

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



Dominika Krenczkowska

**Ocena barierowości skóry ludzkiej *ex vivo*
wobec niskocząsteczkowych siloksanów
o strukturze cyklicznej**

ROZPRAWA DOKTORSKA
wykonana w
Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
i przedstawiona
Radzie Nauk Farmaceutycznych
w celu uzyskania stopnia doktora
w dyscyplinie nauk farmaceutycznych

Promotor pracy:
dr hab. n. farm. Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska

Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej:
prof. dr hab. Wiesław Sawicki

Gdańsk 2021

STRESZCZENIE

Skóra stanowi nie tylko istotną drogę podawania substancji leczniczych, ale jest także ważną barierą powierzchniową, chroniącą organizm przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych. Stąd, od wielu lat jest obiektem zainteresowania zespołów naukowych. Szczególnym przyczynkiem podejmowania badań jest weryfikacja ryzyka pokonywania bariery skórnej przez substancje toksyczne, silnie działające, mające zdolność do kumulowania się w organizmie lub, gdy są popularnym składnikiem produktów na skórę, dla których trzeba ocenić jeden z aspektów bezpieczeństwa ich stosowania. Do tego nurtu należy prezentowany projekt.

Głównym celem badawczym była ocena barierowości skóry ludzkiej *ex vivo* wobec trzech niskocząsteczkowych siloksanów o strukturze cyklicznej: oktametylocyklotetrasiloksanu – D4, dekametylocyklopentasiloksanu – D5 oraz dodekametylocykloheksasiloksanu – D6. Ocena barierowości obejmowała badanie zdolności penetracji warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*) oraz głębokości przenikania tych związków do naskórka żywego (*epidermis*) i skóry właściwej (*dermis*) z określeniem prawdopodobnej drogi wnikania. Ponadto celem badawczym była analiza dawek skumulowanych D4, D5 i D6 w jednostkach [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$] we frakcjonowanych warstwach skóry oraz płynie akceptorowym, jak również wstępna ocena interakcji z lipidami i białkami, które są składnikami strukturalnymi *stratum corneum*, odpowiedzialnego w największym stopniu za funkcje barierowe. Badania poszerzono także w kierunku oceny różnic w barierowości skóry pomiędzy skórą *ex vivo* mrożoną a niemrożoną, w celu potwierdzenia wiarygodności uzyskanych wyników, przygotowany manuskrypt jest dopiero w fazie recenzji w czasopiśmie naukowym.

Z uwagi na to, że dotychczas takich badań nie prowadzono, zdecydowano się na wykorzystanie szeregu technik analitycznych, do których należały: spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera, mikroskopia fluorescencyjna, chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo jonizacyjnym, jak również wykorzystana po raz pierwszy w badaniach skóry mikroskopia holograficzna.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów udowodniono, że badane związki są w stanie pokonać barierę skórną, polegającą na penetracji *stratum corneum*, a w konsekwencji przenikaniu do głębszych warstw skóry: *epidermis* i *dermis* (gdzie obecne są naczynia krwionośne i limfatyczne), a nawet do płynu akceptorowego, co stanowi dowód na możliwość absorpcji do organizmu. Ponadto, testowane siloksany mają zdolność

do bioakumulacji w każdej frakcjonowanej warstwie skóry: *stratum corneum*, *epidermis* i *dermis*. Między siloksanami, a składnikami *stratum corneum*, tzn. lipidami oraz białkami mogą występować interakcje, których skutkiem jest możliwość wystąpienia przejść fazowych lipidów z konformacji ortorombowej do heksagonalnej, a nawet ciekłokrystalicznej (fluidalnej), jak również nieodwracalnej ekstrakcji lipidów. Konsekwencją tego była widoczna dezorganizacja i miejscowe zniszczenie struktury *stratum corneum*. W obrazach mikroskopowych obserwowano powstawanie charakterystycznych przestrzeni (tzw. luk), co przekłada się na zwiększoną utratę barierowości skóry. W ramach realizacji kolejnego celu badawczego, wykazano, że siloksany wnikają do skóry drogą międzykomórkową tzn. przez macierz lipidową, która otacza korneocyty oraz przez lipofilową przestrzeń między klastrami korneocytów, tzw. kaniony. Co istotne, do tej pory kaniony zostały opisane jedynie w kilku pracach naukowych, z dziedziny nanotechnologii farmaceutycznej. W niniejszej pracy udowodniono, że kaniony mogą stanowić istotną drogę wnikania ksenobiotyków do skóry. Należy także podkreślić, że sformułowano prawdopodobny mechanizm wnikania do skóry siloksanów o strukturze cyklicznej, uwzględniając zróżnicowane powinowactwo D4, D5 oraz D6 do warstwy rogowej, złożoność bariery skórnej oraz specyficzne właściwości fizykochemiczne tych związków. Podstawa mechanizmu opierała się nie tylko na zjawisku dyfuzji, zgodnie z pierwszym prawem Fick'a i prawem podziału lipofilowych substancji pomiędzy lipofilową warstwą *stratum corneum* lub hydrofilową warstwą skóry (*epidermis* i *dermis*), ale była także zależna od nieodwracalnych zmian strukturalnych *stratum corneum* na skutek interakcji z badanymi siloksanami.

Niniejsza praca doktorska prezentuje wielokierunkowe badanie oceny bezpieczeństwa stosowania siloksanów o strukturze cyklicznej w produktach na skórę. Wykazano, że siloksan D6 jest najbardziej bezpieczny z punktu widzenia najmniejszej absorpcji do organizmu. Szczegółowo omówiono aspekty związane z metodyką badań transdermalnych, jak i budową strukturalną skóry, która warunkuje funkcje barierowe. Co istotne, wprowadzono do piśmiennictwa naukowego innowacyjną koncepcję postrzegania barierowości tego narządu jako wielopoziomową strukturę *stratum corneum*. Opublikowany cykl prac przyczynia się do rozwoju wiedzy w tej tematyce. Zaprojektowany warsztat analityczny może być z powodzeniem wdrożony do standardowej oceny bezpieczeństwa stosowania różnych ksenobiotyków.

ABSTRACT

The skin constitutes not only an important way of medicinal substances administration, but as well a significant barrier that protects the organism against harmful effects of external factors. Therefore, for many years it has been the object of interest of research teams. A particular reason for undertaking studies is the risk verification of overcoming the skin barrier by toxic substances, potent and with ability to accumulate in the body or when they are a common ingredient in skin care products for which one of their safety aspect needs to be assessed. The presented project belongs to this trend.

The main aim of the present work was to assess barrier of *ex vivo* human skin against three low molecular weight siloxanes with a cyclic structure: octamethylcyclotetrasiloxane - D4, decamethylcyclopentasiloxane - D5, and dodecamethylcyclohexasiloxane - D6. The skin barrier evaluation included study of the *stratum corneum* penetration and the permeation depth of these compounds into vivid *epidermis* and *dermis*, with determination of the possible route of penetration. In addition, the research goal was to analyze the cumulative doses of D4, D5 and D6 [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$] in fractionated layers of the skin and receptor fluid, as well as the initial assessment of interactions with lipids and proteins, which are structural components of the *stratum corneum*, responsible to the greatest extent for barrier functions. The research was also extended to assess the differences of skin barrier between *ex vivo* frozen and non-frozen skin, in order to confirm the reliability of obtained results, prepared manuscript is still under review in a scientific journal.

Due to the fact that such studies have not been conducted so far, it was decided to use many analytical techniques, including: attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, fluorescence microscopy, gas chromatography with a flame ionization detector, as well as holographic microscopy, used for the first time in skin research.

Based on the conducted experiments, it was proved that the studied compounds are able to overcome the skin barrier, consisting in the *stratum corneum* penetration, and consequently permeation into the deeper layers of the skin: *epidermis* and *dermis* (where blood and lymphatic vessels are located), and even to the receptor fluid, which is evidence of the absorption possibility into the body. Moreover, studied siloxanes are able to bioaccumulate in each fractionated layer of the skin: *stratum corneum*, *epidermis* and *dermis*. Between siloxanes and the components of the *stratum corneum*, i.e. lipids and proteins, interactions may occur, resulting in the possibility of lipid phase transitions from orthorhombic to hexagonal or even liquid crystalline (fluid) conformation, as well as irreversible lipid extraction. The consequence of this phenomenon was visible disorganization and local destruction of the *stratum corneum*

structure. In microscopic images, the formation of characteristic spaces (lacunae) was observed, which was associated with an increased loss of skin barrier. Implementation of another aim of the study proved that siloxanes penetrate the skin through the intercellular route, through the lipid matrix that surrounds corneocytes, and through the lipophilic space between clusters of corneocytes, the so-called canyons. Importantly, so far canyons have been described only in a few scientific works, in the field of pharmaceutical nanotechnology. In this study, it was proved that canyons can be an essential route of xenobiotics penetration. It should also be emphasized, that possible penetration mechanism into the skin of siloxanes with a cyclic structure was defined, taking into consideration the different affinity of D4, D5 and D6 to the *stratum corneum*, the complexity of the skin barrier and the specific physicochemical properties of these compounds.

The principle of the mechanism was based not only on the phenomenon of diffusion process, in accordance with the first Fick's law and the law of division of lipophilic substances between lipophilic *stratum corneum* or hydrophilic layers of the skin (*epidermis* and *dermis*), but was also dependent on irreversible structural alterations in the *stratum corneum* due to interactions with the tested siloxanes.

This doctoral dissertation presents a multidirectional study on the safety assessment of the use of cyclic siloxanes in skin products. D6 siloxane has been shown to be the safest from the point of view of the lowest absorption into the body. The aspects related to the methodology of transdermal tests as well as the structural structure of the skin, which determines the barrier functions, are discussed in detail. Importantly, an innovative concept of determination the skin barrier as a multi-level structure of the *stratum corneum* was described in the scientific literature. Published articles contributes to the development of knowledge on this subject. The designed analytical workshop can be successfully implemented in the standard safety assessment the use of various xenobiotics.