

Kyselina hyaluronová a její využití v medicíně a kosmetice

Zuzana Krpalová

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Zuzana KRPALOVÁ
Osobní číslo: T09060
Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů

Téma práce: Kyselina hyaluronová a její využití v medicíně a kosmetice

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma. Charakterizujte kyselinu hyaluronovou, popište její strukturu, chemické a fyzikální vlastnosti jakož i výskyt a chování v biologických systémech. Dále se zaměřte na praktické využití kyseliny hyaluronové s důrazem na její aplikace v medicíně a kosmetice.

II. Praktická část

1. V praktické části sestavte, zpracujte a vyhodnoťte dotazníkové šetření týkající se používání kosmetiky s obsahem kyseliny hyaluronové a ze získaných výsledků formulujte závěry.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.(Prague)*, 2008, vol. 53, no. 8, p. 397-411.

[2]LAPČÍK, L. Jr., BOHDANECKÝ, M., LAPČÍK, L., BAKOŠ, D. Kyselina hyaluronová, příprava, struktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické Listy* 85, 1991, str. 281-299.

[3]LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.*, 1998, vol. 98, no. 8, p. 2663-2684.

[4]KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, p. 17-25.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

24. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 24. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce na téma „Kyselina hyaluronová a její využití v medicíně a kosmetice“ se zabývá obecnými vlastnostmi kyseliny hyaluronové, způsoby její přípravy, výskytem v lidském organismu a jejími biologickými funkcemi. Významná část práce je věnována medicínským aplikacím a využití kyseliny hyaluronové v kosmetice, s důrazem na použití této látky jako výplňového materiálu v estetické chirurgii.

Praktická část je založena na dotazníkovém šetření účinnosti kosmetických prostředků na bázi kyseliny hyaluronové. Porovnává jednotlivé kosmetické řady s jejím obsahem a sleduje oblíbenost tohoto typu kosmetiky v závislosti na věku dotazovaných respondentek a konkrétních estetických problémech.

Klíčová slova: Kyselina hyaluronová, biokompatibilita, kosmetika, estetická medicína

ABSTRACT

The bachelor thesis „Hyaluronic acid and its use in medicine and cosmetics“ deals with the fundamental properties of hyaluronic acid, preparation methods, occurrence in the human organism and its biological functions. A significant part of the thesis is devoted to medical applications and the use of hyaluronic acid in cosmetics, with emphasis on its use as a filler material in aesthetic surgery.

The experimental part is based on questionnaire study focused on the effectiveness of cosmetic products based on hyaluronic acid. The study compares the individual series of cosmetic product containing hyaluronic acid in dependence on the age of the respondents and the specific aesthetic problems.

Keywords: Hyaluronic acid, biocompatibility, cosmetic, aesthetic medicine

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., za její ochotu, cenné rady, připomínky a čas, který mé práci věnovala.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HISTORIE	12
2 CHEMICKÁ STRUKTURA	13
2.1 TVAR A KONFORMACE MAKROMOLEKULY	13
3 VLASTNOSTI KYSELINY HYALURONOVÉ	15
3.1 CHOVÁNÍ HA V ROZTOKU	15
3.1.1 Relativní molekulová hmotnost HA.....	17
3.2 REOLOGICKÉ VLASTNOSTI	18
4 STABILITA KYSELINY HYALURONOVÉ	19
4.1 TERMICKÁ, CHEMICKÁ A ENZYMATICKÁ DEGRADACE.....	19
4.2 FOTOCHEMICKÁ DEGRADACE.....	19
5 BIODOPATIBILITA KYSELINY HYALURONOVÉ	21
5.1 CYTOTOXICITA	21
5.2 NEUROTOXICITA.....	22
5.3 KARCINOGENITA	22
5.4 MUTAGENITA	23
6 PŘÍPRAVA KYSELINY HYALURONOVÉ	24
6.1 VÝROBCI KYSELINY HYALURONOVÉ PRO KOMERČNÍ ÚČELY	25
7 VÝSKYT HA V ORGANISMU A BIOLOGICKÉ FUNKCE	27
7.1 VÝSKYT KYSELINY HYALURONOVÉ V LIDSKÉM ORGANISMU	27
7.2 BIOLOGICKÉ INTERAKCE S JINÝMI MAKROMOLEKULAMI.....	28
7.3 BIOLOGICKÉ FUNKCE HA	30
7.3.1 Synoviální tekutina.....	30
7.3.2 Kloubní chrupavka	31
7.3.3 Kůže.....	31
7.3.4 Oční sklivec.....	32
7.3.5 Další biologické funkce.....	32
8 VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ	33
8.1 MEDICÍNSKÉ APLIKACE KYSELINY HYALURONOVÉ	33
8.1.1 Oftalmologie.....	33
8.1.2 Otolaryngologie	34
8.1.3 Ortopedické aplikace a revmatologie	34
8.1.4 Farmakologie a podávání léků.....	36
8.1.5 Chirurgie a hojení ran.....	36

8.2	VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ V KOSMETICE	38
8.2.1	Estetická medicína a plastická chirurgie	38
8.2.2	Kosmetické použití kyseliny hyaluronové	41
8.2.2.1	Contipro Group a.s.....	42
8.2.2.2	RYOR a.s.	43
8.2.2.3	Eucerin® Hyaluron-filler	43
8.2.2.4	VICHY Liftactiv Retinol HA.....	43
8.2.2.5	Biora cosmetics AQUA BIORA, BIORADERM, BIORAGEL	44
8.2.2.6	JG Cosmetics ACNE, FACE, NEOBY	45
8.2.2.7	L'Oréal Paris Derma Genesis	45
8.2.2.8	Nivea Visage Expert Lift	46
8.2.2.9	Herb pharma.....	47
II	PRAKTICKÁ ČÁST	48
9	CÍL PRÁCE	49
10	METODIKA PRÁCE.....	50
10.1	PRŮZKUM ÚČINNOSTI KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ NA BÁZI KYSELINY HYALURONOVÉ - DOTAZNÍK.....	50
11	VÝSLEDKY	51
11.1	POUŽÍVÁNÍ KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ S HA.....	51
11.2	NEJPOUŽÍVANĚJŠÍ KOSMETICKÁ ŘADA S HA	51
11.3	NEJOBLÍBENĚJŠÍ TYP KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU S HA	52
11.4	VEDLEJŠÍ ÚČINKY PŘI POUŽÍVÁNÍ KOSMETIKY S HA	53
11.5	MĚSÍČNÍ NÁKLADY NA KOSMETIKU	54
11.6	PROBLÉMY S PLETÍ	55
11.7	VĚK DOTAZOVANÝCH RESPONDENTEK	56
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK.....	65
	SEZNAM PŘÍLOH.....	66

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je významný glykosaminoglykan, tedy polysacharid, který se skládá ze stále se opakujících disacharidových jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronové. U člověka se vyskytuje např. v synoviální tekutině, kloubní chrupavce, pokožce, extracelulární matrix a očním sklivci. Tato kyselina je také důležitou složkou mezibuněčné hmoty, je přítomna mezi vrstvami tkáně, kde udržuje potřebnou vlhkost a zabraňuje nežádoucímu tření. Jako signální molekula se účastní imunologických dějů a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk. Byly prokázány i její význačné antioxidační vlastnosti.

Mimo tyto účinky je kyselina hyaluronová často využívána v kosmetice, neboť byla prokázána její schopnost působit aktivně při obnovení pružnosti stárnoucí pokožky a při redukci vrásek. K dalším charakteristickým vlastnostem HA, které jsou kosmeticky využitelné, patří to, že má nejvyšší známé hydratační a regenerační účinky, chrání pokožku před vnějšími vlivy, snižuje tloušťku rohové vrstvy, reguluje mazotok a brání vzniku jizev. Rovněž změkčuje a vyhlazuje kůži, působí protizánětlivě a funguje jako transportní nosič účinných látek. Výše popsané unikátní vlastnosti ji předurčují k tomu, že vytváří atraktivní biomateriál pro medicínské a kosmetické aplikace. Kyselina hyaluronová je aplikována v oční chirurgii, při artroskopických operacích, působí jako výplň vrásek v plastické chirurgii, při terapii močové inkontinence, při osteoartróze, při endoskopických operacích a v očních nebo nosních kapkách. Díky svým lubrikačním schopnostem snižuje pooperační přilnavost tkání, urychluje hojení a epitelizaci poranění a zánětů na kůži, v dutině ústní a na epitelu děložního čípku.

Cílem bakalářské práce je charakterizovat kyselinu hyaluronovou, popsat její vlastnosti, výskyt a chování v biologických systémech a zaměřit se na její využití a aplikace v medicíně a kosmetice. Součástí práce je i praktická část, ve které je vyhodnoceno dotazníkové šetření, týkající se používání kosmetických přípravků s obsahem kyseliny hyaluronové.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTORIE

V roce 1934 se podařilo chemikům Karlu Mayerovi a Johnu Palmerovi na Kolumbijské univerzitě v New Yorku izolovat dříve neznámou chemickou látku z očního sklivce hovězího dobytka, kterou pojmenovali kyselina hyaluronová (HA). Tento název je odvozen z řeckého slova “*hyalos*“, což v překladu znamená sklo a z anglického “*uronic acid*“, což znamená uronová kyselina.

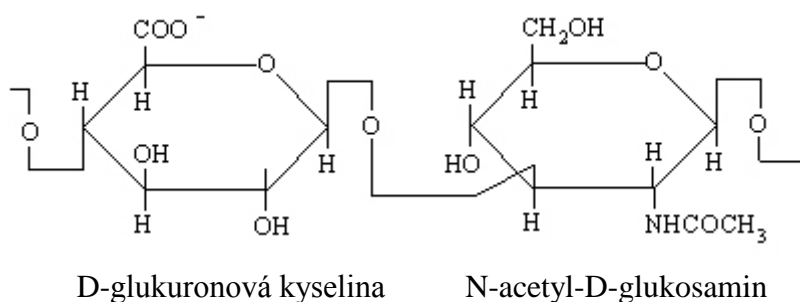
Chemickou strukturu kyseliny hyaluronové podrobněji vysvětlil rovněž Karl Meyer, který po její izolaci zjistil, že se za fyziologických podmínek chová spíše jako sodná sůl (hyaluronát sodný). Termín “hyaluronan“ byl oficiálně zařazen do mezinárodního názvosloví sacharidů roku 1986, a to zásluhou E. Balazse, který zároveň definoval, že molekula HA může mít jak kyselou formu jako je kyselina hyaluronová, ale může také vytvářet i soli [1].

Kyselina hyaluronová byla původně izolována z pupeční šňůry, později z kohoutích hřebínků a vyznačovala se vysokou čistotou a velkou molární hmotností [1]. První průmyslově používaná extrakční metoda pro izolaci a čištění HA byla založena na zmrazení pupeční šňůry, popř. kohoutích hřebínků a následném odstranění jejich buněčné stěny. Dále byla HA extrahována s vodou a následně vysrážena organickými rozpouštědly jako jsou např. ethanol, chloroform [2]. V současné době je HA sice stále získávána z kohoutích hřebínků, lidské pupeční šňůry, ale stále více se upřednostňuje syntetická příprava bakteriálním kvašením bakterie rodu *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus* [2]. Za více jak 70 let od objevení HA se pro tuto látku díky jejím výjimečným vlastnostem našla celá řada využití v mnoha oblastech, včetně kosmetiky a medicíny.

2 CHEMICKÁ STRUKTURA

Chemická struktura kyseliny hyaluronové byla popsána v 50. letech minulého století. Po chemické stránce se jedná o negativně nabitý, lineární glykosaminoglykan tvořený opakující se disacharidovou jednotkou složenou z $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu v poměru 1:1. Molární hmotnost jejich řetězců je vysoká a pohybuje se v rozmezí $0.2 - 10 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, přičemž nejčastější je molární hmotnost $2 - 5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [3].

HA tvoří intramolekulární vodíkové vazby a vyskytuje se buď jako volný řetězec nebo je kovalentně vázaná na bílkoviny [4]. Od ostatních glykosaminoglykanů se HA liší hlavně tím, že se neváže na proteinové jádro, neobsahuje sulfátovou skupinu a dále také extrémní délkou molekul [5].



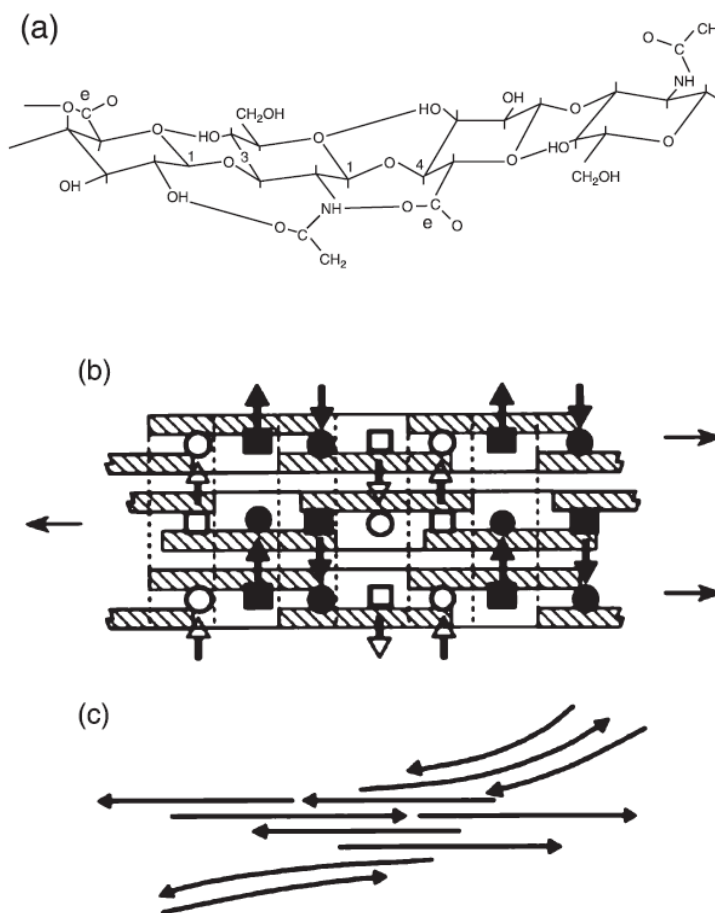
Obr. 1 Chemická struktura kyseliny hyaluronové [1]

2.1 Tvar a konformace makromolekuly

Struktura HA může být popsána pomocí primární, sekundární a terciární struktury.

Primární struktura se skládá z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu s až pěti vodíkovými vazbami existujícími mezi každými dvěma sousedními disacharidy. Sekundární struktura je formována jako pásová dvojitá šroubovice, která je tvořena vzájemně stočenými disacharidovými jednotkami přes úhel 180° . Terciární struktura je stabilizována přítomností intramolekulárních vodíkových vazeb [6]. Některé další zdroje se také shodují, že HA může být popsána i z hlediska vysoce složité kvartérní struktury, jejíž vznik je způsoben superpozicí elektrostatických repulzí ovlivňovaných iontovou silou, nebo pH prostředí [7].

Hydrofobní interakce a vodíkové vazby v kombinaci s elektrostatickým odpuzováním umožňují agregaci velkého počtu molekul a tvorbu molekulové sítě (matrice) HA [6].



Obr. 2 a) Primární struktura HA, b) Sekundární a terciární struktura, c) Schématické znázornění sítě molekuly HA jako výsledek intermolekulárních agregací [6]

3 VLASTNOSTI KYSELINY HYALURONOVÉ

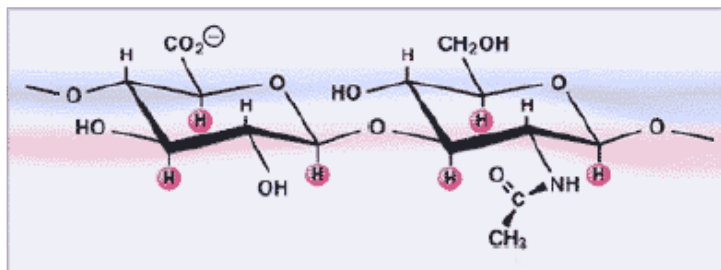
Kyselina hyluronová je důležitou složkou mezibuněčné hmoty. Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 12 – 15 g této látky, která je neustále obnovována. Má schopnost na sebe vázat velké množství vody a tak přispívat k optimální hydrataci tkáně [3]. Je přítomna všude tam, kde je potřeba mezi vrstvami tkáně udržovat vlhkost a zabraňovat nežádoucímu tření [8].

HA se také aktivně účastní imunologických procesů jako signální molekula a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciaci [3]. Vykazuje i významné antioxidační vlastnosti a působí jako vychytávač volných radikálů [4].

Kyselina hyaluronová je mimo jiné látka často využívaná v kosmetice, neboť tvoří důležitou složku při znovuobnovení stárnoucí a poškozené pokožky. Má nejvyšší známé hydratační a regenerační účinky, chrání kůži před zevními vlivy, zabraňuje vzniku strií, snižuje tloušťku rohové vrstvy, koriguje mazotok, zastavuje zvýšené padání vlasů a brání vzniku jizev [9]. Má rovněž mimořádné kožní lubrikační vlastnosti, změkčuje a vyhlazuje kůži, působí protizánětlivě, tvoří vazby s některými toxickými těžkými kovy z prostředí jako je olovo, kadmium a funguje jako transportní nosič účinných látek s řízeným uvolněním [10].

3.1 Chování HA v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je chování molekul kyseliny hyaluronové ovlivněno jednak chemickou strukturou disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a též vzájemnou interakcí tohoto biopolymeru s rozpouštědlem [1]. Vodíkové atomy řetězce HA tvoří nepolární, relativně hydrofobní část molekuly a jsou na Obr. 3 vyznačeny červeně. Druhá část řetězce je více polární (hydrofilní) a na Obr. 3 je označena modře [11].



Obr. 3 Chemická struktura kyseliny hyaluronové se znázorněním nepolární a polární části řetězce [12]

Molekula kyseliny hyaluronové obsahuje disociovatelné skupiny $-\text{COOH}$. Proto se ve vodných roztocích chová jako záporně nabitý polyelektrolyt, což způsobuje vázání kladných iontů o různém mocenství v blízkosti ionizovaných karboxylových skupin. Její konformace, tvar, rozměry i stupeň hydratace závisí na stupni disociace, který je určen pH, iontovou silou a přítomností kladně nabitých iontů [7].

Studium úhlové závislosti rozptylu světla vedlo k závěru, že molekuly HA vytváří v roztoku strukturu připomínající tuhá statistická klubka, která jsou schopna zadržet až tisícinásobně více vody, než činí jejich hmotnost [1]. Hydrofilní charakter HA usnadňuje její interakci s různými tkáněmi uvnitř a vně buňky [4].

Jak již bylo uvedeno, v roztocích je polymerní řetězec HA ve formě náhodně uspořádaného klubka. Jeho chování však vykazuje od tohoto uspořádání jisté odchylky, které jsou uvedeny dále:

- řetězec makromolekuly HA vykazuje vyšší stupeň tuhosti, způsobený systémem vodíkových vazeb
- vzájemný kontakt mezi řetězci indukuje vznik další terciární a vyšší stupňové struktury [7].



Obr. 4 Elektronová mikrofotografie několika propletených molekul HA [12]

3.1.1 Relativní molekulová hmotnost HA

Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové závisí na zdroji, metodě její izolace a kvalitě čistícího procesu použitého při výrobě [2]. První studie zabývající se určováním relativní molekulové hmotnosti HA byly vypracovány již v 50. letech 20. století. Molekulová hmotnost izolované HA se pohybovala v rozmezí od 10^4 do 10^7 g.mol⁻¹. Z absolutních metod byly ke stanovení M_r použity sedimentace, rozptyl světla, osmometrie a kombinace sedimentace a difúze [7].

Tab. 1 Publikované hodnoty relativní molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové připravené z různých tkání [7]

Tkáň	Relativní molekulová hmotnost	Technika měření
lidská pupeční šňůra	3.4×10^6	rozptyl světla
hovězí sklivec	7.7×10^4	rozptyl světla
	1.7×10^6	sedimentace a difúze
hovězí synoviální tekutina	14×10^6	rozptyl světla
lidská synoviální tekutina zdravá	6×10^6	rozptyl světla
	$(2.7-4.5) \times 10^6$	rozptyl světla
revmatická		
kohoutí hřebínek	1.2×10^6	ultracentrifugace
Streptokokové kultury	0.115×10^6	sedimentace
	0.93×10^6	a viskozimetrie

Nejběžnější a nejjednodušší metodou určování M_r roztoků kyseliny hyaluronové jsou viskozimetrická měření [7].

Viskozitní průměr molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové M_v se často stanovuje z hodnot limitního viskozitního čísla pomocí Mark-Houwinkovy rovnice, která popisuje vztah mezi limitním viskozitním číslem a relativní molekulovou hmotností:

$$[\eta] = K \cdot M^a ; \quad (1)$$

kde: K, a jsou konstanty Mark-Houwinkovy rovnice pro dvojici polymer - rozpouštědlo

M je molekulová hmotnost [2].

Pro HA je logaritmická závislost $[\eta]$ a M_v nelineární a liší se v závislosti na její molekulové hmotnosti. Pro $M_v < 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ platí $K = 0.029$ a $a = 0.80$, zatímco pro $M_v > 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ je $K = 0.397$ a $a = 0.601$ [2].

Distribuce molární hmotnosti HA připravené z různých zdrojů byla rovněž zkoumána pomocí gelové chromatografie na různých typech náplní. Je třeba podotknout, že kvalita chromatografické separace HA je významně závislá na pH, iontové síle, typu soli a rychlosti toku mobilní fáze, která je při chromatografické separaci použita [7,13].

3.2 Reologické vlastnosti

V roztoku jsou lineární polymerní řetězce kyseliny hyaluronové uspořádané do tvaru klubka a již při nízkých koncentracích se navzájem propletou, což přispívá k jejím neobvyklým reologickým vlastnostem. Při vyšších koncentracích vykazují roztoky HA extrémně vysokou smykovou závislost viskozity. Roztok o koncentraci 1 % připomíná gel, avšak pokud na něj působíme tlakem, poměrně snadno se pohybuje. Z hlediska reologie se tedy HA chová jako pseudoplastický materiál [14].

4 STABILITA KYSELINY HYALURONOVÉ

4.1 Termická, chemická a enzymatická degradace

Dlouhodobým zahříváním roztoků HA dochází ke snižování její relativní molekulové hmotnosti. V publikaci [7] je uvedena řada pozorování, která dokázala, že vlivem degradace se při teplotě 128 °C po třiceti minutách relativní molekulová hmotnost snížila z hodnoty 4.3×10^6 na 1×10^6 a po 180 minutách dokonce na 1×10^5 . Kinetika tepelné degradace tohoto biopolymeru při neutrálním pH probíhá za výše uvedených podmínek mechanismem náhodného štěpení [7].

Při zvýšené teplotě 40 – 44 °C v přítomnosti thiolů a přechodných kovů dochází též k degradaci HA, protože tyto kovy stimulují produkci reaktivních OH radikálů. K poklesu relativní molární hmotnosti HA dochází i při její oxidaci účinkem kyseliny jodisté. To se projeví ve zvýšené flexibilitě jejího polymerního řetězce a ve snižování hydrodynamických interakcí v roztoku. Tato oxidace může způsobit i roztržení hlavního polymerního řetězce. Chemickou degradací HA účinkem dimetyl sulfoxidu a kyseliny chlorovodíkové je možno připravit směs jejích oligosacharidů [7].

U savců probíhá enzymatická degradace HA působením tří typů enzymů: hyaluronidázou, β -D-glukuronidázou a β -N-acetyl-hexosaminidázou, které se v různých formách nachází v lidském organismu [1]. Za pomoci hyaluronidázy se HA v organismu odbourává dvěma cestami, a to:

- internalizací a degradací v lysozomech buněk
- uvolněním do extracelulární matrix a transportem lymfatickými cestami do jater a ledvin [3].

Hyaluronidáza jako hlavní složka intersticiální bariéry snižuje viskozitu kyseliny hyaluronové, čímž zvyšuje propustnost tkání [1].

4.2 Fotochemická degradace

Již delší dobu je středem vědeckého zájmu studium vlivů různých druhů záření na degradaci HA, především v souvislosti se sledováním patologických procesů probíhajících v oku.

Studiem bylo zjištěno, že UV záření způsobuje pokles viskozity roztoků HA a jeho vlivem dochází k trhání glykosidické vazby za současného odbourávání vedlejších skupin účinkem reaktivních radikálových forem kyslíku. Degradace terciární a kvartérní struktury makromolekuly HA může nastat i účinkem singletového kyslíku $^1\text{O}_2$ [7].

Vědci rovněž zkoumali vliv fotosenzibilizátorů (metylenová modř, riboflavin) na změnu struktury tkaniva sklivce účinkem viditelného záření a zjistili, že dochází ke ztekucování jeho gelové části [2].

Z fyziologického hlediska dochází degradací HA ke zvyšování počtu molekul v uzavřeném objemu sklivce, což může vést ke zvyšování nitroočního tlaku a tím k rozrušování terciární a kvartérní struktury aduktů HA s kolagenem v tkanivu sklivce [7].

5 BIOKOMPATIBILITA KYSELINY HYALURONOVÉ

Biokompatibilita představuje snášenlivost látek a materiálů v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál se posuzuje podle celé řady testů, především se sleduje cytotoxické působení, dále jsou to toxikologické a alergické reakce a karcinogenita či mutagenita [15].

HA je materiál běžně přítomný v lidském těle a je pro něj typická dobrá biokompatibilita. Přítomnost HA lze dokázat u všech druhů savců, ve všech mikroorganismech i ve všech tkáních člověka. Je také zajímavé, že molekula HA je stejná u všech organismů a všech tkání, a proto se nemůže vyskytovat jako látka cizí pro imunitní systém [14]. Důležitým faktorem je i skutečnost, že v lidském těle je u zdravého jedince metabolizováno až několik gramů HA za den. Vysoká kapacita obratu HA znamená, že malé množství její aplikace nepřispívá k významné metabolické zátěži [14].

Balazs s Laurentem [16] zjistili, že HA je inertní v porovnání s ostatními biomateriály používanými v medicíně, jelikož při implantaci nevyvolává zánětlivé či imunitní reakce na cizí těleso. Ačkoliv existuje rozsáhlá literatura shromažďující klinická data pro roztoky, gely a deriváty HA používané k léčebným účelům, jen velmi málo publikací zveřejňuje biokompatibilitu povrchů, které by mohly být připojením HA modifikovány. Larsson [16] použil různé buněčné systémy a krev *in vitro* pro srovnání imobilizované plochy heparinu s imobilizovanou HA. Došel k závěru, že při hodnocení krátkodobé buněčné kompatibility byly obě plochy od sebe nerozeznatelné. Nicméně povrch heparinu může být jasně odlišen od povrchu HA na základě své schopnosti absorbovat a inaktivovat trombin [16].

Nedávno publikovaná studie různých fotochemicky imobilizovaných polymerních povlaků na silikonovém kaučuku porovnává HA se syntetickými materiály jako jsou polyakrylamid, polyethylenglykol, atd. [17]. Z výsledků studie vyplývá, že povrch potažený HA vykazuje 92% pokles v *in vitro* adsorpci proteinu fibrinogenu v porovnání s nepotaženou silikonovou pryží [14].

5.1 Cytotoxicita

Jansen a spol. [18] zkoumali možné cytotoxické účinky HA na periferní nervový systém. Výsledky ukázaly, že HA není cytotoxická a vykazuje dobrou biologickou snášenlivost. HA je neantigenní a anti-imunogenní, vyznačuje se vysokou strukturální homologií téměř se všemi druhy tkání a poskytuje jen omezené interakce s krevními složkami [18].

5.2 Neurotoxicita

Vzhledem k tomu, že HA má výrazný protizánětlivý účinek a zabraňuje srůstání tkání, mohlo by epidurální podání HA zmírnit stav pacientů s chronickou bolestí zad. Proto byla provedena klinická studie epidurálního podávání HA u králíků. Králíci byli rozděleni do dvou skupin – první skupině byl do epidurálního prostoru aplikován fyziologický roztok a druhé HA. Žádný z králíků neprokázal smyslové či jiné změny v chování v průběhu tří týdnů, s výjimkou jednoho ve skupině, které byl aplikován fyziologický roztok. Závěry provedené na základě pozorování v elektronovém mikroskopu ukázaly, že neurotoxické nálezy byly u obou skupin králíků negativní [19].

5.3 Karcinogenita

HA je zodpovědná za některé z funkcí uvnitř extracelulární matrix, jako je růst buněk, diferenciace a migrace. Široké spektrum aktivit je závislé na velkém počtu HA-vazebných receptorů jako je glykoprotein CD44 na povrchu buněk, receptor pro kyselinu hyaluronovou zprostředkovávající buněčnou mobilitu (RHAMM) a několik dalších receptorů, které mají HA-vazebné vzory [1].

Bylo prokázáno, že u různých nádorových buněk je hladina HA zvýšena a má se za to, že se HA formuje jako méně hustá matrice, tudíž zlepšuje buněčnou mobilitu stejně jako invazivní schopnost nádoru do jiných tkání [1].

Je známo, že různé nádory (epitelové, tlustého střeva, žaludku) exprimují HA-vazebné receptory CD44 a RHAMM. V důsledku toho se tyto nádorové buňky vyznačují pevnější vazbou k HA [1].

Paradoxně oba HA-receptory a enzymy eliminující HA (hyaluronidázy) mohou souviset s vývojem rakoviny. Výzkumy dokázaly, že čím vyšší je množství enzymu HA-syntázy, tím vyšší je i hladina HA, což vede ke zrychlenému růstu nádorů a metastáz. Na druhou stranu, exogenní oligomerní HA brání progresi nádorů pravděpodobně tím, že soutěží s endogenní polymerní HA [1]. Podle celé řady provedených testů však bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová nevykazuje karcinogenní účinek.

5.4 Mutagenita

U kyseliny hyaluronové byly provedeny také testy studující její mutagenitu, tedy schopnost vyvolávat v organismu nežádoucí genetické mutace. Výsledky zrealizovaných testů na mutagenní účinky HA byly negativní.

První test se týkal výměny sesterských chromatid a druhý test zkoumal odchylky chromozomů. V obou testech HA nevykazovala mutagenní účinky na vaječníky čínských křečků [20]. Byl také proveden tzv. Amesův test mutagenity u bakterie *Salmonella*. Tímto testem rovněž nebyly u HA prokázány mutagenní účinky pro testovaný kmen *Salmonella typhimurium* [20].

6 PŘÍPRAVA KYSELINY HYALURONOVÉ

HA se nachází ve spojovací tkáni, v synoviálních tekutinách a ve sklivci, odkud je možno ji izolovat [7]. Balazs, Leshchiner a jejich spolupracovníci patentovali několik různých procesů její přípravy a výroby [14].

Jedním ze způsobů izolace a čištění HA pro farmaceutické účely je metoda popsaná v publikaci [7]. Surovina použitá na tuto izolaci, tedy pupeční šňůra nebo kohoutí hřebínky, se zmrazí, aby se rozrušily její buněčné stěny a následně rozřeže na malé kousky. Takto upravená se extrahuje etanolem s přídavkem cetylpyridinium chloridu, chloroformu a vody. Dále se získaný produkt čistí a upravuje se jeho pH. Tímto způsobem je možné získat produkt s 0.5 hm. % obsahem bílkovin s výtěžností 0.9 g/kg výchozí látky. Pro další snížení obsahu bílkovin pod 0.1 hm. % je možno HA čistit pomocí iontově výměnné chromatografie [7].

Pro aplikace v kosmetickém průmyslu je zajímavá výroba této suroviny bakteriemi *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus pneumoniae*. Kultivace se provádí v roztocích glukózy s obsahem kvasinek a soli při 33 °C a pH 8.5 [7]. Při izolaci HA z oslabeného kmene mikroorganismu *Streptococcus equi* se používá proces, který se skládá z postupných kroků prováděných ve vymezených prostorách. Základem je dostatečně provedená purifikace vyrobené HA a snížení obsahu bílkovin. Vstupní materiály již nejsou živočišného původu a tímto postupem je zabráněno kontaminaci viry či priony, což následně omezí alergické reakce [10]. Naopak nežádoucími účinky této metody je přítomnost bakteriálních endotoxinů, chondroitin sulfátu, bílkovin, nukleových kyselin a těžkých kovů [21].

Další účinnou metodou přípravy HA je enzymatická syntéza. Enzym *hyaluronansyntáza* syntetizuje velké, lineární polymery opakující se disacharidové struktury HA střídavým přídavkem kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu na rostoucí řetězec pomocí jeho aktivace cukry nukleotidů, které slouží jako substráty reakce [12]. Počet opakujících se jednotek disacharidů může u kompletní molekuly HA dosáhnout až čísla 10000 a více, s molekulovou hmotností přibližně $4 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [1].

Dříve se pro přípravu kyseliny hyaluronové používaly spíše biologické metody, ale pro jejich náročnost a kvůli možnému riziku kontaminace konečného výrobku surovinou živočišného původu se od těchto postupů ustoupilo. Během posledních let se HA získává převážně moderními biotechnologickými procesy [10].

Velká pozornost je v současnosti věnována výzkumům vlastností síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové tzv. hylanům. Jejich roztoky a gely se vyznačují vysokou elasticitou. Připravují se buď použitím formaldehydu při neutrálním pH za vzniku stálé vazby mezi C-OH skupinami polysacharidu a amino či imino skupinami proteinu, anebo reakcí vinyl sulfonu s hydroxylovými skupinami HA za vzniku systému síťovaného prostřednictvím sulfonyl-bis-etylových příčných vazeb [7].

6.1 Výrobci kyseliny hyaluronové pro komerční účely

Řada výrobců kyseliny hyaluronové pochází z Evropy, například společnost **Contipro Group a.s.**, největší dodavatel HA pro evropský trh nebo švýcarská firma **IBSA Institut Biochimique SA**. Existují ale také další producenti kyseliny hyaluronové, například z Číny, Japonska, Indie, Itálie, Francie a USA.

Mezi současné největší výrobce kyseliny hyaluronové patří český holding Contipro Group a.s. V roce 1992 uvedla tato společnost na trh kyselinu hyaluronovou v kosmetickém stupni kvality, v roce 1999 farmaceuticky čistou kyselinu a po ní kyselinu hyaluronovou pro potravinářské účely. Údaje z roku 2004 potvrzují, že Contipro Group a.s. ovládal dvě třetiny evropského a třetinu světového trhu s touto komoditou [22].

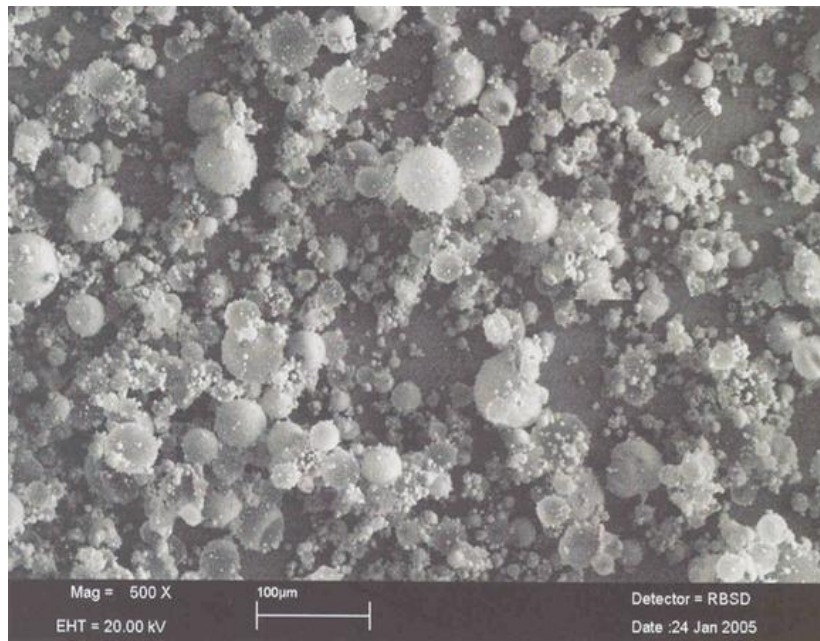
Pro komerční účely se kyselina hyaluronová dodává ve formě práškové či ve formě 1% roztoku. V prášku je obsažena v koncentraci 0.005 – 0.1 % a je používána především v kosmetice [22,23].

Dalším významným výrobcem kyseliny hyaluronové pro dermatologii, kosmetiku, gynekologii a oftalmologii je společnost IBSA (Institut Biochimique SA) ze Švýcarska. Strategie společnosti je orientována na výzkum a vývoj farmakoterapeutických systémů. Firma vyrábí předplněné injekční stříkačky s kyselinou hyaluronovou určené pro estetickou dermatologii. IBSA svůj výrobní proces založila na dostatečné purifikaci HA bakteriálního původu a snížení obsahu bílkovin ($\leq 0,1$ %) v konečném produktu [10].

Na českém trhu se na výrobě HA podílí i hodonínská firma **Biora, s.r.o.** Možnosti využití vlastní technologie výroby kyseliny hyaluronové jí otevřely cestu do oblasti kosmetických prostředků, stejně jako lékových injekčních forem vysokomolekulární kyseliny hyaluronové a očních kapek. V roce 1995 firma zahájila produkci plet'ových vod na bázi kyseliny

hyaluronové, určených pro pravidelné denní použití. V tom samém roce byl vyvinut i potravinový doplněk na bázi včelího pylu, mateří kašičky a hyaluronanu [24].

Mezi producenty HA patří i dánská společnost **Novozymes Biopharma**, která vyvinula novou generaci HA získávanou kvašením bakteriálního kmene *Bacillus subtilis*. Při tomto způsobu výroby nejsou používány žádné materiály živočišného původu ani organická rozpouštědla. Výsledný výrobek obsahuje velmi nízkou hladinu proteinů, endotoxinů a navíc je charakterizován dobře řízenou a reprodukovatelnou molekulovou hmotností [21,25].



*Obr. 5 Fotografie kyseliny hyaluronové produkované bakteriálním kmenem *Bacillus subtilis* pořizená pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu [21]*

7 VÝSKYT HA V ORGANISMU A BIOLOGICKÉ FUNKCE

7.1 Výskyt kyseliny hyaluronové v lidském organismu

Kyselina hyaluronová se vyskytuje především v extracelulární a pericelulární matrix, i když nedávné výzkumy potvrdily, že se může nacházet i intracelulárně. V lidském těle jsou nejvyšší koncentrace HA v měkkých pojivových tkáních, jako je synoviální tekutina, pupeční šňůra, kůže a oční sklivec [26]. Značné množství kyseliny hyaluronové je přítomno také v plicích, ledvinách, mozku, svalech a v játrech. Nejnižší obsah se pak nachází v krevním séru [27]. Celkové množství HA v lidském těle je okolo 12 g [28].

Téměř polovina obsahu HA v těle se vyskytuje v pokožce. HA můžeme nalézt v intracelulárním prostoru v dermis (0.5 mg/ml) a v epidermis (2 – 4 mg/ml) [6]. Funkce kyseliny v každé z těchto komponent kůže je zcela rozdílná. V epidermis HA poskytuje buňkám mobilitu a vytváří vhodné prostředí pro jejich pohyb extracelulárním prostorem. V dermis je volně vázána na tkáň, v rovnováze se zbytkem těla a je snadno odstranitelná lymfatickým systémem, kde je následně metabolizována pomocí mízních uzlin, jater a ledvin [29].

Kyselina hyaluronová je produkována fibroblasty, synoviálními buňkami, endotelovými buňkami, buňkami hladkého svalstva a vajíčky. Vyrobena HA je zadržována v buněčné membráně a poté propuštěna do obklopujícího mezibuněčného prostoru. Katabolismus probíhá velmi rychle, v kůži je její poločas rozpadu menší než 24 hodin. Degradace je ovlivněna tepelným účinkem, enzymaticky prostřednictvím enzymů *hyaluronidáz* a interakcí s volnými radikály [28]. Patologické hromadění HA v lidském těle se označuje jako hyaluronóza [3].

Tab. 2 Výskyt HA v různých živočišných tkáních a její obsah [26]

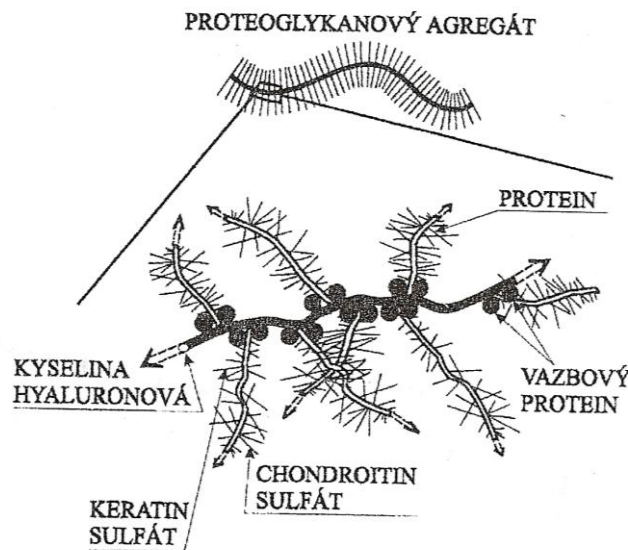
Tkáň nebo tělesná tekutina	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Poznámky
kohoutí hřebínek	7500	živočišná tkáň s nejvyšším obsahem HA
lidská pupeční šňůra	4100	tkáň s relativně vysokou molární hmotností HA
synoviální tekutina	1400-3600	objem synoviální tekutiny se zvyšuje při zánětlivých stavech. To vede k poklesu koncentrace HA
nosní chrupavka skotu	1200	-
oční sklivec	140-340	koncentrace HA se zvyšuje při zrání tkáně
dermis	200-500	HA je využívána jako omlazující prostředek v estetické dermatologii
pokožka (epidermis)	100	koncentrace HA je vyšší kolem buněk, které jsou syntetizovány
králičí mozek	65	má schopnost snížit výskyt mozkových nádorů
králičí srdce	27	-
lidská hrudní míza	0.2-50	-
lidská moč	0.1-0.3	významný zdroj enzymu <i>hyaluronidázy</i>
lidské sérum	0.01-0.1	HA je ve vyšší koncentraci v séru starších lidí, stejně jako u pacientů s artritidou a cirhózou jater

7.2 Biologické interakce s jinými makromolekulami

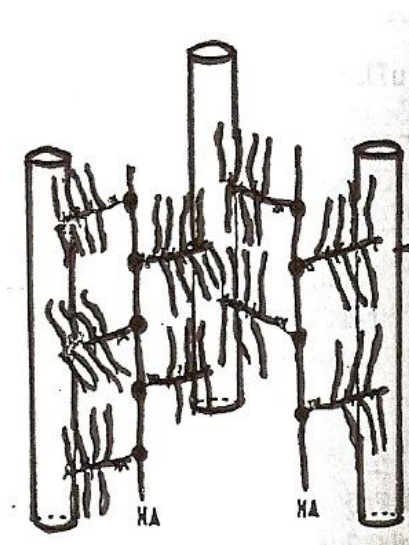
Mezi molekulami polysacharidů nacházejících se ve spojovacím tkanivu a dalšími makromolekulami dochází v organismu ke vzájemné interakci. Asymetrické řetězce HA vytlačují jiné makromolekuly z velké části objemu okolního rozpouštědla. Vyloučený objem narůstá s rostoucí koncentrací HA a velikostí vytlačovaných částic. Vylučovací efekt výrazně ovlivňuje osmotický tlak, jakož i rozpustnost jiných makromolekul, což má velký význam při ovlivňování mnohých fyziologických procesů v organismu [7].

HA slouží jako základní složka pro tvorbu proteoglykanového agregátu, který vykazuje makromolekulární uspořádání. Tento agregát zahrnuje nekovalentně vázanou kyselinu hyaluronovou, individuální proteoglykan a dva vazebné proteiny [4]. Příklad takového agregátu je znázorněn na Obr. 6.

Komplexy mezi glykosaminoglykany a proteiny vytváří v organismech vysoce organizované struktury se specifickými vlastnostmi (např. schopnost vázat vodu, která způsobuje bobtnání tkániva, vysokou pevnost v tahu, vysokou elasticitu, schopnost tvorby gelů o různé velikosti pórů a různé hustotě, které působí v tkánivu jako molekulové síta regulující transporty) [7].



Obr. 6 Schématické znázornění velkého proteoglykanového agregátu vytvořeného z přibližně 100 monomerních jednotek proteoglykanu [7]



Obr. 7 Znárodnění způsobu vazby mezi vlákny kolagenu a agregátu kyselina hyaluronová-proteoglykan [7]

7.3 Biologické funkce HA

Kyselina hyaluronová plní několik důležitých biologických funkcí v organismu. Tyto funkce jsou úzce spojené s jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi a liší se v závislosti na jejím umístění v lidském těle. Primárně funguje jako stavební element [7].

7.3.1 Synoviální tekutina

Synoviální tekutina, stejně jako ostatní extracelulární tekutiny, působí v roli transportního systému dodávající kloubní chrupavce živiny a kyslík a odvádějící odpadní produkty metabolismu. Tvoří povlak pokrývající celý vnitřní povrch kloubu. Tato vrstva je tvořena HA ve spojení s proteiny a je asi 2 μm silná. Vrstva HA je neustále degradována a následně znovu obnovována [30].

Kyselina hyaluronová díky svým viskoelastickým vlastnostem funguje v kloubech jako lubrikans, snižuje tření a absorbuje tlakové nárazy, čímž snižuje opotřebenání kloubů. V zánětlivých procesech jako osteoartritida, revmatická artritida pomáhá uvolňovat látky cytokiny a chemokiny, které vedou k mírnějšímu průběhu zánětu [26].

7.3.2 Kloubní chrupavka

Chrupavka je tkáň tvořena buňkami chondrocyty. Větší část tkáně je vysoce organizovaná [30]. V chrupavce, i přes relativně nízký obsah, funguje HA jako důležitý strukturní prvek v matrici [26]. HA v chrupavčité tkáni tvoří kostru pro připojení proteoglykanů a proteoglykanové agregáty tvoří základní stavební složku chrupavky [30].

Kyselina hyaluronová dává chrupavce pevnost a pružnost a působí jako tlumič nárazů. Snižuje i opotřebenění při artróze. Dále zde podporuje endogenní syntézu nové HA buňkami synoviální membrány, zlepšuje metabolismus chondrocytů a zabraňuje degradaci kloubní chrupavky [31].

7.3.3 Kůže

Hlavním úkolem kyseliny hyaluronové v kůži je hydratovat a zjemňovat pokožku, udržovat tvar tkání a posilovat jejich napětí [10].

Kyselina hyaluronová má větší schopnost vázat vodu než jakákoliv dnes známá přírodní nebo syntetická sloučenina. 1 gram této kyseliny může navázat až 3 litry vody. Díky této schopnosti působí HA jako látka zadržující vodu v pokožce a udržující tonus a elasticitu její tkáně [32]. Rovněž antioxidantním působením chrání HA pokožku proti volným kyslíkovým radikálům, podporuje tvorbu kolagenu a zabraňuje jeho ukládání, tím pádem podporuje to, že při hojení rány nevznikají jizvy. Urychluje tedy tkáňovou regeneraci a proces hojení [10].

Bylo zjištěno, že fyziologické množství kyseliny hyaluronové u dospělých je okolo 12 g, z čehož asi polovina je uložena v kůži [28,33]. Výzkumy prokázaly, že přibližně od 25. roku obsah kyseliny hyaluronové významným způsobem klesá ve prospěch jiných látek a že tento pokles vede ke vzniku vrásek a dalším projevům stárnutí pokožky (Tab. 3) [10]. Např. kolem 40. roku je tvorba vlastní HA na úrovni 40 % a v 60 letech jenom kolem 10 % původní produkce. Výsledkem je, že interakce mezi kyselinou hyaluronovou a kolagenem už nefunguje tak hladce, pokožka ztrácí elasticitu a tvoří se vrásky [32].

Tab. 3 Vliv věku na koncentraci kyseliny hyaluronové v lidské kůži [4]

Věková skupina	HA (%)	Střední směrodatná odchylka (%)	Pokles (%)
19 ± 2.5	0.030	0.005	-
35 ± 3.5	0.030	0.005	-
47 ± 1.7	0.030	0.006	-
60 ± 0.8	0.015	0.003	50
75 ± 5.0	0.007	0.001	77

Důvody, proč kyseliny hyaluronové s věkem ubývá, nebyly ještě zcela objasněny. Některé studie naznačují, že je to způsobené depolymerizací volnými radikály vznikajícími při metabolismu [4].

7.3.4 Oční sklivec

V endotelu rohovky má viskózní vodný roztok kyseliny hyaluronové za úkol chránit tuto tkáň před mechanickým poškozením [4]. Hyaluronát sodný vytváří na povrchu oka lehce hydratační film a tím jej udržuje dostatečně vlhký. V důsledku toho jsou citlivé oční struktury chráněny a je stabilizován přirozený slzný film [8]. Kyselina hyaluronová udržuje také potřebný turgor oka [29].

7.3.5 Další biologické funkce

Přítomnost HA je rovněž důležitá v přípravě endometria na případnou nidaci oplodněného vajíčka. HA současně hraje zcela nezastupitelnou úlohu v embryogenezi a následně i v rámci celého nitroděložního vývoje plodu. Pro nově vzniklé a diferencované buňky vytváří společně s dalšími molekulami opěrnou síť a současně participuje na udržování stálosti prostředí [3]. I když se zpočátku předpokládalo, že HA slouží především jako molekulární inertní náplň pojivové tkáně, následným studiem HA-vazebných proteinů a specifických receptorů bylo zjištěno, že zprostředkovává i mnoho jiných funkčních aktivit. HA hraje důležitou roli při signální transdukci a buněčné mobilitě [26].

V neposlední řadě je známo, že HA pomáhá zabraňovat prostupu virů a bakterií přes pericelulární matrix k buňce, ovlivňuje vývoj (proliferaci a diferenciaci) buněk a má významný analgetický účinek [31].

8 VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ

Výše popsané unikátní vlastnosti HA ji předurčují k tomu, že hraje důležitou fyziologickou roli v živých organismech a vytváří atraktivní biomateriál, především pro medicínské a kosmetické aplikace [26]. Díky své konzistenci a možnosti optimálně udržovat vlhkost tkání bývá proto používána v přípravcích v péči o pokožku, především v hydratačních krémech [1]. Mimo jiné je také hojně využívána v oční chirurgii, při artroskopických operacích, jako výplň vrásek v plastické chirurgii, při terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, při endoskopických operacích k prevenci jizvení, k intravezikální instilaci při cystitidách a v očních nebo nosních kapkách [3].

Kromě výše uvedených aplikací je třeba zmínit, že funguje i jako lubrikans, k čemuž do jisté míry přispívají její mimořádné reologické vlastnosti. Této lubrikační schopnosti kyseliny hyaluronové se s výhodou využívá v medicíně, kdy bylo prokázáno, že snižuje pooperační přilnavost tkání, především po ortopedických a břišních operacích [1]. V neposlední řadě HA vykazuje také význačné imunomodulační vlastnosti, které urychlují hojení a epitelizaci poranění a zánětů na kůži, v dutině ústní a také na vaginální sliznici a epitelu děložního čípku [3].

V této kapitole budou obsáhleji rozebrány hlavně medicínské a kosmetické aplikace HA.

8.1 Medicínské aplikace kyseliny hyaluronové

8.1.1 Oftalmologie

Kyselina hyaluronová je klíčovou makromolekulou používanou v oftalmologii. Je prokázáno, že přípravky obsahující HA chrání oční tkáň a usnadňují náročné chirurgické zákroky. Její prvotní funkcí je však náhrada tekutiny ztracené během operace šedého zákalu, či implantace čočky [26]. V dnešní době je takto používán 1% roztok HA [2].

HA se uplatňuje rovněž během operace ve formě nitroočních injekcí, kdy pomáhá udržet tvar přední komory. Je důležitou složkou očních kapek a pomocnou látkou sloužící k reparaci oční tkáň [1,2].

První komerční oftalmologický produkt na bázi HA **Healon** (Pfizer, 1979) byl připraven z kohoutích hřebínků a byl používán i pro ochranu endotelu rohovky při její transplantaci. V současné době je k dispozici řada výrobků s různou molekulou hmotností HA, včetně preparátu **Viscoat** (Alcon Labs, Inc., Fort Worth), který kombinuje kyselinu hyaluronovou s chondroitin sulfátem [26].

Dalšími obdobnými produkty jsou binární produkt **VISC26**, který se skládá z hyaluronátu sodného a hydroxypropylmethyl celulózy [26] a přípravek **VISMED®** (TRB Chemedica) s obsahem 0.3 % hyaluronátu sodného [8].

8.1.2 Otolaryngologie

Jak již bylo uvedeno v kapitole 7.1, HA se ve vyšším množství v těle nachází i v hlasivkách. V této tkáni ovlivňuje několik funkcí, včetně její viskozity, tkáňového průtoku, osmózy, tlumení nárazů a hojení ran. Tyto funkce jsou pro hlasivky obzvláště důležité, protože mají přímý vliv na tloušťku a viskozitu hlasového orgánu [26]. Deriváty kyseliny hyaluronové jsou určeny ke zvýšení viskozity hlasivek, k regeneraci poškozených hlasivek a k léčbě jejich nedostatečné funkčnosti. Hlavní nevýhodou léčby hlasivek kyselinou hyaluronovou je však krátká doba jejího účinku, pouze jenom 3-5 dní [26].

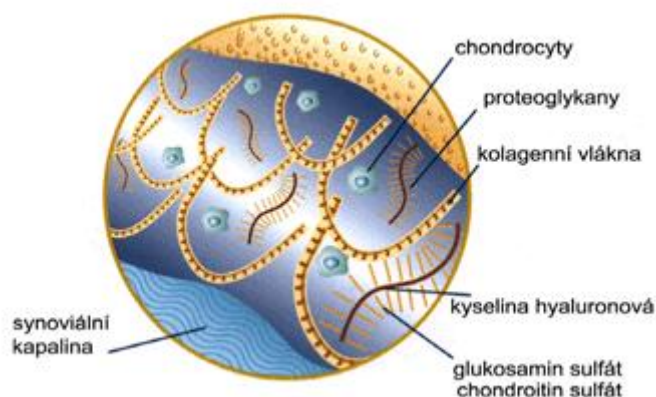
V léčbě poruchy sluchu se osvědčily estery HA, např. přípravek **HYAFF** (Fidia), který je používán při operacích dutin ucha, podporuje hojení ran na bubínku, usnadňuje reepitelizaci, stejně jako zabraňuje srůstání vrstev mezi sliznicí [26].

8.1.3 Ortopedické aplikace a revmatologie

Existuje více než sto artritických onemocnění, mj. osteoartróza a revmatoidní artritida, která postihují převážně starší populaci. Zatímco osteoartróza je degenerativní onemocnění chrupavky a kostí a vede především ke ztuhlosti postiženého kloubu, revmatoidní artritida je systémové zánětlivé onemocnění, ve kterém je bolest kloubů navíc doprovázena degenerativními změnami v jiných orgánech, jako jsou plíce, srdce, cévy [26].

Kyselina hyaluronová byla použita k experimentální léčbě osteoartrózy. Výzkumy prováděné na zvířatech ukázaly, že nitrokloubní injekce HA snižují poškození kloubní chrupavky. V konečném důsledku obnovuje HA viskoelasticitu synoviální tekutiny, snižuje ztuh-

lost a zlepšuje pohyblivost kloubů obnovením transsynoviálního toku, což má vliv na metabolismus a homeostázu kloubu [1,26].



Obr. 8 Schématický náčrt kloubní chrupavky se znázorněním kyseliny hyaluronové [34]

V akutní fázi revmatoidní artritidy je v synoviální tekutině zvýšený počet neutrofilů. Tyto buňky mění oxidační homeostázu a jejich produkty, především reaktivní formy kyslíku, pak přispívají k destrukci kloubních struktur. Změněné tkáně jsou imunitním systémem považovány za cizí a následně autoimunitní reakce podporuje rozvoj systémového onemocnění postihující celé tělo [26].

Hlavními komerčními produkty zaměřenými na zmírnění revmatoidní artritidy jsou přirozeně se vyskytující hyaluronan zvaný **Hyalgan** (Fidia) a syntetický hylan **G-F 20** s komerčním názvem **Synvisc** (Genzyme). Hylany jsou zesíťované formy kyseliny hyaluronové, které vykazují zvýšenou viskoelasticitu. Díky vyšší molekulové hmotnosti mohou být daleko účinnější než kyselina hyaluronová, právě díky svým viskoelastickým vlastnostem a delší době působení v kloubním prostoru [1].

Existují i další komerční produkty s obdobným účinkem na bázi vysokomolekulární HA, např. **Healon** (Pfizer) a **Artz Dispo** (Seikagaku). Zatímco léčba tímto typem HA vyžaduje tři injekce po dobu 3 týdnů, léky na bázi nízkomolekulární HA musí být aplikovány nejméně pětkrát po dobu více jak 5 týdnů. Na trhu existuje také produkt známý jako **Durolane** (Q-Med AB), u kterého stačí pro pozitivní výsledek aplikovat pouze jednu injekci po dobu až šesti měsíců [26].

8.1.4 Farmakologie a podávání léků

Hlavním cílem léčiv při topické aplikaci je, aby pronikly přes kůži až do krevního oběhu. Avšak fyziologickou funkcí kůže je působit jako ochranná bariéra, která pronikání hydrofilních molekul, včetně některých léků, do hlubších vrstev kůže brání [6].

HA je bezpečně metabolizována v lysozomech, navíc je “neviditelná“ pro imunitní systém, protože je přirozenou součástí těla [2]. Proto její přítomnost umožňuje pronikat lékům vnější kožní bariérou, což je vhodné zvláště pro jejich transdermální použití. Tímto způsobem lze aplikovat zejména kortikosteroidy, imunosupresiva, antihistaminika, anestetika, retinoidy, pohlavní hormony, antibakteriální a antivirové prostředky, atd. [6].

Další oblast výzkumu vedla ke zjištění potenciálu kyseliny hyaluronové jako nosiče pro léky pronikající přes lymfatické cesty, neboť lymfatický systém je hlavní účastník v šíření mnoha zhoubných nádorů. Po aplikaci léků na kůži nebo do svalu je většina z nich rozptýlena přes kapilární stěnu do krevního oběhu a jen malá část se dostává do lymfy. Spojením léčiva s HA je dosaženo jeho snadnější přepravy do mízních uzlin [2].

Díky přítomnosti karboxylové skupiny lze kyselinu hyaluronovou i síťovat. Síťovaná HA byla použita k vytvoření hydrogelu sloužícího k perorálnímu podávání léků. HA může být buď přímo konjugovaná na lék, nebo lze využít mikrokapsule. Mezi její další aplikaci související s farmakologií patří zlepšení biokompatibility mikročástic chitosanu používaných v tobolkách [26].

V neposlední řadě může být vysokomolekulární HA použita i k přípravě léků vhodných k léčbě nebo prevenci patologických stavů jako je lupénka, ekzém, ichthyóza, atopická dermatitida, vředy a dekubity, hemeroidy, prurigo [35].

8.1.5 Chirurgie a hojení ran

V poslední době se objevuje stále více studií zaměřených na využití kyseliny hyaluronové při léčbě porušené slizniční a kožní integrity [3]. V místě poranění kůže dochází ke zvýšené produkci a posléze nahromadění kyseliny hyaluronové, která v ráně stimuluje obnovu tkání. Během stárnutí organismu je zároveň snížena i schopnost hojení, což je spojeno se sníženou koncentrací HA v kůži. Bylo prokázáno, že molekuly HA se vážou na fibrin za vzniku krevní sraženiny. Cílem je, aby se sraženina zvětšila a byla co nejvíce porézní, což usnadní migraci buněk do matrice. Buňky z obvodu rány se stěhují dovnitř. Tímto způsobem

bem jsou přitahovány monocyty, makrofágy a neutrofilly, které se v místě poranění začnou množit a zároveň fagocytovat [36].

Možné efektivní využití HA v oblasti chirurgie je především v zamezení pooperačních srůstů a ke snížení adheze po břišních a ortopedických operacích [2]. Firma Genzyme vyvinula k tomuto účelu dva přípravky, **Seprafilm®** a **Sepracoat®** vyrobené na bázi síťovaného gelu hyaluronanu [14]. Obdobně se využívá i výrobek **Hyiodine®** (Contipro Group a.s.), který dokáže udržet bezprostřední okolí buněk dostatečně hydratované a příznivě tak ovlivňuje hojení. Kožní defekt se v přítomnosti HA hojí bez vystouplých jizev. Hyiodine® se používá na zhnisané, hluboké rozsáhlé pooperační rány, popáleniny, proleženiny, bércové vředy a diabetické defekty [22].

Vzájemná přilnavost tkání může být rovněž hlavním důvodem, proč dochází k vývoji infekce, která je velkým rizikem pro pacienta. Proto je HA používána i k prevenci bakteriální adheze na zubní implantáty [1].

Díky svým antioxidačním schopnostem, HA slouží jako protizánětlivá složka obvazů na rány [26]. Jedním z takových produktů je i **Hypro-Flex®** (Hypro Otrokovice, s.r.o.), vstřebatelný obvaz na bázi čistého atelokolagenu s komplexně vázanou kyselinou hyaluronovou. Z používaných kolagen-hyaluronátových kompozitů se však hyaluronan většinou rychle vyplavuje působením exudátu. Proto je HA na atelokolagen naroubována a uvolňuje se postupně. Hypro-Flex® se používá pro prevenci a léčbu dekubitů, bércových vředů, chronických kožních zánětů, ale i na popáleniny I. a II. stupně a pooperační komplikace rány [37].

Tab. 4 Některé produkty obsahující kyselinu hyaluronovou používané pro medicínské aplikace (Evropa, USA) [2]

Produkt	Zdroj	Koncentrace HA [%]	Relativní molekulová hmotnost HA	Indikace
Amvisc	kohoutí hřebínky	1.2	20×10^5	oftalmologie
Aquaderm	neuveдено			dermatologie
ARTZ	kohoutí hřebínky	1.0	$6-12 \times 10^5$	osteoartróza
Healon	kohoutí hřebínky	1.0	40×10^5	oftalmologie
Hyalart	neuveдено	1.0	neuveдено	osteoartróza
Hyalgan	kohoutí hřebínky	1.0	$5-7.3 \times 10^5$	osteoartróza
Jossalind	neuveдено	0.2	neuveдено	hojení ran
Opegan	kohoutí hřebínky	1.0	1.5×10^5	oftalmologie
Provisc	neuveдено			oftalmologie
Synvisc	neuveдено	0.8	neuveдено	osteoartróza
Viscoat	bakterie	3.0	5×10^5	oftalmologie

8.2 Využití kyseliny hyaluronové v kosmetice

8.2.1 Estetická medicína a plastická chirurgie

Estetickou medicínu je možno považovat za hraniční obor mezi medicínou a kosmetikou. V posledních letech je stále větší důraz kladen na minimalizaci kosmetických úprav, po kterých by zůstaly jizvy. Jednou z takových účinných metod je injekční výplň měkkých tkání v oblasti obličeje [38].

Rozvoj výplní pro měkké tkáně se datuje do roku 1893, kdy byl poprvé jako výplňový materiál popsán autologní tuk. Jen o pár let později se začaly aplikovat injekce parafínu. Avšak tato metoda zaznamenala u pacientů závažné negativní reakce. V roce 1940 byl pro kosmetické účely prvně použit tekutý silikon. I přes počáteční úspěch byly nakonec zaznamenány výrazné komplikace a nežádoucí účinky. Roku 1980 se začal používat hovězí kolagen, který byl před příchodem kyseliny hyaluronové „zlatý standard“ ve výplňových ma-

teriálech [39]. Dnes jsou jako výplně aplikovány tyto čtyři látky: autologní tuk, kolagen, kyselina hyaluronová a biosyntetické polymery. Pro estetickou medicínu je kyselina hyaluronová dodávána ve formě čírého gelu v jednorázové injekční stříkačce. Výplně gelu s malými částicemi HA jsou nejvhodnější pro injekci do povrchové nebo horní části dermis. Tyto aplikace se používají pro korekci povrchových vrásek, např. na čele, kolem úst, v okolí očí. Obličejové oblasti jako glabelární rýha, nosoretní rýha a atrofické jizvy jsou nejlépe eliminovány při použití výplně gelu se střední velikostí částic do střední vrstvy dermis [28,39].

Přestože je většina nežádoucích účinků obličejových výplní přechodná a menšího rozsahu, mohou se objevit negativní efekty jako např. krvácení, mírný edém, erytém, bolest, zarudnutí, místní modřiny. Lze také pozorovat hypersenzitivitu kůže a akutní alergické reakce. Závažné komplikace jsou vzácné [38].

Pokud by se HA aplikovala v přirozené formě, došlo by za 1-2 dny k její degradaci. Proto je pro její použití ve výplních potřeba, aby byly vytvořeny stabilní molekuly, které by v kůži setrvaly delší dobu [38]. K tomuto účelu slouží již zmiňované zesíťované deriváty HA, hylany [33,39]. Jedním z takových přípravků je i **Restylane®**, jehož degradace je poměrně pomalá. Opakované podání tohoto přípravku je nutné asi za 4-12 měsíců, po této době se i zesíťovaná HA postupně vstřebává [40]. Kromě Restylane® jsou v této skupině i další komerční produkty jako **Hylaform**, **Hylaform Plus**, **Captique** a **Juvéderm**, které se vzájemně liší velikostí částic, molekulovou hmotností a stupněm zesíťování kyseliny hyaluronové. Taktéž jsou aplikovány do různé hloubky dermis [39].

Přehled životnosti HA po její aplikaci do pokožky je uveden v Tab. 5.

Tab. 5 Životnost kyseliny hyaluronové po její aplikaci do kůže [39]

Ošetřovaná oblast	Životnost kyseliny hyaluronové
rtý	3-4 měsíce
nosoretní rýha	4-6 měsíců
slzná prohlubeň	>6 měsíců
glabelární rýha a partie čela	6 měsíců
orální spojka	3-4 měsíce

V estetické chirurgii může být použita i nezesíťovaná HA. Mezi tyto aplikační možnosti se řadí např. mezoterapie pro obnovu kožního povrchu s určitým typem mezoliftingu [33]. Nejedná se přímo o výplňovou techniku, ale tato metoda umožňuje regeneraci pleti zvýšením hydratace v epidermis a dermis. To vytváří příznivé prostředí pro usnadnění výměny a interakce mezi buňkami extracelulárního prostoru. HA může být používána i v kombinaci s dalšími aktivními látkami, např. vitaminy a stopovými prvky [28].



Obr. 9 Aplikace injekce s HA do oblasti nosoretní rýhy oboustranně a do obou rtů (srovnání bylo provedeno po 4 měsících) [39]

Byla také zkoumána možnost použití HA jako implantabilního výplňového materiálu pro plastickou chirurgii [6]. V současné době jsou k dispozici prsní implantáty vyrobené především ze silikonového gelu. Provedené studie [2] však potvrdily, že další alternativou by mohla být výplň z kyseliny hyaluronové. Ukázalo se, že implantáty na bázi HA jsou v porovnání se silikonovým gelem mnohem měkčí a umožňují lepší vizualizaci struktur v okolí prsního implantátu při pořízení rentgenového snímku. Testy na zvířatech vyloučily jakékoliv vedlejší účinky během prvního roku implantace. Ke stanovení reálného potenciálu HA v této oblasti je však nutné provést více studií [2].

Tab. 6 Obličejové výplně na bázi kyseliny hyaluronové, které jsou v současné době k dispozici k vyplnění měkkých tkání [38]

Typ výplně	Název (výrobce)	Indikace	Trvanlivost (měsíce)	Výhody	Nevýhody
HA – kohoutí hřebínky	Hylaform gel (INAMED)	Mírné vady, zvětšení rtů	3-4	Bezpečné, nevyvolává alergickou reakci.	Krátkodobé výsledky, imunologická reakce u pacientů s alergií na ptačí produkty.
	Hylaform Plus (INAMED)	Hluboké defekty, vrásky a záhyby	3-4		Povrchní injekce může vést ke zbarvení kůže.
HA – bakteriální	Restylane (Medicis)	Povrchové defekty, hlubší vrásky, nosoretní rýhy, glaberní vrásky, zvětšení rtů	6-12	Bezpečné, nevyvolává alergickou reakci, trvalejší účinek než u kolagenu.	Vzácné imunologické reakce, vyšší výskyt podlitin, bolestivosti a otoků, vyšší náklady.
	Restylane Fine (Medicis)				
	Perlane (Medicis)	6-12			
	Captique (INAMED)	3-6			
	Juvéderm (L.E.A. Derm)	3-6			
	Povrchové vady, jemné vrásky			Bezpečné, nevyvolává alergickou reakci.	Relativně nový produkt, vzácné imunologické reakce.
	Povrchové, mírné i hluboké defekty				

8.2.2 Kosmetické použití kyseliny hyaluronové

V současné době jsou k dispozici kosmetické přípravky s kyselinou hyaluronovou, které mají především hydratační účinek a zpomalují projevy stárnutí. Jejich nevýhodou však je, že je v nich obsažená nízkomolekulární HA, která je mnohem méně efektivní ve srovnání s vysokomolekulární HA. Na druhou stranu, vysokomolekulární HA je jen málo rozpustná, což způsobuje závažné technické problémy při přípravě kosmetických a farmaceutických přípravků [35]. HA patří mezi látky, které po nanesení na pokožku vytvoří na povrchu tenký průhledný film, a tak hydratuje pouze hlavní vrstvu *stratum corneum* [23,41].

Kyselina hyaluronová může být aplikována na pleť pomocí různých kosmetických vehikul [41]. Dnes jsou vyráběny kosmetické přípravky s obsahem HA převážně ve formě emulzí. Ty mohou být použity u alopecie, na hyperkeratózy a přetrvávající lupy. Kromě emulzí je dalším typem kosmetického výrobku s HA krém, který kromě samotné HA může obsahovat i aktivní látky, jako jsou vitamin A, vitamin E, kyselina askorbová, výtažek z měsíčku lékařského, přeslička, propolis, aloe, ginko biloba, bambucké máslo, včelí vosk, slunečnicový olej a další látky. Tyto krémy jsou účinné při redukci vrásek, proti suché pleti a k podpoře její elasticity. Mohou být také využity při ochraně proti fotodermatóze, proti zarudnutí a společně s hydrochinonem při léčbě senilních skvrn [35].

V aplikační formě masti či lihového preparátu bývá HA úspěšně používána i k léčbě kožních defektů, např. při virovém postižení kůže, při acne vulgaris a ulcera crucis [37].

Kromě výše uvedených aplikací se HA užívá ve formě přírodních potravinových doplňků [41]. Při jejich perorálním podání je HA účinná v reparaci tkání. Avšak během trávení je degradována na malé fragmenty a jen její velmi malé množství proniká do krevního oběhu [42]. Jedním z takových doplňků je KolagenFORTE s kyselinou hyaluronovou [41].

8.2.2.1 Contipro Group a.s.

Firma **Contipro Group a.s.** kyselinu hyaluronovou používá především v přípravcích denní péče o pleť, v nočních a regeneračních přípravcích, v kosmetice určené po slunění, v dekorativní kosmetice, v přípravcích před- a po holení a v neposlední řadě i v čistících prostředcích [23]. Obsah HA v různých typech kosmetických přípravků této společnosti je uveden v Tab. 7.

Tab. 7 Koncentrace HA u kosmetických přípravků firmy Contipro Group a.s. [23]

Typ kosmetického přípravku	Koncentrace HA [%]
přípravky denní péče o pleť	0.02 – 0.10
noční a regenerační přípravky	0.01 – 0.05
kosmetika určená po slunění	0.02 – 0.10
dekorativní kosmetika	0.005 – 0.02
přípravky před- a po holení	0.02 – 0.10
čistící prostředky	0.005 – 0.6

Ve studii provedené firmou Contipro Group a.s. bylo zjištěno, že v porovnání s kontrolní emulzí bylo po aplikaci emulze s 0.025 % kyseliny hyaluronové dosaženo 20% zvýšení hydratace ve *stratum corneum* (viz. Obr. 15.) [23].

8.2.2.2 *RYOR a.s.*

Firma **RYOR a.s.** používá kyselinu hyaluronovou ve více výrobcích. Kromě Masky s kyselinou hyaluronovou, která je určena pro profesionální použití v kosmetických salónech, lze tuto ingredienci nalézt také v séru Redux linea new, v Aktivním krému proti vráskám (z výrobné řady Mořské řasy), Očním gelu (řada Intenzivní ošetření pleti) a v Séru s kaviárem (řada Caviar Care).

8.2.2.3 *Eucerin® Hyaluron-filler*

U kosmetické firmy **Eucerin®** je HA využívána v kosmetické řadě Hyaluron-filler denní, noční a oční krém. Všechny krémy obsahují kyselinu hyaluronovou a taktéž saponin. Podle informací výrobce kyselina hyaluronová vyplňuje a vypíná i hluboké vrásky v oblasti čela, úst a nosoretních rýh již během 4 týdnů. Saponin stimuluje vlastní tvorbu HA i v hlubších vrstvách pleti [43].



Obr. 10 Kosmetická řada Hyaluron-filler od firmy Eucerin® [43]

8.2.2.4 *VICHY Liftactiv Retinol HA*

Dalším produktem na trhu jsou oční, denní a noční krémy Liftactiv Retinol HA od **VICHY**, které jsou určeny pro potlačení vrásek všech typů - embryonální, reverzibilní a permanentní vrásky v jakémkoliv stádiu. Kromě kyseliny hyaluronové obsahují tyto krémy navíc komplex Retinol-A a adenosin [44].



*Obr. 11 Produktová řada
Liftactiv Retinol HA od
firmy VICHY [44]*

8.2.2.5 Biora cosmetics AQUA BIORA, BIORADERM, BIORAGEL

Biora cosmetics je kosmetická řada s kyselinou hyaluronovou a přírodním kolagenem. Součástí řady je pleťová voda AQUA BIORA, pleťová maska BIORADERM ve formě jednorázových ampulí a pěnová kolagenová maska pro mladistvý vzhled BIORAGEL. Hlavní účinnou látkou celé řady je vysoce koncentrovaná HA [24].



*Obr. 12 Kosmetická řada s kyselinou hyaluronovou
a kolagenem AQUA BIORA, BIORADERM a
BIORAGEL [24]*

8.2.2.6 JG Cosmetics ACNE, FACE, NEOBY

Společnost **JG Cosmetics** se zaměřuje na vývoj a výrobu kosmetických přípravků z vysokomolekulární kyseliny hyaluronové. V její nabídce lze nalézt řadu ACNE, která je určena pro mastný a aknézní typ pleti, dále silně hydratační a regenerační přípravky z kosmetické řady FACE a jako třetí řadu NEOBY, určenou pro sušší a citlivější pleť [9].



Obr. 13 Kosmetické řady s vysokomolekulární kyselinou hyaluronovou - ACNE, FACE a NEOBY od společnosti JG Cosmetics [9]

8.2.2.7 L'Oréal Paris Derma Genesis

Kosmetická řada Derma Genesis od **L'Oréal Paris** v sobě spojuje dvě účinné látky. Jednou z nich je látka Pro-Xylane™ a druhou pak kyselina hyaluronová. Pro-Xylane™ je komplexní molekula sacharidu a proteinu složená z xylózy, což je látka, která stimuluje produkci glykosaminoglykanů v pokožce. Pro-Xylane™ využívá extracelulární matici k řízení aktivity stárnoucích buněk, restimuluje starší buňky a současně přenáší informace do buněk mladších [45].



*Obr. 14 Výrobky z řady
Derma Genesis od
L'Oréal Paris pro ženy
od 25 let [45]*

8.2.2.8 Nivea Visage Expert Lift

Kosmetická řada **Nivea Visage Expert Lift** je součástí „Lifting - effect“ programu, zabráňujícího ochabování pleti. V této řadě lze nalézt denní, noční a oční krém. Základem složení je kombinace dvou účinných látek: kyseliny hyaluronové a Bioxiliftu, což je 100% výtažek z anýzu. Bioxilift působí tak, že podporuje stažení buněčné struktury pleti, a tím dochází k dlouhodobému zdokonalení kontur obličeje [46].



*Obr. 15 Kosmetická řada Expert Lift od Nivea
Visage [46]*

8.2.2.9 Herb pharma

Švýcarská společnost **Herb pharma** vyvinula kosmetické emulze na bázi kyseliny hyaluronové, které napomáhají především k vyplnění vrásek a vypnutí pleti. Mezi její nejznámější produkty patří přípravek **Collagenceutical**. Kromě samotné HA v lipozomové formě obsahuje tato emulze kombinaci peptidů a proteinů, palmitoyl Tripeptide-5, palmitoyl oligopeptid a fermentovaný extrakt *Pseudoalteromonas Antartica*. Dalšími produkty společnosti Herb pharma se stejným obsahem HA, podobným efektem na pleť, ale s odlišnými účinnými látkami jsou i produkty Liftoceutical, Hydroceutical, Diamondceutical a Rapidoceutical [47].



Obr. 16 Produkty Collagenceutical a Hydroceutical od společnosti Herb pharma [47]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

9 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo:

- vypracovat literární rešerši na téma Kyselina hyaluronová a její praktické využití, s důrazem na její aplikace v medicíně a kosmetice,
- sestavit dotazník týkající se používání kosmetiky s kyselinou hyaluronovou, a to především v pleťových krémech různých kosmetických značek,
- pomocí dotazníkového šetření zjistit, která kosmetická řada s kyselinou hyaluronovou je na trhu nejvíce žádaná a kolik žen tyto kosmetické přípravky používá,
- provést vyhodnocení výsledků a formulovat závěry.

10 METODIKA PRÁCE

10.1 Průzkum účinnosti kosmetických prostředků na bázi kyseliny hyaluronové - dotazník

Dotazník pro sledování účinnosti kyseliny hyaluronové v různých kosmetických přípravcích byl sestaven tak, aby podchytil informace týkající se 1) nepoužívanější kosmetické řady na trhu, 2) typu kosmetického přípravku s HA, 3) důvodů používání kosmetiky s HA, 4) účinnosti i vedlejších účinků těchto kosmetických prostředků. Sledoval rovněž problémy, které v souvislosti s pletí ženy nejčastěji trápí. Dotazník je součástí Přílohy I.

Průzkumu hodnocení účinnosti kyseliny hyaluronové v kosmetických přípravcích se zúčastnilo celkem 39 respondentek, jednalo se o ženy ve věkové kategorii 25 – 60 let. Podle věku byly respondentky rozděleny do 7 skupin: 25 – 30, 30 – 35, 35 – 40, 40 – 45, 45 – 50, 50 – 60 a 60 – více let.

Otázky uvedené v dotazníku lze rozdělit do několika bloků. První tři otázky byly obecné, týkající se věku, informovanosti a rovněž používání kosmetických přípravků s obsahem kyseliny hyaluronové.

Další blok otázek byl zaměřen na používání konkrétní kosmetické řady s HA, na nejoblíbenější typ kosmetického produktu s HA, důvody k používání této kosmetiky, shrnutí účinků HA na stupnici 1 – 5 a srovnání kosmetiky s obsahem HA s jinými kosmetickými přípravky. Součástí tohoto bloku byly rovněž otázky, po jaké době ženy pozorovaly pozitivní výsledky této kosmetiky a zda byly viditelné i vedlejší účinky.

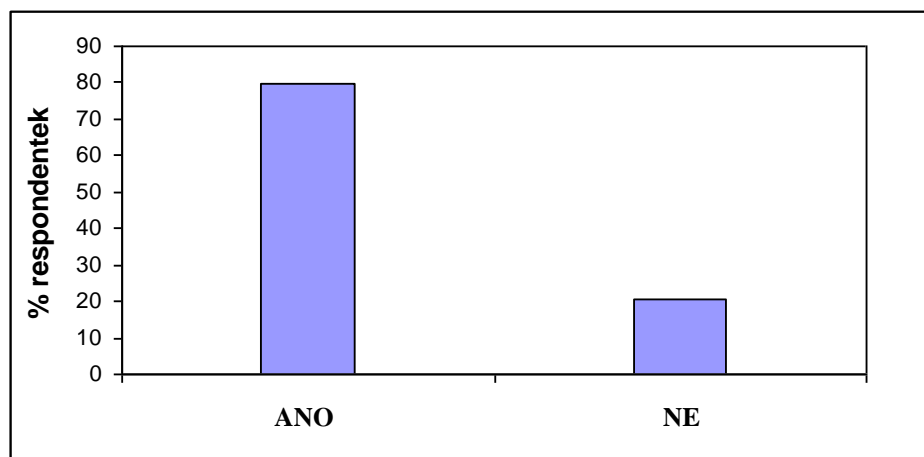
Poslední blok otázek se týkal všeobecných informací o používání kosmetiky. Ženy byly dotazovány, kolik peněz jsou měsíčně ochotny do kosmetiky investovat, kolikrát denně kosmetiku používají a jaké problémy, v souvislosti s pletí, je nejvíce trápí.

Při statistickém vyhodnocování a grafickém znázornění dat dotazníkového průzkumu byl použit program Microsoft Office Excel.

11 VÝSLEDKY

11.1 Používání kosmetických přípravků s HA

Respondentky byly dotazovány, zda používají kosmetiku s obsahem kyseliny hyaluronové.

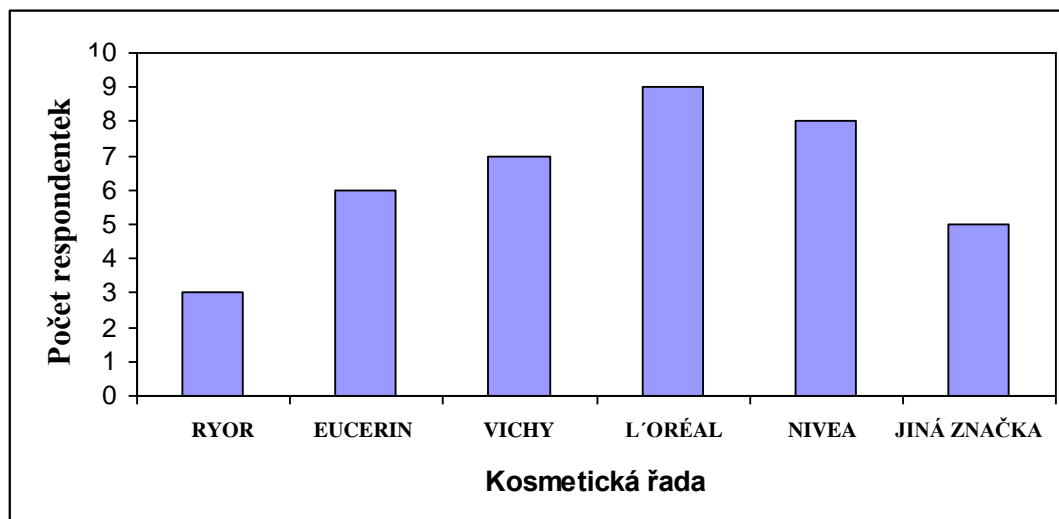


Obr. 17 Počet respondentek, které používají kosmetiku s obsahem HA

Z Obr. 17 je patrné, že počet respondentek, které používají kosmetiku s HA je 31 (79,5 %) a žen, které kosmetiku s HA vůbec nepoužívají, bylo jen 8, což tedy tvoří 20,5 % všech dotazovaných respondentek.

11.2 Nejpoužívanější kosmetická řada s HA

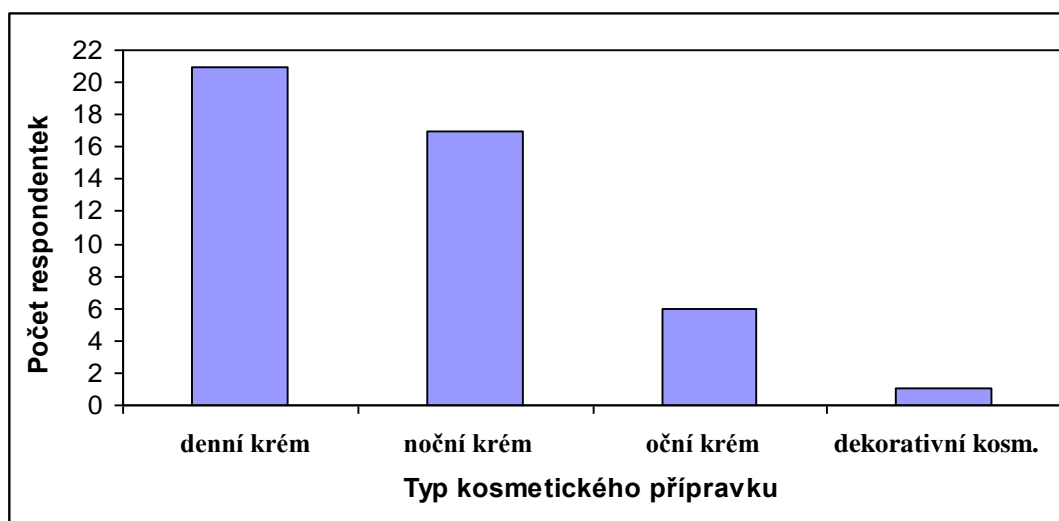
V další otázce byly ženy dotazovány, jakou kosmetickou řadu s kyselinou hyaluronovou nejčastěji používají. Výsledky byly poměrně vyrovnané a nejoblíbenější kosmetickou značkou u dotazovaných respondentek byla L'Oréal Paris Derma Genesis (viz. Obr. 18), která je cenově dostupná. Ostatní značky Eucerin, VICHY a Nivea jsou používány zhruba stejným počtem žen (šest až osm). Překvapivě byla v dotaznících uvedena i kosmetická řada RYOR, která je určena především do kosmetických salonů a v běžných obchodních sítích není příliš dostupná - používají ji tři dotazované ženy. Dále bylo zajímavé, které ostatní značky kromě těch, které byly nabídnuty v dotazníku, ženy používají. Celkem čtyři ženy odpověděly, že používají jinou značku kosmetiky, než byla uvedena v dotazníku. Jedná se o méně známé kosmetické řady Macon, Alcina, Pierre René a Biologique Recherche. Jedna žena pak dokonce podstoupila zákrok injekční výplně s kyselinou hyaluronovou značky Juvéderm.



Obr. 18 Nejpoužívanější kosmetická řada u dotazovaných žen

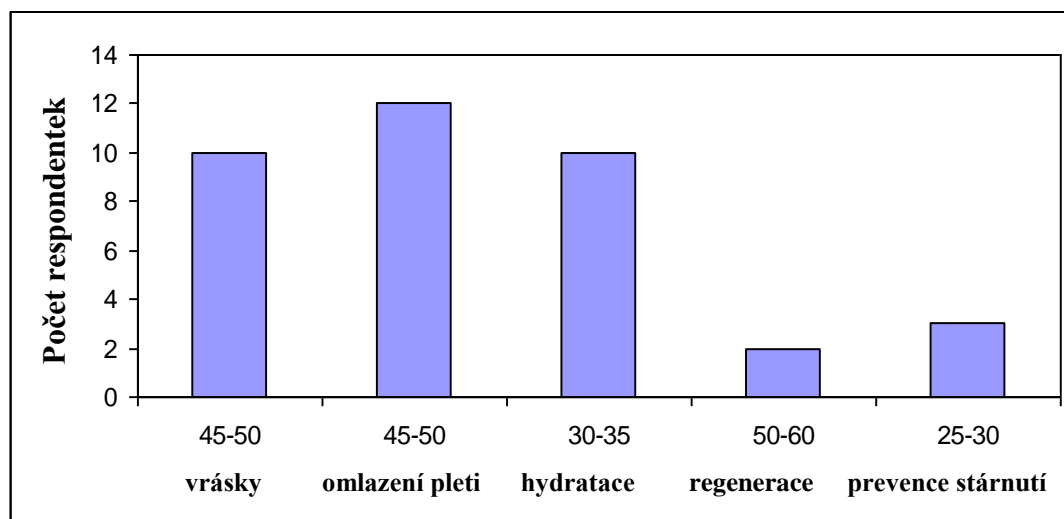
11.3 Nejoblíbenější typ kosmetického přípravku s HA

Zajímavé bylo také zjištění, jaký typ kosmetického přípravku s kyselinou hyaluronovou je u dotazovaných žen nejoblíbenější. Většina kosmetických značek, jako např. VICHY Liftactiv Retinol HA, Nivea Visage Expert Lift, L'Oréal Paris Derma Genesis a Eucerin Hyaluron-Filler, vyrábí své kosmetické přípravky ve třech variantách – jako denní krém, noční krém a oční krém. Záleží už na každé ženě, pro který typ se rozhodne a který jí vyhovuje nejlépe.



Obr. 19 Nejoblíbenější typ kosmetického přípravku s HA

Z Obr. 19 je patrné, že nejoblíbenějším typem kosmetiky s HA je denní krém. Tento typ krému je nejžádanější u žen všech věkových kategorií. Jako druhý v pořadí skončil noční krém, který je oblíbený zejména u žen ve věkové kategorii 35 – 40 a dále 45 – 50 let. Oční krém pravidelně používá pouze 6 žen, z toho 2 značky L'Oréal Paris Derma Genesis a 2 značky VICHY Liftactiv Retinol HA. Pouze 1 dotazovaná žena používá i dekorativní kosmetiku s HA, a to značky Pierre René.



Obr. 20 Nejčastější důvody k používání kosmetiky s HA v závislosti na věku, vztaženo na počet žen

Z grafu na Obr. 20 je zřejmé, že nejvyšší počet žen používá kosmetiku s kyselinou hyaluronovou k omlazení a vypnutí pleti, tyto ženy pak tvoří většinou kategorii 45 – 50 let. Deset žen pak používá tuto kosmetiku především proti vráskám (věková kategorie 45 – 50 let) a k hydrataci pokožky (věková kategorie 30 – 35 let). Pouze 2 respondentky ve věku 50 – 60 let uvedly, že důvodem k používání kosmetiky s HA je regenerace pokožky, což je vzhledem k věku pochopitelné. Nejvyšší počet žen ve věku 25 – 30 let pak uvádí, že hlavním důvodem, proč používají tyto kosmetické přípravky, je prevence před prvními příznaky stárnutí.

11.4 Vedlejší účinky při používání kosmetiky s HA

V další otázce byly respondentky dotazovány, zda při používání kosmetických přípravků s HA pozorovaly i nějaké vedlejší účinky a pokud ano, o jaké vedlejší příznaky se jednalo.

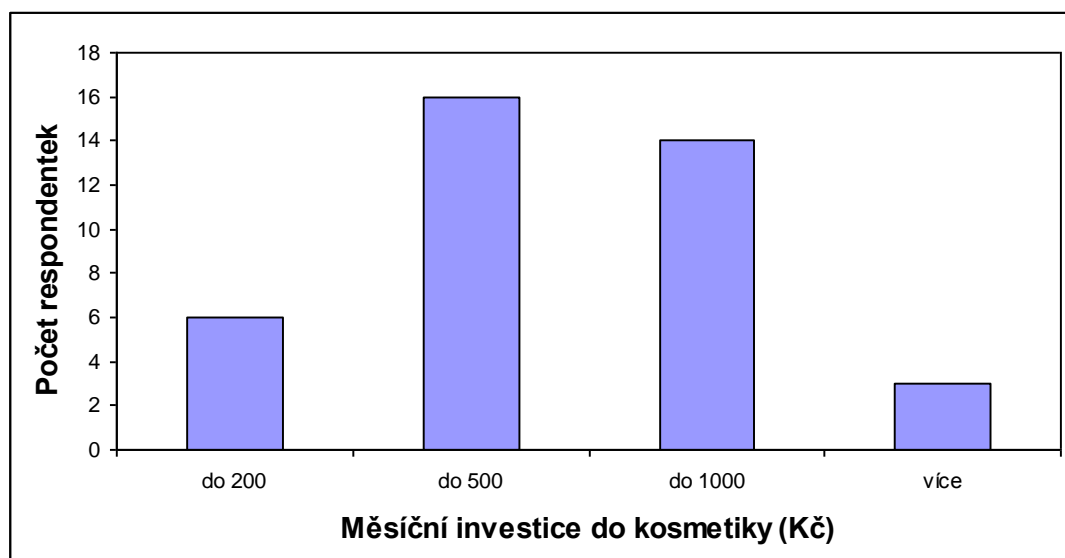
Tab. 8. Vedlejší účinky po používání kosmetiky s HA

VEDLEJŠÍ ÚČINKY	
NE	25
ANO	6
pnutí pleti	3
podráždění	1
zarudnutí	2

Z Tab. 8. je zřejmé, že z celkového počtu 31 žen, které používají kosmetiku s kyselinou hyaluronovou, celých 25 nepozorovalo v průběhu používání této kosmetiky vedlejší účinky. Pouze šest žen uvedlo, že se u nich vedlejší účinky projevily. U třech se vyskytlo pnutí pleti, u jedné podráždění a u dvou dokonce i zarudnutí.

11.5 Měsíční náklady na kosmetiku

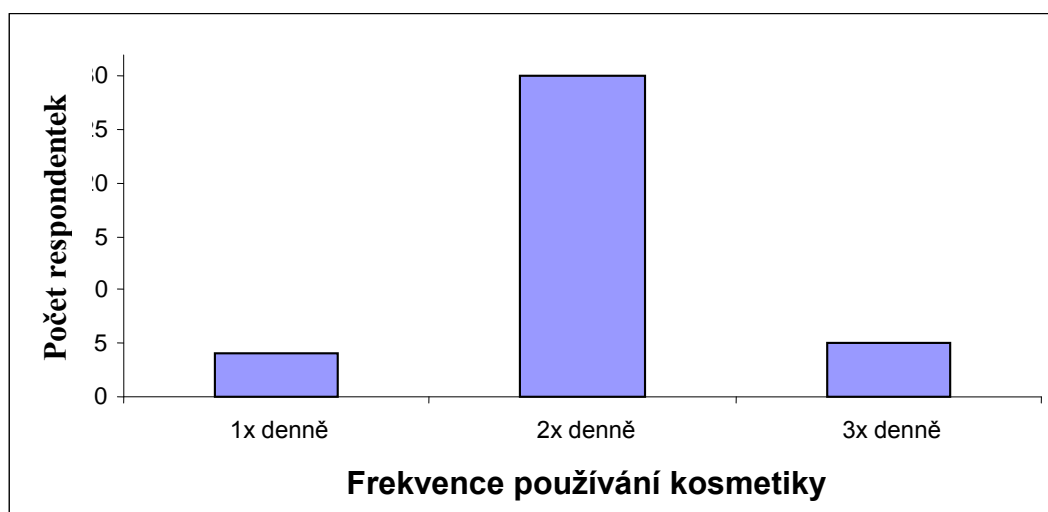
Po těchto specifických otázkách zaměřených na používání kosmetiky s HA bylo zjišťováno, kolik peněz jsou respondentky ochotny do kosmetiky investovat měsíčně a kolikrát denně kosmetiku používají.



Obr. 21 Měsíční náklady na kosmetiku všech dotazovaných žen

Nejvyšší počet žen, a to 16, je ochotno do kosmetiky investovat kolem 500,- Kč měsíčně. Překvapením bylo, že 14 žen vynakládá každý měsíc za kosmetiku až 1000,- Kč a tři ženy

uvedly, že jsou ochotny za kosmetiku utratit i více než 1000,- Kč měsíčně. Pouze 6 žen utratí každý měsíc za kosmetické přípravky do 200,- Kč.



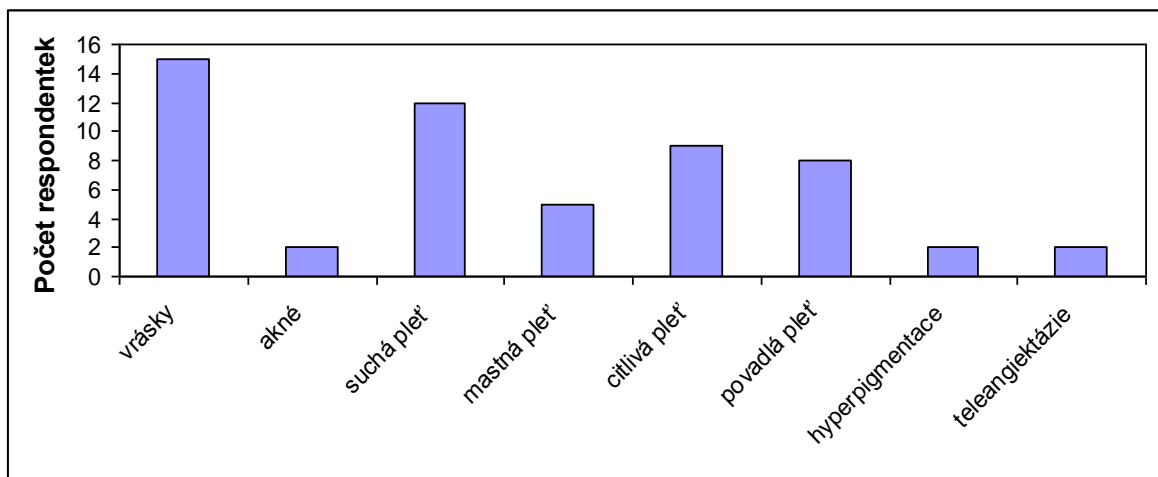
Obr. 22 Denní frekvence používání kosmetiky u dotazovaných žen

Z grafu na Obr. 22 je patrné, že většina žen používá kosmetiku 2x denně, tedy nejčastěji ráno a večer. Pouze 4 ženy používají kosmetiku 1x denně a 5 žen pak dokonce 3x denně. Žádná z respondentek neuvedla, že by kosmetiku používala 1x za dva dny nebo méně často.

11.6 Problémy s pletí

Otázka týkající se problémů s pletí, které dotazované ženy nejčastěji trápí, přinesla výsledky úzce související s věkovým rozložením respondentek. Ženy byly dotazovány, zda je trápí spíše vrásky, akné, suchá pleť, mastná pleť, citlivá či povadlá pleť, hyperpigmentace nebo teleangiektázie.

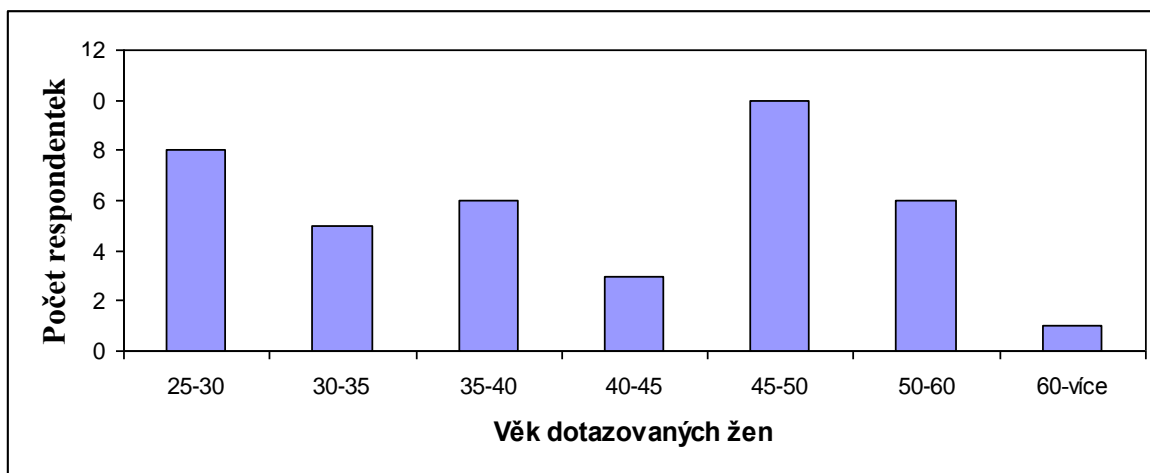
Vyhodnocení dotazníku ukázalo, že nejčastěji ženy trápí tradičně vrásky, dále suchá pleť, a v neposlední řadě také citlivá a povadlá pleť. Jenom pět dotazovaných žen trápí pleť mastná. Počet respondentek, které mají největší problémy s akné, hyperpigmentací nebo trpí teleangiektáziemi byl ve všech případech stejný, jednalo se vždy o dvě ženy.



Obr. 23 Nejčastější problémy v souvislosti s pletí, které dotazované ženy nejvíce trápí

11.7 Věk dotazovaných respondentek

Dotazník byl určen pro respondentky ve věku 25 – 60 let. Podle věku byly tyto ženy rozděleny do 7 skupin: 25 – 30, 30 – 35, 35 – 40, 40 – 45, 45 – 50, 50 – 60 a 60 – více let.



Obr. 24 Věková kategorie dotazovaných respondentek

Jak se dalo předpokládat, nejčetnější věkovou kategorií tvořily ženy ve věku 45 – 50 let, neboť většina kosmetických přípravků s HA zpomaluje projevy stárnutí a redukuje vrásky. Další poměrně velkou kategorií byly ženy 25 – 30 let, které používají kosmetiku s HA díky vysokým hydratačním účinkům kyseliny hyaluronové. Šest žen se nacházelo v kategorii 35 – 40 let a také 50 – 60 let. Pouze jedna žena spadala do kategorie 60 – více let. Grafické znázornění věkového rozložení respondentek je uvedeno na Obr. 24.

ZÁVĚR

V dnešní době existuje na trhu široké spektrum kosmetických přípravků s různými aktivními látkami, které slouží k potlačení projevů stárnutí pleti. Kyselina hyaluronová je jednou z těchto látek, která nejen projevy stárnutí potlačuje, ale dokáže i efektivně působit při hydrataci a regeneraci pleti. Stále více žen potvrzuje pozitivní výsledky používání kosmetiky s obsahem HA a tyto přípravky jsou dnes aplikovány ženami všech věkových kategorií, ve kterých však plní poněkud odlišnou funkci.

Práce ve své teoretické části předkládá základní informace o kyselině hyaluronové a soustřeďuje se především na přehled jejího využití ve farmacii a kosmetice, včetně přehledu neznámějších kosmetických řad, které tuto aktivní látku obsahují.

V praktické části bakalářské práce byla pomocí dotazníkového šetření sledována účinnost vybraných kosmetických prostředků s obsahem HA. Na základě vyhodnocení dotazníku bylo zjištěno, že nejpoužívanější kosmetickou řadou s HA byla L'Oréal Paris Derma Genesis, a to ve formě denního krému. Ve věkové kategorii 45 – 50 let bylo nejčastějším důvodem k používání těchto kosmetických přípravků vypnutí a omlazení pleti, zatímco ženy věkové skupiny 30 – 35 let používají krémy s HA především pro jejich hydratační účinky dané přítomností kyseliny hyaluronové. Většina dotazovaných respondentek shledává krémy s HA účinnější oproti jiným kosmetickým přípravkům proti stárnutí. Téměř všechny ženy se shodly, že určité pozitivní výsledky byly viditelné do dvou měsíců od první aplikace přípravku s HA.

O kosmetice s obsahem HA lze rovněž na základě dotazníku říci, že je pleti zralých žen velmi dobře tolerována. Přes 80 % žen nepozorovalo po její aplikaci žádné vedlejší účinky, a pokud se nějaké vyskytly, jednalo se pouze o mírné podráždění či pnutí pleti.

Z dotazníkového šetření lze učinit závěr, že kosmetika s obsahem HA je u žen oblíbená a že existuje poměrně široké povědomí o pozitivních účincích tohoto typu krému na pleť.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Prague)*, 2008, vol. 53, no. 8, p. 397-411.
- [2] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.*, 1998, vol. 98, no. 8, p. 2663-2684.
- [3] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulator imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [4] LONGAS, O.M. Hyaluronan in Aging. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, edit. Garg H. and Hales C., Elsevier Ltd., 2004, p. 351-366.
- [5] STUHLMEIER, K.M. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wien Med Wochenschr*, 2006, vol. 56, p. 563-568.
- [6] BROWN, M.B., JONES, S.A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venerology*, 2004, vol. 19, p. 308-318.
- [7] LAPČÍK, L. Jr., BOHDANECKÝ, M., LAPČÍK, L., BAKOŠ, D. Kyselina hyaluronová – příprava, struktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické Listy* 85, 1991, str. 281-299.
- [8] Sodium Hyaluronate. What does sodium hyaluronate do? [online]. [cit. 2011-08-27]. Dostupné z: <<http://www.trbchemedica.co.uk/article.asp?article=162§ion=2>>.
- [9] JG Cosmetics [online]. [cit. 2011-10-31]. Dostupné z: <<http://www.jg.cz/>>.
- [10] Viscoderm[®] [online]. [cit. 2011-10-10]. Dostupné z: <<http://www.viscoderm.cz/viscoderm/index.php?mid=508>>.
- [11] SLEVIN, M., et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*, vol. 26, p. 58-68.
- [12] HASCALL, C. V., LAURENT, C. T. Hyaluronan: Structure and Physical Properties [online]. [cit. 2011-08-15]. Dostupné z: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [13] CHURMS, S.C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromathography A*, 1996, vol. 720, p. 151-166.

- [14] HOEKSTRA, D. Hyaluronan as a Versatile Biomaterial for Surface Treatment of Medical Device [online]. [cit. 2011-08-20]. Dostupné z: <<http://www.biocoat.com/hyalvers.pdf>>.
- [15] Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2011-10-05]. Dostupné z: <<http://lekarske.slovníky.cz/pojem/biokompatibilita>>.
- [16] LARSSON, R. Biocompatible Surfaces Prepared by Immobilized Heparin or Hyaluronate. *Acta Oto-Laryngologica*, 1987, vol. 104, no. 442, p. 44-49.
- [17] DEFIFE, K.M., SHIVE, M.S., HAGEN, K.M., et al. Effects of photochemically immobilized polymer coatings on protein adsorption, cell adhesion, and foreign-body reaction to silicone rubber. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, vol. 44, p. 289-307.
- [18] AMARNATH, L.P., SRINIVAS, A., RAMAMURTHI, A. *In vitro* hemocompatibility testing of UV-modified hyaluronan hydrogels. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, p. 1416–1424.
- [19] LIM, Y.J., SIM, W.S., KIM, Y.CH., LEE, S.CH., CHOI, Y.L. The neurotoxicity of epidural hyaluronic acid in rabbits: A light and electron microscopic examination. *Anesthesia and Analgesia*, 2003, vol. 97, p. 1716-1720.
- [20] Product information Orthovisc[®], Summary of safety and effectiveness data. 2004, p. 1–15 [online]. [cit. 2011-08-27]. Dostupné z: <http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/P030019b.pdf>.
- [21] MELANDER, C., TØMMERAAS, K. HyaCare, Radically Shifting the Paradigm of Hyaluronic Acid Production. *Novozymes Biopolymer*, 2007, no. 47, p. 6-7.
- [22] MICHL, J. Světové patenty z Dolní Dobrouče. *Euro*, 2006, vol. 39, p. 64–65.
- [23] CONTIPRO GROUP a.s., Dolní Dobrouč. *HYALURONIC ACID, Sodium salt*. [s.l.]: Contipro Group a.s., ©2009.
- [24] Biora, s.r.o. [online]. [cit. 2011-10-17]. Dostupné z: <<http://www.biora.cz/onas.html>>.
- [25] Novozymes Biopharma [online]. [cit. 2011-10-17]. Dostupné z: <<http://www.biopharma.novozymes.com/en/Pages/default.aspx>>.

- [26] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, p. 17-25.
- [27] FRASER, J.R.E., LAURENT, T.C., LAURENT, U.B.G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, vol. 242, p. 27-33.
- [28] ANDRE, P. Hyaluronic Acid and Its Use as a “Rejuvenation“ Agent in Cosmetic Dermatology. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 2004, vol. 23, no. 4, p. 218-222.
- [29] STERN, R., FROST, G.I., SHUSTER, S., et al. Hyaluronic Acid and Skin. *Cosmetics & Toiletries magazine*, 1998, vol. 113, p. 43–46.
- [30] HYALURONIC ACID (HA): Background & Biology [online]. [cit. 2011-10-15]. Dostupné z: <<http://www.footconsultant.com/documents/Ostenil.pdf>>.
- [31] ARNDT, T. Kyselina hyaluronová [online]. [cit. 2011-10-15]. Dostupné z: <<http://www.celostnimediceina.cz/kyselina-hyaluronova.htm>>.
- [32] VOLMAR spol. s.r.o., Jesenice u Prahy. *Hyaluronic³ – TRIPLE EFFECT*. [s.l.]: Volmar spol. s.r.o., ©2010.
- [33] PALMIERI, B. Kyselina hyaluronová, mesoterapie a rejuvenace kůže [online]. [cit. 2011-10-20]. Dostupné z: <http://www.viscoderm.cz/viscoderm/materialy/o_Palmieri_cz.pdf>.
- [34] RADOVÁ, P. O kloubní výživě s MVDr. Radovou. Hydrolyzovaný kolagen - základní komponenta pro správnou funkci chrupavky [online]. [cit. 2011-10-25]. Dostupné z: <<http://www.domacilekarna.cz/veter/odborneclanky.htm>>.
- [35] ABBIATI, G. *Reaction products of hyaluronic acid and natural amino acids and their use in cosmetic and pharmaceutical compositions*. United States. US 6495148 B1. 2002-12-17.
- [36] ANDERSON, I. The properties of hyaluronan and its role in wound healing. *Prof Nurse*, 2001, vol. 17, no. 4, p. 232-235.

- [37] HYPRO OTROKOVICE, s.r.o., Otrokovice. *Hypro-Flex*[®]. [s.l.]:
Hypro Otrokovice, s.r.o., ©2009.
- [38] BUCK, D., ALAM, M., KIM, J. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 2009, no. 62, p. 11-18.
- [39] ROHRICH, R., GHAVAMI, A., CROSBY, M. The Role of Hyaluronic Acid Fillers (Restylane) in Facial Cosmetic Surgery: Review and Technical Considerations. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007, vol. 120, no. 6, p. 41S-54S.
- [40] WANG, F., GARZA, L., KANG, S., et al. In Vivo Stimulation of De Novo Collagen Production Caused by Cross-linked Hyaluronic Acid Dermal Filler Injections in Photo-damaged Human Skin. *Arch Dermatol.*, 2007, vol. 143, no. 2, p. 155-163.
- [41] Hyaluronic acid skin care wrinkle treatment natural supplements hyaluronate smoother skin [online]. [cit. 2011-10-31]. Dostupné z:
<<http://www.antiaging-all.com/Hyaluronic-Acid.html>>.
- [42] TING, D. Antiaging benefits of hyaluronic acid: available as a cream or supplement, hyaluronic acid is used to fight wrinkles and joint pain, and promote wound healing. *Better Nutrition*, 2006 [online]. [cit. 2011-10-31]. Dostupné z:
<http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FKA/is_11_68/ai_n27023669/?tag=content;col1>.
- [43] Eucerin[®] [online]. [cit. 2011-10-31]. Dostupné z:
<<http://www.eucerin-hyaluron.cz/eucerin-hyaluron-filler-denni-krem>>.
- [44] VICHY [online]. [cit. 2011-10-31]. Dostupné z:
<<http://www.vichyshop.cz/vichy-liftactiv-retinol-ha-balicek-proti-vraskam/d-70760/>>.
- [45] L'Oréal Paris [online]. [cit. 2011-11-15]. Dostupné z: <<http://www.lorealparis.cz>>.
- [46] Nivea [online]. [cit. 2011-12-06]. Dostupné z:
<<http://www.nivea.cz/Vyrobky/Pece-o-plet/expert-lift>>.
- [47] Herb pharma [online]. [cit. 2011-12-06]. Dostupné z:
<<http://www.herb-pharma.cz/cz/>>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	Hyaluronic acid, kyselina hyaluronová
M_r	Relativní molekulová hmotnost
M_v	Viskozitní průměr molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové
Da	Daltony
CD44	Receptor HA glykoproteinové povahy vyskytující se na povrchu buněk
RHAMM	Receptor pro HA zprostředkovávající buněčnou mobilitu

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Chemická struktura kyseliny hyaluronové [1]</i>	13
<i>Obr. 2 a) Primární struktura HA, b) Sekundární a terciární struktura, c) Schématické znázornění sítě molekuly HA jako výsledek intermolekulárních agregací [6]</i>	14
<i>Obr. 3 Chemická struktura kyseliny hyaluronové se znázorněním nepolární a polární části řetězce [12]</i>	15
<i>Obr. 4 Elektronová mikrofotografie několika propletených molekul HA [12]</i>	16
<i>Obr. 5 Fotografie kyseliny hyaluronové produkované bakteriálním kmenem Bacillus subtilis pořízená pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu [21]</i>	26
<i>Obr. 6 Schématické znázornění velkého proteoglykanového agregátu vytvořeného z přibližně 100 monomerních jednotek proteoglykanu [7]</i>	29
<i>Obr. 7 Znázornění způsobu vazby mezi vlákny kolagenu a agregátu kyselina hyaluronová-proteoglykan [7]</i>	30
<i>Obr. 8 Schématický náčrt kloubní chrupavky se znázorněním kyseliny hyaluronové [34]</i>	35
<i>Obr. 9 Aplikace injekce s HA do oblasti nosorettní rýhy oboustranně a do obou rtů (srovnání bylo provedeno po 4 měsících) [39]</i>	40
<i>Obr. 10 Kosmetická řada Hyaluron-filler od firmy Eucerin® [43]</i>	43
<i>Obr. 11 Produktová řada Liftactiv Retinol HA od firmy VICHY [44]</i>	44
<i>Obr. 12 Kosmetická řada s kyselinou hyaluronovou a kolagenem AQUA BIORA, BIORADERM a BIORAGEL [24]</i>	44
<i>Obr. 13 Kosmetické řady s vysokomolekulární kyselinou hyaluronovou - ACNE, FACE a NEOBY od společnosti JG Cosmetics [9]</i>	45
<i>Obr. 14 Výrobky z řady Derma Genesis od L'Oréal Paris pro ženy od 25 let [45]</i>	46
<i>Obr. 15 Kosmetická řada Expert Lift od Nivea Visage [46]</i>	46
<i>Obr. 16 Produkty Collagenceutical a Hydroceutical od společnosti Herb pharma [47]</i>	47
<i>Obr. 17 Počet respondentek, které používají kosmetiku s obsahem HA</i>	51
<i>Obr. 18 Nejpoužívanější kosmetická řada u dotazovaných žen</i>	52
<i>Obr. 19 Nejoblíbenější typ kosmetického přípravku s HA</i>	52
<i>Obr. 20 Nejčastější důvody k používání kosmetiky s HA v závislosti na věku, vztaheno na počet žen</i>	53

<i>Obr. 21 Měsíční náklady na kosmetiku všech dotazovaných žen.....</i>	<i>54</i>
<i>Obr. 22 Denní frekvence používání kosmetiky u dotazovaných žen</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 23 Nejčastější problémy v souvislosti s pleť, které dotazované ženy nejvíce trápí.....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 24 Věková kategorie dotazovaných respondentek</i>	<i>56</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Publikované hodnoty relativní molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové připravené z různých tkání [7]</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 2 Výskyt HA v různých živočišných tkáních a její obsah [26]</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 3 Vliv věku na koncentraci kyseliny hyaluronové v lidské kůži [4]</i>	<i>32</i>
<i>Tab. 4 Některé produkty obsahující kyselinu hyaluronovou používané pro medicínské aplikace (Evropa, USA) [2].....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 5 Životnost kyseliny hyaluronové po její aplikaci do kůže [39]</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 6 Obličejové výplně na bázi kyseliny hyaluronové, které jsou v současné době k dispozici k vyplnění měkkých tkání [38]</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 7 Koncentrace HA u kosmetických přípravků firmy Contipro Group a.s. [23]</i>	<i>42</i>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Průzkum účinnosti kosmetických prostředků na bázi kyseliny hyaluronové - dotazník

PŘÍLOHA P I: PRŮZKUM ÚČINNOSTI KOSMETICKÝCH PROSTŘEDKŮ NA BÁZI KYSELINY HYALURONOVÉ - DOTAZNÍK

Dobrý den, jmenuji se Zuzana Krcalová a jsem studentka UTB ve Zlíně – obor Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů. Touto cestou bych Vás chtěla požádat, jestli byste mi mohli věnovat chvilku času a vyplnit tento krátký **dotazník, který se týká mé bakalářské práce na téma Kyselina hyaluronová a její využití v medicíně a kosmetice.**

Děkuji Vám za Váš čas a za objektivní vyplnění tohoto dotazníku.

1. Váš věk:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="radio"/> 25 – 30 let | <input type="radio"/> 45 – 50 let |
| <input type="radio"/> 30 – 35 let | <input type="radio"/> 50 – 60 let |
| <input type="radio"/> 35 – 40 let | <input type="radio"/> 60 let - více |
| <input type="radio"/> 40 – 45 let | |

2. Slyšela jste již o kosmetických prostředcích s obsahem kys. hyaluronové (HA)?

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| <input type="radio"/> ANO | <input type="radio"/> NE |
|---------------------------|--------------------------|

3. Používáte kosmetické přípravky s obsahem HA ?

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| <input type="radio"/> ANO | <input type="radio"/> NE |
|---------------------------|--------------------------|

4. Pokud ANO, o jakou kosmetickou řadu se jedná?

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> RYOR | <input type="radio"/> Nivea Visage Expert Lift |
| <input type="radio"/> Eucerin [®] Hyaluron-filler | <input type="radio"/> Herb pharma |
| <input type="radio"/> VICHY Liftactiv Retinol HA | <input type="radio"/> jiná (uved'te jaká) |
| <input type="radio"/> L'Oréal Paris Derma Genesis | |

5. Váš nejoblíbenější typ kosmetického přípravku s kyselinou hyaluronovou je:

- denní krém
- noční krém
- oční krém
- pleťová emulze
- pleťová maska
- pleťová voda
- odličovací kosmetika
- dekorativní kosmetika

6. Proč používáte kosmetiku s kyselinu hyaluronovou?

- na vrásky
- k vypnutí a omlazení pleti
- k hydrataci pokožky
- k regeneraci pokožky
- k prevenci před příznaky stárnutí

7. Jaké shledáváte její účinky (na stupnici 1 - výborné až 5 - špatné)?

1 2 3 4 5

8. Oproti jiným kosmetickým prostředkům proti stárnutí, shledáváte ty s kyselinou hyaluronovou účinnější?

- ANO
- NE

9. Po jaké době pozorujete určité pozitivní výsledky?

- do 1 měsíce
- do 2 měsíců
- do 3 měsíců
- do 6 měsíců

10. Byly viditelné i vedlejší účinky? Pokud ANO, jaké?

- NE
- ANO
 - pnutí pleti
 - podráždění
 - zarudnutí
 - zhoršení stavu akné
 - vysušená pokožka
 - zvýšený mazotok

11. Kolik peněz jste ochotna do kosmetiky investovat měsíčně?

- do 200,-
- do 500,-
- do 1000,-
- více

12. Kolikrát denně kosmetiku používáte?

- 1x denně
- 2x denně
- 3x denně
- 1x za dva dny
- méně často

13. Jaké problémy v souvislosti s pletí Vás nejvíce trápí?

- vrásky
- akné
- suchá pleť
- mastná pleť
- citlivá pleť
- povadlá pleť
- hyperpigmentace
- teleangiektázie (červené nitky)