

Anti-pollution: innovativo test *in vitro*

Per quantificare il particolato che entra nel nostro corpo

Marta Cavo

React4life (Genova) - m.cavo@react4life.com

Parole chiave

Anti-pollution
Test in vitro
Bioreattore
Particolato

Riassunto

Il particolato atmosferico è considerato l'inquinante più pericoloso, poiché a causa delle sue ridotte dimensioni ha la capacità di infiltrarsi nelle cellule del nostro corpo, e in particolare in quelle del tratto superiore dell'apparato respiratorio (cavità nasali, faringe e laringe) e della pelle (poli piliferi). A contatto con la pelle, l'inquinamento può generare vari effetti indesiderati come infiammazione e secchezza. Il mercato cosmetico e dei *medical devices* si sta muovendo per proporre soluzioni avanzate atte a contrastare l'infiltrazione degli inquinanti nella pelle; questi prodotti sono per lo più a base di sieri antiossidanti o fosfolipidi. Alla necessità di proporre nuovi prodotti si affianca però la necessità di test affidabili e realistici per valutare in modo preciso e riproducibile l'efficacia di tali formulazioni. React4life, nata nel 2016 a Genova, si occupa di test *in vitro* innovativi, condotti in ambienti altamente tecnologici (bioreattori); nel campo della cosmetica e in particolare dell'*anti-pollution*, ha brevettato un innovativo test *in vitro* che permette per la prima volta di quantificare gli inquinanti che penetrano nella pelle. Il test permette quindi di avere dati precisi e riproducibili sull'effetto schermante dei prodotti *anti-pollution*; ciò contribuirà ad avere prodotti sempre più competitivi per la protezione della pelle. In questo articolo vengono spiegati i metodi adottati dall'azienda e i risultati ottenuti testando una lozione *anti-pollution* commerciale.

Introduzione

Inquinamento e pelle

Il particolato è costituito da quelle particelle disperse nell'atmosfera aventi un diametro che va da pochi nanometri fino ai 500 micron, ed è considerato l'inquinante a maggiore impatto ambientale. Per classificare la na-

Anti-pollution innovative *in vitro* test

To quantify the particulate that enters from the skin in our body

Summary

Atmospheric particulate matter is considered the most dangerous pollutant, due to its small size and to its ability to infiltrate the cells of our body, and in particular those of the upper respiratory tract (nasal cavity, pharynx and larynx) and of the skin (hairs pores). In contact with the skin, pollution can generate various undesirable effects such as inflammation and dryness. The cosmetic and medical devices market is moving to propose advanced solutions to fight the infiltration of pollutants into the skin; these products are mostly based on anti-oxidant or phospholipid sera. However, the need for new products is accompanied by the need for reliable and realistic tests to assess the effectiveness of these formulations in a precise and reproducible way. React4life, founded in 2016 in Genova, deals with innovative *in vitro* tests, conducted in highly technological environments (bioreactors); in the field of cosmetics and in particular of *anti-pollution*, has patented an innovative *in vitro* test that allows for the first time to quantify the pollutants passing through the skin. The test therefore allows to have precise and reproducible data on the shielding effect of *anti-pollution* products; this will contribute to having increasingly competitive products for skin protection. This article explains the methods adopted and the results obtained by testing a commercial *anti-pollution* lotion.

tura del particolato, tipicamente si utilizza un identificativo delle dimensioni, il Particulate Matter (PM), seguito dal diametro massimo delle particelle. La classificazione più comune distingue i PM10 (tutte le particelle con diametro inferiore a 10 µm) dal

PM_{2,5}, cioè quel sottoinsieme del PM₁₀ in cui le particelle hanno diametro inferiore a 2,5 µm. In particolare, il PM_{2,5} è parte di ciò che viene definito “polveri sottili” e si forma maggiormente da scarti e prodotti industriali, come il deterioramento dei freni degli autoveicoli (1).

Il problema dell'inquinamento è comunemente associato ai danni ambientali e ai gravi squilibri che esso causa all'ecosistema; non da meno sono però le conseguenze negative su piante, animali e uomo. Un'esposizione prolungata ad ambienti carichi di smog e di gas di scarico ha infatti innumerevoli conseguenze: asma, broncopatia cronica, cancro ed enfisema, fino all'infarto.

Sono molti gli studi secondo cui l'inquinamento ha anche gravi conseguenze sulla salute della pelle: uno di questi, pubblicato sul *Journal for investigative dermatology*, stima che gli inquinanti favoriscano l'aumento fino al 20% della comparsa di macchie di pigmento sulla pelle (2). Uno dei principali meccanismi con cui il particolato ambientale esercita i suoi effetti dannosi è attraverso la generazione dello stress ossidativo: le particelle, caratterizzate da piccole dimensioni e da grande area superficiale, sono in grado di infiltrarsi nelle superfici e nelle strutture biologiche del nostro corpo, recando un danno biologico diretto (3). Oltre a ciò, pare che esse servano da trasportatrici (*carriers*) di sostanze chimiche e metalli in grado di localizzarsi nei mitocondri (3); in particolare, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) vengono adsorbiti sulla superficie del PM sospeso e così trasportati nella pelle attraverso i follicoli piliferi (4,5). Soprattutto se viviamo in un'area urbana, dove i livelli di inquinamento atmosferico sono spesso superiori ai limiti fissati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), a fine giornata la nostra pelle è ricoperta da uno strato di impurità causato dalle polveri sottili che, se non viene rimosso con la giusta deterzione e cura dell'igiene personale, continuerà a recare un danno biologico. Queste sostanze, infatti, degradano il collagene, proteina responsabile della compattezza della pelle, e il film lipidico cutaneo, con una conseguente predisposizione ad arrossamenti, dermatiti ed eczemi.

Soluzioni *anti-pollution*

In conseguenza dei gravi danni che l'inquinamento può arrecare alla nostra pelle, recentemente il settore della cosmetica si è sensibilizzato sulla tematica dell'anti-inquinamento, proponendo prodotti atti a potenziare l'effetto barriera dell'epidermide, in modo da rendere difficoltoso l'accesso alle particelle inquinanti.

Nel 2016 i cosmetici *anti-pollution* hanno rappresentato l'1% dei nuovi prodotti di bellezza lanciati in tutto il mondo (fonte: Mintel). Il *trend* riguarda in particolare le grandi città europee e americane, che affrontano regolarmente picchi di inquinamento: in queste zone, infatti, i consumatori sono sempre più consapevoli degli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla loro pelle, domandando prodotti che non solo contrastano l'invecchiamento ma che proteggono dal danno ambientale.

Per proteggere la cute servono prodotti con schermi *ad hoc* e ad altissimo potere rigenerante che vadano a ricreare i legami fra le cellule. Sono sieri, creme e fluidi, principalmente a base di antiossidanti come il licopene, il resveratrolo, vitamine E e C; anche i fosfolipidi sono grandemente usati, perché creano barriere in grado di tenere lontano lo smog dalla pelle. Infine, sostanze come l'acido ialuronico o l'alginato hanno una doppia azione: formare uno strato in grado di proteggere la pelle dall'infiltrazione di particolato, e reidratare gli strati (6).

Il mercato dei test *anti-pollution*

Conseguentemente alla necessità di avere nuovi prodotti che proteggano la pelle dall'impatto negativo dell'inquinamento, vi è pure la necessità di disporre di test adeguati per valutarne l'efficacia. È molto importante che il test risulti affidabile, riproducibile ed eseguito in condizioni simili alle condizioni reali. Per confermare se il prodotto o il principio attivo ha un significativo effetto anti-inquinamento, abbiamo bisogno di conoscere come il particolato agisce sulla pelle e di misurarne l'incidenza e l'effetto. Recentemente sono stati proposti e valutati alcuni test *in vivo* e *in vitro*.

Test *in vivo*

Per quanto riguarda i test *anti-pollution in vivo*, essi vengono eseguiti direttamente sulla pelle di volontari. In questo caso, le condizioni reali sono riprodotte, ma l'eterogeneità della pelle umana e le condizioni etiche (applicazione di sostanze nocive su volontari) rendono questi test rispettivamente poco attendibili e rischiosi. Inoltre, i test *in vivo* non consentono di condurre analisi biologiche e molecolari, poiché il campione non può essere estrapolato *ex-post* (6).

Test *in vitro*

I test anti-inquinamento *in vitro* si basano su modelli cellulari ideati per riflettere la situazione ambientale in labora-

torio, dove le condizioni sperimentali possono essere standardizzate. Diversi tipi di cellule possono essere utilizzati per osservare i cambiamenti biologici dovuti all'effetto della *pollution*, e comprendere così il meccanismo di azione di inquinanti, mediato o meno da prodotti anti-inquinamento, su sistemi cellulari.

Le cellule utilizzate sono tipicamente linee di cheratinociti, come HaCaT o NHEK (7-9), o linee di fibroblasti, come NHDF (10,11). Le cellule possono essere coltivate in un singolo strato (*mono-layer*) o come modello di pelle ricostruito (*skin equivalent*), che riproduca l'epidermide e/o il derma.

Per valutare l'impatto di diversi inquinanti, solitamente le cellule sono trattate con una miscela inquinante che consiste, ad esempio, di particolato, polvere urbana, metalli pesanti o fumo di sigaretta (8,10). Una volta esposte al fattore di interesse, l'impatto dell'inquinamento sulle cellule viene valutato tipicamente come effetto sulla vitalità cellulare, misurata mediante un test di attività mitocondriale (MTT), o una valutazione del rilascio di lattato deidrogenasi (indicatore del danno cellulare), o attraverso l'osservazione morfologica dei nuclei e/o della struttura di collagene usando tecniche microscopiche (11).

Indicatori importanti della risposta cellulare all'inquinamento sono anche i marcatori di infiammazione come le interleuchine (IL-6, IL-8, IL-1); la concentrazione di questi marcatori nel terreno di coltura viene generalmente misurata usando il test ELISA.

Anche il mantenimento dell'integrità della barriera cutanea, di fondamentale importanza per il corretto funzionamento dell'epidermide, viene monitorato dopo esposizione alla *pollution*, poiché le sostanze inquinanti hanno un'influenza elevata nel demolire questa integrità. In particolare, analisi basate su qRT-PCR permettono di determinare i cambiamenti nell'espressione genica di alcuni geni legati all'integrità della pelle (10).

Risulta chiaro come i test anti-inquinamento *in vitro* attualmente disponibili comprendano un ampio ventaglio di analisi, che si concentrano sui cambiamenti che si verificano nelle cellule della pelle in seguito all'azione di un inquinante (*analisi dell'effetto dell'inquinamento*).

Una delle maggiori lacune di questi test rimane l'analisi e la quantificazione dell'inquinante in grado di oltrepassare la barriera fisiologica costituita dal tessuto epidermide/derma e, in conseguenza, la reale protezione che una formulazione cosmetica *anti-pollution* può offrire all'individuo. L'impatto dell'inquinamento, infatti, non si esaurisce al tessuto epiteliale di interfaccia con l'aria atmosferica (*i.e.* pelle), poiché

gli inquinanti che riescono a superare la cute possono anche diffondersi a livello sistemico e causare danni in siti anatomici differenti.

Per disporre di dati attendibili, è dunque importante quantificare non solo gli effetti dell'inquinamento in relazione allo stato di salute delle cellule, ma anche l'entità del particolato in grado di superare la barriera costituita dalla pelle (analisi trans-dermica).

Materiali e Metodi

Il nuovo test

React4life, azienda italiana con sede a Genova, ha brevettato un test che permette di analizzare e quantificare il particolato passante la pelle nel tempo tramite una tecnologia all'avanguardia e riproducibile.

Lo stress inquinante viene replicato utilizzando uno standard internazionalmente riconosciuto comprendente metalli pesanti e idrocarburi aromatici.

L'approccio tecnologico è quello di accoppiare alle tecniche standard di valutazione dell'effetto cellulare dell'inquinamento una quantizzazione dell'inquinante in grado di attraversare la pelle (Fig.1), che consente quindi di identificare i prodotti più efficaci atti a proteggere l'individuo dai danni provenienti da inquinamento.

Il test utilizza un bioreattore che permette di ospitare inserti di pelle di complessità variabile e di simulare il flusso capillare e linfatico sottostante la pelle, per riprodurre *in vitro* quelle che sono le condizioni reali. Le cellule e/o il tessuto epiteliale, coltivati all'interfaccia aria-liquido, vengono sollecitati dal fluido sottostante formando così un *layer* che per integrità riproduce la barriera dermica (Fig.2).

Una volta appurata l'integrità della pelle all'interno della piattaforma, questa viene trattata con formulazioni innovative *anti-pollution*. I dati riportati in questo studio si riferiscono in particolare ad una formulazione *anti-pollution* commerciale, i cui ingredienti principali sono acqua, etilil stearato, glicerina, pantenolo, sodio benzoato, sodio cloruro, acido citrico.

Il particolato viene campionato ed esaminato microscopicamente; in tal modo è possibile sia analizzarne la quantità che è riuscita ad attraversare la barriera fisiologica (*i.e.* pelle), sia valutarne la natura tramite apposite sonde chimiche.

Al termine del test è quindi possibile valutare l'effettiva protezione (in termini quantitativi) offerta dalla formulazione cosmetica in esame (Fig.3); inoltre il tessuto epite-

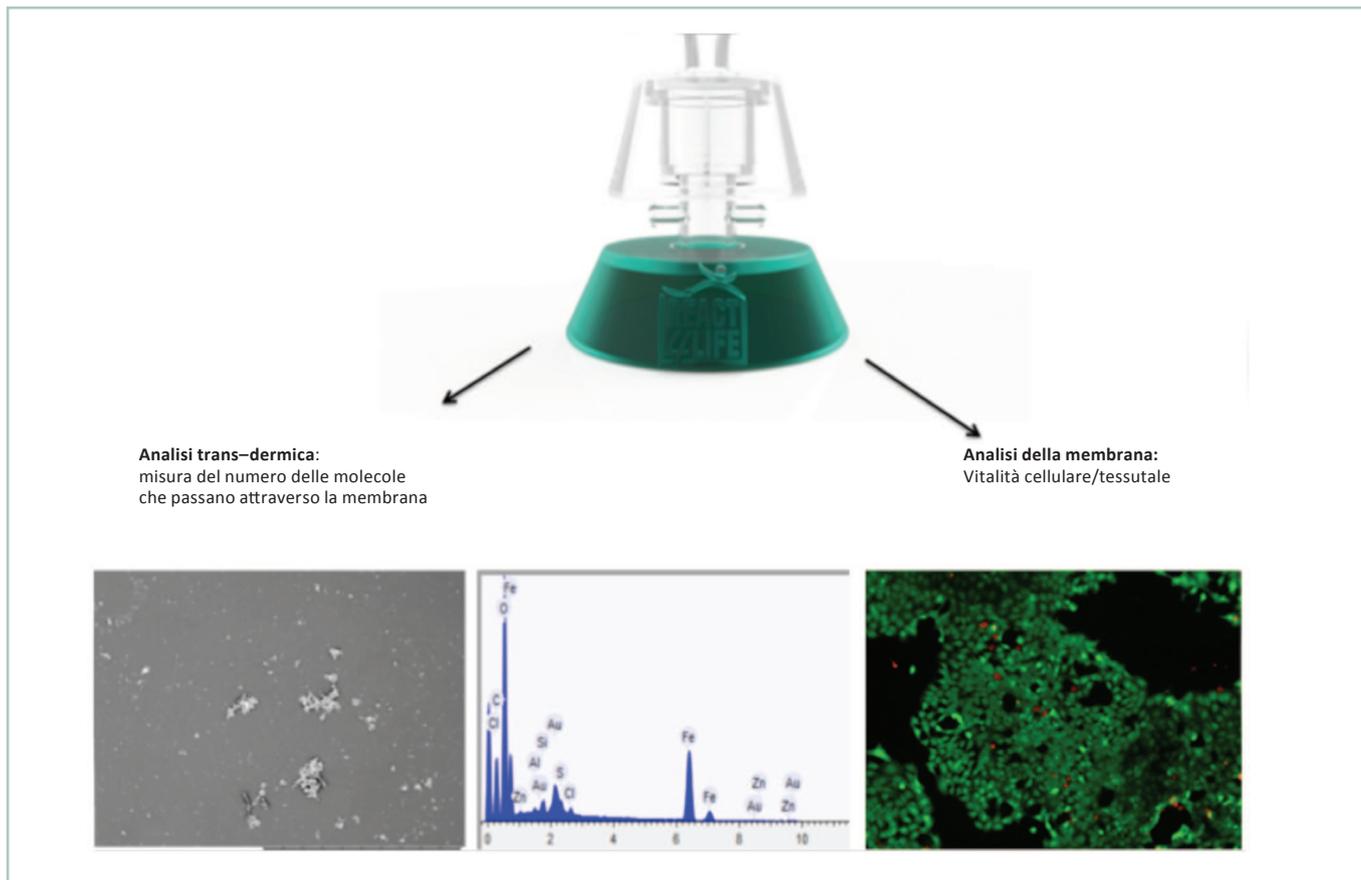


Figura 1 - Il test *anti-pollution* permette sia di condurre analisi sulla membrana cellulare sia analisi trans-dermiche per quantificare il *pollutant* passato.

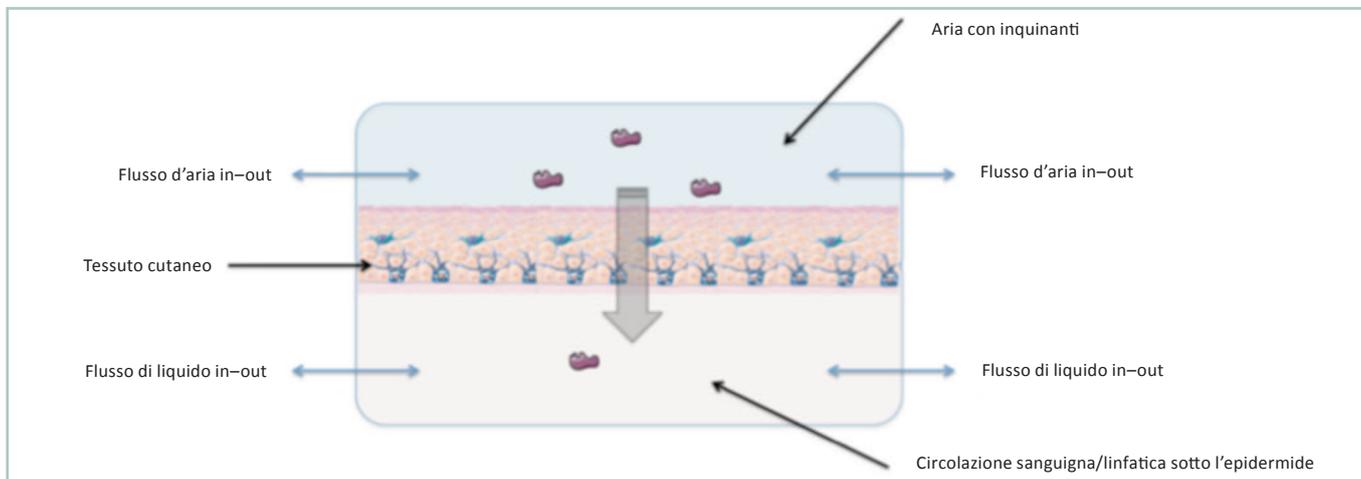


Figura 2 - Il test *anti-pollution* è condotto in un innovativo bioreattore che simula il flusso capillare e linfatico sottostante la pelle, per una migliore riproduzione delle condizioni reali cutanee.

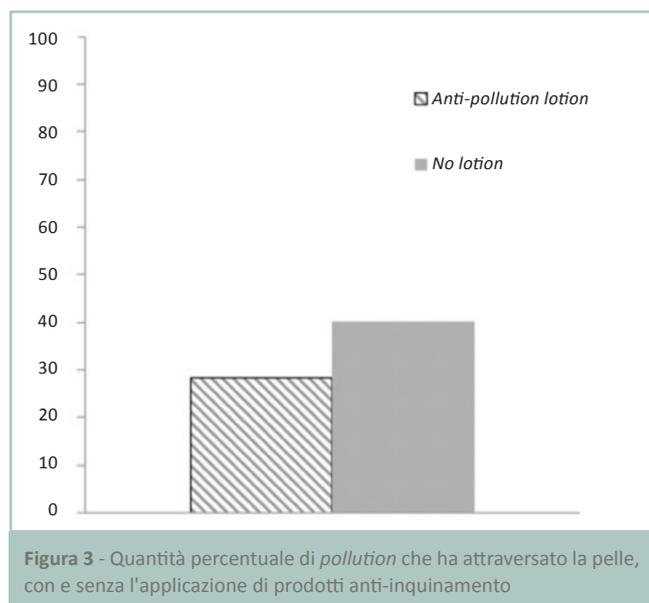
liale può essere ulteriormente analizzato *ex-post* tramite analisi biologiche, istologiche, molecolari.

Conclusioni

Gli effetti negativi che il particolato atmosferico e l'inquinamento hanno sulla pelle sono ormai riconosciuti e di grande attualità. Molte soluzioni, principalmente a base di anti-os-

sidanti e gel naturali, stanno prendendo campo per contrastare l'infiltrazione degli inquinanti nella pelle. Alla necessità di nuovi prodotti si affianca però la necessità di test affidabili e realistici per valutare in modo preciso e riproducibile l'efficacia di tali formulazioni.

React4life ha ideato e brevettato un innovativo test *in vitro* che permette per la prima volta di quantificare gli inquinanti che penetrano nella pelle, che può essere ac-



coppiato alle tecniche standard di valutazione dell'effetto di tali sostanze sulla biologia cellulare. Il test permette quindi di avere dati precisi e riproducibili sull'effetto schermante dei prodotti *anti-pollution*; ciò contribuirà ad avere prodotti sempre più competitivi per la protezione della pelle.

Bibliografia

1. Angelino E *et al* (2006) Le emissioni in atmosfera dalle combustioni in Lombardia. *Rivista dei combustibili* 60(6):359-415
2. Vierkötter A *et al* (2010) Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *Journal of investigative dermatology* 130(12):2719-2726
3. Li N *et al* (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental health perspectives* 111(4):455
4. Menichini E (1992) Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Science of the total environment* 116(1-2):109-135
5. Lademann J *et al* (2004) Penetration of microparticles into human skin. *Der Hautarzt* 55(12):1117-1119
6. Rembisa J *et al* (2018) The Impact of Pollution on Skin and Proper Efficacy Testing for Anti-Pollution Claims. *Cosmetics* 5(1):4
7. Valacchi G, Sticozzi C, Belmonte G, Chen N, Krol Y *et al* (2015) Vitamin C compound mixtures prevent ozone-induced oxidative damage in human keratinocytes as initial assessment of pollution protection. *PLoS ONE* 2015 10 1-15
8. Costa A, Facchini G, Pinheiro A.L.T.A da Silva, Bonner MS, Arbiser MY *et al* (2017) Honokiol protects skin cells against inflammation, collagenolysis, apoptosis, and senescence caused by cigarette smoke damage. *Int J Dermatol* 56:754-761
9. Zhang Y, Zheng L, Tuo J, Liu Q, Zhang X *et al* (2017) Analysis of PM_{2.5}-induced cytotoxicity in human HaCaT cells based on a microfluidic system. *Toxicol In Vitro* 43:1-8
10. Hubaux R, Weisgerber F, Salmon M (2015) *In vitro* assays to study the effects of air pollutants on skin: Exposure to urban dust and cigarette smoke extract. In Proceedings of the 23rd IFSCC Conference (Montreux, Switzerland, 21-23 September)
11. Gimenez A, Davi C, Canadas E, Alminana N, Delgado R (2016) Finding new solutions against pollution. *Sofw J* 142:20-25