

# Formulování a ověřování účinnosti anti-aging krémů

Bc. Adriana Páterová

---

Diplomová práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Adriana Páterová  
Osobní číslo: T22667  
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Formulování a ověřování účinnosti anti-aging krémů

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část:

1. Vypracujte literární studii, ve které se zaměříte na stárnutí pokožky a biologicky aktivní látky, které mohou účinně ovlivňovat proces stárnutí.

### II: Praktická část:

- Navrhněte složení a připravte modelové formulace, charakterizujte jejich základní vlastnosti.
- Zorganizujte testování vybraných modelových formulací *in vivo* dostupnými bioinženýrskými diagnostickými metodami.
- Získané výsledky zpracujte a diskutujte.
- Formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] FORTUNATO, A. T., M. M. GONÇALVES, G. A. COLUSSE, C. B. ADONSKI, B. P. BORGES a J. CARNEIRO, 2021. Stability and Sensory Evaluation of an Innovative Antiaging Formulation Based on Marine Ingredients. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. **64**, e21200429. ISSN 1516-8913. Dostupné z: doi:10.1590/1678-4324-2021200429.
- [2] PAPACCIO, F., A. DÁRINO, S. CAPUTO a B. BELLEI, 2022. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. *Antioxidants* [online]. **11**(6), 1121. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox11061121.
- [3] Göllner I., Voss W., von Hehn U., Kammerer S., 2017. Ingestion of an Oral Hyaluronan Solution Improves Skin Hydration, Wrinkle Reduction, Elasticity, and Skin Roughness: Results of a Clinical Study. *J Evid Based Complementary Altern Med.*;22(4):816-823. Dostupné z: doi:10.1177/2156587217743640.
- [4] MARTINS, E., R. L. REIS a T. H. SILVA, 2023. In Vivo Skin Hydrating Efficacy of Fish Collagen from Greenland Halibut as a High-Value Active Ingredient for Cosmetic Applications. *Marine Drugs* [online]. **21**(2), 57. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md21020057.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Pavlačková, Ph.D.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **9. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

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

---

**Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.**  
ředitel ústavu

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY 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 na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky: Adriana Páterová

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Teoretická část diplomové práce pojednává o příčinách, průběhu i důsledcích stárnutí kůže. Problematiku doplňuje přehled topicky využívaných biologicky aktivních látek, které mohou pozitivně ovlivňovat mechanismus stárnutí.

Praktická část byla věnována formulaci základní matrice krému obohacené o látky s anti-aging efektem za účelem stanovení jejich vlivu na vybrané biofyzikální parametry kůže. Měření bylo realizováno *in vivo* prostřednictvím dostupných neinvazivních diagnostických metod a snímáním kožního reliéfu pomocí silikonových replik. U formulací krémů byla hodnocena jejich mikrobiologická čistota, stabilita i senzorické vlastnosti. Mikrobiologicky čisté emulze O/V vykazovaly stabilní fyzikální vlastnosti. Byla potvrzena anti-aging účinnost formulací na pokožku.

Klíčová slova: kůže, stárnutí pleti, vrásky, anti-aging formulace, bioinženýrské metody

## **ABSTRACT**

The Master's thesis concentrates on the causes, process and consequences of skin aging. This issue is supplemented by an overview of topically used biologically active substances that can positively influence the skin aging mechanism.

The practical part of the thesis concentrates on the preparation of the basic cream matrix enriched with anti-aging substances in order to determine their effect on selected biophysical parameters of the skin. *In vivo* measurements were performed utilizing available non-invasive diagnostic methods and by imaging the skin relief using silicone replicas. The individual cream formulas have been subjected to microbiological and stability tests as well as sensory properties. Microbiologically pure O/W emulsions showed stable physical properties. The anti-aging effectiveness of skin formulations has been confirmed.

Keywords: skin, skin aging, wrinkles, anti-aging formulations, bioengineering methods

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala během zpracování práce. Velké poděkování patří i doc. Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za přínosné rady a pomoc při realizaci mikrobiologické části a též paním laborantkám Ing. Markétě Kudláčkové, Ph.D., Evě Bartoníkové, Dis. a Ing. Veronice Kučabové za jejich velkou ochotu, vstřícnost a pomoc při práci v laboratoři. Též děkuji všem dobrovolnicím, jež se rozhodly zúčastnit se experimentálního měření a umožnily mi tak zrealizovat praktickou část práce.

Největší poděkování bych chtěla věnovat své rodině a nejbližším, kteří mě po celou dobu studia nesmírně podporovali.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 STÁRNUTÍ LIDSKÉHO ORGANISMU.....</b>	<b>11</b>
1.1 TEORIE STÁRNUTÍ.....	11
1.1.1 Genetická teorie .....	11
1.1.2 Teorie volných radikálů .....	12
1.1.3 Neuro-endokrinní teorie .....	12
<b>2 STÁRNUTÍ KŮŽE .....</b>	<b>13</b>
2.1 INTRINSICKÉ STÁRNUTÍ KŮŽE .....	13
2.2 EXTRINSICKÉ STÁRNUTÍ KŮŽE .....	14
<b>3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY OVLIVŇUJÍCÍ STÁRNUTÍ KŮŽE .....</b>	<b>19</b>
3.1 OXIDAČNÍ STRES .....	19
3.2 POŠKOZENÍ DNA .....	19
3.3 MITOCHONDRIÁLNÍ DYSFUNKCE .....	20
3.4 ZKRACOVÁNÍ TELOMER A BUNĚČNÁ SENESCENCE.....	20
3.5 AKUMULACE KONEČNÝCH PRODUKTŮ POKROČILÉ GLYKACE .....	21
<b>4 ZMĚNY STÁRNOUCÍ KŮŽE.....</b>	<b>22</b>
4.1 FYZIOLOGICKÉ ZMĚNY .....	22
4.2 STRUKTURNÍ ZMĚNY .....	25
4.2.1 <i>Epidermis</i> .....	26
4.2.2 <i>Dermis</i> .....	28
4.2.3 <i>Subcutis</i> .....	31
4.3 VIZUÁLNÍ ZMĚNY .....	32
<b>5 AKTIVNÍ LÁTKY S ANTI-AGING ÚČINKEM .....</b>	<b>34</b>
5.1 ANTIOXIDANTY .....	34
5.2 RETINOIDY .....	36
5.3 CERAMIDY .....	36
5.4 PEPTIDY .....	37
5.5 HYDROXYKYSELINY.....	38
5.6 KYSELINA HYALURONOVÁ .....	39
5.7 KOLAGEN .....	40
5.8 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	41
5.9 ROSTLINNÉ EXTRAKTY A OLEJE.....	42
<b>6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>44</b>
<b>7 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>45</b>

<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>46</b>
<b>8 METODIKA PRÁCE.....</b>	<b>47</b>
8.1 POUŽITÉ MATERIÁLY, PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	47
8.2 PŘÍPRAVA FORMULACÍ ANTI-AGING KRÉMŮ .....	50
8.3 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ.....	54
8.3.1 Orientační stanovení mikrobiologické kontaminace.....	54
8.3.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní .....	54
8.3.3 Stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
8.3.4 Test přežívání <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	55
8.4 TESTOVÁNÍ TEPELNÉ STABILITY .....	56
8.4.1 Stanovení organoleptických vlastností.....	57
8.4.2 Měření pH .....	57
8.4.3 Měření viskozity.....	57
8.4.4 Instrumentální měření texturních vlastností.....	58
8.5 <i>IN VIVO</i> TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI FORMULACÍ.....	59
8.5.1 Soubor dobrovolnic .....	59
8.5.2 Organizace měření .....	59
8.5.3 Korneometrické měření.....	61
8.5.4 Měření TEWL .....	61
8.5.5 Měření pH .....	62
8.5.6 Měření erytému .....	62
8.5.7 Měření elasticity .....	62
8.5.8 Vizualizace struktury kožního povrchu .....	62
8.5.9 Snímání reliéfu kůže pomocí silikonových replik .....	63
8.6 SENZORICKÉ POSUZOVÁNÍ ORGANOLEPTICKÝCH VLASTNOSTÍ FORMULACÍ.....	64
8.6.1 Pořadové zkoušky .....	64
8.6.2 Párové porovnávací zkoušky.....	65
8.7 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT .....	65
<b>9 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>66</b>
9.1 ZHODNOCENÍ PŘÍPRAVY FORMULACÍ ANTI-AGING KRÉMŮ.....	66
9.2 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ FORMULACÍ .....	68
9.3 STABILITNÍ TESTY .....	73
9.4 BIOFYZIKÁLNÍ ÚČINNOST FORMULACÍ NA POKOŽKU .....	79
9.5 SENZORICKÉ TESTY .....	97
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>100</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>102</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>117</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>120</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>122</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>123</b>



## ÚVOD

Kůže dospělého člověka zaujímá plochu až 2 m<sup>2</sup> a je tak největším a nejkomplexnějším orgánem lidského těla. V organismu tvoří ochrannou bariéru oddělující vnější a vnitřní prostředí, umožňuje smyslové vnímání zprostředkované receptory nervových zakončení a díky její schopnosti tělesné izolace, mikrocirkulace krve a tvorby potu plní také funkci termoregulační. Neméně důležitá je také její schopnost vylučovat odpadní látky pomocí potních a mazových žláz, ukládat zásoby lipidů a vody a též její role v sociální komunikaci. Na jejím zdravotním stavu i vzhledu se odráží mnoho vlivů původu fyzikálního, chemického i biologického.

Stárnutí pleti je přirozeným multifaktorovým fyziologickým pochodem projevujícím se ve všech jejích vrstvách. Dochází ke změnám ve struktuře s dopadem na její fungování. Chronologické a aktinické stárnutí spolu se životním stylem i životními podmínkami ovlivňuje hydrataci kůže, syntézu strukturních proteinů, funkci buněčných organel, stav kožních buněk i schopnost regenerace kůže. Zmíněné faktory se projevují tvorbou vrásek, ochablostí, rozšířením pórů či vznikem pigmentových skvrn.

Z uvedených důvodů je velmi vyhledávaná tzv. anti-aging kosmetika. Jedná se o topické přípravky se schopností předcházet stárnutí či redukovat jeho viditelné známky. Zpravidla obsahují aktivní látky, které pozitivně ovlivňují mechanismy odehrávající se ve stárnoucí pleti. Nejčastěji jsou cíleny na redukci obsahu volných radikálů a mutací deoxyribonukleové kyseliny (DNA), protekci před působením ultrafialového záření, stimulaci syntézy kolagenu a elastinu, udržení a zvýšení hydratace *stratum corneum* či prodloužení životaschopnosti buněk kůže.

Popularita a zájem o tento druh kosmetiky stále narůstá. Porozumění molekulárním mechanismům probíhajícím v pleti během stárnutí napomáhá k rozvoji účinných anti-aging strategií a na trhu lze tak snadno nalézt nepřeberné množství kosmetických přípravků v podobě sér, krémů, gelů i lotionů. Je nutné zdůraznit, že stárnutí kůže i celého lidského organismu je přirozený proces, který nelze zvrátit. Přesto lze správnou péčí o pleť docílit zpomalení či zmírnění projevů tohoto procesu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 STÁRNUTÍ LIDSKÉHO ORGANISMU

Stárnutí organismu je definováno jako časově závislý ireverzibilní biologický mechanismus vedoucí k chronologickým změnám ve struktuře a funkcích všech částí tvořících organismus. Biochemickým principem procesu je hromadění nahodilých chyb odehrávajících se v biologických molekulách, zejména v proteinech a DNA. Klíčovou roli zde hraje také postupná dysfunkce buněčných organel, akumulace senescentních buněk a reaktivních forem kyslíku [1, 2].

Jako model pro studium stárnutí lidského organismu je využívána kůže, na které se zřetelně odráží veškeré změny související s procesem stárnutí. Kůže chrání naše tělo před fyzikálními, chemickými i biologickými faktory a tvoří tak ochrannou bariéru oddělující vnitřní prostředí organismu od vnějšího okolí [3].

Stárnutí pokožky je obecně označováno jako komplexní biologicky nevyhnutelný proces negativně ovlivňující jednotlivé vrstvy kůže v důsledku poklesu fyziologických funkcí. Mladá, pružná a hydratovaná pleť se s věkem přetváří do pokožky nesoucí známky stárnutí jako je prohlubování vrásek, ztráta elasticity a vznik nepravidelných stařeckých pigmentových skvrn [4, 5, 6].

### 1.1 Teorie stárnutí

Již od dávných věků se vědci i filozofové snažili přijít na podstatu stárnutí, jeho příčinu a způsoby, jak jeho proces ovlivnit či zvrátit. Zabývali se otázkami, zda je stárnutí mechanismem naprogramovaným či nahodilým (stochastickým) a zda jsou faktory stárnutí povahy genetické či epigenetické. Dle jejich nabytých poznatků a vědomostí bylo vypracováno mnoho teorií a hypotéz týkajících se tohoto procesu. Ty nejznámější z nich budou podrobněji popsány v subkapitolách 1.1.1–1.1.3. Žádná ze zpracovaných teorií však není univerzální, některé si odporují, jiné spolu souvisí a překrývají se [7, 8].

#### 1.1.1 Genetická teorie

Podstata genetické teorie vychází z poznatků získaných při porovnávání délky života dvou jedinců stejného živočišného druhu. Její autoři se domnívají, že existuje přibližně stejná délka života nejenom mezi zástupci daného živočišného druhu, ale i mezi příslušníky rodin [9].

S touto teorií je často spojována i teorie programovaného stárnutí, která tvrdí, že je proces stárnutí důsledkem jakéhosi genetického programu – řízeného zapínání a vypínání genů

v průběhu života. K teorii přispěly i poznatky molekulárně genetických studiích založených na pozorování zkracování délky telomer, tedy opakujících se sekvencí DNA. Délka telomery je pro každého jedince individuální, velkou roli zde však hrají především genetické predispozice. V průběhu každého buněčného dělení se telomery zkracují, až do chvíle vyčerpání jejich celkové délky. Poté dochází k zástavě buněčné proliferace, nastává apoptóza a zánik buňky [10, 11].

### 1.1.2 Teorie volných radikálů

Teorie volných radikálů je jednou z nejpopulárnějších hypotéz a bývá řazena mezi stochastické teorie stárnutí. Volné radikály představují vysoce reaktivní částice vznikající homolytickým štěpením chemických vazeb, při kterém dochází ke vzniku dvou radikálů s nepárovým počtem elektronů, což je příčinou jejich vysoké nestability. Volné radikály tak velmi ochotně reagují destruktivním způsobem s biologicky aktivními makromolekulami, zejména s bílkovinami, nukleovými kyselinami a tuky. Nejhojnějšími typy volných radikálů v lidském těle jsou reaktivní formy kyslíku, tzv. ROS. Velmi často vznikají uvnitř buněk v procesu buněčného dýchání jako vedlejší produkty. Reakce těchto volných radikálů vedou ke změně chemického složení, struktury, a tudíž i ke změnám biologické funkce důležitých makromolekul. Teorie stárnutí prostřednictvím volných radikálů tedy předpokládá, že příčinou stárnutí je hromadění oxidativních změn a poškození organických makromolekul, které již nedokážou správně plnit své biologické funkce v organismu [9, 10, 11].

### 1.1.3 Neuro-endokrinní teorie

Neuro-endokrinní teorie předpokládá, že rychlost stárnutí určují naprogramované změny neuronů a s nimi související hormony. Princip této teorie bývá často vysvětlován na vlivu melatoninu na proces stárnutí. V tomto případě se předpokládá, že endokrinním centrem je epifýza, kde je tento hormon tvořen. Melatonin je schopen řídit mnoho biorytmů probíhajících v lidském těle a v buňkách působí jako antioxidant. To znamená, že buňky dokáže účinně ochránit před působením volných radikálů. Pokud tedy budeme vycházet z teorie stárnutí volných radikálů, pak tento specifický hormon působí proti procesu stárnutí [10, 11, 12].

## 2 STÁRNUTÍ KŮŽE

Proces stárnutí pleti obecně dělíme do dvou kategorií: intrinsické (vnitřní) a extrinsické (vnější). Do faktorů ovlivňujících vnitřní stárnutí je řazeno především geneticky řízené chronologické stárnutí pleti. Naopak vnější stárnutí je, jak již název napovídá, ovlivněno vnějšími faktory prostředí. Ač spolu aspekty ovlivňující vnitřní i vnější stárnutí úzce souvisí, oba typy se projevují klinicky jiným způsobem. Působením intrinsického stárnutí dochází k modifikaci struktury kůže na tenkou, suchou a bledou s projevy jemných vrásek. Naopak vnější stárnutí zapříčiňuje vznik hrubé (až drsné) pokožky s výskytem hlubokých vrásek a pigmentových skvrn. Výčet dalších projevů je uveden v kapitole 4.1 v Tab. 1 [13, 14, 15].

### 2.1 Intrinsické stárnutí kůže

Intrinsické neboli chronologické stárnutí, je přirozené stárnutí lidského těla v důsledku plynutí času. Jeho vliv na kůži je komplexní – projevy jsou stejné u částí běžně chráněných před působením ultrafialového (UV) záření i u částí nechráněných. Vnitřním stárnutím dochází k pomalým nevratným fyziologickým změnám v kůži a postupné degradaci tkáně [16, 17].

Hlavní příčinou jsou molekulární mechanismy odehrávající se nejen v kůži, ale i v celém organismu. Podstatnou roli zde hraje vliv genetických predispozicí jedince (pleť dvou stejně starých jedinců může vykazovat menší či větší známky stárnutí), etnická příslušnost, pohlaví a hormonální změny [18].

- Etnická příslušnost

Nejzřetelnějším rozdílem kůže etnických ras je bezesporu míra pigmentace. Příčinou odlišné barvy kůže mezi etniky je zejména rozdílná aktivita melanocytů, která je odpovědná za odstín pleti. Pigmentace poskytuje do určité míry ochranu před účinky škodlivého UV záření, a proto jsou zde i značné rozdíly ve výskytu karcinomu kůže. Pokožka příslušníků černošského etnika produkuje větší množství melaninu, je proto lépe chráněna před vlivy slunečního záření a výskyt rakoviny kůže je zde podstatně nižší než u bělochů. Rozdíly kůže etnik se projevují i na odlišné tloušťce jejích vrstev, různorodém zastoupení jednotlivých komponent kůže a s tím úzce souvisejícím obsahem vody. Je nutno dodat, že vlivy stárnutí z pohledu etnické příslušnosti značně souvisí i s vnějšími faktory (klimatické prostředí, životní styl a stravovací návyky) [14].

- Pohlaví

I když se kůže mužů a žen nijak výrazně neliší, drobný morfologický rozdíl zde nalézt lze. Celková tloušťka kůže mužů je na většině částí těla větší než u žen, u kterých je kůže naopak silnější na dermální úrovni. Z pohledu míry kyselosti kožního pláště, transepidermální ztráty vody (TEWL) i hydratace nejsou názory odborníků jednotné. Někteří autoři uvádí neprůkazné rozdíly [14], jiní ve svých studiích interpretují zaznamenané změny parametrů kůže mezi pohlavími [19, 20].

- Hormonální změny

U žen v období premenopauzy a menopauzy dochází k postupnému snižování hladin estrogenu. Jeho nedostatek přispívá k atrofii (zejména ve vrstvě *stratum spinosum*) a atonii (ztráta tonu svalů) kůže, její snížené regenerační schopnosti a také k poklesu obranyschopnosti buněk proti oxidativnímu stresu a jiným traumatům. Pokles estrogenu vede ke zkrácení životaschopnosti keratinocytů v *epidermis*. Dochází i ke snížené solubilitě kolagenu a ke změně uspořádání jeho vláken, k redukci a fragmentaci elastinu a vlivem poklesu estrogen-dependentní syntézy ceramidů je narušena i bariérová funkce kůže [14, 21, 22].

## 2.2 Extrinsické stárnutí kůže

Za projevy vnějšího stárnutí je zodpovědný náš životní styl, stravovací návyky i environmentální podmínky, kterými jsme obklopeni. Na stavu naší kůže se odráží faktory jako vliv UV záření, užívání návykových látek, znečištění ovzduší, kvalita spánku a stravy a v neposlední řadě také stres [17, 23].

- UV záření

Uvádí se, že až 80 % projevů vnějšího stárnutí je připisováno vlivu UV záření, tzv. fotostárnutí. Fotostárnutí způsobuje UVA (320–400 nm) i UVB (290–320 nm) záření, UVC (200–280 nm) je zachytáváno ozónovou vrstvou, a proto nás jeho účinky neohrožují. Z hlediska jejich působení zde platí, že čím nižší vlnová délka, tím více energie záření má a tím více nebezpečné pro nás může být [18, 24].

Méně energetické záření UVA, které tvoří až 95 % UV záření dopadajícího na zemský povrch, poškozují svými účinky strukturu DNA jen nepřímým způsobem. Účinky UVA záření generují ROS, které mají za následek poškození pojivové tkáně, peroxidaci lipidů a fragmentaci řetězců DNA. Jeho působení zhoršuje mutagenní

riziko závislé na dávce UVB záření. Pokud nedojde k časným opravám mutací DNA, postupně začnou vznikat prekancerózní léze (aktinická keratóza), které v případě jejich neléčení mohou propuknout až v rakovinu kůže (karcinomy, melanomy) [25, 26].

Ač proniká UVB záření maximálně do bazální epidermální vrstvy, jeho biologické účinky jsou až stokrát silnější než u UVA. V případě UVB záření dochází již k přímé interakci s DNA. Zapříčiňuje vznik thyminových dimerů (vznik mutací), poškozují DNA v keratinocytech a melanocytech a také indukuje produkci proteolytických enzymů (MMP). Zejména UVB záření je zodpovědné za vznik opálení (pigmentace), ale také za vznik erytému, imunosuprese a fotokarcinogeneze [26, 27].

Fotostárnutí je kumulativním procesem, jehož účinky se s přibývajícím expozičním časem na slunci projevují markantněji. Oba zmíněné typy záření iniciují v kůži řadu reakcí, které vyvolávají změny v některých buněčných strukturách (zejména u proteinů a lipidů) vedoucí k narušení mechanických vlastností kůže. Mezi typické klinické příznaky fotostárnutí kůže lze zařadit vznik hrubých vrásek, nažloutlé pleti, poruchy pigmentace, laxní, zdrsňelé a suché pokožky. Účinky UV záření jsou také původci solární elastózy (hromadění elastinového materiálu), aktinické keratózy, benigních i maligních výrůstků a také teleangiektázií (akumulace drobných rozšířených cév a kapilár) [27, 28].

- Kouření tabákových výrobků

Je prokázáno, že i kouření cigaret, během kterého se do organismu vstřebávají tisíce škodlivých složek, má negativní vliv na stav pleti. Kouření tabáku může kůži poškozovat dvěma cestami – přímo, prostřednictvím kontaktu toxických složek s *epidermis* anebo nepřímým kontaktem zprostředkovaným krevním oběhem. Kůže může být poškozována dokonce i prostřednictvím opakované expozice cigaretovému kouři, tedy u pasivních kuřáků [6, 18].

Vzhled tváře kuřáků se jeví mnohem starší než nekuřáků. Uvádí se, že každých 10 let kouření přispívá ke vzhledu jedince zvýšením jeho skutečného věku přibližně o 2,5 roku. Pro dlouhodobé kuřáky je typická drsná, bledá nepravidelně ztluštělá kůže s výskytem pigmentových skvrn a tzv. kuřáckých vrásek. Tyto vrásky vznikají v okolí rtů následkem kontrakce obličejových svalů při potahování cigarety. Mžourání očí při podráždění cigaretovým kouřem navíc vede ke zvýšené tvorbě vrásek v očním okolí.

Charakteristickým znakem chronického kuřáka jsou také propadlé tváře (výrazné zejména u kuřáků s podváhou) způsobené v důsledku sání cigarety [18, 29, 30].

Vliv kouření na fyziologii kůže je značný a platí zde vztah dávka–odezva. Přímým kontaktem dochází k oxidativním mutacím DNA, k vysušování a podráždění rohové vrstvy a účinky nikotinu zapříčiňují zúžení cév, čímž je narušena výměna živin a kyslíku mezi jednotlivými vrstvami kůže. Absorpce toxických látek vede k produkci ROS, ke zvýšené syntéze kolagenázy a elastázy (enzymy štěpící kolagen a elastin) a také ke zvýšené expresi MMP vedoucí k poškození pojivové tkáně. Účinky kouření vyvolávají i elastózu a teleangiektázii. Navíc bylo prokázáno, že vliv kouření má s expozicí UV záření synergický účinek a jeho následky jsou proto v jeho kombinaci výraznější [28, 29, 31].

- Znečištění ovzduší

Za určitých atmosférických podmínek se mohou znečišťující látky hromadit v troposféře, kde následně vytváří smog. Jelikož přichází kůže do přímého kontaktu s látkami znečišťujícími ovzduší, lze předpokládat jistou spojitost jejich účinků se stavem lidské pokožky [26, 31].

I když plní kůže funkci bariéry a brání tak vstupu nebezpečných látek do jejího vnitřního prostředí, při dlouhodobé expozici škodlivých účinků polutantů, může být narušena její homeostáza. Polutanty jsou tzv. prooxidační činidla, která jsou schopna v kůži generovat škodlivé ROS poškozující kožní buňky. Některé škodliviny mohou sloužit i jako nosiče nebezpečných chemických látek, jež se ukládají přímo v mitochondriích, kde produkují ROS a tím je přímo poškozují. Ozón navíc napadá i svrchní vrstvu *epidermis*, ze které vyčerpává antioxidanty (vitamín C a E), což má za následek horší odolnost kůže vůči oxidativnímu poškození [18, 32].

Škodlivé účinky polutantů mohou vést ke kožním poruchám i patologickým stavům, které se projevují vznikem zánětu, xerózou, výskytem akné a ekzémů, zvýšenou citlivostí, tvorbou vrásek a nepravidelnou pigmentací [28, 31].

- Spánek

Spánek ovlivňuje estetický vzhled obličeje, ale také řadu fyziologických procesů odehrávajících se v naší kůži. Nedostatek spánku se projevuje bledou pletí, oteklými očními víčky, tmavšími kruhy pod očima a celkovým nezdravým vzhledem obličeje. Je prokázáno, že u jedinců trpících chronickou spánkovou deprivací se vyskytují



známky přirozeného stárnutí ve větším měřítku než u osob s dobrou kvalitou spánku. Jejich kůže vykazuje zvýšené hladiny TEWL (sníženou funkci kožní bariéry), sníženou elasticitu a také výskyt jemných linek a nerovnoměrné pigmentace. Nedostatek kvalitního spánku navíc vede ke zvýšenému riziku výskytu chronických onemocnění [26, 28, 33].

- Strava

Bohatá a vyvážená strava poskytuje kůži dostatek živin, jež zajišťují energetické zásoby nezbytné pro její správnou funkci. Umožňují buňkám schopnost jejich optimálního dělení, přenosu informací i účasti na reparačních procesech. Velkým přínosem může být i zvýšený příjem nutričních složek s antioxidačními vlastnostmi. Předpokládá se, že některé vitamíny, flavonoidy, karotenoidy, či tokoferoly mají schopnost zachycovat volné radikály a chrání tak kůži před jejich poškozením [26, 28, 34].

Důkazem deficitu takových látek jsou např. kurděje způsobené akutním nedostatkem vitamínu C, pelagra zapříčiněná nedostatkem niacinu, či různé kožní léze jako důsledek nutričních nedostatků. I když jsou uvedené příklady vyvolané extrémními nedostatky, i dlouhodobé minimální deficity mohou vést ke kumulativním poškození fyziologických funkcí kůže [6, 26].

Naopak nadměrný příjem cukrů může být pro stárnutí kůže též negativním faktorem. Příčinou je průběh Maillardovy reakce, tedy vznik konečných produktů pokročilé glykace (AGE). Čím více sacharidů je tělem spotřebováno, tím více AGE produktů vzniká. Glykace může být dvojího typu – endogenní (v průběhu vazby stravou přijatých sacharidových produktů na bílkoviny a lipidy v kůži) a exogenní (konzumací potravin s již obsaženými AGE produkty v důsledku tepelné úpravy při vysokých teplotách). Akumulace AGE produktů přispívá k poškození kůže vedoucí k jejímu stárnutí a vzniku vrásek. Podrobněji je tento mechanismus popsán v kapitole 3.5 [26, 30].

Neméně důležitou roli zde hraje i dostatečný příjem vody. Přibližně 1/3 vody v těle člověka je extracelulární a 2/3 jsou součástí intracelulárních kompartmentů. Vzniklá rovnováha tělesných tekutin je zajištěna dostatečným příjmem vody prostřednictvím jídla, pití, metabolismu a také množstvím jejich ztrát v průběhu přírodních mechanismů odehrávajících se v těle. K udržení této rovnováhy jsou klíčové všechny

tři vrstvy kůže, jelikož vzájemně zajišťují řádné biofyzikální vlastnosti pokožky a s tím související optimální obsah vody ve *stratum corneum* (SC). Zvýšený příjem vody vede k jeho dostatečné hydrataci, podporuje vstřebávání živin kůží i její detoxikaci [14].

- Psychický stav

Řada kožních onemocnění (akné, atopická dermatitida, lupénka, aj) je spojena s duševním stavem jedince, jelikož má výrazný dopad na naši kůži. Veškeré emoce se v průběhu let vpisují do kůže a zanechávají na ní výrazné známky. Dlouhodobý stres či jiná psychická nepohoda může vést ke zhoršené textuře pleti, k chronické imunitní i bariérové dysfunkci, snížené hydrataci SC, zvýšené hladině TEWL a ROS a poškození DNA [6, 28].

### 3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY OVLIVŇUJÍCÍ STÁRNUTÍ KŮŽE

Pro přiblížení a snazší pochopení molekulárních změn kůže v průběhu stárnutí byly navrženy modely – teorie volných radikálů, poškození DNA, dysfunkce mitochondrií a lysozomů, vznik genetických mutací, regulace mikroRNA, zkracování telomer, buněčná senescence a akumulace koncových produktů pokročilé glykace. Některé z nich jsou detailněji popsány v kapitolách 3.1–3.5 [13, 18].

#### 3.1 Oxidační stres

Hlavní příčinou vnějšího i vnitřního stárnutí kůže je změna oxidační rovnováhy. Z hlediska chronologického stárnutí jsou ROS (superoxid, hydroxylový radikál, peroxid vodíku, singletový kyslík) produkovány v průběhu energetického metabolismu buňky při tvorbě adenosintrifosfátu (ATP) z glukózy. Při vnějším stárnutí jsou důvodem vzniku ROS vlivy exogenních faktorů (UV záření, poluce), kouření cigaret a špatná životospráva [2, 25].

Volné radikály jsou spouštěčem řady řetězových reakcí, které mohou mít negativní vliv na buněčné proteiny, membrány i DNA. ROS urychlují degradaci kolagenu, elastinu i kyseliny hyaluronové, a proto kůže ztrácí své přirozené funkční vlastnosti i regenerační potenciál. I když každá buňka obsahuje reparační enzymy podílející se na opravách okolních struktur, jejich katalytická aktivita s věkem klesá a v průběhu let dochází k hromadění poškození a mutací jaderné DNA. Akumulace chyb může vést nejen ke stárnutí kůže, ale také ke vzniku zánětů a rakoviny, jejíž výskyt s věkem exponenciálně roste [2, 16, 25, 35].

#### 3.2 Poškození DNA

Dlouhodobá a opakovaná expozice kůže UV záření zvyšuje riziko poškození a mutací DNA. Deoxyribonukleová kyselina dokáže velmi snadno absorbovat fotony v UV oblasti záření, což vede k přeskupení nukleotidů. V řetězci DNA dojde k okamžité fotochemické reakci, během které nastává spojení dvou sousedních pyrimidinových bází (cytosin nebo thymin). Tímto způsobem dojde ke vzniku cyklobutan pyrimidinového dimeru (CPD), který má za následek vznik mutací a chyb ve struktuře DNA. Poškození vzniklá v řetězci mohou vyvolat mutace, jejichž akumulace vede ke vzniku rakoviny a buněčné smrti, jež přispívá k předčasnému stárnutí (nejen kůže). Záleží však na charakteru vzniklých lézí – některé jsou primárně mutagenní, jiné cytotoxické či cytostatické [13, 14, 15].

Tělní buňky reagují na vznik těchto modifikovaných bází přechodným zastavením buněčného dělení, aby nedošlo k rozsáhlejšímu poškození DNA a mohly být spuštěny mechanismy opravy. U nižších organismů dochází k opravě DNA za pomoci enzymu fotolyázy, nicméně savčí buňky (tedy i lidské) tento enzym nemají. U člověka je pro účely opravy poškozené DNA využíván složitý systém řady reparačních mechanismů jako je např. mechanismus nukleotidové excise (NER) nebo bázová excizní oprava (BER), během kterých jsou z řetězce DNA vystřiženy modifikované báze či nukleotidy [15, 16].

### 3.3 Mitochondriální dysfunkce

Každá buňka lidského těla obsahuje ve své cytoplasmě mitochondrie, jejichž počet závisí na charakteru tkáně a typu buňky, ve které se nachází. Funkce mitochondrií je klíčová pro všechny buněčné procesy, kterým dodává energii. Na vnitřní membráně mitochondrií dochází během procesu zvaného oxidativní fosforylace k produkci energie přeměnou adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP). Jak z názvu procesu vyplývá, mitochondrie zde využívají kyslík pro přenos elektronů, které generují energii ukládající se v ATP. Pokud jsou elektrony navázány na kyslík v sudých číslech, jsou pro mitochondrie neškodné. Nicméně může dojít i ke stavu, kdy se na kyslík naváže pouze jeden elektron a tím dojde k tvorbě superoxidových sloučenin (ROS), které jsou schopny mitochondrie poškodit. Působením volných radikálů dochází k poškození mitochondriální membrány, ke vzniku mutací v mitochondriální DNA (mDNA) a s tím spojeného defektního průběhu oxidativní fosforylace. Mitochondriální dysfunkce má za následek sníženou produkci ATP, kterého je však s přibývajícím věkem potřeba stále víc a víc pro účely reparací buněčných poškození [8, 18, 21].

### 3.4 Zkracování telomer a buněčná senescence

Repetitivní nukleotidové sekvence, chránící konce chromozomů buněk před degradací a abnormální rekombinací, se nazývají telomery. Jejich syntetizace probíhá při replikaci DNA enzymem zvaným telomeráza. Tento enzym nicméně obsahují většinou jen buňky se zvýšenou frekvencí dělení (buňky zárodečné a kmenové), většina buněk v lidském těle telomerázu neobsahuje a průběh syntézy DNA tak není možný až po konce chromozomů. S každým dalším buněčným cyklem tedy dochází ke zkracování délky telomer až do chvíle, kdy jsou telomery příliš krátké pro průběh dalšího buněčného dělení. Postupné zkracování telomer lze tak označit za tzv. mitotické hodiny každé buňky, jelikož její další replikace již není možná a buňka vchází do stavu senescence [14, 18, 23].

Buněčnou senescencí se rozumí stav stárnoucí buňky, která ztratila schopnost buněčného dělení a již nedokáže reagovat na změny prostředí. Toto stárnutí buněk úzce souvisí se zkracováním telomer a s tzv. Hayflickovým limitem, jež určuje maximální počet buněčných mitóz. Po překročení tohoto limitu vystoupí buňka z buněčného cyklu a ztrácí tak schopnost proliferace. To je spojeno se změnami v buněčném metabolismu, v regulaci genové exprese a také s procesem vylučování vysokých hladin cytokinů, růstových faktorů a proteáz degradujících extracelulární matrix (ECM) [2, 14, 18].

Eliminace senescentních buněk nastává prostřednictvím imunitního systému, který ovšem také s věkem stárne a neplní tak své funkce plnohodnotně. Tímto způsobem může docházet k postupné akumulaci senescentních buněk, které mají za následek dysfunkci tkání i orgánů. Stárnoucí buňky totiž mohou vylučovat řadu látek škodlivých pro okolní buňky, mohou se shromažďovat kolem fibroblastů i jiných kožních buněk, které nedokáží plnit správně svou funkci a vlivem toho pleť stárne [14, 18].

### 3.5 Akumulace konečných produktů pokročilé glykace

Podstatou glykace je Maillardova reakce – série neenzymatických reakcí redukujících sacharidů (glukózy nebo frukózy) s proteiny, lipidy nebo nukleovými kyselinami. V kůži nastává problém při kovalentním navázání sacharidu na postranní řetězce aminoskupiny lysinu a argininu u dvou hlavních strukturních proteinů lidské kůže, kolagenu a elastinu. Vzniklý komplex sacharid–bílkovina se nazývá Schiffova báze, která je velmi nestabilní a podléhá degradaci, čímž dojde k tzv. Amadoriho přesmyku. Vlivem toho vznikají koncové produkty pokročilé glykace, v tomto případě zesíťované proteiny [35, 36, 37].

Produkty Maillardovy reakce jsou nevratné a škodlivé, jejich vlivem dochází k denaturaci proteinů a mohou být příčinou vzniku mutací v DNA nebo iniciovat vznik autoimunitních reakcí. Glykace má při tělesné teplotě poměrně pomalý průběh, a proto jsou jí postiženy zejména proteiny s dlouhým biologickým poločasem, jako je například zmíněný kolagen. Vlivem intermolekulárního zesíťování i modifikace postranních struktur proteinů není protein schopen patřičně plnit své strukturální funkce, což přispívá ke stárnutí kůže. Procesem glykace jsou modifikovány biomechanické vlastnosti tkáňových proteinů, negativně je ovlivňována schopnost kolagenu interagovat s okolními buňkami i matricovými bílkovinami. Elastická vlákna ztrácí svou pružnost a kolagen není dostatečně pevný a odolný, kůže se tak stává tuhou, ochablou a křehkou [2, 30, 36].

## 4 ZMĚNY STÁRNOUCÍ KŮŽE

Stárnutí lidské kůže se odráží na stavu jejích kompartmentů, plnění životně důležitých funkcí i na jejím vzhledu. Změny odehrávající se v kůži v průběhu procesu stárnutí jsou popsány v kapitolách 4.1–4.3.

### 4.1 Fyziologické změny

Fyziologické změny probíhající v pokožce zahrnují zejména změny biochemické, změny v propustnosti kůže pro cizorodé látky, změny týkající se její regenerační schopnosti a zvýšené náchylnosti ke kožním onemocněním. V Tab. 1 je uveden stručný přehled fyziologických následků stárnutí. Vybrané z nich jsou podrobněji popsány v následujícím textu [18].

Tabulka 1 Fyziologické změny kůže [18]

<b>Funkce kůže</b>	<b>Změny</b>
Bariérová	Doba obnovy SC navýšena cca o 50 %
	Pokles TEWL
	Změna pH povrchu kůže
Smyslová	Pokles citlivosti kůže
Reakce na poranění	Zvýšená citlivost k mechanickým poraněním kůže
	Zpomalen proces hojení ran
Termoregulační	Pokles produkce potu
Imunitní	Opožděná reakce na cizorodé látky
Regulační	Snížená tvorba mazu
	Snížená vaskularizace
	Snížená chemická clearance
Ostatní	Snížená produkce vitamínu D
	Pokles elasticity a pevnosti kůže

- Obsah vitamínu D

Obsah vitamínu D, který je rozpustný v tucích, s věkem v lidském těle klesá. V těle udržuje potřebné hladiny vápníku, čímž je zajištěn správný vývoj a stav kostí, zubů a svalů a ochraňuje buňky před nepříznivými vlivy UV záření. Jeho syntéza probíhá v epidermální vrstvě za katalýzy UVB záření, které přeměňuje prekurzor 7-dehydrocholesterol na vitamín D<sub>3</sub>. Jeho produkce je ve stáří zpomalena z důvodu nedostatečného množství prekurzoru v *epidermis* a *dermis*. Snížený obsah vitamínu D může vést k osteoporóze či osteomalácii a zvýšenému riziku karcinomu kůže [16, 18].

- pH

Povrchové pH průměrného jedince se pohybuje v okolí mírně kyselých hodnot. Na různých částech těla se může mírně lišit. Jeho hodnota přímo nebo nepřímo ovlivňuje řadu funkcí a procesů odehrávajících se v kůži. Má vliv např. na fungování ochranné bariéry kůže po kontaktu s alergeny či iritanty, na lipidové složení *SC* a jeho hydrataci a také na kožní mikrobiom. Poskytuje optimální prostředí pro řadu enzymů a mikroorganismů, které chrání pokožku před patogeny. V okamžiku kontaktu povrchu kůže s cizorodými látkami, odlišného pH než je její přirozená hodnota, dojde k dočasné změně jejího pH. Díky podstatné pufrční kapacitě se však pokožka umí s touto změnou vypořádat a vyrovnat tak své pH na původní hodnotu [14, 18].

Hodnota pH novorozenců je neutrální až zásaditá a přibližně po 6 měsících života nabývá běžných mírně kyselých hodnot. Toto pH zůstává zpravidla konstantní až do 70. roku života člověka a poté dochází k jeho navýšení. Zvýšené pH je zřejmě způsobeno vlivem stárnutí narušením pufrční kapacity a účinnosti mechanismů regulace pH kůže. Vzestup pH má za následek narušení bariérové funkce a s tím spojenou zhoršenou odolnost před endogenními i exogenními vlivy. Stárnoucí pokožka vykazuje zvýšenou propustnost pro cizorodé látky a je tedy mnohem více náchylná k infekcím, alergiím a podráždění než kůže mladších jedinců [14, 18].

- Neurosenzorické vnímání

V důsledku dezorganizace a degenerace (doprovázené ztrátou funkčnosti) Vaterova-Paciniho a Meissnerových tělísek dochází s přibývajícím věkem k poklesu hmatového a tlakového vnímání. Snížení schopnosti neurosenzorického vnímání je podpořeno také poklesem hustoty nervových zakončení v *dermis*. Narušení smyslové funkce, objevující se po 50. roku života, vede k zvýšenému riziku poranění, jelikož se

varovné signály kůže projevující se bolestí, erytémem či edémem nedostavují dostatečně rychle [38, 39].

- Transepidermální ztráta vody a bariérová funkce

Transepidermální ztráta vody je definována jako pasivně odpařené množství vody prošlé přes kůži do vnějšího prostředí. Měření této veličiny je často používaným indikátorem stavu kožní bariéry. Pokud se hodnoty TEWL pokožky vychylují od normálních hladin, je narušena její schopnost zadržovat vlhkost. Pro zestárlou kůži jsou charakteristické výrazně nižší hodnoty TEWL než u mladší generace. Příčinou je pravděpodobně snížená funkční kapacita SC vázat vlhkost, a tudíž je v kůži k dispozici menší množství vody pro difúzi do vnějšího okolí [16, 38].

- Penetrace látek

Kromě fyzikálně-chemických vlastností absorbované látky záleží její penetrace také na povaze jejího charakteru. Hydrofobní sloučeniny pronikají do kůže lépe na místech s vysokým obsahem hydrofobních lipidů. Hydrofilní látky pronikají snadněji např. na chodidlech, kde se obsah lipidů pohybuje okolo 1–2 % a naopak na obličeji, kde se nachází cca 12–15 % lipidů, je jejich průnik obtížnější [39].

Změny ve fluiditě i lipofilitě membrány vedou k rozdílu penetrace různých kosmetických i farmaceutických lokálně aplikovaných aktivních látek. Vzhledem k tomu, že stárnoucí pleť vykazuje pokles lipofility, je snížena rychlost i rozsah penetrace vysoce lipofilních hydrofobních látek. V důsledku nízkého obsahu lipidových struktur je naopak podpořen průnik polárních a hydrofilních látek [40].

- Hojení ran

Řada morfologických i funkčních změn odehrávajících se v kůži v procesu stárnutí má negativní dopad na proces hojení. Poklesem nervových zakončení a zvýšenou křehkostí v důsledku atrofie se kůže navíc stává náchylnější k riziku poranění. Proces hojení ran je souhrnem koordinovaně probíhajících reakcí na vzniklé poranění. U mladé a zdravé kůže dochází k obnově kožní bariéry zráním korneocytů, ke kontrakcím rány zprostředkovanými fibroblasty a remodelací ECM vedoucí k tvorbě jizev. Nicméně vlivem degradačních procesů odehrávajících se v kůži starších osob, jako je např. zpomalená buněčná proliferace, zhoršená regenerační schopnost či reepitelizace SC, má za následek až dvakrát déle probíhající proces hojení ran oproti mladým jedincům [39, 41, 42].

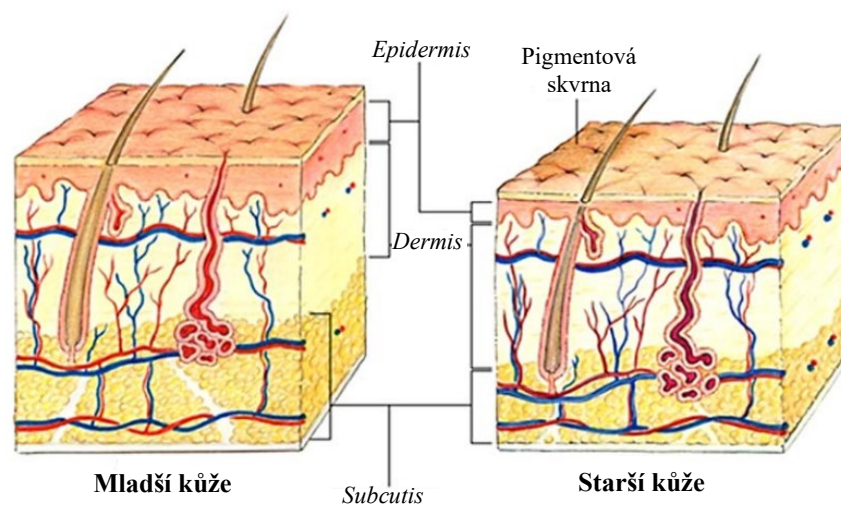


- Výskyt kožních onemocnění

Kumulativním působením anatomických, fyziologických i environmentálních faktorů v průběhu let se starší kůže stává náchylnější ke kožním infekcím i onemocněním. Ztenčení pokožky, pomalejší rychlost obměny buněk i opožděný nástup neurosenzorických signálů kůže zvyšuje riziko poranění, a tak i vstupu infekce. U starších osob se velmi často objevuje suchost, svědění, depigmentace, plísňové infekce, různé typy dermatóz a benigní i zhoubné nádory. Většina kožních změn je zapříčiněná genetickými predispozicemi, změnami imunitního systému, chronickým působením vnějších faktorů (zejména vliv UV záření) a koexistencí dalších onemocnění. V případě vzniku nádorů, zvláště karcinomu a melanomu, se obecně uvádí, že prevalence roste každých 9 let věku až dvojnásobně [43, 44].

## 4.2 Strukturní změny

I přesto že je kůže velmi odolným orgánem lidského těla, ji i její části ovlivňuje stárnutí. Lidská kůže je složena ze 3 hlavních částí: *epidermis*, *dermis* a *subcutis*. V každé této vrstvě se vlivem stárnutí odehrávají specifické změny v závislosti na látkách, ze kterých sestávají. Jejich stručný přehled je uveden v Tab. 2. Jediným společným znakem stárnutí, který postihuje všechny vrstvy současně, je zploštění kůže (viz Obr. 1). I když počet vrstev kůže zůstává zachován, k atrofii kůže dochází již od 20. roku života a její rychlost roste s přibývajícím věkem. Příčin změn ve struktuře lidské kůže je mnoho, detailněji je o nich pojednáváno v textu níže [18].



Obrázek 1 Strukturní změny mladší a starší kůže, upraveno dle [18]

Tabulka 2 Strukturní změny kůže [18, 24].

Vrstva kůže	Projevy
<i>Epidermis</i>	Zploštění dermálně-epidermálního spojení
	Pokles počtu enzymaticky aktivních melanocytů
	Pokles počtu Langerhansových buněk
	Pokles hydratace
<i>Dermis</i>	Atrofie
	Pokles vaskularity
	Pokles syntézy kolagenu a elastinu
	Degradace kolagenu a elastinu
<i>Subcutis</i>	Snížen obsah podkožního tuku
	Změny distribuce podkožního tuku

#### 4.2.1 *Epidermis*

*Epidermis*, tvořící svrchní vrstvu kůže, je avaskulární a sestává především z keratinocytů, melanocytů, Langerhansových a Merkelových buněk. Hlavními funkcemi *epidermis* je ochrana pokožky před vnějšími vlivy a udržení optimální hydratace vnitřní tkáně. Obě funkce plní zejména nejvrchnější část této vrstvy – *SC* [27].

Keratinocyty jsou tvořeny v bazální membráně (vrstva na rozhraní *epidermis* a *dermis*) a během jejich zrání stoupají napříč *epidermis* až do *SC*. V průběhu jejich pohybu produkují některé látky jako např. keratin a mnoho různých lipidů. Dochází také ke změně jejich tvaru, zplošťují se a diferencují se na tzv. korneocyty, které pokrývají celý povrch *SC*. Struktura této vrstvy je zjednodušeně popisována na modelu cihel a malty – korneocyty bohaté na proteiny (cihly) zabudované do matrice složené z lipidů, ceramidů, cholesterolu a mastných kyselin (malta) [18, 27].

S přibývajícím věkem dochází ke změnám v každém typu epidermálních buněk, jejich tvar a funkce se modifikují a počet většinou klesá. Buňky bazální vrstvy již nejsou dostatečně uniformní, keratinocyty mění svůj tvar (stávají se kratšími a tlustšími) a korneocyty zvětšují svou velikost z důvodu nízkého epidermálního obratu. V důsledku sníženého počtu enzymaticky aktivních pigmentových buněk (melanocytů), dochází na pleť k nerovnoměrně

pigmentaci (výskyt stařeckých skvrn). Pokles počtu je u stárnoucí kůže zaznamenán i u Langerhansových buněk. Jejich vzhled i funkce navíc vykazují heterogenitu, což má za následek narušení správné funkce imunitního systému kůže [18].

- Snížený obsah vody

Obsah vody ve *SC* se s věkem snižuje. Změny ve složení aminokyselin spojené se stárnutím vedou ke snížení přirozeného hydratačního faktoru (NMF) a tím klesá schopnost vazby vody. V některých případech může dojít k poklesu vody až pod kritickou úroveň nutnou pro přirozenou deskvamaci, proces, během kterého dochází k odloučení odumřelých kožních buněk. V takovém případě dojde k hromadění odumřelých korneocytů, které následně přilnou k povrchu kůže. V důsledku toho dojde ke zdrsnění a odlupování kůže spojené s tvorbou šupinek [18].

- Pokles bariérové funkce

Integrita bariérové funkce *SC* je bezpodmínečně závislá na uspořádání epidermálních lipidů, které ji tvoří. I jejich počet s věkem klesá, a to o více než 30 % ve srovnání se *SC* mladé kůže. Stárnoucí kůže tudíž postrádá dostatečné množství ceramidů, triglyceridů, mastných kyselin a dalších látek lipidové povahy důležitých pro správnou bariérovou funkci kůže. S věkem navíc dochází i ke snížení proliferace epidermálních buněk a buněčný obrat je tak redukován, což jen přispívá k poklesu bariérové funkce. V důsledku toho se stává kůže více propustná pro cizorodé látky, je zranitelnější a náchylnější k rozvoji atopických a kontaktních dermatitid [15, 18, 45].

- Snížený obsah melanocytů

V důsledku chronologického stárnutí se snižuje i počet funkčních pigmentových buněk (melanocytů) až o 20 % za dekádu. Melanin je tak produkován v menší míře a starší pleť získává bledý vzhled. Z tohoto důvodu navíc nejsou starší jedinci dostatečně chráněni před vlivy slunečního záření a stávají se náchylnějšími ke vzniku karcinomu kůže [16].

K nižšímu poklesu melanocytů dochází u částí běžně vystavených slunečnímu záření, které stimuluje jejich aktivitu. Vlivem stárnutí se však v průběhu melanogeneze odehrává řada modifikací, které vedou ke zvýšené syntéze a ukládání melaninu. Tímto způsobem může docházet ke vzniku pigmentových (stařeckých) skvrn [46].

- Zploštění spojení *epidermis* – *dermis* (DEJ)

Místo, kde dochází ke kontaktu mezi vrstvou *epidermis* a *dermis* je nazýváno dermálně-epidermální junkční zóna. Starší kůže vykazuje její zploštění v důsledku poklesu dermálních papil, které spolu se zárodečnou matrix tvoří kořínek vlasu. Snížení počtu papil na jednotku plochy je poměrně markantní – u mladších osob se v průměru uvádí 40 papil/mm<sup>2</sup>, u starších jejich počet klesá až na 14 papil/mm<sup>2</sup>. Pokles dermálně-epidermálního spojení tak může nastat až o 35 %. Vlivem toho je snížena interakce mezi těmito dvěma vrstvami, vzájemná výměna živin a kyslíku je nedostatečná, kůže je výrazně křehčí a její regenerační schopnost je zpomalena [18, 27, 35].

#### 4.2.2 *Dermis*

Škára, též *dermis*, je nejtlustší vrstvou kůže a leží mezi *epidermis* a *subcutis*. *Dermis* sestává zejména z pojivové tkáně (kolagen a elastin), mazových a potních žláz, vlasových folikulů a husté sítě kapilár a nervů. Dále obsahuje vazivové buňky zvané fibroblasty, které do okolí produkují ECM a různé typy vláken [4, 16, 35].

Prostor mezi kolagenními a elastinovými vlákny je vyplněn různými typy glykoproteinů a glykosaminoglykanů (GAG), které tvoří významnou část ECM. GAGy jsou v *dermis* zásadní, jelikož poskytují vhodné prostředí pro vývoj dermálních buněk, strukturální podporu *dermis*, velmi snadno na sebe vážou vodu, a proto zajišťují optimální obsah vody v kůži [4].

*Dermis* slouží jako opora pro vrstvu *epidermis*, kterou navíc prostřednictvím krve zásobuje živinami a kyslíkem. Cévy jsou spolu s potními žlázami obzvláště důležité v procesu termoregulace. Za přenos smyslových signálů (dotyk, teplota, tlak, bolest) jsou zodpovědná nervová zakončení, za pružnost a odolnost kůže elastin a za pevnost vlákna kolagenu [16].

Stáří má však dopad i na dermální vrstvu kůže, její tloušťka se zmenšuje až o 20 % a její části prochází řadou změn. Kolagen a elastin degradují, jelikož jsou zvláště citlivé na působení MMP produkovanými keratinocyty i fibroblasty na základě podnětů jako je např. oxidační stres a působení slunečního záření. Vlivem sníženého počtu dermálních fibroblastů je snížena syntéza kolagenní i elastických vláken, činnost mazových žláz značně klesá a dermální vrstva je mnohem méně prokrvena než u mladší pleti. To vše má negativní vliv na pleť, která ztrácí pevnost, elasticitu i hydrataci [18, 35, 47].

- Snížení vaskularity

Stárnutí pokožky je velmi často doprovázeno i sníženým prokrvením, ke kterému může dojít až o 35 % v porovnání s mladou kůží. Negativní vliv má na krevní cévy zejména UV záření, z čehož vyplývá, že pokles perfuze je zaznamenán nejvíce u fotoxponovaných oblastí těla. Snížení vaskularity má za následky poruchy termoregulace, nedostatečnou výměnu živin mezi jednotlivými vrstvami a kůže získává bledý vzhled [27, 35].

- Degradace a pokles syntézy kolagenu

Kolagen, hlavní složka ECM a nejhojnější protein vyskytující se v lidském těle, je hlavní kontrakční částí *dermis*. Je jednou z nejsilnějších přírodních bílkovin a jeho vlákna poskytují vrstvě sílu, pevnost a oporu. Každá molekula kolagenu je složena ze 3 polypeptidových řetězců spojených vodíkovými vazbami ve strukturu trojitě šroubovice. Kolagen může být buďto fibrilární (typ I, II, III, V) anebo nefibrilární (typ IV, VI, VII, VIII a XIV), který tvoří klasické fibrily. Nejčastějšími typy v organismu je kolagen typu I, III, IV a VII [27, 47, 48].

Z důvodu expozice UV záření, zejména prostřednictvím ROS, je zvýšena činnost enzymů degradujících kolagen (např. proteolytické metaloproteinázy). Syntéza kolagenu klesá, jelikož klesá i počet fibroblastů v kůži a rovnováha mezi produkcí a degradací kolagenu je narušena. Kolagen obsažený v mladé kůži tvoří vysoce organizované vláknité svazky, ve stárnoucí kůži se však vlivem degenerace jeho struktura mění. Kolagenová vlákna jsou neorganizovaná, zvyšují svou hustotu, jsou méně rozpustná, a také dochází k jejich fragmentaci. Dalším vysvětlením degradace kolagenu je jeho náchylnost ke glykaci, která byla detailněji popsána v kapitole 3.5 [18, 27, 35].

Narušeno je i relativní zastoupení typů kolagenu v kůži. V mladé *dermis* tvoří kolagen typu I 90 % všech typů kolagenu a poměr mezi ním a kolagenem typu III je uváděn 6:1. Vlivem fotopoškození se však kolagen typu I z kůže selektivně vytrácí a obsah kolagenu III je naopak s věkem zvýšen. Zastoupení kolagenů typu IV a VII se mění také. V kůži jsou důležité zejména hladiny kolagenu typu IV, který je nenahraditelně obsažen v dermálně-epidermální junkční zóně. Snížením jeho obsahu není toto spojení dostatečně stabilní a s věkem se zplošťuje. Množství přítomného kolagenu v kůži

klesá v průměru o 2 % za rok, průběžně se tak snižuje integrita a viskoelasticita *dermis*, což je příčinou ochablé kůže se sklonem k vráskění [18, 27, 35, 47].

- Degradace a pokles syntézy elastinu

Životně důležitý protein elastin se v ECM vyskytuje ve formě vláken a je zodpovědný především za elasticitu lidské kůže. Vyvinutý elastin je nerozpustná makromolekula složená z několika molekul tropoelastinu kovalentně vázaných pomocí příčných vazeb. Jeho vlastnosti zajišťují návrat kůže do její původní konfigurace po deformaci či natažení [18, 47].

Elastin je v kůži přirozeně odbouráván enzymem zvaným elastáza. Chronologické stárnutí a opakovaná fotoexpozice přispívá ke zvýšené aktivitě tohoto enzymu, a elastin je tak degradován ve větší míře. Navíc elastin, stejně jako kolagen, podléhá degenerativním změnám působením MMP. V důsledku fotostárnutí se především v horní části *dermis* ukládá a hromadí amorfni elastinový materiál, což vede ke vzniku tzv. solární (též zvané aktinické) elastózy. Hlavními znaky této poruchy je nažloutlá a ztlustělá kůže s výskytem hrubých vrásek. Jelikož je i elastin klíčový pro integritu kůže a je zodpovědný za její elasticitu, vede jeho degradace a pokles jeho syntézy k povislé kůži a vzniku vrásek [18, 47].

- Pokles obsahu GAGů

Glykosaminoglykany, též nazývané mukopolysacharidy, jsou složeny z dlouhých lineárních polysacharidových řetězců obsahujících opakující se specifické disacharidové jednotky. V lidském organismu se vyskytuje 6 druhů GAGů, mezi které patří kyselina hyaluronová (HA), chondroitin sulfát, dermatan sulfát, keratan sulfát, heparan sulfát a heparin [49, 50].

V lidské kůži jsou tyto látky důležité zejména proto, že tvoří podstatnou část ECM a jsou oporou pro strukturální proteiny. Jejich řetězce obsahují záporně nabitě karboxylové a sulfátové skupiny, a proto do své struktury velice snadno vážou vodu. Uvádí se, že jsou schopny pojmout molekuly vody až do tisícinásobku své hmotnosti, a tudíž jsou klíčovými složkami pro udržování dostatečného množství vody ve tkáni [35, 49].

Kyselina hyaluronová sestává z disacharidových jednotek tvořených N-acetylglukosaminem a kyselinou D-glukoronovou a je jednou z nejhojněji se vyskytujících složek v ECM. Je produkována dermálními fibroblasty, a naopak

degradována enzymem zvaným hyaluronidáza. Mimo to, že je, stejně jako ostatní GAGy, nepostradatelnou složkou v zajištění hydratace pleti, plní ještě další důležitou roli. V kůži tvoří proteoglykanové agregáty (komplexy HA s proteoglykany), jejichž zesíťováním s jinými matricovými proteiny (např. kolagenová síť) vznikají supermolekulární struktury, které zvyšují tuhost tkáně [49, 50, 51].

Ve stárnoucí pleti je detekován pokles obsahu GAGů vlivem chronologického (snížené hladiny estrogenu) i vnějšího typu stárnutí. Negativně na jejich strukturu působí ROS produkované působením UV záření, znečištěním ovzduší a kouřením cigaret. Vlivem degradace dermální tkáně a poklesu počtu fibroblastů klesá produkce kyseliny hyaluronové, i ostatní typy GAGů. Navíc může docházet i k jejich fragmentaci, obsah vody je rapidně snížen a kůže jeví známky suchosti, je tenká, volnější, což přispívá ke vzniku vrásek [18, 49, 50].

- Pokles činnosti mazových žláz

U mladé a zdravé pokožky plní maz funkci bariéry tím, že tvoří malou lipidovou vrstvu na povrchu kůže, která zabraňuje odpařování vody. V důsledku stárnutí však dochází ke snížení činnosti mazových žláz (u žen zejména v období menopauzy a v pozdějším věku i u mužského pohlaví) a pokožka již není dostatečně hydratovaná. V průběhu let se kůže postupně vysušuje, může se projevovat zarudnutí, svědění, a dokonce i vznik xerózy [6, 16].

#### 4.2.3 *Subcutis*

Poslední vrstva, zvaná též jako podkožní tukové vazivo nebo podkoží je tvořena tukovou a pojivovou tkání, obsahuje větší krevní cévy a také nervy. Vrstva představuje 14–20 % tělesné hmotnosti u žen s normální hmotností a 9–18 % u mužů. Její tloušťka se liší v závislosti na obsahu tuku jedince a také na lokaci v těle. V oblastech, kde je lidská kůže obzvláště tenká (oční víčka, prsní bradavky, holeně a okolí genitálií), není *subcutis* přítomna vůbec [4, 35].

Podkožní vazivo je neméně důležitou vrstvou, jelikož v kůži plní několik důležitých rolí. Má funkci tlumící vrstvy, která chrání svaly, kosti a životně důležité orgány těla před mechanickým poškozením. Plní termoregulační funkci a jsou v ní uloženy nutričně důležité látky, takže je i zásobárnou energie. Navíc se v ní nacházejí mezenchymální kmenové buňky, které jsou nepostradatelné v procesu hojení ran [6, 25].

Vlivem stárnutí organismu dochází k poklesu a reorganizaci obsahu podkožního tuku. V obličejí, na ruce a nohy jeho obsah klesá, zatímco v oblastech stehen a pasu je detekován jeho nárůst. Postupná dysfunkce tkání lidského těla a s tím spojený i pokles schopnosti buněk bránit se před oxidačním stresem má negativní dopad na funkci kmenových buněk *subcutis*. I to je jednou z příčin zpomaleného průběhu hojení ran u starších jedinců [18, 25].

### 4.3 Vizuální změny

Stárnutí pleti se neodráží jen na jejích strukturních či fyziologických změnách, ale také na jejím vnějším vzhledu. Charakteristickými rysy je např. povislá kůže, tvorba vrásek, vznik pigmentových skvrn a nepravidelností na povrchu kůže.

- Povislá kůže

Kombinace špatného stavu podpůrných svalů kůže, její snížené tloušťky, degradace a snížená produkce elastinu a kolagenu vede k ochabnutí kůže. Vlivem gravitační síly se navíc ochablá kůže protahuje směrem dolů a začíná se jevit povisle, což je jedním z hlavních rysů stárnoucí pleti. Tato povislá kůže se začíná výrazněji projevovat v okolí 40. roku života, a to zejména na bradě, očních víčkách a tvářích [6, 15].

- Vrásky

Ztrátou napětí, pružnosti, sníženou hydratací *SC*, atrofii kůže, degradací strukturních proteinů a dalšími již zmiňovanými změnami kůže vznikají vrásky. Začínají se objevovat přibližně od 30. roku věku a průběžně jejich počet, hloubka i velikost narůstá. Mohou mít podobu jemných linií (např. vějířovité vrásky v oblasti vnějších koutků očí), či výrazných hlubokých rýh pozorovatelných např. na čele a mezi očima. Příčin jejich vzniku je mnoho, nicméně výskyt a podoba vrásek je v podstatě u každého člověka jedinečná, jelikož úzce souvisí s genetickými predispozicemi a individuálními mimickými návyky [15].

- Pigmentace pleti

Stará kůže obecně ztrácí svou načervenalou mladistvou barvu a její odstín je bledý a spíše nažloutlý. To je způsobeno nižší úrovní prokrvení jejích vrstev a také sníženým obsahem aktivních melanocytů. I přesto mohou být na fotoexponovaných oblastech těla některé pigmentové buňky hyperaktivní a díky UV záření jsou tak schopny zvýšené produkce melaninu. Akumulace a zvýšená koncentrace těchto hyperaktivních melanocytů vede ke vzniku tzv. solárního lentiga (viz Obr. 2), neboli stařeckých



(jaterních) skvrn. Stařecké skvrny jsou drobné tmavě hnědé skvrnky, které se mohou shlukovat do větších útvarů. Vyskytují se u všech druhů pleti, a to zejména na obličeji, hřbetu rukou, ramenech a zádech [15, 38, 52].



Obrázek 2 Pigmentové skvrny [6]

- Nepravidelnosti reliéfu pleti

Na reliéfu kůže se s přibývajícím věkem odráží spousta faktorů jako je např. klimatické prostředí, psychický stav jedince či účinek kosmetických přípravků. Následky působení těchto vlivů se mohou projevit vznikem zdrsňelých nepravidelných rýh a vyvýšenin na povrchu pleti. Stárnutím dochází i k rozšiřování pórů, což je považováno za další charakteristický znak [6, 14].

## 5 AKTIVNÍ LÁTKY S ANTI-AGING ÚČINKEM

Na trhu je v současnosti nepřeberné množství ingrediencí s protistárnoucím účinkem. Ač je mechanismus jejich účinku mnohdy odlišný, většinou je cílen na potlačení projevů (či prevenci) známek stárnutí vlivem antioxidačního, protizánětlivého, fotoprotektivního, hydratačního působení či schopnosti ovlivňovat fyziologické pochody kůže. Mechanismy působení, účinky i obecné informace o vybraných zástupcích anti-aging aktivních látek odpovídajících zadání diplomové práce jsou podrobněji popsány v kapitolách 5.1–5.9.

### 5.1 Antioxidanty

V kůži se přirozeně vyskytují antioxidační enzymy (kataláza, glutathionperoxidáza, superoxiddismutáza) a také neenzymatické endogenní molekuly s antioxidačními vlastnostmi ( $\alpha$ -tokoferol, kyselina askorbová, ubichinon, glutathion), které interagují na různých úrovních oxidačních pochodů za účelem zachycení a následného odstranění škodlivých ROS. Za normálních podmínek existuje mezi volnými radikály a antioxidační kapacitou buněk rovnovážný stav. Pokud je však kůže vystavena oxidačnímu stresu (zvýšenému počtu nekontrolovatelných ROS), je narušen obranný mechanismus kůže a její přirozená antioxidační ochrana není dostačující [37, 53].

Přirozeně se vyskytujícím antioxidantům v kůži mohou v boji proti oxidativnímu poškození pomoci topicky aplikované antioxidanty jako součást kosmetických produktů. Většinou jsou takto využívány minerály, vitamíny a další látky přírodního původu (karotenoidy, flavonoidy, fenoly). Antioxidanty rozpustné v tucích, mezi které patří např. vitamín E, lykopen, kurkumin a koenzym Q10, aktivně působí v lipofilní části buněčných membrán. Naopak antioxidanty rozpustné ve vodě, jako je vitamín C, resveratrol, extrakt ze zeleného čaje, silymarinu a kávovníku, jsou aktivní v hydrofilních buněčných částech. S oblibou jsou zařazovány do kosmetických formulací také kvůli jejich fotoprotektivním, protizánětlivým a depigmentačním vlastnostem a schopnosti potlačovat vznik erytému a edému. Při jejich výběru hrají zásadní roli následující aspekty: stabilita (zejména vůči světlu, kyslíku), biologická dostupnost (vhodná forma pro optimální vstřebávání), efektivní koncentrace a synergické působení s dalšími antioxidanty [37, 38, 54].

- Vitamín E

Vitamín E bývá v kosmetice přítomen nejčastěji v podobě esterů  $\alpha$ -tokoferolu (který je sám nestabilní) – tokoferyl acetátu, tokoferyl linoleátu nebo tokoferyl palmitátu.

Je jedním z nedůležitějších antioxidantů, jelikož chrání buněčné membrány eliminací lipidových peroxylových radikálů. Vykazuje synergický efekt v kombinaci s vitamínem C, ubichinolem a glutathionem, jež dokážou účinně regenerovat jeho radikálovou strukturu. Tokoferol má na kůži řadu blahodárných účinků. Poskytuje prevenci akutního i chronického poškození v důsledku působení UVB záření, podporuje hojení ran, má protizánětlivé účinky a pokožku zjemňuje a hydratuje [55, 56, 57].

- Vitamín C

Vitamín C je rutinně používaným antioxidantem, který můžeme v kosmetických přípravcích nalézt ve formě kyseliny askorbové, askorbylfosfátu (a jeho hořečnatých a sodných solí) nebo askorbátových derivátů (askorbylpalmitát, askorbylglukosid). Nejčastěji je využíván zejména kvůli jeho schopnosti redukovat hyperpigmentované skvrny na kůži (prostřednictvím antioxidantního účinku nebo inhibice tyrozinázy). Z pohledu podpory syntézy kolagenu je však podstatnější jeho funkce esenciálního kofaktoru pro lysylhydroxylázu a prolylhydroxylázu (nepostradatelných v procesu posttranslačních úprav biosyntézy kolagenu typu I a III). Ač má vitamín C značný potenciál v anti-aging kosmetice, jeho velkou nevýhodou je oxidační nestabilita. Zejména kyselina askorbová velmi ochotně podléhá oxidačním změnám v přítomnosti kyslíku. V samotném přípravku tak dochází k úbytku aktivní látky, a navíc může dojít ke (spotřebitelsky neatraktivním) změnám jeho organoleptických vlastností. Při jeho zakomponování do formulací je nutno brát v úvahu jisté stabilizační strategie – příprava v nepřítomnosti kyslíku, obal nepropustný pro kyslík, zapouzdření vitamínu C, minimalizace obsahu vody, využití nízkého pH nebo dalších antioxidantů [54, 55, 58].

- Koenzym Q10

Ubichinon, neboli koenzym Q10 se přirozeně vyskytuje ve všech částech našeho těla, zejména v orgánech s vysokou metabolickou rychlostí (srdce, játra, ledviny). V pokožce je jeho koncentrace relativně nižší a s přibývajícím věkem jeho hladiny ještě více klesají. Jeho zastoupení v topických přípravcích je pro stav kůže prospěšné jak z důvodu antioxidantní ochrany, tak i kvůli jeho pozitivnímu působení na dráhy buněčného energetického metabolismu, čímž zvyšuje odolnost i životnost buněk. Dále má také protektivní účinek před UVA indukovanou destrukcí kolagenu, posiluje

pojivovou tkáň a stimuluje syntézu kyseliny hyaluronové, kolagenu typu IV a elastinu [56, 59].

## 5.2 Retinoidy

Pojmem retinoidy se označují látky s obsahem vitamínu A (retinolem) a jeho přírodní nebo syntetické deriváty. V kosmetice jsou běžně používány retinylestery (retinylacetát, retinylpropionát, retinylpalmitát) a retinaldehyd. Všechny zmíněné formy jsou pomocí endogenních enzymatických reakcí přeměněny na kyselinu *trans*-retinovou, aktivní formu vitamínu A v kůži. Konkrétně retinylestery jsou nejprve převedeny vlivem esteráz na retinol, který je přeměňován retinoldehydrogenázou na retinaldehyd. Posledním krokem je oxidace retinaldehydu prostřednictvím enzymu retinaldehydoxidázou na kyselinu retinovou [55, 58].

Retinoidy podporují přirozené pochody v kůži – cirkulaci, exfoliaci, buněčné regeneraci. Jejich účinky mají za následek zesílení pokožky, zvyšují epidermální proliferaci a diferenciaci, eliminují hyperpigmentové skvrny, mají antioxidační účinky a redukují výskyt jemných vrásek. Také podporují syntézu kolagenu a GAGů, čímž dochází ke zvýšené schopnosti vázat vodu [58, 60].

Retinoidy mají dvě negativa. První z nich je vysoký sklon k vyvolání podráždění kůže (štípání, pálení), což má nepříznivý vliv na kožní bariéru. Zdá se, že nejmenší potenciál k podráždění vykazují retinylestery (zejména retinyl palmitát). I tak je však vhodné u formulací s jejich obsahem zvážit přidavek látek s protizánětlivým účinkem, aby byla iritace co nejvíce potlačena. Druhou negativní stránkou je jejich nestabilita vlivem působení světla a kyslíku. Při navrhování formulace i samotného obalového materiálu je dobré uvažovat nad zapouzdřením retinoidů, či použitím obalů minimalizujících kontakt s kyslíkem a světlem [54, 58].

## 5.3 Ceramidy

Ceramidy (zastoupeny z cca 47 %) spolu s volnými kyselinami a cholesterolem tvoří mezibuněčné lipidy obklopující korneocyty SC. Přirozeně se vyskytující ceramidy vznikají N-acylací sfingosinu, jehož volné hydroxylové skupiny mohou být fosforylovány (vznik sfingomyelinů) či glykosylovány (vznik cerebrosidů). V pokožce se podílejí na opravě kožní bariéry a obnově funkce lipidové bariéry přitahovat, zadržovat a redistribuovat vodu (snižují TEWL). Svými účinky brání kůži před stárnutím spíše nepřímo a preventivně. Obnovy kožní bariérové funkce lze docílit doplněním ceramidových struktur. Dříve byly k tomuto používány

přírodní ceramidy pocházející z mozku hovězího dobytka, nicméně současně jsou vyráběny spíše syntetickou cestou z důvodu nižší ceny. Dle chemické struktury se připravované ceramidy dělí do 3 skupin: přírodně identické ceramidy (složením velmi podobné přírodním), ceramidové analogy (odvozené od sfinganinu) a pseudoceramidy (složením odlišné od ceramidů). Struktura pseudoceramidů může být založena např. na bázi jednoduchých sacharidů, derivátech kyseliny jantarové nebo aduktech polyethylenoxidu. Dodávané ceramidy fungují v kůži podobně jako ty přirozeně se vyskytující. Problematická je jejich penetrace do *SC* a inkorporace do struktury bariérových lipidů. Tento problém lze vyřešit využitím ceramidů v liposomální formě [28, 61].

## 5.4 Peptidy

Peptidy jsou tvořeny aminokyselinovými sekvencemi spojenými peptidovými vazbami a jsou přirozenou součástí lidského těla. Jelikož jsou zodpovědné za buněčnou komunikaci (regulační činnost proteinů, buněčná proliferace a migrace), podílejí se na fyziologických procesech regulace růstu, vývoje a reprodukce, podporují zachování homeostázy a imunitní funkci. Pro kosmetické využití se vyrábí chemickou syntézou či biotechnologickými procesy. Díky svým bioaktivním vlastnostem a schopnosti interakce s kožními buňkami jsou vysoce účinné již při nízkých koncentracích. Synteticky připravené peptidy mohou napodobovat působení růstových faktorů a cytokinů prostřednictvím interakce s jejich receptory, stimulovat syntézu složek ECM (kolagen, elastin), podporovat hojení ran a buněčnou proliferaci. Také mohou v kůži inhibovat destrukci přirozeně se vyskytujících peptidů a stimulovat jejich syntézu *de novo*. Jejich sekvence aminokyselin mohou být navíc modifikovány i pro účely zvýšení penetrace, vazby na receptory, stability a rozpustnosti [62, 63, 64].

Topicky používané peptidy bývají klasifikovány do kategorií dle mechanismu jejich působení na: signální peptidy, nosné peptidy, peptidy jako inhibitory neurotransmiterů, peptidy jako inhibitory enzymů, peptidy vycházející ze strukturních peptidů. Příklady konkrétních zástupců jednotlivých skupin jsou uvedeny v Tab. 3 [64].

Signální peptidy sdružuje schopnost spustit kaskádu signálních dějů. Matrikiny, jak jsou též označovány, jsou uvolňovány z ECM za účelem zvýšení proliferace kolagenu, elastinu, proteoglykanu, GAGů a fibronektinu. Účinek nosných peptidů je založen na stabilizaci a transportu některých stopových prvků (měď, mangan) do buněk kůže. Tyto stopové prvky jsou nepostradatelné pro správný průběh procesu hojení ran a také syntézu některých enzymů. Jsou kofaktory např. enzymu lisyloxidázy, tyrozinázy a superoxididismutázy potřebných

pro tvorbu kolagenu, melanogenezi a dismutaci peroxidu (antioxidační účinek). Peptidy inhibující neurotransmitery obsahují ve své struktuře podobnou aminokyselinovou sekvenci jako synaptický receptorový protein SNAP-25. Jako specifické inhibitory neurosekrece, jsou schopny snížit opakovanou svalovou kontrakci a cílit na redukci mimických vrásek. Peptidy inhibující enzymy přímo nebo nepřímo snižují aktivitu enzymů, které se podílejí na procesech stárnutí pokožky. Inhibovány jsou např. proteinázy zodpovědné za rozklad bílkovin, či tyrozinázy zapříčiňující vznik pigmentových skvrn. Peptidy založené na bázi keratinu vykazují zvýšenou schopnost zadržovat vodu, hydrataci a pružnost pokožky [63, 64, 65].

Tabulka 3 Třídy peptidů a jejich konkrétní zástupci [65]

Třída peptidu	Příklad
Signální peptidy	Karnosin
	Tripeptid-10 citrulin
	Palmitoyl pentapeptid-4
Nosné peptidy	Tripeptid mědi
	Tripeptid manganu
Inhibitory neurotransmiterů	Acetylhexapeptid-3
	Pentapeptid-3
	Pentapeptid-18
Inhibitory enzymů	Sójové peptidy
	Rýžové peptidy
Peptidy odvozené ze strukturních proteinů	Peptidy na bázi keratinu

## 5.5 Hydroxykyseliny

Hydroxykyseliny jsou organické látky obsahující 2 funkční skupiny – karboxylovou a hydroxylovou. Z důvodu jejich prokázaných pozitivních účinků na pleť jsou běžně zařazovány do anti-aging kosmetických výrobků.

- $\alpha$ -hydroxykyseliny

Karboxylové kyseliny s hydroxylovou skupinou v  $\alpha$  poloze definují  $\alpha$ -hydroxykyseliny (AHA). Z důvodu jejich přítomnosti v některých ovocných plodech jsou často označovány též jako kyseliny ovocné. Řadíme mezi ně zvláště kyseliny mléčnou, glykolovou, citrónovou, jablečnou a vinnou, jež ovlivňují

epidermální i dermální část kůže. Komplexně působí několika mechanismy: zlepšují epidermální proliferaci, funkci kožní bariéry, obnovují hydrataci pleti, eliminují stařecké skvrny a stimulují syntézu kolagenu. Konkrétní vlastnosti jsou ovšem u každé z kyselin odlišné. Např. kyselina glykolová bývá z důvodu jejích exfoliačních a keratolytických vlastností často součástí procedury chemického peelingu a kůži chrání před UVB indukovaným zářením. Kyselina mléčná, přirozená součást NMF a oblíbený humektant, zvyšuje pevnost a jemnost pokožky a redukuje jemné vrásky [28, 60, 66].

- $\beta$ -hydroxykyseliny

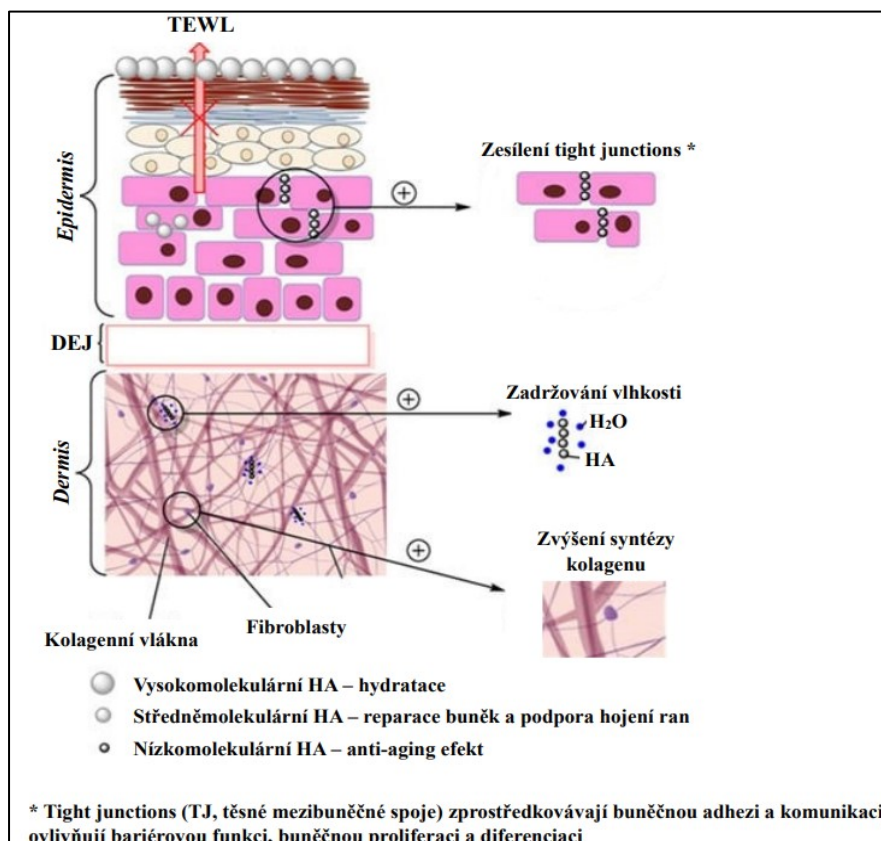
$\beta$ -hydroxykyseliny (BHA) jsou karboxylové kyseliny s navázanou hydroxylovou skupinou v poloze  $\beta$ . Na rozdíl od AHA jsou rozpustné v tucích, což jim umožňuje průnik do pokožky prostřednictvím mazových folikulů. Ač nejsou BHA v kosmetice příliš časté, jedna běžná kyselina mezi ně přece jen patří – kyselina salicylová. Jejimi exfoliačními a keratolytickými vlastnostmi urychluje proces deskvamace, čímž nepřímo zvyšuje hydrataci pokožky [28, 55].

## 5.6 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je vysoce hydrofobická látka, která má schopnost vázat vodu až v tisícinásobku své hmotnosti. Bohužel s věkem dochází k její degradaci (enzymaticky hyaluronidázou i vlivem ROS) i celkovému snížení jejího obsahu v důsledku působení vnitřního i vnějšího stárnutí. Její obsah je s věkem snižován až o 6 % za jednu dekádu, což má za následek dehydrataci ECM, ztrátu pružnosti a tvorbu vrásek [17].

V kosmetickém průmyslu jde o jednu z nejpoužívanějších ingrediencí hned z několika důvodů: je biokompatibilní s drtivou většinou složek, má viskoelastické vlastnosti a je vysoce hydrofobická a neimunogenní. Její biologická aktivita a penetrace kůží závisí na její molekulové hmotnosti. Jak Obr. 3 znázorňuje vysokomolekulární HA (>1000 kDa) působí jako okluzivum a má hydratační účinek, neboť vytváří na pokožce nepropustný viskoelastický film. Středněmolekulární HA (250–1000 kDa) podporuje buněčnou reparaci a nízkomolekulární (<250 kDa) proniká nehlouběji a vykazuje anti-aging účinek. Obecně zvyšuje úroveň hydratace, urychluje regeneraci kůže, ovlivňuje stabilitu ECM a stimuluje tvorbu kolagenu [50, 51, 67].

Bývá syntetizována prostřednictvím tzv. biofermentačního procesu. Především v minulosti byla získávána z živočišných zdrojů – kohoutí hřebínky, telecí pojivová tkáň, pupeční šňůra, synovie. V kosmetických přípravcích plní HA funkci modifikátoru viskozity a filmotvorné látky. Její okluzivní účinek může být navíc využit i pro usnadnění průniku dalších biologicky aktivních látek do *epidermis*. Díky svým unikátním schopnostem je hojně využívána v přípravcích pro poškozenou, suchou i stárnoucí pleť [50, 68].



Obrázek 3 Aktivita kyseliny hyaluronové v závislosti na její molekulové hmotnosti, upraveno dle [50]

## 5.7 Kolagen

Začlenění kolagenu do anti-aging produktů je dobrým a velmi oblíbeným řešením, jak redukovat známky stárnoucí pleti. V topických přípravcích bývá často obsažen kolagen pocházející ze skotu (mladé telecí kůže, krátké hovězí šlachy) či prasat. Kolagen pocházející z těchto zdrojů však bývá často spojován s rizikem přenosu onemocnění bovinní spongiformní encefalopatie (nemoc šílených krav), slintavky či kulhavky. Pro spotřebitele obávajících se živočišných patogenů či virových infekcí dobytka je vhodnou alternativou využití mořského kolagenu. Tento kolagen je izolovaného z rybích kůží, šupin, chrupavek, ploutví i vnitřností. V topických přípravcích je hojně zastoupen z důvodu jeho hydratačního, regeneračního



i filmotvorného účinku (snížení TEWL). Vyniká schopností vázat vlhkost, urychluje hojení ran, pokožku zjemňuje a chrání před působením UV záření [48, 69].

## 5.8 Esenciální oleje

Esenciální oleje (též silice) jsou vysoce hydrofobní látky přírodního původu získávané extrakcí, destilací nebo lisováním aromatických rostlin. Jejich vlastnosti i biologická funkce je ovlivňována: způsobem získávání, časem sklizně, aktuálními klimatickými podmínkami, druhem a částí zdrojové rostliny. Do široké škály kosmetických produktů nejsou přidávány pouze z důvodu dodání vonné fáze, ale také kvůli jejich přírodnímu původu, ekologické udržitelnosti a blahodárným účinkům. Vliv na kůži se liší druh od druhu, ale esenciální oleje mohou mít antioxidační, antimikrobiální, antivirový, fungicidní, insekticidní, protizánětlivý a analgetické účinky. Využití silic ale nemusí mít pouze pozitivní efekt. Jejich vysoká těkavost, nemísitelnost s vodou či nestabilita vlivem vlhkosti, světla, tepla, chemických či enzymatických reakcí mohou představovat nemalé komplikace. Formulaci a manipulaci přípravku s jejich obsahem, také balení a způsobu skladování by tedy měla být věnována značná pozornost. Pro citlivější jedince mohou silice také představovat potenciální zdroj alergenů, a proto je nutné pečlivě zvážit jejich koncentraci v daném produktu [70, 71].

V Tab. 4 jsou zmíněny jedny z neúčinnějších esenciálních olejů s anti-aging vlastnostmi.

Tabulka 4 Příklady esenciálních olejů s potenciálním anti-aging účinkem

INCI	Rostlina	Účinky na kůži	Zdroj
<i>Pogostemon Cablin Leaf Oil</i>	<i>Pogostemon cablin</i>	Fotoprotektivní, regenerační, antioxidační	[70]
<i>Pelargonium Graveolens Flower Oil</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	Antioxidační, fotoprotektivní, hydratační, podpora elasticity a krevního oběhu, redukce pigmentových skvrn	[70, 72]
<i>Rosmarinus Officinalis Leaf Oil</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální, fungicidní	[71]
<i>Santalum Spicatum Wood Oil</i>	<i>Santalum spicatum</i>	Antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální, hydratační	[70, 73]
<i>Calendula Officinalis Flower Oil</i>	<i>Calendula officinalis</i>	Antioxidační, fotoprotektivní	[70, 72]
<i>Lavandula Officinalis Flower Oil</i>	<i>Lavandula officinalis</i>	Antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé, hydratační	[70]

## 5.9 Rostlinné extrakty a oleje

Podstatou výroby rostlinných extraktů je extrakční proces s cílem odstranit nežádoucí složky, které by mohly způsobovat nežádoucí změny. S ohledem na rostlinný druh i další účel použití se k extrakci využívají příslušná rozpouštědla. Účinné látky z pravidla nebývají obsaženy v rostlinách ve stejném zastoupení, a proto se extrahují pouze některé jejich části: listy, plody, pupeny, kůra, kořeny, semena. Rostlinné extrakty zmírňují známky stárnutí, celulitidy, pleť zklidňují, hydratují, rozjasňují a eliminují viditelné jizvy. V přípravcích mohou být využity i funkčně v podobě konzervantů, emulgátorů, stabilizátorů a zahušťovadel. Bohužel ani extrakty nejsou příliš stabilním materiálem. Dochází u nich snadno k autooxidaci působením světla a vzduchu a také v přítomnosti přechodných kovů (železa a mědi). Dle typu rostliny i použitého rozpouštědla je také nutné stanovit vhodné pH přípravku, aby nedocházelo k nechtěným změnám. Vhodným řešením je zapouzdření extraktů do liposomů, nanočástic nebo jejich využití ve formě mikro a nanoemulzí [56, 60, 74].

Tabulka 5 uvádí příklady rostlinných extraktů s protistárnoucím účinkem na pleť.

Tabulka 5 Příklady rostlinných extraktů s anti-aging účinkem [56]

INCI	Rostlina	Účinky na kůži
<i>Centella Asiatica Extract</i>	<i>Centella asiatica</i>	Antibakteriální, anti-aging, podpora hojení ran
<i>Camellia Sinensis Extract</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Antioxidační, anti-aging
<i>Humulus Lupulus Extract</i>	<i>Humulus lupulus</i>	Podpora hojení ran a zánětů, stimulace syntézy kolagenu
<i>Gynostemma Pentaphyllum Extract</i>	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Protizánětlivé, antioxidační, regenerace pokožky
<i>Lavandula Angustifolia Extract</i>	<i>Lavandula Angustifolia</i>	Zklidňující, protizánětlivé, podpora hojení ran

Rostlinné oleje jsou získávány lisováním či extrakcí. Za pokojové teploty jsou to kapalné hydrofobní látky nerozpustné ve vodě. Svými účinky mohou podporovat homeostázu kožní bariéry a hojení ran, mohou mít antioxidační, protizánětlivé i antimikrobiální vlastnosti. Na kůži navíc působí okluzivním efektem (snížení hodnot TEWL) [75].

Jejich konkrétní vlastnosti závisí na způsobu získávání, úpravách a zejména na jejich složení. Mezi hlavní složky se řadí triacylglyceroly, parciální acylglyceroly, volné mastné kyseliny, tokoferoly, steroly, fosfolipidy a fenolové sloučeniny. Každá z těchto látek působí na kůži

trochu jinak a právě to, zda jsou či nejsou v oleji přítomny, případně v jaké míře, ovlivňuje fyziologii kůže odlišným způsobem. Důležitou roli zde hrají zejména mastné kyseliny, které spolu s glycerolem tvoří triacylglyceroly. Nejčastěji bývají v triacylglycerolech v různých poměrech zastoupeny mastné kyseliny palmitová, stearová, olejová, linolová a linolenová. Charakter mastné kyseliny se odráží na celkovém účinku oleje, jeho okluzivní i penetrační schopnosti, biologické aktivitě i stabilitě [37, 76].

Tabulka 6 poskytuje výčet některých rostlinných olejů pozitivně ovlivňujících stárnutí pokožky.

Tabulka 6 Rostlinné oleje a jejich účinky na pleť [75]

INCI	Rostlina	Účinky na kůži
<i>Cocos Nucifera Oil</i>	<i>Cocos nucifera</i>	Obnova bariérové funkce, antibakteriální, antioxidační, regenerační, protizánětlivé, fotoprotektivní, antivirové
<i>Vitis Vinifera Seed Oil</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Antibakteriální, antioxidační, regenerační
<i>Olea Europaea Fruit Oil</i>	<i>Olea europaea</i>	Antioxidační, protizánětlivé, regenerační
<i>Glycine Soja Oil</i>	<i>Glycine max</i>	Obnova bariérové funkce, antibakteriální, antioxidační
<i>Rosa Canina Fruit Oil</i>	<i>Rosa canina</i>	Antioxidační, protizánětlivé, podpora funkce kožní bariéry
<i>Argania Spinosa Kernel Oil</i>	<i>Argania spinosa</i>	Protizánětlivé, regenerační, obnova bariérové funkce, podpora elasticity
<i>Simmondsia Chinensis Seed Oil</i>	<i>Simmondsia chinensis</i>	Antioxidační, protizánětlivé, regenerační

## 6 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Snaha zachovat si mladistvý vzhled a s tím narůstající poptávka po účinné kosmetice vede přirozeně kosmetický průmysl k vzestupu. Spotřeba anti-aging kosmetických produktů je každoročně výraznější, což je z pohledu inovace a vývoje nových spotřebitelsky atraktivních přípravků velkou příležitostí pro kosmetické firmy. Kromě kvality a účinnosti produktů je však v posledních několika letech kladen velký důraz také na principy udržitelnosti. Negativní dopad kosmetického průmyslu na životní prostředí, zejména na vodní faunu a flóru, a obavy z environmentálního zatěžování planety pobízí výrobce k využívání ekologicky šetrných látek, vyrobených nejlépe z obnovitelných zdrojů. Mezi takové ingredience lze zařadit recyklovatelné sloučeniny extrahované z rostlin, živočichů, mikroorganismů, řas či kultur *in vitro* [77, 78, 79].

V boji proti stárnutí pleti se nejčastěji využívají topické anti-aging přípravky s obsahem nejrůznějších druhů biologicky aktivních látek. Jako další efektivní cestou, jak redukovat známky stárnutí se ukazují i perorálně užívaná nutraceutika. Na trhu lze nalézt doplňky stravy obsahující hydrolyzovaný kolagen, kyselinu hyaluronovou ale také glutathion, koenzym Q10 či isotretinoin. I u potravinových suplementů s anti-aging účinkem je zvyšován zájem o látky přírodního původu, a proto v jejich složení můžeme nalézt i např. přírodní polyfenoly, quercetin, resveratrol, kurkumin a další. K posouzení jejich účinnosti bohužel chybí důkazy a klinické studie, které by potvrdily jejich konkrétní vliv na pokožku [80, 81].

Další stále populární možností, díky které lze potlačit rysy stárnutí, je podstoupení invazivních či neinvazivních kosmetických ošetření. Mezi invazivní metody narušující integritu kůže patří např. dermální výplně (na bázi kyseliny hyaluronové, kolagenu, polykaprolaktonu, aj.), ošetření liftingovými nitěmi či injekce botulotoxinu. Tyto zákroky, často prováděné v estetických klinikách dermatologem, sice poskytují rychlejší a markantnější výsledky, nicméně zde existuje jisté riziko komplikací i alergických reakcí. Na druhé straně – neinvazivní metody (bezjehlová mezoterapie, mikrojehličková mezoterapie, chemický peeling) obvykle nejsou spojeny s výskytem komplikací, avšak jejich účinek se dostaví po delší době [82, 83].

Možností korekce stárnoucí pleti je v současnosti mnoho a z důvodu velkého zájmu jich bude do dalších let pravděpodobně ještě nabývat. Výběr závisí individuálně na spotřebiteli dle jeho preferencí.

## 7 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracovat literární studii věnovanou stárnutí pleti a faktorům, které tento proces ovlivňují. Pozornost byla soustředěna na příčiny předčasného stárnutí kůže na úrovni molekulárních mechanismů a na biologicky aktivní látky s anti-aging účinkem.

Záměrem praktické části bylo formulování a příprava základní krémové matrice, která byla následně modifikována přísadami vybraných aktivních látek ze skupiny peptidů a hyaluronanu sodného. Připravené modelové formulace byly vystaveny podmínkám stabilitních a mikrobiologických testů. V další fázi byly u formulací posuzovány sensoricky a instrumentálně organoleptické vlastnosti. Ověřování biofyzikálních parametrů a anti-aging efektu aktivních látek v krémové matrici bylo realizováno *in vivo* testováním pomocí neinvazivních diagnostických metod doplněných o snímání replik kožního reliéfu u souboru 25 dobrovolnic. Ve stanovených časových intervalech byla monitorována hydratace, TEWL, pH, erytém, míra elasticity, distribuce vrásek, pórů, pigmentových skvrn a kožní reliéf pomocí silikonových replik.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 METODIKA PRÁCE

### 8.1 Použité materiály, přístroje a pomůcky

Suroviny a pomůcky pro přípravu krémových formulací:

- *Aqua* (Aromedica spol. s.r.o., Česká republika, vlastní výroba)
- *Glycerin* (Comercial Química Massó S.a., Španělsko)
- *Panthenol* (Comercial Química Massó S.a., Španělsko)
- *Fructose* (Fagron a.s., Česká republika)
- *Carbomer* (Comercial Química Massó S.a., Španělsko)
- *Isopropyl Myristate* (OQEMA s.r.o., Česká republika)
- *Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate* (Evonik Industries AG, Německo)
- *Glyceryl Stearate* (ACE Trade spol. s r.o., Česká republika)
- *Cetearyl Alcohol* (ACE Trade spol. s r.o., Česká republika)
- *Rosa Canina Fruit Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Argania Spinosa Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Glycine Soja Oil* (Fabio Produkt, Česká republika)
- *Cocos Nucifera Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Methylparaben* (Fagron a.s., Česká republika)
- *Ethylparaben* (Fagron a.s., Česká republika)
- *Pelargonium Graveolens Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Santalum Album Wood Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Rosmarinus Officinalis Oil* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Tocopherol* (Joh. Vögele KG, Německo)
- *Ascorbyl Glucoside* (Comercial Química Massó S.a., Španělsko)
- *Aloe Barbadensis Gel* (Mosaico Verde, Španělsko)
- *Sodium Hyaluronate* (Contipro a.s., Česká republika)

- *Sh-Nonapeptide-4*, komerční název Clodessine (Contipro a.s., Česká republika)
- *Sh-Pentapeptide-3*, komerční název Elasef (Contipro a.s., Česká republika)
- *Pentapeptide-60-s-Methanocaldococcus Jannaschii Heptapeptide-1*, komerční název Recelline (Contipro a.s., Česká republika)
- *Sodium Hydroxide* (ACE Trade spol. s r.o., Česká republika)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, Petriho misky, magnetické míchadlo, kopist', kovové lžičky, Pasteurovy pipety)

Příprava krémových formulací:

- Laboratorní váhy PCB-D (Kern, Německo)
- Hřídlové míchadlo SBS-MR-2500 (Steinberg, Německo)
- Mixér ponorný WSB60E (Waring Commercial, USA)
- Indukční vařič PHCP 1620 (Philco, USA)
- Magnetická míchačka s ohřevem Hei-Connect (Heidolph, Německo)
- pH metr HI981032 (Hanna Instruments, Česká republika)
- Vpichový digitální teploměr 30.1054.10 (TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Německo)

Materiál a pomůcky pro orientační stanovení mikrobiologické kontaminace:

- Testovací set Hygicult TPC (Aidian Oy, Finsko)
- Sterilní vatové tyčinky (ArgoMed a.s., Česká republika)

Materiál a pomůcky pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní a *Pseudomonas aeruginosa*:

- Agarové půdy – PCA, ChYGA, PA (HiMedia Laboratories, Indie)
- Sterilní fyziologický roztok, 0,9% NaCl (Lachner s.r.o., Česká republika)
- Ethanol 96 % (VWR International s. r. o., Francie)
- Automatická pipeta (Eppendorf, Německo)
- Běžné laboratorní pomůcky a spotřební materiál (plastové Petriho misky, špičky pro automatické pipety, plastové mikrozkušavky, sterilní kalíšky, kovové lžičky)



Provedení stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní a *Pseudomonas aeruginosa*:

- Biohazard box Euroflow (Schoeller Instruments s.r.o., Česká republika)
- Analytické váhy SBC 32 (Scaltec, Německo)
- Laboratorní třepačka Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., USA)
- Spiral Plater Eddy Jet 2W (IUL SA, Španělsko) a příslušný spotřební materiál
- Inkubátor INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)

Materiál a pomůcky pro test přežívání *Pseudomonas aeruginosa*:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- Agarová půda – NA (HiMedia Laboratories, Indie)
- Sterilní fyziologický roztok, 0,9% NaCl (Lachner s.r.o., Česká republika)
- Ethanol 96 % (VWR International s. r. o., Francie)
- Automatická pipeta (Eppendorf, Německo)
- Běžné laboratorní pomůcky (plastové Petriho misky, sterilní skleněné zkumavky, kopist', špičky pro automatické pipety, plastové mikrozkušavky, sterilní kalíšky)

Provedení testu přežívání *Pseudomonas aeruginosa*:

- Biohazard box Euroflow (Schoeller Instruments s.r.o., Česká republika)
- Analytické váhy SBC 32 (Scaltec, Německo)
- Laboratorní třepačka Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., USA)
- Spiral plater Eddy Jet 2W (IUL SA, Španělsko) a příslušný spotřební materiál
- Automatické počítadlo SphereFlash (IUL SA, Španělsko)
- Inkubátor INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)

Materiál a pomůcky pro testování účinnosti *in vivo*:

- Destilovaná voda (Fakulta technologická UTB, Česká republika, vlastní výroba)
- Micelární voda (Ellie, Česká republika)
- Dvousložkový silikon (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)

- Běžné laboratorní a jiné pomůcky (laboratorní sklo, buničina)
- Další spotřební materiál pro přípravu replik (plastové kalíšky a tyčinky, transparentní krycí fólie, papírové rámečky)

Provedení testování účinnosti *in vivo*:

- Korneofix CF 20 (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Stanice MPA 10 se sondami: Korneometr® CM 825, Tewametr® TM 300, pH metr® 905, Mexametr® MX 18, Reviskometr® RVM 600 (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Visioskop® PC 35 (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Počítačový software Complete Skin Investigation (Courage & Khazaka electronic GmbH, Německo)
- Visiometr® SV 700 s vakuovou pumpou VP 45 (Courage & Khazaka, Německo)

Provedení testu tepelné stability:

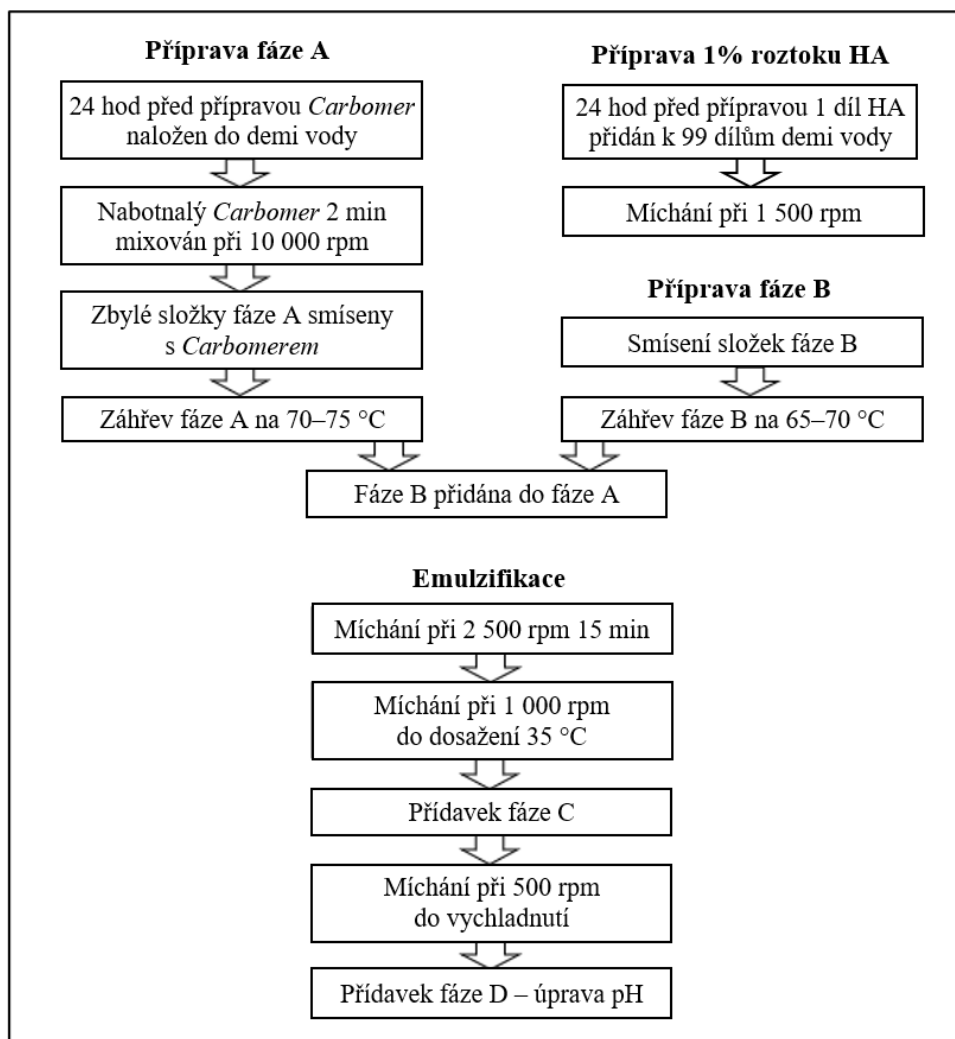
- Inkubátor INE 600 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Analyzátor textury TA1 (AMETEK Inc., USA)
- Počítačový software NEXYGENPlus 4.0 (AMETEK Inc., USA)
- Rotační viskozimetr MYR V2 (Viscotek Hispania, Španělsko)
- Vpichový pH metr PH60S-Z (Apera Instruments, USA)
- Běžné pomůcky (plastové kelímky, kovová lžička, kopist')

## 8.2 Příprava formulací anti-aging krémů

Složení krémů bylo formulováno s cílem redukovat známky stárnutí pleti. Emulzní základ krémů je tvořen vodnou fází A (sestavující z vodorozpustných složek) a olejovou fází B (s látkami lipofilní povahy). Silice, vitamíny a další aktivní látky citlivé na teplo byly zařazeny do fáze C. Poslední fáze (D) byla tvořena roztokem hydroxidu sodného pro úpravu konzistence a pH výsledných formulací. V Tab. 7 je uvedeno kompletní složení krémových formulací. Schéma přípravy formulací je znázorněno na Obr. 4.

Tabulka 7 Složení krémových formulací

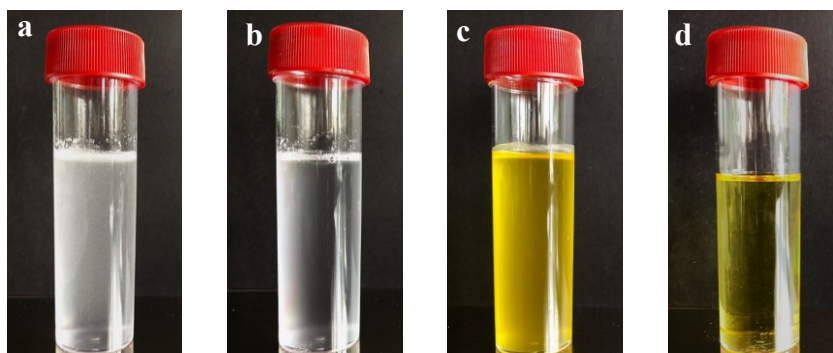
Fáze	Ingredience	[%]				
		F1	F2	F3	F4	F5
A	<i>Aqua</i>	do 100 %				
	<i>Glycerin</i>	3	3	3	3	3
	<i>Panthenol</i>	2	2	2	2	2
	<i>Fructose</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<i>Carbomer</i>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
B	<i>Isopropyl Myristate</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	<i>Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate</i>	3	3	3	3	3
	<i>Glyceryl Stearate</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<i>Cetearyl Alcohol</i>	2	2	2	2	2
	<i>Rosa Canina Fruit Oil</i>	5	5	5	5	5
	<i>Argania Spinosa Oil</i>	2	2	2	2	2
	<i>Glycine Soja Oil</i>	2	2	2	2	2
	<i>Cocos Nucifera Oil</i>	2	2	2	2	2
	<i>Methylparaben</i>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	<i>Ethylparaben</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C	<i>Pelargonium Graveolens Oil</i>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	<i>Santalum Album Oil</i>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
	<i>Rosmarinus Officinalis Oils</i>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	<i>Tocopherol</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<i>Ascorbyl Glucoside</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<i>Aloe Barbadensis Gel</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<i>Sodium Hyaluronate</i>	–	5	5	5	5
	<i>Phosphate Buffered Saline, Sh-nonapeptide-4, Phenoxyethanol</i>	–	–	1	–	–
	<i>Phosphate Buffered Saline, Sh-pentapeptide-3, Phenoxyethanol</i>	–	–	–	1	–
	<i>Phosphate Buffered Saline, Pentapeptide 60 S-Methanocaldococcus Jannaschii Heptapeptide-1, Phenoxyethanol</i>	–	–	–	–	1
D	<i>Sodium Hydroxide</i>	q. s. pro pH 5,8–6,0				



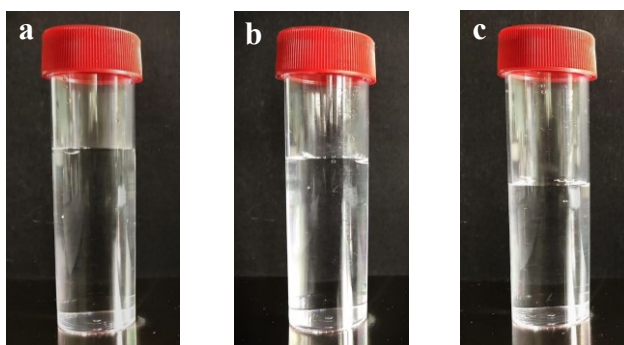
Obrázek 4 Schéma přípravy krémových formulací

Příprava 1% roztoku kyseliny hyaluronové (HA) byla započata 24 hodin před samotnou přípravou krémových formulací. Potřebné množství HA (1 díl) bylo přidáno do kádinky s příslušným objemem demineralizované vody (99 dílů), následovalo míchání při 1 500 rpm do vzniku homogenního roztoku. Den před přípravou emulzí byl také naložen *Carbomer* do 2/3 z potřebného objemu demineralizované vody. Po jeho nabotnutí byl mixován při otáčkách 10 000 rpm po dobu 2 minut a následně přidán ke zbylé části vody spolu s dalšími složkami fáze A. Celá vodná fáze byla zahřáta na teplotu 70–75 °C, připravená olejová fáze (smísením příslušného množství jejích složek) byla zahřáta na teplotu 65–70 °C. Po dosažení požadovaných teplot obou fází byla olejová fáze přidána do vodné. Emulzifikace probíhala pomocí hřídelového míchadla prvních 15 minut při 2500 rpm a poté při 1000 rpm až do dosažení teploty emulze 35 °C. Při této teplotě byly přidány složky fáze C – esenciální oleje, vitamín D, vitamín C, aloe vera gel, v případě formulací F2–F5 i 1% roztok HA.

K formulaci F3 byl přidán navíc i peptid Clodessine (dle INCI *Sh-Nonapeptide-4*), k F4 peptid Elasef (dle INCI *Sh-Pentapeptide-3*) a k formulaci F5 peptid Recelline (dle INCI *Pentapeptide-60-s-Methanocaldococcus Jannaschii Heptapeptide-1*). Následovalo míchání při 500 rpm až do úplného vychladnutí emulze na pokojovou teplotu. Nakonec bylo upraveno pH jednotlivých formulací pomocí 10% roztoku NaOH na hodnotu 5,8–6,0. Na Obr. 5 jsou zobrazeny složky emulze: a) nabotnalý *Carbomer*; b) vodná fáze; c) olejová fáze; d) směs silic. Obrázek 6 vyobrazuje použité druhy peptidů: a) Clodessine; b) Elasef; c) Racelline.

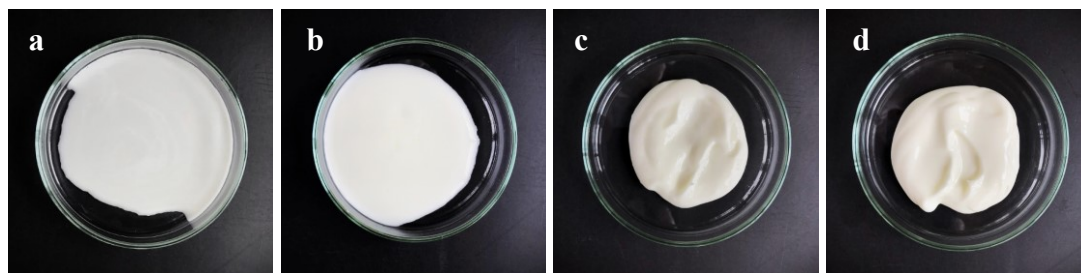


Obrázek 5 Složky krémových formulací: a) nabotnalý *Carbomer*; b) připravená vodná fáze; c) připravená olejová fáze; d) směs silic [vlastní zdroj]



Obrázek 6 Použité druhy peptidů: a) Clodessine; b) Elasef; c) Racelline [vlastní zdroj]

Změny konzistence připravované emulze jsou zaznamenány na Obr. 7: a) ihned po smísení fází A a B; b) po 15 minutách míchání; c) po vychladnutí na pokojovou teplotu; d) výsledná konzistence.



Obrázek 7 Příprava formulací a): ihned po smísení fáze A a fáze B; b): po 15 min emulzifikace; c): po dosažení pokojové teploty; d): po úpravě pH [vlastní zdroj]

Průběžně bylo připraveno necelých 2 500 g krémových formulací – pro účely mikrobiologického testování 50 g, pro stabilitní testy 1000 g, pro *in vivo* ověřování účinnosti 1250 g a 150 g pro sensorické hodnocení.

### 8.3 Mikrobiologické testování

Pro ověření mikrobiální čistoty a účinnosti konzervačního systému byly podrobeny připravené formulace řadě mikrobiologickým testům.

#### 8.3.1 Orientační stanovení mikrobiologické kontaminace

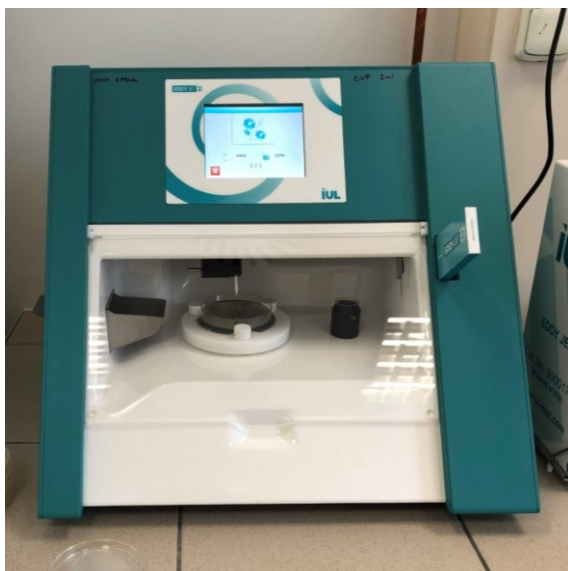
Pro prvotní ověření mikrobiální čistoty byl proveden test Hygicult s živnou půdou TPC ihned po zformulování krémů dle návodu výrobce [84]: Pomocí sterilní vatové tyčinky navlhčené destilovanou vodou bylo odebráno malé množství krému. Po povrchu živného média bylo následně otáčeno sterilní vatovou tyčinkou s naneseným krémem směrem zleva doprava a zdola nahoru, aby se přeneslo velmi malé množství krému na živnou půdu. Přenos krému na agar byl prováděn velmi obezřetně, aby nedošlo k poškození agaru. Analogicky se postupovalo u všech 5 formulací krémů. Kultivace probíhala při 23 °C po dobu 5 dní.

#### 8.3.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní

Do plastové mikrozkušavky bylo odváženo 0,1 g krému, ke kterému bylo následně napipetováno 900  $\mu$ l fyziologického roztoku. Z důvodu řádné homogenizace byl obsah mikrozkušavky 4 minuty vytřepáván na třepačce Vortex při 3 000 rpm. Vzniklá suspenze byla pomocí Spiral Plateru (viz Obr. 8) vyočkována (50  $\mu$ l) na Petriho misku s příslušným živným médiem. Každý vzorek byl nanesen na dva druhy agarů: Plate Count Agar (PCA) pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (ChYGA) pro detekci kvasinek a plísní. Kultivační podmínky pro PCA byly 48 hodin

při 30 °C. Pokud nedošlo po této době k nárůstu kolonií, inkubační doba byla prodloužena na 72 hodin. ChyGA agary byly kultivovány při 25 °C po dobu 5 dní.

Po uplynutí inkubační doby byly na agarových plotnách spočítány kolonie pomocí automatického počítadla (viz Obr. 9) a přepočítány na jednotky CFU/g.



Obrázek 8 Spiral Plater [vlastní zdroj]



Obrázek 9 Automatické počítadlo kolonií [vlastní zdroj]

### 8.3.3 Stanovení *Pseudomonas aeruginosa*

Mikrobiologické testování bylo doplněno i o stanovení bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je jednou z nejčastějších mikroorganismů kontaminujících kosmetické přípravky.

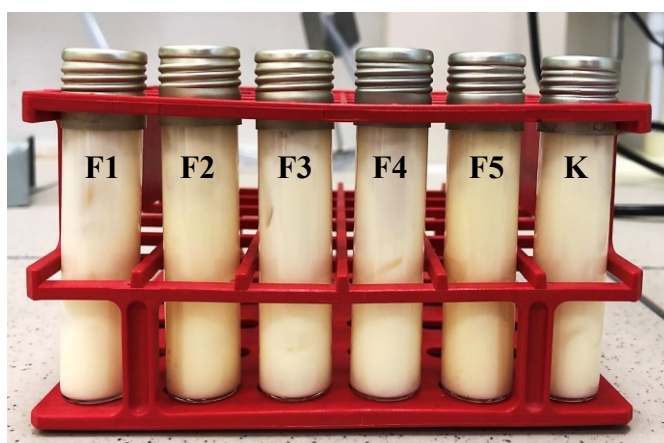
Na Petriho misky s *Pseudomonas* Agarem (PA) bylo pomocí Spiral Plateru vyočkováno 50 µl krémové suspenze připravené analogickým způsobem jako v případě stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní v kapitole 8.3.2; PA plotny byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace byly na agarových plotnách spočítány kolonie pomocí automatického počítadla a přepočítány na jednotky CFU/g.

### 8.3.4 Test přežívání *Pseudomonas aeruginosa*

Byla připravena bakteriální suspenze *Pseudomonas aeruginosa*. Inokulum o koncentraci  $3,32 \cdot 10^6$  CFU/ml bylo v množství 50 µl přidáno k 5 g krému ve skleněné zkumavce a důkladně asepticky promícháno. Analogicky se postup opakoval u všech formulací. Pro

přípravu kontrolního vzorku bylo namísto inokula použito 50  $\mu$ l sterilního fyziologického roztoku.

Z každé zkumavky, obsahující krém s bakterií *P. aeruginosa*, bylo ihned po jeho přípravě odebráno 0,1 g do plastové mikrozkušavky, do které bylo následně přidáno i 900  $\mu$ l fyziologického roztoku. Obsah mikrozkušavek byl vytřepáván na vortexové třepačce při 3 000 rpm po dobu 4 minut. Následně byl obsah mikrozkušavek přemístěn do sterilních kalíšků pomocí mikropipety. Z jednotlivých kalíšků bylo prostřednictvím Spiral Plateru nanášeno 50  $\mu$ l suspenze krémů na Petriho misky s Nutrient agar (NA). Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Zkušavky s kontaminovanými krémy (viz Obr. 10) včetně kontrolního provedení (zkumavka K) byly uchovány při pokojové teplotě pro potřeby dalšího měření, které se opakovalo analogickým způsobem po 14 dnech a 3 měsících. Po inkubaci agarových ploten bylo provedeno počítání kolonií pomocí automatického počítadla.



Obrázek 10 Zkušavky obsahující krémové formulace se zaočkovanou *P. aeruginosa* [vlastní zdroj]

#### 8.4 Testování tepelné stability

Pro stanovení tepelné stability přípravků byly 4 sady krému skladovány v různých teplotních podmínkách. Po dobu 28 dnů byly uchovány při 25, 37, 47 a 55 °C v termostatu. Ve třech časových intervalech (v čase 0, po 14 a 28 dnech) byly sledovány změny organoleptických vlastností, pH, viskozity a textury jednotlivých vzorků. V co nejkratší době od přípravy emulzí bylo vždy cca 50 g krému přemístěno do plastového transparentního kelímku označeného číslem F1–F5 dle příslušné formulace. Soubor formulací uchovávaných při vyšších teplotách v termostatu byl před každým měřením temperován na pokojovou teplotu.



#### 8.4.1 Stanovení organoleptických vlastností

Během stabilitních testů byl vizuálně hodnocen vzhled emulzí, především separace vodné a olejové fáze. Dalším posuzovaným kritériem byla změna barvy a vůně. Za každý časový interval měření byla pro porovnání pořízena fotografie souboru 5 formulací vedle sebe.

#### 8.4.2 Měření pH

K monitoringu pH hodnot formulací krémů byl využit vpichový pH metr PH60S–Z. Samotné měření probíhalo v laboratoři při teplotě  $23,2 \pm 0,8$  °C. Do emulze byla ponořena měřící špička pH metru a po ustálení byl proveden odečet hodnoty. Mezi měřeními každé nové formulace byla měřící část pH metru očištěna papírovým ubrouskem a opláchnuta demineralizovanou vodou. U každé z formulací bylo zaznamenáno vždy 5 hodnot za každý časový interval.

#### 8.4.3 Měření viskozity

Pro detekci změn viskozity jednotlivých formulací byl používán rotační viskozimetr typu MYR V2 uvedený na Obr. 11. Měření viskozity bylo provedeno metodou dle Brookfielda. Výběr použitého spindlu i konkrétních otáček se odvíjel od výsledného točivého momentu, jenž by se měl v ideálním případě pohybovat v okolí 85 %. Pro účely tohoto měření byl zvolen spindl 4 a otáčky o velikosti 30 rpm vhodné pro měření vzorků o viskozitě do  $20\,000\text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ .



Obrázek 11 Rotační viskozimetr MYR V2 [vlastní zdroj]

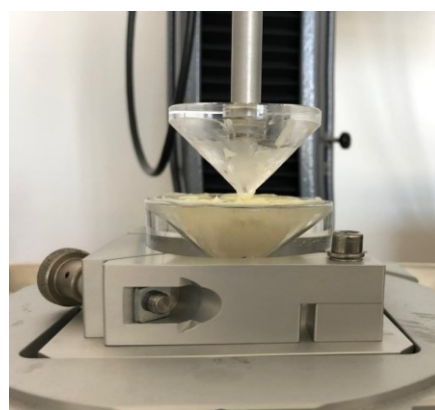
Měření viskozity probíhalo při teplotě  $23,2 \pm 0,8$  °C. Před zahájením byl spindl ponořen do krému po vyznačenou rysku. Stisknutím tlačítka START na ovládacím panelu viskozimetru bylo spuštěno měření. Pro každou formulaci bylo zaznamenáno vždy 5 hodnot. Při přechodu měření na jinou formulaci byl spindl očištěn.

#### 8.4.4 Instrumentální měření texturních vlastností

K analýze texturních vlastností formulací byl použit texturometr typu TA1 (viz Obr. 12) penetrometrickou metodou pro polotuhé matrice. Přístroj byl v režimu měření komprese v jednom měřícím cyklu. Do upínacího stolku (pro snadnou konfiguraci a vyrovnání) byla upevněna skleněná kónická nádobka určená pro náplň vzorku. Kompatibilní tvar s touto nádobkou má použitá kónická sonda s úhlem kužele  $90^\circ$  upevněná k analyzátoru textury [85]. Formulace krému byla vždy pomocí kovové lžičky naplněna do skleněné nádobky až po její povrch. Poté bylo s nádobkou třikrát jemně klepnuto, aby došlo k odstranění vzduchových bublin, případně bylo množství krému doplněno tak, aby byla nádobka opět naplněna až po okraj. Pomocí kovové špachtle byl povrch zarovnan a celá nádobka upevněna do kovového upínacího stolku. Měřící rameno texturometru bylo spuštěno k nádobě se vzorkem tak, aby byla vzdálenost mezi kónickou sondou a nádobkou cca 5 mm. Následně byla sonda spouštěna rychlostí  $50 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  a silou 10 N k průniku do krému. Před dalším měřením stejné formulace byl povrch krému vždy uhlazen špachtlí do roviny. Při přechodu na analýzu jiné formulace byla kónická nádobka i měřící sonda ořena papírovým ubrouskem a očištěna lihem. Na Obr. 13 je zobrazen detailní pohled na proces měření.



Obrázek 12 Texturometr TA1  
[vlastní zdroj]



Obrázek 13 Detailní pohled na  
průběh měření [vlastní zdroj]

V průběhu tohoto experimentu byla zjišťována přilnavost, soudržnost, konzistence, práce penetrace a tvrdost jednotlivých krémů v čase. Analýza a vyhodnocení těchto parametrů proběhla s využitím softwaru NEXYGEN Plus. Každá formulace byla měřena v každém časovém intervalu vždy v 5 opakováních.

## 8.5 *In vivo* testování účinnosti formulací

Pro průběžné posouzení stavu pokožky dobrovolnic byla sledována řada parametrů: hydratace, TEWL, pH a míra erytému. Tyto parametry byly monitorovány v obou periorbitálních oblastech a ve středu čela v čase 0, po 4 a 8 týdnech používání dané formulace krému. Během prvního a posledního měření bylo provedeno navíc měření elasticity, snímání replik kůže a pořízení snímků kožního reliéfu.

### 8.5.1 Soubor dobrovolnic

Výběr dobrovolnic probíhal dle kritérií pro zařazení do souboru (Příloha I). Ověřování účinnosti *in vivo* se zúčastnilo celkem 25 dobrovolnic v rozmezí věku 40–60 let (viz Tab. 8). Rozděleny byly do 5 skupin, každá sestávající vždy z 5 dobrovolnic. První skupině bylo přiděleno placebo (F1), tedy základní matrice krému bez přídavku aktivních látek, druhá skupina používala formulaci obohacenou o 1% roztok HA. Posledním třem skupinám byly přiřazeny formulace obsahující 1% roztok HA a také příslušný typ peptidu – pro F3 Clodessine, F4 Elasef, F5 Recelline.

Tabulka 8 Charakteristika věku dobrovolnic pro přidělené typy formulací

Formulace	Složení	Věk [ $\bar{x} \pm s$ ]
F1	Základní matrice	49,6 ± 2,0
F2	Základní matrice + 1% HA	45,4 ± 2,2
F3	Základní matrice + 1% HA + Clodessine	50,2 ± 3,4
F4	Základní matrice + 1% HA + Elasef	43,6 ± 1,8
F5	Základní matrice + 1% HA + Recelline	42,2 ± 1,2

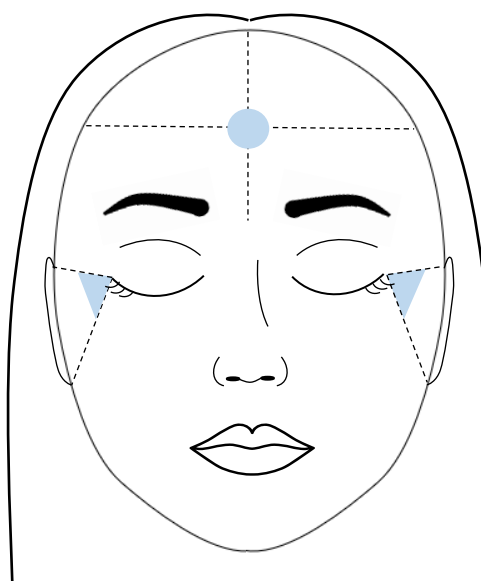
### 8.5.2 Organizace měření

Před započítím experimentu byly dobrovolnice obeznámeny s metodikou testu (Příloha II) a vyplnily dotazník zaměřený na jejich předešlý i aktuální zdravotní stav (Příloha III). K podepsání jim byl předložen i informovaný souhlas (Příloha IV) a také prohlášení souhlasu

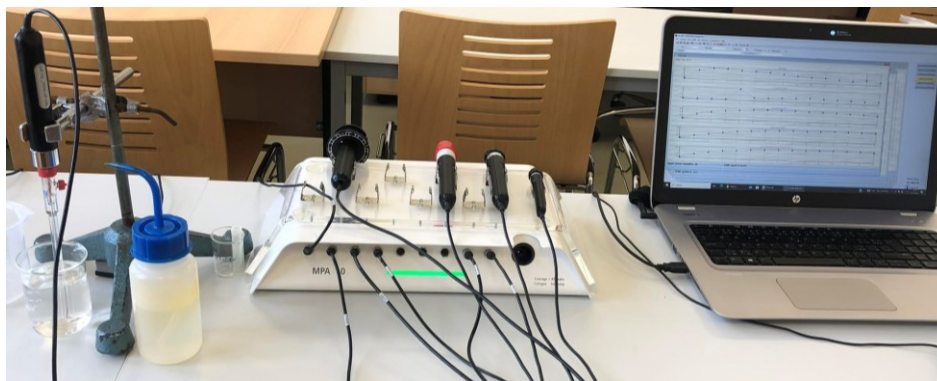
(Příloha V) s dobrovolnou účastí ve studii. Každé z dobrovolnic byl přidělen krém o hmotnosti 50 g. Krém byl aplikován každé ráno a večer na celý obličej po dobu 8 týdnů. Účastnice experimentu byly instruovány, aby po stanovenou dobu nepoužívaly jiné krémové přípravky na obličej.

Ověřování účinnosti krémových formulací probíhalo v laboratoři Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně při teplotě  $23,1 \pm 2,2$  °C a relativní vlhkosti  $42,6 \pm 1,2$  %. Dobrovolnice se zúčastnily celkem trojího měření v měsících září–listopad organizovaných vždy po uplynutí 4 týdnů používání přidělených formulací. Před samotným měřením byly dobrovolnice ponechány 20 minut v klidovém režimu v laboratoři z důvodu jejich aklimatizace za účelem přesnosti měření. V případě předchozího použití make-upu byla měřená místa odlíčena micelární vodou.

V levé i pravé periorbitální části obličeje a ve středu čela (viz Obr. 14) byla sledována hydratace kůže, TEWL, pH a míra erytému. Záznam výsledných hodnot byl umožněn propojením počítače se stanicí MPA (viz Obr. 15) se softwarem CK-Multi Probe. Naměřená data byla vždy převedena do programu Microsoft Office Excel a uložena ke zpracování. První a třetí měření bylo navíc doplněno o měření elasticity, snímání mikroreliefu kůže silikonových replik a také o pořízení snímků pokožky s vizualizací množství vrásek, pórů a pigmentových skvrn visioskopem.



Obrázek 14 Znázornění měřených oblastí



Obrázek 15 Stanice MPA se sondami pro měření parametrů kůže [vlastní zdroj]

### 8.5.3 Korneometrické měření

Pro účely měření hydratace pokožky bylo použito zařízení Korneometr® CM 825. Lehkým přitlakem korneometrické sondy bylo naměřeno na sledovaných místech vždy 5 hodnot hydratace. Míra hydratace je kvantitativně vyjádřena hodnotami uvedenými v Tab. 9.

Tabulka 9 Stupnice hodnot korneometrického měření [86]

Hydratace [k. j.]	Interpretace stavu hydratace kůže
<30	Extrémně suchá kůže
30–45	Suchá kůže
>45	Normální kůže

### 8.5.4 Měření TEWL

S využitím Tewametry® TM 300 bylo naměřeno pro každou ze tří monitorovaných oblastí vždy 15 hodnot TEWL. Prvních 5 z nich bylo vždy zanedbáno z důvodu ustálení TEWL ovlivněné rozdíly v teplotě a vlhkosti pokožky dobrovolnice a prostředí. Tabulka 10 uvádí škálu hodnot TEWL včetně interpretace daného stavu.

Tabulka 10 Stupnice hodnot tewametrického měření [86]

TEWL [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	Interpretace stavu TEWL
0–10	Velmi dobré
10–15	Dobré
15–25	Normální
25–30	Špatné (mírné poškození bariérové funkce)
>30	Kritické (patologické narušení bariérové funkce)

### 8.5.5 Měření pH

Měření pH pokožky bylo provedeno přiložením sondy pH metru® k měřené oblasti. Sonda byla před každým měřením opláchnuta demineralizovanou vodou a velmi jemně otřena buničinou. Na levé i pravé periorbitální oblasti a ve středové části čela byla naměřena vždy jedna hodnota. Škála pH hodnot kůže je uvedena v Tab. 11.

Tabulka 11 Stupnice pH hodnot [87]

pH	<3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	>6,5
Ženy	Nízké		Normální			Vysoké	
Muži	Nízké		Normální			Vysoké	

### 8.5.6 Měření erytému

Míra erytému byla monitorována s využitím sondy Mexametr® MX 18 na měřeném místě (obě periorbitální oblasti, ve středu čela). Na každém z těchto míst bylo přitlakem zaznamenáno celkem 5 hodnot.

### 8.5.7 Měření elasticity

Elasticita kůže byla analyzována prostřednictvím sondy Reviskometr® RVM 600 umožňující měření při úhlu 0–360°. Před započítáním měření byl na polohovací kroužek s úhlovou stupnicí nalepen oboustranně lepící kruh, díky kterému mohla být tato krytka připevněna ke kůži. Samotné měření probíhalo jemným vkládáním měřicí jehličky sondy reviskometru po každých 30° do krytky. Na všech třech monitorovaných místech bylo zaznamenáno vždy 13 hodnot.

### 8.5.8 Vizualizace struktury kožního povrchu

Zobrazovací kamera Visioskop® PC 35 (viz Obr. 16) byla přiložena na monitorovanou oblast, došlo k zaostření, zmrazení obrazu a následnému provedení snímku kůže. Analýza probíhala při prvním a posledním měření vždy pořízením tří snímků programem CSI-Complete Skin Investigation. Ze zobrazovaného kožního povrchu bylo získáno procentuální množství vrásek, pórů a pigmentových skvrn.



Obrázek 16 Zařízení Visioskop PC 35 a příslušenství  
[vlastní zdroj]

### 8.5.9 Snímání reliéfu kůže pomocí silikonových replik

První a poslední měření účinnosti *in vivo* bylo doplněno o snímání replik kožního reliéfu. Před samotným měřením byla kůže v okolí všech 3 monitorovaných oblastí odmaštěna micelární vodou. Poté byl dobrovolníci do měřené lokality nalepen oboustranně lepicí transparentní rámeček určený pro nános silikonu. Jedna ze stran rámečku je opatřena otvorem pro odtok přebytečného množství silikonu. Hmota repliky byla připravena smísením silikonu B a katalyzátoru C v poměru 2:1 v malém plastovém kelímku. Krouživými pohyby po dobu cca 20 vteřin vakuovou odsávací pumpou byly mezi sebou obě látky důkladně promíchány. Hmota byla rychle a rovnoměrně plastovou tyčinkou nanášena na předem připravený rámeček v oblasti měření. Ihned po aplikaci bylo místo repliky překryto adhezivní krycí fólií korneofixu. Po zesíťování silikonu, tj. cca 15 minut, byla replika opatrně sejmuta z pokožky dobrovolnice a následně přilepena na popsanou papírovou kartičku umožňující lepší manipulaci i následné vyhodnocení visiometrem. V případě nezdárného sejmutí reliéfu (nerovnoměrným nánosem silikonu či nedostatečným odsátím vzduchu) byl postup v dané oblasti analogicky opakován. Po dokončení kalibrace Visiometru byla do komůrky tohoto zařízení vložena analyzovaná kartička tak, aby přední strana repliky (s nalepenou fólií korneofixu) směřovala ke světelnému zdroji. Pořízený snímek zobrazeného reliéfu byl spolu s výslednými daty uložen pro účely dalšího vyhodnocení. Na Obr. 17 je zaznamenáno příslušenství pro přípravu replik.



Obrázek 17 Příslušenství potřebné pro přípravu silikonových replik [vlastní zdroj]

## 8.6 Senzorické posuzování organoleptických vlastností formulací

Hodnocení sensorických vlastností krémových formulací bylo provedeno panelem 14 zaškolených posuzovatelů v listopadu – prosinci 2023 v prostorách laboratoře sensorické analýzy na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně podle podmínek uvedených v [88]. Zakódované vzorky krémů byly hodnotitelům předkládány za stejných podmínek, tzn. připraveny ve stejném množství, ve stejných nádobách a za totožných teplotních podmínek dle náležitostí uvedených v [89, 90]. Klíč k posuzovaným vzorkům je uveden v Tab. 12. Vzorky byly hodnoceny 4 pořadovými zkouškami a 3 párovými porovnávacími zkouškami (Příloha VI).

Tabulka 12 Kódy k sensoricky posuzovaným vzorkům

Formulace	Složení	Kód vzorku
F1	Základní matrice	590
F2	Základní matrice + 1% HA	073
F3	Základní matrice + 1% HA + Clodessine	901
F4	Základní matrice + 1% HA + Elasef	251
F5	Základní matrice + 1% HA + Recelline	342

### 8.6.1 Pořadové zkoušky

Pořadové zkoušky jsou využívány k rozdělení souboru hodnoceného výrobku např. dle preference či intenzity znaku. Jedná se o zkoušky s nucenou volbou, dva vzorky nesmí mít přidělené stejné pořadí. První pořadová zkouška byla zaměřena na seřazení vzorků dle intenzity barvy (1 – nejsvětlejší, 5 – nejtmaší). V druhé zkoušce bylo úkolem posuzovatelů uspořádat vzorky dle roztíratelnosti (1 – nejlépe roztíratelný, 5 – nejhůře roztíratelný)



následujícím způsobem: Špachtlí nanesené (vždy stejné) množství vzorku bylo na volární straně předloktí prstem rozetřeno do kruhu o průměru 2 cm. Mezi hodnocením jednotlivých vzorků byl prst očištěn papírovým ubrouskem. Posuzovaná místa byla po uplynutí 3–5 minut vizuálně hodnocena na vstřebatelnost (1 – nejlépe vstřebatelný, 5 – nejhůře vstřebatelný), což bylo podstatou třetí pořadové zkoušky. Poslední zkouška spočívala v uskupení vzorků dle vlastních preferencí (1 – nejvíce preferovaný, 5 – nejméně preferovaný).

### 8.6.2 Párové porovnávací zkoušky

Párové porovnávací zkoušky jsou určeny ke komparaci sensorických znaků dvou posuzovaných vzorků, k určení rozdílu mezi nimi či jejich preference. Párová porovnávací zkouška byla zaměřená na roztíratelnost, vstřebatelnost a určení preferovanějšího vzorku krémové formulace.

## 8.7 Statistické zpracování získaných dat

K vyhodnocení naměřených dat (textury, viskozity i pH formulací, hydratace, TEWL, pH, erytému, elasticity, mikroreliefu kůže a sensorického hodnocení) byl využit program Microsoft Office Excel verze 2403 (Microsoft Corporation, USA) pro výpočet parametrů popisné statistiky aritmetického průměru a směrodatné odchylky.

Pro posouzení statisticky významných změn měřených veličin v průběhu experimentu byla pomocí funkce Analýza dat v programu Microsoft Office Excel stanovena i hodnota signifikance. K tomuto účelu byl využit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Signifikantní hodnoty byly označeny symbolem hvězdičky.

Pořadové zkoušky posuzování sensorických vlastností byly vyhodnocovány statisticky s využitím Friedmanova testu na 95% hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Byly stanoveny dvě hypotézy. Nulová hypotéza  $H_0$  předpokládala, že mezi vzorky neexistují statisticky významné rozdíly v hodnoceném sensorickém znaku. Naopak alternativní hypotéza  $H_1$  byla definována tak, že mezi sledovanými vzorky lze nalézt alespoň jeden, jenž se od jiného či jiných liší [91].

K vyhodnocení jednostranného testu párové porovnávací zkoušky bylo využito Fisherovy statistiky opět na hladině významnosti 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). Nulová hypotéza v tomto případě předpokládala, že mezi dvěma vzorky neexistuje v daném znaku rozdíl a nelze je tudíž od sebe odlišit. Oproti tomu stav, kdy lze jeden ze vzorků označit za preferovanější (či je ve sledovaném kritériu intenzivnější), definuje alternativní hypotéza  $H_1$  stojící proti hypotéze  $H_0$  [91].

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části této diplomové práce byly navrženy a připraveny anti-aging krémové formulace, které byly podrobeny sérii testů: mikrobiologické hodnocení čistoty a ověření účinnosti konzervačního systému, ověření stability a účinnosti *in vivo* a sensorické posouzení organoleptických vlastností. V následujících kapitolách 9.1–9.5 jsou prezentovány a diskutovány výsledky použitých metod.

### 9.1 Zhodnocení přípravy formulací anti-aging krémů

Krémové formy kosmetických přípravků jsou velmi spotřebitelsky oblíbenými a žádanými produkty pro různé typy pleti a rozličné problémy, které se odráží ve formulačních strategiích za účelem přípravy účinných bezpečných multifunkčních výrobků [92]. Ve složení připravovaných formulací anti-aging krémů jsou obsažena rozpouštědla, změkčovadla, emulgátory, modifikátory viskozity, pufruční činidla, konzervanty, kondicionační a zvlhčující složky, antioxidanty i vonné látky. Ingredience byly vybrány dle jejich konkrétních účinků, stabilitních vlastností a také s ohledem na jejich vzájemnou kompatibilitu. Pro podporu a udržení hydratace pleti byly do formulace zařazeny zvlhčující složky (schopné přitahovat a vázat molekuly vody díky své chemické povaze) *Glycerin*, *Panthenol*, *Fructose*, *Aloe Barbadensis Gel* a také *Isopropyl Myristate*, jež plnil zároveň funkci fixátoru vůně [92]. *Carbomer* byl využit jako modifikátor viskozity, jež byla stabilizována účinkem přísady *Cetearyl Alcohol*. Rostlinné oleje šípkový (*Rosa Canina Fruit Oil*), arganový (*Argania Spinosa Oil*), sojový (*Glycine Soja Oil*), kokosový (*Cocos Nucifera Oil*) byly do složení zařazeny pro jejich vysokou antioxidační aktivitu a schopnost zadržovat vlhkost (a tím zvyšovat hydrataci pleti), snižovat TEWL a podporovat elasticitu pokožky [75]. Vybrané esenciální oleje nebyly do formulací začleněny pouze z důvodu tvorby vonné fáze. Silice geránia (*Pelargonium Graveolens Oil*), santalového dřeva (*Santalum Album Oil*) a rozmarýnu (*Rosmarinus Officinalis Oils*) totiž vynikají svými antioxidačními vlastnostmi. Esenciální olej geránium bývá v anti-aging kosmetice používán pro obnovu přirozené elasticity kůže, minimalizace stařeckých skvrn a podporu hydratace. Silice rozmarýnu navíc vykazuje výborné antibakteriální schopnosti a tím podporuje účinnost použitých konzervantů [70, 71]. Pro zesílení antioxidačního účinku byl použit ve formulacích vitamín E (*Tocopherol*) a také stabilní forma vitamínu C (*Ascorbyl Glucoside*). Emulgace fází byla zajištěna díky použitému emulgátoru vhodného pro emulze O/V *Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate* s HLB 12 v kombinaci s ko-emulgátorem *Glyceryl Stearate* s HLB 4,8. Pro své účinné antimikrobiální

vlastnosti tvořily konzervační systém parabeny *Methylparaben* a *Ethylparaben*. Pro dodání anti-aging účinku byla mezi aktivní látky zařazena nízkomolekulární kyselina hyaluronová (*Sodium Hyaluronate*) a také 3 druhy peptidů – *Sh-Nonapeptide-4*, *Sh-pentapeptide-3* a *Pentapeptide-60-s-Methanocaldococcus Jannaschii Heptapeptide-1*. Konečná úprava hodnot pH byla provedena pomocí hydroxidu sodného (*Sodium Hydroxide*).

Použitá 40kDa kyselina hyaluronová ve formě bílého prášku rozpustného ve vodě byla připravena mikrobiální fermentací mikroorganismu *Streptococcus zooepidemicus*. Díky nízké molekulární hmotnosti proniká snadno až do dermální vrstvy kůže, kde stimuluje syntézu kolagenu a tělu vlastní kyselinu hyaluronovou. Podporuje deskvamaci, bariérovou funkci i funkci kožního mikrobiomu. Působí proti atrofii kůže a vzniku erytému [93, 94].

Aktivní látky na bázi peptidů jsou připravovány rozpuštěním příslušného peptidu syntetické formy ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Jejich syntetizace probíhá standardní metodou syntézy proteinů na pevné fázi. Surový peptid je čištěn pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a následně analyzován prostřednictvím hmotnostní spektrometrie (MS) [95, 96, 97]. Na trhu jsou k dostání jako 0,1% roztok v PBS zakonzervovaný phenoxyethanolem, či phenethyl alkoholem dle výběru odběratele. Pro účely diplomové práce byly všechny 3 typy peptidů zakonzervovány phenoxyethanolem. Produkty mají podobu čiré transparentní kapaliny s mírným specifickým odorem [95, 96, 97]. Principy jejich anti-aging účinků jsou popsány v textu níže.

*Sh-Nonapeptid-4*, komerčně označovaný jako Clodessine, je aktivní částí „hormonu mládí“ – klotho. Hormon klotho se přirozeně vyskytuje v lidského organismu. Jeho funkce je založena na simulaci dietního režimu, tedy omezeného příjmu kalorií, což dle studie [93] vede nejen k poklesu tělesné hmotnosti, ale také ke zpomalení procesu stárnutí. Klotho aktivuje signální dráhy, které vedou ke zpomalení procesu buněčného stárnutí, snížení obsahu volných radikálů a environmentálního stresu (UV záření, znečištění) kůže. Peptid Clodessine prodlužuje životnostaschopnost kožních buněk, eliminuje vrásky a má pozitivní vliv na pružnost a texturu pleti [94, 95, 98].

Peptid *Sh-Pentapeptide-3* (produkt Elaself) je odvozen od mikrofibrilárního lidského proteinu 4 (MFAP4), který je klíčový pro tvorbu elastinových vláken. Dle studie *in vitro* [99] bylo prokázáno, že zmíněný peptid stimuluje produkci proteinu MFAP-4. Pentapeptid Elaself má pozitivní vliv nejen na zlepšení elasticity pokožky, ale také na syntézu kolagenu. Mezi jeho hlavní účinky se tedy řadí redukce vrásek a také protekce před stárnutím i fotostárnutím [93, 95, 98].

Recelline, též peptid *Pentapeptide-60-s-Methanocaldococcus Jannaschii Heptapeptide-1* se přirozeně vyskytuje v naší kůži, kde je jeho hlavní úlohou specifická aktivace proteazomů, které jsou obsaženy v kožních buňkách a ECM. Proteazomové jednotky jsou bílkovinné struktury s enzymatickou aktivitou, jež jsou odpovědné za degradaci poškozených proteinů často hromaděných ve stárnoucí kůži. Zvýšením aktivity proteazomů v kůži, dojde k vyšší rychlosti obratu bílkovin, a tedy i k pozitivnímu dopadu na buňky vystavené oxidačnímu stresu [100]. Peptid Recelline redukuje vzniklé vrásky, podporuje elasticitu pokožky, zmírňuje kožní erytém a pozitivně ovlivňuje texturu pleti [94, 97].

Ač nedošlo během přípravy formulací k žádným komplikacím, za účelem zachování organoleptických vlastností krémů bylo nutné zvolit vhodnou formu kyseliny askorbové. Vitamín C je ve vodném prostředí nestabilní antioxidant, který snadno podléhá oxidačním změnám urychlovaných vzrůstající teplotou, koncentrací kyslíku, kovových iontů i přístupem světla. Yong Chool ve své studii [101] z roku 2022 uvádí, že poločas rozpadu vitamínu C v emulzi V/O nastává při 25 °C po 20 dnech a již po 10 dnech při teplotě 45 °C. Rozklad je dle této studie podpořen pH v okolí 5,6, což je velice blízká hodnota pH připravovaných anti-aging formulací (5,8–6,0). Proto byl do složení zařazen stabilnější derivát kyseliny askorbové – *Ascorbyl Glucosid*. Jeho nevýhodou oproti vitamínu C je však jeho horší propustnost kůží, a tudíž i nižší účinnost.

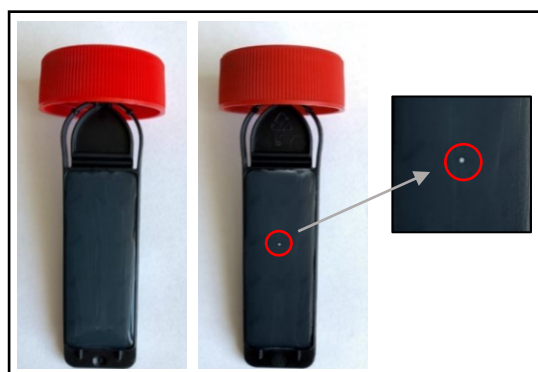
## 9.2 Mikrobiologické testování formulací

Pro zajištění bezpečnosti spotřebitele a kvality přípravku je žádoucí zvolit konzervační systém, který bude chránit výrobek před mikrobiální kontaminací jak během výroby (především dodržováním zásad správné výrobní praxe), tak i při používání spotřebitelem. Zejména náchylné jsou kosmetické produkty obsahující vysoký obsah vody – v případě emulzí především O/V. Studie [102] dokazuje, že mezi nejčastější mikroorganismy přítomné v kosmetice patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacteria gergoviae* a *Serratia marcescens*, ale i další bakterie, plísně a kvasinky. Konzervační systém připravovaných formulací tvoří konzervanty *Methylparaben* a *Ethylparaben*, které na mikroorganismy působí řadou mechanismů: inhibují proteosyntézu (reakcí s aminokyselinami) a syntézu DNA a RNA, ovlivňují transmembránový přenos živin aj. Lincho a kol. ve studii [103] popisuje, že parabeny obecně účinněji působí na plísně a na G+ bakterie, avšak spektrum jejich působení lze rozšířit kombinací různých parabenů. Nízká

koncentrace konzervačních látek v kosmetických přípravcích (kvůli minimalizaci rizika toxicity pro spotřebitele) je však příležitostí pro vznik rezistence některých mikroorganismů, které tak mohou být zdrojem mikrobiální infekce spotřebitele. Zvláště náchylní jsou citlivější a starší jedinci, osoby s oslabenou imunitou a děti do 3 let. Proto byly stanoveny evropskou normou EN ISO 17516:2014 [104] mikrobiologické limity, která dělí kosmetické přípravky do dvou kategorií: 1) produkty pro děti do 3 let, produkty aplikované v okolí očí a sliznic, 2) ostatní. Mezní limit celkového počtu aerobních mezofilních mikroorganismů je u první kategorie stanoven jako  $\leq 1 \cdot 10^2$  CFU/g (ml) a u ostatních přípravků je nutné dodržet limit  $\leq 1 \cdot 10^3$  CFU/g (ml). Pro zajištění bezpečnosti je vyžadována u přípravků obou kategorií naprostá absence mikroorganismů *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *C. albicans* v 1 g (ml) [105]. Pro ověření účinnosti použitých konzervantů a zajištění bezpečnosti spotřebitelů bylo nutné podrobit připravené formulace mikrobiologickému testování.

#### Orientační stanovení mikrobiologické kontaminace pomocí Hygicult TPC

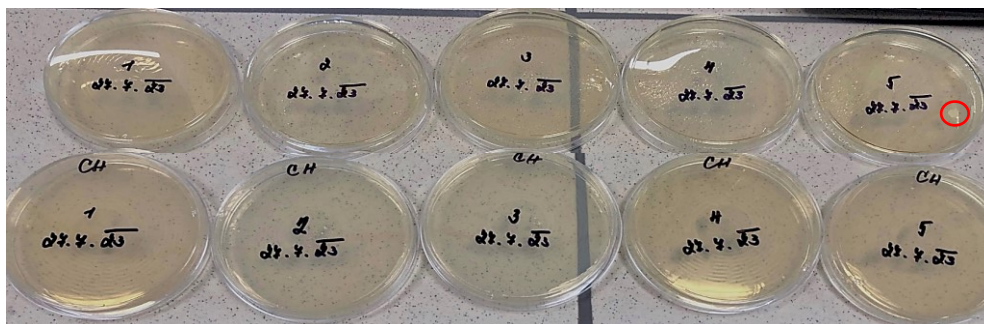
Orientační kontrola mikrobiologické hygieny byla provedena pomocí destiček neselektivního testu Hygicult s živným médiem TPC, jež umožňuje rychlý růst nejběžněji se vyskytujících druhů bakterií, kvasinek a plísní. Po pětidenní inkubaci destiček při 23 °C byl proveden odečet výsledků. U formulací F1, F2, F4 a F5 nebyl zpozorován žádný nárůst mikroorganismů. Naopak u formulace F3 (Obr. 18) byl po uplynutí 5 dní zaznamenán nárůst jediné kolonie na jedné ze stran destičky. Počet životaschopných mikroorganismů byl u této formulace stanoven jako  $2 \cdot 10^1$  CFU/g, což je hodnota pod mezním limitem kontaminace krémových přípravků, a proto lze tento výsledek zanedbat.



Obrázek 18 Nárůst kolonie na formulaci F3  
[vlastní zdroj]

Stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní

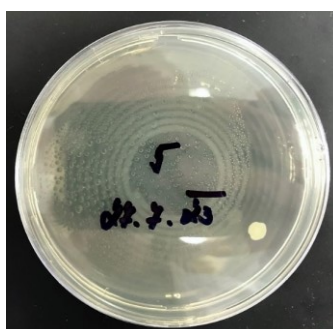
Jelikož slouží test Hygicult TPC pouze k rychlé a orientační mikrobiální kontrole, bylo provedeno kultivační stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní. Nárůst kolonií byl monitorován na jednotlivých vzorcích krémů nanesených na agary PCA a ChYGA. Po uplynutí příslušné kultivační doby byly Petriho misky s agary vyhodnoceny (Obr. 19).



Obrázek 19 Mikrobiologická analýza (první řada: PCA, druhá řada: ChYGA) [vlastní zdroj]

Při stanovení celkového počtu mikroorganismů byl zjištěn nárůst u formulace F5, všechny ostatní vzorky byly mikroorganismů prosté. Stanovení kvasinek a plísní neprokázalo přítomnost těchto mikroorganismů žádného z testovaných krémů.

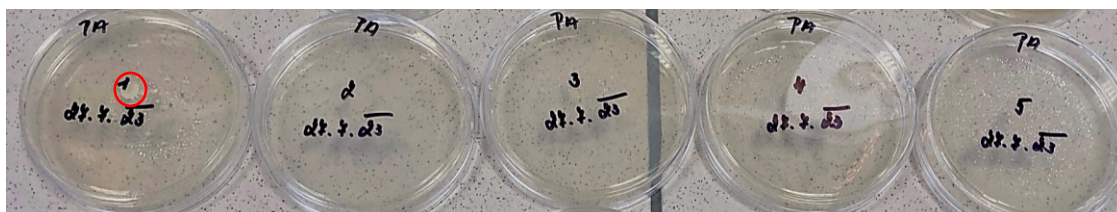
Obrázek 20 detailněji zobrazuje nárůst jediné kolonie, ke kterému došlo na plotně s agarem PCA u formulace F5. Přístroj Spiral Plater vysévá vzorek od středu misky a do každé třetiny je spirálně nanášeno jedno ředění z desítkové řady. Je patrné, že kolonie narostla na agaru pouze v poslední třetině dávkovací plochy, kde je vzorek nejvíce naředěn. Pokud by se tedy jednalo o mikroorganismus pocházející ze vzorku, musely by být kolonie přítomny ve vyšších počtech u středu plotny. V tomto případě lze narostlou kolonii považovat za vnější kontaminaci a lze ji tak ve výsledcích zanedbat.



Obrázek 20 Detailní zobrazení kolonie na plotně s PCA u F5 [vlastní zdroj]

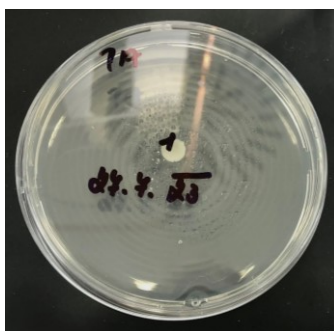
### Stanovení *Pseudomonas aeruginosa*

U každé formulace krémů byla též stanovena přítomnost bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, jež je běžným zdrojem mikrobiální kontaminace kosmetických přípravků. Růst mikrobiálních kolonií byl sledován u jednotlivých vzorků krémů nanesených na PA agar. Petriho misky s agarem byly vyhodnoceny po uplynutí kultivační doby (Obr. 21).



Obrázek 21 Mikrobiologická analýza PA [vlastní zdroj]

Při stanovení *P. aeruginosa* byl detekován nárůst u krémové formulace F1. U ostatních vzorků nebyla zaznamenána přítomnost této bakterie. Na Obr. 22 je znázorněn nárůst kolonie na Petriho misce s PA agarem. Jak z fotodokumentace vyplývá, k nárůstu došlo mimo plochu dávkovaného vzorku. Tato kolonie tedy nepochází ze zkoušené formulace, nýbrž pravděpodobně došlo ke kontaminaci z vnějšího okolí.



Obrázek 22 Detailní zobrazení kolonie na plotně s PA u F1 [vlastní zdroj]

### Test přežívání *Pseudomonas aeruginosa* ve formulacích

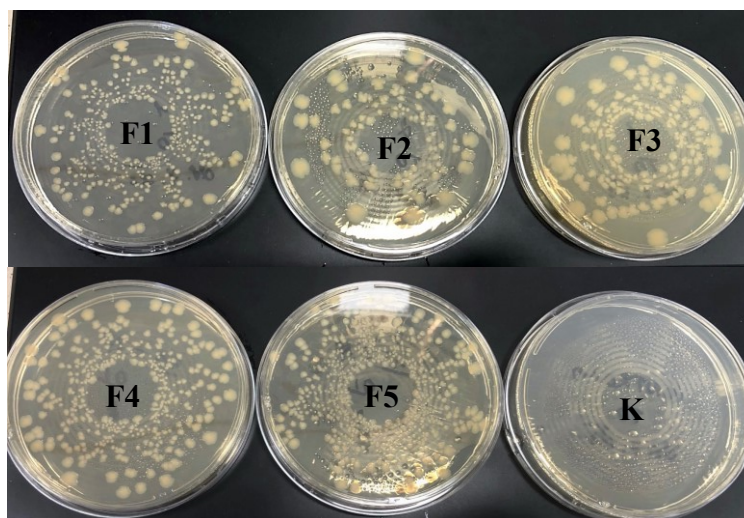
Test přežívání *P. aeruginosa* v jednotlivých emulzích byl zvolen z důvodu ověření účinnosti použitých konzervantů a mikrobiální stability v průběhu skladování i běžného používání formulací spotřebitelem dle Pokynů SCCS pro testování kosmetických složek a hodnocení jejich bezpečnosti [105]. Podstatou experimentálního provedení byla umělá kontaminace přípravku a následné vyhodnocení snižující se bakteriální kontaminace pod stanovené mezní limity. Inokulace bakterií *P. aeruginosa* byla provedena u všech 5 vzorků krémů, které byly

skladovány při pokojové teplotě v laboratoři. Vyhodnocení životaschopných bakterií bylo provedeno v čase 0, dále po 14 a 90 dnech skladování. Výsledky jsou pro všechna provedení souhrnně uvedeny v Tab. 13.

Tabulka 13 Vyhodnocení životaschopnosti bakterie *P. aeruginosa*

Čas	0	14 dní	90 dní
<b>Formulace</b>	CFU/g		
F1	$1,02 \cdot 10^5$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$
F2	$2,70 \cdot 10^4$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$
F3	$5,83 \cdot 10^4$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$
F4	$1,35 \cdot 10^5$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$
F5	$1,48 \cdot 10^5$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$
K	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$

Ihned po zaočkování krémů bakterií *P. aeruginosa* byl proveden první test životaschopnosti bakterie. Na Obr. 23 jsou zdokumentovány narostlé kolonie *P. aeruginosa* po 24hodinové kultivaci. K nárůstu kolonií došlo u všech krémových formulací. Nejnižší nárůst byl detekován u formulace F2, kde byla stanoveno množství bakterie hodnotou  $2,70 \cdot 10^4$  CFU/g. Naopak k nejrozsáhlejšímu nárůstu kolonií došlo u formulace F5, kde byla *P. aeruginosa* detekována v koncentraci  $1,48 \cdot 10^5$  CFU/g. Kontrolní test měl negativní výsledek, což potvrzuje správnost provedení metody.



Obrázek 23 Nárůst kolonií v čase 0 [vlastní zdroj]

Další test přežívání bakterie byl proveden po 14 dnech skladování. Vlivem působení konzervantů došlo k naprosté inhibici růstu této bakterie. Nárůst *P. aeruginosa* tak nebyl detekován na žádném vzorku zkoušené formulace krému.



Z důvodu ověření požadované účinnosti konzervace byl test analogicky opakován i po 90 dnech skladování inokulovaných krémů. Ani zde nebyl nárůst kolonií *P. aeruginosa* zaznamenán v žádném z 5 zkoušených vzorků krémů.

### 9.3 Stabilitní testy

Vlastnosti kosmetických emulzí se mění v závislosti na čase, jelikož jsou termodynamicky nestabilními systémy. Stabilita je normou ISO TR 18811 [106] definována jako schopnost kosmetického výrobku odolávat vnitřním i vnějším změnám v čase za definovaných či předvídatelných podmínek skladování i použití. Cílem provedení stabilitních testů bylo ověřit, zda nemá teplotní zátěž negativní vliv na jejich organoleptické a fyzikální vlastnosti. S ohledem na velké množství forem kosmetických výrobků rozličného složení nelze stanovit standardní metody testování stability, a proto byly teploty a doby skladování zvolené s ohledem na poskytnutá doporučení uvedená v normě. Během stanovení v čase 0, po 14 a 28 dnech byly sady krémů vystaveny teplotám 25, 37, 47 a 55 °C.

#### Organoleptické vlastnosti

U sad krémových formulací byla vizuálně pozorována barva, změny detekující separaci fází a vůně (vyhodnocení viz Tab. 14).

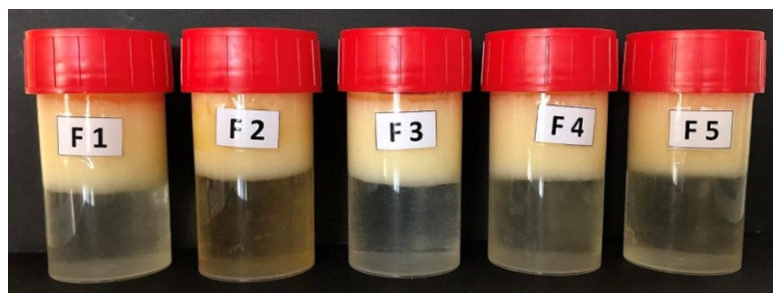
V případě sady uchovávané při laboratorní teplotě 25 °C nedošlo k žádné negativní změně sledovaných parametrů u žádné z formulací. Sada vystavená teplotě 37 °C nevykazovala změnu barvy, ani separaci fází. Nicméně po 14 dnech došlo k zintenzivnění vůně všech vzorků, které bylo po 28 dnech ještě výraznější. U sady krémů umístěné v termostatu vytemperovaném na 47 °C byly zjištěny podobné výsledky jako u sady předchozí. Změna barvy, ani separace fází sice nebyly zaznamenány, avšak změna původní vůně nastala již po 14 dnech. Pozorování sady formulací vystavené 55 °C bylo ukončeno již 14. den z důvodu separace fází (viz Obr. 24). K rozpadu emulzí došlo pravděpodobně vlivem použitého emulgátoru *Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate*, u něhož je výrobcem stanovena stabilita přípravku do teploty 50 °C [107]. Barva, ani vůně v tomto případě nebyly hodnoceny.

Vizuálním pozorováním organoleptických vlastností bylo zjištěno, že nejstabilnější sadou byly formulace uchovávané při 25 °C. I když u teplot 37 a 47 °C nedošlo ke změně zbarvení či rozdělení emulzí, vyšší teploty měly negativní dopad na jejich vůni.

Tabulka 14 Vyhodnocení organoleptických vlastností krémových formulací během stabilitních testů

		Teplota	25 °C			37 °C			47 °C			55 °C	
		Čas	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14
Fyzikální charakteristika	Barva	F1	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	X
		F2	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	X
		F3	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	X
		F4	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	X
		F5	P	-	-	P	-	-	P	-	-	P	X
	Vůně	F1	P	-	-	P	+	++	P	++	++	P	X
		F2	P	-	-	P	+	++	P	++	++	P	X
		F3	P	-	-	P	+	++	P	++	++	P	X
		F4	P	-	-	P	+	++	P	++	++	P	X
		F5	P	-	-	P	+	++	P	++	++	P	X
	Separace fází	F1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
		F2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
		F3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
		F4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
		F5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A

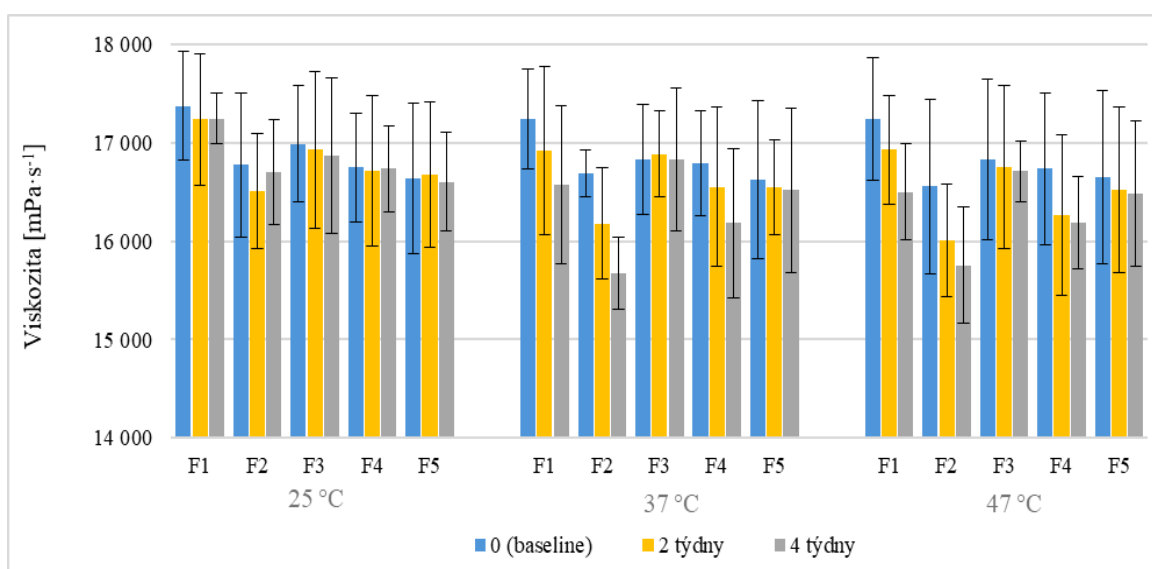
P = původní; - = beze změny; X = nehodnoceno; + = více intenzivní; ++ = mnohem více intenzivní; N = ne; A = ano



Obrázek 24 Rozpad emulzí vystavených teplotě 55 °C [vlastní zdroj]

## Viskozita

Dalším sledovaným parametrem byly změny viskozity formulací v čase za vlivu teplot 25, 37, 47 °C. Výsledky jsou pro všechny sady krémů souhrnně zobrazeny na Obr. 25. Viskozitní hodnoty pro vzorky krémů vystavených 55 °C nebyly zpracovány z důvodu jejich rozpadu. Při uchovávání vzorků formulací při laboratorní teplotě 25 °C nedošlo k žádným výrazným změnám viskozity ani po uplynutí 4 týdnů. K patrnějšímu poklesu došlo při vystavení krémů teplotě 37 °C. Téměř neměnnou viskozitu si však zachovala formulace F3 (mírný nárůst o 0,01 %) a také formulace F5 (pokles o 0,6 %). Nejvíce poklesla viskozita krému F1, a to o 4,1 % a též viskozita formulace F2 (o 6,1 %). Obdobná data byla získána i u sady krémových formulací uchovávaných při teplotě 47 °C. I v tomto případě vykazovaly formulace F3 a F5 poměrně konstantní hodnoty viskozity. Nejvýraznější změny byly zaznamenány opět u formulací F1 (pokles hodnot o 4,6 %) a F2 (pokles o 4,8 %). Ze zpracovaných výsledků lze konstatovat, že viskozita připravených krémových formulací vystavených teplotnímu namáhání klesala u formulací F1, F2 a F4. Jelikož jsou formulace F2–F5 složeny z většiny ze základní matrice, tj. formulace F1, je zajímavé, že k výraznějšímu poklesu došlo pouze v případě tří formulací. Je možné, že byla viskozita krémových formulací ovlivněna různorodým přidavkem hydroxidu sodného, obohacením kyseliny hyaluronové, peptidu či vzájemnou nekompatibilitou použitých ingrediencí.

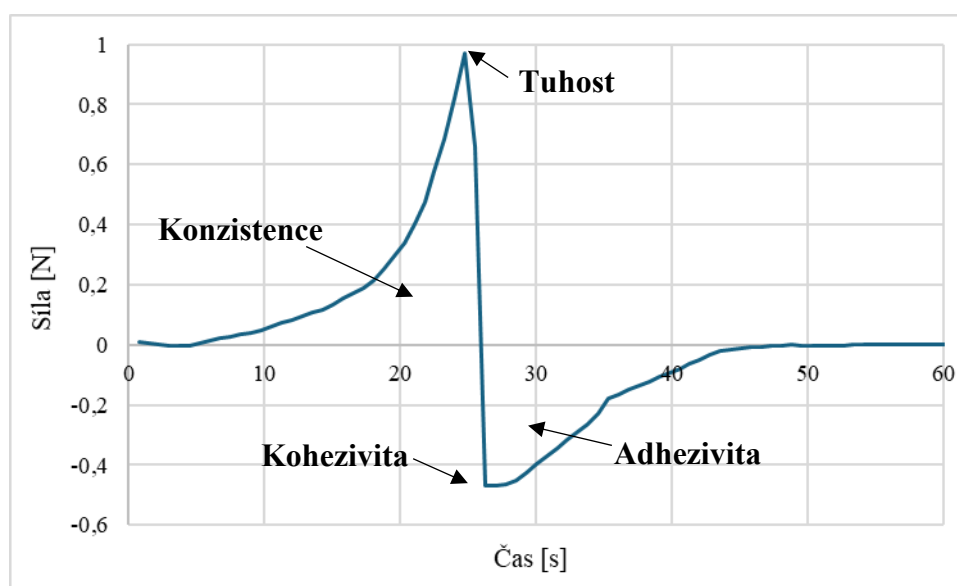


Obrázek 25 Změny viskozity krémů v závislosti na čase a teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (\* p < 0,05)

## Textura

Dle vědeckého článku [108] lze texturu definovat jako kombinaci mechanických, povrchových i geometrických vlastností přípravku vnímaných hmatovými, zrakovými, popřípadě sluchovými receptory. Cílem bylo kvantifikovat texturní vlastnosti studovaných anti-aging formulací. Měření bylo prováděno pomocí texturního analyzátoru vybaveného speciální kónickou sondou. Přístroj simuluje působení lidského prstu při roztírání hmoty formulace, přičemž monitoruje její vlastnosti. Roztíratelnost kosmetických emulzí ovlivňují zejména modifikátory viskozity, jejichž množství v přípravku přímo souvisí s texturními vlastnostmi. Především z tohoto důvodu je texturní analýza v kosmetickém průmyslu běžným experimentálním měřením klíčovým pro optimalizaci vlastností přípravků [109, 110].

Formulaci lze vystavit jednomu či více cyklům deformace. Z křivky odpovídající jednomu cyklu lze stanovit tuhost, kohezivitu, konzistenci a adhezivitu [108]. Modelový graf texturní analýzy, z průběhu jehož křivky lze kvantifikovat sledované parametry, je znázorněn na Obr. 26. Testované vzorky byly namáhány jednorázovým cyklem třikrát v časovém rozestupu 0, 4 a 8 týdnů při teplotách 25, 37 a 47 °C.

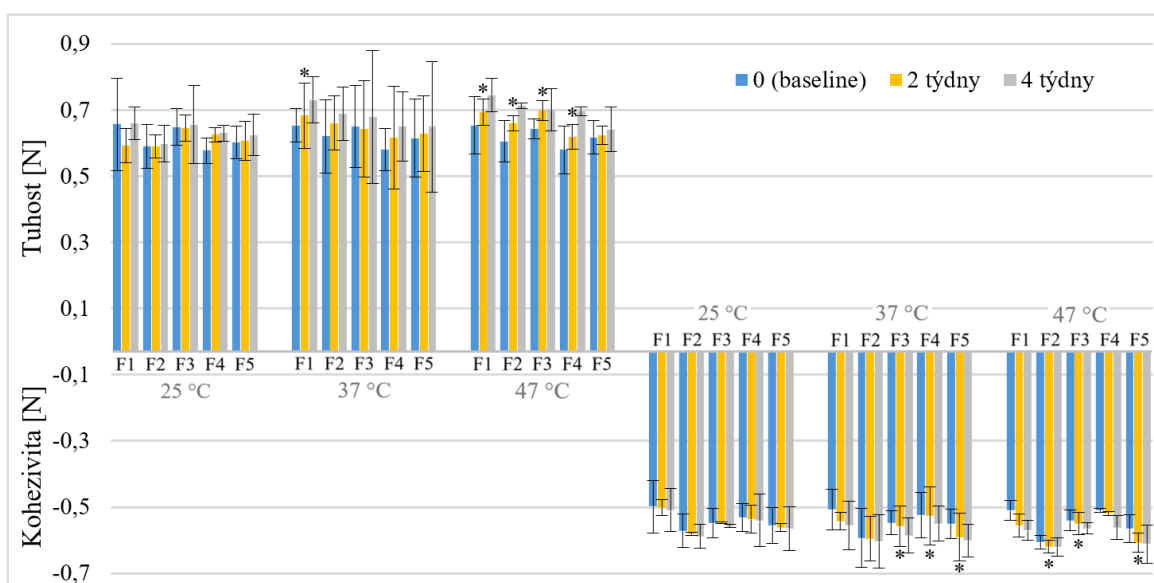


Obrázek 26 Modelová křivka texturní analýzy

Maximální kladná síla potřebná k deformaci emulze (např. prstem) definuje první měřenou charakteristiku – tuhost. Vyšší hodnoty tohoto parametru indikují obtížnější roztíratelnost krému [109]. Vyhodnocení tohoto parametru (spolu s kohezivitou) je souhrnně pro všechny sady uvedeno na Obr. 27. Je patrné, že všechny sady krémů vykazovaly po uplynutí 4 týdnů vzrůst tuhosti. K mírným změnám tohoto parametru došlo překvapivě již při působení 25 °C.

Při uchovávání při 37 °C došlo ke statisticky významnému nárůstu hodnot (po 2 týdnech) zejména u formulace F1 (o 11,5 %). Poměrně konstantní vlastnosti při teplotním vlivu vykazovala formulace F3 s nárůstem o 4,1 %. Signifikantní změny v tuhosti byly zaznamenány také po dvou týdnech při působení 47 °C na formulace F1–F4. Nejméně stabilní v tomto parametru byla formulace F4, která vykazovala změnu o 18,9 %. U formulace F1 byla naměřena tuhost nejvyšší po vystavení všem teplotám, což kladně koreluje i s naměřenými hodnotami její viskozity, jež byly taktéž jedny z nejvyšších.

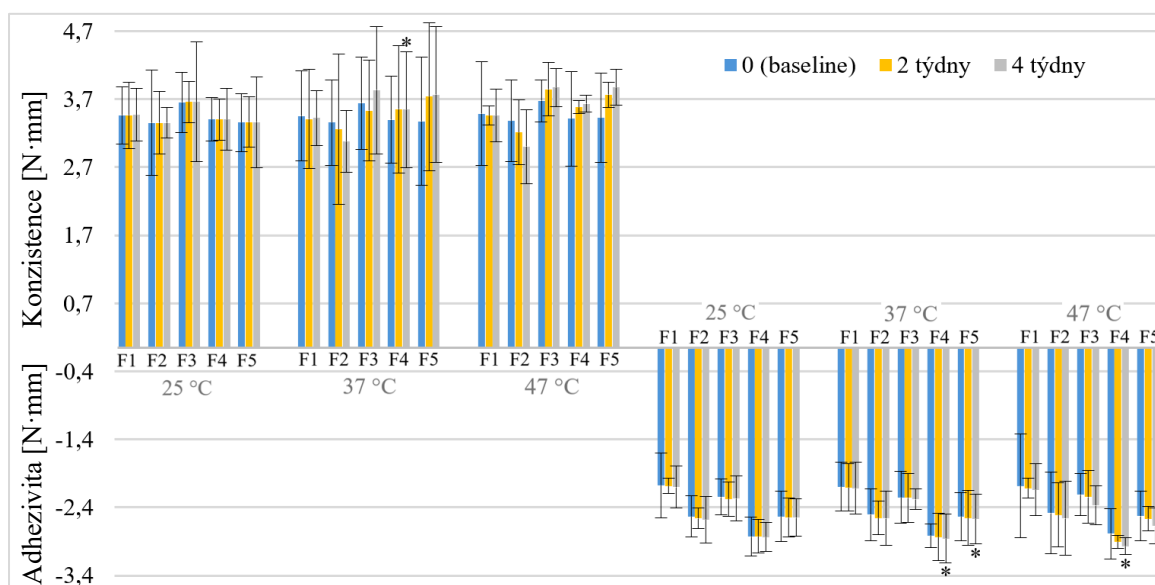
Vyhodnocení soudržnosti neboli kohezivitu je uvedeno taktéž na Obr. 27. Soudržnost je maximální hodnota síly negativního píku vznikajícího při pohybu sondy texturometru, nad analyzovaným vzorkem. Obecně platí, že čím zápornější hodnota je naměřena, tím větší odpor klade vzorek k vytažení měřicí sondy a tím soudržnější je [110]. Z grafu je možné opět vyhodnotit zvětšující se změny klesajícího charakteru soudržnosti jednotlivých formulací se zvyšující se teplotou. Největší výkyvy hodnot bylo možné pozorovat u sad uchovávaných při teplotách vyšších 25 °C. Nejmarkantnější rozdíly hodnot byly zaznamenány u formulace F1 – při 37 °C změna o 9,8 %, při 47 °C změna o 12,5 %. Z důvodu naměření nejnižších hodnot kohezivitu u formulace F2 lze tuto formulaci označit za nejsoudržnější. Za signifikantní byly v průběhu 2. měření označeny hodnoty formulace F3, F4 a F5 při 37 °C a také F2, F3 a F5 při 47 °C.



Obrázek 27 Změna tuhosti a kohezivitu formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (\*  $p < 0,05$ )

Dalším hodnoceným texturním parametrem (v grafu texturní analýzy kladná plocha píku) byla konzistence emulzí, viz Obr. 28. Sady krémů uchovávané při 25 °C vykazovaly téměř konstantní hodnoty v průběhu celého měření. U vyhodnocování sad uložených při 37 a 47 °C byl detekován různý průběh změn konzistence. Téměř neměnné hodnoty byly naměřeny u formulace F1. Formulace F2 vykazovala pokles hodnot – při 37 °C o 8,3 % a při 47 °C o 11,4 %. Konzistence zbylých emulzí vykazovala naopak při vyšších teplotách rostoucí trend. Jako významná se ukázala konzistence u formulace F4 v posledním měření.

Posledním sledovaným parametrem byla přilnavost neboli adhezivita definovaná jako síla potřebná k překonání vzájemných přitažlivých sil mezi dvěma povrchy [109]. V grafu texturní analýzy se jedná o oblast záporné plochy píku. Z grafu znázorňujícího vyhodnocení přilnavosti krémových formulací (též viz Obr. 28) je patrné, že měla adhezivita pozvolně vzestupný charakter u všech 3 monitorovaných sad. K výraznějším změnám došlo však až při vystavení teplotě 47 °C. Signifikantní hodnoty byly zjištěny u posledního měření v případě sady 37 °C u formulací F5 a F4, u které nastala signifikantní změna také při vystavení 47 °C.

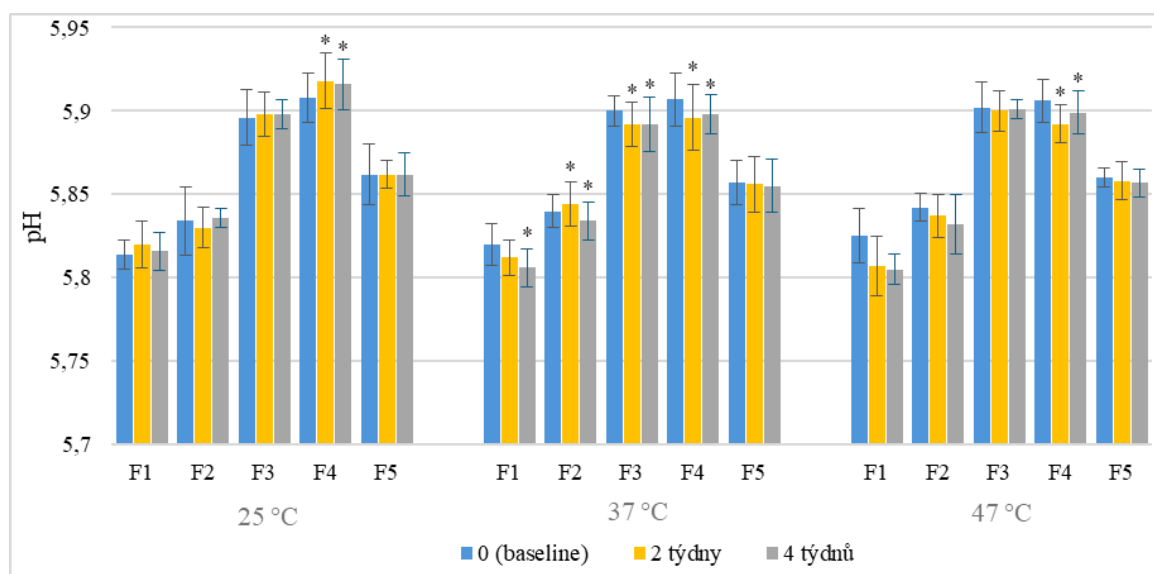


Obrázek 28 Změna konzistence a adhezivita formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (\* p < 0,05)

### Změny pH formulací

Vliv vyšších teplot na pH krémových formulací je vyhodnocen na Obr. 29. Sada krémů uchovávaných při 25 °C nevykazovala žádné velké výkyvy pH hodnot. U formulace F5 bylo dokonce během všech 3 měření zjištěno pH stejné hodnoty, tj. 5,9. U krému F4 byly zaznamenány signifikantní změny u druhého a třetího měření. I formulace uložené

při teplotě 37 °C si byly schopné udržet své pH hodnoty v průběhu 4 týdnů měření. Byl zaznamenán pouze mírný pokles pH (maximální o 0,2 % u F1). Jako signifikantní byly vyhodnoceny hodnoty krémových formulací F2–F4 při 2. měření a F1–F4 při 3. měření. Poměrně stabilní byly i krémové formulace uchovávané při 47 °C, kde klesající trend přetrvával. V případě formulace F4 byly zjištěny v 2. i 3. měření signifikantní změny pH hodnot. Z důvodu rozpadu krémů uchovávaných při 55 °C není tato sada v grafu zaznamenána.



Obrázek 29 Změna pH formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (\*  $p < 0,05$ )

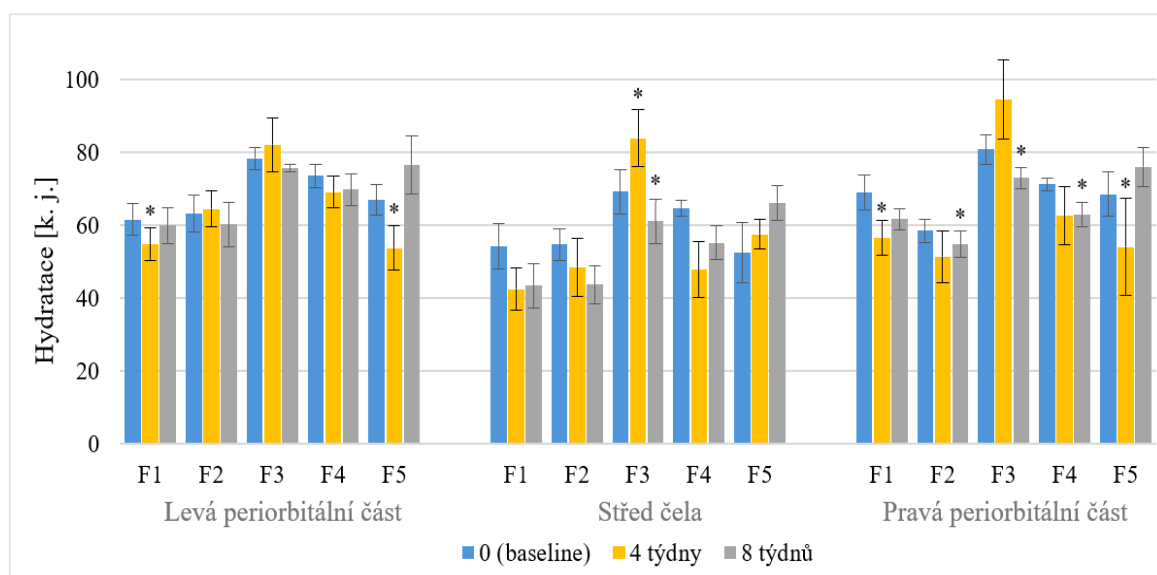
#### 9.4 Biofyzikální účinnost formulací na pokožku

Pro ověření účinku připravených formulací byly provedeny testy *in vivo* na 25 dobrovolnicích. Ve 3 časových intervalech (v čase 0, po 4 a 8 týdnech používání) byla v obou periorbitálních oblastech a ve středové části čela sledována hydratace, TEWL, pH i erytém. První a poslední měření bylo doplněno o měření elasticity, monitoring vrásek, pórů, pigmentových skvrn a též o snímání replik reliéfu kůže.

##### Hydratační účinnost

Princip měření hydratace pokožky je založen na měření kapacity dielektrického média (v tomto případě kůže). Jelikož existuje značný rozdíl mezi dielektrickou konstantou vody (81) a jiných látek (<7), sonda korneometru dokáže detekovat i velmi malé změny dielektrické konstanty v důsledku hydratace povrchu pokožky [111].

Vliv jednotlivých formulací na hydrataci kůže probandů v čase je znázorněn grafem na Obr. 30. Ze získaných počátečních průměrných hodnot plyne, že kůže dobrovolnic odpovídá normálnímu stavu hydratace (> 45 k. j.) [86]. Na konci používání anti-aging krémů byl však zaznamenán u 4 z 5 formulací pokles hydratace, nejvýrazněji v oblasti čela. Snížení hydratace bylo účinkem anti-aging formulací F1 a F2 natolik výrazné (u obou o 20 %), že došlo k poklesu korneometrických hodnot do horní části intervalu charakterizujícího suchý stav kůže (30–45 k. j.) [86]. Hydratační účinek byl zaznamenán pouze u formulace F5. U souboru probandů používajících tuto formulaci byl detekován v levé periorbitální oblasti nárůst hydratace o 14 %, ve středu čela o 26 % a v pravé periorbitální části o 11 % (v porovnání s počátečním měřením). Zajímavý je průběh účinku formulace F3. U dobrovolnic používajících tuto emulzi byl zaznamenán po 4 týdnech aplikace nárůst hydratace ve středové části čela až o 21 %, avšak po uplynutí další 4 týdnů byl evidován pokles. Změny v hydrataci kůže mohou nastat vlivem stresu, pitného režimu, kvality stravování, fyzické aktivity i hormonálních změn [26]. Vzhledem k tomu, že první měření započalo začátkem září a poslední počátkem listopadu, pokles hydratace mohl být ovlivněn i změnou klimatických podmínek.



Obrázek 30 Vliv formulací na hydrataci v závislosti na čase (\*  $p < 0,05$ )

### Bariérová účinnost

Transepidermální ztráta vody je důležitý parametr pro kvantifikaci funkce kožní bariéry. Množství evaporované epidermální vody je vyhodnocováno pomocí dvou párů senzorů (pro měření teploty a vlhkosti) umístěných v dutém otevřeném válci. Sonda tewametru



vyhodnocuje gradient hustoty odpařování vody kůží [112]. Rychlost difúze vodní páry je dle prvního Fickova zákona (1) určena složkou bariéry a složkou hnací síly [113].

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial z} \quad (1)$$

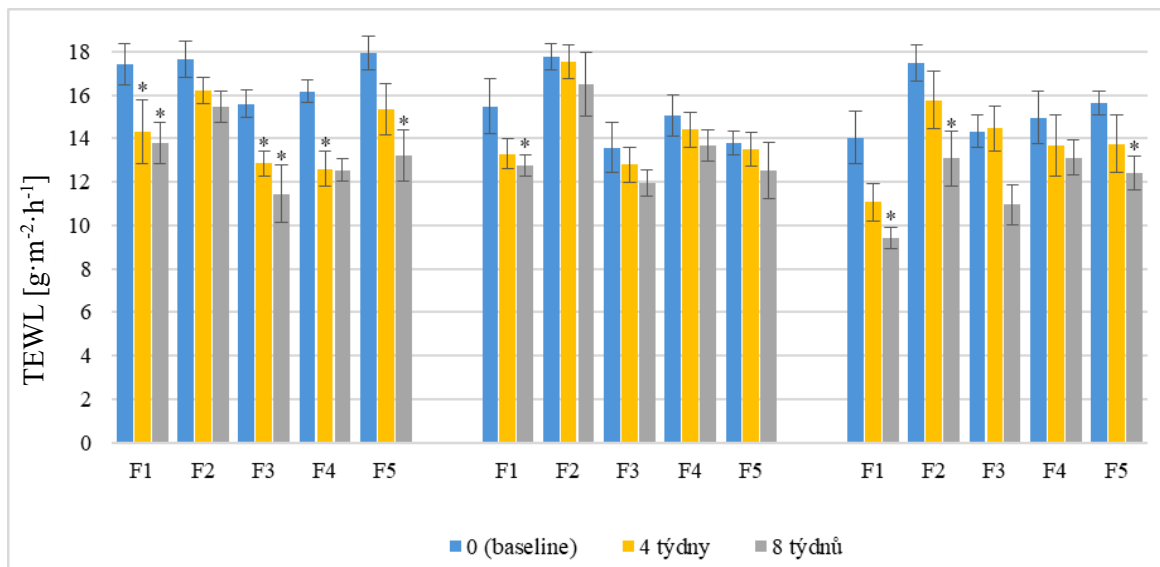
Kde:

J – rychlost difúze,

D – difúzní konstanta,

$\frac{\partial c}{\partial z}$  – koncentrační gradient.

Obrázek 31 prezentuje průběh tewametrického měření. Průměrné původní hodnoty TEWL dobrovolnic v rozmezí 14,0–17,9 g·m<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup> vypovídají o dobrém až normálním stavu jejich kůže [86]. Dle získaných dat lze vyhodnotit, že všechny připravené formulace vykazovaly žádoucí schopnost postupně snižovat TEWL. Zejména v levé i pravé periorbitální oblasti byl zaznamenán výrazný klesající trend. Statisticky významný účinek byl pozorován (na konci experimentu) u souboru dobrovolnic používající formulaci F1. Oproti původním naměřeným hodnotám byl po 8 týdnech používání této formulace na levé straně zjištěn pokles TEWL o téměř 21 % a ve středu čela o necelých 18 %. V pravé periorbitální oblasti došlo ke snížení TEWL dokonce o 33 %. Velmi pozitivní signifikantně prokázaný vliv na bariérovou funkci kůže měly i zbylé formulace, především krém F3 a F5. U krémové formulace F3 došlo k poměrně velkému poklesu TEWL i v monitorované oblasti čela o 12 %. Autoři studie [114] zaměřené na účinek hydratačního krému s obsahem HA na stav pleti pacientů trpících xerózou popisují, že stupeň hydratace *SC* (úzce spjatý s TEWL) lze ovlivnit vhodnými kosmetickými přípravky s obsahem zvlhčujících vysoce hydrofobických složek (např. glycerin, HA). Na základě získaných výsledků tewametrického měření v této diplomové práci bylo možné toto tvrzení potvrdit, jelikož použité zvlhčující látky v připravených formulacích pozitivně ovlivňovaly TEWL dobrovolnic, a tudíž i stav bariérové funkce pokožky.



Obrázek 31 Vliv formulací na bariérové vlastnosti v závislosti na čase (\*  $p < 0,05$ )

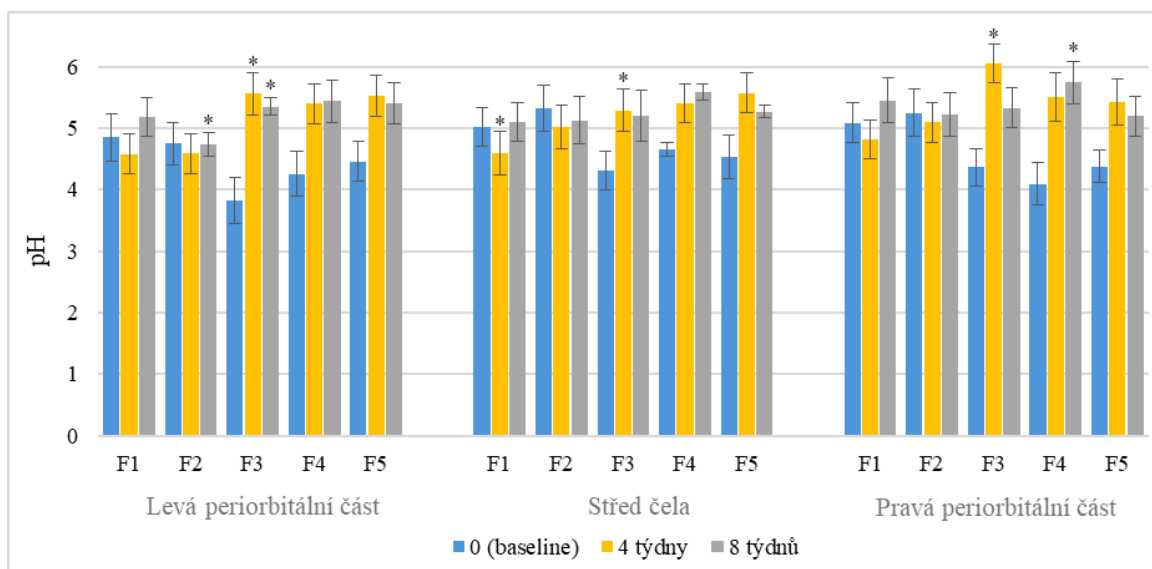
#### Účinnost na kyselost kožního pláště

Pro měření pH povrchu pokožky byl použit pH metr® 905, jehož součástí je kombinovaná elektroda – skleněná část sondy obsahuje měřící  $H^+$  iontově selektivní elektrodu i elektrodu referenční. Měření pomocí uvedeného typu pH metru umožňuje monitoring hodnot s přesností na desetiny [115]. Kyselé pH povrchu kůže působí jako regulační faktor pro udržení homeostázy *SC* a bariérové propustnosti. Nejdůležitější funkce kyselého pH souvisí s procesem diferenciací keratinocytů, tvorbou a funkcí epidermálních lipidů a lipidového obalu korneocytů, udržováním kožního mikrobiomu a také s kožními poruchami a nemocemi [116].

Vyhodnocení vlivu připravených formulací na pH kůže je uvedeno na Obr. 32. Ze získaných dat lze odečíst, že hodnoty naměřené ve středové oblasti čela jsou v průměru vyšší než v periorbitálních oblastech obličeje. U souborů dobrovolnic, jež používaly formulace F1 a F2, odpovídala velikost původního pH normálnímu stavu kůže (4,5–5,5) [86]. Průměrné pH (též v průběhu prvního měření) souboru dobrovolnic, kterým byly přiřazeny formulace krémů F3, F4 a F5, vykazovalo ve většině případů mírně kyselá hodnota interpretovaná dle [86] jako nízká ( $< 4,5$ ). Z naměřených dat lze vyhodnotit, že trend vlivu 4 z 5 připravených formulací na pH pleti měl vzrůstající charakter. U jediného souboru používajícího krém F2 byl monitorován nepatrný pokles pH hodnot pokožky (signifikantní po 8 týdnech používání v levé oblasti). Změna, ke které došlo po 4 týdnech používání formulace F1, byla též vyhodnocena jako signifikantní. Vzestup pH hodnot do mírně alkalické oblasti byl zaznamenán u pokožky

ošetřované krémovými formulacemi F3, F4 i F5 – signifikantní změny byly detekovány při 2. měření u všech oblastí u souboru používajícího F3 (v levé oblasti i při 3. měření) a na konci experimentu u F4 v pravé periorbitální oblasti. Lze tedy říci, že pH skupin dobrovolnic (používajících zmíněné 3 formulace), jež vykazovalo na počátku experimentu nízké hodnoty, vlivem aplikovaných formulací vzrostlo na hodnoty odpovídající normálnímu stravě. Formulace F3–F5 obsahují přírůstek látky peptidové povahy, a proto je velmi pravděpodobné, že pozitivní změny pH byly zapříčiněny právě vlivem použitých peptidů.

Lambers a kol. [117] ve své studii *in vivo* na 330 dobrovolnicích testovali změny pH povrchu kůže volárního předloktí. Ze získaných dat bylo zjištěno, že přirozené fyziologické pH kůže se v průměru pohybuje v okolí hodnoty 4,7. Použitím kosmetických přípravků s pH v okolí takových hodnot lze předpokládat minimální zásah do přirozeného pH lidské pokožky. K obdobným výsledkům došel ve svém vědeckém článku [116] i Lukić a kol., který souhrnným zpracováním mnoha studií hodnotil vliv pH kosmetických přípravků na pH lidské kůže. Dle jeho vyhodnocení se přirozené pH pokožky pohybuje v kyselější oblasti, než bylo dříve předpokládáno – konkrétně v rozmezí 4,1–5,8 v závislosti na lokaci. Většina studií se shoduje, že by se pH topických přípravků mělo pohybovat v intervalu pH 4–6, aby nedošlo k narušení přirozené pufrční kapacity a obranné schopnosti kůže [116].



Obrázek 32 Vliv formulací na pH v závislosti na čase (\*  $p < 0,05$ )

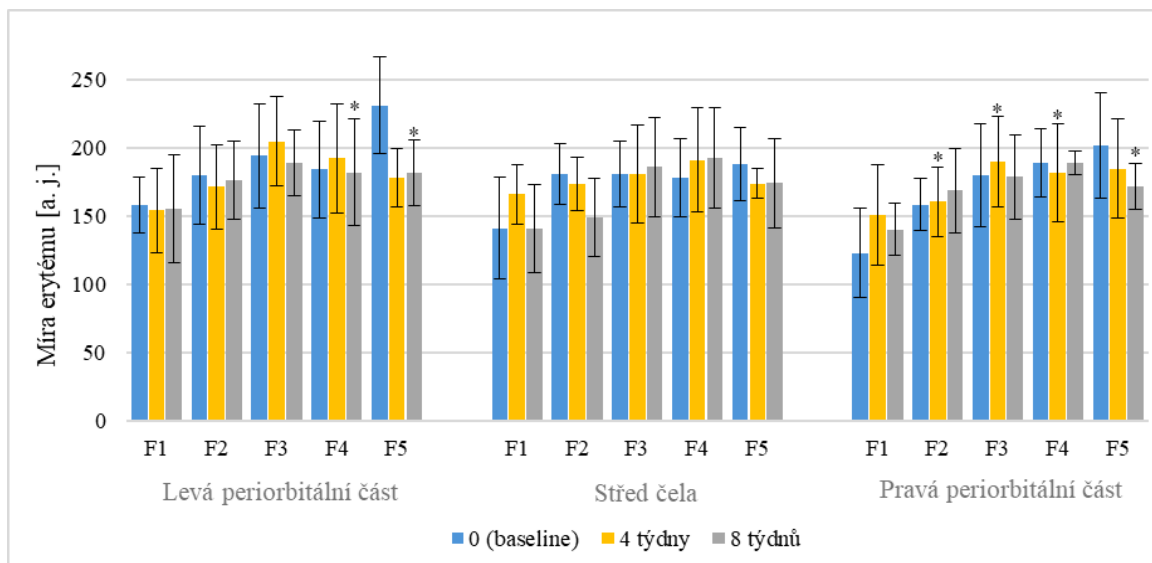
### Změna erytému

Principem této metody je měření odrazu a absorpce světla kůží. Sondou mexamtru je vyzařováno světlo o třech různých vlnových délkách odpovídajících rychlostem absorpce melaninu a hemoglobinu. Od povrchu kůže je vyzařované světlo odráženo a míra tohoto odrazu je zaznamenána přijímačem umístěným v měřicí sondě [118].

Vyhodnocené průměrné hodnoty erytému v průběhu experimentu jsou uvedeny na Obr. 33. Z grafu lze odečíst, že většina formulací má různorodý vliv na míru erytému. U souboru dobrovolnic používajících formulace F1 a F2 došlo v levé periorbitální oblasti a ve středu čela ke snížení erytému, v pravé periorbitální oblasti však míra erytému vzrostla. Krémy označené jako F3 a F4 naopak podporovaly vznik erytému ve středové oblasti čela, ve zbylých monitorovaných oblastech míru erytému snižovaly. U jediné formulace F5 byl zaznamenán na všech monitorovaných místech pokles erytému (nejvýraznější v levé oblasti o 21,4 %) způsobený pravděpodobně obsahem peptidu Recelline působícímu také proti začervenání. Signifikantní změny byly detekovány po 4 týdnech používání u formulací F2–F4 (v pravé periorbitální oblasti) a po 8 týdnech v levé periorbitální oblasti v případě formulace F4 a F5, u které byla signifikance zaznamenána i v pravé měřené oblasti.

Podobné výsledky byly zjištěny i ve studii *in vivo* společnosti Contipro [100] při testování emulze s 1% přídatkem peptidu Recelline na 15 dobrovolnicích. Po 6 týdnech aplikace, tj. na konci experimentu, došlo k poklesu erytému o 6 %.

Ve studii [119] byly hodnoceny účinky antioxidačního séra (obohaceného o 20 % kyseliny askorbové, 1 % tokoferylacetátu a 0,0005 % extraktu z buněčné kultury listů maliníku) na vybrané parametry pleti. Experimentu se zúčastnilo celkem 50 žen v průměrném věku 47 let, jež byly instruovány, aby si sérum aplikovaly na jednu stranu obličeje každý večer po dobu 8 týdnů. Po ukončení studie byl u zúčastněných dobrovolnic detekován průměrný pokles míry erytému kůže o 7,7 % (na ošetřované polovině obličeje), čímž bylo potvrzeno účinné synergické působení použitých aktivních látek. I když byly vitamíny C a E použity v připravovaných formulacích F1–F5 v nižších koncentracích než v hodnoceném séru uvedené studie, monitorované snížení erytému pleti mohlo být podpořeno i vzájemným působením vitamínu C (schopného snižovat produkci melaninu) a vitamínu E snižujícího hyperpigmentaci vyvolanou expozicí UV záření.

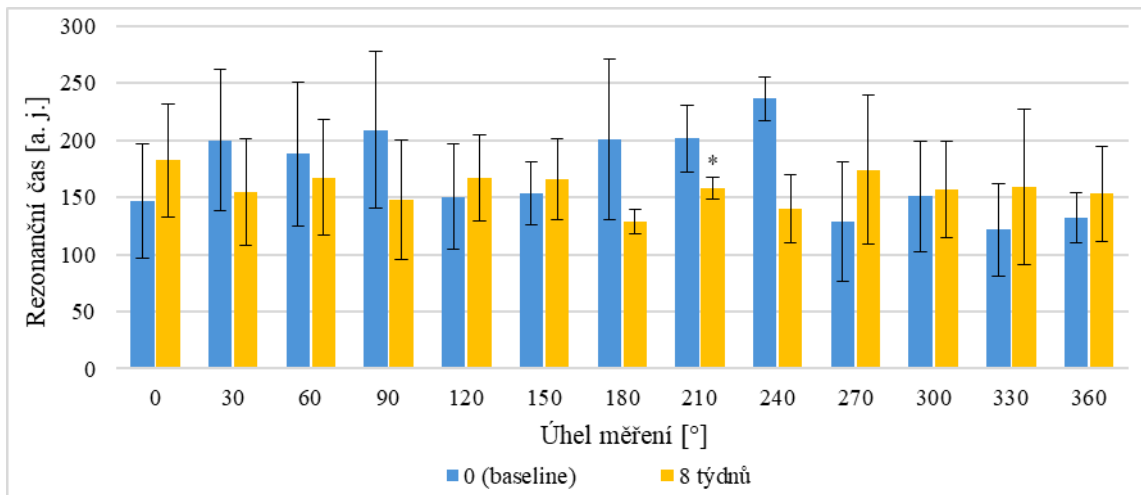


Obrázek 33 Vliv anti-aging formulací na erytém kůže (\*  $p < 0,05$ )

#### Účinnost na elasticitu kůže

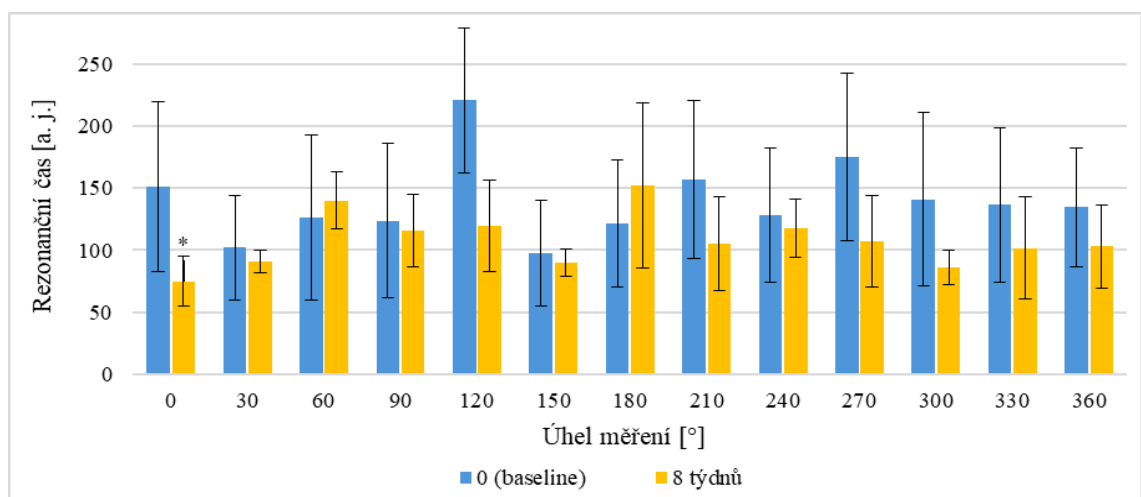
Míra elasticity kůže byla stanovena pomocí reviskometru, který díky dvěma senzorům, z nichž jeden funguje jako vysílač akustických rázových vln a druhý slouží jako přijímač, měří dobu rezonančního průběhu akustické rázové vlny od vysílače k přijímači. Rezonanční čas (RRT), během kterého se vlny kůže šíří, je závislý na stavu elastických vláken a také na hydrataci pokožky [120]. Naměřené rezonanční časy vybraných formulací a monitorovaných oblastí jsou na Obr. 34–38 uvedeny v reviskometrických jednotkách [a. j.]. Čím kratší zaznamenané hodnoty RRT jsou, tím vykazuje kůže vyšší elasticitu a dosahuje tak nižší tuhosti. Cílem aplikovaných anti-aging formulací bylo snížit (podpořit elasticitu pokožky) a též obecně sjednotit hodnoty RRT, tedy snížit anizotropii mechanických vlastností kůže.

Obecně lze konstatovat, že nebyl prokázán pozitivní vliv na elasticitu pokožky dobrovolnic účinkem formulace F1 – pravděpodobně z důvodu absence aktivních anti-aging látek ve složení formulace. Pro prezentaci výsledků byla vybrána pravá periorbitální oblast (viz Obr. 34), vykazující po 8 týdnech experimentu narůstající trend tuhosti pokožky u většiny ze získaných hodnot. Hodnota elasticity naměřená při úhlu  $210^\circ$  byla vyhodnocena jako signifikantní. V ostatních monitorovaných oblastech byly získány obdobné výsledky.



Obrázek 34 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F1 v pravé periorbitální oblasti (\*  $p < 0,05$ )

Zhodnocením výsledků účinku formulace F2 a jejich porovnáním s výsledky formulace F1 lze říci, že obohacení o 1% roztok HA přispělo ke zlepšení elasticity pokožky. Obrázek 35 zobrazuje vyhodnocení elasticity pravé periorbitální oblasti dobrovolnic. Byl sledován příznivý účinek formulace F2 na elasticitu kůže ve většině měřených úhlech. Nicméně i v tomto případě byly detekovány dva měřicí úhly (60° a 180°), při kterých byl zjištěn nárůst tuhosti kůže. Signifikantní pokles rezonančního času nastal při měřícím úhlu 0°.



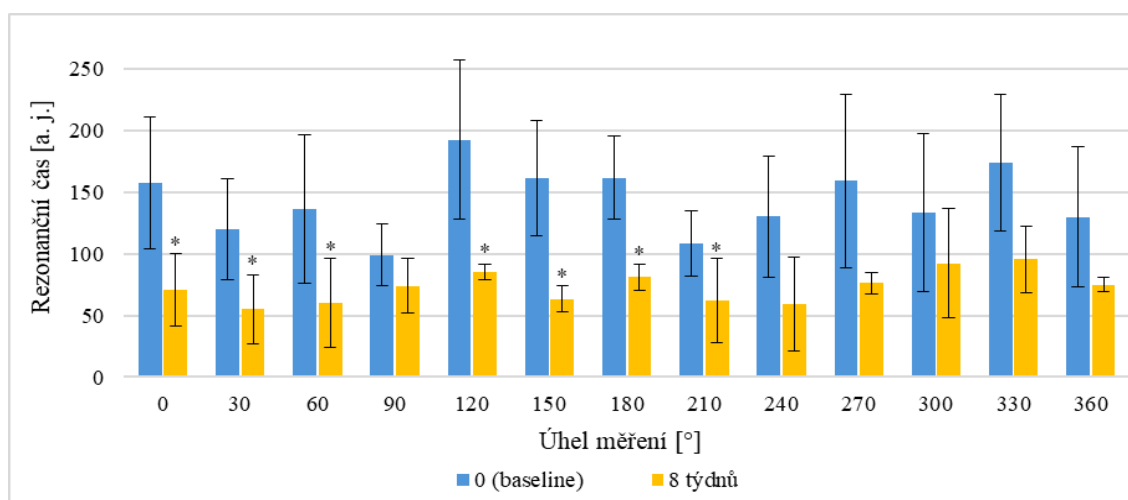
Obrázek 35 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F2 v pravé periorbitální oblasti (\*  $p < 0,05$ )

Pro prezentaci účinků formulací obsahující přídavek HA a látek peptidového charakteru byla vzorově vybrána formulace F4. Její vliv na elasticitu pleti je zobrazen na Obr. 36 pro levou

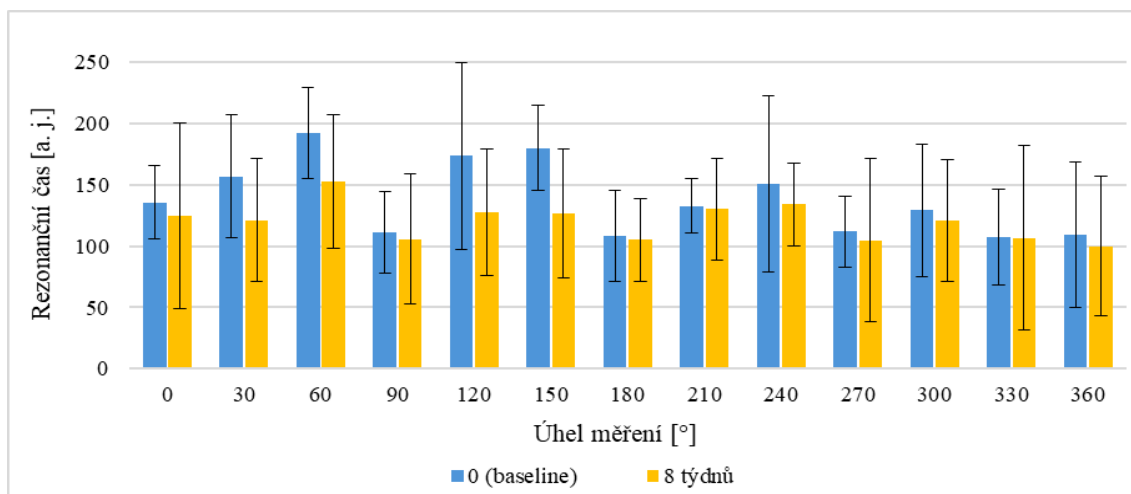
periorbitální část, na Obr. 37 pro středovou oblast čela a na Obr. 38 pro pravou periorbitální část. Z grafů je patrné, že formulace F4 pozitivně ovlivňuje elasticitu pleti. V monitorovaných místech byl shledán výrazně klesající trend rezonančních časů (oproti původnímu nultému měření). Hodnoty signifikance byly v levé periorbitální oblasti zaznamenány u měřících úhlů 0–210° (s výjimkou úhlu 90°), v pravé periorbitální oblasti při úhlech 0 a 150–360° (s výjimkou úhlu 300°). U dalších dvou formulací s obsahem peptidů (F3 a F5) byly zjištěny velice obdobná data prokazující pozitivní vliv připravených krémů na elasticitu pokožky.

S naměřenými daty korelují i výsledky vývojové studie společnosti Contripro, jež ověřovala účinnost zmíněného peptidu na 30 dobrovolnících. Po 4 týdnech používání emulze s 1% přídatkem peptidu Elasef byla elasticita navýšena o 30 % [99].

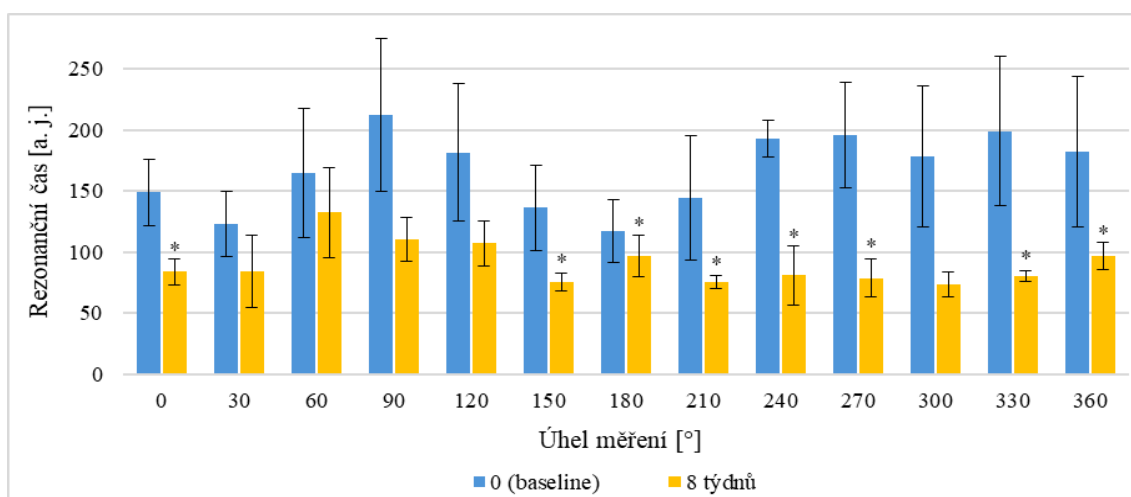
Studie [119] zmíněná již v diskuzi hodnocení vlivu formulací na erytém pokožky byla zaměřena též na posouzení účinku antioxidantních složek vitamínu C, E a buněčné kultury maliníku na elasticitu pokožky. Z naměřených dat bylo zjištěno, že po 8týdenní aplikaci séra s obsahem zmíněných antioxidantních složek došlo k průměrnému navýšení elasticity dobrovolnic o 14,3 %. Nastalo tak v důsledku schopnosti aktivních látek chránit složky ECM před degradací způsobenou ROS a též podporovat produkci a stabilitu kolagenu.



Obrázek 36 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 v levé periorbitální oblasti (\*  $p < 0,05$ )



Obrázek 37 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 ve středové oblasti čela (\*  $p < 0,05$ )



Obrázek 38 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 v pravé periorbitální oblasti (\*  $p < 0,05$ )

#### Vyhodnocení stavu povrchu kůže fotografickou metodou

Zobrazovací zařízení Visioskop® PC 35 umožňuje pořizovat snímky reliéfu kůže s třicetinasobným zvětšením. Během měření je možno zvolit mezi paralelním či křížově polarizovaným světlem. Jedná se o snadnou i rychlou digitální metodu určenou k analýze parametrů kůže. Zařízení bylo využito pro vyhodnocení množství vrásek, pórů i pigmentových skvrn [121].

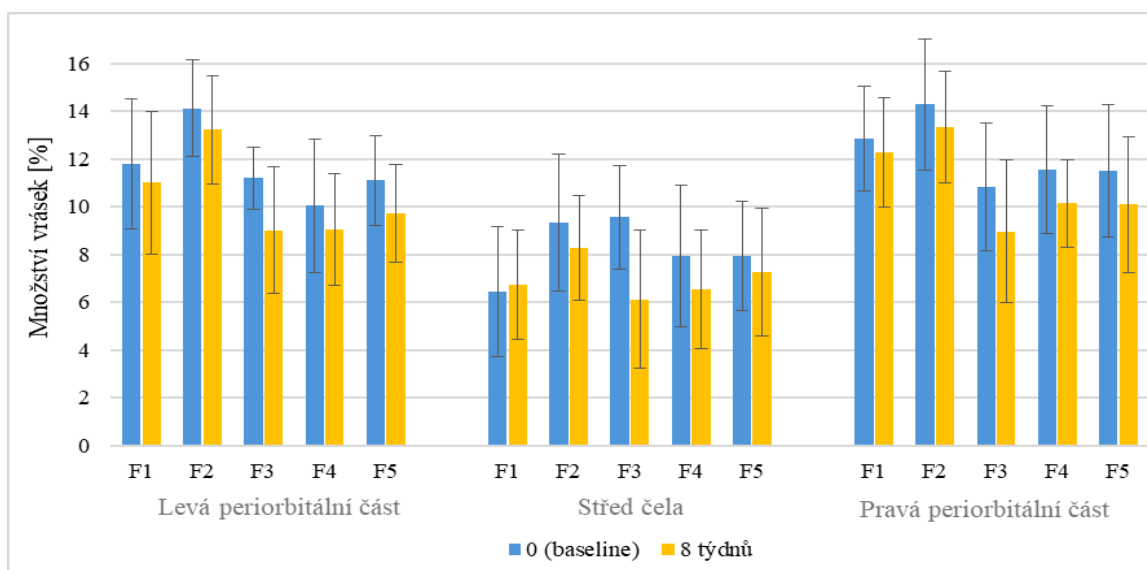
Na Obr. 39 je znázorněno vyhodnocení vlivu jednotlivých formulací na množství vrásek ve všech monitorovaných oblastech. Je patrné, že většina připravených formulací má pozitivní



vliv na redukci vrásek. Opačný jev byl zaznamenán pouze u formulace F1 při měření středové části čela, kde došlo k navýšení vrásek pravděpodobně v důsledku absence anti-aging aktivních peptidů a HA ve složení. K největšímu snížení množství vrásek došlo ve středu čela u dobrovolnic používajících formulaci F3. Pravděpodobně přidavek roztoku HA v kombinaci s peptidem Clodessine do jejího složení se ukázal jako stěžejní pro pokles množství vrásek na čele dokonce o 36,0 %. Formulace F2, F4 a F5 vykazovaly též dobré výsledky, konkrétně u formulací s obsahem peptidů byla změna nejmarkantnější.

Z výsledků je patrné, že zejména formulace s obsahem peptidů projevily schopnost výrazně redukovat množství vrásek. V *in vivo* studiích společnosti Contipro [95, 96, 97] zabývajících se účinností použitých peptidů došli k podobným závěrům. V případě peptidu Clodessine bylo do experimentu zařazeno 30 dobrovolnic používajících emulzi neuvedeného složení s 1% přídávkem peptidu po dobu 6 týdnů. Oproti baselině byl zde zaznamenán pokles vrásek o 52 % [95]. Ve studii [96] zkoumající vliv peptidu Elasef na pleť byla připravena emulze s 5% přídávkem tohoto peptidu určená k používání po dobu 2 týdnů 15 dobrovolnicemi. Na konci experimentu byla detekována redukce vrásek o 37 %. Obdobných výsledků bylo dosaženo i při ověřování účinnosti peptidu Recelline [97], kdy byla vytvořena emulze s jeho 1% přídávkem určená pro 15 dobrovolnic. Po 2 týdnech používání emulze byl u účastnic zaznamenán 30% pokles vrásek.

Na Obr. 40–43. jsou uvedeny snímky reliéfu pokožky před a po 8týdenní aplikaci krémových formulací s pozitivním vlivem na redukci vrásek.



Obrázek 39 Vliv anti-aging formulací na množství vrásek (\*  $p < 0,05$ )



Obrázek 40 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F2 [vlastní zdroj]



Obrázek 41 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F3 [vlastní zdroj]



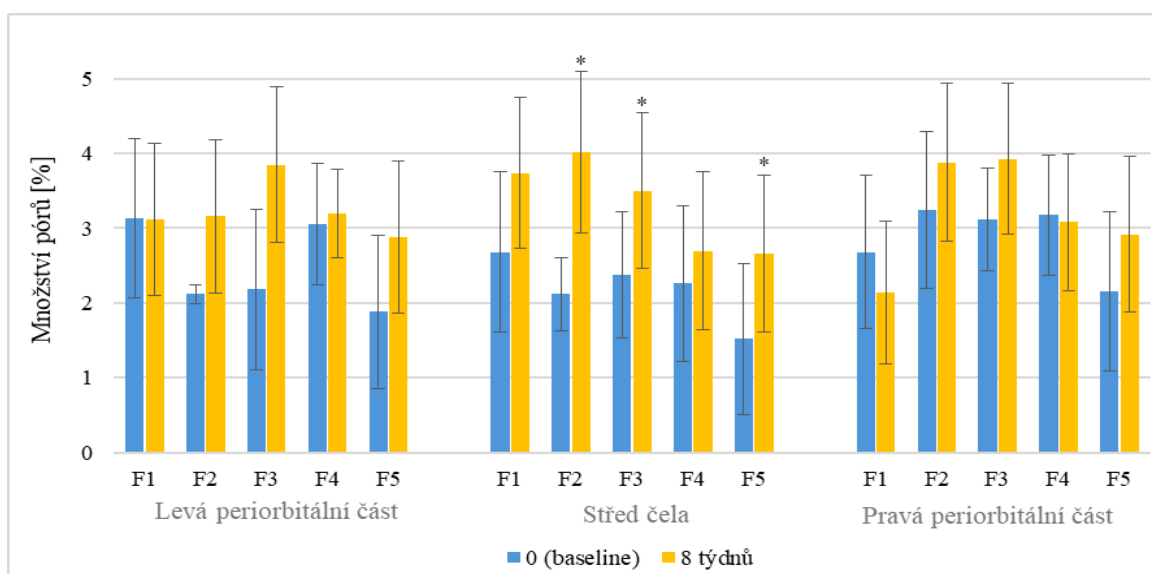
Obrázek 42 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F4 [vlastní zdroj]



Obrázek 43 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F5 [vlastní zdroj]

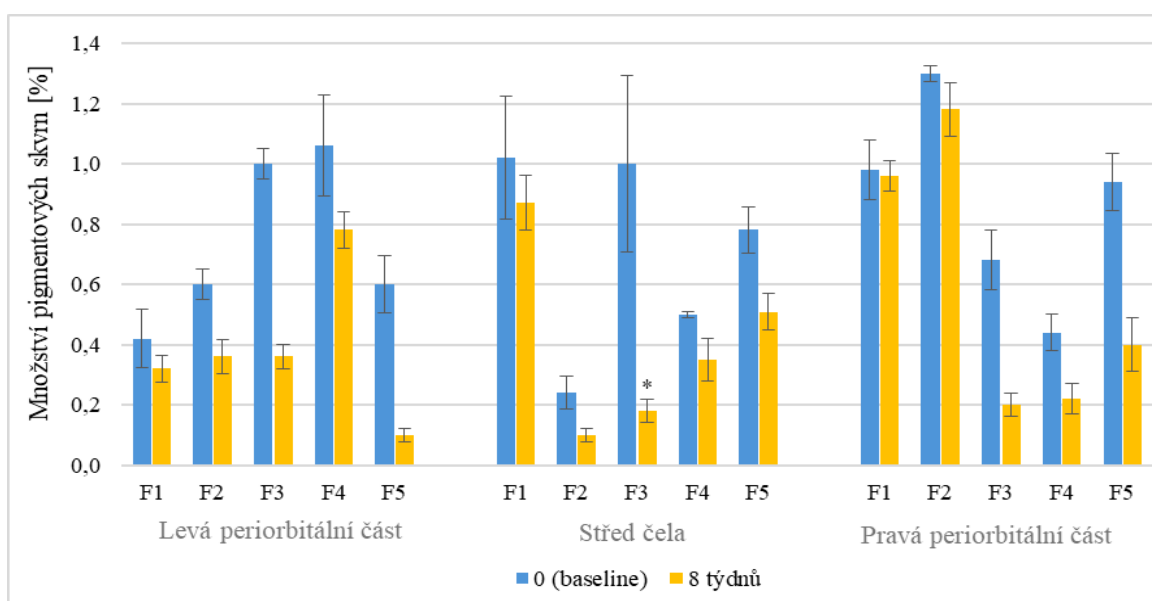
Dalším sledovaným parametrem pomocí skenovací kamery Visioskop® PC 35 bylo množství pórů. Obr. 44 znázorňuje vyhodnocení účinku jednotlivých formulací. Z grafu je patrné, že se nepodařilo prokázat příznivý vliv formulací na množství pórů. Hodnoty formulace F2, F3 a F5 ve středové oblasti čela byly vyhodnoceny jako signifikantní.

Vyhodnocením získaných dat lze konstatovat, že připravené formulace krémů nemají prokazatelný vliv na redukci pórů. Společnost Contipro během vývojové studie *in vivo* [98], ve které byl hodnocen vliv peptidu Clodessine na stav pórů kůže 30 dobrovolnic, však uvádí, že po 6týdenní aplikaci emulze s 1% přídatkem peptidu bylo detekováno snížení množství pórů o 16 %.



Obrázek 44 Vlivu anti-aging formulací na množství pórů (\* p < 0,05)

Posledním monitorovým parametrem pomocí skenovací kamery bylo množství pigmentových skvrn. Z grafu na Obr. 45 lze vyhodnotit, že všechny z připravených anti-aging formulací pozitivně snižovaly množství pigmentových skvrn. Jako nejefektivnější se jeví formulace F3, u které byly zaznamenány nejlepší výsledky. Silná redukce pigmentových skvrn byla zaznamenána i u formulace F5, což kladně koreluje s výsledky mexametrického měření, během kterého byl detekován též velmi příznivý vliv této formulace na snížení erytému pokožky. Signifikantní změna nastala po 8 týdnech používání formulace F3 ve středu čela.



Obrázek 45 Vliv anti-aging formulací na množství pigmentových skvrn (\*  $p < 0,05$ )

### Vyhodnocení kožních replik

Fotometrické zařízení Skin Visiometr® SV 700 je určeno k hodnocení topografie reliéfu kůže. Replika vyrobená z modrého dvousložkového silikonu je umístěna mezi zdroj světla a černobílou CCD kameru. Modrý pigment součástí silikonu pro přípravu replik je schopen rychlé absorpce světelného záření. Množství absorbovaného světla je závislé na tloušťce silikonového otisku povrchu kůže. Na základě různé tloušťky reliéfu byla měřena drsnost pokožky charakterizována parametrem: R1 definujícím vzdálenost mezi nejvyšším a nejnižším vrcholem, R2 jako maximální drsnost monitorované oblasti, R3 představující průměrnou drsnost, R4 popisující hladkost prohlubní reliéfu a R5 jako aritmetický průměr drsnosti [122].

Míra absorpce světla je dána Lambert-Beerovým zákonem (2):

$$\Phi_{\text{ex}} = \Phi_{\text{in}} \cdot e^{-kd} \quad (2)$$

Kde:

$\Phi_{\text{ex}}$  – intenzita světla před vstupem do média,

$\Phi_{\text{in}}$  – intenzita světla po výstupu z média,

$k$  – absorpční konstanta,

$d$  – délka optické dráhy.

S využitím stejného zařízení byly též hodnoceny změny anizotropie a hustoty kůže.

Dle výsledků procentuálních změn parametrů drsnosti uvedených v Tab. 15 je patrné, že byl u souboru dobrovolnic používajících formulaci F1 detekován v monitorové oblasti čela negativní vliv na všechny parametry drsnosti R1–R5. Tyto výsledky byly očekávané, jelikož formulace F1 neobsahovala žádné aktivní látky, které by mohly výrazně redukovat známky stárnutí, s potenciálním anti-aging účinkem byly zastoupeny pouze rostlinné a esenciální oleje. Změny parametrů drsnosti R4 a R5 v levé periorbitální oblasti (L) a R1 a R4 na čele (Č) byly stanoveny jako signifikantní. V porovnání s hodnotami získanými před pravidelnou aplikací formulace F2 došlo v levé periorbitální oblasti na konci experimentu k poklesu hodnot 4 z 5 parametrů drsnosti (signifikantní R1, R3, R5), z nichž nejvýraznější byl zjištěn u parametru R2 (o 4,1 %). Ve středové části čela byl zaznamenán výrazný pokles hloubky vrásek (největší u parametru R2 o 36,2 %). Na pravé měřené oblasti (P) byly naměřeny různorodé výsledky, signifikantní změny nastaly u parametru R1 a R4. Vyhodnocením parametrů drsnosti kůže souboru žen používajících emulzi (F3), jež obsahovala přídavek HA i peptidu Clodessine, byly zaznamenány pozitivní výsledky v obou periorbitálních oblastech. Signifikance byla zjištěna u parametrů R1–R3 (Č) a R5 (P). Ještě příznivějších výsledků bylo dosaženo při vyhodnocení replik reliéfu kůže dobrovolnic s formulací F4. Složení formulace (sestavující ze základní krémové matrice, 1% roztoku HA a peptidu Elasef) mělo příznivý vliv na redukci hloubky vrásek, což dokazuje sestupný trend hodnot parametrů drsnosti. Pouze u parametru R2 měřeného ve středové oblasti čela nebyla zaznamenána žádná změna. Za signifikantní byly označeny změny parametrů R1–R5 (L) a R1, R4 a R5 (P). Z vyhodnocení anti-aging účinku formulace F5 obsahující přídavek roztoku HA a peptidu Recelline vyplývá, že došlo ke snížení všech parametrů drsnosti. Signifikantní hodnoty

drsnosti byly naměřeny u parametru R2, R4 a R5 (L), R1–R5 (Č) a R2 a R3 (P). Všechny detekované signifikantní změny jsou v Tab. 15 označeny hvězdičkou.

Tabulka 15 Vyhodnocení parametrů drsnosti (\* p < 0,05)

Měřená oblast	Formulace	Změna parametru drsnosti [%]				
		R1	R2	R3	R4	R5
Levá periorbitální část	F1	-8,2	+4,0	+10,2	-27,4*	-28,6*
	F2	-0,4*	-4,1	-1,2*	0,0	-2,0*
	F3	-34,5	-30,1	-21,2	-52,8	-40,7
	F4	-33,5*	-23,5*	-18,8*	-43,1*	-48,2*
	F5	-36,8	-41,3*	-41,9	-30,1*	-35,9*
Středová oblast čela	F1	+27,7*	+67,6	+41,2	+20,0*	+23,6
	F2	-25,0	-36,2	-27,9	-15,9	-1,8
	F3	-3,0*	-1,8*	-1,9*	-2,6	0,0
	F4	-2,8	0,0	-7,3	-20,1	-18,5
	F5	-29,0*	-32,9*	-32,2*	-32,5*	-29,7*
Pravá periorbitální část	F1	-5,6	-9,9	+2,4	-19,5	-11,0
	F2	-1,9*	-13,5	-3,0	+3,3*	+19,0
	F3	-28,2	-31,7	-22,3	-35,3	-23,8*
	F4	-28,5*	-29,6	-26,8	-27,0*	-32,4*
	F5	-43,0	-48,7*	-48,4*	-39,2	-46,0

Další hodnocenou charakteristikou byla anizotropie, tj. preferované směry vláken v důsledku vystavení dlouhodobému vnějšímu napětí kůže. I když nebyly doposud anizotropické vlastnosti kůže zcela pochopeny, předpokládá se, že je anizotropie zapříčiněna kontrakcí svalů a dermálních struktur, jejichž orientace vymezuje roztažitelnost a elasticitu pokožky. V důsledku stárnutí dochází k vnitřním i vnějším změnám kůže, které vedou ke zvýšení anizotropie pokožky. Studium této charakteristiky je významné nejen v kosmetickém průmyslu, ale také v oblasti medicíny, zvláště plastické chirurgie [123, 124].

Vyhodnocení změn anizotropie kůže je pro všechny formulace souhrnně uvedeno v Tab. 16. Dle očekávání byl detekován sestupný trend změny anizotropního indexu u formulací obohacených o HA a látky peptidové povahy. Zejména formulace F3 a F5 vykazovaly nejpriznivější účinky. Vyhodnocením účinku formulace F1 monitorovaného v levé i pravé periorbitální oblasti bylo zjištěno, že též použité esenciální a rostlinné oleje ve složení

formulací mají schopnost příznivě ovlivňovat mechanické vlastnosti kůže. Signifikantní hodnoty byly potvrzeny v případě formulace F2 (L), F3 (Č, P) a F5 (P) – v Tab. 16 označeny symbolem hvězdičky.

Tabulka 16 Vyhodnocení anizotropie kůže (\*  $p < 0,05$ )

Měřená oblast	Změna anizotropie [%]				
	F1	F2	F3	F4	F5
Levá periorbitální část	-10,3	-23,8*	-42,9	-39,5	-43,5
Středová oblast čela	0,0	-12,3	-39,0*	-19,9	-28,7
Pravá periorbitální část	-12,1	-26,3	-43,2*	-37,7	-40,5*

Posledním parametrem hodnoceným pomocí zařízení Skin Visiometr® SV 700 byla hustota kůže, jež se odvíjí od změn probíhajících v kůži v důsledku stárnutí. Poklesem hustoty kolagenu a dalších složek ECM kůže ztrácí objem dermální vrstvy, elasticitu, jeví se ochablá a vykazuje množství vzniklých vrásek. Topickou aplikací kosmetických přípravků s obsahem aktivních látek s regeneračními schopnostmi (např. antioxidanty, peptidy, HA), lze však částečně zvýšit úroveň hustoty kůže a podpořit tak její mechanické vlastnosti [125].

Vyhodnocení změn hustoty kůže je pro všechny formulace i monitorované oblasti souhrnně zaznamenáno v Tab. 17. Z výsledku je patrné, že měly formulace příznivý vliv na podporu hustoty kůže. Jediná výjimka byla zaznamenána při působení formulace F1 na středovou oblast čela, kde došlo k poklesu hustoty o 8,1 %. Hodnoty v ostatních dvou monitorovaných oblastech však dokazují efektivní účinek použitých antioxidantů na změnu hustoty kožních vláken. Naměřená data u formulace F2 dokazují, že přídavek 1% roztoku HA do složení emulze účinně napomáhá produkci složek ECM. Nejvýraznější změny nastaly u formulací F3–F5 obohacených o 1% HA a látky peptidového charakteru. Pravděpodobně přídavek peptidu Recelline podporující syntézu kolagenu do složení formulace F5 přispěl k největší schopnosti této formulace pozitivně zvyšovat úroveň hustoty kůže. Signifikantní změny nastaly u formulace F1 a F2 (P), F3 a F4 (S) a v případě krému F5 (L), všechny jsou v Tab. 17 označeny hvězdičkou.

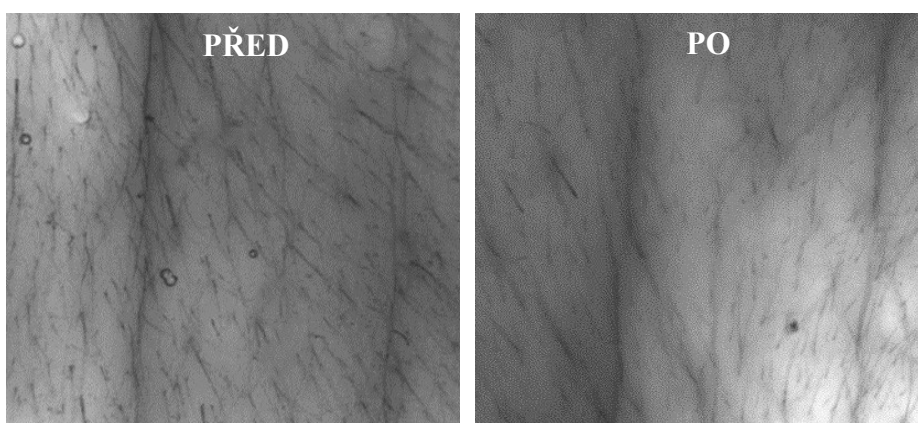
K pozitivním výsledkům došli též Smiths a Herbst ve své studii [126] ověřující vliv komplexu extraktu květů granátového jablka a derivátu vitamínu C (askorbylfosfátu sodného) na stárnoucí pokožku. *In vivo* studie bylo zúčastněno celkem 20 žen ve věku 40–65 let, které byly instruovány, aby používaly dvakrát denně krém s 1% přídavkem zmíněného komplexu. Díky schopnosti extraktu snižovat aktivitu MMP-1 a antioxidačnímu vlivu vitamínu C

podporujícího též syntézu kolagenu, bylo možné po 56 dnech používání krému zaznamenat navýšení hustoty kůže o 32,5 %.

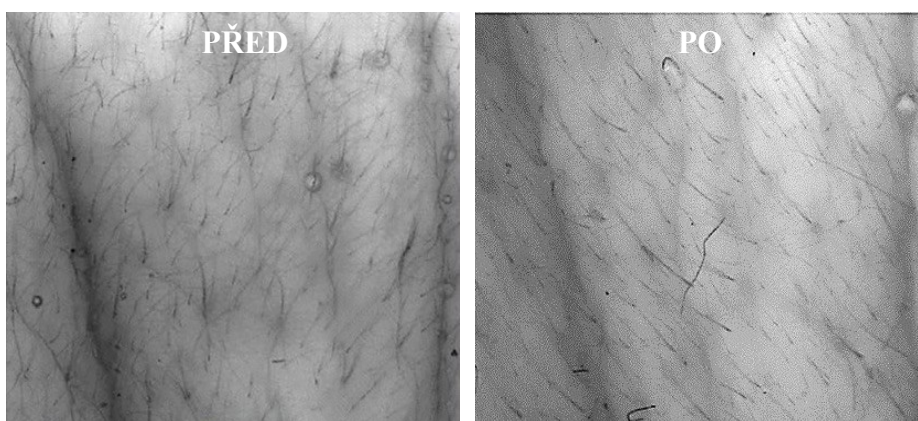
Tabulka 17 Vyhodnocení změny hustoty kůže (\*  $p < 0,05$ )

Měřená oblast	Změna hustoty [%]				
	F1	F2	F3	F4	F5
Levá periorbitální část	+3,8	+5,0	+11,2	+11,9	+14,2*
Středová oblast čela	-8,1	+2,0	+5,8*	+10,5*	+10,7
Pravá periorbitální část	+1,9*	+7,2*	+8,9	+10,4	+13,4

Účinnost formulací F2–F5 interpretovanou výše pomocí parametrů drsnosti popisujících stav kožního mikroreliefu ve studovaných oblastech doplňují fotografické záznamy z visioskopu viz Obr. 46–49.

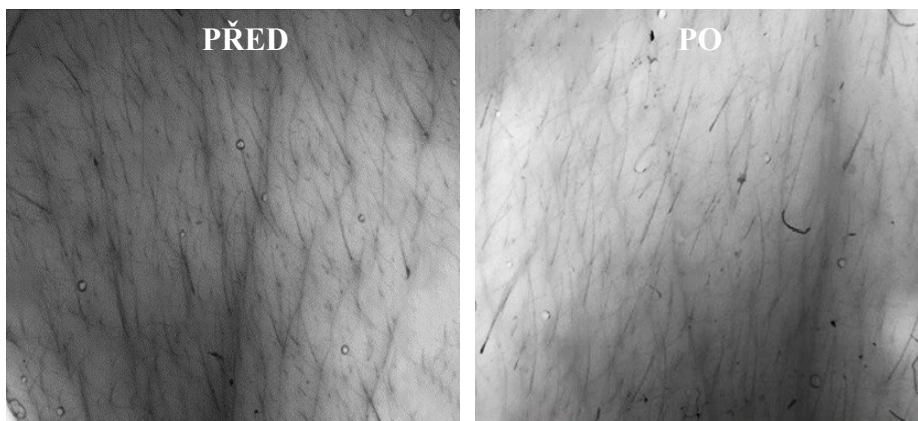


Obrázek 46 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F2 [vlastní zdroj]

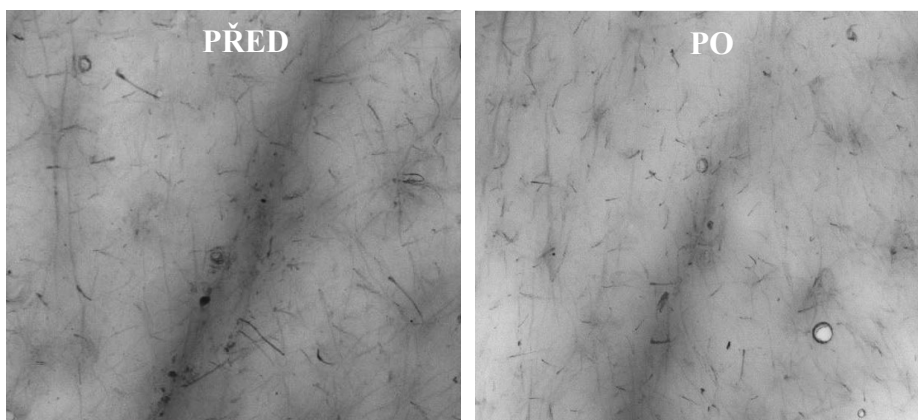


Obrázek 47 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F3 [vlastní zdroj]





Obrázek 48 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F4 [vlastní zdroj]



Obrázek 49 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F5 [vlastní zdroj]

## 9.5 Senzorické testy

Do sensorického hodnocení vzorků připravených krémových formulací byly zařazeny pořadové i párové porovnávací zkoušky. Sensorické testování bylo realizováno dotazníkovou metodou, které se zúčastnilo celkem 14 posuzovatelů.

### Pořadová zkouška

Principem pořadové zkoušky je předložení skupiny nahodile seřazených testovaných vzorků s cílem posuzovatele utřídit vzorky dle hodnotícího kritéria. Anonymně předložené krémové formulace byly posuzovateli řazeny dle barvy, roztíratelnosti, vstřebatelnosti a vlastní preference. První pořadová zkouška byla zaměřena na intenzitu barvy (1 – nejsvětlejší, 5 – nejtmavší) vzorků anti-aging formulací. Algoritmem výpočtu pomocí Friedmenova testu (viz Příloha VII) padla výsledná hodnota testového kritéria do kritického oboru. S 95% spolehlivostí bylo prokázáno, že mezi vzorky existuje alespoň jeden, který se liší

od ostatních. Na základě součtu pořadí byl jako nejsvětější vyhodnocen vzorek F2 sestávající ze základové báze a přidaného 1% roztoku HA. Nejtmavší barva byla přisouzena vzorku formulace F1 (základní matrice krému), viz Tab. 18. Intenzita barevného odstínu krémů je do jisté míry ovlivněna přidavkem hydroxidu sodného za účelem úpravy pH. Je tedy pravděpodobné, že seřazení vzorků koresponduje s různorodým přidavkem 10% roztoku hydroxidu sodného. Cílem druhé pořadové zkoušky bylo seřadit vzorky dle roztíratelnosti (1 – nejlépe roztíratelný, 5 – nejhůře roztíratelný). Stejným algoritmem výpočtu jako v předešlé zkoušce bylo zjištěno, že jako nejlépe roztíratelný vzorek byla posuzovateli vybrána formulace F4 sestávající ze základní matrice, 1% roztoku HA a peptidu Elasef. Pravděpodobně i z důvodu vyšší viskozity i hodnot tuhosti byl nejhůře roztíratelným vzorkem F1. Vyhodnocení na základě součtu pořadí je uvedeno též v Tab. 18. Poslední dvě pořadové zkoušky byly soustředěny na vstřebatelnost (1 – nejlépe vstřebatelný, 5 – nejhůře vstřebatelný) a vlastní preference posuzovatele (1 – nejvíce preferovaný, 5 – nejméně preferovaný). S 95% spolehlivostí nebyl prokázán rozdíl ve vstřebatelnosti, ani v preferenci vzorků jednotlivých posuzovatelů.

Tabulka 18 Součty pořadí vzorků u pořadové zkoušky se zaměřením na intenzitu barvy a roztíratelnost

<b>Formulace</b>	F1	F2	F3	F4	F5
<b>Posuzovaný znak</b>	<b>Součet pořadí</b>				
Intenzita barvy	64	31	34	42	39
Roztíratelnost	59	37	41	33	40

#### Párová porovnávací zkouška

Párové porovnávací zkoušky slouží k porovnání dvou vzorků ve sledovaném znaku. V této praktické části byl využit tzv. jednostranný test, díky kterému lze posoudit, zda je jeden ze vzorků preferovanější před druhým či vykazuje větší intenzitu ve sledovaném kritériu. Byly zařazeny párové porovnávací zkoušky soustředěné na roztíratelnost, vstřebatelnost a určení preference vzorků. První párová porovnávací zkouška byla zaměřena na roztíratelnost posuzovaných vzorků. U posuzování dvojice F1:F2 a u dvojice F4:F5 se nepodařilo prokázat rozdíl v roztíratelnosti těchto posuzovaných vzorků. Naopak při porovnávání páru F3:F4 a F1:F5 se s 95% spolehlivostí podařilo prokázat rozdíl v jejich roztíratelnosti. Vzorek F4 byl označen jako lépe roztíratelný oproti vzorku F3 a vzorek formulace F1 byl naopak zvolen za hůře roztíratelný oproti vzorku F5. Výsledky těchto dvou posuzovaných dvojic vzorků

korelují i s vyhodnocením pořadové zkoušky na roztíratelnost. V případě určení vstřebatelnosti či preferovanějšího vzorku nebyl prokázán rozdíl u žádné z dvojic vzorků. V Tab. 19 je uvedeno vyhodnocení párové porovnávací zkoušky. Posuzované dvojice, mezi kterými se podařilo prokázat rozdíl, jsou v tabulce označeny symbolem hvězdičky.

Tabulka 19 Vyhodnocení párové porovnávací zkoušky (\*  $p < 0,05$ )

<b>Pár formulací</b>	F1:F2	F3:F4	F4:F5	F1:F5
<b>Posuzovaný znak</b>	<b>Součet za vybranou formulaci</b>			
Roztíratelnost	9:5	3:11*	7:7	3:11*
Vstřebatelnost	8:6	5:9	5:9	6:8
Preference	6:8	5:9	7:7	6:8

## ZÁVĚR

Teoretická část byla zaměřena na problematiku stárnutí kůže. Konkrétně byly v práci popsány teorie stárnutí lidského organismu, intrinsické a extrinsické příčiny i molekulární mechanismy a změny odehrávající se ve stárnoucí kůži. Přehled je doplněn vybranými aktivními látkami, které mají prokazatelný kosmetologický účinek k potlačení či redukování projevů stárnutí pokožky.

V praktické části byly navrženy a připraveny formulace emulzí O/V sestávající ze základové matrice krému obohacené o nízkomolekulární HA a peptidy s anti-aging účinkem. U těchto krémových formulací byla testována mikrobiologická čistota a účinnost zvoleného konzervačního systému, tepelná stabilita fyzikálních vlastností, *in vivo* účinnost ověřovaná biofyzikálními parametry a sensoricky posuzované vybrané organoleptické vlastnosti.

Ověřování mikrobiologické čistoty formulací nepotvrdilo přítomnost žádných mikroorganismů, kvasinek, či plísní. Použité konzervanty *Methylparaben* a *Ethylparaben* dokázaly inhibovat růst *P. aeruginosa*, čímž byla prokázána účinnost zvolené koncentrace i celého konzervačního systému.

Kromě zintenzivnění vonné fáze formulací nebyl zjištěn výrazný negativní vliv teplot  $\leq 47$  °C na vizuálně hodnocené organoleptické vlastnosti formulací, viskozitu, texturní vlastnosti (tuhost, kohezivitu, konzistenci, adhezivitu), ani jejich pH. Vystavením emulzí teplotě 55 °C došlo k úplnému rozpadu emulzí separací fází pravděpodobně v důsledku nestability emulgátoru *Polyglyceryl 3 Methylglucose Distearate*.

Dle získaných výsledků z 8týdenního bioinženýrského *in vivo* ověřování účinnosti formulací na dobrovolnicích bylo zjištěno několik poznatků. Hydratační schopnost byla prokázána pouze u formulace F5 obohacené o HA a peptid Recelline, ostatní typy formulací hydrataci kůže nepodpořily. Všechny emulze vykazovaly schopnost podporovat bariérovou funkci kůže zvyšováním hodnot TEWL. Účinkem formulací F1, F3, F4, F5 byly zvýšeny hodnoty pH do intervalu odpovídajícímu normálnímu stavu kůže. Hodnoty pH dobrovolnic používajících formulaci F2 obohacenou o HA setrvaly od začátku experimentu bez výrazné změny. Účinkem všech formulací došlo k výraznému snížení množství pigmentových skvrn, avšak na redukcii množství pórů neměla pozitivní vliv emulze žádná. Formulace F5 prokázala schopnost snižovat míru erytému. Ke zvýšení elasticity pokožky korespondujícího se sníženými hodnotami rezonančního času došlo účinkem formulací obohacených o aktivní anti-aging látky, zejména v případech kombinace HA s peptidy (F3–F5). U formulací

obohacených aktivními anti-aging látkami byla též potvrzena schopnost redukovat množství vrásek, podporovat hustotu a mechanické vlastnosti kůže klesajícími hodnotami anizotropie. Účinek základní matrice krému F1 na tyto parametry nebyl tak příznivý, jelikož v jejím složení byly zastoupeny pouze rostlinné a esenciální oleje s potenciální schopností mírnit známky stárnoucí pleti. Vyhodnocením dat parametrů drsnosti kůže byly shledány signifikantně potvrzené změny v mikroreliefu kůže periorbitální oblasti dobrovolnic používajících formulace s anti-aging přísadami (F2–F5).

Během sensorického posuzování organoleptických vlastností formulací, konkrétně v rámci pořadové zkoušky byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi připravenými formulacemi v intenzitě jejich barvy a roztíratelnosti. Párová porovnávací zkouška prokázala statisticky významné rozdíly při porovnávání roztíratelnosti dvojic formulací F3:F4 a F1:F5.

Lze konstatovat, že se podařilo formulovat mikrobiologicky čisté a stabilní formulace. Emulzní řada krémů pozitivně ovlivňovala většinu monitorovaných parametrů kůže. Anti-aging účinek formulací na pokožku byl výrazně podpořen přidavkem inkorporovaných peptidů.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MINE, Solène; FORTUNEL, Nicolas O.; PAGEON, Hervé; ASSELINEAU, Daniel. Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. Online. *PLoS ONE*. 2008, vol. 3, no. 12. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004066>. [cit. 2023-11-14].
- [2] PLÁTENÍK, Jan. Biochemická podstata stárnutí. Online. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2020, č. 4, s. 132–138. ISSN 1210-7921. Dostupné z: [https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2021/01/KBM\\_4\\_2020\\_Platenik-132.pdf](https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2021/01/KBM_4_2020_Platenik-132.pdf). [cit. 2023-11-14].
- [3] TAOFIQ, Oludemi; GONZÁLEZ-PARAMÁS, Ana M.; MARTINS, Anabela; BARREIRO, Maria Filomena a FERREIRA, Isabel C.F.R. Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics—A review. Online. *Industrial Crops and Products*. 2016, vol. 90, s. 38–48. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.012>. [cit. 2023-11-14].
- [4] MICHALUN, M. Varinia a DINARDO, Joseph C. *Skin Care and Cosmetic Ingredients Dictionary*. 4th edition. Milady, 2014. ISBN 978-1-285-06079-8.
- [5] REW, Jehyeok; CHOI, Young-Hwan; KIM, Hyungjoon a HWANG, Eenjun. Skin Aging Estimation Scheme Based on Lifestyle and Dermoscopy Image Analysis. Online. *Applied Sciences*. 2019, vol. 9, no. 6. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app9061228>. [cit. 2023-11-14].
- [6] SHAI, Avi; MAIBACH, Howard I. a BARAN, Robert. *Handbook of Cosmetic Skin Care*. 2nd edition. CRC Press, 2009. ISBN 978-0415467186.
- [7] KALVACH, Zdeněk; ZADÁK, Zdeněk; JIRÁK, Roman; ZAVÁZALOVÁ, Helena; SUCHARDA Petr et. al. *Geriatric a gerontologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0548-6.
- [8] BAČOVÁ, Martina. *Fyziologické a patofyziologické aspekty stárnutí*. Online, bakalářská práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 2018. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/98569/130229537.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [cit. 2023-11-14].

- [9] MALÍKOVÁ, Eva. *Péče o seniory v pobytových zařízeních sociálních služeb*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-271-2030-7.
- [10] LIPSKY, Martin S. a KING, Mitch. Biological theories of aging. Online. *Disease-a-Month*. 2015, vol. no, č. 11, s. 460–466. ISSN 00115029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.09.005>. [cit. 2023-11-14].
- [11] ĎURÁČOVÁ, Miroslava. *Telomery jako biomarkery stárnutí*. Online, bakalářská práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 2011. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/50115/BPTX\\_2009\\_1\\_0\\_267\\_875\\_0\\_80772.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/50115/BPTX_2009_1_0_267_875_0_80772.pdf?sequence=1&isAllowed=y). [cit. 2023-11-14].
- [12] ĎOUBAL, Stanislav. *Teoretická gerontologie*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-481-0.
- [13] GOLKOVÁ, Monika. Anti-Aging medicína a dermatologie. Online. *Dermatologie pro praxi*. 2009, roč. 3, č. 4, s. 163–167. ISSN 1802-2960. Dostupné z: <http://www.dermatologiepropraxi.cz/archiv.php>. [cit. 2023-11-14].
- [14] BAREL, Andre' O.; PAYE, Marc a MAIBACH, Howard I. (ed.). *Handbook of cosmetic science and technology*. 3rd edition. USA: Informa Healthcare. 2009. ISBN 978-1-4200-6963-1.
- [15] MITSUI, Takeo (ed.). *New Cosmetic Science*. Amsterdam: Elsevier Science, 1997. ISBN 0-444-82654-8.
- [16] BAKI, Gabriella a ALEXANDER, Kenneth S. *Introduction to Cosmetic Formulation and Technology*. New Jersey: John Wiley, 2015. ISBN 978-1-118-76378-0.
- [17] NERADOVÁ, Martina. Možnosti korekce stárnutí pleti. Online. *Dermatologie pro praxi*. 2016, roč. 10, č. 3, s. 148–151. ISSN 1803-5337. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2016/03/10.pdf>. [cit. 2024-02-19].
- [18] FARAGE, Miranda A.; MILLER, Kenneth W. a MAIBACH, Howard I. *Textbook of Aging Skin*. Berlin: Springer, 2016. ISBN 978-3-642-27814-3.
- [19] LUEBBERDING, S.; KRUEGER, N. a KERSCHER, M. Skin physiology in men and women: *in vivo* evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, vol. 35, no. 5, s. 477–483. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12068>. [cit. 2024-03-30].

- [20] RAHROVAN, S.; FANIAN, F.; MEHRYAN, P.; HUMBERT, P. a FIROOZ, A. Male versus female skin: What dermatologists and cosmeticians should know. Online. *International Journal of Women's Dermatology*. 2018, vol. 4, no. 3, s. 122–130. ISSN 23526475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2018.03.002>. [cit. 2024-03-30].
- [21] THORNTON, M. Julie. Estrogens and aging skin. Online. *Dermato-Endocrinology*. 2014, vol. 5, no. 2, s. 264–270. ISSN 1938-1980. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/derm.23872>. [cit. 2023-12-07].
- [22] LITVIK, Radek. Hormonální stárnutí kůže. Online. *Dermatologie pro praxi*. 2008, roč. 2, č. 5, s. 226–229. ISSN 1803-5337. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2008/05/04.pdf>. [cit. 2024-02-19].
- [23] THOMAS, Pat. *Skin deep: The Essential Guide to What's in the Toiletries and Cosmetics You Use*. Rodale, 2008. ISBN 978-1-9057-44-23-7.
- [24] WALKER, Mike. Human skin through the ages. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022, no. 622. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121850>. [cit. 2024-02-19].
- [25] PAPACCIO, Federica; D'ARINO, Andrea; CAPUTO, Silvia a BELLEI, Barbara. Focus on the Contribution of Oxidative Stress in Skin Aging. Online. *Antioxidants*. 2022, vol. 11, no. 6. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11061121>. [cit. 2023-12-07].
- [26] KRUTMANN, Jean; BOULOC, Anne; SORE, Gabrielle; BERNARD, Bruno A. a PASSERON, Thierry. The skin aging exposome. Online. *Journal of Dermatological Science*. 2017, vol. 85, no. 3, s. 152–161. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.09.015>. [cit. 2024-02-19].
- [27] TOBIN, Desmond J. Introduction to skin aging. Online. *Journal of Tissue Viability*. 2017, vol. 26, no. 1, s. 37–46. ISSN 0965206X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>. [cit. 2023-12-07].
- [28] AK, Mohiuddin. Skin Aging & Modern Age Anti-Aging Strategies. Online. *International Journal of Clinical Dermatology & Research*. 2013. ISSN 2332-2977. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.19070/2332-2977-1900052>. [cit. 2024-02-19].
- [29] GRAGNANI, Alfredo; CORNICK, Sarita Mac; CHOMINSKI, Verônica; RIBEIRO DE NORONHA, Samuel Marcos; ALVES CORRÊA DE NORONHA, Silvana



- Aparecida et al. Review of Major Theories of Skin Aging. Online. *Advances in Aging Research*. 2014, vol. 3, no. 4, s. 265–284. ISSN 2169-0499. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/aar.2014.34036>. [cit. 2023-11-14].
- [30] CLATICI, Victor Gabriel; RACOCEANU, Daniel; DALLE, Claude; VOICU, Cristiana a TOMAS-ARAGONES, Lucia et al. Perceived Age and Life Style. The Specific Contributions of Seven Factors Involved in Health and Beauty. Online. *Maedica – a Journal of Clinical Medicine*. 2017, vol. 12, no. 3, s. 191–201. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706759/>. [cit. 2023-12-07].
- [31] VIERKÖTTER, Andrea a KRUTMANN, Jean. Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. Online. *Dermato-Endocrinology*. 2014, vol. 4, no. 3, s. 227–231. ISSN 1938-1980. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/derm.19858>. [cit. 2024-02-19].
- [32] PARRADO, Concepcion; MERCADO-SAENZ, Sivia; PEREZ-DAVO, Azahara; GILABERTE, Yolanda a GONZALEZ, Salvador et al. Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2019, vol. 10. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00759>. [cit. 2024-02-19].
- [33] OYETAKIN-WHITE, P.; SUGGS, A.; KOO, B.; MATSUI, M. S. a YAROSH, D. at al. Does poor sleep quality affect skin ageing? Online. *Clinical and Experimental Dermatology* [online]. 2015, vol. 40, no. 1, s. 17–22. ISSN 03076938. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ced.12455>. [cit. 2024-02-19].
- [34] BURGESS, Cheryl M., ed. *Cosmetic Dermatology*. Springer, 2005. ISBN 978-3540230649.
- [35] BAUMANN, Leslie a WEISBERG, Edmund; SAGHARI, Sogol (ed.). *Cosmetic Dermatology: Principles and Practice*. 2nd edition. The McGraw-Hill Companies, 2009. ISBN 978-0-07-164128-9.
- [36] SCHMID, Daniel; RETO, Muggli a ZÜLLI, Fred. Collagen glycation and skin aging. Online. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*. London: Wilmington Media. ISSN 1358-2453. Dostupné z: <https://mibellebiochemistry.com/media/289/download?attachment>. [cit. 2023-12-07].

- [37] BAUMANN, Leslie. *Cosmeceuticals and Cosmetic Ingredients*. McGraw-Hill Education, 2015. ISBN 978-0-07-179399-5.
- [38] DAYAN, Nava, ed. *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*. William Andrew, 2008. ISBN 978-0-8155-1584-5.
- [39] FARAGE, Miranda A.; MILLER, Kenneth W.; ELSNER, Peter a MAIBACH, Howard I. Functional and physiological characteristics of the aging skin. Online. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2008, vol. 20, no. 3, s. 195–200. ISSN 1594-0667. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF03324769>. [cit. 2024-02-19].
- [40] DOS SANTOS, Laurita; TIPPAVAJHALA, Vamshi Krishna; MENDES, Thiago Oliveira; DA SILVA, Michely G. Pereira a FÁVERO, Priscila P. et al. Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy. Online. *Vibrational Spectroscopy*. 2019, no. 100, s. 123–130. ISSN 09242031. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.11.010>. [cit. 2024-02-19].
- [41] SGONC, Roswitha a GRUBER, Johann. Age-Related Aspects of Cutaneous Wound Healing: A Mini-Review. Online. *Gerontology*. 2013, vol. 59, no. 2, s. 159–164. ISSN 0304-324X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000342344>. [cit. 2024-02-19].
- [42] AL-NUAIMI, Yusur; SHERRATT, Michael J. a GRIFFITHS, Christopher E.M. Skin health in older age. Online. *Maturitas*. 2014, vol. 79, no. 3, 256–264. ISSN 03785122. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.08.005>. [cit. 2024-02-19].
- [43] LAUBE, Simone. Skin infections and ageing. Online. *Ageing Research Reviews*. 2004, vol. 3, no. 1, s. 69–89. ISSN 15681637. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2003.08.003>. [cit. 2024-02-19].
- [44] BLUME-PEYTAVI, Ulrike; KOTTNER, Jan; STERRY, Wolfram; HODIN, Michael W. a GRIFFITHS, Tamara W. et al. Age-Associated Skin Conditions and Diseases: Current Perspectives and Future Options. Online. *The Gerontologist*. 2016, vol. 56, no. 2, s. 230–242. ISSN 0016-9013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/geront/gnw003>. [cit. 2024-02-19].
- [45] WANG, Zhen; MAN, Mao-Qiang; LI, Tienan; ELIAS, Peter M. a MAURO, Theodora M. Aging-associated alterations in epidermal function and their clinical significance. Online. *Aging*. 2020, vol. 12, no. 6, s. 5551–5565. ISSN 1945-4589. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/aging.102946>. [cit. 2023-12-07].

- [46] KANG, Hee Young; LEE, Jin Wook; PAPACCIO, Federica; BELLEI, Barbara a PICARDO, Mauro. Alterations of the pigmentation system in the aging process. Online. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2021, vol. 34, no. 4, s. 800–813. ISSN 1755-1471. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12994>. [cit. 2023-12-07].
- [47] COSTA, Erika F.; MAGALHÃES, Wagner V. a DI STASI, Luiz C. Recent Advances in Herbal-Derived Products with Skin Anti-Aging Properties and Cosmetic Applications. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 21. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27217518>. [cit. 2023-12-07].
- [48] MARTINS, Eva; REIS, Rui L. a SILVA, Tiago H. *In Vivo* Skin Hydrating Efficacy of Fish Collagen from Greenland Halibut as a High-Value Active Ingredient for Cosmetic Applications. Online. *Marine Drugs*. 2023, vol. 21, no. 2. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21020057>. [cit. 2023-12-07].
- [49] LEE, Dong Hun; OH, Jang-Hee a CHUNG, Jin Ho. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. Online. *Journal of Dermatological Science*. 2016, vol. 83, no. 3, s. 174–181. ISSN 09231811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.016>. [cit. 2023-12-07].
- [50] JUNCAN, Anca Maria; MOISĂ, Dana Georgiana; SANTINI, Antonello; MORGOVAN, Claudiu; RUS, Luca-Liviu et al. Advantages of Hyaluronic Acid and Its Combination with Other Bioactive Ingredients in Cosmeceuticals. Online. *Molecules*. 2021, vol. 26, no. 15. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26154429>. [cit. 2023-12-07].
- [51] GÖLLNER, Imke; VOSS, Werner; VON HEHN, Ulrike a KAMMERER, Susanne. Ingestion of an Oral Hyaluronan Solution Improves Skin Hydration, Wrinkle Reduction, Elasticity, and Skin Roughness: Results of a Clinical Study. Online. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2017, vol. 22, no. 4, s. 816–823. ISSN 2156-5872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2156587217743640>. [cit. 2024-02-19].
- [52] KIM, Jin Cheol, Tae Jun PARK a Hee Young KANG, 2022. Skin-Aging Pigmentation: Who Is the Real Enemy? Online. *Cells*. 2022, vol. 11, no. 16. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11162541>. [cit. 2024-02-19].

- [53] ZHANG, Shoubing a DUAN, Enkui. *Fighting against Skin Aging*. Online. *Cell Transplantation*. 2018, vol. 27, no. 5, s. 729–738. ISSN 0963-6897. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>. [cit. 2023-11-14].
- [54] RAMOS-E-SILVA, Marcia; CELEM, Livia Ribeiro; RAMOS-E-SILVA Stella a FUCCI-DA-COSTA Ana Paula. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. Online. *Clinics in Dermatology*. 2013, vol. 31, no. 6, s. 750–758. ISSN 0738081X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.013>. [cit. 2024-02-19].
- [55] DRAELOS, Zoe Diana, 2010. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. Blackwell Publishing. ISBN 978-1-4051-8635-3.
- [56] RÄHSE, Wilfried. *Cosmetic creams: development, manufacture and marketing of effective skin care products*. Weinheim: Wiley, 2020. ISBN 978-3-527-34398-0.
- [57] BJØRKLUND, Geir; SHANAIDA, Mariia; LYSIUK, Roman; BUTNARIU, Monice a PEANA, Massimiliano et al. Natural Compounds and Products from an Anti-Aging Perspective. Online. *Molecules*. 2022, vol. 27, no. 20. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27207084>. [cit. 2024-02-19].
- [58] DRAELOS, Zoe Diana a THAMAN, Lauren A. *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-0-8493-3968-4.
- [59] DRAELOS, Zoe Diana. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*. 2nd edition. Blackwell Publishing, 2016. ISBN 978-1-118-65558-0.
- [60] NANJWADE, Basavaraj K. Development of Cosmeceuticals. Online. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017, vol. 4, no. 4, s. 643–691. ISSN 2278-4357. Dostupné z: <https://doi.org/10.20959/wjpps20174-8927>. [cit. 2024-02-19].
- [61] KREJČÍ, Jiří. Kosmetika a kosmetologie. Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012. Dostupné z: <https://docplayer.cz/47760494-Kosmetika-a-kosmetologie-ing-jiri-krejci-csc-zvysovani-exkluzivity-vyuky-technologie-tuku-kosmetiky-a-detergentu.html>. [cit. 2024-02-19].
- [62] MICHALEK, Irmina Maria; LELEN-KAMINSKA, Karolina a CAETANO DOS SANTOS, Florentino Luciano. Peptides stimulating synthesis of extracellular matrix used in anti-ageing cosmetics: Are they clinically tested? A systematic review of the

- literature. Online. *Australasian Journal of Dermatology*. 2019, vol. 60, no. 4. ISSN 0004-8380. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ajd.13036>. [cit. 2024-02-19].
- [63] LIMA, Tamyres a PEDRIALI MORAES, Carla. Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals. Online. *Cosmetics*. 2018, no. 1. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010021>. [cit. 2024-02-19].
- [64] FERREIRA, Marta Salvador; MAGALHÃES, Maria Catarina; SOUSA-LOBO José Manuel a ALMEIDA, Isabel Filipa. Trending Anti-Aging Peptides. Online. *Cosmetics*. 2020, vol. 7, no. 4. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics7040091>. [cit. 2024-02-19].
- [65] SCHAGEN, Silke. Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results. Online. *Cosmetics*. 2017, vol. 4, no. 2. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics4020016>. [cit. 2024-02-19].
- [66] LEYDEN, James J. a RAWLINGS, Anthony V. *Skin Moisturization*. CRC Press, 2002. ISBN 0-8247-0643-9.
- [67] JUHAŠČIK, Martin; KOVÁČIK, Andrej a HUERTA-ÁNGELES, Gloria. Recent Advances of Hyaluronan for Skin Delivery: From Structure to Fabrication Strategies and Applications. Online. *Polymers*. 2022, vol. 14, no. 22. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14224833>. [cit. 2024-03-30].
- [68] DRAELOS, Zoe Diana. *Cosmetics and Dermatological Problems and Solutions: A Problem Based Approach*. 3rd edition. Informa Healthcare, 2011. ISBN 9781841847405.
- [69] SIONKOWSKA, Alina; ADAMIĄK, Katarzyna; MUSIAŁ, Katarzyna a GADOMSKA, Magdalena. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. Online. *Materials*. 2020, vol. 13, no. 19. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13194217>. [cit. 2024-02-19].
- [70] GUZMÁN, Eduardo a LUCIA, Alejandro. Essential Oils and Their Individual Components in Cosmetic Products. Online. *Cosmetics*. 2021, vol. 8, no. 4. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040114>. [cit. 2024-02-19].
- [71] MONTENEGRO, Lucia; PASQUINUCCI, Lorella; ZAPPALÀ, Agata; CHIECHIO, Santina a TURNATURI, Rita et al. Rosemary Essential Oil-Loaded Lipid Nanoparticles: *In Vivo* Topical Activity from Gel Vehicles. Online.

- Pharmaceutics*. 2017, vol. 9, no. 4. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040048>. [cit. 2024-02-19].
- [72] LOHANI, Alka; MISHRA, Arun Kumar a VERMA, Anurag. Cosmeceutical potential of geranium and calendula essential oil: Determination of antioxidant activity and in vitro sun protection factor. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019, vol. 18, no. 2, 550–557. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12789>. [cit. 2024-02-19].
- [73] FRANCOIS-NEWTON, Véronique; BROWN, Andrew; ANDRES, Philippe; MANDARY, Madiiha Bibi a WEYERS, Carli et al. Antioxidant and Anti-Aging Potential of Indian Sandalwood Oil against Environmental Stressors *In Vitro* and *Ex Vivo*. Online. *Cosmetics*. 2021, vol. 8, no. 2. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020053>. [cit. 2024-02-19].
- [74] SIVAMANI, Raja; JAGDEO, Jared R.; ELSNER, Peter a MAIBACH, Howard I. (ed.). *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. Online. 3rd edition. CRC Press, 2015. ISBN 9780429192388. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/b18895>. [cit. 2024-02-19].
- [75] LIN, Tzu-Kai; ZHONG, Lily a SANTIAGO, Juan. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, vol. 19, no. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms19010070>. [cit. 2024-02-19].
- [76] CAMPA, Molly a BARON, Elma. Anti-aging Effects of Select Botanicals: Scientific Evidence and Current Trends. Online. *Cosmetics*. 2018, vol. 5, no. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5030054>. [cit. 2024-02-19].
- [77] SASOUNIAN, Rafaela; MARTINEZ, Renata Miliani; LOPES, André Moreni; GIAROLLA, Jeanine a ROSADO, Catarina. Innovative Approaches to an Eco-Friendly Cosmetic Industry: A Review of Sustainable Ingredients. Online. *Clean Technologies*. 2024, vol. 6, no. 1, 176–198. ISSN 2571-8797. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cleantechnol6010011>. [cit. 2024-03-21].
- [78] FORTUNATO, Amanda Tavares; GONÇALVES, Melissa Marques; COLUSSE, Guilherme Augusto; ADONSKI, Camila Benato a BORGES, Bárbara Paula et al. Stability and Sensory Evaluation of an Innovative Antiaging Formulation Based on Marine Ingredients. Online. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2021,

- no. 64. ISSN 1678-4324. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200429>. [cit. 2024-03-21].
- [79] BOUZROUD, Sarah; EL MAAIDEN, Ezzouhra; SOBEH, Mansour; MERGHOUB, Nawal a BOUKCIM, Hassan et al. Biotechnological Approaches to Producing Natural Antioxidants: Anti-Ageing and Skin Longevity Prospects. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, vol. 24, no. 2. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24021397>. [cit. 2024-03-21].
- [80] MORGADO-CARRASCO, D.; GIL-LIANES, J.; JOURDAIN, E. a PIQUERO-CASALS, J. Tratamiento mediante suplementación oral o fármacos sistémicos del envejecimiento cutáneo. Revisión narrativa de la literatura. Online. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2023, vol. 114, no. 2, s. 114–124. ISSN 00017310. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2022.09.014>. [cit. 2024-03-21].
- [81] GAO, Lulu; LIU, Xudong; LUO, Xiaoyan; LOU, Xiaofan a LI, Pusen et al. Antiaging effects of dietary supplements and natural products. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2023, no. 14. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1192714>. [cit. 2024-03-21].
- [82] ROSTKOWSKA, Ewelina; POLESZAK, Ewa; WOJCIECHOWSKA, Katarzyna a DOS SANTOS SZEWCZYK, Katarzyna. Dermatological Management of Aged Skin. Online. *Cosmetics*. 2023, vol. 10, no. 2. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics10020055>. [cit. 2024-03-21].
- [83] GUO, Jiahong; FANG, Wei a WANG, Feifei. Injectable fillers: current status, physicochemical properties, function mechanism, and perspectives. Online. *RSC Advances*. 2023, vol. 13, no. 34. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d3ra04321e>. [cit. 2024-03-21].
- [84] Aidian Oy. *Hygicult TPC: Návod k použití*. Online. Espoo: Aidian Oy, 2021. Dostupné z: [https://www.aidian.cz/uploads/CZ-Dokumenty-ke-stazeni/Hygicult/IFUs/132252-30CZ\\_Hygicult\\_TPC\\_IFU\\_FINAL.pdf](https://www.aidian.cz/uploads/CZ-Dokumenty-ke-stazeni/Hygicult/IFUs/132252-30CZ_Hygicult_TPC_IFU_FINAL.pdf)
- [85] Ametek. *Food Fixture Catalog*. Online. Ametek, Inc., 2013. Dostupné z: [https://www.ametektest.com/-/media/ametektest/download\\_links/food\\_fixture\\_catalogue.pdf?revision=431eb34b-86fc-4ce4-8470-4012c70787d7](https://www.ametektest.com/-/media/ametektest/download_links/food_fixture_catalogue.pdf?revision=431eb34b-86fc-4ce4-8470-4012c70787d7)

- [86] PROKOPOVÁ, Aneta; PAVLAČKOVÁ, Jana; MOKREJŠ, Pavel a GÁL, Robert. Collagen Hydrolysate Prepared from Chicken By-Product as a Functional Polymer in Cosmetic Formulation. Online. *Molecules*. 2021, vol. 26, no. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26072021>. [cit. 2024-04-02].
- [87] Courage & Khazaka electronic GmbH. *The skin-pH-meter PH 905: Technical charges*. 2013.
- [88] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN EN ISO 8586. *Senzorická analýza - Výběr a výcvik senzorických posuzovatelů*. 2023.
- [89] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN ISO 6658. *Senzorická analýza - Metodologie - Obecný návod*. Česká agentura pro standardizaci, 2022.
- [90] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN EN ISO 8589. *Senzorická analýza - Obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště*. Český normalizační institut, 2008.
- [91] KŘÍŽ, Oldřich; BUŇKA, František a HRABĚ, Jan. *Senzorická analýza potravin II.: statistické metody*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2007. ISBN 978-80-7318-494-0.
- [92] MAWAZI, Saeid Mezail; ANN, Jo; OTHMAN, Noordin; KHAN, Jiyauddin a ALOLAYAN, Sultan Othman et al. A Review of Moisturizers; History, Preparation, Characterization and Applications. Online. *Cosmetics*. 2022, vol. 9, no. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics9030061>. [cit. 2024-05-02].
- [93] Contipro a.s. *HyActive: Very low molecular weight hyaluronic acid*. Online. Dolní Dobrouč: Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.com/images/ProductLists/HYACTIVE.pdf>. [cit. 2024-04-29].
- [94] Contipro a.s. *Every face tells a story: Cosmetic portfolio*. Online. Dolní Dobrouč: Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.com/images/downloads/ANTI-AGEING-BROCHURE.pdf>
- [95] Contipro a.s. *Clodessine: Fragment of natural human anti-ageing factor klotho*. Online. Dolní Dobrouč: Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.com/images/ProductLists/CLODESSINE.pdf>. [cit. 2024-04-29].



- [96] Contipro a.s. *Elaself: Pentapeptide for improvement of elastic fibers assembly*. Online. Dolní Dobrouč: Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.com/images/ProductLists/ELASELF.pdf>. [cit. 2024-04-29].
- [97] Contipro a.s. *Recelline Anti-stress oligopeptide activating proteasomes*. Online. Dolní Dobrouč: Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.com/images/ProductLists/RECELLINE.pdf>. [cit. 2024-04-29].
- [98] Contipro a.s. *Clodessine: Product dossier*. Dolní Dobrouč: Contipro a.s, 2019.
- [99] Contipro a.s. *Elaself: Product dossier*. Dolní Dobrouč: Contipro a.s, 2019.
- [100] Contipro a.s. *Recelline: Product dossier*. Dolní Dobrouč: Contipro a.s, 2019.
- [101] BOO, Yong Chool. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. Online. *Antioxidants*. 2022, vol. 11, no. 9. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox11091663>. [cit. 2024-04-29].
- [102] HALLA, Noureddine; FERNANDES, Isabel; HELENO, Sandrina; COSTA, Patrícia a BOUCHERIT-OTMANI, Zahia et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. Online. *Molecules*. 2018, vol. 23, no. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>. [cit. 2024-05-01].
- [103] LINCHO, João; MARTINS, Rui C. a GOMES, João. Paraben Compounds—Part I: An Overview of Their Characteristics, Detection, and Impacts. Online. *Applied Sciences*. 2021, vol. 11, no. 5. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app11052307>. [cit. 2024-05-01].
- [104] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. EN ISO 17516:2014. *Kosmetika - Mikrobiologie - Mikrobiologické limity*. Státní zdravotní ústav, 2014.
- [105] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation - 9th revision; SCCS/1564/15*. Online. European Commission: Brussels, 2015. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/consumer\\_safety/docs/sccs\\_o\\_190.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf). [cit. 2024-05-05].
- [106] International organization for standardization. ISO/TR 18811:2018. *Guidelines on the stability testing of cosmetic products*. ISO, 2018.

- [107] Evonik Operations GmbH. *TEGO Care 450 MB: Technical Information*. Online. Německo: Evonik Operations GmbH, 2021. Dostupné z: <https://azeliscanada.com/wp-content/uploads/2020/06/TEGO-Care-450-MB.-TDS.pdf>. [cit. 2024-05-01].
- [108] TAI, A.; BIANCHINI, R. a JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2014, vol. 36, no. 4, s. 291–304. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12125>. [cit. 2024-05-01].
- [109] ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M. H. a SOUSA LOBO, J. M. Comparison between sensory and instrumental characterization of topical formulations: impact of thickening agents. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2016, vol. 38, no. 4, s. 389–398. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ics.12302>. [cit. 2024-04-19].
- [110] STOLIĆ-JOVANOVIĆ, Aleksandra; MARTINOVIĆ, Milica a NEŠIĆ, Ivana. The influence of selected thickeners on the textural properties of oil-in-water emulsions. Online. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2022, vol. 30, no. 1, s. 57–65. ISSN 0351-6083. Dostupné z: <https://doi.org/10.5937/afmnai39-31064>. [cit. 2024-04-19].
- [111] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Corneometer® CM 825: The World's Most Used Skin Hydration Instrument*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2024. Dostupné z: [https://www.courage-khazaka.com/images/Downloads/Brochures/Wissenschaftlich/Brochure\\_Corneometer.pdf](https://www.courage-khazaka.com/images/Downloads/Brochures/Wissenschaftlich/Brochure_Corneometer.pdf). [cit. 2024-04-19].
- [112] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Tewameter® TM 300: Skin Barrier Function and Transepidermal Waterloss*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2020. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [113] FLUHR, Joachim W.; WIORA, Georg; NIKOLAEVA, Dessyslava G.; MISÉRY, Laurent a DARLENSKI, Razvigor. *In vivo transepidermal water loss: Validation of a new multi-sensor open chamber water evaporation system Tewameter TM Hex*. Online. *Skin Research and Technology*. 2023, vol. 29, no. 4. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/srt.13307>. [cit. 2024-05-02].
- [114] HA, Nam Gyoung; KIM, Sang Lim; LEE, Seon Hwa a LEE, Weon Ju. A novel hydrogel-based moisturizing cream composed of hyaluronic acid for patients with

- xerosis: An intraindividual comparative analysis. Online. *Skin Research and Technology*. 2023, vol. 29, no. 11. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/srt.13499>. [cit. 2024-05-02].
- [115] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Skin pH Meter PH 905: pH Measurement on Skin and Scalp*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2024. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [116] LUKIĆ, Milica; PANTELIĆ, Ivana a SAVIĆ, Snežana D. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. Online. *Cosmetics*. 2021, vol. 8, no. 3. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030069>. [cit. 2024-05-02].
- [117] LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; PRONK H. a FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. Online. *International Journal of Cosmetic Science*. 2006, vol. 28, no. 5, s. 359–370. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>. [cit. 2024-04-20].
- [118] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Mexameter® MX 18: Assessing Melanin Content and Erytema Level*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH, 2024. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [119] RATTANAWIWATPONG, Pattarawan; WANITPHAKDEEDECHA, Rungsima; BUMRUNGPET, Akkarach a MAIPRASERT, Mart. Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial. Online. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020, vol. 19, no. 3, s. 671–676. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.13305>. [cit. 2024-05-02].
- [120] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Reviscometer® RVM 600: Interesting Aspects of Skin Aging*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [121] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Visioscope® PC 35: Take a Close Look at Skin, Hair and Scalp*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z:

- <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [122] Courage+Khazaka electronic GmbH. *Skin Visiometer ® SV 700: Assessing the Skin Microrelief*. Online. Köln: Courage+Khazaka electronic GmbH. Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/downloads-en/category/scientific-devices>. [cit. 2024-04-19].
- [123] ROSADO, C.; ANTUNES, F. ; BARBOSA, R.; FERNANDO, R. a ESTUDANTE, M. et al. About the *in vivo* quantitation of skin anisotropy. Online. *Skin Research and Technology*. 2017, vol. 23, no. 3, s. 429–436. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/srt.12353>. [cit. 2024-05-02].
- [124] SAKAI, Shingo; YAMANARI, Masahiro; LIM, Yiheng; NAKAGAWA, Noriaki a YASUNO, Yoshiaki. *In vivo* evaluation of human skin anisotropy by polarization-sensitive optical coherence tomography. Online. *Biomedical Optics Express*. 2011, vol. 2, no. 9. ISSN 2156-7085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/BOE.2.002623>. [cit. 2024-05-02].
- [125] POGAČNIK, Tina; ŽMITEK, Janko; HRISTOV, Hristo; KERŠMANC, Petra a BUTINA, Mirjam Rogl et al. The effect of a 12-week dietary intake of food supplements containing collagen and MSM on dermis density and other skin parameters: A double-blind, placebo-controlled, randomised four-way study comparing the efficacy of three test products. Online. *Journal of Functional Foods*. 2023, no. 110. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105838>. [cit. 2024-05-02].
- [126] SMITS, Julian a HERBST, Norbert. Effects of pomegranate flower complex on the skin. Online. *Personal Care Magazine*. 2012, s. 45–50. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/285176411\\_Effects\\_of\\_pomegranate\\_flow\\_er\\_complex\\_on\\_the\\_skin](https://www.researchgate.net/publication/285176411_Effects_of_pomegranate_flow_er_complex_on_the_skin). [cit. 2024-05-02].

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ADP	Adenosindifosfát
AGE	Produkt pokročilé glykace
AHA	Alfa-hydroxykyselina
a. j.	Arbitrární jednotky
ATP	Adenosintrifosfát
BER	Bázová excisní oprava
BHA	Beta-hydroxykyselina
CFU/g	Kolonie tvořící jednotky na 1 g
CFU/ml	Kolonie tvořící jednotky na 1 ml
CPD	Cyklobutan pyrimidinový dimer
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DEJ	Dermálně-epidermální spojení
ECM	Extracelulární matrix
g	Gram
$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	Jednotky TEWL
G+	Grampozitivní
HA	Kyselina hyaluronová
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
hod	Hodina
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ChYGA	Chloramphenicol Yeast Glukose Agar
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad
kDa	Kilodalton
k. j.	Korneometrické jednotky
mDNA	Mitochondriální DNA

---

min	Minuta
ml	Mililitr
mm	Milimetr
mm·min <sup>-1</sup>	Milimetr za minutu
MMP	Matrix metaloproteinázy
mPa·s <sup>-1</sup>	Milipascal za sekundu
MS	Hmotnostní spektrometrie
N	Newton
NA	Nutrient agar
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NER	Nukleotidová excisní oprava
NMF	Přirozený hydratační faktor
N·s <sup>-1</sup>	Newton za sekundu
O/V	Emulze olej ve vodě
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCA	Plate Count Agar
pH	Potenciál vodíku
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
rpm	Otáčky za minutu
RRT	Rezonanční čas
s	Sekunda
SC	<i>Stratum corneum</i>
TEWL	Transepidermální ztráta vody
TJ	Těsné mezibuněčné spoje

TPC	Total Plate Count
UV	Ultrafialové záření
UVA	Ultrafialové záření typu A
UVB	Ultrafialové záření typu B
UVC	Ultrafialové záření typu C
V/O	Emulze voda v oleji
μl	Mikrolitr
α	Alfa
°C	Stupeň Celsia
%	Procento

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1	Strukturní změny mladší a starší kůže.....	25
Obrázek 2	Pigmentové skvrny .....	33
Obrázek 3	Aktivita kyseliny hyaluronové v závislosti na její molekulové hmotnosti .....	40
Obrázek 4	Schéma přípravy krémových formulací .....	52
Obrázek 5	Složky krémových formulací: a) nabotnalý <i>Carbomer</i> ; b) připravená vodná fáze; c) připravená olejová fáze; d) směs silic.....	53
Obrázek 6	Použité druhy peptidů: a) Clodessine; b) Elasef; c) Racelline.....	53
Obrázek 7	Příprava formulací a): ihned po smísení fáze A a fáze B; b): po 15 min emulzifikace; c): po dosažení pokojové teploty; d): po úpravě pH .....	54
Obrázek 8	Spiral Plater .....	55
Obrázek 9	Automatické počítadlo kolonií .....	55
Obrázek 10	Zkumavky obsahující krémové formulace se zaočkovanou <i>P. aeruginosa</i> .....	56
Obrázek 11	Rotační viskozimetr MYR V2.....	57
Obrázek 12	Texturometr TA1.....	58
Obrázek 13	Detailní pohled na průběh měření .....	58
Obrázek 14	Znázornění měřených oblastí .....	60
Obrázek 15	Stanice MPA se sondami pro měření parametrů kůže .....	61
Obrázek 16	Zařízení Visioskop PC 35 a příslušenství .....	63
Obrázek 17	Příslušenství potřebné pro přípravu silikonových replik.....	64
Obrázek 18	Nárůst kolonie na formulaci F3.....	69
Obrázek 19	Mikrobiologická analýza (první řada: PCA, druhá řada: ChYGA) .....	70
Obrázek 20	Detailní zobrazení kolonie na plotně s PCA u F5 .....	70
Obrázek 21	Mikrobiologická analýza PA.....	71
Obrázek 22	Detailní zobrazení kolonie na plotně s PA u F1 .....	71
Obrázek 23	Nárůst kolonií v čase 0 .....	72
Obrázek 24	Rozpad emulzí vystavených teplotě 55 °C.....	74
Obrázek 25	Změny viskozity krémů v závislosti na čase a teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (* p <0,05) .....	75
Obrázek 26	Modelová křivka texturní analýzy.....	76
Obrázek 27	Změna tuhosti a kohezivitu formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (* p <0,05).....	77
Obrázek 28	Změna konzistence a adhezivitu formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (* p <0,05).....	78
Obrázek 29	Změna pH formulací v závislosti na čase při teplotních podmínkách 25, 37 a 47 °C (* p <0,05) .....	79



Obrázek 30 Vliv formulací na hydrataci v závislosti na čase (* p <0,05).....	80
Obrázek 31 Vliv formulací na bariérové vlastnosti v závislosti na čase (* p <0,05) .....	82
Obrázek 32 Vliv formulací na pH v závislosti na čase (* p <0,05).....	83
Obrázek 33 Vliv anti-aging formulací na erytém kůže (* p <0,05).....	85
Obrázek 34 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F1 v pravé periorbitální oblasti (* p <0,05) .....	86
Obrázek 35 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F2 v pravé periorbitální oblasti (* p <0,05) .....	86
Obrázek 36 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 v levé periorbitální oblasti (* p <0,05) .....	87
Obrázek 37 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 ve středové oblasti čela (* p <0,05).....	88
Obrázek 38 Změny rezonančních časů v závislosti na úhlu otočení a čase pro formulaci F4 v pravé periorbitální oblasti (* p <0,05) .....	88
Obrázek 39 Vliv anti-aging formulací na množství vrásek (* p <0,05) .....	89
Obrázek 40 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F2.....	90
Obrázek 41 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F3.....	90
Obrázek 42 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F4.....	90
Obrázek 43 Snímky reliéfu kůže před a po 8 týdnech používání formulace F5.....	91
Obrázek 44 Vlivu anti-aging formulací na množství pórů (* p <0,05) .....	91
Obrázek 45 Vliv anti-aging formulací na množství pigmentových skvrn (* p <0,05).....	92
Obrázek 46 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F2 .....	96
Obrázek 47 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F3 .....	96
Obrázek 48 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F4 .....	97
Obrázek 49 Snímky silikonových replik kůže před a po 8 týdnech používání formulace F5 .....	97

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Fyziologické změny kůže .....	22
Tabulka 2 Strukturní změny kůže .....	26
Tabulka 3 Třídy peptidů a jejich konkrétní zástupci .....	38
Tabulka 4 Příklady esenciálních olejů s potenciálním anti-aging účinkem.....	41
Tabulka 5 Příklady rostlinných extraktů s anti-aging účinkem .....	42
Tabulka 6 Rostlinné oleje a jejich účinky na pleť .....	43
Tabulka 7 Složení krémových formulací.....	51
Tabulka 8 Charakteristika věku dobrovolnic pro přidělené typy formulací.....	59
Tabulka 9 Stupnice hodnot korneometrického měření .....	61
Tabulka 10 Stupnice hodnot tewametrického měření.....	61
Tabulka 11 Stupnice pH hodnot .....	62
Tabulka 12 Kódy k senzoricky posuzovaným vzorkům.....	64
Tabulka 13 Vyhodnocení životaschopnosti bakterie <i>P. aeruginosa</i> .....	72
Tabulka 14 Vyhodnocení organoleptických vlastností krémových formulací během stabilitních testů .....	74
Tabulka 15 Vyhodnocení parametrů drsnosti (* $p < 0,05$ ) .....	94
Tabulka 16 Vyhodnocení anizotropie kůže (* $p < 0,05$ ) .....	95
Tabulka 17 Vyhodnocení změny hustoty kůže (* $p < 0,05$ ).....	96
Tabulka 18 Součty pořadí vzorků u pořadové zkoušky se zaměřením na intenzitu barvy a roztíratelnost.....	98
Tabulka 19 Vyhodnocení párové porovnávací zkoušky (* $p < 0,05$ ).....	99

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Kritéria pro zařazení do souboru probandů

Příloha P II: Metodika testu

Příloha P III: Dotazník účastníka experimentu

Příloha P IV: Individuální informovaný souhlas

Příloha P V: Prohlášení účastníka studie

Příloha P VI: Dotazník pro sensorické hodnocení anti-aging krémů

Příloha P VII: Vyhodnocení pořadové zkoušky na barvu pomocí Friedmanova testu

Příloha P VIII: Vyhodnocení párové porovnávací zkoušky na roztíratelnost

# PŘÍLOHA P I: KRITÉRIA PRO ZAŘAZENÍ DO SOUBORU PROBANDŮ

## KRITÉRIA PRO ZAŘAZENÍ DO SOUBORU PROBANDŮ

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Předpokladem pro zařazení do souboru probandů pro testování účinnosti krémových anti-aging formulací jsou následující kritéria:

- Absence jakéhokoliv onemocnění (i nachlazení) minimálně 1 týden před zahájením testu
- Absence jakéhokoliv kožního onemocnění (např. psoriáza, ekzém, rakovina kůže, jiné dermatitidy)
- Absence kožních anomálií v oblasti testování (např. jizvy, mateřská znaménka, erytém po slunění)
- Proband nesmí mít astma, ani jiné chronické respirační choroby
- Proband nesmí mít diabetes, který je léčený inzulínem
- Proband nesmí být léčen pro imunodeficienci nebo autoimunitní onemocnění a neužívá léky s vlivem na imunitní systém
- Proband nesmí mít v anamnéze transplantaci orgánů a léčbu zhoubných onemocnění
- Proband nesmí užívat pravidelně léky s lokálním i celkovým protizánětlivým účinkem (např. aspirin, ibuprofen, kortikoidy)
- Proband musí být bez alergologické anamnézy

Do souboru probandů nebude přijata:

- Osoba, která je již účastníkem jakékoli jiné klinické studie nebo v případě, že studie byla ukončena v době kratší než 14 dní před zahájením testu
- Ženy těhotné, či kojící

## KRITÉRIA PRO VYŘAZENÍ ZE SOUBORU PROBANDŮ

---

Ze souboru probandů pro testování účinnosti krémových anti-aging formulací je osoba vyřazena v případě, že:

- Nedodrží podmínky experimentu
- Na vlastní žádost ukončí svou účast v experimentu
- Dojde ke změně jejího zdravotního stavu v takové míře, že by tím mohl být ovlivněn výsledek práce
- Dojde u ní k navození takové situace a podmínek, které mohou ovlivnit výsledek experimentu

# PŘÍLOHA P II: METODIKA TESTU

## METODIKA TESTU

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Použitá zařízení:	Visioskop PC 35 (měření velikosti pórů, vrásek, pigmentových skvrn), stanice MPA 10 se sondami (Korneometr CM 825, Tewametr TM 300, Skin pH metr 905, Reviskometr RVM 600, Mexametr MX 18), Skin Visiometr SV 700 (Courage & Khazaka electronic, Německo)
Použité pomůcky:	laboratorní sklo a běžné laboratorní pomůcky, buničina, pinzeta, materiál pro přípravu replik
Oblast aplikace:	celý obličej
Perioda aplikace:	ráno a večer
Množství aplikované látky:	cca 0,45 g
Doba trvání testu:	8 týdnů
Intervaly odečtu:	v čase 0, po 4 a 8 týdnech použití
Typ reakce:	změna biofyzikálních hodnot povrchu kůže
Stupeň reakce:	interpretace prostřednictvím hodnoty měřené veličiny
Vyhodnocení:	změna měřených veličin v čase

## SYSTÉM KLASIFIKACE KOŽNÍ REAKCE

---

Kožní reakce bude hodnocena změnou číselných hodnot měřených veličin pomocí následujících zařízení:

- Visioskop PC 35 (měření velikosti pórů, vrásek, pigmentových skvrn)
- Stanice MPA 10 se sondami Korneometr CM 825 (hydratace), Tewametr TM 300 (TEWL), Skin pH metr 905 (pH), Reviskometr RVM 600 (elasticita), Mexametr MX 18 (erytém)
- Skin Visiometr SV 700 (mikrorelief povrchu pokožky)

# PŘÍLOHA P III: DOTAZNÍK ÚČASTNÍKA EXPERIMENTU

## DOTAZNÍK ÚČASTNÍKA EXPERIMENTU

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Jméno a příjmení probanda:

Věk:

Pohlaví:

Kód pokusné osoby (evidenční číslo):

### Současný zdravotní stav

#### Vyskytuje se u Vás v současné době \*)

Lupénka	ANO	NE	
Ekzém	ANO	NE	
Rakovina kůže	ANO	NE	
Diabetes vyžadující léčbu inzulínem	ANO	NE	
Astma vyžadující denní příjem léků	ANO	NE	
Jizvy, mateřská znamínka, jiné vady kůže v místě testu	ANO	NE	
Erytém po slunění (nebo z jiného důvodu) v místě testu	ANO	NE	
Jiné kožní problémy a onemocnění	ANO	NE	Jaké: .....
Jiné chronické respirační onemocnění	ANO	NE	Jaké: .....
Onemocnění imunitního systému	ANO	NE	Jaké: .....

### Užívání léků

#### Užíváte pravidelně \*)

Protizánětlivé léky (např. aspirin, ibuprofen, hydrokortizon, nebo jiné steroidy)	ANO	NE	Jaké: .....
Imunosupresivní léky (např. cyklosporin A)	ANO	NE	Jaké: .....
Jiné léky	ANO	NE	Jaké: .....

### Alergie

#### Projevila se u Vás někdy alergická reakce na \*)

Detergenty a čisticí prostředky	ANO	NE	Jaké: .....
Kosmetické přípravky a vůně parfémů	ANO	NE	Jaké: .....
Přípravky do koupele a na mytí (šampón, mýdlo)	ANO	NE	Jaké: .....
Pleťové krémy a mléka, lotiony	ANO	NE	Jaké: .....
Antiperspiranty a deodoranty	ANO	NE	Jaké: .....
Léky	ANO	NE	Jaké: .....
Jiné látky a materiály	ANO	NE	Jaké: .....



# PŘÍLOHA P IV: INDIVIDUÁLNÍ INFORMOVANÝ SOUHLAS

## INDIVIDUÁLNÍ INFORMOVANÝ SOUHLAS

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

V rámci realizace experimentální části diplomové práce budou na Váš obličej aplikovány modelové formulace anti-aging krémů. Veškeré známé informace o ingrediencích, které jsou součástí formulací, dovolují testování na dobrovolnících.

### **Cíl studie**

Cílem práce je zaznamenávat odezvu Vaší pokožky na aplikovanou krémovou formulaci pomocí exaktně změřených veličin.

### **Podmínky účasti**

Před započítím vlastního experimentu je nutné vyplnit dotazník účastníka experimentu. Součástí dokumentu jsou údaje o Vašem dosavadním zdravotním stavu, alergiích, kožních problémech, o užívaných lécích a o dřívější účasti v obdobných studiích. Dle Vašich pravdivých odpovědí bude organizátorem rozhodnuto o Vaší účasti v tomto experimentu.

### **Metodika testu**

Experiment bude prováděn zaškolenou studentkou magisterského studia pod dohledem Ing. Jany Pavlačkové, Ph.D, kvalifikovaného pracovníka Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Praktická část studie zahrnuje aplikaci a ověřování účinnosti krémových formulací na pokožku v oblasti obličeje pomocí bioinženýrských in vivo metod.

### **Odstoupení z experimentu**

Z experimentu je možné odstoupit kdykoli při výskytu závažnějších potíží po dohodě s vedoucím diplomové práce.

### **Rizika a nepříjemnosti**

V průběhu praktické části studie může dojít k lehkému podráždění pokožky. V místě aplikace modelových formulací může dojít k tvorbě erytému, ke svědění, pálení, či vysušení pokožky. Vznik trvalých následků není předpokládán.



# PŘÍLOHA P V: PROHLÁŠENÍ ÚČASTNÍKA STUDIE

## PROHLÁŠENÍ ÚČASTNÍKA STUDIE

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Prohlašuji a svým níže uvedeným podpisem souhlasím s dobrovolnou účastí ve studii testování modelových formulací anti-aging krémů. Jsem si vědom(a), že experiment může zahrnovat riziko nežádoucích účinků na kůži, které mi bylo detailně objasněno.

Měl(a) jsem možnost informovat se o všech podrobnostech týkajících se účasti ve výzkumu a na své dotazy jsem dostal(a) jasné a srozumitelné odpovědi.

Měl(a) jsem v dostatečném čase a klidu možnost zvážit všechny poskytnuté informace o studii a svou účast v experimentu.

Byl(a) jsem seznámen(a) s právem odmítnout svou účast ve výzkumném projektu nebo svůj souhlas kdykoli odvolat bez represí.

Souhlasím s tím, že údaje a data získaná v průběhu experimentu mohou být anonymně statisticky zpracována a že výsledky vzešlé z výzkumu mohou být anonymně publikovány.

**Prohlašuji, že jsem pochopil(a) smysl a cíle experimentu a souhlasím s podmínkami uvedenými výše.**

**Svůj souhlas se zapojením do studie stvrzuji svým podpisem, a to při plném vědomí.**

.....  
jméno a příjmení účastníka

.....  
podpis účastníka

Ve Zlíně dne .....

# PŘÍLOHA P VI: DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ ANTI-AGING KRÉMŮ

## DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ ANTI-AGING KRÉMŮ

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Jméno a příjmení:

Hodina:

Podpis:

Datum:

### Pořadový test dle intenzity znaku

**Úkol č. 1: Seřaďte předložené vzorky krémů dle barvy (1 – nejsvětlejší, 5 – nejtmaší)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

Kód vzorku	590	073	901	251	342
Pořadí					

**Úkol č. 2: Seřaďte předložené vzorky krémů dle roztíratelnosti (1 – nejlépe roztíratelný, 5 – nejhůře roztíratelný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

Provedení: Nanášejte špachtlí vždy stejné množství hodnoceného vzorku krému na volární stranu levého (či pravého) předloktí a prstem roztírejte do kruhové plochy přibližně o průměru 2 cm. Prst za každým vzorkem utřete přiloženou papírovou utěrkou.

Hodnocená místa po rozetření vzorku krému vizuálně vyhodnoťte po uplynutí 3 – 5 minut na vstřebatelnost uvedenou v úkolu č. 3.

Kód vzorku	251	901	073	342	590
Pořadí					

**Úkol č. 3: Seřaďte předložené vzorky krémů dle vstřebatelnosti (1 – nejlépe vstřebatelný, 5 – nejméně vstřebatelný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

Kód vzorku	073	342	251	590	901
Pořadí					

### Pořadový test dle preference

**Úkol č. 4: Seřaďte předložené vzorky krémů dle vlastních preferencí (1 – nejvíce preferovaný, 5 – nejméně preferovaný)**

Jedná se o nucenou volbu, dva vzorky nesmí mít stejné pořadí.

Kód vzorku	590	251	342	901	073
Pořadí					

### Párová porovnávací zkouška

**Úkol č. 5: Který z předložených vzorků je lépe roztíratelný?**

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
590	073	251	342

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
901	251	590	342

**Úkol č. 6: Který z předložených vzorků je lépe vstřebatelný?**

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
590	073	251	342

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
901	251	590	342

**Úkol č. 7: Který z předložených vzorků preferujete?**

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
590	073	251	342

Kód vzorku	Odpověď	Kód vzorku	Odpověď
901	251	590	342

## PŘÍLOHA P VII: VYHODNOCENÍ POŘADOVOÉ ZKOUŠKY NA BARVU POMOCÍ FRIEDMANOVA TESTU

Posuzovatel	F1	F2	F3	F4	F5
1	5	1	2	4	3
2	4	1	3	5	2
3	5	2	1	3	4
4	5	2	1	3	4
5	5	4	1	3	2
6	5	1	3	2	4
7	4	2	1	3	5
8	5	3	4	1	2
9	5	2	4	3	1
10	5	4	1	2	3
11	5	1	4	3	2
12	1	2	3	4	5
13	5	3	4	2	1
14	5	3	2	4	1
<b>T<sub>i</sub></b>	64	31	34	42	39
<b>T<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	4096	961	1156	1764	1521
<b>Σ T<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	9498				

Testové kritérium:

$$FR = \frac{12}{n \cdot R \cdot (R + 1)} \cdot \sum_{i=1}^R T_i^2 - 3 \cdot n \cdot (R + 1)$$

$$FR = \frac{12}{14 \cdot 5 \cdot (5 + 1)} \cdot 9498 - 3 \cdot 14 \cdot (5 + 1)$$

$$FR = 19,37$$

Kritický obor:

$$FR \geq Q_{1-\alpha}(R; n)$$

$$FR \geq Q_{0,95}(5; 14)$$

$$19,37 \geq 9,32$$

Hodnota testového kritéria padla do kritického oboru, tudíž nulovou hypotézu H zamítáme a přijímáme alternativní hypotézu A. S 95% spolehlivostí se podařilo prokázat, že existuje minimálně jeden vzorek, který se liší od jiných.

## PŘÍLOHA P VIII: VYHODNOCENÍ PÁROVÉ POROVNÍVACÍ ZKOUŠKY NA ROZTÍRATELNOST

Porovnávané dvojice	F1	F2	F3	F4	F4	F5	F1	F5
Počet preferencí	9	5	3	11	7	7	3	11

Vzorový výpočet pro dvojici vzorků F1 a F2:

Testové kritérium:

$$F = \frac{n_A}{n - n_A + 1}$$

$$F = \frac{9}{14 - 9 + 1}$$

$$F = 1,5$$

Kritický obor:

$$F \geq F_{1-\alpha}(v_1; v_2)$$

$$1,5 \geq F_{0,95}(12; 18)$$

$$1,5 \geq F_{0,95}(12; 18)$$

$$1,5 \geq 2,34 \rightarrow \text{NEPLATÍ}$$

Stupně volnosti:

$$v_1 = 2 \cdot (n - n_A + 1)$$

$$v_1 = 2 \cdot (14 - 9 + 1)$$

$$v_1 = 12$$

$$v_2 = 2 \cdot n_A$$

$$v_2 = 2 \cdot 9$$

$$v_2 = 18$$

Hodnota testového kritéria nepadla do kritického oboru, tudíž alternativní hypotézu A zamítáme a přijímáme nulovou hypotézu H. S 95% spolehlivostí se nepodařilo prokázat rozdíl ve vstřebatelnosti porovnávaných vzorků.