

# Kolagenní hydrolyzáty jako funkční polymer v kosmetice

Bc. Ivana Stromková

---

Diplomová práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Stromková**  
Osobní číslo: **T18246**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Kolagenní hydrolyzáty jako funkční polymer v kosmetice.**

### **Zásady pro vypracování**

Zpracujte literární studii o využití polymerů v kosmetice, detailněji se zaměřte na stárnutí kůže, hydrataci pokožky a měření vlastností pokožky. Navrhněte vhodný způsob přípravy hydrolyzáty kolagenu ze zadané suroviny, s ohledem na jeho aplikaci v kosmetických přípravcích; připravte si zásobní množství hydrolyzovaného kolagenu. Připravte kosmetické formulace s přídavkem hydrolyzovaného kolagenu.

Na skupině probandů sledujte vybrané vlastnosti pokožky ošetřené připravenými formulacemi. K testování použijte bioinženýrské neinvazivní metody. Výsledky měření zpracujte vhodným softwarem, proveďte diskusi a zhodnoťte přínos Vaší práce pro praxi.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

Baumann, Leslie. *Cosmetic ingredients and cosmeceuticals*. New York: McGraw-Hill Companies, 2015. ISBN 9780071793988.

Baki, G., Alexander, K.S. *Introduction to cosmetic formulation and technology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.

Loh, X.J. *Polymers for personal care products and cosmetics*. Cambridge, UK: Royal Society Of Chemistry, 2016.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Pavel Mokrejš, Ph.D.**  
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Teoretická část práce se zabývá hydratací kůže a jejím stárnutím, dále využitím syntetických a přírodních polymerů v kosmetických produktech a měření vlastností pokožky. V praktické části byla připravena gelová formulace s přidavkem kolagenního hydrolyzátu. Byl testován vliv na hydrataci, transepidermální ztrátu vody, elasticitu a redukci vrásek pomocí neinvazivních metod *in vivo* u 10 dobrovolnic. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že gelová formulace s přidavkem kolagenního hydrolyzátu má pozitivní vliv na hydratační účinek, transepidermální ztrátu vody, elasticitu a redukci vrásek.

Klíčová slova: gelová formulace, stárnutí, hydratace, transepidermální ztráta vody, elasticita, kolagenní hydrolyzát, vrásky

## ABSTRACT

Theoretical part of this work is focused on skin hydration and its aging, then is focused on using synthetic polymers and biopolymers in cosmetic products and measuring of skin properties. In experimental part gel formulation with collagen hydrolysate was prepared. Hydration, transepidermal water loss, elasticity and reduction of wrinkles were tested by using non-invasive *in vivo* methods on 10 volunteers.

Keywords: gel formulation, aging, hydration, transepidermal water loss, elasticity, collagen hydrolysate, wrinkles

## PODĚKOVÁNÍ:

Touto cestou bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě podporovali při psaní této diplomové práce a po celou dobu studia.

Poděkování patří také vedoucímu mé diplomové práce, doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D., za jeho trpělivost, podporu a cenné rady, které mi poskytl během zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D., která organizovala praktickou část měření a všem probandkám, které se zúčastnily testování.

## PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1 KŮŽE A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJÍ VLASTNOSTI.....</b>	<b>11</b>
1.1 STÁRNUTÍ KŮŽE.....	13
1.1.1 Intrinsické a extrinsické stárnutí kůže.....	13
1.1.2 Vrásky.....	15
1.1.2.1 Klasifikace vrásek v oblasti obličeje.....	16
1.1.2.2 Kosmetické přípravky proti vráskám.....	18
1.2 HYDRATACE KŮŽE.....	20
1.2.1 Transepidermální ztráta vody.....	21
1.2.2 Tonus a turgor.....	22
1.2.3 Okluze.....	23
<b>2 POLYMERY JAKO FUNKČNÍ LÁTKY V KOSMETICE.....</b>	<b>24</b>
2.1 PŘÍRODNÍ POLYMERY.....	24
2.1.1 Proteiny v kosmetice.....	25
2.1.1.1 Kolagen.....	25
2.1.1.2 Placentální proteiny.....	26
2.1.1.3 Pšeničné proteiny.....	26
2.1.1.4 Sójové proteiny.....	27
2.1.2 Polysacharidy v kosmetice.....	27
2.1.2.1 Arabská guma.....	28
2.1.2.2 Karagenan.....	28
2.1.2.3 Chitin a chitosan.....	29
2.1.2.4 Kyselina hyaluronová (hyaluronan).....	30
2.2 SYNTETICKÉ POLYMERY.....	31
2.2.1 Polymery jako zahušťovací látky a reologické modifikátory.....	31
2.2.2 Polymery jako čisticí a kondičiační látky.....	32
<b>3 MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ POKOŽKY.....</b>	<b>35</b>
3.1 NEINVAZIVNÍ METODY TESTOVÁNÍ POKOŽKY.....	35
3.1.1 Objektivní metody analýzy vrásek.....	36
3.1.2 Měření elasticity pokožky.....	37
3.1.3 Měření hydratace.....	37
3.1.4 Měření transepidermální ztráty vody (TEWL).....	39
3.2 INVAZIVNÍ METODY TESTOVÁNÍ POKOŽKY.....	40
<b>4 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>42</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>43</b>
<b>5 MATERIÁLY, METODY A POSTUP PRÁCE.....</b>	<b>44</b>
5.1 PŘÍPRAVA KOLAGENNÍHO HYDROLYZÁTU.....	44
5.2 PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMIKÁLIE.....	46
5.2.1 Korneometr CM 825.....	47
5.2.2 Tewametr TM 300.....	48
5.2.3 Reviskometr RV 600.....	48
5.2.4 Visioskop PC 35.....	48

5.2.5	Skin Visiometer SV 700.....	49
5.3	PŘÍPRAVA APLIKAČNÍCH FORMULACÍ S KOLAGENNÍM HYDROLYZÁTEM.....	50
5.4	METODIKA A POSTUP PRÁCE.....	50
5.4.1	Výběr probandů.....	50
5.4.2	Organizace měření .....	51
5.4.3	Princip měření .....	52
5.4.4	Statistické vyhodnocení naměřených dat .....	55
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
6.1	VYHODNOCENÍ HYDRATAČNÍCH ÚČINKŮ GELU .....	56
6.2	VYHODNOCENÍ ÚČINKŮ GELU NA TEWL POKOŽKY .....	60
6.3	VYHODNOCENÍ ÚČINKŮ GELU NA ELASTICITU POKOŽKY .....	63
6.4	VYHODNOCENÍ DRSNOSTI POKOŽKY .....	68
6.5	VYHODNOCENÍ ÚČINKŮ GELU NA STAV VRÁSEK POMOCÍ VISIOSKOPU .....	77
6.6	ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ .....	80
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>83</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>92</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>94</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>95</b>



## ÚVOD

Stárnutí kůže je nevyhnutelný biologický proces, který je důsledkem vnitřních faktorů (genetická predispozice) a také vnějších faktorů (sluneční záření, životní styl). Vnitřní i vnější faktory mají synergický efekt a ovlivňují tak celkový stav kůže. Mohou tedy způsobit kožní změny, jako je hyperpigmentace, suchost nebo ochabnutí kůže, změny textury nebo vznik hrubých vrásek. Stárnutí kůže je tedy předmětem zájmu mnoha výzkumů, které se soustředí na zlepšení kvality života ve stáří, ale také na prevenci vzniku různých onemocnění souvisejících s narůstajícím věkem.

Kosmetické produkty se používají po celém světě již více než tisíc let pro zlepšení vzhledu. V dnešní době dochází díky mnoha výzkumům ke kosmetickým inovacím. V kosmetickém průmyslu se používá mnoho přísad, které mají při lokálním užívání určité účinky na pokožku. Obecně platí, že ačkoliv mohou být účinky malé, jsou významné a při dlouhodobém používání mohou zlepšit vzhled pokožky. Polymery jsou důležitými komponenty v široké škále kosmetických produktů a mají mnoho různých funkcí. Nejvíce používanými polymery v kosmetickém průmyslu jsou syntetické a silikonové polymery, polysacharidy a proteiny. Při návrhu nového kosmetického produktu je důležité brát v úvahu reologické vlastnosti polymerů a zajistit tak stabilitu výsledného produktu.

Výrobky proti stárnutí obecně hydratují a zpevňují pokožku. Různé přísady v kosmetických produktech mohou mít také pozitivní efekt na vyhlazení vrásek a na celkové zlepšení reliéfu pokožky. Existuje mnoho metod, které zkoumají stav a povrch pokožky. Díky těmto metodám je možné zjistit množství vody v pokožce, stav kožní bariéry, elasticitu a pomocí profilometrických metod lze také zkoumat reliéf pokožky a množství vrásek nebo kožních linií.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 KŮŽE A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJÍ VLASTNOSTI

Kůže je orgán, který tvoří asi 12-16 % celkové tělesné hmotnosti a jeho plocha se pohybuje v rozmezí 1,5-2,0 m<sup>2</sup> u dospělého člověka. Na kůži působí vlivy jak vnějšího, tak i vnitřního prostředí organismu. Skládá se ze tří vrstev: *epidermis* (zevní vrstva), *dermis* (střední vrstva) a *hypodermis* (podkožní vrstva). *Epidermis* obsahuje několik vrstev epitelových buněk a podílí se na mechanické odolnosti kůže. Je téměř nepropustná pro vodu a působí jako hlavní bariéra proti pronikání mikroorganismů. *Dermis* tvoří vazivo a nalezneme zde kolagenní a elastická vlákna. Zároveň se zde nachází sensorická zakončení. *Hypodermis* je také tvořena vazivem, které je upevněno ke kostře nebo svalům. Obsahuje také tukové buňky, jejichž funkcí je izolace a mechanická odolnost kůže a zároveň tvoří zásobárnu energie.

Kůže plní mnoho důležitých funkcí nezbytných pro život člověka. Vykonává funkci ochrannou (bariérovou), smyslovou, sekreční, resorpční (vstřebávací) a také respirační (dýchací) [1, 2, 6].

### Ochranná (bariérová) funkce

Vnější vrstvy kůže musí chránit organismus před mechanickými vlivy, UV zářením a volnými radikály a mikroorganismy. Je známo, že různé oblasti kůže obsahují odlišné druhy mikroorganismů, např. oblasti jako jsou podpaží nebo prsty mohou dosáhnout počtu 10<sup>7</sup> bakterií na cm<sup>2</sup>, zatímco suché oblasti (lokty, trup) obsahují 10<sup>2</sup> nebo méně bakterií na cm<sup>2</sup>. Mnoho vnějších faktorů může ovlivnit ekosystém kůže, což má za následek změny chování mikroorganismů. Mezi vnější faktory patří teplota, vlhkost a vystavení slunečnímu záření. Vnitřní faktory zahrnují věk, pohlaví, užívání léků (antibiotika, steroidy) a také typ používaných kosmetických přípravků. Několik studií také popsalo vzájemné interakce mezi mikroorganismy na kůži. Důležitou funkcí je také zabránit ztrátě vody z kůže. Za bariérové vlastnosti zodpovídá zrohovatělá vrstva kůže (*stratum corneum*), která se skládá z plochých buněk, tzv. korneocytů, upevněných v lipidové matici. Korneocyty jsou vyplněny keratinem, který je hydrofilní. Je tedy nezbytné o kůži pečovat a udržovat tak správnou funkci kožní bariéry. K tomu jsou používána různá kosmetická zvlhčovačla a hydratační krémy (humektanty), které zabraňují vysušování a zlepšují tak kožní bariéru. Termínem „zvlhčovačlo“ označujeme materiál, který vyhlazuje povrch pokožky, ta je zároveň i jemná na dotek. Humektanty obsahují vodu a změkčující látky, přičemž zvyšují hydrataci pokožky a zároveň brání odpařování vody.

Bariérová funkce kůže může být narušena působením povrchově aktivních látek, které jsou používány v kosmetických přípravcích z důvodu stabilizace disperze (emulze), ale využívají se také v čistících prostředcích. Pokud je kůže často vystavena těmto látkám, může dojít k poškození kožní bariéry, což má za následek vysychání pokožky [3, 4, 5, 7].

### **Resorpční (vstřebávací) a respirační (dýchací) funkce**

Pomocí vývodů potních a mazových žláz dochází ke vstřebávání látek do kůže a odtud dále do hlubších vrstev. Látky, které jsou rozpustné v tucích, pronikají do kůže pomocí mazových a potních žláz a ve vodě rozpustné látky pronikají do kůže cestou potních žláz. Pro většinu látek není kůže snadno propustná, nicméně při porušení rohové vrstvy pokožky dochází ke zvýšení propustnosti.

Kůže se účastní také dýchání, dochází tedy k výměně kyslíku a oxidu uhličitého.

### **Smyslová funkce**

V kůži se nachází mnoho receptorů (nervových zakončení), které reagují na chlad, teplo, tlak nebo bolest. Vnímání bolesti je velice důležité, jelikož nám umožňuje vyvarovat se různým úrazům. Tělíška, která vnímají chlad, jsou nejcitlivější při teplotě 25 °C, naopak tělíška pro vnímání tepla reagují nejvíce při teplotách mezi 30 až 40 °C.

### **Sekreční funkce**

Kůže je důležitým orgánem podílejícím se na vylučování chemických látek z těla pomocí potních a mazových žláz. Sekrety těchto žláz (pot a kožní maz) přispívají k ochraně kůže. Denně dojde k vyloučení přibližně 2 g kožního mazu, přičemž mužská kůže ho produkuje více než kůže u žen. V mazu se nachází tzv. squaleny (nenasycené mastné kyseliny, triglyceridy a vyšší alkoholy). Na povrchu pokožky vytvoří maz lipidový film, jehož funkcí je ochrana kůže před vysycháním a také ochrana před bobtnáním, pokud dojde ke styku s vodou. Pot spolu s mazem tvoří hydrolipidový film na povrchu pokožky. Pot je složen z vody, soli, kyseliny mléčné a močoviny. Každý den dojde k vyloučení asi 500 až 1000 ml potu [1, 6].

## 1.1 Stárnutí kůže

Proces stárnutí začíná už naším narozením. Jedná se o složitý a nepřetržitý proces, na který má vliv dědičnost a také faktory prostředí. Nedávné studie poukazují na fakt, že stárnutí kůže u mužů a u žen se liší, stejně tak je potvrzeno, že se proces stárnutí odlišuje u různých etnických skupin [8, 9]. Odhaduje se, že přibližně 70 % starších lidí trpí kožními problémy, které ovlivňují jejich každodenní život. Stárnutím dochází tedy k jistým změnám vzhledu a funkce kůže. Suchá pokožka postihuje 59-85 % lidí starších 64 let a může mít za následek praskání a svědění, kdy vliv mohou mít jak vnější, tak i vnitřní faktory. Mezi faktory vnějšího prostředí patří vlhkost, druh oblečení nebo čisticí prostředky, zatímco vnitřními faktory může být konzumace alkoholu, kouření, špatné stravování, nemoc nebo užívání léků. Studie poukázaly na časnější nástup vrásek a ochablosti pleti u Kavkazanů, kdy zejména kavkazské ženy vykazovaly výraznou tvorbu vrásek ve spodních částech obličeje. V další studii při porovnání tvorby vrásek mezi japonskými a čínskými ženami bylo zjištěno, že čínské ženy měly v oblasti kolem očí výraznější vrásky než japonské ženy [9, 10].

### 1.1.1 Intrinsické a extrinsické stárnutí kůže

Stárnutí kůže lze rozdělit do dvou kategorií: *intrinsické* (vnitřní) a *extrinsické* (vnější). *Intrinsické stárnutí* je nevyhnutelné. Dochází k nižší produkci kolagenu a elastinu, což má za následek snížení elasticity pokožky. Dochází také k úbytku počtu buněk. Rychlost intrinsického stárnutí je individuální u každého člověka a záleží tedy na genetických predispozicích. Je však velice obtížné oddělit intrinsické stárnutí od řady dalších faktorů jako je kouření, vystavení slunečnímu záření, konzumace alkoholu a celkového životního stylu, které silně přispívají ke stárnutí. Předpokládá se, že genetika neovlivňuje proces vnitřního stárnutí více než ze 3 %. Typickými projevy tohoto typu stárnutí jsou jemné vrásky, suchost, podrážděnost a ochablost pokožky. Významný vliv mají volné radikály, které jsou důležitou součástí metabolismu a jsou nezbytné pro život díky jejich schopnosti ničit mikroby. Vnitřní stárnutí závisí na homeostáze mezi produkcí volných radikálů a účinností ochranných systémů. *Extrinsické stárnutí* neboli photoaging je naopak způsobeno vnějšími faktory, jako je cigaretový kouř, znečištění, ale největší vliv má vystavení UV záření. Neustálé vystavování UV záření brání tvorbě nového kolagenu a může vést také k degradaci elastinových vláken, což způsobuje předčasné snížení elasticity pokožky.

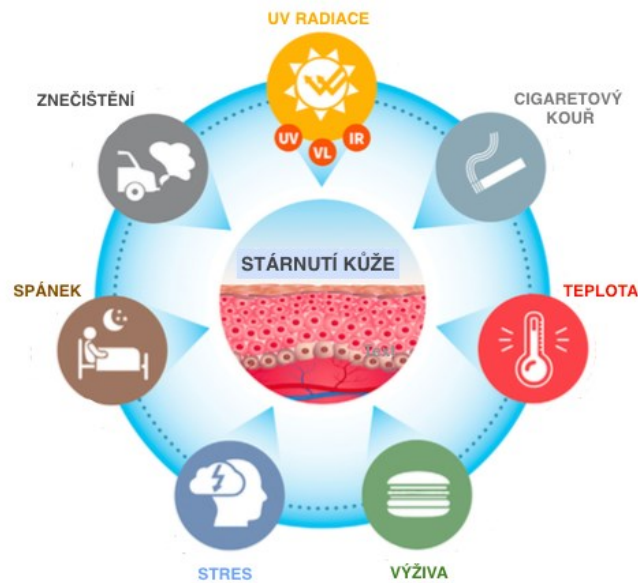
Typickými projevy vnějšího stárnutí jsou hluboké vrásky, suchá kůže a nadměrná pigmentace [8, 11]. Albert Kligman poprvé v roce 1969 předložil, že kromě vnitřních faktorů

ovlivňuje stárnutí také sluneční záření. V Evropě a v Číně proběhly dvě epidemiologické studie, které poskytly významné údaje ve vztahu mezi stárnutím kůže a působením slunečního záření u dvou populací různého etnického původu. U Kavkazanů je v jakémkoliv věku prevalence poruch pigmentace silně spojena s působením slunečního záření. U Číňanů byl také prokázán vliv slunečního záření na projevy stárnutí v oblastech obličeje. Ultrafialové záření představuje 5 % z celkového slunečního spektra a je rozděleno do tří skupin, v pořadí od nejkratší po nejdelší vlnovou délku:

- UVC (100-280 nm), které se nedostane až k pokožce, protože je absorbováno ozonovou vrstvou
- UVB (280-315 nm), které proniká do povrchových kožních vrstev a poškozují kůži (rakovina a spálení kůže)
- UVA (315-400 nm), které proniká hlouběji do kůže než UVB a má za následek stárnutí a vznik vrásek

Viditelné světlo (400-740 nm) představuje 50 % z celkového slunečního spektra a infračervené záření tvoří zbývajících 45 %. Lze konstatovat, že UV záření lze považovat za jeden z nejlépe studovaných environmentálních faktorů přispívajících ke stárnutí kůže.

Cigaretový kouř má také významný vliv na vnější stárnutí. Epidemiologické studie dokazují vztah mezi kouřením cigaret a stárnutím kůže. Při pravidelném kouření se projevuje více vrásek v oblasti obličeje, zejména kolem úst a očí. Bylo zjištěno, že těžcí kuřáci mají hyperpigmentaci ústní sliznice nazývanou „kuřácká melanóza“. Studie potvrdily, že kouření podporuje tvorbu vrásek a dochází také k pigmentovým změnám kůže. Jednou inhalací z cigarety dostáváme do těla přibližně 3.800 škodlivých chemických látek, mezi které řadíme zejména nikotin, oxid uhelnatý, dehet, amoniak, rtuť, olovo a kadmium. Obrázek 1 popisuje faktory, které ovlivňují stárnutí kůže [12].



Obrázek 1: Faktory ovlivňující stárnutí kůže [12]

### 1.1.2 Vrásky

Stárnutí je nevratný jev, během kterého mechanické vlastnosti kůže (napětí a elasticita) s věkem klesají, což má za následek vznik vrásek a ochabnutí kůže. Vznik vrásek úzce souvisí s množstvím a strukturou kolagenových vláken a elastinu v *dermis*, jelikož tato vlákna přispívají k mechanickým vlastnostem pokožky a k její elasticitě. Proti vráskám se používají kosmetické přípravky obsahující fytochemikálie, které produkují rostliny. Fytochemikálie mají antioxidační účinky a řadíme zde flavonoidy, tokoferoly, fenolové kyseliny nebo monoterpeny. *Veronica officinalis* je bylinná rostlina, která se v některých částech Evropy používá jako náhražka čaje a je považována za léčivou bylinu. Tato rostlina je bohatým zdrojem fytochemikálií, působí protizánětlivě a má antioxidační účinky. V jedné studii v roce 2017 byly na ženách testovány účinky této rostliny a její vliv na vznik vrásek. Tato studie byla prováděna po dobu 56 dní za použití krému, který obsahoval extrakt z testované rostliny. Ze získaných výsledků bylo patrné, že produkt s extraktem snížil procento plochy a délky vrásek o 18 % [13, 14].

Velký úspěch při redukci vrásek v oblasti obličeje má botulotoxin. Tato látka se injekčně aplikuje pod kůži přímo do svalů a způsobuje jejich dlouhodobé zatuhnutí. Skutečnost, že dojde k takovému dramatickému účinku na vzhled vrásek, dokazuje, že hluboké vrásky nejsou pouze jevem změny povrchu pokožky, ale vliv má také podkožní tuk a svalové vrstvy [15].

Vrásky v oblasti obličeje jsou nejvíce charakteristickými morfologickými změnami pozorovanými na povrchu kůže. Díky tomu bylo vyvinuto mnoho kvantitativních metod, které se využívají pro analýzu vrásek. Využívá se zejména vizuální hodnocení obličeje (čelní a boční pohledy) a také hodnocení různých aspektů vnějšího stárnutí (jemné a hluboké vrásky nebo drsnost kůže). Přestože je vizuální hodnocení spíše subjektivní, metody se při klinickém testování produktů na vyhlazení vrásek často využívají. Jako doplněk k vizuálním hodnocením bylo použito vyhodnocení vrásek pomocí silikonových replik. Pomocí těchto replik lze získat mikrorelief kůže a hluboké vrásky. K analýze replik je v dnešní době k dispozici mnoho technik pracujících na různých principech (mechanická a laserová profilometrie, dvourozměrná analýza obrazu, konfokální mikroskopie) [16].

### ***1.1.2.1 Klasifikace vrásek v oblasti obličeje***

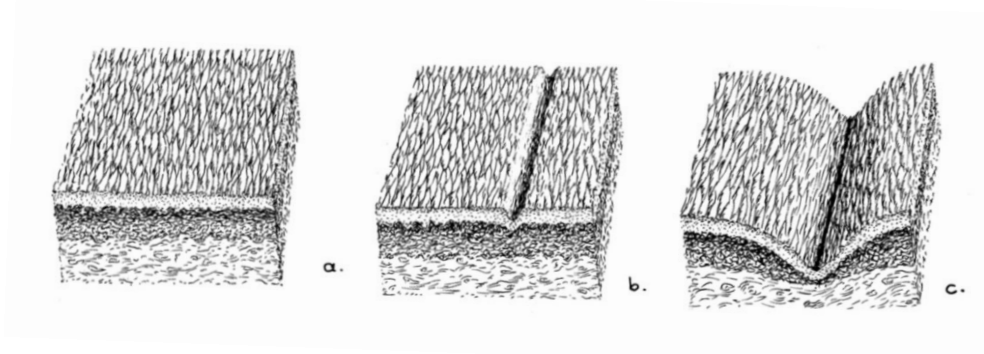
Léčba vrásek v oblasti obličeje se stala hlavním problémem mnoha dermatologů a plastických a estetických chirurgů. Lékaři mohou využít vysokovýkonné lasery, které zasahují hlouběji do kůže. Hlavním účelem je předcházet vzniku vrásek a zároveň oddalovat jejich vznik pomocí mnoha kosmetických přípravků, které zlepšují stav pleti. Jedná se o přípravky s obsahem vitaminů, flavonoidů, betakarotenu nebo např. retinolu. Důležité je také používání krémů s UV filtry. Vrásky dělíme do dvou skupin: *stařecké a mimické*.

*Stařecké vrásky* jsou způsobeny vnitřním stárnutím, úbytkem vody v pokožce, horším stavem kolagenu a elastinu a působením UV záření. Jedná se o jemné linie vrásek, které se mohou časem rozšiřovat do více směrů a jsou pouze na povrchu, lze je tedy ošetřit pomocí chemického peelingu nebo dermabraze. Pro korekci stařeckých vrásek se používá metoda, při které se aplikují výplňové materiály (tzv. fillery). Tyto materiály obsahují kyselinu hyaluronovou, která není živočišného původu a díky tomu není nutné provádět alergologické testy před její aplikací v porovnání s kolagenovými výplněmi, které se používaly již dříve. Efekt této aplikace trvá přibližně 10-18 měsíců. Kyselinu hyaluronovou lze aplikovat i ve formě gelu, kdy se aplikuje na kůži. V současné době se nejvíce používají kombinace invazivních metod, např. současné použití laseru, výplňových materiálů a injekce botulotoxinu A.

*Mimické vrásky*, běžně označovány jako čáry nebo rýhy, jsou tvořeny hlubokým zvrásněním kůže díky pohybu mimických svalů. Nejčastěji se vyskytují na čele, kolem očí, v rozích úst, na kořeni nosu nebo glabelární linii, což je linie mezi obočím a je výsledkem častého mračení. Mimické vrásky lze odstranit aplikací botulotoxinu A nebo jinými výplňovými materiály aplikovanými injekcí. Botulotoxin je neurotoxická látka, kterou produ-



kuje bakterie *Clostridium botulinum*. Aplikuje se pomocí jehly a efekt zákroku se objeví do 2 týdnů. Po 6-8 měsících je třeba zákrok znovu opakovat. Obrázek 2 popisuje změnu textury kůže v oblasti obličeje [1, 17].



Obrázek 2: Změna textury kůže v oblasti obličeje: (a) jemná textura, (b) mimická vráska, (c) kožní záhyb [17]

### Klasifikace vrásek podle Fitzpatricka

Klasifikace podle Fitzpatricka je zaměřena především na elastózu (ztráta elasticity), zatímco hloubka vrásek není brána v úvahu. Analýza hloubky vrásek, která není zahrnuta ve Fitzpatrickově stupnici, je důležitá při augmentaci vrásek pomocí výplňových materiálů.

- Typ I udává velmi jemné vrásky a mírně zvýrazněné linie kůže
- Typ II zahrnuje jemné až středně hluboké vrásky, u tohoto typu je zřetelná papulární elastóza a dyschromie
- Typ III popisuje hluboké vrásky, kdy se projevuje těžká multipapulární elastóza [17]

### Klasifikace vrásek podle Glogaua

Nezahrnuje mimické vrásky nebo kožní záhyby. Glogau vytvořil systém pro kategorizaci rozsahu poškození kůže v oblasti obličeje vlivem působení UV záření, tedy vystavení slunečnímu světlu a navrhl rozdělení vrásek na typ I, II, III a IV.

- Typ I zahrnuje mírné změny pigmentace obličeje, bez výskytu vrásek a projevů keratózy, pleť vypadá zdravě a atraktivně
- Typ II popisuje vrásknění obličeje při pohybu svalů, tedy při usmívání nebo mračení
- Typ III se vyskytuje u osob, u kterých je kůže vráscitá i v klidu, jsou také patrné změny pigmentu

- Typ IV je charakteristický silně vrásčitou kůží, často je doprovázen rakovinou kůže

Pro pacienta s kůží typu I je vhodná a dostatečná péče pomocí jemného peelingu. Hluboký peeling by naopak mohl způsobit více škody než užítku. Pro pacienta s kůží typu II nebo III se používá povrchový nebo středně hluboký peeling a pacient s typem IV je vhodným kandidátem pro ošetření hlubokým peelinglem.

### Klasifikace vrásek podle Hamiltona

Jedinou klasifikací, která zahrnuje vrásky v oblasti obličeje, rýhy a kožní záhyby, zavedl Hamilton a je uvedena v Tabulce 1 [17, 18].

Tabulka 1: Klasifikace vrásek podle Hamiltona [18]

Stárnutí v oblasti obličeje	Klinická morfologie	Poloha tkáně	Klinická poloha	Etiologie (příčina vzniku)
A	Záhyby	Svalová	Krk, oční víčka, nasolabiální rýha	Gravitace, pokles napětí
B	Rýhy	Muskulokutánní	Čelo, linie úst	Výrazy obličeje, které se opakují
C	Vrásky	Kožní	Tváře, mimické vrásky zevního koutku oka	Intrinsické stárnutí, photoaging
D	Kombinace			

#### 1.1.2.2 Kosmetické přípravky proti vráskám

Každý rok jsou uvedeny na trh nové kosmetické přípravky pro péči o pleť. Je zřejmé, že lokální léčba pomocí kosmetických přípravků může pomoci zlepšit určité problémy během stárnutí pleti, např. pigmentové skvrny, drsnost povrchu pokožky, tón pleti nebo zarudnutí. Kosmetické přípravky proti vráskám nalezneme ve formě klasických a jednoduchých přípravků, tedy od různých druhů vitaminů, antioxidantů, lokálních a orálních kosmetických a farmaceutických produktů až po chirurgické a laserové zákroky. Tyto kosmetické produkty jsou přísně testovány. V současné době existuje mnoho druhů metod, díky kterým je možné zkoumat účinky produktů proti vráskám. Je však zřejmé, že neexistuje univerzální produkt, který by dokázal zlepšit všechny problémy pleti, např. keratóza, purpura nebo poruchy pigmentace lze zmírnit pouze cílenou léčbou pomocí specifických složek [16, 20, 21]. Podle druhu jsou kosmetické výrobky směsí látek o různém počtu a také koncentrace. Krém proti vráskám může obsahovat 30-40 složek. Většina přípravků je však složena z 6-15 druhů látek. Díky nevyhovujícím toxikologickým vlastnostem a účinkům, které nejsou

pro kosmetiku povoleny, je pro kosmetiku v EU vyřazeno přes 1.330 látek. Jedná se o živočišné hormony, léčiva, výtažky některých druhů rostlin a jiné další látky [22].

### *Zvlhčovač*

Klasická zvlhčovač se používají k ošetření suché kůže. Do této kategorie řadíme polyoly (glycerin, propylenglykol, sorbitol), močovinu, kyselinu mléčnou a její soli, kyselinu hyaluronovou, pantenol, aminokyseliny a proteiny (kolagen a proteiny z pšenice, rýže, hedvábí, sojových bobů a ovsu). V současné době se jako zvlhčovač používají sofistikovanější peptidy a proteiny. Obecně se jedná o lipofilní kvartérní N-alkylové deriváty proteinů nebo malých polypeptidů s dlouhými postranními řetězci ke zvýšení lipofilního charakteru a tedy lepší percutánní absorpci. Pomocí zvlhčovadel lze zlepšit hydrataci kůže a snížit transepidermální ztrátu vody (TEWL), což má za následek snížení vrásek [16, 20]. Zvlhčovač se obvykle aplikují pomocí krému nebo pleťového mléka, které obsahují lipidové bariéry kůže (ceramidy, cholesterol, mastné kyseliny), humektanty vázající vodu (glycerin, hyaluronát sodný, aminokyseliny, proteiny, laktát, močovinu) a ochranné prostředky (přírodní a syntetické polymery, vosky, rostlinné a minerální oleje) [21].

### *Retinoidy*

Retinoidy, souhrnný název pro kyselinu retinovou a sloučeniny vitamínu A, zahrnují retinaldehyd a retinol. V mnoha klinických studiích byl prokázán pozitivní vliv na redukci vrásek při lokální aplikaci retinolu. Bylo rozsáhle zkoumáno použití kyseliny retinové jako přísady proti stárnutí a její účinnost byla vědecky prokázána. Kyselina retinová má vliv na redukci jemných vrásek. Typické vedlejší účinky lokálního použití kyseliny retinové (retinoidní dermatitida) se vyskytují u většiny pacientů, jedná se o šupinatění a svědění kůže. Bylo zjištěno, že retinol, který se metabolizuje na retinaldehyd a kyselinu retinovou, vykazuje menší iritaci než kyselina retinová, ale musí být použit ve vyšší koncentraci. Při potlačování vzniku vrásek se ukázal aktivní také retinaldehyd [16, 20, 21].

### *Vitamíny*

Mnoho vitamínů, včetně vitamínů A, C, D a E, tvoří životně důležitou část v metabolických procesech. Retinoidy (třída vitamínu A) prokazují nejlepší účinek na vrásky. Vitamin A se v kosmetických přípravcích používá v množství 0,5-1,0 % a uplatňuje se především v pleťových přípravcích na regeneraci buněk. Byla provedena studie účinků 5% vitamínu E v rozsahu čtyř týdnů, kdy se ve formě krému aplikoval v oblasti paty chodidla. Výsledky ukázaly sníženou drsnost kůže a menší hloubku vrásek v oblastech, kde byl krém apliko-

ván. Roste také počet kosmetických produktů s vitamínem C, u kterých jsou kladeny požadavky na redukci vrásek. Vitamin C také podporuje tvorbu elastinu a kolagenu v kůži. Nicméně čistý vitamin C pro kosmetické použití není vhodný, a proto se používá stabilnější forma, tedy *Ascorbyl Palmitate*, který je připraven chemickou syntézou [16, 20].

#### *Alfa-hydroxy a beta-hydroxy kyseliny*

Alfa-hydroxy kyseliny jsou přírodní látky s hydroxylovou skupinou na druhém (alfa) uhlíku, zatímco beta-hydroxy kyseliny jsou přírodní látky s hydroxylovou skupinou na třetím (beta) uhlíku. Mezi alfa-hydroxy kyseliny, které jsou nejčastěji používané v kosmetice, patří kyselina citrónová, jablečná, vinná, mléčná a glykolová. Do skupiny beta-hydroxy kyselin řadíme kosmeticky významnou kyselinu salicylovou, která se používá k ošetření zrohovatělé kůže. Denní aplikace kyseliny glykolové nebo mléčné v koncentracích 5-15 % odstraňuje povrchovou epidermální vrstvu kůže a stimuluje produkci glykosaminoglykanů a kolagenu. Vyšší koncentrace těchto kyselin se používají jako chemické peelings a byl prokázán i jejich účinek na zmírnění vrásek [16, 20, 21, 22].

V dnešní době existují produkty, které se používají jako prevence výskytu vrásek způsobených UV světlem. Používání opalovacích krémů může minimalizovat tvorbu vrásek a vnější stárnutí. Prokazatelné účinky na vrásky mají zejména retinoidy nebo alfa-hydroxy kyseliny při lokálním použití. Lze tedy říci, že neustálý vývoj kosmetických produktů proti vráskám, dosahuje stále větších pokroků [20].

## **1.2 Hydratace kůže**

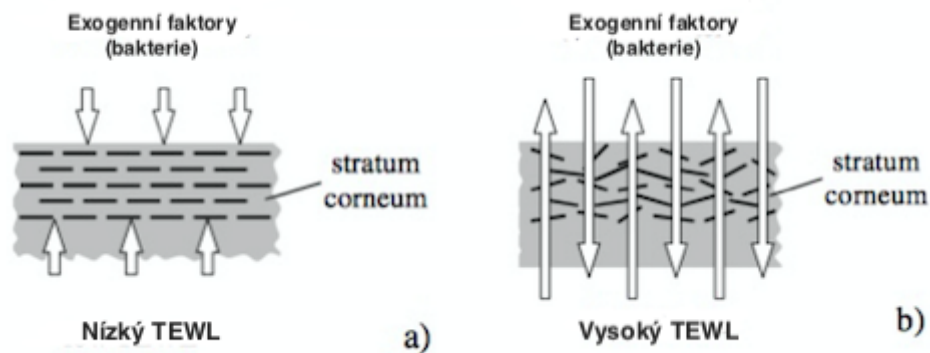
Hydratace je klíčovým faktorem kůže, který ovlivňuje její fyzikální a mechanické vlastnosti. *Stratum corneum* (SC) je odpovědná za bariérovou funkci, tato vrstva také udržuje vodu v pokožce. Hydratace může ovlivnit mechanické vlastnosti pokožky z hlediska pevnosti a pružnosti. Studie potvrdily, že obsah vody v SC je skutečně primárním faktorem, který ovlivňuje flexibilitu kůže. Suchá kůže je velice častým problémem, který může být způsoben různými faktory, např. nízkou teplotou okolního prostředí, nízkou vlhkostí, působením chemických látek a mikroorganismů nebo vyskytujícím se ekzémem. Pro zlepšení a udržení funkce kožní bariéry jsou využívány hydratační přípravky, které se používají k léčbě suché pokožky. Hydratace funguje tak, že zabraňuje nebo omezuje odpařování vody z pokožky, což umožňuje rehydrataci kůže zevnitř. Existují kosmetické přísady, které se používají jako zvlhčovačla, okluziva, humektanty a emolienty. Tyto látky obsahují podobné složky jako SC a často se používají v kombinaci s jinými přísadami. Okluziva snižují tran-

sepidermální ztrátu vody (TEWL) vytvořením hydrofobního bariérového filmu na povrchu kůže a tím dojde k zabránění odpařování vody z SC. Humektanty jsou hygroskopické látky, které vážou vodu a vlhkost. Emolienty jsou látky, které zůstávají na povrchu kůže, kde vytváří lubrikační vrstvu a udržují tak kůži měkkou a hladkou [23, 24].

**Přirozený hydratační faktor NMF (natural moisturizing factor)** je tvořen speciálními zvlhčujícími látkami, které nalezneme v SC. Mezi tyto látky řadíme aminokyseliny, laktáty a močovinu. NMF se tvoří důsledkem degradace proteinu filaggrinu a tato tvorba je regulována obsahem vlhkosti v SC. Voda zadržována hygroskopickými látkami v SC je rozhodujícím faktorem při zachování pružnosti a deskvamace pokožky [20].

### 1.2.1 Transepidermální ztráta vody

Transepidermální ztráta vody (TEWL) je ztráta vody z povrchu pokožky prostřednictvím vnější difúze. Zvýšené hodnoty TEWL odráží poškození bariérové funkce [16]. Pokud na pokožku působí některá dráždivá kosmetická složka, je poškozena bariérová funkce a zvyšuje se množství vodní páry, což má za následek zvýšení TEWL. Jedinci s citlivou pokožkou vykazují zvýšené transepidermální ztráty vody, vyšší hodnoty pH a nižší produkci kožního mazu. Avšak snížení transepidermální ztráty vody je možné díky aplikaci vhodného hydratačního přípravku, tím dojde ke zvýšení množství vody v SC a k vyhlazení povrchu pokožky. Některé emolienty, které vykazují silný lipofilní charakter, jsou definovány jako okluziva. Jedná se o látky, které zůstávají na povrchu pokožky a snižují tak transepidermální ztrátu vody [20]. Čím dokonalejší je bariérová funkce pokožky, tím vyšší je obsah vody a nižší transepidermální ztráta vody. Pokud je kožní bariéra narušena, mohou se objevit poruchy kůže, např. atopická dermatitida. Měření TEWL umožňuje odhalit narušení ochranné funkce pokožky v rané fázi. Normální pleť umožňuje ztrátu vody pouze v malém množství, v případě atopické kůže jsou ztráty vody mnohem vyšší. Obrázek 3 popisuje správnou a narušenou bariérovou funkci kůže, při které dochází k větším ztrátám vody z kůže. Hodnoty TEWL nezávisí pouze na typu kůže, ale také na jiných podmínkách. Důležitý je čas měření a také roční období, během kterého měření probíhá (rozdíly v létě a zimě). SC je nejen účinnou bariérou proti difúzi vody, ale tvoří také bariéru proti mikrobům a chemickým látkám [25].



Obrázek 3: Schéma bariérové funkce SC: a) zdravá kůže, b) porušená kůže [25]

### 1.2.2 Tonus a turgor

Jedná se o kritéria, která nám slouží k posouzení stavu pleti, tedy zda se jedná o pleť mladou či stárnoucí. Tonus a turgor popisují stav vnitřního napětí kůže. *Tonus* udává elasticitu a pružnost kůže a je ovlivněn elastickými a kolagenními vlákny. U mladé pleti je dostatečné množství elastinu, a proto je tonus ideální, a je také dostatek vázané vody, a proto je ideální i turgor. Během stárnutí se však snižuje množství kyseliny hyaluronové, elastinu a kolagenu a dojde tedy i ke snížení tonusu a turgoru. *Turgor* udává napětí a je dán množstvím vody obsaženým v kůži [1, 22]. Tonus a turgor jsou spolu úzce spjaty, a proto se testují společně. Vlivem stárnutí dochází k úbytku vody v kůži (snížení turgoru) a zhoršuje se kvalita elastických a kolagenních vláken (snížení tonusu) a díky tomu se zhoršuje pružnost kůže. Tonus a turgor se posuzuje podle odporu, který klade kůže na přiložený prst, ten zároveň vyvíjí mírný tlak. K posuzování se používají dvě metody, první z nich je kompresně rotační test a druhým je test kožní řasy.

*Kompresně rotační test* provádíme přiložením bříška palce do středu tváře pod lícní kost a následně palcem mírně otáčíme. Pokud se nevytvoří vějíř vrásek, tak je test negativní (normotonie). Pokud se vytvoří vějíř vrásek, který ale po oddálení palce ihned mizí, test se jeví jako lehce pozitivní (hypotonie). Při vytvoření výrazného vějíře je test silně pozitivní (atonie).

*Test kožní řasy* provádíme stisknutím kožní řasy bočních partií tváře dvěma prsty. Pokud se nepodaří vytvořit kožní řasu, tak se test jeví jako negativní (dobrý tonus a turgor). Pokud se kožní řasa pomalu vrací, tak má test slabě pozitivní výsledek a jakmile se kožní řasa vrací velice pomalu, test je silně pozitivní [1].

### 1.2.3 Okluze

Funkcí okluze je snížit množství odpařené vlhkosti z kůže. Okluzivní účinek, zabraňující odpařování vnitřní vlhkosti, je funkcí emolientů (změkčovadel). Jedná se tedy o vytvoření nepropustného filmu, který mohou vytvořit vehikula obsahující tuky nebo polymerní oleje. Okluze je díky své jednoduchosti široce využívána ke zvýšení penetrace aplikovaných léčiv, nezvyšuje však absorpci všech látek. Může zvýšit penetraci nepolárních molekul rozpustných v lipidech, ale v praxi není zvýšení míry penetrace aplikovaného léčiva kůží zdaleka jednoduché. Bariérovou funkci zajišťuje SC, kde se nachází lipoidní a hydrofilní oblasti, z toho důvodu hrají fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv, jako je struktura a molekulová hmotnost, důležitou roli při určování absorpční schopnosti látek.

Nishiyama a kol. testovali okluzivní efekt různých druhů olejů a zvlhčovadel a došli k závěru, že mnohem vyšší okluzivní účinek vykazují oleje s nižší polaritou. Výsledek testování prokázal, že nejnižší okluzivní efekt mezi zvlhčovadly má glycerin, avšak záleží na hodnotách koncentrace použitého zvlhčovadla. Zdravá SC obsahuje obvykle 10-20 % vody. Okluze může zamezit difúzní ztrátě vody z pokožky a tím zároveň zvýšit hydrataci SC. I krátká expozice (30 min) může vést k významně zvýšené hydrataci SC, nicméně při delší expozici (24 h) může dojít k morfologickým změnám na povrchu kůže a tedy k poškození SC. Zkoumání dopadu okluze na bariérovou funkci jsou důležité v oborech fyziologie kůže, patologie, farmakologie a dermatologie [26, 27].

## 2 POLYMERY JAKO FUNKČNÍ LÁTKY V KOSMETICE

Polymer je makromolekula, která se skládá z molekul s dlouhými sekvencemi jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin atomů navzájem spojených primárními, obvykle kovalentními vazbami, těmto atomům říkáme monomery. Makromolekuly se vytvářejí vzájemným spojením molekul monomeru pomocí chemických reakcí, tento proces je známý jako polymerace. Struktura makromolekul může být lineární, cyklická, rozvětvená nebo zesíťovaná [28].

Polymery tvoří důležitou složku kosmetických přípravků a plní zde mnoho různých funkcí. Obvykle jsou klasifikovány podle jejich použití, jako jsou zahušťovadla, filmtvorné látky nebo humektanty. Zahušťovadla se používají k úpravě viskozity produktů, aby se daly tyto produkty snadno používat. Přírodní polymery a pryskyřice se používají od počátku 40. let 20. století jako pojiva, zahušťovadla a filmtvorné látky. Přidávají se do mnoha kosmetických přípravků, ale často se používají zejména kvůli rostoucí poptávce spotřebitelů po přírodních produktech. Při použití polymerů do kosmetických přípravků je důležité zajistit jejich stabilitu [29].

### 2.1 Přírodní polymery

V celé historii se lidé do značné míry spoléhali na přírodní zdroje, jako je vlna, kůže, hedvábí a celulóza. Dnes mohou být takové přírodní polymery přizpůsobeny tak, aby vyhovovaly specifickým potřebám. Biopolymery mohou být přirozeně se vyskytující materiály u rostlin, zvířat, bakterií a hub nebo mohou být syntetizovány chemicky z biologických materiálů, mezi které patří aminokyseliny, cukry, tuky nebo oleje. Využití biomateriálů je široké, nachází uplatnění v lékařství, kosmetice, potravinářství a používají se také jako absorbenty nebo biosenzory. Velké procento kosmetických přípravků obsahuje biopolymery, používají se např. do krémů proti stárnutí, zubních past nebo do přípravků pro péči o vlasy. Použití biopolymerů v kosmetice je výhodné, protože jsou biokompatibilní (nevyvolávají negativní reakci organismu), biodegradabilní (rozkládají se na produkty, které lze vyloučit z těla) a šetrné k životnímu prostředí a jsou klasifikovány na proteiny a polysacharidy. Jak zvířata, tak i rostliny poskytují vhodné proteinové složky pro přípravu kosmetických přísad. Je známo, že peptidy, které se přidávají do kosmetických produktů typu zvlhčovačů, snižují známky stárnutí v oblasti obličeje. Polysacharidy se používají v kosmetice dlouhodobě díky své nízké ceně a snadné dostupnosti. Řadíme mezi ně celulózu, chitin, dextrin, pektin, xanthanovou gumu, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát nebo agar,



jejich využití v kosmetických aplikacích je široké. Kosmetické přípravky obecně obsahují kombinaci vody, emulgátoru, konzervačního činidla, zahušřovadla a také stabilizátory barvy, vůně a pH [30].

### 2.1.1 Proteiny v kosmetice

Počet, typ a sekvence základních aminokyselin, které tvoří všechny přírodní proteiny, jsou faktory, které ovlivňují jejich biologické vlastnosti. Většina kosmetických přípravků je založena na bázi vody, a proto by všechny jejich složky měly být rozpustné ve vodě, ačkoliv mnoho proteinů je ve vodě nerozpustných. Rozpustnou formu lze získat hydrolýzou, enzymatická hydrolýza umožňuje štěpení proteinů a zabraňuje možné degradaci aminokyselin a tvorbě nebezpečných vedlejších produktů. Aby byly proteiny vhodné pro začlenění do kosmetických produktů na bázi vody, musí být převedeny na rozpustnou formu za pomoci hydrolýzy. Proteinové hydrolyzáty izolované z kolagenu nebo rostlinných surovin jsou cennou součástí přípravků pro péči o vlasy díky jejich filmotvorným vlastnostem, které zvyšují lesk. Proteiny významně chrání strukturu vlasu. Kolagen, placentální proteiny, kyselina hyaluronová, pšeničné a sójové proteiny jsou příklady proteinů užívaných v kosmetice [30].

#### 2.1.1.1 Kolagen

Kolagen se stal dobře dostupným živočišným proteinem, který poskytuje značné výhody v kosmetických přípravcích. Jedná se o účinný humektant a dnes existuje mnoho kolagenových přípravků, které se liší svým složením a také vlastnostmi [31]. Bylo identifikováno 29 typů kolagenu a v pojivových tkáních převládají typy I, II a III. Kolagen typu I je nejdůležitější složkou, která se podílí na opravě tkáně. Během zánětlivé fáze se uvolní proteolytické enzymy, které štěpí kolagen na menší fragmenty, rovnováha mezi syntézou a degradací kolagenu je klíčovým faktorem při hojení ran. Kolagen je hlavní strukturální protein pojivových tkání, jako jsou kůže, šlachy, vazy a kosti. Představuje přibližně čtvrtinu celkového obsahu bílkovin u většiny zvířat. Jedná se o vláknitý protein, jehož strukturu tvoří tři polypeptidové řetězce, které jsou uspořádány do trojitě spirály. Z nejvíce zastoupených aminokyselin je glycin, prolin a hydroxyprolin. Kolagen lze extrahovat ze zvířat, ale lze získat i tzv. mořský kolagen, jehož zdrojem jsou mořské houby, medúzy, ryby a chobotnice. Kosmetické přípravky na bázi mořského kolagenu se liší svým složením, vlastnostmi a druhem a stářím živočicha, ze kterého je extrahován. Kolagen je známý pro svůj přínos v kosmetickém průmyslu a používá se jako produkt proti stárnutí a vráskám a slouží záro-

veň jako humektant. Proteiny s vyšší molekulovou hmotností, jako je kolagen, nemohou být absorbovány SC, ale zůstávají na jejím povrchu a udržují tak pokožku zvlhčenou. Rozpuštěný kolagen je preferován v aplikacích pro péči o pleť vzhledem k jeho filmotvorným vlastnostem. Dnes jsou velice známé a populární kosmetické produkty proti stárnutí. Struktura proteinů se vlivem stárnutí mění, např. dochází k zesíťování kolagenu a elastinu, což má za následek změny barvy kůže, celulitidu, suchost pokožky a ztrátu lesku vlasů. Použití pleťových krémů s přídavkem kolagenu stimuluje kožní buňky k jeho produkci, což může částečně zvrátit proces stárnutí. Bylo prokázáno, že stimulace syntézy kolagenu během stárnutí snižuje tvorbu vrásek a zlepšuje strukturu kůže. Kolagen je hojně používán v kosmetické chirurgii při léčbě popálenin [30, 32, 33].

### ***2.1.1.2 Placentální proteiny***

Jsou v mnoha zemích široce využívány v kosmetických přípravcích a produktech na hojení ran. Díky aktivní inhibici vývoje melaninu pokožka vypadá zářivěji a mladistvě. Extrakt z placenty také obsahuje aktivní enzymy, nukleové kyseliny, vitaminy, aminokyseliny, steroidy, mastné kyseliny, minerální látky a antioxidanty, které stimulují obnovu kožních buněk a zpomalují proces stárnutí kůže. Hlavními antioxidačními složkami placentálního extraktu jsou uracil, tyrosin, fenylalanin, tryptofan a peptidy produkované z kolagenu. Studie v Japonsku odhalily, že placentální protein je mnohem lepší a účinnější než glutathion, což je oblíbená složka bělicích kosmetických přípravků na pigmentové skvrny. Jedna ze studií srovnávala placentální protein s glutathionem a bylo zjištěno, že placentální protein je dvakrát účinnější, pokud jde o zpomalení enzymu tyrosináza, který hraje klíčovou roli při tvorbě melaninu [30].

### ***2.1.1.3 Pšeničné proteiny***

Hydrolyzované pšeničné proteiny, které jsou produkovány hydrolýzou lepku, se používají v kosmetice a potravinách jako emulgátory a stabilizátory. Kosmetické přípravky obsahující hydrolyzované pšeničné proteiny však mohou vyvolávat určité problémy, např. kontaktní kopřivku, která způsobuje svědění kůže, v horších případech mohou potraviny obsahující pšeničné proteiny vyvolat po požití anafylaktický šok [30]. Bylo zjištěno, že hydrolyzát pšeničného proteinu s rozsahem molekulové hmotnosti 5.000 až 10.000 Da o koncentraci 1 %, který byl použit v šampónu, snížil průměrný koeficient tření vlasů a díky tomu byly vlasy více hladké. Pšeničné proteiny v hydrolyzované formě se hojně používají v kosmetických přípravcích [29]. V Japonsku bylo zjištěno, že v roce 2009 tisíce osob vy-

kazovalo kontaktní kopřivku a anafylaxii po použití mýdla, které obsahovalo 0,3 % hydrolyzovaného pšeničného proteinu s názvem Glupearl 19S. Glupearl 19S byl vyroben kyselým zpracováním lepku při hodnotách pH 0,5-1,2 a při teplotě 95 °C po dobu 40 minut, a je zodpovědný za vyvolání nežádoucích účinků po aplikaci mýdla. Nežádoucí účinky se projevily celkem u 2.111 osob (2.025 žen, 86 mužů) ve věkovém rozmezí 1-93 let. V květnu 2011 byl prodej mýdla obsahující Glupearl 19S ukončen. Většina osob používala mýdlo pouze v oblasti obličeje, ale někteří z nich ho aplikovali i na jiné části těla. Celkem 25 % pacientů zažilo anafylaktický šok, u 43 % se objevila dušnost a u 11 % zvracení. Ačkoliv v Evropě a ve Spojených státech bylo hlášeno několik případů s alergií na hydrolyzovaný pšeničný protein v kosmetických produktech, dosud nebylo hlášeno takové množství případů, jako tomu bylo po aplikaci přípravku obsahující Glupearl 19S [35, 36].

#### **2.1.1.4 Sójové proteiny**

Hydrolyzované sójové proteiny jsou získávány ze sójové rostliny *Glycine soja*. Sójové proteiny zlepšují schopnost vlasů a kůže vázat vlhkost a zvyšují také pevnost vlasů v tahu. Zároveň minimalizují drsnost a popraskání kůže. Pšeničný lepek a sójové proteiny se v kosmetických přípravcích využívají nejvíce, co se týká kosmetických přísad získávaných z rostlinných bílkovin [29, 30]. Sójové proteiny obsahují tzv. fytoestrogeny, které se podobají ženskému estrogeneru. Estrogeny mají významný vliv na vlastnosti kůže, jejich nedostatek po menopauze má za následek rychlejší stárnutí, což lze zvrátit nahrazením estrogenů fytoestrogeny. Tím dojde ke snížení vrásek a ke zvýšení hydratace a elasticity pokožky. Fytoestrogeny působí proti stárnutí kůže prostřednictvím estrogenových receptorů, zvyšují produkci kolagenu, kyseliny hyaluronové a vykazují také ochranu proti oxidačnímu stresu. Stárnutí kůže může být tedy výrazně zmírněno podáváním fytoestrogenů. Zástupcem fytoestrogenů je např. resveratrol. Bylo prokázáno, že zvyšuje produkci kolagenu a elastinu, čímž zmírňuje proces stárnutí. Fytoestrogeny se v posledních letech staly důležitou součástí výzkumů v boji proti stárnutí [37].

#### **2.1.2 Polysacharidy v kosmetice**

Polysacharidový průmysl se začal rozvíjet v prvním desetiletí 20. století. Ve vodě rozpustné oligomery přírodních polysacharidů jsou slibnými surovinami pro přípravu léčiv a aditiv pro potravinářský a kosmetický průmysl, jejich výhodou je také šetrnost k životnímu prostředí. Hydrokoloidy jsou polysacharidy s vysokou molekulovou hmotností a řadíme mezi ně např. xanthanovou gumu, chitin a chitosan nebo pektiny. Získávají se extrakcí

z rostlin nebo řas a dodávají specifické vlastnosti kosmetickým přípravkům [30]. Polysacharidy plní mnoho kosmetických funkcí, působí např. jako modifikátory, suspenzní činidla nebo jako kondicionéry na vlasy. Polysacharidy hrají důležitou roli v kosmetickém průmyslu, jelikož zvlhčují a hydratují pokožku [29, 30].

### 2.1.2.1 *Arabská guma*

Tento polysacharid je získáván ze stromu *Accacia senegal* a sestává z větvených polysacharidů s vysokou molekulovou hmotností a jejich vápenatých, hořečnatých a draselných solí, které díky hydrolýze poskytují tři hlavní složky proteinů a polysacharidů, včetně arabinogalaktanu, arabinogalaktanového proteinu a glykoproteinu. Arabská guma se používá v textilním, potravinářském, papírenském a kosmetickém průmyslu. Najdeme ji v kosmetických přípravcích, jako jsou pleťové vody, ochranné krémy nebo pleťové masky [38]. Ve farmaceutickém průmyslu se arabská guma používá jako nosič léčiv, jelikož není považována za nebezpečnou látku. Nedávné studie navíc potvrdily, že vykazuje antioxidační účinky a hraje roli v metabolismu lipidů. Arabská guma vykazuje také antimikrobiální aktivitu, kdy inhibuje tvorbu zubního plaku a tedy i patogenních mikroorganismů, což lze využít jako potenciální preventivní prostředek při tvorbě zubního kazu. Tyto účinky jsou připisovány vysokému obsahu vápenatých, hořečnatých a draselných solí. Výhodou arabské gumy v kosmetických přípravcích jsou její netoxické vlastnosti a nebyly prokázány žádné alergické reakce. Využívá se také v přípravcích na vlasy, např. v balzámech nebo pro fixační přípravky [39, 40].

### 2.1.2.2 *Karagenan*

Jedná se o sulfátový polysacharid s obsahem 15-40 % ester-sulfátu, který je tvořen jednotkami D-galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy spojenými  $\alpha$ -(1,3) a  $\beta$ -(1,4)-glykosidickou vazbou. Hlavní faktory, které ovlivňují vlastnosti karagenanů, jsou počet a poloha esterových sulfátových skupin a také obsah 3,6-anhydrogalaktózy. Karagenan se získává z červených řas. Existuje nejméně sedm druhů karagenanů s odlišnými chemickými vzorci, které se rozlišují řeckými písmeny. K nejvíce komerčně dostupným typům patří kappa, iota a lambda karagenan. Silné a křehké gely tvoří  $\kappa$ -karagenan,  $\iota$ -karagenan tvoří měkké a elastické gely a  $\lambda$ -karagenan funguje jako zahušťovadlo. Karagenany patří mezi aniontové polysacharidy, jejichž schopnost tvořit gely může být využita v kosmetických přípravcích ke zlepšení textury a konzistence produktů. Funkčnost karagenanů v různých aplikacích do značné míry závisí na jejich reologických vlastnostech. Karagenany, jako lineární, ve vodě

rozpuštěné polymery, obvykle tvoří vysoce viskózní vodné roztoky. Viskozita se zvyšuje téměř exponenciálně s koncentrací a klesá s teplotou a závisí na koncentraci, teplotě, typu karagenanu a jeho molekulové hmotnosti. Karagenany se používají především jako zahušťovadla, želírující látky nebo jako stabilizátory v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Jsou součástí zubních past, pleťových vod, výrobků pro péči o vlasy nebo pěn na holení [30, 42].

### 2.1.2.3 Chitin a chitosan

Chitin je hlavní složkou buněčných stěn hub a exoskeletů členovců, jako jsou krabi, humři, hmyz a měkkýši. Jedná se o dusíkatý polysacharid a komerčně se vyrábí z odpadů při zpracování ryb. Chitin a chitosan jsou vysoce bazické polysacharidy. Chitosan se vyrábí deacetylací N-acylové skupiny zahříváním chitinu ve vysoce koncentrovaném alkalickém roztoku nebo zahříváním práškového chitinu v roztaveném hydroxidu vápenatém při 180 °C po dobu 30 minut. Deacetylací chitinu se získá chitosan a v kombinaci s kyselinami vytváří ve vodě rozpustné soli, které se používají do kosmetických přípravků na vlasy (šampóny a gely) nebo jako antibakteriální látky v zubních pastách a ústních vodách [30]. Hlavní rozdíl mezi chitinem a chitosanem je jejich rozpustnost. Chitin je hydrofobní ve vodném prostředí a ve většině organických rozpouštědel, zatímco chitosan je rozpustný v kyselých vodných roztocích. Zájem kosmetického průmyslu o chitin, chitosan a jejich deriváty závisí na jedinečných biologických a technologických vlastnostech těchto polymerů. Jejich hlavní funkce v péči o pleť jsou shrnuty na Obrázku 4. Chitin a chitosan jsou využívány také jako humektanty a zvlhčovače. Aktivita polymerů, které fungují jako humektanty, je závislá na kationtovém náboji, molekulové hmotnosti a jejich hydrofobních vlastnostech. Ve zvlhčovacích krémech najdeme např. chitin-glukanové komplexy, které jsou složeny z chitinových a  $\beta$ -glukanových jednotek. Chitin, chitosan a jeho deriváty vykazují mnoho různých vlastností v péči o kůži, vlasy a také nehty [41].



Obrázek 4: Hlavní funkce derivátů chitosanu v péči o pokožku [41]

#### 2.1.2.4 Kyselina hyaluronová (hyaluronan)

Byla identifikována v roce 1934 izolací z kravských očí a první kosmetický produkt s kyselinou hyaluronovou byl vyroben v roce 1979. Jedná se o makromolekulární mukopolysacharid, který je široce distribuován v tělesných tkáních a intracelulárních tekutinách a je přítomen ve sklivci a kůži. Proces stárnutí a vnější podněty, jako je UV záření, kouření a látky znečišťující ovzduší, postupně snižují množství kyseliny hyaluronové. Její redukce v těle má za následek bolest kloubů a suchou pokožku. Obvykle nachází využití ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Jelikož se fyzikální vlastnosti a fyziologické aktivity kyseliny hyaluronové liší v závislosti na molekulové hmotnosti, vyrábí se produkty v různém rozmezí molekulových hmotností. Užívání kyseliny hyaluronové má za následek zvýšení vlhkosti pokožky díky své schopnosti absorbovat vodu, což bylo dokázáno v mnoha studiích. Kromě toho bylo také zjištěno, že účinek hydratace se neodvíjí od molekulové hmotnosti. Kyselina hyaluronová používaná v různých kosmetických přípravcích se také komerčně vyrábí bakteriální fermentací. Ukázalo se také to, že hraje klíčovou roli při hojení ran, pokud dojde k poškození tkáně. Lokální aplikace na poraněnou pokožku minimalizuje zjizvení a zlepšuje proces hojení, nicméně účinek kyseliny hyaluronové na poškozenou tkáň je stále předmětem diskuzí [29, 34].

Bylo zjištěno, že mnoho kosmetických přípravků používaných na celém světě obsahovalo látky, které byly buď známými činiteli způsobujícími rakovinu (karcinogeny) nebo naopak nebyl testován jejich účinek na lidské zdraví. Použití biopolymerů v kosmetických přípravcích může být tedy řešením, jak tyto negativní účinky eliminovat. V současné době existu-

je celá řada biopolymerů, včetně proteinů a polysacharidů, které jsou hojně využívány v kosmetických produktech [30].

## 2.2 Syntetické polymery

Polymery se běžně používají v kosmetických produktech, využívá se jejich různorodých vlastností a mnoha výhod. Využívají se široká spektra polymerů, kam patří přírodní, organické a syntetické polymery a také silikony. Fungují jako filmotvorné látky, emulgátory, zahušťovadla, modifikátory a ochranné bariéry. Kosmetické produkty lze použít ke zlepšení vzhledu vlasů, kůže nebo nehtů. Druhy polymerů používaných v kosmetice jsou stejně rozmanité jako jejich aplikace. Použití syntetických polymerů je také velice široké, od organických polymerů na bázi alfa olefinů po anorganické materiály na bázi silikonů.

Stupeň polymerace a množství větvení mohou mít dopad na konečné funkční vlastnosti. Běžně používané syntetické polymery jsou polymery na bázi kyseliny akrylové, polyakrylamidy, polyvinylamidy, polymethylmetakryláty a homopolymery a kopolymery na bázi alkyleneoxidů [43].

### 2.2.1 Polymery jako zahušťovací látky a reologické modifikátory

Polymery obsahují dlouhé, rozvětvené nebo nerozvětvené molekuly a používají se jako zahušťovací látky. Mechanismus účinku zahuštění může být dosažen zapletením řetězců nebo zesíťováním. Polymery hrají důležitou roli jako modifikátory reologie v kosmetických produktech, které se často připravují za použití formulací na bázi vody s nízkou viskozitou, a proto se přidávají polymery za účelem zahuštění. Jsou široce používány v gelech, olejích a emulzích ke zvýšení viskozity. Mechanismus zapletení při zahušťování funguje tak, že polymerní řetězce jsou rozpuštěny v rozpouštědle, kdy se viskozita roztoku zvyšuje se zvyšující se koncentrací polymeru jednoduše proto, že stále více řetězců se snaží zabírat omezený prostor. Se zvyšující se koncentrací polymeru je obtížnější oddělit jednotlivé polymerní řetězce. Polymery, které síťují při zahušťování, radikálně mění své vlastnosti, kdy dochází ke zvýšení molekulové hmotnosti polymerů. Optimální úroveň zesíťování je požadována pro maximalizaci viskozity polymeru [43, 44].

*Akrylátové kopolymery/karbomer* je homopolymer kyseliny akrylové s vysokou molekulovou hmotností, který je zesíťován. Polyalkoholová část umožňuje jeho vysokou rozpustnost ve vodě. Karbomery vytvoří vzájemným zesíťováním síť, díky které mohou výrazně stabilizovat emulze, a proto jsou skvělými látkami, které vytvářejí stabilní a vysoce viskózní krémy. Karbomer je vynikající zahušťovadlo, je hypoalergenní a na povrchu pokož-

ky vytváří film, který je příjemný na dotek. Příklady akrylátových kopolymerů/karbomerů jsou karboxymethylový nebo karboxyvinylový polymer [44].

*Polyvinylalkohol (PVA)* se komerčně získává katalytickou hydrolyzou polyvinylacetátu. Charakteristické vlastnosti PVA v roztoku jsou dány molekulovou hmotností a rozsahem hydrolyzy acetátových skupin hlavního řetězce polymeru. PVA je málo rozpustný ve vodě, pokud je rozsah hydrolyzy pod 70 %. Hydrolyza polymeru mezi 70 a 85 % poskytuje materiály, které jsou snadno rozpustné ve studené vodě a nerozpustné v horké vodě. Optimální úroveň hydrolyzy pro dosažení úplné rozpustnosti ve studené i horké vodě je nad 85 %. Polymery PVA hydrolyzované mezi 70 a 90 % jsou ve skutečnosti kopolymery obsahující hydrofobní monomer (vinylacetát) a hydrofilní monomer (vinylalkohol). Tyto polymery našly komerční využití jako stabilizátory emulze typu olej ve vodě. PVA je obecně docela tolerantní k různým rozsahům hodnot pH a tepla [29].

*Polyethylenglykol (PEG)* vzniká vzájemnou interakcí ethylenoxidu s vodou, ethylenglykolem nebo ethylenglykolovými oligomery. Výchozími materiály používanými pro syntézu PEG polymerů s nízkým indexem polydisperzity (úzká distribuce molekulových hmotností) jsou ethylenglykol a jeho oligomery. Zahuštění PEG probíhá tak, že se obklopují vrstvou vody. Ve většině případů jsou rozpustné ve vodě a vykazují vysokou rozpustnost v organických rozpouštědlech. Poskytují emulgační vlastnosti, které pomáhají stabilizovat emulze [44]. PEG a jejich deriváty se v kosmetice hojně používají jako povrchově aktivní látky, čisticí prostředky, emulgátory a zvlhčovačla. Nedávné studie o klinických účincích a permeabilitě různých emulgátorů prokázaly, že PEG stearáty s nízkou molekulovou hmotností (při koncentraci 5 %) jsou schopny ovlivnit bariérovou funkci kůže, naopak PEG o vyšší molekulové hmotnosti tyto vlastnosti nevykazovaly [45].

Aplikace těchto typů polymerů je v kosmetickém průmyslu široká, využívají se např. v gelech do vlasů, které jsou obvykle zahuštěny kyselinou polyakrylovou, tedy karbomery, dále je najdeme v nanoemulzích typu olej ve vodě, což jsou disperze kapalina/kapalina, u nichž je velikost kapiček menší než 100 nm. Nanoemulze jsou podobné běžným emulzím, ale jsou termodynamicky nestabilní [44].

### 2.2.2 Polymery jako čisticí a kondičiační látky

Jedná se o skupinu polymerů, které jsou účinnými modifikátory určené k adhezi a adsorpci k proteinům vlasů a kůže. Díky tomu jsou vlasy jemnější. Do této skupiny patří kationtové, neiontové a silikonové polymery. Kondicionéry mohou zvýšit lesk vlasů, snížit statickou



elektřinu, zlepšit sílu vlasů a také je chrání před UV zářením. Polymerní kondicionéry zlepšují stav povrchu vlasu a jsou určeny především k tomu, aby se mokré vlasy snáze rozčesaly a aby byly lesklejší a hladší [29, 44].

*Kationtové polymery* jsou pozitivně nabitě a jejich použití je výhodné, jelikož jsou poutány negativně nabitými proteiny kůže nebo vlasů elektrostatickými silami. Analýzy ukazují, že kationtové polymery zlepšují strukturu a vzhled pokožky a vlasů. Pozitivně kladný náboj kationtových polymerů jim zaručuje unikátní fyzikálně-chemické, biologické a antimikrobiální vlastnosti, které z nich dělají ideální kandidáty pro mnoho různých aplikací. Všechny kationtové polymery jsou nositeli kvartérní amoniové skupiny, která se nazývá „polyquaternium“, důležitými příklady těchto polymerů jsou polyquaternium-10 (PQ-10), polyquaternium-7 (PQ-7) nebo polyquaternium-11 (PQ-11). PQ-10 a PQ-7 jsou dva nejčastěji používané polymery v šampónech [20, 29, 44, 46].

*Neiontové polymery* vykazují hydrofobní vlastnosti, pokud jsou v suchém stavu, pokud jsou ale hydratovány, jsou velice hydrofilní. Tato vlastnost jim umožňuje rychlé šíření po povrchu vlasů, které mají nízké povrchové napětí. Lze je snadno odstranit povrchově aktivními látkami (na rozdíl od minerálních olejů), a proto se snadno omyjí při použití šampónu [44]. Mezi neiontové polymery řadíme např. polyvinylpyrrolidon (PVP), který je rozpustný ve vodě, netoxický a biokompatibilní. Použití PVP v kosmetice je využíváno díky jeho vlastnostem, jako je vynikající povrchová aktivita, tvorba filmu, žádné alergické reakce a dráždivé účinky. PVP se využívá v mnoha produktech (šampóny, kondicionéry, krémy) díky tvorbě transparentního filmu a také zvyšuje lesk vlasů [47].

*Silikonové polymery* jsou syntetické anorganické polymery na bázi polydimethylsiloxanu, které lze připravit a modifikovat mnoha způsoby za účelem výroby materiálů vhodných pro širokou škálu aplikací. Různé typy silikonů nacházejí uplatnění jako kondicionéry, šampóny, pěny a gely. Silikony využívané pro péči o vlasy mají řadu jedinečných vlastností, jako je nerozpustnost ve vodě a nízké povrchové napětí. Tyto vlastnosti umožňují silikonům snadné rozprostření po povrchu vlasů a vytvoření hydrofobního filmu, který usnadňuje česání a dodává vlasům hebkost a mimořádnou úroveň lesku díky vysokému indexu lomu. Nejběžněji používanými silikonovými polymery jsou cyklomethikony (zajištění lesku vlasů), dimethikony (zajištění lesku a jemnosti vlasů) nebo alkyl modifikované silikony (zlepšení objemu vlasů) [20, 44].

Syntetické polymery představují významný podíl látek používaných v kosmetickém průmyslu. Polymery a pryskyřice používané v produktech pro osobní péči mohou být přírodní

nebo syntetické. Syntetické polymery (chemicky modifikované přírodní polymery) byly vyvinuty tak, aby zlepšovaly a nabízely jedinečné vlastnosti produktů ve srovnání s přírodními polymery. Přírodní polymery mají jedinečné vlastnosti, ale někdy se používají jednoduše kvůli rostoucí poptávce spotřebitelů po přírodních produktech a ve srovnání se syntetickými polymery jsou relativně drahé [48].

### 3 MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ POKOŽKY

Výrobci kosmetických přípravků jsou povinni zaručit bezpečnost a stabilitu svých výrobků. Nový výrobek je před uvedením na trh podroben důkladnému testování, testuje se jak účinnost, tak i bezpečnost pomocí metod *in vitro* a *in vivo*. Přesnost měření však závisí na použití vhodné metodiky. Účelem testování kosmetických látek *in vitro* je získání kvalitativních a kvantitativních informací o sloučeninách, které se mohou během používání dostat do lidského těla. Provádí se na vyříznuté prasečí nebo lidské kůži, kdy se testovaná látka aplikuje na vyříznutý vzorek kůže. Běžná doba expozice je 24 h. Jakmile bude testování kosmetických látek *in vitro* dokončeno a charakterizováno, mohou zkoumané látky postoupit do další fáze testování, tedy *in vivo*. Účinky kosmetických produktů jsou nejlépe prokazatelné za pomoci testů *in vivo* neinvazivními metodami, tedy na lidských dobrovolnících, kteří tyto produkty používají. Na lidech mohou být testovány pouze výrobky, které jsou prokázány jako netoxické. Testy *in vivo* se provádějí na zdravých dobrovolnících s ohledem na pohlaví, věk, typ kůže a možné kožní problémy. Účastníci jsou rozděleni do dvou skupin, kdy jedna skupina obdrží výrobek s testovanou látkou a druhá skupina obdrží pouze placebo. Následně se vyhodnotí stav kůže, projevy alergických reakcí apod. Vzhledem k obtížím při získávání lidské kůže v požadovaných věkových skupinách *in vitro* nebo *in vivo*, využívají vědci k testování zvířata, kdy nejvíce podobná lidské kůži z hlediska propustnosti je prasečí kůže [8, 16, 20, 49, 50].

#### 3.1 Neinvazivní metody testování pokožky

Standardizace je klíčovým problémem pro úspěšné použití jakékoliv instrumentální metody při testování kosmetického produktu. Musí zohledňovat následující parametry:

- Prostředí – teplota místnosti, relativní vlhkost, světelné zdroje, cirkulace vzduchu
- Přístroje – kalibrace, vlastnosti sondy a její umístění, vynulování
- Subjekty (testované osoby) – pohlaví, typ kůže, věk, očištění nebo neočištění měřené místo, užívání léků
- Testovaný produkt – stabilita, vystavení světlu, množství naneseného produktu, způsob podání

Zohlednění všech těchto aspektů je základem při poskytování výsledků studie a sestavení protokolu. Neinvazivní metody měření jsou mnohem slibnější než metody invazivní, které

jsou sice velice přesné, ale vyžadují odběr vzorků kůže a nemusí být proto ideální z hlediska dlouhodobého sledování stavu pokožky [8, 51].

### 3.1.1 Objektivní metody analýzy vrásek

Kůže v oblasti obličeje podléhá s rostoucím věkem mnoha změnám. Ačkoliv existují další zjevné morfologické změny, které lze považovat za ukazatele stárnutí kůže, stupeň vrásek se jeví jako nejlepší ukazatel. Není proto překvapující, že bylo vyvinuto značné úsilí při vývoji kosmetických produktů pro péči o pleť a také mnoho chirurgických zákroků, které mohou pokožce dodat mladistvý vzhled. Vrásky mohou být snadno vizualizovány a mnoho klinických studií tak zahrnuje použití různých stupnic pro hodnocení vrásek.

Nejznámější metodou pro analýzu vrásek je optická profilometrie, při které se využívají silikonové repliky pro zachycení mikroreliefu povrchu kůže a hrubých vrásek, následně se provede analýza obrazu pomocí zavedených technik. K analýze replik je nyní k dispozici mnoho technik, které jsou založeny na různých principech, např. mechanická a optická profilometrie, dvourozměrná analýza obrazu, konfokální mikroskopie apod. Místo, na které je aplikován silikon, se vymezení nalepením papírových kroužků. Následně se nanese tenká vrstva silikonu do vyznačených oblastí papírových kroužků. Během pár minut dojde k polymeraci materiálu a replika se opatrně z kůže odstraní pouhým odlepením. Pokud dojde k intenzivnímu míchání při přípravě silikonu, mohou se vytvořit nežádoucí vzduchové bubliny, důležité je také zachování správného poměru silikonu a katalyzátoru před samotným mícháním. Následně se provede analýza délky a hloubky vrásek pomocí nástrojů, které obsahují černobílý digitální fotoaparát s vysokým rozlišením, který je propojen s počítačem. Replika je osvětlena pomocí světelného zdroje pod určitým úhlem, pro pozorování hlubokých vrásek je optimální úhel  $38^\circ$  až  $45^\circ$ . Následně se získá černobílý obrázek, u kterého budou vrásky vrhat stíny, které jsou kontrastovány proti bílému pozadí repliky. Digitalizovaný obrázek může být matematicky znázorněn jako trojrozměrná kombinace čísel. Hodnoty X a Y jsou polární souřadnice, které poskytují umístění pixelu, zatímco hodnota Z představuje jas pixelu z hlediska jeho úrovně šedé. Z mnoha dostupných parametrů pro hodnocení topografie povrchu se ukázalo, že nejužitečnější jsou parametry drsnosti  $R_z$  a  $R_a$ .

Pro výpočet  $R_z$  je profil nejprve rozdělen do pěti stejných segmentů podél osy x, poté se stanoví minimální a maximální rozdíly v každém z pěti segmentů a  $R_z$  se vypočítá jako průměr těchto pěti hodnot. Pro výpočet  $R_a$  se vytvoří průměrná čára procházející středem profilu a určí se oblast, kterou profil popisuje nad a pod touto referenční čarou [8, 16, 20].

### 3.1.2 Měření elasticity pokožky

Obsah vody v SC je rozhodující pro zachování elasticity pokožky a pevnosti v tahu, může být ovlivněn mnoha faktory, např. použitím čisticích kosmetických přípravků nebo stárnutím. Stárnoucí kůži charakterizují výrazné změny v orientaci kolagenových vláken. U mladé kůže jsou tato vlákna velmi malá a orientovaná téměř ve všech směrech (izotropie), zatímco během stárnutí dochází k zahušťování kolagenových vláken (anizotropie). Stupeň izotropie nebo anizotropie lze vyhodnotit měřením rychlosti šíření akustické vlny na povrchu kůže pomocí tzv. reviskometru. Rychlost šíření akustické vlny na povrchu kůže v různých úhlech dává stupeň izotropie nebo anizotropie jasně související se stárnutím kůže. Nejdříve jsou na kůži umístěny dva senzory, jeden z nich vydává akustickou rázovou vlnu a druhý ji přijímá. Rázová vlna se tak šíří kožními vlákny různě podle vlhkosti a pružnosti kůže a měřeným parametrem je doba, kterou vlna musí přejít od vysílače k přijímači. Čím delší je doba potřebná pro průnik vlny pokožkou, tím větší je naměřená hodnota a tedy nižší elasticita [16, 52, 53]. Elasticitu kůže lze také měřit pomocí tzv. kutometru. Sonda (obvykle 2 mm široká) tohoto přístroje vytváří podtlak, který lze měnit v rozmezí mezi 20 a 500 mbar. Měřená plocha kůže je vlivem tohoto podtlaku vtažena do otvoru sondy, což způsobuje vertikální deformaci. Vtažení kůže do otvoru sondy je měřeno v závislosti na čase, kdy je náhle aplikováno a uvolněno vakuum. Z křivky deformace v závislosti na čase lze kvantifikovat elastické vlastnosti kůže, které souvisí se stupněm stárnutí. Mladá kůže vykazuje vysoký stupeň pružnosti a ztrácí svůj tvar postupně a po ukončení sacího procesu se znovu vrátí do původního stavu. Kůže, která je zdravá a dostatečně hydratovaná, vykazuje vyšší hodnoty elasticity než suchá kůže [16, 54, 55].

### 3.1.3 Měření hydratace

Stárnoucí pokožka vykazuje typické příznaky drsnosti a suchosti, kdy některé oblasti (např. spodní část chodidel u starších osob) mohou být extrémně suché (ichthyóza). Pro ošetření suché pokožky se používají hydratační kosmetické přípravky. Kvantitativní hodnocení hydratace horních vrstev kůže, zrohovatělé vrstvy a zevní *epidermis*, jsou různá, patří sem např. měření elektrické impedance a kapacitance, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a konfokální Ramanova spektroskopie. Většina měření hydratace se provádí pomocí vlastností elektrické impedance (dermalab, skicon) nebo kapacitance (korneometr). Konfokální Ramanova spektroskopie kůže se dnes běžně používá při testování u lidí. Tato metoda nám dává jedinečné informace o chemickém složení kůže. Unikátní je zejména schopnost měřit chemické složení tkání neinvazivně v definovaných

hloubkách pomocí konfokální optiky (optické řezy). Ramanova spektra jsou získána zaostrěním laserového paprsku z mikroskopu a umožněním objektivu promítat paprsek na a pod povrch kůže. Obrázek 5 znázorňuje první komerčně dostupný Ramanův přístroj pro analýzu kůže. Nejdůležitějšími faktory Ramanova přístroje jsou výběr laserů, optických materiálů a kvalita detektorů. Celkově se přístroj skládá ze čtyř částí, tedy ze zdroje laserového světla, NIR (optimální vlnová délka při měření kůže), Ramanova spektrometru a ze speciálního operačního systému pro analýzu dat. Hlavní výhodou Ramanovy spektroskopie je prakticky žádná potřeba přípravy vzorku a schopnost sledovat účinky podle různé hloubky kůže. Tato metoda se používá k měření změn obsahu melaninu a hemoglobinu v souvislosti se stárnutím nebo změnami přirozeného hydratačního faktoru [8, 16].



Obrázek 5: Ramanův přístroj pro analýzu kůže [16]

Kůže vykazuje elektrické vlastnosti, které se vztahují k hydrataci SC. Elektrické metody pro měření hydratace považují jednoduchý elektrický model kůže za rezistor spojený paralelně s kondenzátorem, který celkově přispívá k impedanci kůže ( $Z$ ). Pokud je na kůži aplikován střídavý proud o frekvenci ( $f$ ), hodnota  $Z$  bude záviset na příspěvku odporu ( $R$ ) a kapacitance ( $C$ ), tedy  $Z = (R^2 + 1/2\pi fC^2)^{1/2}$ . Použitím měřících elektrod mohou s odpovídající geometrií a vhodnou aplikovanou frekvencí elektrická zařízení určit kapacitní, impedanční nebo vodivostní výsledky související s hydratací kůže [57].

#### *Kapacitance a vodivost kůže*

Princip měření je založen na klasickém provozu kondenzátoru, jehož hlavní úlohou je ukládat elektrický náboj, jakmile se přiblíží k nabitému poli a skládá se nejméně ze dvou elektrických vodičů oddělených izolačním materiálem působícím jako dielektrikum. Dielektrická konstanta vody se od ostatních látek výrazně liší, voda je tedy mnohem silnější při zvyšování kapacity kondenzátoru, a to vede k předpokladu, že kapacitance kůže je pří-

mo úměrná obsahu vody v pokožce a čím vyšší je úroveň hydratace v SC, tím vyšší je kapacitance. Metoda měření kapacitance kůže je měřítkem její vlhkosti, používá se u ručního zařízení známého jako korneometr [57]. Je založen na měření kapacitance, kdy se na měřeném místě vytvoří elektrické pole. Vlastnosti tohoto elektrického pole se mění v závislosti na obsahu vody. Sonda se skládá z keramických destiček s rovnoběžnými zlatými linkami, které fungují jako kondenzátorové desky. Deskový kondenzátor je od pokožky oddělen extrémně tenkým filmem. Korneometr měří obsah vody v kůži do hloubky 30  $\mu\text{m}$ , což zahrnuje SC a *epidermis* [8, 56,]. Vodivost kůže je alternativní přístup k měření vlhkosti kůže odvozený od změn elektrických vlastností SC. Vrstva SC s vysokým obsahem vody vytváří silnější a citlivější elektrickou vodivost než dehydratovaná SC a zvyšuje indukci dielektrické konstanty. Obecně to dává větší hodnoty vodivosti a kapacitance, ale snižuje hodnotu impedance kůže.

#### *Impedance kůže*

Na rozdíl od kapacitance a vodivosti, impedance kůže udává výsledky o její odolnosti. Narůstá s dehydratací vrstvy SC a je ovlivňována složením a metabolickou aktivitou kůže. Komerční přístroje, které fungují na tomto principu, zahrnují přístroj měřící dermální fáze Nova a přístroj monitorující povrchové charakterizační impedance. Tyto přístroje integrují hodnoty odečtené na samostatných frekvencích aplikovaného střídavého proudu [57].

### **3.1.4 Měření transepidermální ztráty vody (TEWL)**

Měření transepidermální ztráty vody nebo ztráty par na povrchu pokožky je dobrým indikátorem funkce kožní bariéry, která má důležitou funkci při zadržování vlhkosti. Bylo prokázáno, že hodnoty TEWL korelovaly se stárnutím kůže. Výsledky měření jsou udávány v jednotkách  $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$  [8]. TEWL lze měřit pomocí čtyř různých mechanismů:

#### *Otevřená komora*

Tento mechanismus se řídí základní teorií Fickova zákona difúze a je tradiční metodou měření TEWL. Komora se skládá ze dvou snímačů teploty a vlhkosti umístěných uvnitř dutého válce. Celkový systém odhaduje vodní gradient otevřenou komorou a umožňuje nepřetržitě odečty okolního vzduchu nad povrchem kůže. Mezi komerčně dostupné přístroje patří tewametr, dermalab a evaporimetr. Při jejich použití je nutné dodržet optimální podmínky prostředí, protože mnoho faktorů, jako je velikost sondy, proudění vzduchu, pokojová teplota a vlhkost okolí, mohou snadno ovlivnit výsledky.

*Uzavřená komora*

Tento systém se skládá ze snímačů vlhkosti a teploty umístěných v uzavřené válcové komoře. Po aplikaci na kůži se relativní vlhkost zvyšuje a používá se k detekci rychlosti TEWL. Populárním zařízením tohoto typu je vapometr, který pomocí srovnávacích studií prokázal přesnější a rychlejší odečty. Na rozdíl od přístrojů s otevřenou komorou není systém s uzavřenou komorou vapometru ovlivňován prouděním vzduchu, ale je náchylný k rušení způsobenému pohyby, povrchovou vlhkostí a chvěním a není schopen provádět nepřetržitá měření, protože používá systém jednobodového odečtu.

*Odvětrávaná uzavřená komora*

Princip je založen na sledování toku a měření vlhkosti okolního vzduchu proudícího do uzavřené komory. Uzavřená komora je umístěna na povrch kůže a skrz tuto komoru prochází vzduch. Rychlost TEWL se stanoví odhadem rozdílu vlhkosti před a po kontaktu s kůží. Toto nastavení umožňuje nepřetržité zaznamenávání hodnot TEWL, ale může být nespolehlivé, pokud je proudící vzduch příliš suchý, protože uměle zvýší vypařování.

*Kondenzátorová komora*

Jedná se o novější způsob, kdy uzavřená komora obsahuje studenou desku, která kondenzuje vlhkost na led pomocí systému Peltier. Systém eliminuje hromadění vlhkosti jejím odstraněním z komory, což je problém, který se běžně vyskytuje v neventilovaných komorách. Biox aquaflux je příkladem této techniky měření, která využívá difúzní gradient k získání hodnot TEWL [57].

### **3.2 Invazivní metody testování pokožky**

Tyto metody jsou založeny na testování pomocí biopsie. Mohou poskytnout nejjasnější obraz při zánětu kůže pomocí histologické analýzy. Přestože jsou tyto metody přesné, nevýhodou je nutnost odebrání vzorku kůže a nemusí být tedy ideální pro dlouhodobé sledování stavu pokožky [51].

Biopsie kůže je jednou z nejdůležitějších technik v dermatologii pro přesnou diagnózu neoplastických nebo zánětlivých kožních onemocnění. Tato technika je prováděna pod lokálním anestetikem pouze vyškoleným lékařem, obvykle dermatologem, kdy se vyjme vzorek kůže o průměru 2-4 mm, který je následně histopatologicky analyzován. Patologické zkoumání pomocí kožních biopsií často doplňuje nebo potvrzuje diagnózu běžných neoplastických nebo zánětlivých kožních onemocnění. Tato technika se obvykle provádí po-



mocí skalpelu a dokáže poskytnout přesnou diagnózu výskytu nemoci, avšak nevýhodou těchto technik je, že vyžadují lokální anestezii a použití stehů. Nevýhodou je také čas potřebný k provedení postupu [73].

Existují různé techniky provádění kožní biopsie a každá z nich je založena na typu léze, místě léze a také na odbornosti dermatologa. Nejčastěji používaná technika pro biopsii kůže je tzv. punch biopsie, kdy se odebere vzorek kůže přes všechny vrstvy léze pomocí kruhového nástroje. Nástroj se otáčí směrem dolů přes *epidermis* a *dermis* a do podkožního tuku. Další technikou je biopsie „holením“, kdy je část léze, která je nad úrovní okolní kůže, oholena pomocí ostří. Tímto způsobem se provádí povrchová biopsie, např. u kožní keratózy. Nevýhodou je však to, že lze analyzovat pouze povrch a ne hlubší tkáň. Dále existuje excisionální biopsie, kdy je celá léze zcela odstraněna až do roviny podkoží a rána je následně uzavřena pomocí stehů. Tato technika se používá pro odstranění menších lézí. Naopak u incisionální biopsie dojde k odstranění malé části vzorku u velké léze pomocí skalpelu [74].

## 4 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární studii, která se zaměřuje především na stárnutí a hydrataci kůže a vznik vrásek, které jsou dnes důležitým tématem a kosmetický průmysl se neustále snaží vyvíjet nové a účinnější produkty, které zpomalují stárnutí a tvorbu vrásek. Dále byl kladen důraz na využití přírodních a syntetických polymerů v kosmetických přípravcích, jejichž využití v kosmetickém průmyslu je opravdu široké, a v poslední části byly popsány neinvazivní metody využívané při testování kosmetických produktů před jejich uvedením na trh.

V dnešní době je velký zájem nahradit některé syntetické polymerní přísady v kosmetických produktech biopolymery, mezi které se řadí i KH, a proto je testován jeho účinek v této diplomové práci. Cílem praktické části práce bylo připravit kolagenní hydrolyzát (KH) z hovězích šlach a poté otestovat jeho účinky po přidání do kosmetické formulace ve formě gelu na vlastnosti pokožky v oblasti očí – na hydrataci, transepidermální ztrátu vody, elasticitu a změnu reliéfu pokožky, tedy vliv na potlačení vrásek. Testování pokožky proběhlo pomocí neinvazivních metod, které jsou popsány v mnoha studiích. Hydratace kůže byla měřena korneometricky, transepidermální ztráta vody tewametricky, elasticita byla zjištěna pomocí reviskometru a reliéf pokožky byl zkoumán pomocí visiometru a visioskopu. Aplikací kosmetické formulace (gelu) s přídavkem KH lze předpokládat vyšší hydrataci pokožky a nižší transepidermální ztrátu vody po měsíční aplikaci, přibližně po dvouměsíční aplikaci lze předpokládat zvýšení elasticity a změnu reliéfu pokožky. Dále bylo provedeno statistické zpracování dat a vyhodnocení a diskuze získaných výsledků.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁLY, METODY A POSTUP PRÁCE

### 5.1 Příprava kolagenního hydrolyzátu

Do kosmetické formulace (gelu) byl přidán připravený KH z krátkých hovězích šlach o koncentraci 1,0 % a  $M_w = 1.500$  Da.

Materiál: krátké hovězí šlachy

Použitý enzym: Polarzyme 6.0 T

Opracování šlach: neutrální prostředí

*Homogenizace vstupní suroviny:* Hovězí šlachy se nejprve promyly vodou, nakrájely se na menší kousky (cca 1,5 cm) a rozemlely se na elektrickém mlýnku na maso.

*Odtučnění vstupní suroviny:* V 5.000 ml Erlenmayerově baňce se šlachy smíchaly se směsí rozpouštědel petrolether a ethanol (poměr 1:1, objemové díly) v poměru 1:5 (500 g šlach a 2.500 ml směsi rozpouštědel). Směs se třepala cca 51 h na třepačce. Po cca 7, 24 a 31 h odtučňování byla směs rozpouštědel vyměněna za novou. Po ukončení odtučňování se směs přecedila přes kovové sítko.

*Příprava kolagenního hydrolyzátu:* V prvním stupni zpracování se do 1.000 ml PE láhve navážilo 30 g šlach a přidalo se 300 ml  $H_2O$ . Směs se třepala 8 h na třepačce. Po ukončení prvního stupně zpracování se zbobtnalé šlachy separovaly od kapalného podílu filtrací přes kovový cedník. Následně byly šlachy smíchány s 300 ml  $H_2O$  a intenzivně míchány 30 s v PE láhvi. Po filtraci se tento postup promytí s vodou opakoval ještě dvakrát. Ve druhém stupni zpracování se zbobtnalé šlachy smísily s 300 ml  $H_2O$  a po krátkém protřepání v PE láhvi se pH směsi upravilo na  $8,0 \pm 0,2$  přidávkem ledové  $CH_3COOH$ , respektive 10% roztoku NaOH. Přidalo se 3 % (vztaženo na sušinu výchozích šlach) proteolytického enzymu Polarzyme 6.0 T. Směs se třepala 16 h při pokojové teplotě na třepačce, v prvních hodinách pracovní doby se cca každou hodinu kontrolovalo a upravovalo pH směsi na  $8,0 \pm 0,2$ .

*Výpočet sušiny:* Do dvou misek (A a B) bylo naváženo kolem 1 g odtučněných šlach, které byly následně vloženy do sušárny a vysušeny, poté byly opět zváženy a ze zjištěných hmotností byl vypočítán obsah sušiny.

Navážka odtučněných šlach před vysušením:  $m_{\text{šlach,A}} = 1,1389 \text{ g}$ ,  $m_{\text{šlach,B}} = 1,1247 \text{ g}$

Navážka odtučněných šlach po vysušení (sušina):  $m_{\text{sušiny,A}} = 0,9746 \text{ g}$ ,  $m_{\text{sušiny,B}} = 0,9595 \text{ g}$

$$\frac{m_{\text{sušiny,A}}}{m_{\text{šlach,A}}} \cdot 100 \% = \frac{0,9746}{1,1389} \cdot 100 \% = 85,57 \% \quad (1)$$

$$\frac{m_{\text{sušiny,B}}}{m_{\text{šlach,B}}} \cdot 100 \% = \frac{0,9595}{1,1247} \cdot 100 \% = 85,44 \% \quad (2)$$

$$\bar{X}_{A,B} = \frac{85,57 + 85,44}{2} = 85,44 \% \text{ sušiny} \quad (3)$$

Z výpočtu bylo zjištěno, že u odtučněných šlach sušina tvoří 85,44 %, tato hodnota byla následně použita pro navážku 3 % enzymu.

Výpočet navážky 3 % enzymu:  $m_{\text{šlach}} = 30 \text{ g}$ ,  $\bar{X}_{A,B} = 85,44 \%$ , enzym (E) = 3 %

$$\frac{\bar{X}_{A,B}}{100} \cdot m_{\text{šlach}} = \frac{85,44}{100} \cdot 30 = 25,6328 \text{ g šlach} \quad (4)$$

$$\frac{E}{100} \cdot 25,6328 = \frac{3}{100} \cdot 25,6328 = 0,7689 \text{ g enzymu} \quad (5)$$

Z výpočtu sušiny byla zjištěna navážka 3 % enzymu Polarzyme 6.0 T, která činila 0,7689 g. Ve třetím stupni zpracování se směs přelila do 800 ml kádinky a obsah se ohřál na teplotu 60 °C, směs se při této teplotě mírně míchala po dobu dvou minut. Poté se směs za horka přefiltrovala přes kovový cedník se třemi vrstvami PAD tkaniny. Roztok hydrolyzátu se vysušil na silikonových miskách v tenkém filmu při teplotě 45 °C (cca 48 h). Získaný film byl rozdrcen na velmi jemný prášek v třecí misce (Obrázek 6). Hydrolyzát byl uchováván v uzavřené plastové lahvičce v exsikátoru.



Obrázek 6: Připravený KH ve formě prášku [vlastní zdroj]

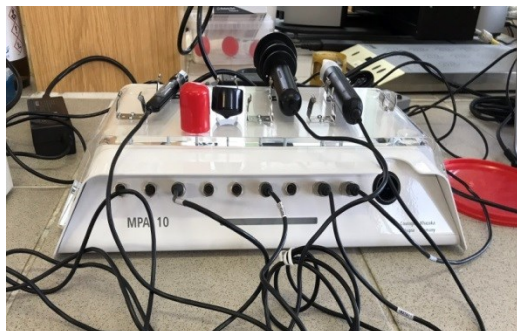
## 5.2 Přístroje, pomůcky, chemikálie

### *Použité chemikálie*

- Jarischův roztok (složení dle INCI [76]: *Aqua, Glycerin, Acidum boricum*)
- Dvousložkový silikon (Courage & Khazaka, Německo)
- Odličovač Bioderma Sensibio H<sub>2</sub>O (složení: *Aqua, PEG-6 Caprylic/Capric glycerides, Propylene glycol, Cucumis sativus (Cucumber) fruit extract, Mannitol, Xylitol, Rhamnose, Fructooligosaccharides, Disodium EDTA, Cetrimonium bromide*)

### *Použité přístroje a pomůcky*

- stanice MPA 10 s jednotlivými sondami (Courage & Khazaka, Německo), (Obrázek 7 a)
- tewametr TM 300 (Courage & Khazaka, Německo), (Obrázek 7 c)
- korneometr CM 825 (Courage & Khazaka, Německo), (Obrázek 7 d)
- laboratorní váhy (KERN & Sohn, GmbH, Německo)
- Skin Visiometer SV 700 USB (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo), (Obrázek 7 b)
- software Visiometer SV 700 USB Windows pro zpracování obrazu a dat
- vakuové čerpadlo VP 45 (Courage & Khazaka, Německo) pro míchání silikonových složek s pedálem (tlak: 550-650 kPa)
- visioskop PC 35 (Courage & Khazaka, Německo), (Obrázek 7 f)
- reviskometr RV 600 (Courage & Khazaka, Německo), (Obrázek 7 e)
- míchadlo RZR 2020 (Ika, Německo)
- běžné laboratorní sklo a plastové pomůcky, buničina, nůžky, destilovaná voda
- použitý materiál pro přípravu silikonových replik: oboustranně lepící papírové kroužky, průhledná krycí fólie, plastové tyčinky na nanášení silikonu a kalíšky na míchání silikonu, papírové rámečky pro uchycení silikonové repliky



a)



b)



c)



d)



e)



f)

Obrázek 7: a) stanice MPA 10, b) Skin Visiometer SV 700, c) tewametr TM 300, d) korneometr CM 825, e) reviskometr RV 600, f) visioskop PC 35 [vlastní zdroj]

### 5.2.1 Korneometr CM 825

Korneometr je přístroj, který slouží k měření hydratace pokožky pomocí sondy, která je jemným tlakem přiložena na měřené místo. Tato sonda je chráněna pryžovým uzávěrem, aby nedošlo k jejímu poškození. Naměřená hodnota je ihned zaznamenána na monitoru počítače, ten je propojen s MPA stanicí. Po každém měření je nutno sondu očistit od krémů nebo gelů pomocí buničiny a destilované vody, aby nedošlo k ulpívání vzorku na sondě a následnému ovlivnění měřených hodnot. Korneometrické měření je rychlou a snadnou metodou ke zjištění hydratace pokožky. Existuje stupnice hydratace, podle které se typ kůže dělí na extrémně suchou (< 30 c. j.), suchou (30-45 c. j.) a normální (> 45 c. j.) [58].

### 5.2.2 Tewametr TM 300

Pokožka slouží jako přirozená bariéra proti vypařování vlhkosti. Pokud je však tato bariéra narušena, vlhkost se z pokožky vypařuje ve větším množství, což způsobuje také zvýšení hodnot TEWL. K měření množství vypařené vlhkosti se používá tzv. tewametr. V této diplomové práci byl použit tewametr TM 300 s otevřenou komorou. Nejdříve je z přístroje sejmuta pryžová krytka, poté je sonda přiložena na měřené místo a po stisknutí tlačítka je spuštěno měření, po opětovném stisknutí je měření ukončeno. Naměřené hodnoty se ihned objeví na monitoru počítače, který je připojen k MPA stanici. Opět je nutno sondu tewametru očistit za pomoci buničiny a destilované vody pro přesné výsledky měření. Existuje stupnice hodnot TEWL, podle které se stav kůže dělí na velmi dobrý (0-10 g/m<sup>2</sup>/h), dobrý (10-15 g/m<sup>2</sup>/h), normální (15-25 g/m<sup>2</sup>/h), napjatý (25-30 g/m<sup>2</sup>/h) a kritický (> 30 g/m<sup>2</sup>/h) [59].

### 5.2.3 Reviskometr RV 600

Pomocí reviskometru lze měřit elasticitu pokožky, kterou přístroj vyhodnotí pomocí rychlosti šíření akustické vlny na povrchu kůže. Měření probíhá v různých úhlech a výsledky závisí jak na izotropii, tak také na anizotropii, která souvisí se stárnutím kůže. Na kůži jsou přiloženy dva senzory, kdy jeden z nich vydává rázovou vlnu a druhý ji přijímá, závisí tedy na rychlosti šíření rázové vlny kožními vlákny. Rychlost šíření je ovlivněna elasticitou a vlhkostí kůže. Reviskometr je chráněn krytkou, která je před vlastním měřením sejmuta. Následně se na měřené místo nalepí oboustranně lepící papírový kroužek a poté je přiložena sonda reviskometru, která umožňuje měření po 30° krocích (nejméně po 10° krocích). Opět jsou naměřená data ihned zobrazena na monitoru počítače, který je připojen k MPA stanici.

### 5.2.4 Visioskop PC 35

Visioskop je USB kamera vybavená polarizačními filtry. Pomocí něj lze pořídit snímky pokožky s třicetinásobným zvětšením, které lze následně uložit a analyzovat. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu analýzy pokožky. Před vlastním měřením se kamera nejprve očistí buničinou, následně je přiložena k měřenému místu a stisknutím tlačítka je vytvořen snímek reliéfu pokožky, který je zobrazen na monitoru počítače. Software dokáže určit množství vrásek, deskvamaci pokožky, pigmentové skvrny, množství pórů a nečistot, poškození kůže vlivem stárnutí a působení UV záření a také strukturu vlasu [60].



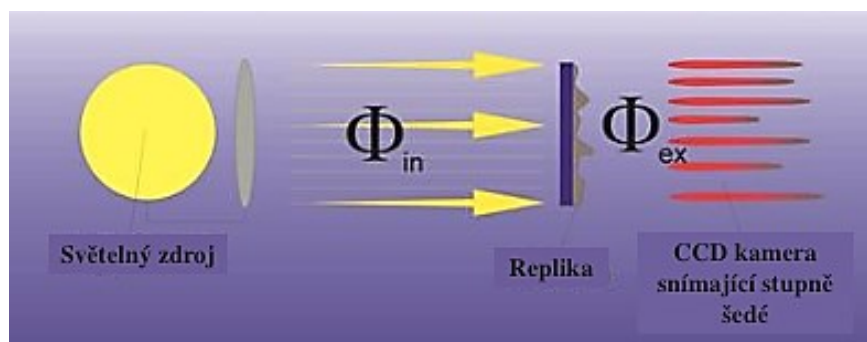
### 5.2.5 Skin Visiometer SV 700

Jedná se přístroj, který slouží k vyhodnocení mikroreliefu povrchu pokožky díky světlu, které prochází velmi tenkou a modrou silikonovou replikou (Obrázek 9). Replika je vyrobena ze speciálního modrého dvousložkového silikonu a poté je umístěna mezi zdroj světla a paralelně umístěnou CCD kameru. Světlo je absorbováno podle tloušťky silikonového materiálu. Modrý pigment je schopen rychlé absorpce záření. Výsledkem jsou 2D a 3D obrazy kůže, ze kterých jsou získány na základě hloubky vrásek parametry povrchu kůže.

Množství absorbovaného světla je dána Lambert-Beerovým zákonem:

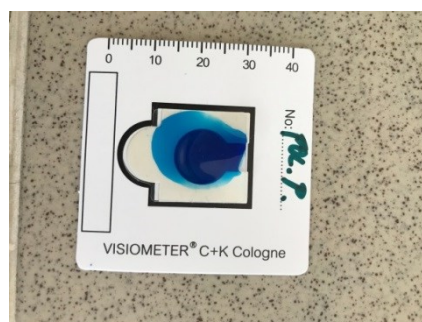
$$\Phi_{\text{ex}} = \Phi_{\text{in}} \cdot e^{-kd} \quad (6)$$

Kde:  $k$  – absorpční konstanta,  $d$  – délka optické dráhy



Obrázek 8: Princip měření přístroje Skin Visiometer SV 700 [61]

CCD kamera měří světlo procházející replikou v úrovních šedi. Obrázek 8 popisuje princip měření přístroje. Získaný obraz je zobrazen v jednotlivých souřadnicích X, Y a Z, kdy výšku zobrazují souřadnice X a Y a hloubku souřadnice Z. Lze stanovit hloubku vrásek v rozmezí 20-300  $\mu\text{m}$ . Měření mikroreliefu pokožky je pro kosmetický průmysl zajímavým ukazatelem. Visiometer je přesný, snadno použitelný a ekonomický přístroj pro výzkumné laboratoře nebo instituce, které testují účinnost produktů proti stárnutí [61].



Obrázek 9: Šablona se silikonovou replikou pro vyhodnocení mikroreliefu pokožky [vlastní zdroj]

### 5.3 Příprava aplikačních formulací s kolagenním hydrolyzátem

*Carbopolový gel (Fagron, ČR)*

Kvalitativní složení hydrogelového základu (karbomerového gelu) dle INCI [76]: *Carbomerum 980, Aqua purificata, Methylparabenum, Propylparabenum, Trolaminum*. Složení karbomerového gelu je uvedeno od nejvyššího zastoupení látek až po látky s nejnižším zastoupením.

Karbomerový gel je transparentní a chladivý gel, skládá se z 0,7 % kyseliny polyakrylové a jeho hodnota pH je 4,5.

Do carbopolového gelu byl zamíchán KH v poměru 1:1, nejprve byl tedy navážen KH v množství 3 g a následně bylo naváženo 300 g carbopolového gelu. Celá směs byla homogenizována na míchadle RZR 2020 po dobu 10 min při 2000 ot/min. Připravená směs byla následně nadávkována do lahviček v množství 75 ml pro každého probanda. Směs probandi uchovávali po celou dobu testování v lednici.

### 5.4 Metodika a postup práce

#### 5.4.1 Výběr probandů

V experimentální části byla testována účinnost gelových formulací s přídavkem KH, který byl aplikován na pravý a levý spánek probandek. Výběr probandů a také postup testování se řídil mezinárodními etickými principy biomedicínského výzkumu s lidskými účastníky [62]. Jelikož byl sledován vliv gelové formulace na potlačení vrásek, tak se testování zúčastnily pouze starší ženy, aby byly výsledky co nejvíce viditelné. Skupinu tvořilo celkem 10 testovaných probandek. Tabulka 2 popisuje charakteristiku 10 probandek, které se zúčastnily měření.

Tabulka 2: Charakteristika probandek, které se zúčastnily experimentu

Charakteristika probandek	Počet	Věk (rok)
$\bar{x} \pm s$	10	50 ± 9

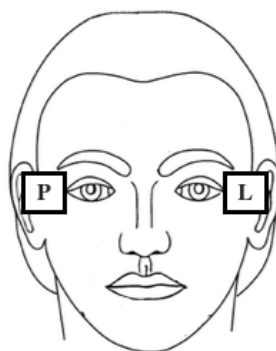
### 5.4.2 Organizace měření

Praktické měření, během kterého se testovala účinnost gelových formulací s KH v oblasti pravého a levého spánku, probíhalo v měsíci únoru, březnu a dubnu. Praktické měření probandek se konalo vždy po měsíční aplikaci gelu s KH na pravém a levém spánku.

Měření probíhalo vždy ve stejné laboratoři Fakulty technologické při teplotě  $21 \pm 2$  °C a relativní vlhkosti  $38 \pm 2$  %. Probandky byly před zahájením měření seznámeny s organizací měření, musely podepsat informovaný souhlas (P I) a následně vyplnily dotazník o svém zdravotním stavu (P II).

První měření proběhlo v měsíci únoru, kdy byla měřena místa v oblasti pravého a levého spánku (Obrázek 10) jednotlivých probandek před aplikací gelové formulace s KH. Před samotným měřením byly probandky ponechány 20 minut v klidu v laboratoři, aby probíhalo měření v klidovém stavu a výsledky byly přesné. Testované místo v oblasti spánků bylo odlišeno od makeupu (pokud to bylo nutné) pomocí odličovací vody Bioderma a poté dočištěno Jarischovým roztokem. Jarischovým roztokem bylo měřené místo očištěno vždy, aby nedošlo k ovlivnění výsledků od případných nečistot.

Probandky obdržely během prvního měření gelovou formulaci s KH v uzavřené lahvičce a dostaly pokyny týkající se aplikace gelu. Gel byl aplikován v tenké vrstvě vždy ráno a večer na odličenou a očištěnou pleť v oblasti pravého a levého spánku po dobu čtyř týdnů, po uplynutí této doby proběhlo druhé měření. Probandky si aplikovaly gelovou formulaci další čtyři týdny a po uplynutí této doby bylo provedeno poslední měření. Gelová formulace byla tedy pravidelně aplikována po dobu osmi týdnů. Probandky byly požádány, aby během aplikace gelové formulace nepoužívaly žádné jiné kosmetické produkty v oblasti obličeje a aby gel uchovávaly po celou dobu v lednici.



Obrázek 10: Měřené oblasti v průběhu testování [19, upraveno]

### 5.4.3 Princip měření

#### *Princip měření hydratace pokožky*

Nejprve bylo provedeno měření hydratace pokožky pomocí korneometru CM 825. Měřená místa byla nejprve očištěna Jarischovým roztokem a následně byla změřena pravá a levá strana v oblasti spánků. Na pravé i levé straně bylo vždy naměřeno 5 hodnot hydratace pomocí sondy, která se mírným tlakem přitlačila na měřené místo. Naměřená data byla poté uložena a následovalo měření TEWL.

#### *Princip měření transepidermální ztráty vody (TEWL)*

Dále byla změřena transepidermální ztráta vody z pokožky pomocí tewametru TM 300. Na pravé a levé straně spánků bylo naměřeno 15 hodnot pomocí přiložené sondy. Naměřená data byla opět uložena a následovalo měření elasticity pokožky.

#### *Princip měření elasticity pokožky*

Elasticita pokožky byla měřena pomocí reviskometru RV 600. Úhel sondy je 0°-360° a měření probíhalo vždy pootočením sondy po 30° krocích na pravé i levé části spánku. Nejméně lze postupovat během měření po 10° krocích. Naměřená data byla opět uložena a následně byla provedena analýza reliéfu pokožky.

Měření hydratace, transepidermální ztráty vody a elasticity pokožky bylo zaznamenáno pomocí programu CK-Multi Probe.

#### *Princip měření reliéfu pokožky*

Snímek reliéfu pokožky, konkrétně analýza vrásek, byl získán pomocí visioskopu PC 35. Kamera přístroje byla vždy jemně přiložena na měřené místo a po zaostření obrazu byl vyfocen snímek. Program také vypočítal zastoupení vrásek v dané oblasti v %. Snímek byl uložen a poté byla provedena poslední analýza vrásek pomocí silikonových replik.

Program používaný při snímání reliéfu pokožky byl CSI-Complete Skin Investigation.

#### *Princip měření kožního reliéfu pomocí silikonových replik*

Kožní reliéf byl měřen přístrojem Skin Visiometer SV 700. Nejprve bylo nutné připravit silikonovou repliku, k tomu bylo potřeba:

- Oboustranně lepící papírový kroužek na vymezení plochy, na kterou byl nanášen silikon (Obrázek 11 a). Papírový kroužek má na svém konci otvor, kterým odtéká

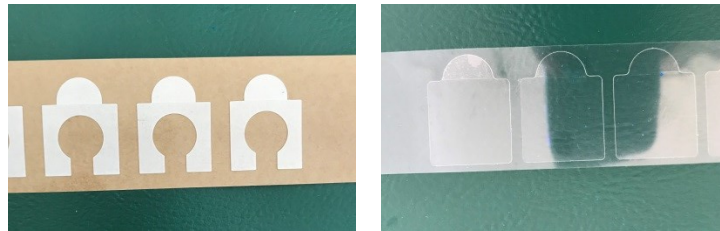
přebytečný silikon, který by mohl způsobit značnou deformaci repliky a tedy nežádoucí výsledky.

- Průhledná krycí fólie, která slouží k překrytí silikonové repliky a brání tak jejímu znehodnocení od nečistot (Obrázek 11 b).
- Dvousložkový silikon, který se skládá z báze (B) a katalyzátoru (C). Při míchání je nejprve do plastového pohárku nanese báze a až poté katalyzátor, a to v poměru 1:1 (Obrázek 12 c).
- Plastový pohárek, do kterého se nanese silikonová báze a katalyzátor (Obrázek 12 d). Následně jsou obě složky smíchány pomocí vakuového čerpadla. Vakuové míchání je důležité pro zamezení tvorby vzduchových bublin, které jsou nežádoucí, jelikož mohou ovlivnit výsledky měření.
- Plastová tyčinka, která slouží pro nanesení silikonu na průhlednou krycí fólii, která je následně přilepena k papírovému kroužku vymezujícího měřené místo pokožky (Obrázek 12 d).
- Papírová šablona, na kterou je replika v závěru nalepena. Tato šablona se poté vkládá do přístroje Skin Visiometer SV 700.
- Vakuové čerpadlo, které se skládá z nerezové tyčinky s krytem. Tyčinka s krytem se přiloží k plastovému pohárku se silikonem, vytvoří se podtlak a obě silikonové složky se ručně míchají po dobu 20 s. Vakuové čerpadlo je poháněno pomocí mechanického pedálu.

Nejdříve byl vymezen měřený prostor v oblasti spánků probandek pomocí náplastí (Obrázek 13 A), následně byl do definovaného prostoru nalepen oboustranně lepící papírový kroužek (Obrázek 13 B). Poté byly smíchány obě silikonové složky, tedy báze (B) a katalyzátor (C) pomocí vakuového čerpadla po dobu 20 s (po delším čase by silikon zatuhl).

Po smíchání obou těchto složek došlo k rychlému nanesení silikonu (1-2 kapky) pomocí plastové tyčinky na průhlednou krycí fólii. Tato krycí fólie i se silikonem byla nalepena na oboustranně lepící papírový kroužek v oblasti spánku probandky (Obrázek 13 C). Přiložením krycí fólie došlo k vytlačení přebytečného silikonu otvorem papírového kroužku, čímž byla dosažena rovnoměrná silikonová vrstva repliky. Následně bylo nutné nechat silikon vytvrdit, doba nutná k vytvrzení byla přibližně 5 min. Během této doby probandky seděly v klidu v křesle. Po uplynutí této doby byla silikonová replika opatrně sejmuta z pokožky, aby nedošlo k jejímu poškození a byla nalepena na papírovou šablonu. Každá šablona byla

označena jménem probandky a byla zde také uvedena měřená oblast spánku (pravá nebo levá). V posledním kroku byla šablona vložena do přístroje Skin Visiometer SV 700 tak, aby strana repliky, která byla překryta krycí fólií, byla otočena směrem ke světelnému zdroji. Byl pořízen snímek repliky, který byl následně uložen spolu se získanými daty.

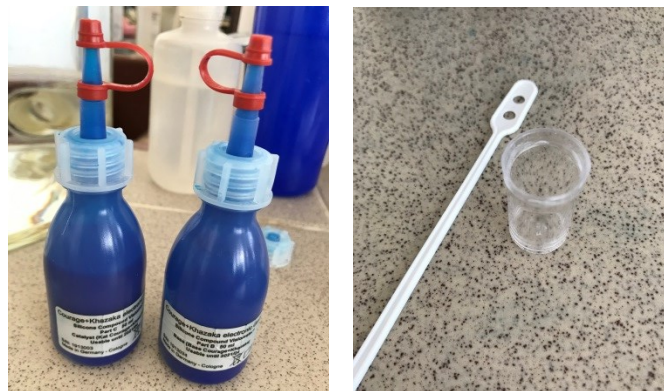


a)

b)

Obrázek 11: a) oboustranně lepicí papírový kroužek, b) průhledná krycí fólie

[vlastní zdroj]



c)

d)

Obrázek 12: c) dvousložkový silikon (báze a katalyzátor), d) plastový pohárek a tyčinka

[vlastní zdroj]



A

B

C

Obrázek 13: Postup nanášení silikonové repliky: A) vymezená oblast, B) nalepený papírový kroužek, C) nanesený silikon [vlastní zdroj]

#### 5.4.4 Statistické vyhodnocení naměřených dat

Veškerá naměřená data byla vyhodnocena a statisticky zpracována pomocí programu Microsoft Office Excel (2010). Ze získaných dat byl vypočítán aritmetický průměr  $\bar{x}$  a směrodatná odchylka  $s$ , které uvádějí rovnice (7) a (8).

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (7)$$

Kde:  $\bar{x}$  – aritmetický průměr,  $N$  – počet měření,  $x_i$  – hodnota měření

$$s = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (8)$$

Kde:  $s$  – směrodatná odchylka,  $N$  – počet měření,  $\bar{x}$  – aritmetický průměr,  $x_i$  – hodnota měření

Vyhodnocení získaných dat souboru probandek, která byla naměřena v pravé a levé spánkové oblasti v 1., 4. a 8. týdnu, bylo provedeno následovně:

- Hydratace – v jednotlivých oblastech spánku bylo vždy naměřeno 5 hodnot, aritmetický průměr (7) a směrodatná odchylka (8) byly spočítány pouze ze 3 hodnot, jelikož nejvyšší a nejnižší hodnota byla vždy zanedbána
- TEWL – v jednotlivých oblastech pokožky bylo vždy naměřeno 15 hodnot, aritmetický průměr (7) a směrodatná odchylka (8) byly spočítány pouze z 10 hodnot, protože prvních 5 hodnot bylo vždy zanedbáno kvůli vyrovnaní teplot mezi sondou a pokožkou
- Elasticita – v jednotlivých oblastech pokožky bylo vždy naměřeno 13 hodnot pro každý úhel otočení ( $0^\circ$ - $360^\circ$ ), aritmetický průměr (7) a směrodatná odchylka (8) byly spočítány pro každý úhel otočení sondy
- Drsnost – pro každý z parametrů drsnosti R1-R5 byl vypočítán aritmetický průměr (7) a směrodatná odchylka (8)
- Množství vrásek a anizotropie pokožky byly vyhodnoceny pomocí aritmetického průměru (7)

V případě vyhodnocení hydratace a TEWL byl spočítán také aritmetický průměr (7) u jednotlivých probandek.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Vyhodnocení hydratačních účinků gelu

Prvním testovaným parametrem této diplomové práce byla hydratace pokožky v oblasti pravého a levého spánku pomocí korneometru CM 825. Byl sledován hydratační účinek gelové formulace s přidavkem KH u 10 probandek. Na hydrataci má vliv mnoho faktorů (strava, pitný režim, kosmetické přípravky), které také ovlivňují získané výsledky.

V Tabulce 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty hydratace pro oblast pravého (P) a levého (L) spánku jednotlivých probandek, nejprve tedy v počátečním stavu před nanesením gelové formulace (1. týden) a následně po čtyřech a osmi týdnech pravidelného používání gelu v oblasti spánků. Tabulka 4 udává průměrné hodnoty souboru probandek se směrodatnými odchylkami s hodnotami hydratace v jednotlivých týdnech. Pro lepší přehlednost byly sestrojeny sloupcové grafy průměrných hodnot hydratace jednotlivých probandek (Obrázek 14 a 15) a celého souboru (Obrázek 16) v počátečním stavu a po čtyř a osmitýdenní aplikaci gelu v jednotlivých oblastech spánku.

Nejprve byla změřena hydratace probandek před pravidelnou aplikací gelové formulace. Ze získaných výsledků uvedených v Tabulce 3 je vidět, že probandky vykazují již v počátečním stavu dostatečně vysoké hodnoty hydratace a jejich pleť je tedy v normálním stavu, ani u jedné probandky nebyl stav pleti extrémně suchý (viz. kapitola 5.2.1). Měřené hodnoty hydratace byly u všech probandek přibližně stejné při porovnání pravé a levé spánkové oblasti. Při srovnání výsledků celého souboru probandek (Tabulka 4) je zřejmé, že v průměru došlo ve 4. a 8. týdnu ke zvyšování hydratace vlivem aplikace gelové formulace. Ve 4. týdnu se hydratace zvýšila o 1,9 % (P) a 3,7 % (L) v porovnání s výsledky hydratace před samotnou aplikací formulace. Gelová formulace byla aplikována další čtyři týdny, kdy se opět projevil pozitivní hydratační účinek. Hodnoty hydratace se po osmi týdnech tedy zvýšily o 11,1 % (P) a 9,1 % (L). Z výsledků je tedy zřejmé, že záleží na době aplikace gelové formulace a při delším používání hydratační účinek roste. Vliv na hydrataci může mít také tloušťka nanesené vrstvy gelu. Celkově se hydratace pokožky během celého období testování zvýšila o 13,0 % (P) a 12,8 % (L).

Pokud porovnáme výsledky hydratace u jednotlivých probandek (Tabulka 3), je zřejmé, že největšího zlepšení dosahuje probandka 1, kdy hodnoty hydratace vzrostly již po 4. týdnu aplikace gelové formulace. Celkový nárůst u této probandky činí 96,4 % (P) a 86,7 % (L).



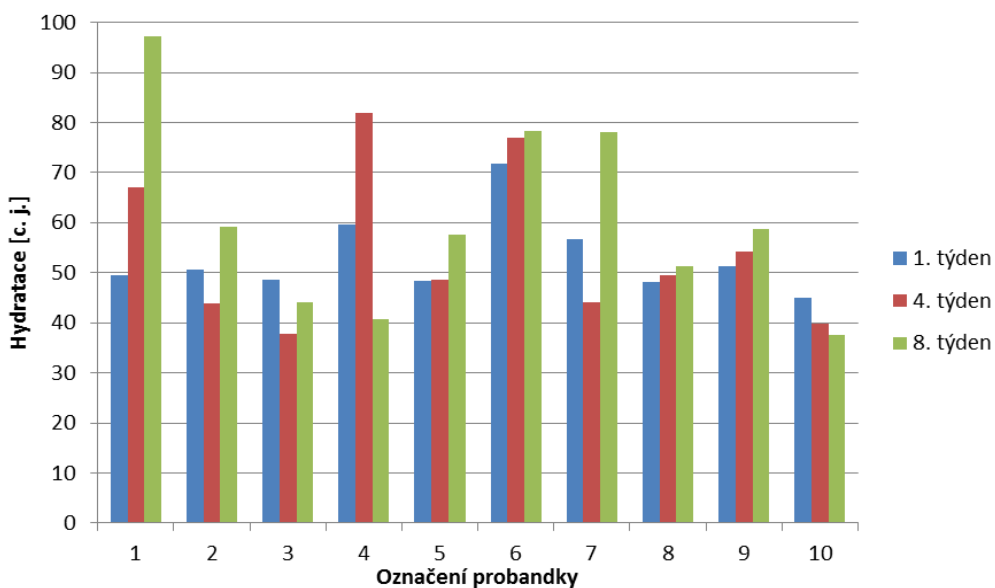
Významný nárůst hydratace po osmi týdnech vykazuje také probandka 7, kdy hodnoty vzrostly o 37,7 % (P) a 34,9 % (L). U této probandky ale došlo ve 4. týdnu k poklesu hydratace o -22,2 % (P) a -19,6 % (L). Pokles pozorujeme také u probandek 2 a 3. Nejvyšších hodnot dosahuje ve 4. týdnu probandka 4, kdy došlo k nárůstu o 37,2 % (P) a 53,1 % (L), ale v 8. týdnu došlo k výraznému poklesu o -50,3 % (P) a -45,4 % (L). Naopak žádný hydratační účinek gelu nebyl zjištěn u probandky 10, u které došlo k poklesu hydratace ve 4. i 8. týdnu a zároveň dosáhla nejnižších hodnot ze všech probandek během posledního měření. U této probandky došlo k celkovému poklesu o -16,7 % (P) a -11,2 % (L). Důvodem tak nízkých hodnot hydratace může být to, že probandka jako jediná ze všech testovaných účastnic trpěla kožním onemocněním (lupénkou). Bylo prokázáno, že nízké hodnoty hydratace vykazují lidé trpící kožními problémy, jako je psoriáza nebo atopická dermatitida [16]. Celkově tedy došlo k zlepšení hydratace u 70 % probandek po pravidelné aplikaci gelové formulace a lze tedy říci, že přídavek KH má pozitivní vliv na hydrataci kůže při pravidelném používání.

Tabulka 3: Průměrné hodnoty hydratace probandek v oblasti pravého a levého spánku v jednotlivých týdnech aplikace

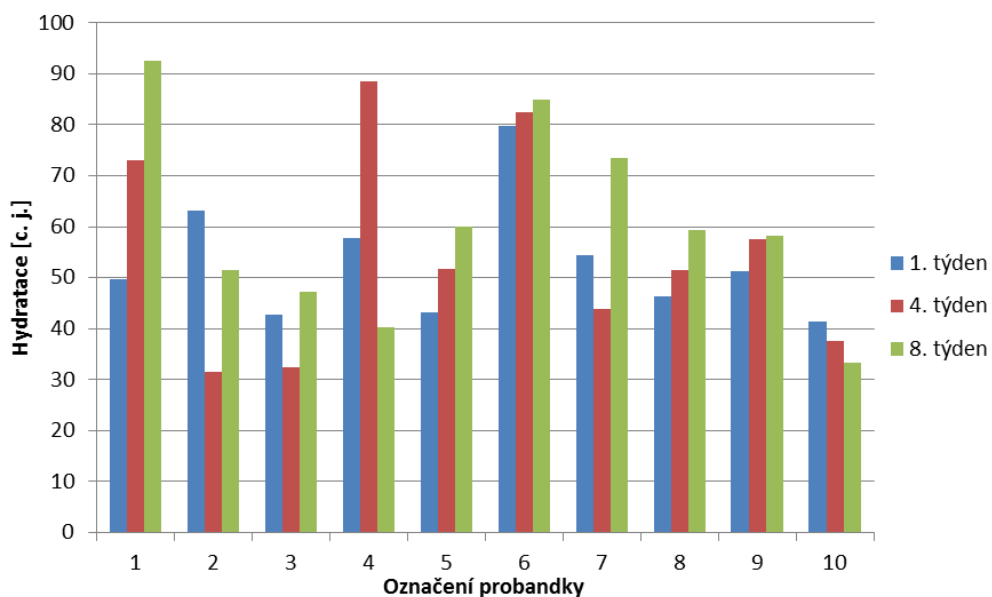
Hydratace [c. j.] $\bar{x}$						
Probandka	Pravá strana (P)			Levá strana (L)		
	Týden			Týden		
	1.	4.	8.	1.	4.	8.
1	49,5	67,0	97,2	49,6	73,1	92,6
2	60,7	43,9	59,2	63,1	31,6	51,4
3	48,6	37,7	49,1	42,7	32,5	47,2
4	59,7	81,9	40,7	57,8	88,5	40,2
5	48,4	48,7	57,6	43,2	47,6	60,1
6	71,9	76,9	78,4	79,8	82,4	84,9
7	56,8	44,2	78,2	54,5	43,8	73,5
8	48,1	49,4	51,4	46,4	51,4	59,4
9	51,3	54,2	58,7	51,3	57,5	58,2
10	45,1	39,9	37,6	41,4	37,6	33,4

Tabulka 4: Průměrné hodnoty hydratace se směrodatnými odchylkami pro soubor probandek

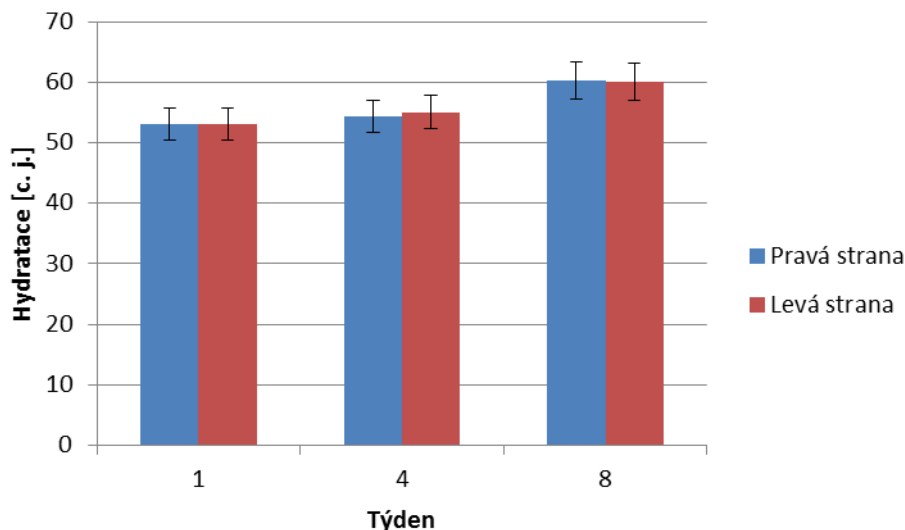
Hydratace [c. j.] $\bar{x} \pm s$		
Týden	Pravá strana	Levá strana
1.	$53 \pm 3$	$53 \pm 3$
4.	$54 \pm 3$	$55 \pm 4$
8.	$60 \pm 4$	$60 \pm 4$



Obrázek 14: Srovnání průměrných hodnot hydratace jednotlivých probandek (pravá strana)



Obrázek 15: Srovnání průměrných hodnot hydratace jednotlivých probandek (levá strana)



Obrázek 16: Průměrné hodnoty hydratace souboru probandek pro pravou a levou stranu

Existuje mnoho studií zabývajících se právě účinky kolagenu na vlastnosti pokožky. V jedné studii byl sledován účinek krému s přídavkem kolagenu po aplikaci na pokožku. Bylo zjištěno, že došlo k mírnému zlepšení hydratace kůže. Výhodou přímé aplikace na kůži je přímý kontakt produktu s povrchem kůže, kdy může zlepšit elasticitu a zvýšit hydrataci. Nevýhodou však je, že aplikovaný produkt nepronikne do hlubších vrstev kůže, tedy až do *stratum corneum*, která slouží k minimalizaci ztráty vlhkosti. Důležitým faktorem, který ovlivňuje hydrataci pokožky, je také zdroj kolagenu, kdy bylo prokázáno, že kolagen získaný z ryb proniká mnohem hlouběji do kůže a lépe ji hydratuje [63]. Ze získaných výsledků této diplomové práce je opravdu vidět, že nárůst hydratace není příliš vysoký a u některých probandek neměl aplikovaný gel na hydrataci významný vliv.

V jiné studii byla měřena a porovnána hydratace kůže v různých oblastech obličeje (spánek, tvář, horní čelist, brada, čelo). Byla provedena krátkodobá (1 h) a dlouhodobá (3 týdny) studie s hydratačním přípravkem u probandek ve věku mezi 20 a 60 lety se suchou pokožkou. Měření byla prováděna pomocí korneometru CM 820. Krátkodobé testy hodnotící okamžitý účinek na hydrataci se obvykle provádějí v rozsahu hodiny až několika hodin po aplikaci hydratačního produktu. Po uplynutí stanovené doby (1 h) byla provedena korneometrická měření jednotlivých zón. Do této studie bylo přijato 21 probandek. Naopak dlouhodobé testování hodnotí zlepšení stavu pokožky po opakovaném použití produktu. Měření byla provedena před aplikací produktu a následně 1, 2 a 3 týdny od počátku studie. Účinek produktu byl porovnán mezi iritovanými místy po krátkodobé a dlouhodobé aplikaci. Výsledkem této studie byl prokazatelný účinek produktu na zlepšení hydratace testovaných míst. Aplikace produktu významně zvýšila obsah vody v SC. Při hodnocení účinku

dlouhodobého užívání produktu byl také prokázán významný rozdíl. V oblasti tzv. T-zóny (čelo a brada) dosahovala hydratace po 3 týdnech nižších hodnot v porovnání s ostatními testovanými zónami obličeje, u kterých byl hydratační účinek produktu mnohem efektivnější [64].

## 6.2 Vyhodnocení účinků gelu na TEWL pokožky

Dalším testovaným parametrem u jednotlivých probandek byla transepidermální ztráta vody z pokožky pomocí tewametru TM 300. Naměřené hodnoty TEWL v počátečním stavu a po čtyř a osmitýdenní aplikaci gelové formulace s přídavkem KH u jednotlivých probandek jsou uvedeny v Tabulce 5 a u souboru probandek v Tabulce 6. Opět byly pro lepší přehlednost sestrojeny sloupcové grafy průměrných hodnot TEWL u jednotlivých probandek (Obrázek 17 a 18) a u celkového souboru (Obrázek 19) v dané oblasti spánků a byl tak srovnán počáteční stav a stav po aplikaci gelové formulace po dobu čtyř a osmi týdnů.

Podle stupnice TEWL mají téměř všechny probandky v počátečním stavu stav kůže normální (viz. kapitola 5.2.2). Výjimkou je probandka 3, která vykazuje velmi nízké hodnoty TEWL a stav její kůže je tedy velmi dobrý a probandka 8 s dobrým stavem kůže. Měřené hodnoty TEWL byly při porovnání pravé i levé spánkové oblasti přibližně stejné u všech probandek. Pokud porovnáme výsledky celého souboru probandek (Tabulka 6), lze vidět, že v průměru došlo ve 4. a 8. týdnu ke snížení TEWL a tedy k celkovému zlepšení bariérové funkce kůže. Ve 4. týdnu došlo k poklesu hodnot o  $-11,0\%$  (P) a  $-9,2\%$  (L) ve srovnání s výsledky před samotnou aplikací gelové formulace. Pozitivní účinek na bariérovou funkci kůže byl znatelný i v 8. týdnu, kdy došlo k poklesu TEWL o  $-17,0\%$  (P) a  $-16,2\%$  (L). Celkový pokles TEWL po osmitýdenní aplikaci gelové formulace byl tedy  $-28,0\%$  (P) a  $-25,4\%$  (L). Stejně jako u hydratace je zřejmé, že záleží na době aplikace gelové formulace a při delším používání TEWL klesá. Je známo, že čím lepší je bariérová funkce kůže, tím vyšší je obsah vody a nižší TEWL, což bylo prokázáno ze získaných výsledků hydratace a TEWL v této diplomové práci.

Pokud porovnáme výsledky u jednotlivých probandek (Tabulka 5), je zřejmé, že nejlepších hodnot TEWL již před samotnou aplikací gelové formulace dosahuje probandka 3, u které došlo i po osmi týdnech k poklesu TEWL o  $-14,2\%$  (P) a  $-15,2\%$  (L). Ve 4. týdnu ale došlo k nárůstu o  $24,5\%$  (P) a  $39,1\%$  (L). Nárůst TEWL hned ve 4. týdnu pravidelné aplikace gelové formulace nastal také u probandek 2, 5 a 6, u ostatních probandek došlo ve 4. týdnu k poklesu. Největší pokles po osmi týdnech je pozorován u probandky 4, tedy o

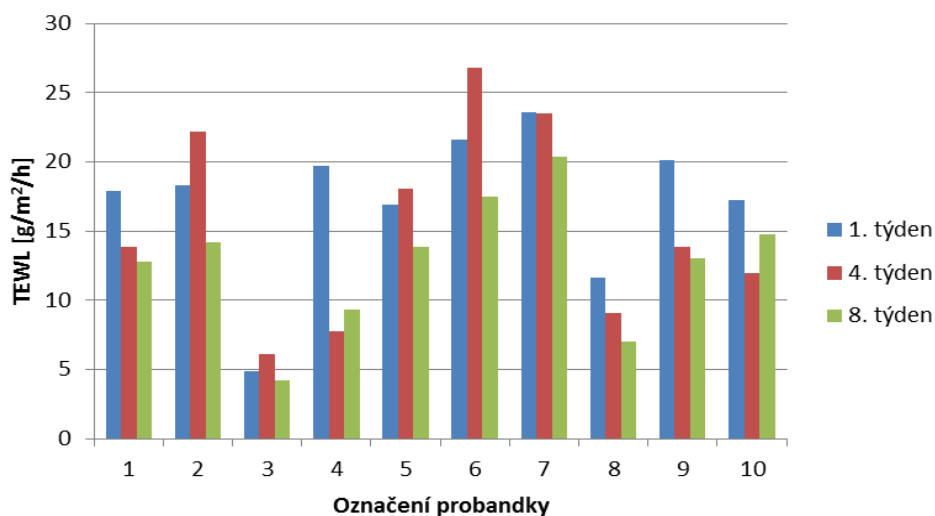
–52,3 % (P) a –51,3 % (L), dále také u probandky 8, kdy pokles činil –39,7 % (P) a –30,0 % (L). Významného zlepšení bariérových vlastností kůže dosáhla také probandka 9, kdy došlo ke snížení hodnot o –35,3 % (P) a –55,0 % (L) a probandka 1, u které hodnoty poklesly o –28,5 % (P) a –13,5 % (L). Naopak nejnižšího poklesu ze všech účastnic dosáhla probandka 7, u které byly zároveň naměřeny nejvyšší hodnoty TEWL. Hodnoty poklesly o –13,6 % (P) a –12,3 % (L). Nižší pokles byl naměřen také u probandky 10, tedy –14,0 % (P) a –16,5 % (L). Tato probandka trpěla onemocněním kůže (lupénka) a pravidelná aplikace gelové formulace měla tedy na rozdíl od hydratace kůže pozitivní vliv na bariérový stav kůže. Podle Tabulky 5 je patrné, že u všech probandek došlo po osmi týdnech pravidelné aplikace gelové formulace k poklesu hodnot TEWL, přídavek KH má tedy pozitivní vliv na bariérovou funkci kůže při pravidelné a dlouhodobé aplikaci.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty TEWL probandek v oblasti pravého a levého spánku v jednotlivých týdnech aplikace

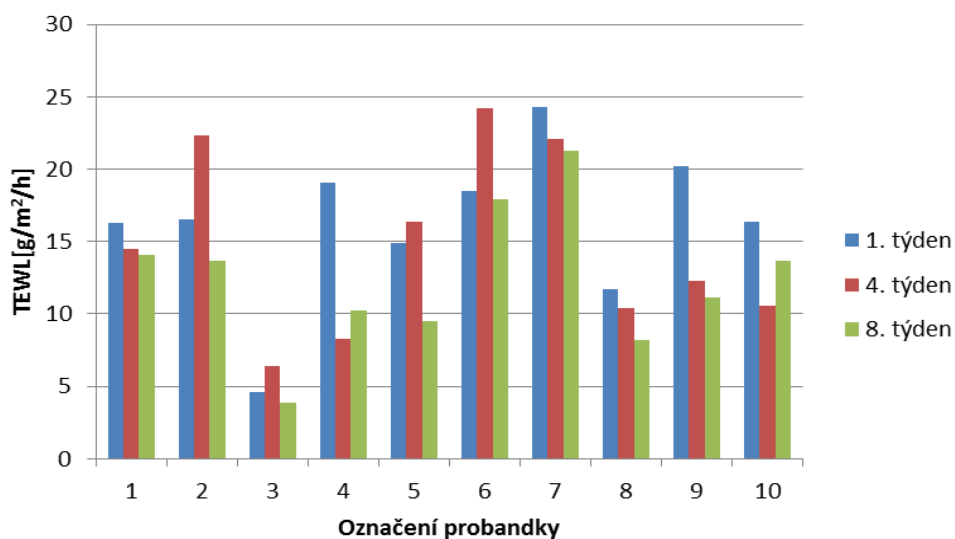
TEWL [g/m <sup>2</sup> /h] $\bar{x}$						
Probandka	Pravá strana			Levá strana		
	Týden			Týden		
	1.	4.	8.	1.	4.	8.
1	17,9	13,9	12,8	16,3	14,5	14,1
2	18,3	22,2	14,2	16,5	22,3	13,7
3	4,9	6,1	4,2	4,6	6,4	3,9
4	19,7	7,8	9,3	19,1	8,3	9,8
5	16,9	18,1	13,9	14,9	16,4	9,5
6	21,6	24,8	17,5	18,5	24,2	17,9
7	23,6	23,5	20,4	24,3	22,1	21,3
8	11,6	9,1	7,0	11,7	10,4	8,2
9	20,1	13,9	13,0	20,2	12,3	11,1
10	17,2	12,0	14,8	16,4	10,6	13,7

Tabulka 6: Průměrné hodnoty TEWL se směrodatnými odchylkami pro soubor probandek

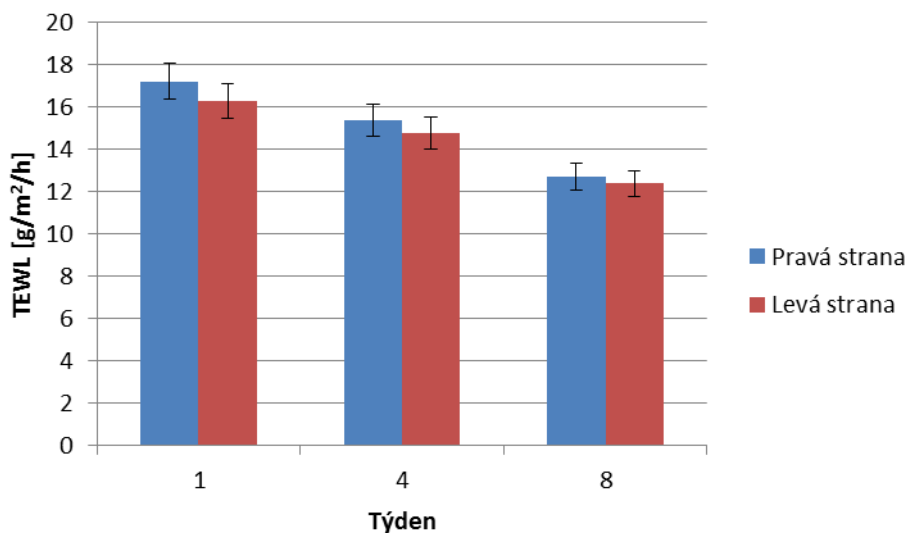
TEWL [g/m <sup>2</sup> /h] $\bar{x} \pm s$		
Týden	Pravá strana	Levá strana
1.	17,2 ± 0,6	16,3 ± 0,6
4.	15,3 ± 0,8	14,8 ± 0,7
8.	12,7 ± 0,5	12,4 ± 0,5



Obrázek 17: Srovnání průměrných hodnot TEWL jednotlivých probandek (pravá strana)



Obrázek 18: Srovnání průměrných hodnot TEWL jednotlivých probandek (levá strana)



Obrázek 19: Průměrné hodnoty TEWL souboru probandek pro pravou a levou stranu

Existuje přímá souvislost mezi rozsahem poškození kůže a TEWL. Měření TEWL jsou ovlivněna různými vnitřními (věk, pohlaví, stav kůže, genetická predispozice) a vnějšími (teplota okolí, relativní vlhkost, denní doba, aplikace krémů nebo čisticích prostředků) faktory. Všechny tyto faktory mohou vést k nesrovnalostem naměřených údajů. V jedné studii byly měřeny hodnoty TEWL v oblasti krku a čela. Před vlastním měřením byla nutná aklimatizace probandů po dobu 20 min v prostředí s řízenou teplotou (20 °C) a vlhkostí (50 %). Byl testován bariérový účinek krému po dobu několika týdnů. I když měla daná studie malý počet probandů, kteří byli pravidelně vystaveni těžkým kovům a chemikáliím v rámci zaměstnání, testování probíhalo za poměrně standardizovaných podmínek a během prvních šesti týdnů se rozdíl v průměrných hodnotách TEWL rychle zvyšovaly (v průběhu tří týdnů expozice došlo k pětinasobnému zvýšení průměrných hodnot TEWL), poté však nedocházelo k výrazným změnám a hodnoty zůstávaly téměř konstantní. Nárůst TEWL je připisován kontaktu pracovníků s kyselinou sírovou a jinými kovy [65].

### 6.3 Vyhodnocení účinků gelu na elasticitu pokožky

Dalším parametrem, u kterého byl sledován účinek gelu s přídavkem KH, byla elasticita pokožky pomocí reviskometru RV 600. Měření probíhalo pomocí sondy v různých úhlech otočení (0°-360°) po 30° krocích, kdy byly získány hodnoty rezonančních časů (RRT), které jsou udávány v reviskometrických jednotkách [A.U.]. Získané výsledky RRT v jednotlivých úhlech otočení sondy jsou uvedeny v Tabulce 7 (pravá oblast) a v Tabulce 8 (levá oblast).

Reviskometrem lze měřit elasticitu pokožky, kterou přístroj vyhodnotí pomocí rychlosti šíření akustické vlny na povrchu kůže. Měření probíhá v různých úhlech a výsledky závisí jak na izotropii, tak také na anizotropii, která souvisí se stárnutím kůže. Na kůži jsou přiloženy dva senzory, kdy jeden z nich vydává rázovou vlnu a druhý ji přijímá, závisí tedy na rychlosti šíření rázové vlny kožními vlákny. Rychlost šíření je ovlivněna elasticitou a vlhkostí kůže. Reviskometr je chráněn krytkou, která je před vlastním měřením sejmuta. Následně se na měřené místo nalepí oboustranně lepící papírový kroužek a poté je přiložena sonda reviskometru, která umožňuje měření po 30° krocích. Opět jsou naměřená data ihned zobrazena na monitoru počítače, který je připojen k MPA stanici. Vzhledem ke kruhovému tvaru sondy (viz. Obrázek 7 e) byly pro lepší přehlednost sestrojeny paprskové grafy, které udávají výsledky hodnot RRT pro jednotlivé úhly v pravé a levé spánkové oblasti (Obrázek 20 a 21).

Čím vyšší jsou hodnoty RRT, tím dosahuje kůže vyšší tuhosti a tedy nižší elasticity. Cílem aplikace gelu v oblasti spánků bylo zvýšení elasticity, tedy snížení hodnot RRT a zároveň také jejich sjednocení, tím zároveň dojde ke zmenšení anizotropie. S narůstajícím věkem roste anizotropie mechanických vlastností pokožky v různém směru a hodnoty RRT jsou vyšší. Vlivem gelové formulace by tedy mělo dojít k tvorbě kolagenu a elastinu v kůži a tím ke snížení tuhosti a snížení RRT. Měření elasticity pokožky bylo provedeno u všech probandek v oblasti pravého a levého spánku, opět nejprve před samotnou aplikací gelové formulace v 1. týdnu a následně po pravidelné aplikaci, tedy ve 4. a 8. týdnu. Předpokladem bylo snížení rezonančního času díky pravidelné aplikaci gelové formulace a zároveň snížit rozdíly mezi maximálními a minimálními hodnotami, tedy zvýšit izotropii mechanických vlastností kůže. Ze získaných výsledků RRT v jednotlivých týdnech (Tabulka 7 a 8) lze vidět, že gelová formulace měla vliv na zvýšení elasticity pokožky. Hodnoty RRT byly porovnány pro celý soubor probandek, u kterého byl pozorován vliv na elasticitu pokožky v jednotlivých týdnech.

Při porovnání hodnot RRT u souboru probandek v 1. a 4. týdnu (Tabulka 7 a 8) lze vidět, že ke zvýšení hodnot RRT došlo pouze v úhlech 30° a 60°, v jiných úhlech ale došlo k poklesu hodnot RRT a tedy ke snížení tuhosti, což je pozitivní výsledek dlouhodobé aplikace gelu. Předpokladem byl pokles tuhosti ve 4. týdnu pravidelné aplikace gelu a podle Tabulek 7 a 8 je patrné, že došlo k výraznému poklesu a tedy ke zvýšení elasticity u všech probandek. Výjimku tvoří úhel otočení 30° a 60°, kdy došlo k mírnému nárůstu RRT. Zvýšení RRT v porovnání s počátečním a koncovým stavem lze pozorovat pouze při úhlu otočení 30°, kdy hodnoty RRT vzrostly o 30,3 % (P) a 23,1 % (L) a při úhlu otočení 270°, kdy



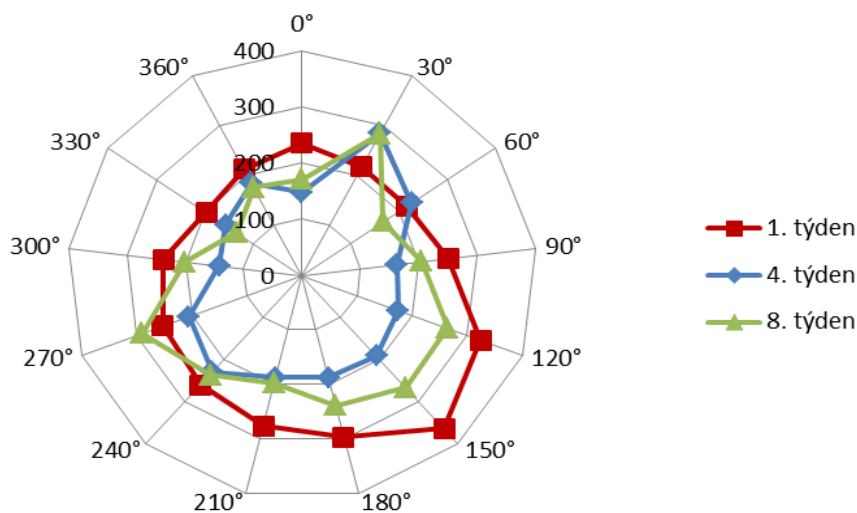
došlo ke zvýšení hodnot o 14,6 % (P) a 22,9 % (L). Celkově tedy došlo ke snížení velikosti RRT, což znamená snížení tuhosti v různých směrech. Pokles RRT znázorňují přehledně paprskové grafy (Obrázek 20 a 21). Hodnoty RRT jsou závislé na mnoha faktorech, např. na hydrataci nebo promaštění kůže. Z reviskometrických měření je tedy obtížné interpretovat výslednou elasticitu pokožky, která vysoce závisí na stavu kůže. Dalším faktorem, který má vliv na získané výsledky u souboru probandek je také to, že není možné zajistit stejný způsob aplikace formulace v testovaných oblastech. Interpretace výsledků elasticity pomocí reviskometrických měření může být obtížná vzhledem k rozdílnému stavu pokožky probandek, což může vést k určitým odchylkám.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty RRT se směrodatnými odchylkami v jednotlivých úhlech otočení sondy pro pravou oblast spánku

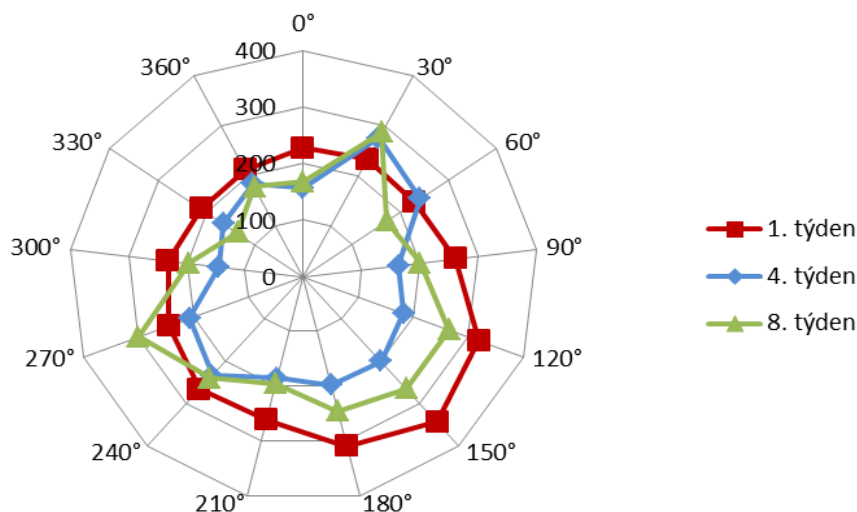
Úhel [°]	0	30	60	90	120	150	180
Týden	RRT [A.U.] $\bar{x} \pm s$						
1.	235 ± 50	218 ± 50	216 ± 40	251 ± 60	325 ± 60	364 ± 50	296 ± 50
4.	147 ± 20	285 ± 80	227 ± 40	162 ± 16	175 ± 30	192 ± 40	188 ± 30
8.	171 ± 30	284 ± 90	167 ± 30	204 ± 60	264 ± 70	266 ± 70	238 ± 60
Úhel [°]	210	240	270	300	330	360	
Týden	RRT [A.U.] $\bar{x} \pm s$						
1.	276 ± 40	260 ± 50	254 ± 60	238 ± 60	198 ± 30	213 ± 30	
4.	187 ± 30	230 ± 70	206 ± 60	142 ± 15	158 ± 30	185 ± 40	
8.	197 ± 60	236 ± 90	291 ± 90	200 ± 50	135 ± 16	176 ± 40	

Tabulka 8: Průměrné hodnoty RRT se směrodatnými odchylkami v jednotlivých úhlech otočení sondy pro levou oblast spánku

Úhel [°]	0	30	60	90	120	150	180
Týden	RRT [A. U.] $\bar{x} \pm s$						
1.	228±50	234±50	230±30	262±50	321±60	344±40	309±50
4.	156±18	276±80	242±40	164±15	183±30	200±40	197±30
8.	167±20	288±90	173±30	200±60	266±70	265±70	245±60
Úhel [°]	210	240	270	300	330	360	
Týden	RRT [A. U.] $\bar{x} \pm s$						
1.	262±40	267±50	245±60	231±60	211±30	213±30	
4.	185±19	234±70	208±50	145±16	165±30	186±30	
8.	195±60	240±80	301±90	196±50	137±16	179±40	



Obrázek 20: Srovnání průměrných hodnot RRT pro jednotlivé úhly otočení sondy (pravá oblast)



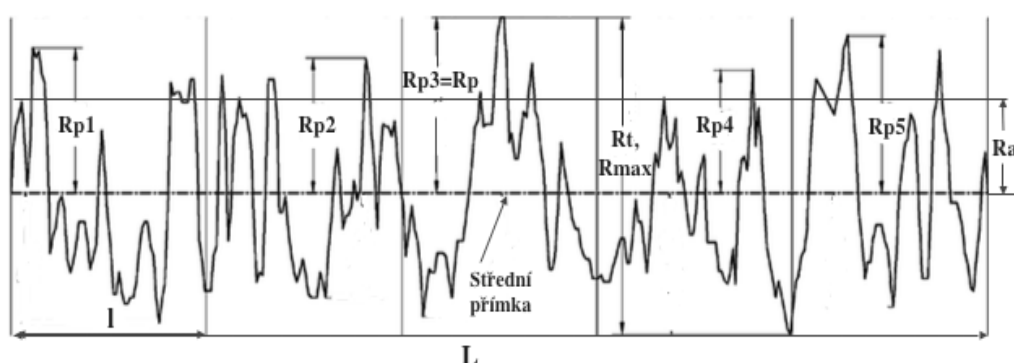
Obrázek 21: Srovnání průměrných hodnot RRT pro jednotlivé úhly otočení sondy (levá oblast)

Bylo však prokázáno, že orální užívání KH má pozitivní vliv na tvorbu kolagenu a také zlepšuje vlastnosti pokožky, jako je elasticita, hydratace a TEWL, jelikož přímo podporuje tvorbu fibroblastů a kolagenu typu I v *dermis*. Denní příjem KH snižuje hladiny exprese matrixové metaloproteinázy, která je zodpovědná za rozklad kolagenu. Orální užívání KH bylo testováno u 25 japonských žen. Tyto ženy užívaly denně 7 g KH. Výsledky ukázaly, že po šesti týdnech došlo k významnému zlepšení hydratace kůže a elasticity v oblasti obličeje předloktí. Při aplikaci gelu nebo krému na pokožku s přídavkem KH je také důležitá koncentrace hydrolyzátu. V jedné studii byl KH o různých koncentracích (5%, 7% a 10%) aplikován na pokožku u 30 žen po dobu 30 dní. Výsledky ukázaly, že KH o nejvyšší koncentraci (10%) vykazoval největší vliv na zlepšení hydratace a elasticitu pokožky. V této diplomové práci byl použit KH o koncentraci pouze 1 % a je tedy pravděpodobné, že při použití vyšších koncentrací by gelová formulace měla na výslednou elasticitu mnohem větší vliv. Byly provedeny inovativní studie u 60 žen, které kombinovaly topickou a orální aplikaci KH. Bylo zjištěno, že hladina hydratace vlivem topické aplikace KH byla zlepšena již po jednom měsíci. Po 90 dnech došlo také k významnému zlepšení elasticity pokožky a redukci vrásek v oblasti čela [70].

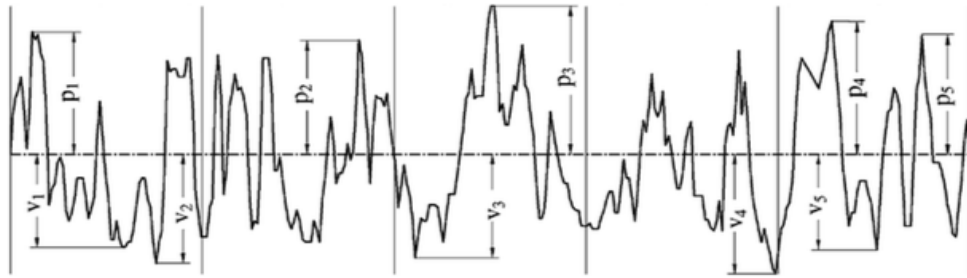
Ze získaných studií je tedy prokázáno, že KH má opravdu pozitivní vliv na elasticitu kůže, dokonce i při nižších koncentracích (1,0 %), což bylo potvrzeno v této diplomové práci.

## 6.4 Vyhodnocení drsnosti pokožky

Při testování účinnosti gelové formulace s přídavkem KH proti vráskám v oblasti spánků byly vyhodnocovány parametry drsnosti R1, R2, R3, R4 a R5, které se používají pro stanovení drsnosti pokožky pomocí přístroje Visiometer SV 700. Tyto parametry byly měřeny před samotnou aplikací gelové formulace a následně po čtyř a osmi týdenní aplikaci gelové formulace. Parametry drsnosti R1-R5 jsou podle směrnice DIN 4762-4768 [75] uvedeny jako Rt, Rmax, Rz, Rp a Ra. Parametr drsnosti R1 určuje vzdálenost mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou a je vztažen k referenční délce, v normě DIN je tento parametr uveden jako Rt. Maximální parametr drsnosti R2 je největší drsnost z různých segmentů drsností, v normě DIN je tento parametr známý jako Rm nebo Rmax. Průměrný parametr drsnosti R3 je průměr drsnosti vypočtený z pěti nejvyšších a pěti nejnižších segmentů, v normě DIN je tento parametr známý jako Rz. Parametr R4 (hloubka hladkosti) udává maximální výšku profilu, popisuje vzdálenost mezi nejvyšším bodem profilu a střední přímkou, kolem které se měří odchylky profilu. Tato definovaná plocha se vztahuje k délce vrásky. Podle normy DIN je tento parametr definován jako Rp. Parametr R5 je aritmetický průměr absolutních hodnot výšek profilu po délce vyhodnocení L, na této délce jsou vyhodnoceny jednotlivé parametry. Délka L sestává z pěti tzv. cutoff délek l, na kterých jsou parametry vyhodnocovány. V normě DIN je tento parametr známý jako Ra. Poměr mezi jednotlivými parametry je  $R1 \geq R2 \geq R3 \geq R4 \geq R5$ . Parametry Rt (R1), Rmax (R2), Rp (R4) a Ra (R5) znázorňuje Obrázek 22, parametr Rz (R3) znázorňuje Obrázek 23 [66].

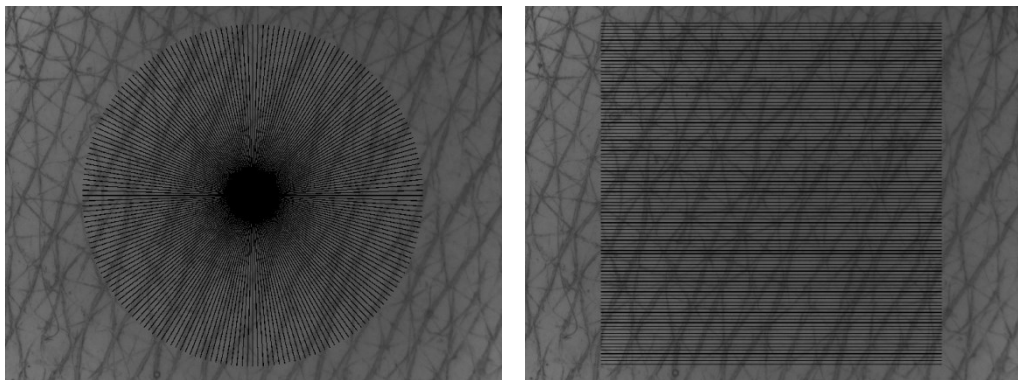


Obrázek 22: Parametry drsnosti Rt (R1), Rmax (R2), Rp (R4), Ra (R5) [66]



Obrázek 23: Parametr drsnosti Rz (R3) pro pět nejvyšších a pět nejnižších segmentů [66]

Výsledné parametry drsnosti závisí na zvolené oblasti výpočtu, a proto byla velikost této oblasti vždy stejná pro získání přesných výsledků. Vyhodnocení drsnosti je tedy možno stanovit v oblasti horizontální, vertikální nebo po kružnici (Obrázek 24). Pro vyhodnocení byla v této diplomové práci zvolena kruhová oblast, která je podle výrobce pro stanovení nejpřesnější a její výhodou je to, že kompenzuje vliv směru vrásek.



Obrázek 24: Kruhová a horizontální oblast pro vyhodnocení drsnosti pokožky

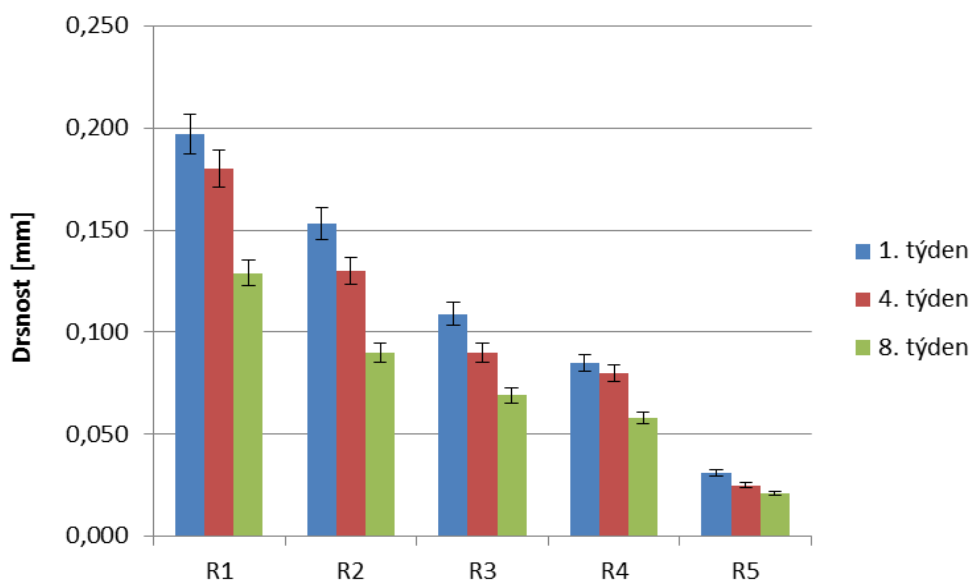
V této části diplomové práce byly zjišťovány parametry drsnosti pomocí silikonových replik. Nejdříve byly tyto parametry zjištěny před samotnou aplikací gelové formulace a poté byly jednotlivé parametry změřeny a porovnány po čtyř a osmitýdenní pravidelné aplikaci gelu. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9 a 10. Ze získaných výsledků byly pro lepší přehlednost sestrojeny sloupcové grafy (Obrázek 25 a 26). Tabulka 11 a 12 poukazuje na celkovou redukci vrásek při porovnání počátečního stavu, tedy bez aplikace gelové formulace a následně po osmitýdenní aplikaci gelu. Opět byl pro lepší přehlednost celkové redukce vrásek sestrojen sloupcový graf (Obrázek 27).

Tabulka 9: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti se směrodatnými odchylkami v jednotlivých týdnech měření pro pravou oblast spánku

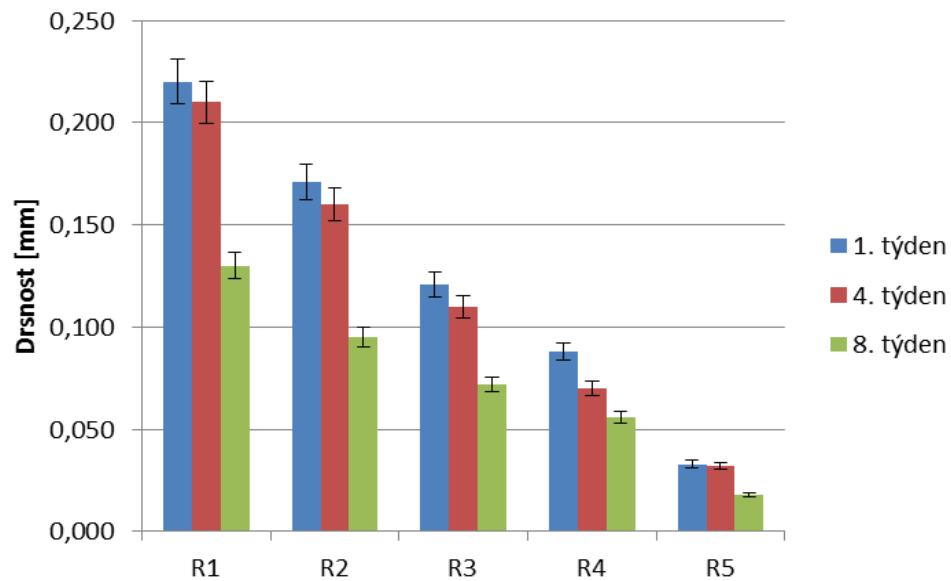
Týden	Parametry drsnosti $\bar{x} \pm s$				
	R1	R2	R3	R4	R5
1.	0,197±0,015	0,153±0,012	0,109±0,008	0,085±0,006	0,031±0,004
4.	0,18±0,04	0,13±0,03	0,09±0,02	0,08±0,02	0,025±0,012
8.	0,129±0,012	0,090±0,008	0,069±0,006	0,058±0,006	0,021±0,004

Tabulka 10: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti se směrodatnými odchylkami v jednotlivých týdnech měření pro levou oblast spánku

Týden	Parametry drsnosti $\bar{x} \pm s$				
	R1	R2	R3	R4	R5
1.	0,22±0,03	0,171±0,018	0,121±0,012	0,088±0,003	0,033±0,007
4.	0,21±0,05	0,16±0,04	0,11±0,03	0,07±0,03	0,032±0,014
8.	0,130±0,012	0,095±0,009	0,072±0,006	0,056±0,006	0,018±0,003



Obrázek 25: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti R1 až R5 v jednotlivých týdnech měření pro pravou oblast spánku



Obrázek 26: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti R1 až R5 v jednotlivých týdnech měření pro levou oblast spánku

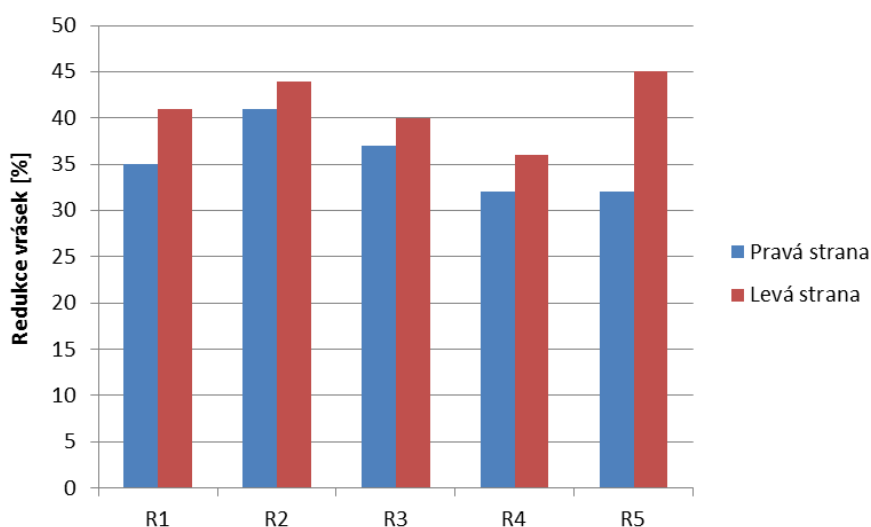
Ze získaných výsledků je patrné, že postupně došlo vlivem aplikované gelové formulace k redukcí vrásek (Tabulka 9 a 10). Z Obrázku 25 a 26 je také přehledně vidět, že podle předpokladu dochází k poklesu parametrů drsnosti v pořadí  $R1 \geq R2 \geq R3 \geq R4 \geq R5$ . V jednotlivých týdnech docházelo také k poklesu všech parametrů R1-R5 a tím k celkové redukcí vrásek. Při srovnání poklesu jednotlivých parametrů lze podle Tabulky 11 a 12 konstatovat, že parametr drsnosti R1 poklesl o 35 % (P) a 41 % (L). Maximální parametr drsnosti R2 vykazuje redukcí hloubky vrásky po aplikaci gelové formulace až o 41 % v pravé oblasti a 44 % v levé oblasti. Průměrný parametr drsnosti R3 dosáhl zlepšení o 37 % (P) a 40 % (L). Parametr R4 udávající hloubku hladkosti vykazuje zlepšení o 32 % (P) a 36 % (L). Aritmetický průměr drsnosti (R5) dosahuje zlepšení o 32 % (P) a 45 % (L). Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že gelová formulace s přísadkou KH měla při dlouhodobém používání výrazný vliv na redukcí hloubky vrásek ve spánkové oblasti.

Tabulka 11: Celková redukce vrásek při porovnání počátečního a koncového stavu po aplikaci gelové formulace v oblasti pravého spánku

Parametr drsnosti	Rozdíl počátečního a koncového stavu parametru	Celková změna parametru [%]	Redukce vrásek [%]
R1	0,068	65	35
R2	0,063	59	41
R3	0,040	63	37
R4	0,027	68	32
R5	0,010	68	32

Tabulka 12: Celková redukce vrásek při porovnání počátečního a koncového stavu po aplikaci gelové formulace v oblasti levého spánku

Parametr drsnosti	Rozdíl počátečního a koncového stavu parametru	Celková změna parametru [%]	Redukce vrásek [%]
R1	0,090	59	41
R2	0,076	56	44
R3	0,049	60	40
R4	0,032	64	36
R5	0,015	55	45



Obrázek 27: Redukce vrásek v pravé a levé spánkové oblasti po osmítýdenní aplikaci gelu



V jedné studii byl testován kosmetický produkt proti stárnutí, kdy se sledoval vliv tohoto produktu na redukci vrásek s ohledem na věk probandek. Konkrétně byly testovány parametry R3 a R5. Výsledky prokázaly, že hodnoty těchto parametrů se před aplikací produktu zvyšovaly s rostoucím věkem probandek. Cílem bylo tedy zjistit, zda má produkt pozitivní účinek na redukci vrásek. Statisticky významný rozdíl drsnosti byl skutečně prokázán u žen nestarších věkových skupin (61-70 let), kdy výsledky dosahovaly největšího zlepšení, významných výsledků ale také dosáhla mladší testovaná skupina (31-50 let). Na konci testování dosahovaly tedy nejlepších výsledků ženy starší 50 let, které reagovaly nejvíce na kosmetické ošetření daným produktem [67]. V této diplomové práci se studie zúčastnily probandky ve věkovém rozmezí 38-62 let a výsledky tak poukazují na významnou redukci vrásek. Je tedy pravděpodobné, že při testování mladších probandek by nedošlo k tak výraznému zlepšení. V jiné studii se naopak sledoval vliv orálního dávkování KH u 69 žen (35-55 let) po dobu osmi týdnů. Bylo provedeno měření před užitím KH a následně po čtyř a osmitýdenním užívání. Nebyly však zjištěny žádné viditelné změny drsnosti kůže ve srovnání s placebem. Důvodem může být krátkodobé užívání KH nebo lokalizace měření (vnitřní strana předloktí). Na druhé straně jedna studie potvrdila významnou korelaci mezi drsností kůže a tloušťkou *stratum corneum*. Jak je známo, tloušťka kůže s věkem klesá a tento aspekt by mohl být důvodem nedostatečného účinku KH na drsnost kůže, která byla v této studii testována [68].

### **Vyhodnocení obrazu kožní repliky**

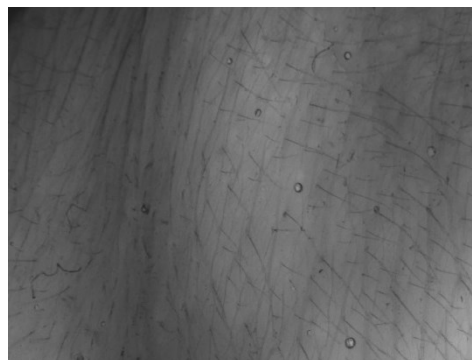
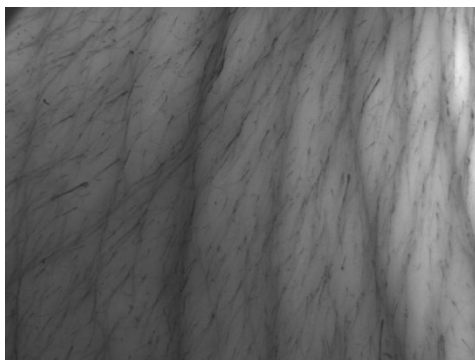
Přístroj Visiometer SV 700 je schopen také rychle vytvořit obraz vrásek ze silikonových replik v odstínech šedé, ale dokáže také zobrazit trojrozměrný barevný obraz (3D) získaných vrásek. Obraz kožní repliky je v krátkém čase vytvořen na monitoru počítače. Silikonové repliky byly snímány v pravé i levé části spánku, ale pro porovnání byla zvolena jen pravá spánková oblast, jelikož levá spánková oblast dosahovala podobných změn v redukci vrásek. Obrazy byly porovnány ve stupních šedé a ve 3D na vymezeném úseku pokožky před aplikací gelové formulace a po osmi týdnech používání gelu, tedy v koncovém stavu u tří probandek ve věku 50, 54 a 45 let. Ze snímků kožního povrchu (Obrázek 28) lze opravdu pozorovat zmenšení vrásek a dosažení hladšího povrchu pokožky díky nižší intenzitě stínu na jednotlivých snímcích. Celkově došlo i ke zmenšení prohlubní. Lze tedy konstatovat, že aplikace gelové formulace s přídavkem KH má opravdu pozitivní vliv na redukci vrásek a prohlubní kožního povrchu. Jak již bylo zmíněno, přístroj Visiometer SV 700 dokáže velice rychle vytvořit také 3D obrazy kůže, které jsou získány na základě hloubky vrásek. Opět byly výsledné 3D snímky porovnány u tří probandek ve věku 50, 54

a 45 let před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace s přídavkem KH (Obrázek 29). Tato jednoduchá vizualizace kožního povrchu znázorňuje zmenšení hloubky vrásek u jednotlivých probandek, bylo tedy dosaženo hladšího povrchu kůže po dlouhodobé aplikaci gelové formulace ve spánkové oblasti.

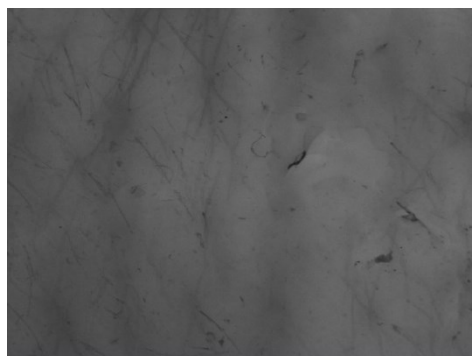
PŘED APLIKACÍ

PO 8 TÝDNECH APLIKACE

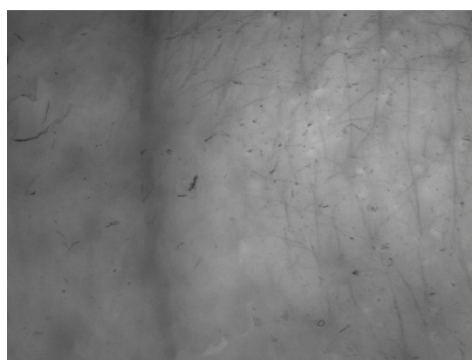
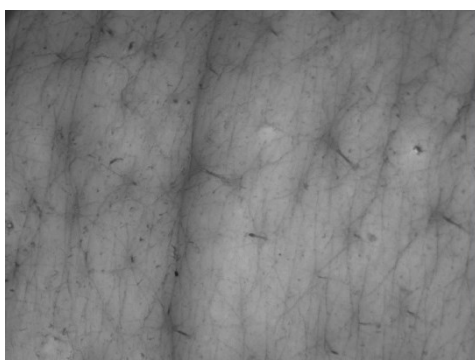
1) 50 let



2) 54 let



3) 45 let

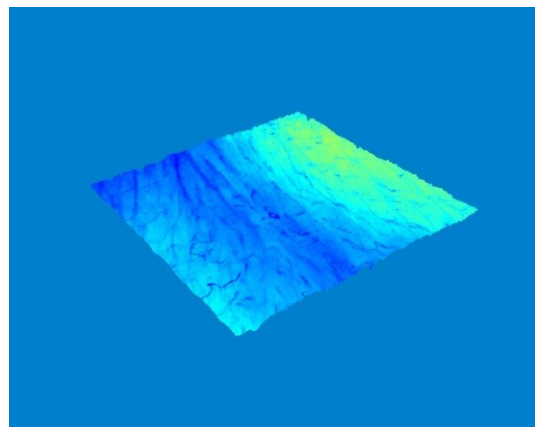
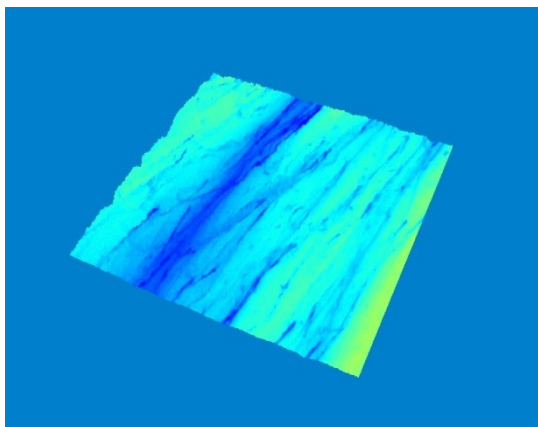


Obrázek 28: Porovnání snímků kožního povrchu před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace

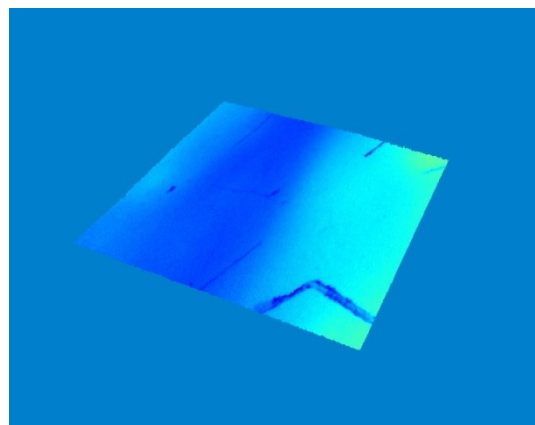
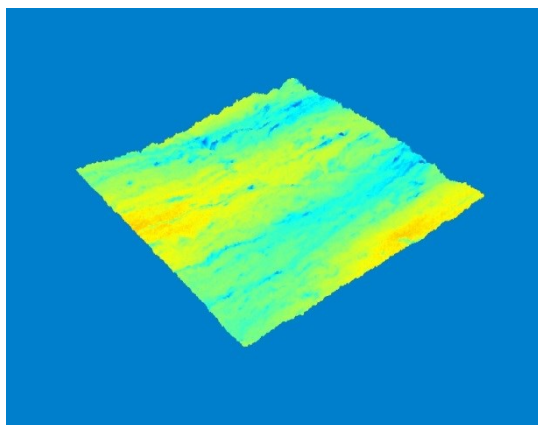
PŘED APLIKACÍ

PO 8 TÝDNECH APLIKACE

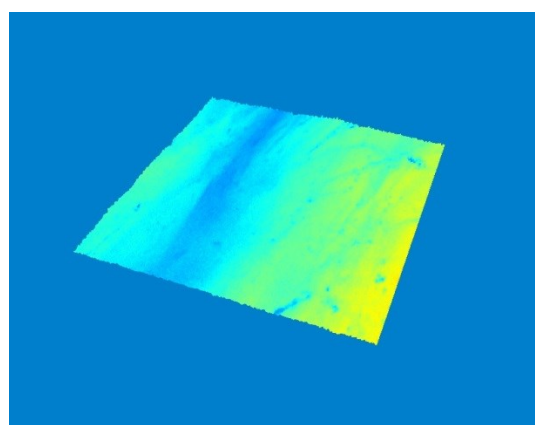
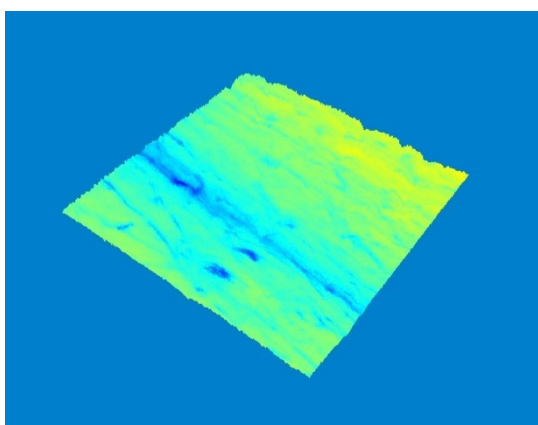
1) 50 let



2) 54 let



3) 45 let



Obrázek 29: Porovnání 3D obrazů před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace

Zajímavou studií bylo testování orálního užívání bioaktivního hydrolyzátu kolagenu u 114 probandek ve věku 45-65 let. Jedna skupina užívala kolagen a druhá pouze placebo. Byl sledován pokles vrásek ve spánkové oblasti. Po čtyřech týdnech došlo k redukci vrásek o 7,2 % ve srovnání se skupinou, která užívala pouze placebo. Tento pozitivní efekt byl ještě větší po osmi týdnech užívání KH, kdy došlo k redukci vrásek o 20,1 %. Na základě výsledků této studie lze tedy konstatovat, že orální užívání KH vedlo k významnému snížení vrásek v oblasti očí, tento pozitivní účinek je díky přímému vlivu na extracelulární matici, což dokazuje zvýšení syntézy kolagenu a elastinu. Může tedy dojít ke snížení vrásek až po dobu čtyř týdnů po ukončení užívání KH. V jiné studii bylo také zjištěno, že nástup vrásek byl u žen z Číny pomalejší asi o 10 let ve srovnání s ženami z Francie. Orální užívání kolagenu má tedy také významný a pozitivní vliv na redukci vrásek [69].

Při získávání silikonových odlitků vrásek a jejich následného vyhodnocení však existují rizikové faktory. Tím hlavním je vznik vzduchových bublin během vakuového míchání silikonových složek, které se i při správném postupu občas objevily v silikonové replice, která musela být následně zhotovena znovu, protože by došlo k ovlivnění výsledků. Dalším rizikovým faktorem bylo sejmutí silikonové repliky dříve, než silikon zcela zatuhl. Výsledky mohou být také ovlivněny nedostatečným očištěním a odlícením pokožky, probandky ale chodily na měření vždy odlícené a nedošlo tak k znehodnocení snímků.

### **Vyhodnocení anizotropie kůže**

Anizotropie je důležitou mechanickou vlastností kůže, zejména v oblasti plastické chirurgie, protože směr řezu ovlivňuje tvorbu jizev. Obecně se předpokládá, že anizotropie kůže je způsobena kontrakcí svalů a celkovou strukturou kůže, která určuje její pružnost. Nejznámějšími liniemi popisující anizotropii jsou Langerovy linie, které mohou být rozpoznány pomocí kruhového zařízení. Langer vytvořil systém linií po celém těle. Bylo však vytvořeno mnoho jiných variací Langerových linií, mezi které patří Cox linie, Kraissl linie a linie uvolněného kožního napětí. Studium anizotropních vlastností kůže *in vivo* je důležité z hlediska vývoje mnoha onemocnění kůže. Anizotropie je také významným ukazatelem procesu stárnutí, kdy se s narůstajícím věkem zvyšuje [71].

V této části diplomové práce byl také sledován vliv gelové formulace s přídatkem KH na anizotropii kůže pomocí Visiometru SV 700 ze silikonových replik. Předpokládalo se, že dojde ke snížení anizotropie vlivem pravidelné aplikace gelu v oblasti spánků. Ze získaných výsledků (Tabulka 13) vyplývá, že při pravidelné a dlouhodobé aplikaci formulace skutečně došlo ke snížení anizotropie. K poklesu došlo již ve 4. týdnu, a to o

-3,1 % (P) a -7,1 % (L). V 8. týdnu anizotropie opět poklesla o -3,7 % (P) a -3,3 % (L). Celkově tedy během testovaného období došlo k poklesu anizotropie o -6,8 % (P) a -10,4 % (L). Pravidelná aplikace gelové formulace s přídavkem KH má tedy pozitivní vliv na výslednou anizotropii kůže.

Tabulka 13: Anizotropie kůže před aplikací a po aplikaci gelové formulace v jednotlivých týdnech

Anizotropie [%] $\bar{x}$			
Týden	Pravá strana	Týden	Levá strana
1.	23,9	1.	25,7
4.	20,8	4.	18,6
8.	17,1	8.	15,3

V jedné studii byla testována kyselina retinová a její účinek na anizotropii kůže. Již ve 4. týdnu při pravidelném používání kosmetického přípravku s touto kyselinou byly pozorovány pozitivní změny na anizotropii a v 8. týdnu došlo k dalšímu zlepšení. Jiná studie prokázala pozitivní účinek acetylhexapeptidu-3, který je účinnou složkou kosmetických přípravků proti stárnutí, jelikož snižuje anizotropii pokožky v oblasti obličeje a má pozitivní vliv na její mechanické vlastnosti [72].

## 6.5 Vyhodnocení účinků gelu na stav vrásek pomocí visioskopu

Dále byl snímán stav pokožky probandek v oblasti pravého a levého spánku pomocí visioskopu PC 35, konkrétně byla sledována procentuální redukce množství vrásek po aplikaci gelové formulace s přídavkem KH. Jak již bylo zmíněno (kapitola 5.2.4), visioskop je USB kamera, která poskytuje snímky pokožky až s třicetinasobným zvětšením, které lze následně analyzovat. V této části bylo analyzováno množství vrásek u jednotlivých probandek (Tabulka 14). Stav vrásek je v pravé i levé spánkové oblasti podobný, pravá část dosahuje před samotnou aplikací gelové formulace množství 15,6 % vrásek a levá část 15,2 %. Následně byla aplikována gelová formulace po dobu čtyř týdnů, podle Tabulky 14 je patrné, že gelová formulace měla pozitivní vliv na redukci vrásek, kdy na pravé straně došlo k poklesu na 14,4 % a na levé straně na 14,5 %. Po osmi týdnech došlo opět k redukci vrásek, a to na 12,2 % v oblasti pravé strany a na 12,7 % v levé oblasti spánku. Celkově došlo tedy k redukci vrásek o -3,4 % v oblasti pravé strany a -2,5 % v oblasti levé strany.

U tří probandek ve věku 62, 45 a 50 let byla porovnána vizuální změna stavu pokožky opět jen v pravé spánkové oblasti před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace (Obrázek 30). U probandky ve věku 62 let došlo k redukci vrásek z původních 16,0 % na 10,0 %, tato probandka trpěla zároveň lupénkou, ale i tak měla aplikace gelové formulace pozitivní vliv na redukci vrásek. U další probandky ve věku 45 let došlo k redukci vrásek z 17,7 % na 16,6 %, pokles sice nebyl tak významný jako u starší probandky, ale vyhlazení pokožky a zmenšení vrásek je opravdu viditelné, u poslední probandky došlo k poklesu vrásek z 12,2 % na 10,6 %. U všech probandek došlo k viditelným změnám reliéfu pokožky po osmi týdnech aplikace gelové formulace, což znázorňuje Obrázek 30.

Pokud chceme získat vizualizaci reliéfu pokožky, je visioskop dostačujícím přístrojem, ale pro přesné a objektivní hodnocení vlivu na zmenšení vrásek a zlepšení stavu pokožky není příliš vhodný, protože nedokáže odfiltrvat pozadí a defekty v místě měření tak mohou ovlivnit získané výsledky celé analýzy.

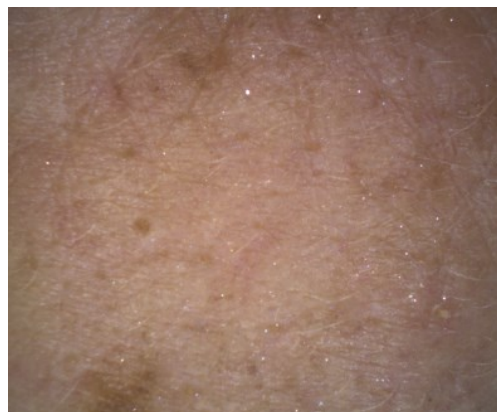
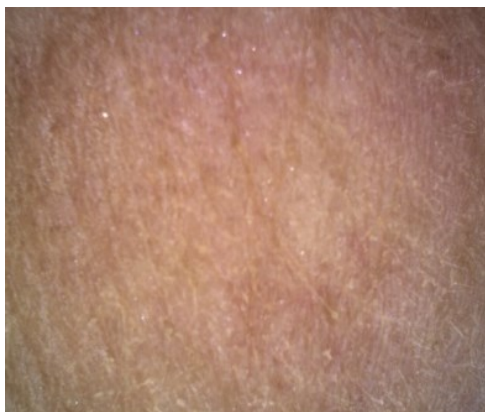
Tabulka 14: Redukce množství vrásek před aplikací a po aplikaci gelové formulace v jednotlivých týdnech

Vrásky [%] $\bar{x}$			
Týden	Pravá strana	Týden	Levá strana
1.	15,6	1.	15,2
4.	14,4	4.	14,5
8.	12,2	8.	12,7

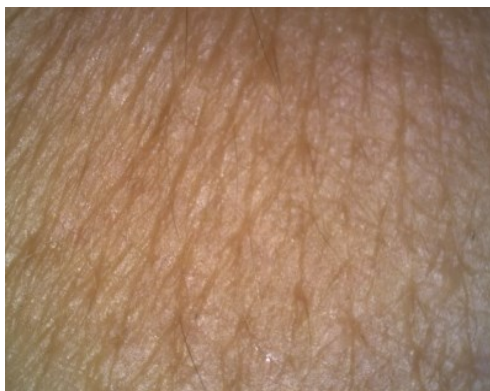
PŘED APLIKACÍ

PO 8 TÝDNECH APLIKACE

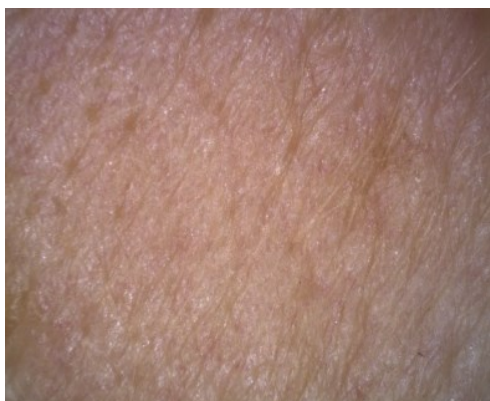
1) 62 let



2) 45 let



3) 50 let



Obrázek 30: Změna reliéfu pokožky před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace

## 6.6 Zhodnocení výsledků

V této diplomové práci byl testován účinek gelové formulace, do které byl přidán kolagen-ní hydrolyzát (KH) o koncentraci 1,0 %. Během osmi týdnů pravidelné aplikace gelové formulace v oblasti pravého a levého spánku byl sledován vliv přídavku KH na jednotlivé parametry pokožky, jako je hydratace, transepidermální ztráta vody, elasticita a změna reliéfu pokožky, tedy redukce vrásek. Gelová formulace byla aplikována dvakrát denně (vždy ráno a večer) v oblasti pravého a levého spánku.

Nejprve proběhlo měření před samotnou aplikací gelové formulace (1. týden), poté byl gel pravidelně aplikován a další měření proběhla ve 4. a 8. týdnu. Po uplynutí této doby se předpokládalo zlepšení stavu pokožky u jednotlivých probandek, tedy zvýšení hydratace kůže, snížení transepidermální ztráty vody a tím i zlepšení bariérových vlastností kůže, zvýšení elasticity a pokles tuhosti a také redukce vrásek. Ze získaných výsledků vyplývá, že přídavek KH v gelové formulaci měl pozitivní vliv na stav pokožky už po čtyřtýdenní aplikaci. Nárůst hydratace byl pro celý soubor probandek ve 4. týdnu o 1,9 % (P) a 3,7 % (L). V 8. týdnu ale došlo ještě ke znatelnějšímu zlepšení hydratace, a to o 11,1 % (P) a 9,1 % (L). Celkově se hydratace zvýšila o 13,0 % (P) a 12,8 % (L) v porovnání s počátečním stavem, kdy nebyla aplikována gelová formulace. Při porovnání výsledků TEWL u souboru probandek také došlo ke zlepšení bariérových vlastností. Ve 4. týdnu došlo k poklesu o -11,0 % (P) a -9,2 % (L), v 8. týdnu lze pozorovat opět zlepšení, kdy hodnoty poklesly o -17,0 % (P) a -16,2 % (L). Celkový pokles TEWL byl po osmitýdenní aplikaci -28,0 % (P) a -25,4 % (L). Ze získaných výsledků je patrné, že čím déle je formulace aplikována, tím lepší jsou výsledky hydratace a TEWL. Pozitivní vliv byl také prokázán u výsledků elasticity pokožky, kdy hodnoty rezonančního času (RRT) v jednotlivých směrech poklesly a tím došlo ke zvýšení elasticity pokožky a ke snížení její tuhosti. Snížila se také anizotropie, která udává poměr mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou RRT. Anizotropie se s narůstajícím věkem zvyšuje a hodnoty RRT jsou vyšší, gelová formulace s přídavkem KH hodnoty RRT snížila a tím i pozitivně ovlivnila výsledné mechanické vlastnosti kůže. Anizotropie byla také sledována pomocí silikonových replik a bylo potvrzeno, že vlivem aplikace gelové formulace došlo k jejímu celkovému poklesu o -6,8 % (P) a -10,4 % (L). Poté byl sledován účinek gelové formulace na redukci vrásek, která byla měřena pomocí silikonových odlitků pomocí visiometru, který měří hloubku vrásek. Ta je definována pomocí parametrů drsnosti R1-R5. Vlivem aplikace gelové formulace docházelo k poklesu těchto parametrů a tedy ke snížení hloubky vrásek. Množství vrásek na stanovenou plochu



bylo měřeno rovněž pomocí visioskopu, který vyhodnotil úbytek vrásek díky snímání stavu pokožky pomocí kamery. Množství vrásek ale dosahovalo menšího úbytku při porovnání s výsledky z visiometru, který je ale mnohem přesnější metodou. Visioskop není schopen odfiltrvat pozadí a defekty v místě měření.

Ze získaných výsledků tedy vyplývá, že gelová formulace s přídavkem KH má pozitivní účinek na stav pokožky již při nižších koncentracích (1,0 %). Kolagen se stal dostupnou přísadou používanou v kosmetických produktech díky svým benefitům. Jedná se o přírodní humektant, který má hydratační účinky. Existuje mnoho druhů kolagenu, které se liší svou tepelnou stabilitou a mohou tak ovlivňovat vlastnosti výsledného produktu.

## ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zabývá hydratací a stárnutím kůže, se kterým souvisí i vznik vrásek. Dále je pozornost zaměřena také využití syntetických polymerů a přírodních polymerů, mezi které patří i kolagenní hydrolyzát (KH), u kterého byl v této práci testován účinek na stav pokožky. Nakonec jsou zde zmíněny invazivní a neinvazivní metody testování pokožky, především metody analýzy vrásek, měření hydratace, transepidermální ztráty vody (TEWL) a elasticity kůže.

Cílem praktické části bylo zjistit pomocí neinvazivních metod vliv gelové formulace s přísadkou 1,0 % KH na stárnoucí pleť ve spánkové oblasti. Byla sledována změna stavu kůže před a po aplikaci formulace na hydrataci, TEWL, elasticitu a změnu reliéfu pokožky, tedy na redukci vrásek.

V případě sledování vlivu gelové formulace na hydrataci kůže byl pozorován výrazný hydratační účinek testované formulace ve 4. i 8. týdnu pravidelné aplikace. Pozitivní účinek byl také zjištěn u hodnot TEWL, kdy byl pozorován pokles hodnot během osmi týdnů. Získané výsledky hydratace a TEWL ukazují, že při delší a pravidelné aplikaci gelové formulace dochází ke zlepšení hydratačních účinků a bariérových vlastností pokožky. Pravidelná aplikace gelové formulace vykazovala také významný vliv na zvýšení elasticity kůže a snížení anizotropie v jednotlivých směrech. Dále byla sledována redukce vrásek a anizotropie pomocí silikonových replik v oblasti spánků při pravidelné aplikaci formulace. Během osmi týdnů byla pozorována výrazná redukce vrásek, k pozitivním výsledkům došlo již ve 4. týdnu pravidelné aplikace gelu. Snížení hloubky vrásek je viditelné také na jednotlivých snímcích získaných replik. Anizotropie kůže byla také vyhodnocena ze silikonových replik a výsledky ukazují, že došlo k jejímu poklesu a ke zlepšení mechanických vlastností kůže. Pomocí visioskopu PC 35 bylo sledováno množství vrásek. Ze získaných výsledků lze konstatovat, že došlo k jejich snížení opět už ve 4. týdnu a v 8. týdnu byl úbytek vrásek ještě výraznější. Redukci množství vrásek ukazují i snímky pořízené visioskopem před aplikací a po osmi týdnech pravidelné aplikace gelové formulace.

Experimentem bylo tedy prokázáno, že přísadka KH v gelové formulaci měl pozitivní vliv na výsledný stav pokožky díky pravidelné a dlouhodobé aplikaci v oblasti spánků. Na získané výsledky má však vliv mnoho faktorů (věk, stav kůže, oblast a doba aplikace), které mohou způsobit určité odchylky. Pozitivní účinky KH na stav pokožky byly prokázány v mnoha studiích, a proto je široce užívanou látkou v kosmetických produktech.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ROZSÍVALOVÁ, V. *Kosmetika I pro studijní obor Kosmetička*. 2., aktualiz. vyd. Praha: Informatorium, 2010. ISBN 9788073330804.
- [2] LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 9788024725260.
- [3] ELIAS, P. M. a K. R. FEINGOLD. *Skin barrier*. New York: Taylor & Francis, 2006. ISBN 0824758153.
- [4] LODÉN, M., AGNER, T. a S. KARGER. Treatments improving skin barrier function. *Current problems in dermatology*. 2016, **49**, 112 – 122. DOI: 10.1159/000441586.
- [5] LEMERY, E., S. BRIANCON, Y. CHEVALIER, T. ODDOS, A. GOHIER, O. BOYRON a M. A. BOLZINGER. Surfactants have multi-fold effects on skin barrier function. *European journal of dermatology*. 2015, **25**(5), 424 – 435. DOI: 10.1684/ejd.2015.2587.
- [6] POKORNÁ, A. a R. MRÁZOVÁ. *Kompendium hojení ran pro sestry*. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024733715.
- [7] FREDERICKS, D. N. Microbial ecology of human skin in health and disease. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings*. 2001, **6**(3), 167 – 169. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.00039.x.
- [8] DAYAN, N. *Skin aging handbook: an integrated approach to biochemistry and product development*. Norwich, NY: William Andrew, 2008. ISBN 9780815515845.
- [9] MAKRANTONAKI, E., V. BEKOU A Ch. C. ZOUBOULIS. Genetics and skin aging. *Dermato-endocrinology*. 2014, **4**(3), 280 – 284. DOI: 10.4161/derm.22372.
- [10] LAWTON, S. External influences on ageing skin health. *Nursing and residential care*. 2011, **13**(11), 522 – 526. DOI: 10.12968/nrec.2011.13.11.522.
- [11] POLJŠAK, B., R. DAHMANE a A. GODIC. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. *Acta dermatoveneol alpina pannonica et adriatica*. 2012, **2**, 33 – 36. DOI: 10.2478/V10162-012-0009-0.

- [12] KRUTMANN, J., A. BOULOC, G. SORE, B. A. BERNARD a T. PASSERON. The skin aging exposome. *Journal of dermatological science*. 2017, **85**(3), 152 – 161. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.015.
- [13] LEE, H. Y., A. K. GHIMERAY, J. H. YIM a M. S. CHANG. Antioxidant, collagen synthesis activity in vitro and clinical test on anti-wrinkle activity of formulated cream containing Veronica officinalis extract. *Journal of cosmetics, dermatological sciences and applications*. 2015, **5**(1), 45 – 51. DOI: 10.4236/jcdsa.2015.51006.
- [14] YASUI, T., Y. TAKAHASHI, S. FUKUSHIMA, Y. OGURA, T. YAMASHITA, T. KUWAHARA, T. HIRAO a T. ARAKI. Observation of dermal collagen fiber in wrinkled skin using polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy. *Optics express*. 2009, **17**(2), 912 – 923. DOI: 10.1364/OE.17.000912.
- [15] BARAN, R. a H. I. MAIBACH. Textbook of cosmetic dermatology. 5th edition. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis group, 2017. ISBN 9781482257359.
- [16] BAREL, A. O., M. PAYE a H. I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2009. ISBN 9781420069631.
- [17] ROHRICH, R. J. Training the generation X plastic surgeon: Dispelling the myths? *Plastic and reconstructive surgery*. 2001, **108**(6), 1733 – 1734. DOI: 10.1097/00006534-200111000-00048.
- [18] RINZLER, C. A. *The encyclopedia of cosmetic and plastic surgery*. New York, NY: Facts on file, 2009. ISBN 0816062854.
- [19] ARUMUGAM, P., S. SELVAKUMAR a M. SUBRAMANYAM. Facial forehead wrinkles detection using colour based skin segmentation. *Advances in natural and applied sciences research: an official journal of the Chemistry Advancement Society*. 2015, **9**(12), 71 – 80.
- [20] BAREL, A. O., M. PAYE a H. I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0824702921.
- [21] MCCOOK, J. P. Topical products for the aging face. *Clinics in plastic surgery*. 2016, **43**(3), 597 – 604. DOI: 10.1016/j.cps.2016.03.005.
- [22] HOJEROVÁ, J. a E. BOSKOVIČOVÁ. *Kozmetika, zdravie, krása: jako si vybrať kozmetiku*. Bratislava: Plat4M Books, 2015. ISBN 9788089642199.

- [23] MOJUMDAR, E. H., Q. D. PHAM, D. TOPGAARD a E. SPARR. Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific reports*. 2017, **7**(1). DOI: 10.1038/s41598-017-15921-5.
- [24] SPADA, F. T. M. BARNES a K. A. GREIVE. Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2018, **11**, 491 – 497. DOI: 10.2147/CCID.S177697.
- [25] MÜNDLEIN, M., B. VALENTIN, R. CHABICOVSKY, J. NICOLICS, J. WEREMCZUK, G. TARAPATA a R. JACHOWICZ. Comparison of transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2008, **142**(1), 67 – 72. DOI: 10.1016/j.sna.2007.04.012.
- [26] SAKAMOTO, K. *Cosmetic science and technology: theoretical principles and applications*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. ISBN 9780128020050.
- [27] ZHAI, H. a H. I. MAIBACH. Occlusion vs. Skin barrier function. *Skin research and technology*. 2002, **8**(1), 1 – 6. DOI: 10.1046/j.0909-752x.2001.10311.x.
- [28] YOUNG, R. a P. A. LOVELL. *Introduction to polymers*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 9780849339295.
- [29] GODDARD, E. D. a J. V. GRUBER. *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. New York: Marcel Dekker, 1999. ISBN 0824719239.
- [30] THOMAS, S., D. DURAND, CH. CHASSENIEUX a P. JYOTISHKUMAR. *Handbook of biopolymer-based materials*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2013. ISBN 9783527652457.
- [31] PENG, Y., V. GLATTAUER, J. A. WERKMEISTER a J. A. M. RAMSHAW. Evaluation for collagen products for cosmetic application. *International journal of cosmetic science*. 2004, **55**, 327 – 341. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2004.00245\_2.x.
- [32] ALVES, A. A. MARQUES, E. MARTINS, T. SILVA a R. REIS. Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics*. 2017, **4**(4), 39. DOI: 10.3390/cosmetics4040039.

- [33] SAHANA, T. G. a P. D. REKHA. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular biology reports*. 2018, **45**(6), 2857 – 2867. DOI: 10.1007/s11033-018-4296-3.
- [34] KAWADA, CH., T. YOSHIDA, H. YOSHIDA et. al. Ingested hyaluronan moisturizers dry skin. *Nutrition journal*. 2014, **13**(1), 70. DOI: 10.1186/1475-2891-13-70.
- [35] REGAN, J. A., Y. CAO, M. C. DISPENZA, S. MA, L. I. GORDON, A. M. PETRICH a B. S. BOCHNER. Ibrutinib, a Bruton's tyrosine kinase inhibitor used for treatment of lymphoproliferative disorders, eliminates both aeroallergen skin test and basophil activation test reactivity. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2017, **140**(3), 875 – 879. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.013.
- [36] NAKAMURA, M., A. YAGAMI, K. HARA, A. SANO-NAGAI, T. KOBAYASHI a K. MATSUNAGA. Evaluation of the cross-reactivity of antigens in Glupearl 19S and other hydrolysed wheat proteins in cosmetics. *Contact dermatitis*. 2016, **74**(6), 346 – 352. DOI: 10.1111/cod.12551.
- [37] LIU, T., N. LI, Y. YAN et. al. Recent advances in the anti-aging effects of phytoestrogens on collagen, water content, and oxidative stress. *Phytotherapy research*. 2020, **34**(3), 435 – 447. DOI: 10.1002/ptr.6538.
- [38] PATEL, S. a A. GOYAL. Applications of natural polymer gum arabic: a review. *International journal of food properties*. 2015, **18**(5), 986 – 998. DOI: 10.1080/10942912.2013.809541.
- [39] MARIANA, A., L. MARA, L. VALLE a D. CLAUDIO. Gum arabic: more than an edible emulsifier. *Products and applications of biopolymers*. 2012, **3**(7). DOI: 10.5772/33783.
- [40] WIJESEKERA, R. O. B. *The medicinal plant industry*. Boca Raton: CRC Press, 1991. ISBN 9780849366697.
- [41] ARANAZ, I., N. ACOSTA, C. CIVERA, B. ELORZA, J. MINGO, C. CASTRO, M. GANDÍA a A. HERAS CABALLERO. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *Polymers*. 2018, **10**(2), 213. DOI: 10.3390/polym10020213.
- [42] NECAS, J. a L. BARTOSIKOVA. Carrageenan: a review. *Medicina*. 2013, **58**(4), 187 – 205. DOI: 10.17221/6758-VETMED.

- [43] PATIL, A. a M. S. FERRITTO. Polymers for personal care and cosmetics: overview. *Polymers for personal care and cosmetics*. 2013, **1**(12), 3 – 11. DOI: 10.1021/bk-2013-1148.ch001.
- [44] MAHAJAN, A. Advancements in polymers used in hair care: a review. *International journal of research in cosmetic science*. 2016, **6**(1), 6 – 16.
- [45] FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*. 2005, **214**(1 – 2), 1 – 38. DOI: 10.1016/j.tox.2005.06.001.
- [46] CHAUHAN, N. P. S. *Biocidal polymers*. 2nd edition. Boston: De Gruyter, 2019. ISBN 9783110639131.
- [47] TEODORESCU, M. a M. BERCEA. Poly(vinylpyrrolidone)-a versatile polymer for biomedical and beyond medical applications. *Polymer-plastics technology and engineering*. 2015, **54**(9), 923 – 943. DOI: 10.1080/03602559.2014.979506.
- [48] SALAMONE, J. C. *Concise polymeric materials encyclopedia*. Boca Raton: CRC Press, 1999. ISBN 084932226X.
- [49] IGIELSKA-KALWAT, J., J. GOŚCIAŃSKA, B. WITKOWSKA a I. NOWAK. In vivo studies of substances used in the cosmetic industry. *Advances in dermatology and allergology*. 2016, **3**(3), 163 – 169. DOI: 10.5114/ada.2016.60607.
- [50] DÍEZ-SALES, O., A. NÁCHER, M. MERINO a V. MERINO. Alternative methods to animal testing in safety evaluation of cosmetic products. *Analysis of cosmetic products*. 2018, 551 – 584. DOI: 10.1016/B978-0-444-63508-2.00017-5.
- [51] LI, Z., N. NAVARRO-ALVAREZ, E. J. KEELEY, N. H. NOWELL, B. M. M. GONCALVES, CH. A. HUANG a C. L. EVANS. Non-invasive monitoring of skin inflammation using an oxygen-sensing paint-on bandage. *Biomedical optics express*. 2017, **8**(10). DOI: 10.1364/BOE.8.004640.
- [52] ROSADO, C., R. BARBOSA, R. FERNANDO, F. ANTUNES a L. M. RODRIGUES. Study of the effect of epidermal overhydration by occlusion, on the skin biomechanical behaviour assessed in vivo with the systems Cutometer®, Reviscometer® and CutiScan®. *Journal biomedical and biopharmaceutical research*. 2015, **12**(2), 203 – 213. DOI: 10.19277/BBR.12.2.117.

- [53] WÓJCIK, A., E. BARTNICKA a H. ROTSZTEJN. Reviscometer evaluation of the skin condition after applying retinol and vitamin C complex in menopausal women. *Journal of cosmetics, dermatological sciences and applications*. 2016, **6**(4), 148 – 155. DOI: 10.4236/jcdsa.2016.64019.
- [54] MILLER, T. Clinical testing to uphold an anti-aging claim. *Skin aging handbook*. 2009, **3**(14), 363 – 389. DOI: 10.1016/B978-0-8155-1584-5.50018-1.
- [55] WEBSTER, J. G. *The physiological measurement handbook*. Boca Raton: CRC, Taylor & Francis group, 2015. ISBN 1439808473.
- [56] RIEGER, M. M. a L. D. RHEIN. *Surfactants in cosmetics*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 1997. ISBN 9780824798055.
- [57] QASSEM, M. a P. KYRIACOU. Review of modern techniques for the assessment of skin hydration. *Cosmetics*. 2019, **6**(1), 19. DOI: 10.3390/cosmetics6010019.
- [58] The Corneometr CM 825: Technical charges. 2013.
- [59] The Tewametr TM 300: Technical charges. 2013.
- [60] JANIŠ, R., V. PATA, P. EGNER, J. PAVLAČKOVÁ, A. ZAPLETALOVÁ a K. KEJLOVÁ. Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. *Biointerphases*. 2017, **12**(2). DOI: 10.1116/1.4985696.
- [61] COURAGE a KHAZAKA elektronik, Skin-Visiometer SV 700 USB. *Skin-Visiometer SV 700 USB*. Germany, 2016. Dostupné z: <http://courage-khazaka.de>.
- [62] International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Council for international organisations of medical sciences. Geneva (2002).
- [63] BAZIN, R. a C. FANCHON. Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. *International journal of cosmetic science*. 2006, **28**(6), 453 – 461. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2006.00352.x.
- [64] JANSEN VAN RENSBURG, S., A. FRANKEN a J. L. DU PLESSIS. Measurement of transepidermal water loss, stratum corneum hydration and skin surface pH in occupational settings: A review. *Skin research and technology*. 2019, **25**(5), 595 – 605. DOI: 10.1111/srt.12711.



- [65] SAMAD, N. a A. SIKARWAR. Collagen: new dimension in cosmetic and healthcare. *International journal of biochemistry research & review*. 2016, **14**(3), 1 – 8. DOI: 10.9734/IJBCRR/2016/27271.
- [66] GADELMAWLA, E. S., M. M. KOURA, T. M. A. MAKSOUD, I. M. ELEWA a H. H. SOLIMAN. Roughness parameters. *Journal of materials processing technology*. 2002, **123**(1), 133 – 145. DOI: 10.1016/S0924-0136(02)00060-2.
- [67] CARTIGLIANI, C., A. BONFIGLI, S. BRANCATO a L. RIGANO. The age factor in cosmetic management of biophysical skin parameters. *Cosmetics*. 2014, **1**(2), 117 – 127. DOI: 10.3390/cosmetics1020117.
- [68] PROKSCH, E., D. SEGGER, J. DEGWERT, M. SCHUNCK, V. ZAGUE a S. OESSER. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin pharmacology and physiology*. 2014, **27**(1), 47 – 55. DOI: 10.1159/000351376.
- [69] PROKSCH, E., M. SCHUNCK, V. ZAGUE, D. SEGGER, J. DEGWERT a S. OESSER. Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. *Skin pharmacology and physiology*. 2014, **27**(3), 113 – 119. DOI: 10.1159/000355523.
- [70] AGUIRRE-CRUZ, A. LEÓN-LÓPEZ, V. CRUZ-GÓMEZ, R. JIMÉNEZ-ALVARADO a G. AGUIRRE-ÁLVAREZ. Collagen hydrolysates for skin protection: oral administration and topical formulation. *Antioxidants*. 2020, **9**(2), 181. DOI: 10.3390/antiox9020181.
- [71] SAKAI, S., M. YAMANARI, Y. LIM, N. NAKAGAWA a Y. YASUNO. In vivo evaluation of human skin anisotropy by polarization-sensitive optical coherence tomography. *Biomedical optics express*. 2011, **2**(9), 2623 – 2631. DOI: 10.1364/BOE.2.002623.
- [72] TADINI, K. A., D. G. MERCURIO a P. M. B. G. M. CAMPOS. Acetyl hexapeptide-3 in cosmetic formulation acts on skin mechanical properties – clinical study. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*. 2015, **51**(4), 901 – 909. DOI: 10.1590/S1984-82502015000400016.

- [73] LIN, L. L., T. W. PROW, A. P. RAPHAEL, R. L. HARROLD, C. A. PRIMIERO, A. B. ANSALDO a H. P. SOYER. Microbiopsy engineered for minimally invasive and suture-free submillimetre skin sampling. *F1000 research*. 2013, **2**, 120. DOI: 10.12688/f1000research.2-120.v1.
- [74] NISCHAL, U., K. NISCHAL a U. KHOPKAR. Technique of skin biopsy and practical considerations. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2008, **1(2)**, 107 – 111. DOI: 10.4103/0974-2077.44174.
- [75] DIN 4762-4768: Bestimmung des Wassergehalts in Honig. Deutsche Industrie Norm.
- [76] INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

c. j.	Korneometrická jednotka
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
KH	Kolagenní hydrolyzát
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
UV	Ultrafialové záření
SC	<i>Stratum corneum</i>
NMF	Natural moisturizing factor (přirozeně hydratační faktor)
RRT	Resonance running time (rezonanční čas)
g/m <sup>2</sup> /h	TEWL jednotka
EU	Evropská Unie
Da	Jednotka molekulové hmotnosti (Dalton)
PVA	Polyvinylalkohol
PEG	Polyethylenglykol
PQ	Polyquaternium
PVP	Polyvinylpyrrolidon

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Faktory ovlivňující stárnutí kůže [12].....	15
Obrázek 2: Změna textury kůže v oblasti obličeje: (a) jemná textura, (b) mimická vráska, (c) kožní záhyb [17].....	17
Obrázek 3: Schéma bariérové funkce SC: a) zdravá kůže, b) porušená kůže [25].....	22
Obrázek 4: Hlavní funkce derivátů chitosanu v péči o pokožku [41] .....	30
Obrázek 5: Ramanův přístroj pro analýzu kůže [16].....	38
Obrázek 6: Připravený KH ve formě prášku [vlastní zdroj].....	45
Obrázek 7: a) stanice MPA 10, b) Skin Visiometer SV 700, c) tewametr TM 300, .....	47
Obrázek 8: Princip měření přístroje Skin Visiometer SV 700 [61].....	49
Obrázek 9: Šablona se silikonovou replikou pro vyhodnocení mikroreliefu pokožky [vlastní zdroj] .....	49
Obrázek 10: Měřené oblasti v průběhu testování [19, upraveno].....	51
Obrázek 11: a) oboustranně lepící papírový kroužek, b) průhledná krycí fólie .....	54
Obrázek 12: c) dvousložkový silikon (báze a katalyzátor), d) plastový pohárek a tyčinka [vlastní zdroj].....	54
Obrázek 13: Postup nanášení silikonové repliky: A) vymezená oblast, B) nalepený papírový kroužek, C) nanesený silikon [vlastní zdroj].....	54
Obrázek 14: Srovnání průměrných hodnot hydratace jednotlivých probandek (pravá strana).....	58
Obrázek 15: Srovnání průměrných hodnot hydratace jednotlivých probandek (levá strana).....	58
Obrázek 16: Průměrné hodnoty hydratace souboru probandek pro pravou a levou stranu .....	59
Obrázek 17: Srovnání průměrných hodnot TEWL jednotlivých probandek (pravá strana).....	62
Obrázek 18: Srovnání průměrných hodnot TEWL jednotlivých probandek (levá strana).....	62
Obrázek 19: Průměrné hodnoty TEWL souboru probandek pro pravou a levou stranu .....	63
Obrázek 20: Srovnání průměrných hodnot RRT pro jednotlivé úhly otočení sondy (pravá oblast).....	66
Obrázek 21: Srovnání průměrných hodnot RRT pro jednotlivé úhly otočení sondy (levá oblast).....	67
Obrázek 22: Parametry dsnosti $R_t$ ( $R_1$ ), $R_{max}$ ( $R_2$ ), $R_p$ ( $R_4$ ), $R_a$ ( $R_5$ ) [66].....	68

---

Obrázek 23: Parametr drsnosti Rz (R3) pro pět nejvyšších a pět nejnižších segmentů [66] .....	69
Obrázek 24: Kruhová a horizontální oblast pro vyhodnocení drsnosti pokožky.....	69
Obrázek 25: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti R1 až R5 v jednotlivých týdnech.....	70
Obrázek 26: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti R1 až R5 v jednotlivých týdnech měření pro levou oblast spánku.....	71
Obrázek 27: Redukce vrásek v pravé a levé spánkové oblasti po osmitýdenní aplikaci gelu .....	72
Obrázek 28: Porovnání snímků kožního povrchu před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace.....	74
Obrázek 29: Porovnání 3D obrazů před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace.....	75
Obrázek 30: Změna reliéfu pokožky před aplikací a po osmi týdnech aplikace gelové formulace.....	79

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Klasifikace vrásek podle Hamiltona [18] .....	18
Tabulka 2: Charakteristika probandek, které se zúčastnily experimentu .....	50
Tabulka 3: Průměrné hodnoty hydratace probandek v oblasti pravého a levého spánku v jednotlivých týdnech aplikace.....	57
Tabulka 4: Průměrné hodnoty hydratace se směrodatnými odchylkami pro soubor probandek .....	58
Tabulka 5: Průměrné hodnoty TEWL probandek v oblasti pravého a levého spánku v jednotlivých týdnech aplikace .....	61
Tabulka 6: Průměrné hodnoty TEWL se směrodatnými odchylkami pro soubor probandek .....	62
Tabulka 7: Průměrné hodnoty RRT se směrodatnými odchylkami v jednotlivých úhlech otočení sondy pro pravou oblast spánku.....	65
Tabulka 8: Průměrné hodnoty RRT se směrodatnými odchylkami v jednotlivých úhlech otočení sondy pro levou oblast spánku .....	66
Tabulka 9: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti se směrodatnými odchylkami v jednotlivých týdnech měření pro pravou oblast spánku.....	70
Tabulka 10: Průměrné hodnoty parametrů drsnosti se směrodatnými odchylkami v jednotlivých týdnech měření pro levou oblast spánku .....	70
Tabulka 11: Celková redukce vrásek při porovnání počátečního a koncového stavu po aplikaci gelové formulace v oblasti pravého spánku.....	72
Tabulka 12: Celková redukce vrásek při porovnání počátečního a koncového stavu po aplikaci gelové formulace v oblasti levého spánku.....	72
Tabulka 13: Anizotropie kůže před aplikací a po aplikaci gelové formulace v jednotlivých týdnech .....	77
Tabulka 14: Redukce množství vrásek před aplikací a po aplikaci gelové formulace v jednotlivých týdnech .....	78

## SEZNAM PŘÍLOH

P I Informovaný souhlas

P II Dotazník

# PŘÍLOHA P I: INFORMOVANÝ SOUHLAS

Příloha č.4

## Individuální informovaný souhlas

V rámci realizace experimentální části diplomové práce budou na Vaši kůži aplikovány různé testované výrobky. U všech výrobků byla posouzena dokumentace z hlediska jejich bezpečnosti. Všechny známé informace o zkoumaných výrobcích dovolují testování na dobrovolnících.

### Cíl studie

Cílem práce je zjistit odezvu Vaší pokožky na aplikovaný přípravek pomocí exaktně změřených veličin.

### Podmínky účasti

Před zahájením vlastního experimentu je nutno vyplnit dotazník (viz. příloha č. 3). Součástí dotazníku jsou údaje o Vašem zdravotním stavu, alergiích, kožních problémech, o užívaných lécích a o dřívější účasti v obdobných studiích. Na základě Vašich pravdivých odpovědí bude rozhodnuto o účasti v daném cvičení.

### Metodika testu

Experiment bude prováděn diplomantkami pod dohledem kvalifikovaných pracovníků Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a dermatologa. Plánovaná práce zahrnuje: - jednorázový otevřený kožní test (epikutánní test na vnitřní straně předloktí).

### Odstoupení z laboratorní práce

Z práce je možno odstoupit při výskytu závažnějších potíží po dohodě s vedoucím diplomové práce.

### Rizika a nepříjemnosti

Během práce může dojít k podráždění odpovídající lehkému připálení sluncem. Místo aplikace může zrudnout nebo zčervenat, dočasně pálit, svědit nebo se vysušit. Nejsilnější očekávanou reakcí je zrudnutí, které může být doprovázeno místním otokem. Nejsou očekávány žádné trvalé následky.



# PŘÍLOHA P II: DOTAZNÍK

Příloha č.3

## Dotazník pro účastníka měření

Jméno:

Příjmení:

Věk:

Pohlaví:

Kód pokusné osoby (evidenční číslo):

### **Současný zdravotní stav:**

Vyskytuje se u Vás nyní:	ano	ne	jaké
lupénka			-----
ekzém			-----
rakovina kůže			-----
jiné kožní problémy a onemocnění			
žizvy, mateřská znaménka, jiné vady kůže v místě testu			-----
zarudnutí kůže po slunění nebo z jiného důvodu v místě testu			-----
astma vyžadující denní příjem léků			-----
jiné chronické respirační onemocnění			
diabetes vyžadující léčbu inzulínem			-----
onemocnění imunitního systému			

### **Zdravotní stav v minulosti**

Prodělal(a) jste:	ano	ne
transplantaci orgánů		
léčbu maligního nádoru v posledních 6 měsících		

### **Užívání léků**

Berete či používáte pravidelně:	ano	ne	jaké
protizánětlivé léky (např. aspirin, ibuprofen, hydrokortizon, nebo jiné steroidy)			
imunosupresivní léky (např. cyklosporin A)			
jiné léky			

### **Alergologická léčba**

Probíhá u vás v současné době:	ano	ne	jaká
alergologická léčba (kapky, injekce, apod.)			
dostali jste poslední dávku během minulého týdne			-----
očekáváte další dávky v průběhu studie			-----