

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA HRIBERNIK
DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA HRIBERNIK

***IN VITRO* VREDNOTENJE VPLIVA BARV ZA LASE NA TRANSEPIDERMALNO
IZGUBO VODE**

***IN VITRO* EVALUATION OF HAIR DYES AND THEIR INFLUENCE ON
TRANSEPIDERMAL WATER LOSS**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko tehnologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorstvom asist. dr. Mirjam Gosenca.

Zahvala

Rada bi se zahvalila mentorici, prof. dr. Mirjani Gašperlin, za strokovne nasvete in pomoč ter možnost opravljanja diplomskega dela pod njenim mentorstvom.

Zahvaljujem se tudi somentorici, asist. dr. Mirjam Gosenca, za usmerjanje, nasvete in spodbudne besede pri pisanju diplomskega dela ter za pomoč pri delu v laboratoriju.

Prav tako hvala strokovni sodelavki, Maji Bjelošević, mag. ind. farm., za pomoč v laboratoriju in pozitivno energijo.

Hvala moji družini za moralno podporo in spodbudo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.

Špela Hribernik

Vsebina

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1. Barve za lase.....	4
1.1.1. Rastlinske barve.....	5
1.1.2. Začasne barve	7
1.1.3. Poltrajne barve	8
1.1.4. Trajne (obstoje) barve	8
1.2. Iritacija.....	10
1.2.1. Vrednotenje iritacije	12
1.3. Alergijske reakcije	14
1.3.1. Možnosti nastanka alergijske reakcije.....	14
1.3.2. Alergijski kontaktni dermatitis	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1. Materiali	17
3.1.1. Barve za lase in barvna razvijalca	17
3.1.2. Reagenti in topila.....	17
3.1.3. Aparature.....	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Priprava kože	18
3.2.2. Priprava receptorskega medija.....	18
3.2.3. Sestava Franzove celice	18
3.2.4. Priprava vzorcev	19

3.2.5. Izvedba meritev transepidermalne izgube vode	20
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
4. 1. Preliminarno testiranje.....	23
4. 2. Vrednotenje barv za lase	26
4.2.1. Barvna krema SP Unique	27
4.2.2. Barvna krema SP Echoes brez amoniaka.....	34
5 ZAKLJUČEK.....	38
6 LITERATURA.....	39

POVZETEK

Barve za lase so priljubljen kozmetični izdelek med uporabniki vseh starostnih skupin, saj omogočajo spremembo naravne barve, zakrivanje sivih las in popestritev trenutnega videza. Najpogosteje se uporabljajo oksidativne barve za lase, saj dajejo najobstojnejšo barvo, z njimi pa lahko lase tudi posvetlimo. Sestavljene so iz primarnega intermediata in barvnega modifikatorja, ki z oksidacijo ob združitvi z razvijalcem pod alkalnimi pogoji tvorita določen odtenek barve znotraj lasu. Poleg pozitivnih učinkov so ob njihovi uporabi možni tudi številni neželeni učinki, kot sta draženje lasišča in alergijske reakcije.

V okviru diplomskega dela smo vrednotili, kakšno je draženje kože ob uporabi barv za lase in kako se razlikuje znotraj različnih formulacij barvnih krem in razvijalcev. Draženje kože smo vrednotili posredno z merjenjem razlik v transepidermalni izgubi vode (TEWL) pred in po nanosu barve za lase. V kolikor snov draži kožo, se to odraža v višjih vrednostih TEWL, ki je merilo za oceno barijerne funkcije kože. Vrednotenje draženja kože smo izvedli posredno z meritvami TEWL (z uporabo Tewametra[®] TM 300) *in vitro* na modelu prašičje kože, vpete v statične Franzove celice. Uporabili smo štiri barvne kreme in štiri razvijalce v različnih kombinacijah.

V okviru preliminarne testiranja smo določili, da je optimalen čas za temperiranje kože eno uro pred meritvijo bazalne vrednosti, spremembo TEWL po nanosu barve pa smo izmerili eno uro po odstranitvi barve za lase. Slednje smo pustili delovati maksimalen čas, kot ga določa proizvajalec. Če je razlika med končno in bazalno vrednostjo večja ali enaka 6 g/h/m^2 , test na prašičjem ušesu opredeli testirano snov kot dražečo. Na podlagi tega smo ugotovili, da vse testirane barve za lase dražijo kožo, opazili smo tudi rdečico. Na draženje kože vpliva formulacija barvne kreme in razvijalca. Metoda je zanesljiva, kar smo potrdili tudi s testiranjem prvih kombinacij znotraj različnih dni.

Ključne besede: draženje kože, barve za lase, transepidermalna izguba vode, Franzova celica

ABSTRACT

Hair dyes are cosmetic products that are popular among people of all ages due to their ability of changing the natural color, concealing grey hair or simply intensifying the current look. The most used ones are oxidative hair dyes because they are persistent and can provide lighter shades too. They consist of primary intermediates and color modifiers which oxidize when combined with a developer under alkaline conditions and make a certain shade of hair dye within the hair fibre. When used severe side effects can happen, for example skin irritation or allergic reactions.

The aim of our work was to evaluate the amount of irritation when using hair dyes combined with different coloured creams and developers. The evaluation of irritation was measured as a difference in transepidermal water loss (TEWL) before and after the application of hair dye. Skin irritation causes higher values of TEWL which was measured using Tewameter[®]TM 300. TEWL measurements are used to evaluate skin barrier function. The evaluation was performed *in vitro*, using pig ear skin on a static diffusion Franz cell. Four different coloured creams and 4 developers in various combinations were tested. Optimal time points for TEWL measurements were defined In preliminary tests, i.e. skin samples had to be tempered for one hour for basal values measurements, while final TEWL was measured one hour after the removal of hair dye.

According to the pig ear test, if the material causes increase of TEWL values equal or greater than 6 g/h/m^2 , it is classified as an irritant. All of tested hair dyes caused skin irritation and redness. Formulation of both coloured cream and developer has an influence on skin irritation. The method confirmed interday reliability.

Key words: skin irritation, hair dyes, transepidermal water loss, Franz cell

SEZNAM OKRAJŠAV

PPD	<i>p</i> -fenilenamin
TDA	toluen-2,5-diamin
SP	Subrina Professional
TEWL	transepidermalna izguba vode
RV	relativna vlažnost
T	temperatura
SD	standardna deviacija

1 UVOD

Pričeska in barva las predstavljata pomemben del našega celotnega izgleda. S kombinacijo dolžine, gostote, oblike in barvnega odtenka las lahko prilagajamo videz, s katerim se predstavljamo zunanjemu svetu pri vsakodnevnih izzivih. Razvoj tehnologije je poskrbel, da je na tržišču na voljo cela paleta različnih barv, njihovih odtenkov, znamk in načinov za barvanje las, poleg tega pa je le-to postalo enostavno in cenovno dostopno. V koraku s tehnologijo se je razvijala tudi miselnost ljudi. Včasih je barva las pomenila določen kulturni in socialni status, tudi posnemanje ljudi iz višjih razredov, kasneje pa so se barve uporabljale predvsem za prekrivanje sivih las. Tudi razvoj elektronike oz. barvne televizije je imel močan vpliv na uporabo barv, saj so nastopajoči z ekranov kar naenkrat dobili čisto drugačno podobo. Barve za lase so tako sčasoma dobivale nov pomen. V 21. stoletju tako služijo za popestritev trenutne barve las ali pa za izpolnitev želje po spremembi videza. Mnogi uporabljajo barvo las že kot modni dodatek, izražajo svoja stališča ali pa pripadnost subkulturi.

1.1. Barve za lase

Barve za lase so kozmetični izdelek, ki se ga nanaša na lase z namenom spreminjanja njihovega videza. Služijo za popestritev naravnega odtenka las, zakrivanje prvih znakov sivenja, spremembo videza. Razvrstimo jih glede na njihovo zmožnost prodiranja v lasno vlakno oz. njihovo obstojnost:

- neoksidativne
 - rastlinske,
 - začasne,
 - poltrajne (polobstojne)
- oksidativne
 - delno obstojne,
 - trajno obstojne barve za lase (1).

1.1.1. Rastlinske barve

Začetki uporabe barv za lase segajo v starodavni Egipt, v čas faraonov. V želji po spremembi barve las so se zatekli k naravi in začeli uporabljati številne kovine in rastlinske izvlečke, ki jih poznamo še danes. Ženskam so služili za barvanje las, nohtov in podplatov, moškim pa za barvanje brad. Najpogosteje so uporabljali kano v kombinaciji z indigom. Podobne metode uporabe naravnih barvil so se razvile tudi drugod po svetu. Tako so Rimljani uporabljali svinčev(II) acetat, bakrov(II) acetat, orehove olupke in črni bezeg (*Sambucus nigra*). Kasneje, v 17. stoletju, ko so se ženske navduševale nad pudri, so jih rade aplicirale tudi na lase. Uporabljale so takšne iz vijolic (*Viola odorata*), perunik (*Iris sp.*) in lišajev, npr. hrastovega lišaja (*Evernia prunastri*), pogost je bil tudi škrob (2, 3).

Dandanes se izmed rastlinskih barv še vedno največ uporablja kana, poznamo pa tudi rumeno barvilo iz kamilice (*Matricaria chamomilla*), rjavovijolični hematein iz lesa višnjeve pražilke (*Haematoxylum campechianum*) in živordeči brazilein iz barvitenga brazilskega lesa drevesa pernambuk (*Caesalpinia echinata*). Ta barvila omogočajo le ozek nabor barv, njihova obstojnost pa je odvisna od izdelka. V preglednici 1 so navedene najpogosteje uporabljene rastlinske barve za lase (2, 3).

- Kana

Kana (*Lawsonia inermis*) je grm, ki uspeva pretežno v Indiji, Tuniziji in Iranu. Beli cvetovi imajo močan vonj, zato se uporabljajo za izdelavo dišav, medtem ko glavno surovino za znano barvilo predstavljajo posušeni listi. Te nato zdrobijo, rezultat pa je svetlo zelen prah, ki ga morajo pred uporabo zmešati z vročo vodo. Nastane pasta, ki jo nanesejo na lase (3). Kana se različno odziva glede na predhodno barvo las, čeprav njena aktivna komponenta, 2-hidroksi-4-naftokinon (CI 75480), v osnovi daje rdeče-oranžno barvo. Na temnejših laseh tako pušča rdečkasto-rjavo barvo, na svetlejših oranžno, v kombinaciji z indigo barvilom pa daje temno rjav odtenek. Uporabljena je predvsem v arabskem svetu, kjer jo ženske uporabljajo za barvanje las, oblačil in nohtov, najbolj pa za tradicionalno, dekorativno poslikavo dlani in stopal (3). Čeprav ponekod kana predstavlja rutinsko uporabo, pri majhnem deležu uporabnikov ob stiku s praškom ali barvo izzove alergijski kontaktni dermatitis (4).

- Kamilica

Prava kamilica (*Matricaria chamomilla*) je tradicionalna zdravilna rastlina, ki uspeva po celem svetu. Uporablja se v številnih farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih, saj ima številne blagodejne učinke: protivnetno, protimikrobno in antioksidativno delovanje. Glavna surovina za izdelavo barve za lase so cvetovi, ki vsebujejo rumeno barvilo 4',5,7-trihidroksiflavon (CI Natural Yellow 1). Uporabljamo jo lahko kot pasto ali dekoka iz cvetov. Po nanosu posvetli barvo las (3).

- Indigo

Indigo je temno modro barvilo (CI 7300), ki ga pridobivajo iz različnih rastlin ali pa sintezno. Pogosto uporabljen rastlinski vir predstavljajo indigovec (*Indigofera tinctoria*), silina (*Isatis tinctoria*) in japonski indigovec (*Persicaria tinctoria*). Slednji vsebuje β -indoksil-D-glukozid, pri katerem ob prisotnosti encima β -glukozidaze ali nizke vrednosti pH poteka hidroliza. Zaradi prisotnosti atmosferskega kisika nastali indoksil oksidira, indigo pa je posledica nadaljnje spontane reakcije dimerizacije. Nastali produkt je pigment, saj se v vodi ne topi dobro. Z redukcijo nastane druga spojina – beli indigo, ki je bolje topen v vodi in se lažje uporablja kot barvilo. Ob izpostavitvi kisiku beli indigo z lahkoto pretvorimo nazaj v indigo z oksidacijo.

Zaradi množične uporabe tega barvila v tekstilni industriji ga danes pridobivajo predvsem po sintezni poti. Obstajata dva postopka, ki sta poimenovana po obeh izumiteljih, Karlu Heumannu in Johannesu Pflegerju (3, 5).

Preglednica I: Predstavniki rastlinskih barv za lase.

Rastlina	Latinsko ime	Barvilo	IUPAC ime	Kemijska skupina	CI	Barva
kana	<i>Lawsonia inermis</i>	lavson	2-hidroksi-4-naftokinon	naftokinon	75480	rdeče-oranžna
kamilica	<i>Matricaria chamomilla</i>	apigenin	4'5,7-trihidroksiflavon	flavonoid	Natural Yellow 1	rumena
indigo	<i>Indigofera tinctoria</i>	indikan	β -indoksil-D-glukozid	glikozid	7300	temno modra
višnjeva pražiljka	<i>Haematoxylum campechianum</i>	hematein	3,4,6a,10-tetrahidroksi-6,7-dihidroindeno[2,1-c]kromen-9-on	dihidropiran		rjavo-vijolična
pernambuk	<i>Caesalpinia echinata</i>	brazilein	6a,9,10-trihidroksi-6,7-dihidroindeno[2,1-c]kromen-3-on	dihidropiran		živordeča

1.1.2. Začasne barve

Začasne barve za lase se obdržijo na laseh le kratek čas. Zaradi visoke molekulske mase in zelo nizke afinitete do las ne morejo prodreti v lasno skorjo, zato se s šibkimi van der Waalsovimi silami pritrdijo na lasno kutikulo. Njihov učinek tako traja do naslednjega pranja las, ko se barva z lahkoto spere. Izjemoma se lahko barva na laseh zadrži dlje, če so poškodovani, saj zaide globlje v lasno vlakno. Z njimi ni mogoče v celoti zakriti sivih las ali jih posvetliti, zato so namenjene predvsem ljudem, ki želijo poizkusiti določen odtenek, povrniti zbledelo naravno barvo las ali pa zgolj popestriti svoj videz. Najbolj se uporabljajo v obliki šampona in aerosola, na voljo pa so tudi v drugih oblikah. Tipični predstavniki začasnih barv so nekatera azo barvila, trifenilmetanska barvila, indamini in indofenoli (2, 3, 6).

1.1.3. Poltrajne barve

Poltrajne ali polobstojne barve se na laseh zadržijo dlje kot začasne. Nizka molekulska masa jim omogoča prodiranje v zunanjo plast lasne kutikule. Uporabljamo jih direktno na laseh – ne potrebujejo predhodne priprave oz. razvoja barve. Namenjene so dodajanju podtona naravni barvi las ali pa ohranjanju naravne barve. Z njimi ravno tako ne moremo posvetliti las. Nanešena barva z vsakim pranjem las blede, popolnoma pa se odstrani po 6–8 pranjih. Proces pranja las namreč odpre celice kutikule in povzroči, da se vodotopna barva izloči. Barvila, ki se uporabljajo pri tej vrsti barv za lase, so nitro barvila (derivati aromatskih aminov, aminofenolov in fenolov), ki z reakcijami substitucij ponujajo celo paleto najrazličnejših barvnih tonov (2, 3, 6).

1.1.4. Trajne (obstojne) barve

Trajne barve za lase so najbolj priljubljene in najpogostejše uporabljene, saj omogočajo posvetlitev naravne barve in popolno prekrivnost sivih las, ponujajo pa tudi največji nabor barvnih odtenkov. Sestavljajo jih aromatski diamini, aminofenoli in naftofenoli. Od ostalih vrst se razlikujejo po tem, da vsebujejo dve ločeni sredstvi.

- Prva komponenta

Prva komponenta je v kremni ali tekoči obliki in poleg pomožnih snovi vsebuje brezbarvno predstopnjo, imenovano primarni intermediat, vezalne komponente oz. barvne modifikatorje in alkalno snov. Primarni intermediiati so predstavniki aromatskih diaminov, diaminofenolov in *orto*- ali *para*-aminofenolov. Najpogostejši predstavniki so: *p*-fenilendiamin (PPD), *p*-aminofenol, toluen-2,5-diamin (TDA) in 4-amino-2-hidroksitoluen. Barvni modifikatorji so *meta*-diamini, *meta*-aminofenoli in polifenoli, npr. *m*-aminofenol, resorcinol, 1-naftol. V kombinaciji z oksidirano obliko primarnega intermediiata dajejo značilno barvo. Ta je odvisna od vrste obeh snovi, različne kombinacije pa ustvarijo veliko število različnih barvnih tonov in njihovih odtenkov. Alkalna snov je najpogostejše amoniak, uporabljata pa se tudi etanolamin in aminometilpropanol. Uporablja se za uravnavanje pH vrednosti med 9 in 10 (6, 7).

- Druga komponenta

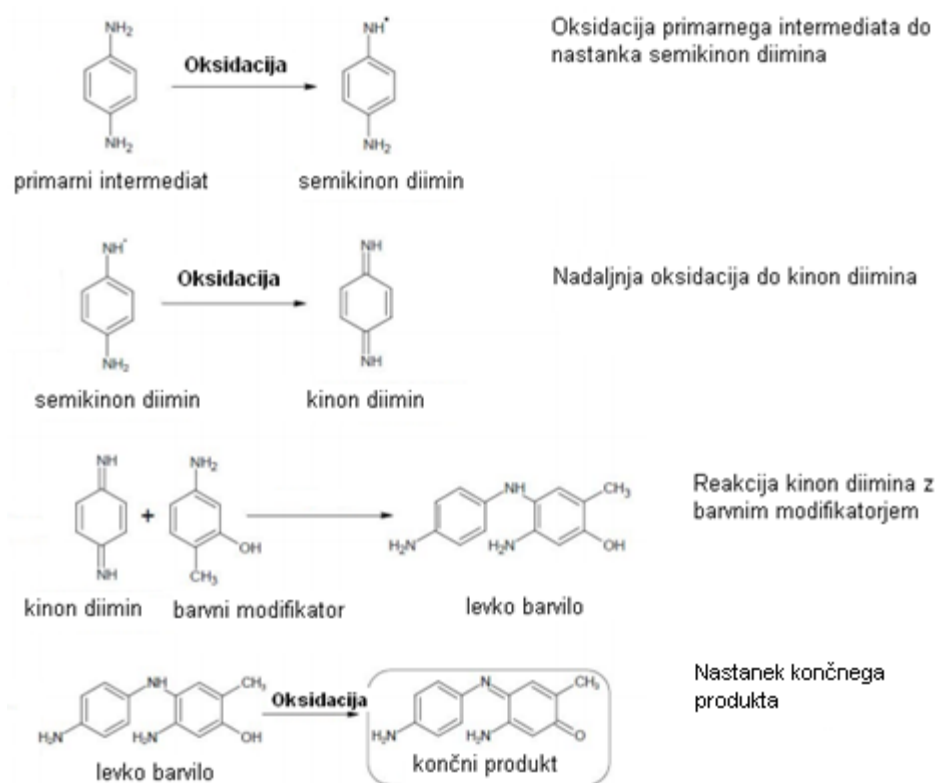
Druga komponenta je razvijalec, ki je v tekoči obliki in vsebuje oksidacijsko sredstvo. Najpogostejše je to raztopina vodikovega peroksida (H_2O_2), uporablja pa se tudi urea peroksid. Glede na koncentracijo vodikovega peroksida ločimo delno obstojne barve za lase, kjer koncentracija H_2O_2 ni višja od 2 %, in trajno obstojne s koncentracijo do 6 %.

- Nastanek barve

Proces barvanja las s temi izdelki poteka tako, da združimo obe komponenti, ju dobro premešamo in nato takoj nanesemo na lase. Alkalen pH izdelka povzroči nabrekanje lasnega vlakna in omogoča, da majhne molekule primarnega intermedijata in barvnega modifikatorja prodrejo skozi kutikulo v lasno skorjo. Barva nastane znotraj lasu. Primarni intermedijati ob prisotnosti vodikovega peroksida oksidirajo do zelo reaktivnih *p*-benzokinon iminov, ki nato reagirajo z barvnimi modifikatorji. Nastali produkt na koncu še oksidira in tvori levko indo-barvilo v obliki polimera. Ta je zaradi svoje velikosti ujet v lasni skorji in ne more difundirati navzven, zato teh barv ne moremo odstraniti s pranjem las. Njihov ponovni nanos je tako odvisen le od hitrosti rasti las. Potek nastanka barve je grafično prikazan na sliki 1 (6, 7).

Poznamo tudi drugačne mehanizme nastanka barve. Nastali oksidirani produkti primarnih intermediatov (*p*-benzokinon imini) lahko namesto z barvnim modifikatorjem reagirajo s svojo neoksidirano obliko, saj so primarni intermedijati vedno prisotni v presežku. Takšna reakcija ponuja le omejeno število barvnih tonov. Sočasno z nastajanjem barve pa poteka tudi oksidativna razgradnja melanina. Pri tem se melaninska zrnca razgradijo in uničijo, kar omogoča lasu prevzem novonastale barve (7).

Oksidativne barve za lase lahko zaradi mehanizma delovanja, vsebovanih sestavin in pogostosti nanašanja povzročajo razne neželene učinke. Barvane lase je potrebno še posebej negovati z regeneratorji (kvaterne amonijeve spojine), saj se z njihovo uporabo odstranjuje lipofilna 18-metileikozanojska kislina, ki služi kot lasna zaščita in barjera. Poleg tega takšne barve vsebujejo precej snovi, ki so znani iritanti ali alergeni in povzročajo alergijski kontaktni dermatitis (1, 4, 7, 8, 9).



Slika 1: Proces razvoja barve pri oksidativnih barvah za lase (6).

1.2. Iritacija

PPD, TDA, vodikov peroksid in amoniak so snovi, uporabljene v oksidativnih barvah za lase, ki najpogosteje povzročajo neželene učinke na koži, kot sta draženje (iritacija) in vnetje (1). Glede na Aneks k smernicam Organizacije za gospodarsko sodelovanje in razvoj (Annex to the OECD Guideline for the Testing of Chemicals) za testiranje substanc je iritacija *"reverzibilna poškodba kože, ki se pojavi po nanosu testirane substance v času do štirih ur"* (10). Čeprav se tovrstni izdelki uporabljajo na laseh, pridejo v kontakt tudi z lasiščem oz. kožo, ko se jih nanese na korenino las, pri tem pa lahko povzročajo vnetje, sklenjenje, srbenje in pekoč občutek. Za zagotavljanje čim boljšega občutka uporabnikov je pomembno, da te izdelke ovrednotimo čim bolj natančno in uporabnika opozorimo na morebitno iritacijo (10, 11). Dovoljeno koncentracijo in določene omejitve teh spojin določa Priloga III Uredbe (ES) št. 1223/2009 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (v nadaljevanju Uredba 1223/2009), ki vsebuje *"seznam snovi, ki jih ne smejo vsebovati kozmetični izdelki, razen tistih, za katere veljajo omejitve"* (12).

Te omejitve so bile še dodatno dopolnjene v Uredbi komisije (EU) št. 1197/2013 z dne 25. novembra 2013 o spremembi Priloge III k Uredbi 1223/2009. Glede na prisotnost določene snovi, mora proizvajalec na embalažo natisniti ustrezno besedilo. Na sliki 2 je predstavljeno besedilo pogojev in uporabe za PPD (13), v preglednici II pa so navedeni predstavniki posameznih skupin barv za lase z omejitvami (12–14).

Na etiketo natisnite:
mešalno razmerje.
„Samo za poklicno uporabo.“
 Ta izdelek lahko povzroči resne
alergijske reakcije.
Preberite in upoštevajte navodila.
Ta izdelek ni namenjen za uporabo na
osebah, mlajših od 16 let.
Začasni tatu s črno kano lahko poveča
tveganje za alergije.
Trepalnic se ne sme barvati, če:
— ima potrošnik izpuščaj na obrazu
ali občutljivo, razdraženo in
poškodovano lasišče,
— je potrošnik kadar koli po barvanju
las ali trepalnic že imel reakcijo,
— je potrošnik v preteklosti imel
reakcijo na začasni tatu s črno
kano.
Če pride izdelek v stik z očmi, jih takoj
izperite.
Vsebuje fenilendiamine.
Uporabljajte ustrezne rokavice.* *

Slika 2: Besedilo pogojev in uporabe PPD (12).

Preglednica II: Predstavniki barv za lase po skupinah z omejitvami.

Spojina (INCI)	Skupina	Uporaba	Max. koncentracija	Besedilo pogojev in uporabe		
				Mešalno razmerje	Vsebnost	Alergije
Acid Red 92	ksanten	začasne barve za lase	0,4%	/	/	/
HC Red No. 3	nitro anilin	poltrajne barve za lase	3,0%	/	/	DA
resorcinol	fenol	trajne barve za lase	1,25%	DA	DA	DA
vodikov peroksid	organska snov	trajne barve za lase	12%	/	DA	/
amoniak	anorganska snov	trajne barve za lase	6%	/	DA	/

1.2.1. Vrednotenje iritacije

Od leta 1944 dalje je Draizov test na albinu kuncih predstavljal standardni test za vrednotenje draženja kože (15). Uredba 1223/2009 je z 18. členom prepovedala *izvajanje testiranja sestavin, kombinacij sestavin ali končnih kozmetičnih izdelkov na živalih znotraj Skupnosti, prav tako pa dajanje na trg kozmetičnih izdelkov, pri katerih se je končna formulacija, sestavine ali kombinacija sestavin testirala na živalih z metodo, ki ni alternativna metoda, potem, ko je le-ta že bila znanstveno potrjena in sprejeta* (12). Zato se razvija in uporablja vedno več *in vitro* alternativnih metod, ki lahko v celoti nadomestijo testiranja na živalih.

1.2.1.1. Rekonstruirani kožni modeli

Evropski center za validacijo alternativnih metod (The European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) je po večletnih raziskavah validiral več alternativnih *in vitro* metod, ki temeljijo na 3D-rekonstruiranih kožnih modelih in dajejo objektivne rezultate (15). Te sestavljajo izolirani keratinociti, ki jih po stiku z rastnim medijem izpostavimo zraku, da se razvije še rožena plast. Njihova zgradba torej v celoti posnema človeško kožo. V uporabi so EpiSkin™, Modified EpiDerm in SkinEthic™ RHE. Poleg iritacije lahko z njimi testiramo tudi fototoksičnost, korozivnost in dermalno absorpcijo. Vsem rekonstruiranim kožnim modelom je skupno, da se snov oceni kot iritant oz. dražeča snov, kadar je celična viabilnost $\leq 50\%$ (15, 16). Poleg kožnih modelov se uporabljata še test na prašičjem ušesu in test integritete mišje kože (The mouse skin integrity function test, SIFT) (17).

- EpiSkin™

EpiSkin™ model je metoda, ki lahko v celoti nadomesti Draizov test na živalih, saj omogoča razlikovanje med dražečimi in nedražečimi snovmi (15). Pri tem na model nanesemo testirano snov, nato pa merimo sproščanje vnetnega citokina IL-1 α ali pa uporabimo test citotoksičnosti MTT. Ta deluje tako, da molekula barvila MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) prodre v celice, kjer se razgradi v formazan in spremeni barvo iz začetne rumene v vijolično. Razgradnja lahko poteka le v živih celicah z aktivnim metabolizmom. Na ta način določimo odstotek celične viabilnosti in s tem potencial draženja snovi (17, 18).

- Modified EpiDerm

Sprva so testirali model EpiDerm™, ki je služil za identifikacijo dražečih snovi. Temeljil je na merjenju časa, po katerem se celična viabilnost zniža za 50 % po metodi MTT Effective Time-50 (ET-50). Ker model ni mogel nadomestiti Draizovega testa, so v želji po boljšem delovanju metode razvili njeno izboljšano različico, imenovano Modified EpiDerm, ki za vrednotenje iritacije uporablja klasičen MTT-test citotoksičnosti in predstavlja ustrezno zamenjavo za Draizov test. (15, 17).

- SkinEthic™ RHE

Tudi SkinEthic za določanje iritacije uporablja MTT-test citotoksičnosti.

1.2.1.2. Klinične študije

Poleg *in vitro* metod se uporabljajo tudi študije na prostovoljcih, tako imenovani krpični testi. Testirana snov je nanešena na kožo in pokrita s krpico ali obližem, ki se odstrani po štirih urah. Po določenem času (24, 48 in 72 ur) se vrednoti spreminjanje oz. naraščanje rdečice s pomočjo številčne lestvice. Dobljeni rezultat je primerjan z rezultati s standardnim iritantom (20 % natrijev lavrilsulfat, SDS). Če je iritacija testirane snovi večja od standardne, je ta označena kot R38 – iritant (19).

Na navodilih za uporabo barv za lase je velikokrat omenjen tudi test pred nanosom izdelka. Uporabniki morajo nanesti izdelek na določen predel kože in opazovati morebitne spremembe po 48 urah. Če teh ni, naj bi bil izdelek primeren za uporabo. Ocena stanja kože je subjektivna in nestrokovna, zato je kljub pozitivnemu odzivu izdelka vseeno potrebna previdnost.

Za določitev stopnje draženja kože lahko uporabljamo tudi neinvazivne instrumentalne metode. Te temeljijo na dejstvu, da dražeče snovi poškodujejo kožno bariero, kar se kaže v spremenjenih lastnostih kože, ki jih lahko instrumentalno vrednotimo. Poleg večje izgube vode skozi kožo, se odstrani tudi zaščitni lipidni sloj na površini kože, kar dražečim snovem olajša prehod v kožo in nastanek iritacije. Merimo transepidermalno izgubo vode, hidratacijo kože, vsebnost loja in vnetje (11, 19). Poškodovana bariera zaradi nanosa

dražeče snovi prepušča večjo količino vode in vsebuje manjšo količino epidermalnih lipidov. Instrumentalno vrednotenje vnetja je novejša metoda. Pri tem določamo prisotnost vnetnih citokinov s Sebutapeom, ki je prvotno namenjen vrednotenju količine in hitrosti izločanja lipidov (19).

1.3. Alergijske reakcije

Alergijske reakcije po uporabi barv za lase so posledica draženja in zmanjšane barierne funkcije kože. Alergena snov lahko tako lažje vstopi v kožo in povzroči reakcijo. Poleg oseb, ki so barvam poklicno izpostavljene, se alergijske reakcije pojavijo tudi pri ostalih uporabnikih, ko nanašajo barvo ali stopijo v stik z lasmi po delovanju izdelka. Najpogostejša alergena v barvah za lase, ki povzročata alergijski kontaktni dermatitis, sta PPD in TDA (1).

1.3.1. Možnosti nastanka alergijske reakcije

Reakcija se lahko pojavi tako pri stalnih uporabnikih barv za lase kot pri tistih, ki jo uporabijo prvič, pogost nastanek alergijskega odziva pa predstavlja tatu, narejen s črno kano. Kana sama po sebi ne povzroča tovrstnih težav, za nastanek črne barve, hitrejši nanos tatuja in daljšo obstojnost pa ji izdelovalci primešajo PPD v koncentracijah 0,4 %–29,5 %, čeprav se v barvah za lase lahko uporablja le v koncentraciji do 6 %. Uporaba takšnega tatuja pri določenih osebah povzroči hude reakcije (12, 20). PPD povzroča tudi navzkrižno alergijsko reakcijo s sebi podobno molekulo, kadar organizem ni sposoben razlikovanja med njima. Na ta način reagira s TDA in azo barvili (20,21). Zaradi tovrstnih težav s prisotnostjo PPD v izdelkih za barvanje las, se le-ta zamenjuje s *p*-toluendiamin sulfatom (PTDS) in 2-metoksimetil-*p*-fenilendiaminom (21, 22).

1.3.2. Alergijski kontaktni dermatitis

Alergijska reakcija na PPD se uvršča v tip IV oz. pozni tip preobčutljivosti. Pri tem tipu alergena snov, imenovana hapten, preide skozi poškodovano kožno bariero, kjer se poveže z določenimi proteini. Langerhansove celice, ki se nahajajo v epidermisu, prepoznajo alergen, se z njim povežejo preko MHC II molekul in potujejo do bezgavk. Medtem dozori antigen predstavljajoče dendritične celice, ki aktivirajo limfocite T. Nastanejo spominski limfociti T, ki so specifično senzibilizirani za določen antigen. Ko koža

ponovno pride v stik z alergenom, se ti specifični limfociti aktivirajo in začnejo izločati citokine. Alergijski odziv se tako pojavi ob drugem stiku z alergenom. Posledice reakcij se kažejo v srbečici, pekočem občutku in rdeči koži. Če smo alergenu izpostavljeni dlje časa, lahko pride do nastanka subakutne ali kronične oblike bolezni (1, 23).

Za preprečevanje nastanka bolezni je zelo pomembna previdnost pri uporabi barv za lase in natančno upoštevanje priloženih navodil za uporabo. Če izdelke uporabljamo dlje časa, je priporočena uporaba zaščitnih rokavic, da se izognemo stiku z iritativnimi in alergeni snovmi. Posebej moramo biti pozorni, če smo že imeli določeno alergijsko reakcijo, bili izpostavljeni alergenom oz. se tetovirali s črno kano. Stanje kože po alergijski reakciji na takšen tatu prikazuje slika 3.

Alergijsko reakcijo lahko potrdimo z izvajanjem krpičnih testov na pacientu. Na določenem predelu kože namerno sprožimo reakcijo s pomočjo obližev, ki vsebujejo testirano substanco. Po 48 urah odstranimo obliže in ovrednotimo stanje kože (1).



Slika 3: Posledica alergijske reakcije na PPD.

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučiti vpliv različnih barv za lase na draženje kože z namenom postavitve *in vitro* modela za oceno draženja kože po nanosu barv. Vrednotenje bomo izvedli posredno na modelu kože prašičjega ušesa, vpete v statično difuzijsko Franzovo celico. Pri tem bomo spremljali spremembo vrednosti transepidermalne izgube vode (TEWL), ki je merilo za oceno barijerne funkcije kože. V prvem sklopu bomo izvedli preliminarne preizkuse za določitev optimalnih časovnih točk meritev. V nadaljevanju bomo testirali osem različnih kombinacij štirih barvnih krem in štirih razvijalcev in vrednotili spremembo TEWL po nanosu posamezne kombinacije glede na bazalno vrednost. V okviru preliminarnega testiranja bomo za določene testirane kombinacije izvedli vrednotenje v različnih dnevih, z namenom da preverimo meddnevno ponovljivost metode.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

- koža prašičjega uhlja (uhlji pridobljeni decembra 2015, ustrezno shranjeni v zamrzovalniku neposredno po odvzemu)

3.1.1. Barve za lase in barvna razvijalca

- Subrina Professional (SP), barvna krema za lase Unique, odtenka dark blond-brown ash (6/71) in lightest blond-ash (10/1) (Ilirija d.d., Slovenija)
- SP, barvna krema za lase Echoes, odtenka 6/71 in 10/1 (Ilirija d.d., Slovenija)
- SP, barvni razvijalec Hydrogen cremoxyd, 6 % (Ilirija d.d., Slovenija)
- SP, barvni razvijalec Echoes, 5,5 % (Ilirija d.d., Slovenija)

3.1.2. Reagenti in topila

- prečiščena voda (pripravljena z reverzno osmozo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani)
- natrijev klorid (INCI: *sodium chloride*, Lex d.o.o., Koper)

3.1.3. Aparature

- Franzove celice (Verrerie Villeurbannaise, Francija)
- tehtnica (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija)
- vodna kopel, 6 L (Labnet International, Inc., Edison, Združene države Amerike)
- Transferpette[®]S, 100 – 1000μL (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Nemčija)
- Tewameter[®]TM 300 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)
 - Probe Heater[®]PR 100 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)
 - Ambient Condition Sensor RHT 100 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija)

3.2. Metode

3.2.1. Priprava kože

Meritve smo izvedli na koži prašičjega uhlja, le-ta je bil predhodno ustrezno shranjen v zamrzovalniku. Uporabili smo distalne dele uhlja, ki smo jih razdelili na manjše dele. Posamezne sklope meritev smo v okviru realnih možnosti namreč izvedli na istem prašičjem uhlju oz. uhljih iste živali. S tem smo skušali zmanjšati vpliv morebitnih razlik v koži različnih živali na variabilnost rezultatov. Na dan meritve smo posamezne dele uhlja odtajali na sobni temperaturi, jih po potrebi previdno očistili ter s pomočjo škarjic odstranili dlake. S skalpelom smo ločili kožo od hrustanca in odrezali štiri koščke v velikosti 2 cm x 2 cm.

3.2.2. Priprava receptorskega medija

Kot receptorski medij smo uporabili fiziološko raztopino, tj. 0,9 % raztopino natrijevega klorida. Na tehtnici (Kern&Sohn GmbH, Balingen, Nemčija) smo natančno natehtali 0,9 g natrijevega klorida ter 99,1 g prečiščene vode (pripravljene z reverzno osmozo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani) in dobro premešali.

3.2.3. Sestava Franzove celice

Franzove statične difuzijske celice predstavljajo *in vitro* sistem, ki služi za rutinsko vrednotenje dermalne absorpcije oziroma iritacije kože. Posamezna celica je sestavljena iz receptorskega dela z mestom za vzorčenje, v katerem se nahaja receptorski medij, in donorskega dela, kamor naneseemo testirano snov oz. izdelek. Med omenjena dela vpnemo ustrezno membrano, npr. živalsko kožo, ki je nameščena tako, da je dermis obrnjen v smeri receptorskega, epidermis pa v smeri donorskega dela (24).

Z mikropipeto (Transferpette[®]S, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Nemčija) smo napolnili receptorski del Franzove celice s predhodno pripravljeno receptorsko raztopino, tako da je le-ta na vrhu tvorila konveksno površino (približno 9,5 mL, odvisno od posamezne celice). Receptorski del smo zaprli z zamaškom na mestu za vzorčenje, da preprečimo izhlapevanje receptorskega medija tekom izvedbe eksperimenta. Na zgornji del receptorskega dela smo nato previdno postavili pripravljeno kožo, nanjo postavili še donorski del, tako da se je pozicijsko ujemal z receptorskim delom, in fiksirali Franzovo

celico s priloženim zapiralom. Na koncu smo s škarjicami odrezali odvečno kožo, da smo preprečili dodatno hidratacijo kože z vodo iz vodne kopeli. Sestavljena Franzova celica je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Sestavljena Franzova celica.

Ustrezno pripravljene Franzove celice smo termostatirali eno uro pred nanosom formulacij v vodni kopeli (Labnet International, Inc., Združene države Amerike) s temperaturo 37 °C in gladino vode v višini receptorskega dela. S tem smo posnemali temperaturni gradient človeške kože, temperatura notranjosti telesa namreč znaša približno 37 °C, medtem ko ima površina kože 32 °C (25).

3.2.4. Priprava vzorcev

V okviru testiranj smo vrednotili štiri različne barvne kreme (SP barvna krema za lase Unique – odtenka dark blond-brown ash (6/71) in lightest blond-ash (10/1) in SP barvna krema za lase Echoes, odtenka 6/71 in 10/1) in štiri razvijalce (SP barvni razvijalec Hydrogen cremoxyd, 6 % iz treh različnih serij in SP barvni razvijalec Echoes, 5,5 %) v naslednjih kombinacijah:

- SP Unique 6/71 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 1)
(v nadaljevanju kombinacija 1)
- SP Unique 6/71 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 2)
(v nadaljevanju kombinacija 2)

- SP Unique 6/71 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 3)
(v nadaljevanju kombinacija 3)
- SP Echoes 6/71 + SP Echoes 5,5 % (razvijalec 4)
(v nadaljevanju kombinacija 4)
- SP Unique 10/1 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 1)
(v nadaljevanju kombinacija 5)
- SP Unique 10/1 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 2)
(v nadaljevanju kombinacija 6)
- SP Unique 10/1 + SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (razvijalec 3)
(v nadaljevanju kombinacija 7)
- SP Echoes 10/1 + SP Echoes 5,5 % (razvijalec 4)
(v nadaljevanju kombinacija 8)

Vse kombinacije barv za lase smo pripravili skladno z navodili proizvajalca, in sicer smo homogeno zmešali barvno kremo in razvijalec v razmerju 1:1. Tako pripravljeno kombinacijo smo nanесли neposredno na donorski del Franzove celice. Tako smo najprej s pomočjo vatirane palčke nanесли tanko plast pripravljene kombinacije in z njo natančno premazali celotno površino vpete kože. Tako smo preprečili, da bi pri nanosu barve nastala vmesna plast zraka med kožo in barvo, ki bi preprečila neposreden stik s kožo. Nato smo s pomočjo plastične brizge natančno natehtali približno 500 mg posamezne kombinacije v donorski del celice ter s stekleno palčko zagotovili enakomerno in dobro porazdelitev izdelka po koži.

3.2.5. Izvedba meritev transepidermalne izgube vode

Meritve transepidermalne izgube vode (TEWL) smo izvedli z napravo Tewameter[®] TM 300 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija). Priključena je na računalniško enoto Cutometer[®] MPA 580 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija), ki omogoča uporabo več različnih sond z ustrezno programsko opremo (MPA Software). Sondo naprave smo pred meritvijo temperirali v grelcu Probe Heater[®] PR 100 (Courage & Khazaka GmbH, Köln, Nemčija) na 32 °C. S tem smo zagotovili enako temperaturo površine sonde in kože, kar zagotavlja stabilnejše meritve.

TEWL je pasivna izguba vode, ki poteka ves čas skozi zdravo kožno bariero s procesom difuzije. Kadar je koža poškodovana ali razdražena oziroma je okrnjena njena barierna funkcija, posledično skozi njo izhlapi večja količina vode, kar se kaže v višjih izmerjenih vrednostih TEWL. Z meritvami TEWL lahko torej ovrednotimo barierne lastnosti kože in posredno njeno integriteto. Tewameter[®] TM 300 (v nadaljevanju Tewameter) sestavlja sonda z odprto celico, ki meri gostoto toka vodnih hlapov na površini rožene plasti. Hlapi potujejo skozi sondo v atmosfero, kar omogoča kontinuirano merjenje TEWL. Pri tem v sondi nastane gradient relativne vlažnosti (RV), ki ga naprava izračuna s pomočjo dveh senzorjev RV in temperature (T). Senzorja dajeta tudi informacijo o vrednostih RV in T za vsako posamezno vrednost znotraj meritve (26). Glede na vrednost izmerjene TEWL lahko dobljeni rezultat razložimo s pomočjo spodnje preglednice III. Test na prašičjem ušesu opredeljuje snov kot dražečo oziroma iritativno takrat, ko je razlika med končno in bazalno vrednostjo večja ali enaka 6 g/h/m^2 (27).

Preglednica III: Interpretacija izmerjenih vrednosti TEWL pri zdravi koži.

Vrednost TEWL [g/h/m ²]	Razlaga
0–10	zelo zdrava bariera
10–15	zdrava bariera
15–25	normalna bariera
25–30	občutljiva koža
nad 30	kritično stanje

Franzovo celico z vpeto kožo (poglavje 3.2.3.) smo vstavili v vodno kopel (37 °C). Po eni uri temperiranja smo izmerili bazalno vrednost TEWL. Meritev smo izvedli tako, da smo Franzovi celici odstranili donorski del, nato pa sondo vodoravno položili na efektivno površino kože (koža, ki je v neposrednem stiku s spodnjim receptorskim medijem, $S = 78,54 \text{ mm}^2$). Meritev smo izvajali 60 s, pri tem pa poskušali popolnoma mirovati. Izgled merilne sonde in izvedba meritve sta prikazana na sliki 5.



Slika 5: Zgradba sonde Tewametra (levo) in prikaz meritve TEWL (desno).

Po končani meritvi bazalne vrednosti smo na kožo nanесли pripravljeno barvo za lase. Znotraj enega poskusa smo vrednotili posamezno kombinacijo barvne kreme in razvijalca (t.i. kombinacija 1–8) na štirih Franzovih celicah (paralelah). Po nanosu barve za lase smo celice ponovno temperirali, in sicer glede na predpisan maksimalni čas delovanja glede na določila proizvajalca, ki je za vse kombinacije znašal 35 min. Po tem času smo z vatirano palčko v celoti previdno odstranili formulacijo s kože, nato pa Franzove celice postavili nazaj v vodno kopel za eno uro in šele nato pomerili vrednost TEWL, ki smo jo označili kot končna vrednost TEWL (meritev je tudi v tem primeru trajala 60 s). Optimalen čas, po katerem smo izmerili bazalno (po ustreznem času temperiranja kože) in končno vrednost TEWL (po odstranitvi vzorca) smo določili v okviru preliminarne testiranja. Kombinacije 1–4 smo testirali v dveh različnih dnevih (v štirih paralelah znotraj enega dneva) in tako preverili tudi meddnevne ponovljivosti metode. Kombinacije 5–8 smo testirali znotraj enega dneva, za posamezno kombinacijo smo naredili štiri paralele.

Rezultat meritve je podan v obliki grafa, ki prikazuje vrednost TEWL [g/h/m^2] v odvisnosti od časa [s], skupaj s podatki standardnih deviacijah (SD) za vsako posamezno sekundo in povprečnih vrednostih zadnjih 10 s za vsako časovno točko. Kot končni rezultat smo podali končno vrednost TEWL glede na bazalno vrednost za vsako posamezno paralelo, znotraj posamezne meritve pa smo upoštevali vrednost z najnižjo SD.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo preučevali vpliv različnih formulacij barv za lase na draženje kože. Uporabili smo *in vitro* test na modelu živalske kože, natančneje prašičje, vpete v Franzovo celico. Merili smo TEWL pred in po nanosu posamezne kombinacije barve za lase. Na podlagi spremljanja spremembe TEWL, ki služi za oceno barierne funkcije kože, smo dobili informacijo o stopnji draženja kože, ki se kaže v višjih vrednostih TEWL. V okviru testiranja smo najprej izvedli preliminarno testiranje, s katerim smo določili časovne točke meritev. Sledilo je nadaljnje vrednotenje vzorcev, kjer smo spremljali spremembo TEWL po nanosu barv za lase glede na bazalno vrednost in tako dobili informacijo o draženju kože.

4. 1. Preliminarno testiranje

Na začetku eksperimentalnega dela smo najprej izvedli preliminarna testa, s katerima smo želeli določiti optimalne časovne točke za meritve TEWL; natančneje **bazalne vrednosti** (določiti čas, kdaj je koža optimalno hidratirana z receptorskim medijem) ter **končne TEWL** (časovne točke, ki je najprimernejša za izvedbo meritve po nanosu barve, torej po ustreznem času delovanja in nato odstranitvi barve).

Določitev optimalne časovne točke za meritve bazalne vrednosti

Ustrezno pripravljene Franzove celice (n=3) smo postavili v vodno kopel, segreto na 37 °C. Bazalno vrednost TEWL smo na vsaki celici (paraleli) izmerili v treh časovnih točkah, in sicer po eni, dveh in treh urah temperiranja, z namenom da ugotovimo, po kolikšnem času je koža optimalno hidratirana. Rezultati so predstavljeni v preglednici IV.

Pomembno je tudi, da so v laboratoriju zagotovljeni optimalni pogoji (RV, T), npr. pri nižji RV iz vzorca izpari večja količina vode kot pri višji vrednosti. Najbolj optimalni pogoji za izvedbo meritev so RV med 40 in 60 % in T 20 °C (26). Izvedene meritve v okviru diplomskega dela so potekale v prostoru s T 23,1 °C – 24,6 °C in RV 51,4 % – 62,6 %.

Pri vseh treh paralelah (preglednica IV) opazimo nihanje bazalnih vrednosti pri istih časovnih točkah, kljub temu da smo za vse paralele uporabili kožo istega uhlja. Vendar pa so rezultati razumljivi, če upoštevamo, da so lastnosti kože tudi na majhni površini lahko zelo različne. Kljub temu da smo za vrednotenje izbrali nepoškodovano kožo, je ta lahko

vsebovala številne mikro poškodbe, ki so očem nevidne, te pa povzročijo večje izgube vode skozi kožo in posledično višje vrednosti TEWL. Izmerjene vrednosti pa so odvisne tudi od najmanjših premikov sonde med meritvijo. Vpliv slednjega smo skušali zmanjšati tako, da smo za nadaljnjo interpretacijo rezultatov vselej izbrali vrednost TEWL z najnižjo SD (preglednica IV).

Preglednica IV: Rezultati prvega preliminarne testa. Prikazane so meritve TEWL z najnižjo SD.

VZOREC	MERITEV	TEWL [g/h/m ²]	SD
1	po 1 uri	12,20	0,12
1	po 2 urah	13,50	0,17
1	po 3 urah	15,50	0,05
2	po 1 uri	6,00	0,05
2	po 2 urah	15,40	0,09
2	po 3 urah	19,80	0,17
3	po 1 uri	18,90	0,37
3	po 2 urah	24,80	0,12
3	po 3 urah	23,20	0,10

Bazalne vrednosti so po eni uri temperiranja znašale med 6,00 in 18,90 g/h/m². Vrednosti TEWL znotraj te časovne točke še ustrezajo vrednostim normalne kože, ki ima ohranjeno barierno funkcijo (preglednica III), vendar pa koža, ki ima izmerjeno bazalno vrednost večjo od 10,00 g/h/m², načeloma ni primerna za uporabo v nadaljnjih testiranjih (27). Po dveh oziroma treh urah so se vrednosti že nekoliko povišale, in sicer so znašale od 13,50 do 24,80 g/h/m² po dveh urah ter med 15,50 in 23,20 g/h/m² po treh urah. Te vrednosti so značilne za občutljivo kožo, ki ima okrnjeno barierno funkcijo (TEWL vrednosti med 25 in 30 g/h/m²). Skozi poškodovano bariero izhlapi večja količina vode, kar se kaže tudi v višjih vrednostih izmerjene TEWL (28). Takšna koža ni primerna za nadaljnja testiranja, saj bi posledično lahko dobili lažno pozitivne vrednosti za testirano snov. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo vzorce po pripravi kože v vodni kopeli temperirali eno uro, saj od vseh časovnih točk ta zagotavlja najnižje bazalne vrednosti.

Določitev optimalne časovne točke za meritve končne TEWL

V nadaljevanju smo določili optimalen čas za izvedbo meritev končne TEWL (tj. po delovanju in odstranitvi barve za lase). Po pripravi kože smo na podlagi ugotovitev prvega preliminarne testa vzorce (n =3) temperirali eno uro v vodni kopeli, segreti na 37 °C. Po tem času smo izmerili bazalno vrednost TEWL, nanесли barvo za lase in jo odstranili po predpisanem času delovanja (35 min). Celice smo postavili nazaj v vodno kopel, da se je koža stabilizirala in izmerili vrednost končne vrednosti TEWL po 30 min, eni in dveh urah. Dobljene rezultate prikazuje preglednica V.

Preglednica V: Rezultati drugega preliminarne testa. Prikazane so meritve TEWL z najnižjo SD.

VZOREC	MERITEV	TEWL [g/h/m ²]	SD
1	bazalna vrednost	8,10	0,38
1	po 30 min	15,20	0,16
1	po 1 uri	18,90	0,28
1	po 2 urah	20,00	0,20
2	bazalna vrednost	9,10	0,15
2	po 30 min	25,80	0,28
2	po 1 uri	35,40	0,24
2	po 2 urah	31,90	0,23
3	bazalna vrednost	15,40	0,14
3	po 30 min	30,80	0,32
3	po 1 uri	39,20	0,27
3	po 2 urah	46,80	0,21

Izmerjene bazalne vrednosti so znašale med 8,10 in 15,40 g/h/m² (zdrava bariera). Spremembe TEWL so po 30 minutah znašale med 7,10 in 16,7 g/h/m². Po eni uri so bile vrednosti nekoliko višje (med 10,80 in 26,30 g/h/m²), po dveh urah pa še višje (od 11,9 do 31,4 g/h/m²). Vse dobljene vrednosti nakazujejo na draženje kože po odstranitvi barve za lase (27). S povečevanjem časa po odstranitvi barve za lase so se končne vrednosti TEWL višale. Višje končne TEWL glede na bazalne vrednosti namreč nakazujejo na slabšanje kožne bariere. Spremembe TEWL po eni uri kažejo dobro ponovljivost, med

seboj so si najbolj podobne, medtem ko končne vrednosti TEWL, izmerjene po 30 minutah in 2 urah stabilizacije ne kažejo ponovljivosti. Te znašajo med 15,20 in 30,80 g/h/m² (po 30 minutah) in med 20,00 in 46,80 g/h/m² (po 2 urah). Na podlagi teh podatkov smo se odločili, da pri vrednotenju barv za lase končno TEWL izmerimo po eni uri stabilizacije vzorca po odstranitvi barve za lase.

4. 2. Vrednotenje barv za lase

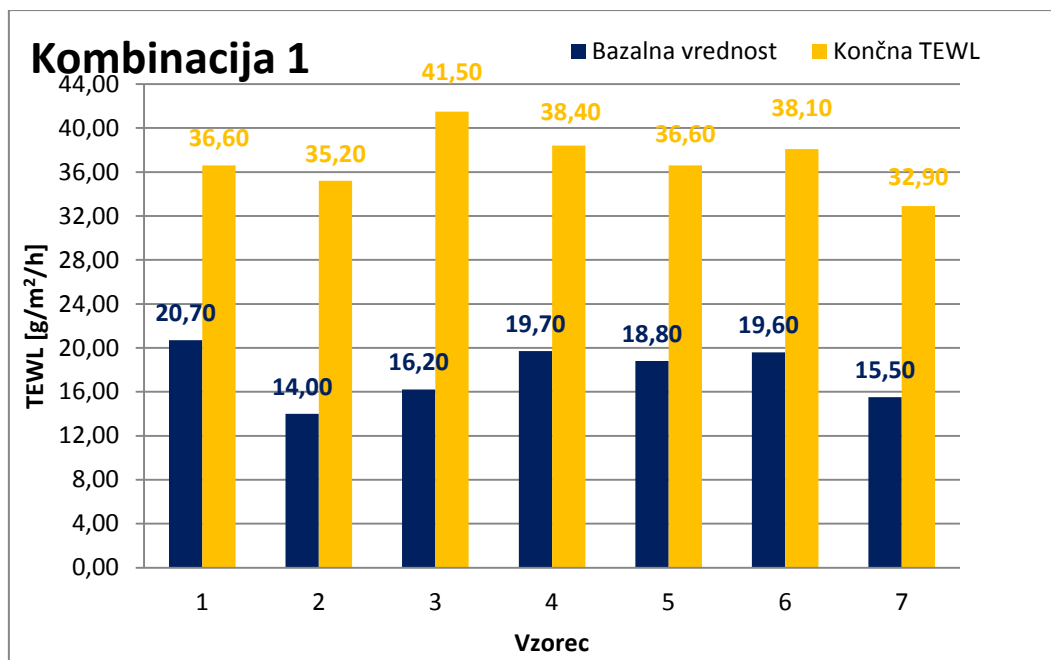
Čeprav je na tržišču veliko različnih vrst barv za lase, se načeloma najpogosteje uporabljajo oksidativne (trajne) barve zaradi najdaljše obstojnosti. Ta nastane z reakcijo oksidacije znotraj lasu pod alkalnimi pogoji ob združitvi dveh komponent, barvne kreme in razvijalca. Barvno kremo najpogosteje sestavljajo *p*-fenilendiamin (PPD), *m*-aminofenol in amoniak, razvijalec pa vsebuje oksidativno sredstvo, in sicer vodikov peroksid. Barva se zadrži v laseh in se zgolj z umivanjem las ne odstrani. Ker želimo, da učinkuje tudi na začetku lasnega stebra, jo moramo nanesti na celotno lasišče. Medtem je koža v stiku z različnimi snovmi, ki sicer v lasu tvorijo barvo, s kože pa istočasno odstranjujejo zaščitni lipofilni sloj. S tem poškodujejo kožno bariero in posledično povzročijo draženje kože (7). Za oceno draženja snovi se najbolj uporabljajo *in vitro* metode, kot so rekonstruirani kožni modeli (EpiSkin™, Modified EpiDerm, SkinEthic™ RHE), izvajajo se klinične študije na prostovoljcih v obliki krpičnih testov in testiranja na živalskih modelih (15, 16). V sklopu diplomskega dela smo za vrednotenje draženja kože po nanosu barv za lase uporabili t.i. test na prašičjem ušesu. Pri tem vrednotimo spremembo končne TEWL glede na bazalno vrednost. Če vrednost naraste za več ali enako 6 g/h/m², je nanešena snov označena kot dražeča. Na ta način lahko uspešno ločujemo med snovmi, ki dražijo, in tistimi, ki ne (17). Čeprav je metoda pokazala dobro korelacijo v primerjavi z rezultati *in vivo* (28), se v praksi največ uporabljajo omenjeni rekonstruirani kožni modeli (15). Na slikah 6–13 so predstavljeni rezultati spremembe končne TEWL v primerjavi z bazalno vrednostjo za posamezno kombinacijo barvne kreme in razvijalca. Znotraj slikovnega grafikona so predstavljene bazalne in končne vrednosti TEWL z najnižjo SD. Določene kombinacije smo na začetku vrednotili tekom dveh različnih dni za oceno meddnevne ponovljivosti.

4.2.1. Barvna krema SP Unique

V okviru vrednotenja barv za lase smo najprej testirali barvno kremo SP Unique v odtenku 6/71, ki smo jo kombinirali s tremi različnimi serijami razvijalca SP Hydrogen cremoxyd, 6 %. V nadaljevanju smo z istimi razvijalci kombinirali še odtenek 10/1 barvne kreme SP Unique in primerjali dobljene rezultate.

- **odtenek 6/71**

Kombinacija 1 (slika 6) sestavljata barvna krema SP Unique 6/71 in razvijalec SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (v nadaljevanju razvijalec 1). Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 1) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 .

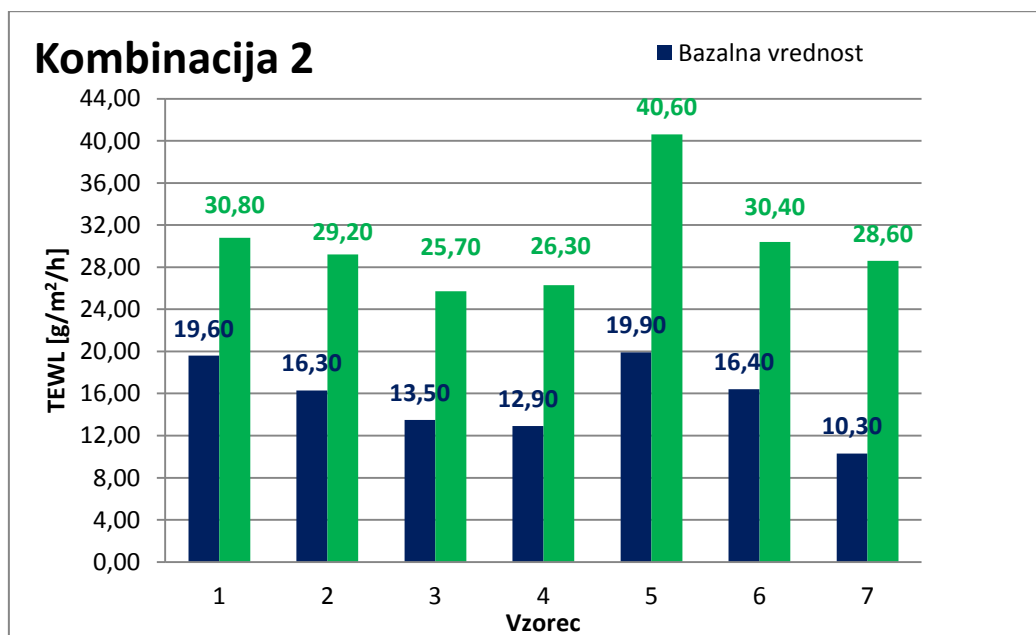


Slika 6: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 1 (SP Unique 6/71 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 1); n=7; meritve 1–3 so izvedene tekom istega dne, 4–7 tekom naslednjega dne.

Končne vrednosti TEWL (kombinacija 1 je delovala na koži 35 min) so bile v primerjavi z bazalnimi vrednostmi višje (slika 6). Največjo spremembo opazimo pri paraleli 3, kjer se je vrednost TEWL povišala za $25,30 \text{ g/h/m}^2$ (156,20 %). Sprememba TEWL je bila v primeru prvih treh paralel, ki smo jih izvedli tekom istega dneva, še primerljiva, in sicer med $15,90 \text{ g/h/m}^2$ (76,81 %) in $25,30 \text{ g/h/m}^2$ (156,20 %). Pri vzorcih, ki smo jih testirali naslednji dan, so bile njihove bazalne vrednosti (med $15,50$ in $19,70 \text{ g/h/m}^2$) zelo podobne tistim s prvega dne (med $14,00$ in $20,70 \text{ g/h/m}^2$). Spremembe TEWL so bile naslednji dan nekoliko

nižje vendar seboj zelo podobne – znašale so med $17,40 \text{ g/h/m}^2$ (112,26 %) in $18,70 \text{ g/h/m}^2$ (94,92 %).

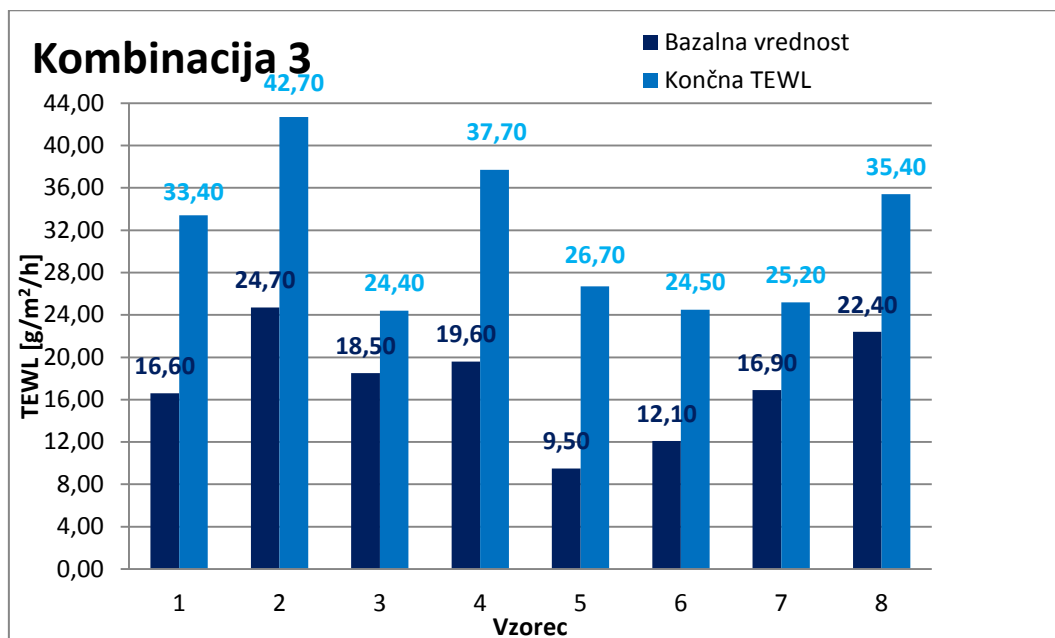
Kombinacija 2 (slika 7) predstavljata barvna krema SP Unique 6/71 in razvijalec SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (v nadaljevanju razvijalec 2). Ta je izdelan v drugačni seriji kot razvijalec 1. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 2) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 .



Slika 7: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 2 (SP Unique 6/71 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 2); $n=7$; meritve 1–4 so izvedene tekom istega dne, 5–7 tekom naslednjega dne.

Najvišja sprememba TEWL je opazna pri paraleli 5, kjer se je vrednost TEWL povišala za $20,70 \text{ g/h/m}^2$ (104,02 %). Bazalne vrednosti pri prvih štirih paralelah (testiranih isti dan) znašajo od $12,90 \text{ g/h/m}^2$ in $19,60 \text{ g/h/m}^2$, kar je zelo primerljivo z bazalnimi vrednostmi zadnjih treh paralel (testiranih naslednji dan), ki so med $10,30$ in $19,90 \text{ g/h/m}^2$. Spremembe TEWL znotraj prvega dne (paralele 1–4) so med seboj zelo podobne – med $11,20 \text{ g/h/m}^2$ in $13,40 \text{ g/h/m}^2$. V naslednjem dnevu opazimo nekoliko višje spremembe (med $14,00 \text{ g/h/m}^2$ in $20,70 \text{ g/h/m}^2$).

Kombinacija 3 (slika 8) predstavljata barvna krema SP Unique 6/71 in razvijalec SP Hydrogen cremoxyd, 6 % (v nadaljevanju razvijalec 3). Ta je izdelan v drugačni seriji kot razvijalca 1 in 2. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 3) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 .



Slika 8: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 3 (SP Unique 6/71 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 3); $n=8$; meritve 1–4 so izvedene tekom istega dne, 5–8 tekom naslednjega dne.

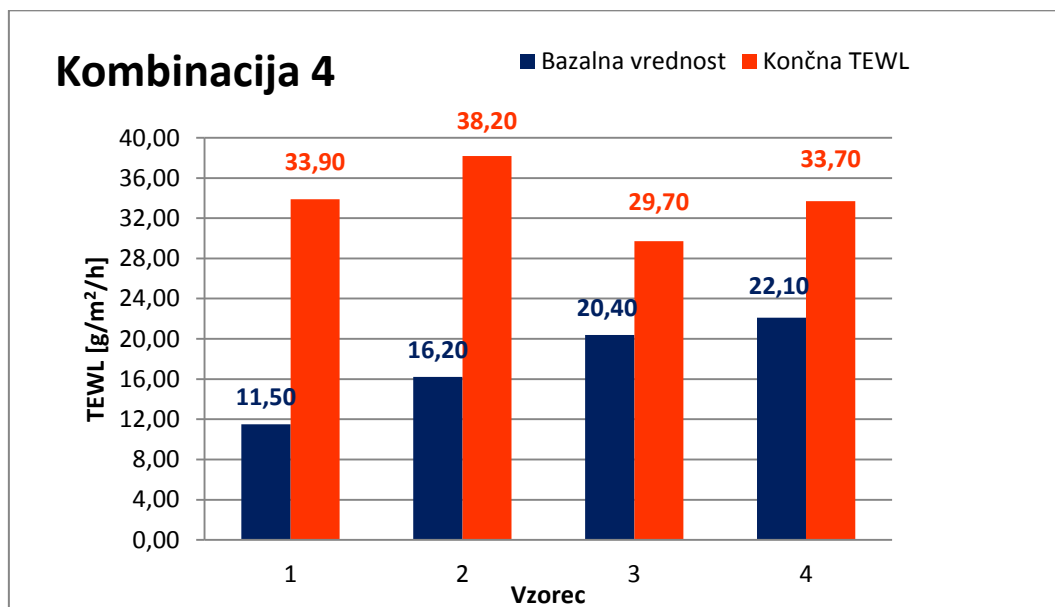
Najvišja sprememba TEWL je opazna pri paraleli 4, kjer se je TEWL zvišala za $18,10 \text{ g/h/m}^2$ (92,35 %, slika 8). Bazalne vrednosti prvih štirih paralel (testiranih znotraj enega dne) so zelo podobne – znašajo med $16,60$ in $24,70 \text{ g/h/m}^2$, medtem ko so pri zadnjih štirih paralelah (testirane naslednji dan) nekoliko nižje (med $9,50$ in $22,40 \text{ g/h/m}^2$). Pri spremembi TEWL znotraj prvih štirih paralel izstopa paralela 3, z najnižjo spremembo – $5,90 \text{ g/h/m}^2$ (31,89 %), medtem ko so ostale vrednosti zelo podobne – od $16,80$ do $18,10 \text{ g/h/m}^2$ (92,35 %). Zelo podobno opazimo tudi znotraj zadnjih štirih paralel, kjer izstopa paralela 7 s spremembo TEWL $8,30 \text{ g/h/m}^2$ (49,11 %) ostale vrednosti pa se gibljejo med $12,40$ in $17,20 \text{ g/h/m}^2$ (181,05 %).

Z uporabo istega odtenka barvne kreme in treh različnih razvijalcev smo ugotavljali njihov vpliv na draženje kože. Vse tri razvijalce (SP Hydrogen cremoxyd, 6 %) sestavlja 6-odstotni vodikov peroksid, razlikujejo se le v proizvodni seriji. Kljub temu so med njimi prisotne razlike. Razlog je v minimalnih spremembah in izboljšavah formulacij razvijalcev oz.

razvoja in uporabe novejših tehnologij pri novejši seriji razvijalca. Primerjali smo povprečno spremembo TEWL vseh paralelno znotraj posamezne kombinacije. Ugotovili smo, da so znotraj prvih treh kombinacij vse dražeče, saj povprečna sprememba TEWL znaša več kot 6 g/h/m^2 (27). Najbolj draži kombinacija 1, povprečna sprememba TEWL znaša $19,30 \text{ g/h/m}^2$ oz. 108,21 % (slika 6), manj kombinacija 2 s povprečno spremembo TEWL $14,67 \text{ g/h/m}^2$ oz. 94,28 % (slika 7). Povprečni spremembi TEWL kombinacij 2 in 3 sta skoraj enaki, razlikujeta se za manj kot 1 g/h/m^2 (zgolj za $0,96 \text{ g/h/m}^2$). Kljub temu je kombinacija 3 med omenjenimi najustreznejša za uporabo, saj ima najnižjo povprečno spremembo TEWL – $13,71 \text{ g/h/m}^2$ oz. 56,67 % (slika 8). Rezultati nakazujejo, da je torej stopnja draženja povezana ne zgolj z vsebnostjo vodikovega peroksida, temveč ima pomemben vpliv tudi tehnološka oblika.

- **odtenek 10/1**

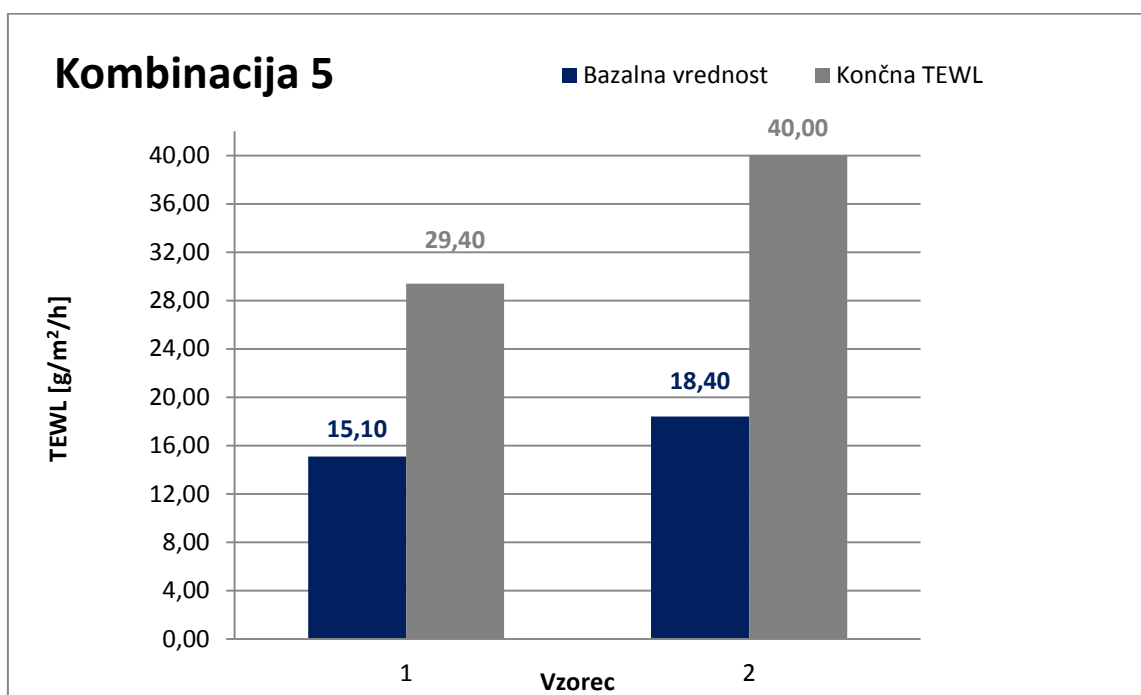
Barvno kremo SP Unique v odtenku 10/1 smo kombinirali z istimi razvijalci kot odtenek 6/71 (razvijalci 1–3). **Kombinacija 4** (slika 9), sestavljata barvna krema SP Unique 10/1 in razvijalec 1. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 4) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 . Vse meritve so bile izvedene znotraj istega dne.



Slika 9: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 4 (SP Unique 10/1 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 1); n=4.

Najvišja sprememba TEWL je opazna pri paraleli 1 (22,40 g/h/m² oz. 194,78 %), najnižja pa pri paraleli 3, kjer znaša 9,30 g/h/m² oz. 45,59 % (slika 9). Bazalne vrednosti kombinacije 4 so med 11,50 in 22,10 g/h/m². Spremembe TEWL znašajo med 11,60 in 22,40 g/h/m². Pri tem opazimo večjo podobnost med prvima paraleloma (22,40 g/h/m² pri prvi ter 22,00 g/h/m² pri drugi paraleli) in zadnjima paraleloma (9,30 g/h/m² pri tretji ter 11,60 g/h/m² pri zadnji paraleli). Ker so končne TEWL zelo primerljive (med 29,70 in 38,20 g/h/m²), zato so manjše razlike v spremembi TEWL verjetno posledica razlik v bazalnih vrednostih.

Kombinacija 5 (slika 10) predstavlja barvna krema SP Unique 10/1 in razvijalec 2. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 5) glede na bazalno vrednost v g/h/m². Obe meritvi sta bili izvedeni znotraj istega dne.

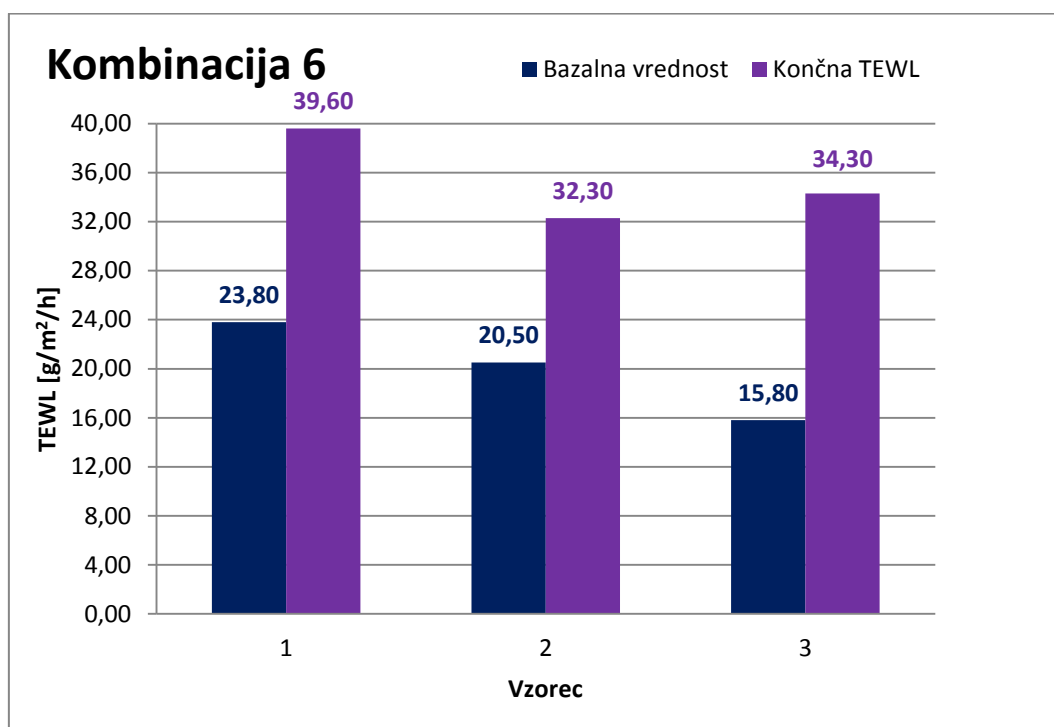


Slika 10: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 5 (SP Unique 10/1 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 2); n=2.

Obe bazalni vrednosti sta zelo primerljivi. Pri paraleli 1 ta znaša 15,10 g/h/m², pri paraleli 2 pa 18,40 g/h/m². Pri prvi paraleli opazimo povišanje TEWL za 14,30 g/h/m² (94,70 %), pri drugi paraleli pa za 21,60 g/h/m² (117,39 %). Vrednosti sta podobni, vendar bi bilo zaradi manjšega števila paralel smiselno testiranje ponoviti, da bi lahko bolj natančno ocenili primerljivost paralel (manjše število paralel je posledica izključitve vzorcev iz

nadaljnega testiranja zaradi izredno visokih vrednosti TEWL, ki so nakazovala poškodbo kože, posledično bi bili rezultati nezanesljivi).

Kombinacija 6 (slika 11) predstavlja barvna krema SP Unique 10/1 in razvijalec 3. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 6) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 . Vse meritve so bile izvedene tekom istega dne.



Slika 11: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 5 (SP Unique 10/1 in SP Hydrogen cremoxyd, 6 % – razvijalec 3).

Pri kombinaciji 6 (slika 11) opazimo razlike v bazalnih vrednostih, ki so med $15,80 \text{ g/h/m}^2$ in $23,80 \text{ g/h/m}^2$. Končne vrednosti so bolj primerljive (med $32,30 \text{ g/h/m}^2$ in $39,60 \text{ g/h/m}^2$), vendar razlika v bazalnih vrednostih posledično vpliva na razliko v spremembi TEWL. Najvišja tako znaša $18,50 \text{ g/h/m}^2$ oz. 117,09 % (paralela 3), najnižja pa $11,80 \text{ g/h/m}^2$ oz. 57,56 % (paralela 2).

Pri uporabi odtenka 10/1 barvne kreme SP Unique in razvijalcev 1–3 (slednji so bili isti, kot smo kot smo jih uporabili v kombinaciji z odtenkom 6/71) smo prišli do sledečih ugotovitev. V kombinaciji z odtenkom 10/1 najbolj draži razvijalec 2. Povprečna sprememba TEWL namreč znaša $17,95 \text{ g/h/m}^2$ oz. 107,16 % (slika 10). Sledi mu kombinacija 1 s povprečno spremembo TEWL $16,33 \text{ g/h/m}^2$ oz. 93,04 % (slika 9), kožo pa

najmanj draži kombinacija 3 s spremembo TEWL v povprečju 15,37 g/h/m² oz. 76,73 % (slika 11). Razlike med povprečnimi spremembami TEWL pri razvijalcih v kombinaciji z odtenkom 10/1 so minimalne, rezultati so v povprečju zelo podobni za razliko od kombinacij razvijalcev z odtenkom 6/71, kjer smo zaznali razlike. In sicer v kombinaciji z odtenkom 6/71 najbolj draži razvijalec 1, najmanj pa razvijalec 3. Natančnejša razlaga je podana v nadaljevanju.

Primerjava odtenkov SP Unique 6/71 in 10/1

Glede na razlike v vrednostih TEWL, v kolikor primerjamo isti razvijalec in drug odtenek, smo sklepali, da imata odtenka različno kemijsko sestavo, ki posledično vpliva na te razlike (preglednica 6). Podrobnejša sestava odtenkov 6/71 in 10/1 barvne kreme SP Unique je prikazana v prilogi I. Obema so skupne osnovne sestavine, poleg njih pa vsebujeta še sledeče:

SP Unique 6/71: A, C, D, 1, 5, 6, 7, 8, 13 (priloga I)

SP Unique 10/1: A, C, D, 1, 5, 6, 11 (priloga I)

Odtenka vsebujeta različne barvne modifikatorje. Odtenek 6/71 tako vsebuje 2-metilresorcinol, 2,4-diaminofenoksietanol HCl in hidroksietil-3,4-metilendioksianilin HCl, odtenek 10/1 pa 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat (priloga I). 2-metilresorcinol, prisoten v odtenku 6/71 po mnenju Znanstvenega odbora za potrošniške proizvode (SCCP) povzroča zmerno draženje kože, medtem ko ostali modifikatorji niso dražeči (29–32).

Preglednica VI: Povprečna sprememba TEWL med kombinacijami treh razvijalcev SP Hydrogen cremoxyd, 6 % in odtenkoma 6/71 in 10/1 barvne kreme SP Unique.

Razvijalec	Odtенок	povprečna sprememba TEWL	
		v [g/h/m ²]	v %
1	6/71	19,30	108,21
1	10/1	16,33	93,04
2	6/71	14,67	94,28
2	10/1	17,95	107,16
3	6/71	13,71	56,67
3	10/1	15,37	76,73

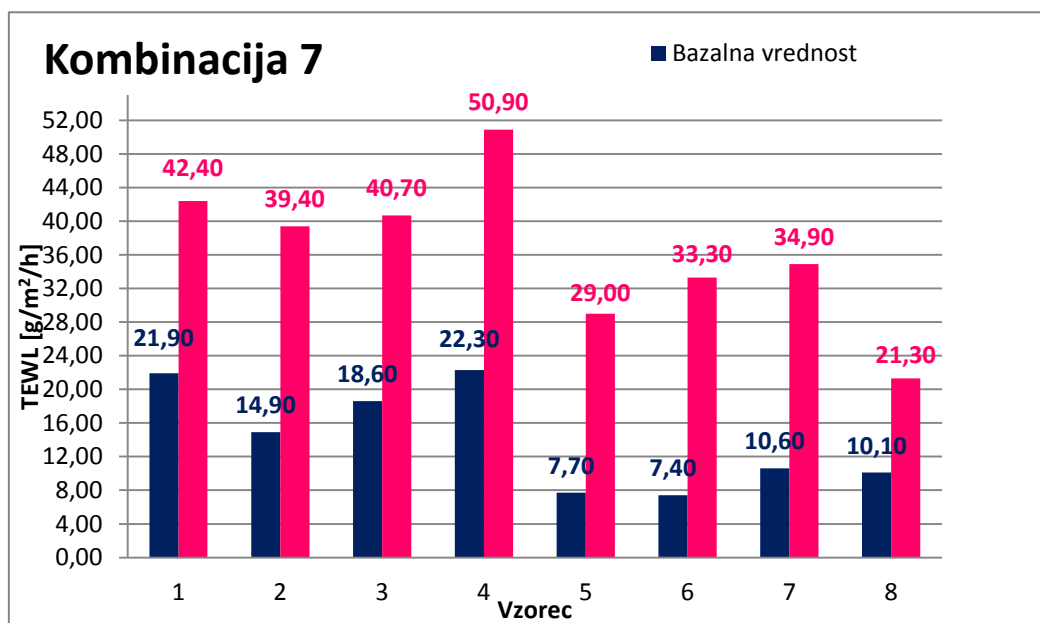
Razvijalec 1 povzroči manjše draženje kože v kombinaciji z barvno kremo z odtenkom 10/1 (16,33 g/h/m²) kot v kombinaciji z odtenkom 6/71 (19,30 g/h/m²). Slednji dodatno vsebuje 2-metilresorcinol, ki dokazano povzroča draženje kože, kar pojasnjuje dobljeno razliko (preglednica VI). Razvijalca 2 in 3 namreč manj dražita ravno v kombinaciji z odtenkom 6/71, njuni povprečni spremembi TEWL sta nižji kot pri razvijalcu 1 ter skoraj isti (14,67 g/h/m² in 13,71 g/h/m²). Rezultati tako nakazujejo oz. lahko na podlagi le-teh predvidevamo, da so pri razvoju novejšje serije razvijalca Hydrogen cremoxyd formulaciji najverjetneje dodali več lipofilnih snovi, ki zmanjšajo poškodbe kožne bariere lasišča in s tem tudi draženje kože. Povprečne spremembe TEWL pri odtenku 10/1 so pri vseh treh razvijalcih zelo podobne in se s spremembo razvijalcev zelo malo spreminjajo. Ker se ta odtenek od drugega razlikuje le v vsebnosti 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfata, ki ne povzroča dodatnega draženja, sklepamo, da morebitna sprememba formulacije razvijalcev 2 in 3, nanj nima velikega vpliva.

4.2.2. Barvna krema SP Echoes brez amoniaka

V nadaljevanju smo testirali še barvno kremo SP Echoes, ki ne vsebuje amonijaka ter sledi smernicam naravne kozmetike. Uporabili smo odtenka 6/71 in 10/1, ki smo ju kombinirali z razvijalcem SP Echoes 5,5 %. Pri tem so nas zanimala morebitne razlike v primerjavi z barvnimi kremami, ki vsebujejo amoniak.

- **odtenek 6/71**

Kombinacija 7 (slika 12) sestavljata barvna krema SP Echoes 6/71 in razvijalec SP Echoes 5,5 % (v nadaljevanju razvijalec 4). Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 7) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 .

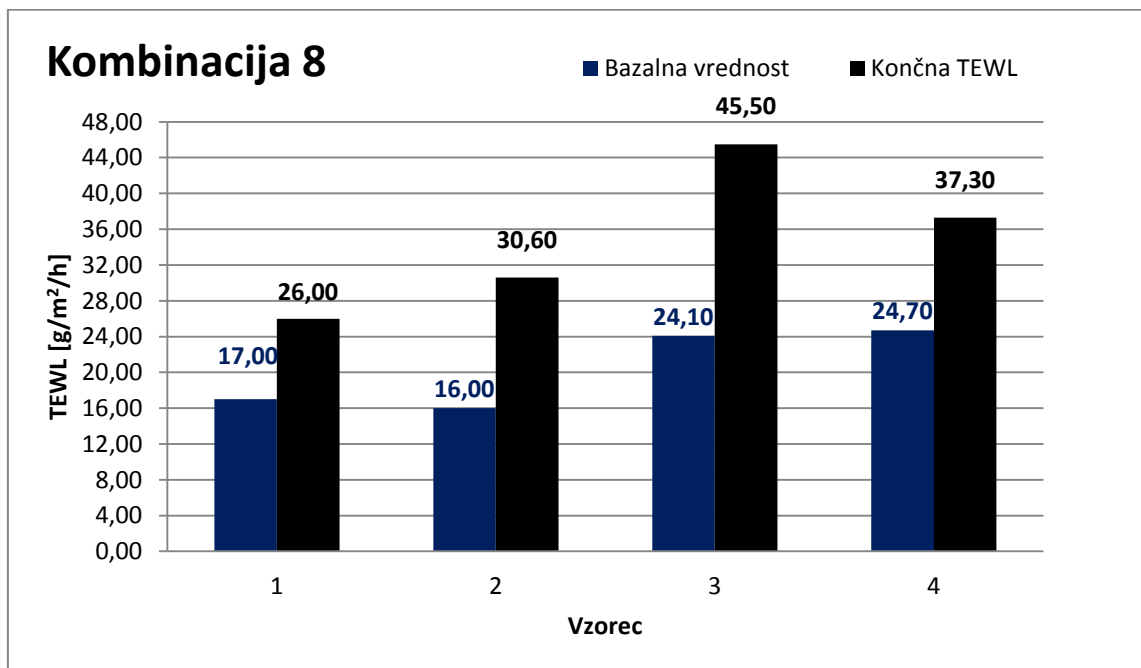


Slika 12: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 7 (SP Echoes 6/71 in SP Echoes, 5,5 % – razvijalec 4); n=8; meritve 1–4 so izvedene tekom istega dne, 5–8 tekom naslednjega dne.

Najvišja sprememba TEWL je opazna pri paraleli 4, kjer se je TEWL zvišala za $28,60 \text{ g/h/m}^2$ oz. 128,25 % (slika 12). Bazalne vrednosti pri prvih štirih paralelah, ki smo jih testirali znotraj enega dne, znašajo med $14,90$ in $22,30 \text{ g/h/m}^2$, medtem ko so pri zadnjih štirih paralelah, ki smo jih testirali naslednji dan, opazimo nekoliko nižje vrednosti – med $7,70$ in $10,60 \text{ g/h/m}^2$. Spremembe TEWL prvih štirih paralel so zelo podobne. Znašajo med $20,50 \text{ g/h/m}^2$ in $28,60 \text{ g/h/m}^2$ in so zelo podobne spremembi TEWL paralel 5–7, ki se gibljejo med $21,30 \text{ g/h/m}^2$ in $25,90 \text{ g/h/m}^2$. Izstopa le paralela 8 z najnižjo spremembo TEWL $11,20 \text{ g/h/m}^2$ oz. 110,89 %.

- **odtenek 10/1**

Kombinacija 8 (slika 13) sestavljata barvna krema SP Echoes 10/1 in razvijalec 4. Slikovni grafikon prikazuje spremembo končne TEWL (po delovanju kombinacije 8) glede na bazalno vrednost v g/h/m^2 . Vse meritve so izvedene tekom istega dne.



Slika 13: Bazalne in končne vrednosti TEWL po nanosu kombinacije 8 (SP Echoes 10/1 in SP Echoes, 5,5 % – razvijalec 4); $n=4$.

Bazalne vrednosti paralel znašajo od $16,00 \text{ g/h/m}^2$ do $24,70 \text{ g/h/m}^2$, z ujemanjem prvih in zadnjih dveh paralel (slika 13). Opazne so velike razlike v spremembah TEWL, te namreč znašajo med $9,00 \text{ g/h/m}^2$ in $21,40 \text{ g/h/m}^2$. Najvišjo spremembo TEWL predstavlja paralela 3, kjer le-ta znaša $21,40 \text{ g/h/m}^2$ (88,80 %).

Pri kombinacijah 7 in 8 smo uporabili barvno kremo SP Echoes brez amoniaka (v odtenkih 6/71 in 10/1) ter razvijalec SP Echoes 5,5 %, ki vsebuje 0,5 % manj vodikovega peroksida kot prvi trije uporabljeni razvijalci. Zaradi odsotnosti amoniaka in manjšega odstotka vodikovega peroksida smo pričakovali, da bodo omenjene kombinacije najmanj dražeče, vendar so bili rezultati ravno nasprotni. Povprečna sprememba TEWL pri kombinaciji 7 (SP Echoes 6/71 in razvijalec 4) znaša $23,93 \text{ g/h/m}^2$, kar je tudi najvišja sprememba TEWL v primerjavi z predhodno testiranimi kombinacijami 1–6. Nasprotno pa pri kombinaciji 8 (SP Echoes 10/1 in razvijalec 4) znaša sprememba TEWL $14,40 \text{ g/h/m}^2$, kar je ena izmed nižjih

vrednosti sprememb TEWL. Ker smo pri obeh kombinacijah uporabljali isti razvijalec, smo iskali razlago za nasprotujoče rezultate v različni sestavi barvnih odtenkov SP Echoes. Njihova kemijska sestava je podana v prilogi II.

Odtenska se razlikujeta v dodanih barvnih modifikatorjih. Tako odtenek 10/1 dodatno vsebuje 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat, odtenek 6/71 pa 2-metilresorcinol in 2,4-diaminofenoksietanol HCl. Poleg tega vsebuje tudi večjo količino primarnega intermedijata toluen-2,5-diamin sulfata, ki poleg 2-metilresorcinola povzroča zmerno draženje kože in posledično višje vrednosti TEWL pri kombinaciji 7, kjer je uporabljen odtenek 6/71 (29, 33). Čeprav barvna krema ne vsebuje amoniaka, je ta zamenjan z drugo alkalno snovjo, etanolaminom, saj oksidativne barve za lase za svoje delovanje potrebujejo visok pH, ki še dodatno poveča draženje kože. V ta namen obe barvni kremi vsebujeta veliko lipofilnih snovi (karitejevo maslo, kakavovo maslo ...) in polikvaternij-22, ki ščitijo kožno bariero na lasišču in omilijo draženje kože, vendar je njihov učinek izrazitejši pri odtenku 10/1.

5 ZAKLJUČEK

V sklopu diplomskega dela smo vrednotili vpliv različnih barv za lase na TEWL in posredno na draženje kože. Najprej smo v sklopu preliminarne testiranja določili optimalne časovne točke za izvedbo meritev. V nadaljevanju smo vrednotili različne kombinacije barvnih krem in razvijalcev. Uporabili smo štiri barvne kreme (SP Unique, odtenka 6/71 in 10/1 ter SP Echoes, odtenka 6/71 in 10/1) in štiri razvijalce (SP Hydrogen cremoxyd, 6 % v treh različnih serijah ter SP Echoes, 5,5 %).

Pri vseh testiranih kombinacijah je razlika med bazalno in končno vrednostjo TEWL večja od 6 g/h/m^2 , kar jih uvršča med dražeče snovi glede na kriterij izbranega testa (poglavje 3.2.4.). Prav tako je bila po odstranitvi barve za lase pri vseh vzorcih opazna rdečica. Najmanjša sprememba TEWL znaša $13,71 \text{ g/h/m}^2$, največja pa $23,93 \text{ g/h/m}^2$.

Rezultati kažejo, da kožo najmanj draži kombinacija 3 s povprečno spremembo TEWL $13,71 \text{ g/h/m}^2$. Sledijo ji kombinacije 8 ($14,40 \text{ g/h/m}^2$), 2 ($14,67 \text{ g/h/m}^2$), 6 ($15,37 \text{ g/h/m}^2$), 4 ($16,33 \text{ g/h/m}^2$), 5 ($17,95 \text{ g/h/m}^2$), 1 ($19,30 \text{ g/h/m}^2$) in kombinacija 7 ($23,93 \text{ g/h/m}^2$), ki ima najvišjo povprečno spremembo TEWL in posledično najbolj draži kožo. Kljub nižjemu odstotku vodikovega peroksida, dodanih lipofilnih sestavinah in alternativni amoniaki, je pri tej kombinaciji še vedno izrazit vpliv dodanega dražečega 2-metil rezorcinola in toluen-2,5-diamin sulfata.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je najmanj dražeča zadnja serija SP Hydrogen cremoxyda, 6 % (sliki 8, 11). Odtenek 10/1 barvne kreme SP Echoes je primernejši za uporabo, saj občutno manj draži kožo kot odtenek 6/71. Na draženje kože vpliva tako formulacija barvne kreme kot razvijalca.

V sklopu prvih štirih kombinacij smo dokazali meddnevno ponovljivost metode. Kljub temu bi bilo v prihodnje smiselno ponoviti vrednotenje na večjem številu vzorcev in s spremljanjem vpliva več spremenljivk. Testiranje bi v prihodnje lahko razširili tako, da bi vrednotili še stopnjo rdečice na koži po odstranitvi barve za lase in rezultate primerjali z vrednostmi TEWL.

6 LITERATURA

- 1) Zaletel P, Bilban M, Lunder T: Poklicna izpostavljenost alergenom v oksidativnih barvah za lase. Zdrav Vestn 2013; 82: 308–15.
- 2) Bolduc C, Shapiro J: Hair Care Products: Waving, Straightening, Conditioning, and Coloring. Clin Dermatol 2001; 19(4): 431–6.
- 3) Zviak C, Millequant J: Hair Coloring: Non-Oxidation Coloring In: Bouillon C, Wilkinson J: The Science of Hair Care, Taylor & Francis, 2005: 269–94.
- 4) Dias Gavazzoni Reis MF: Hair Cosmetics: An Overview. Int J Trichology 2015; 7(1): 2–15.
- 5) Stasiak N, Koch-Kukuła W, Głowniak K: Modern Industrial and Pharmacological Applications of Indigo Dye and its Derivates – a Review. Acta Pol Pharm 2014; 71(2): 215–21.
- 6) Draelos ZD: Cosmetic Dermatology: Products and Procedures, Blackwell Publishing Ltd, Chichester, 2010: 222–35.
- 7) Zviak C, Millequant J: Hair Coloring: Oxidation Coloring In: Bouillon C, Wilkinson J: The Science of Hair Care, Taylor & Francis, 2005: 296–327.
- 8) Nohyek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H: Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. Toxicol Appl Pharm 2010; 243: 239–59.
- 9) Corbett JF: Chemistry of hair colorant processes – Science as an aid to formulation and development. J Soc Cosmet Chem 1984; 35: 297–310.
- 10) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 2013; 439: 1–21.
- 11) Fujita F, Azuma T, Tajiri M, Okamoto H, Sano M, Tominaga M: Significance of hair-dye base-induced sensory irritation. Int J Cosmet Sci 2010; 32: 217–24.
- 12) Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih.

- 13) Uredba komisije (EU) št. 1197/2013 z dne 25. novembra 2013 o spremembi Priloge III k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega Parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih.
- 14) Aparecida da Franca S, Ferrera Dario M, Brigatto Esteves V, Baby AR, Robles Velasco MV: Types of Hair Dye and Their Mechanisms of Action. *Cosmetics* 2015; 2: 110–26.
- 15) <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-irritation#alternative-test-methods-and> (dostopano 11. 7. 2015)
- 16) Gosenca M, Gašperlin M: Membrane za *in vitro* testiranje dermalne absorpcije. *Farm Vestn* 2009; 60: 8–13.
- 17) Zuang V, Alonso MA, Botham PA, Eskes C, Fentem J, Liebsch M, J.M. van de Sandt J: Skin Irritation and Corrosion. *Altern Lab Anim* 2005; 33(1): 35–46.
- 18) Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays In: Assay Guidance Manual, e-knjiga, 2013: 260–70.
- 19) Robinson MK, Perkins MA: A Strategy for Skin Irritation Testing. *Am J Contact Dermat* 2002; 13(1): 21–29.
- 20) Al-Suwaidi A, Ahmed H: Determination of p-Phenylenediamine (PPD) in Henna in the United Arab Emirates. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(4): 1681–93.
- 21) Schuttelaar MLA, Vogel TA: Contact Allergy to Hair Dyes. *Cosmetics* 2016; 3(21): 1–6.
- 22) Scheman A, Cha C, Bhinder M: Alternative hair-dye products for persons allergic to para-phenylenediamine. *Dermatitis* 2011; 22(4): 189–92.
- 23) Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ: Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 201–11.
- 24) http://www2.mst.dk/common/Udgivramme/Frame.asp?http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2009/978-87-7052-980-8/html/helepubl_eng.htm, dostopano 27. 7. 2016
- 25) Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, 3., popravljena in dopolnjena izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 105–108.

- 26) Imhof RE, De Jesus MEP, Xiao P, Ciortea LI, Berg EP: Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *Int J Cosmet Sci* 2009; 31: 97–118.
- 27) Fentem JH, Briggs D, Chesne C, Elliott GR, Harbell JW, Heylings JR, Portes P, Roguet R, van de Sandt JJM, Botham PA: A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxicol in Vitro* 2001; 15: 57–93.
- 28) Salem H, Katz SA: *Advances in Animal Alternatives for Safety and Efficacy Testing*, Taylor & Francis, New York, 1998: 251–60.
- 29) Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on 2-Methylresorcinol, 2006.
- 30) Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on 2,4-Diaminophenoxyethanol and its salts, 2006.
- 31) Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on Hydroxyethyl-3,4-methylenedioxyaniline HCl, 2006.
- 32) Scientific Committee on Consumer Products: Updated opinion on 2-Amino-4-hydroxyethylaminoanisol sulfate, 2009.
- 33) Scientific Committee on Consumer Products: Opinion on Toluene-2,5-diamine and its sulfate, 2012.

Priloga I: Seznam sestavin z embalaže barvnih krem SP Unique

Sestavine (Ingredients): voda, cetearil alkohol, cetearet-20, natrijev lavret sulfat, fosforjev oleat, oleil alkohol, kokamidopropil betain, amonijev hidroksid, olet-10, natrijev lavril sulfat, arganovo olje, silica, natrijev sulfat, parum, askorbinska kislina, tetranatrijev EDTA, sljuda, CI 77891, alfa-izometil ionon, geraniol, citronellol

Lahko vsebuje (May contain):

- 1) toluen-2,5-diamin sulfat
- 2) 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazolsulfat
- 3) p-aminofenol
- 4) 4-amino-m-krezol
- 5) resorcinol
- 6) m-aminofenol
- 7) 2-metilresorcinol
- 8) 2,4-diaminofenoksietanol HCl
- 9) 4-amino-2-hidroksitoluen
- 10) 2-metil-5-hidroksietilaminofenol
- 11) 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat
- 12) 1-naftol
- 13) hidroksietil-3,4-metilendioksianilin HCl
- 14) 2-amino-3-hidroksipiridin
- 15) N,N-bis (2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat
- 16) 2-amino-6-kloro-4-nitrofenol
- 17) HC Yellow 2
- 18) 2,6-dimetoksi-3,5-piridindiamin HCl
- 19) Basic red 51
- 20) gliceril stearat

Vsebuje (Contains):

- A fenilendiamine (toluendiamine)
- B fenilendiamine
- C resorcinol
- D amoniak

Priloga II: Seznam sestavin z embalaže barvnih krem SP Echoes

SP Echoes 6/71: voda, cetearil alkohol, etanolamin, cetearet-25, oleil alkohol, oleinska kislina, kakavovo maslo, karitejevo maslo, kukuijevo olje, maslo indijskega mangovca, kokosovo olje, toluen-2,5-diamin sulfat, lavril glukozid, aminometil propanol, polikvaternij-22, natrijev sulfit, askorbinska kislina, natrijev sulfat, natrijev silikat, tetranatrijev glutamat diacetat, 2-metil resorcinol, hidroksietil-3,4-metilendioksianilin HCl, resorcinol, *m*-aminofenol, 2,4-diaminofenoksietanol HCl

SP Echoes 10/1: voda, cetearil alkohol, cetearet-25, oleil alkohol, etanolamin, kakavovo maslo, karitejevo maslo, kukuijevo olje, maslo indijskega mangovca, kokosovo olje, lavril glukozid, aminometil propanol, polikvaternij-22, oleinska kislina natrijev sulfit, askorbinska kislina, natrijev sulfat, natrijev silikat, tetranatrijev glutamat diacetat, toluen-2,5-diamin sulfat, resorcinol, *m*-aminofenol, 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat