobi in drugi. Ampule z izvlečkom cvetnega prahu trav smo raztopili v 1 ml raztopine fosfatnega pufra. Raztopini izvlečka cvetnega prahu je bil dodan fluorescein-izotiocianat FITC [2]. Mešanico

smo dve uri hranili v temi pri 4 °C. Prečiščenje proteinov cvetnega prahu, označenih s FITC, je bilo izvedeno z membransko dializo. S FITC označenim proteinom in dializatu smo dodali prebitek L-alanil-L-glutamina, da bi inaktivirali nevezan FITC. Obe raztopini smo dve uri hranili pri 4 °C.

Losjoni, ki okrepijo bariero: uporabljeni so bili izdelki znamke Eucerin (Beiersdorf AG, Hamburg, Nemčija): pH5 losjon in pH5 losjon F.

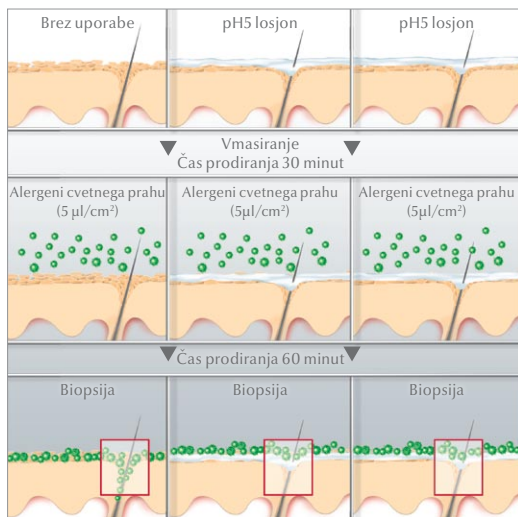
Vzorci tkiva in priprava kože: Eksperimente smo izvedli na 4 uhljih sveže zaklanih domačih svinj, ki so primeren model za človeško kožo [3]. Svinjski uhlji so bili očiščeni z mrzlo vodo in osušeni s papirnatimi brisačami. Za namene študije smo na vsakem uhlju označili tri predele kože v velikosti 3 x 2 cm² (slika 1).

Histološki vzorec: S treh predelov kože na vsakem uhlju smo z biopsijo odvzeli vzorce v velikosti 0,5 x 0,5 cm². Z dermatomom smo dobili histološke vzorce debeline 10 μm. Jemanje vzorcev je potekalo vertikalno od desne proti levi, da bi se izognili kontaminaciji označenih alergenov s površin.

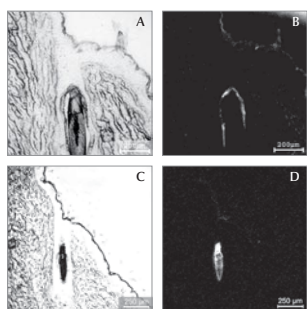
Laserska mikroskopija: Dobljene histološke vzorce smo analizirali z lasersko mikroskopijo tako v transmisijem kot fluorescentnem načinu (slika 4 in 5). Za indukcijo fluorescence je bila uporabljena valovna dolžina 488 nm [4]. Globino prodiranja alergenov cvetnega prahu smo določili s programom laserskega mikroskopa za merjenje razdalj (slika 8). Skupno smo pregledali 70 dlačnih mešičkov na predelu, kjer ni bil uporabljen noben izdelek, 91 mešičkov na predelu pH5 losjona in 69 na predelu pH5 losjona F.

Rezultati

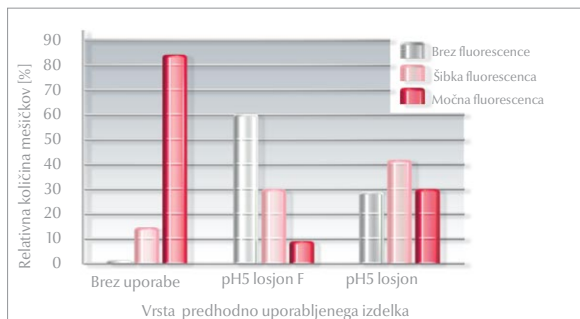
Na predelu kože, kjer ni bil uporabljen noben izdelek, je 98 % dlačnih mešičkov vsebovalo alergene cvetnega prahu. V primeru predhodne uporabe pH5 losjona F je le 30 % dlačnih mešičkov kazalo znake fluorescence, medtem ko je predhodna uporaba pH5 losjona zmanjšala število dlačnih mešičkov s fluorescentnimi lastnostmi na 70 % (slika 6). 60 % znakov fluorescence, zaznanih po predhodni uporabi pH5 losjona F, je bilo zelo šibkih, kar pomeni, da ta losjon zagotavlja močno zaščito pred prodiranjem alergenov cvetnega prahu v dlačne mešičke (slika 5).



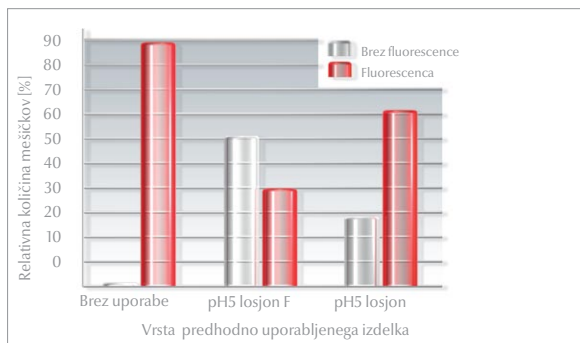
Slika 2: Postopek priprave vzorca: predhodna uporaba izdelka (2 mg losjona/cm²), uporaba alergenov cvetnega prahu in biopsija.



Slika 4: Določanje fluorescence v dlačnih mešičkih: prikazana sta prodiranje (sliki A in C) in fluorescentna podoba (sliki B in D) histološkega vzorca, kjer so dlačni mešički. Histološki vzorec je bil pridobljen z biopsijo, odvzet s kože svinjskega uhlja, na kateri so bili uporabljeni pH5 losjon in alergeni cvetnega prahu (sliki A in B) oz. samo alergeni cvetnega prahu (sliki C in D). Slika B prikazuje šibko fluorescenco, slika D pa močno fluorescenco.



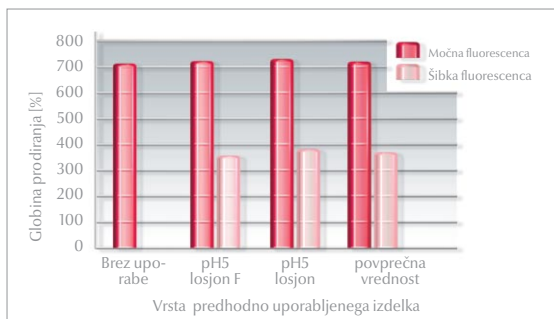
Slika 5: Relativna količina mešičkov z močno, šibko in brez fluorescence alergenov cvetnega prahu za različne predhodno uporabljene izdelke.



Slika 6: Relativna količina mešičkov z ali brez fluorescence alergenov cvetnega prahu za različne predhodno uporabljene izdelke.



Slika 8: Prikaz določitve globine prodiranja z uporabo programa laserskega mikroskopa.



Slika 7: Globina prodiranja alergenov cvetnega prahu z močno in šibko fluorescenco na mešičkih, kjer je bil in kjer ni bil predhodno uporabljen izdelek, v primerjavi s povprečno vrednostjo vseh treh skupin.

Tudi v primeru predhodne uporabe pH5 losjona je bila večina znakov fluorescence iz dlačnih mešičkov šibka. Šibke fluorescentne lastnosti so se vedno ujemale z manjšo globino prodiranja (slika 7).

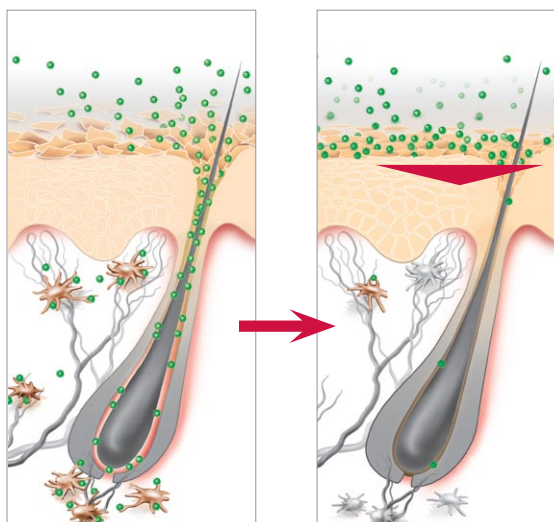
Razprava in sklep

Rezultati pH5 losjona F so boljši od rezultatov pH5 losjona. Zdi se, da je vzrok v različnih formulacijah obeh izdelkov. pH5 losjon F (emulzija vode v olju) vsebuje večjo količino lipidov v primerjavi s pH5 losjonom (emulzija olje v vodi). Poleg tega lahko vpliva na večjo učinkovitost pri zapiranju dlačnih mešičkov tudi dolžina verige v uporabljenih lipidih v pH5 losjonu F.

Če povzamemo, je študija dokazala, da uporaba komercialnih izdelkov Eucerin pH5 losjona in pH5 losjona F na koži pomembno zmanjša prodiranje alergenov cvetnega prahu v dlačne mešičke.

	Število pregledanih mešičkov	Brez fluorescenco	Šibka fluorescenco	Močna fluorescenco
Brez uporabe				
Absolutne vrednosti	70	1	10	59
Relativna količina [%]		2	14	84
pH5 losjon F				
Absolutne vrednosti	69	24	21	6
Relativna količina [%]		61	30	9
pH5 losjon				
Absolutne vrednosti	91	26	38	27
Relativna količina [%]		29	42	29

Tabela 1: Absolutne in relativne vrednosti mešičkov s šibko, močno in brez fluorescenco alergenov cvetnega prahu za različne predhodno uporabljene izdelke



Slika 9: Način prodiranja alergenov cvetnega prahu z ali brez predhodne uporabe izdelkov Eucerin pH5 losjona ali pH5 losjona F na koži. Oba losjona pomembno zmanjšata prodiranje alergenov cvetnega prahu v kožo.

Viri:

- [1] Lademann J et al., Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2001, 14 Suppl 1: 17-22
- [2] Jacobi U et al., Skin Pharmacol Physiol 2007, 20: 297-304
- [3] Jacobi U et al., Skin Res Technol 2007, 13: 19-24
- [4] Meyer L et al., Laser Physics 2006, 16 (5): 758-764