

Studium vlivu bioaktivních polysacharidů na pokožku

Bc. Šárka Pantůčková

Diplomová práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Šárka Pantůčková**
Osobní číslo: **T17378**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Studium vlivu bioaktivních polysacharidů na pokožku**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

Zpracujte literární rešerši na zadané téma. Věnujte se polysacharidům jako aktivním látkám používaným v kosmetice a soustřeďte se na polysacharidy na bázi fukózy.

Charakterizujte složení, vlastnosti a mechanismus jejich působení na pokožku.

II. Praktická část

V praktické části práce připravte modelové formulace se zastoupením vybraných, komerčně dostupných polysacharidů. Proveďte fyzikálně-chemickou charakterizaci připravených formulací a pomocí bioinženýrských metod sledujte jejich vliv na pokožku. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Barel, A. O., Paye, M., Maibach, H. I. *Handbook of cosmetic science and technology* . 1. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. ISBN ISBN 0-8247-0292-1

[2] Popa V. *Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications* . iSmithers, Shawbury, 2011. ISBN 978-1-84735-438-9

[3] de Camargo, F.B., Gaspar, et al.: Immediate and long-term effects of polysaccharides-based formulations on human skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2012), 48 (3), 547-555

[4] Peterszegi, G., Isnard, N., Robert, A. M., Robert, L. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2003), 57 (5-6), 187-194

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2019

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠARKA PANTUČKOVÁ

Obor: 2901 T031

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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, považuji 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 30.4.2019

Pantučková

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 nevydělečně 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). Odpírá-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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá vlivem polysacharidů na pokožku, a to především jejich účinky na hydrataci a elasticitu pokožky. Pro experiment byly vybrány dva polysacharidy; kyselina hyaluronová, jako etalon mezi účinnými látkami používanými v kosmetice a Fucogel. Byly testovány různé koncentrace a následně i kombinace těchto účinných látek zapracované v kosmetické formulaci. Vliv připravených formulací na pokožku byl měřen korneometrickou sondou (hydratace) a sondou cutometru (elasticita). V druhé části práce pak byly v průběhu šesti týdnů testovány komerční přípravky s obsahem studovaných polysacharidů a byl zjišťován jejich dlouhodobý vliv na zlepšení hydratace a elasticity pokožky.

Klíčová slova: polysacharidy, hydratace, elasticita, kyselina hyaluronová, Fucogel

ABSTRACT

The thesis is dealing with the effect of polysaccharides on the skin, mainly with their effects on skin hydration and elasticity. For the experiment, two polysaccharides were selected; hyaluronic acid as a standard among the active ingredients used in cosmetics, and Fucogel. Various concentrations and their combinations of active ingredients incorporated in cosmetic formulation were tested. Their effect on the skin was measured by a corneometric probe (hydration) and a cutometer probe (elasticity). In the second part of the work, commercial preparations containing the studied polysaccharides were tested over the period of six weeks and their long-term effect on the skin hydration and elasticity was determined.

Keywords: polysaccharide, hydration, elasticity, hyaluronic acid, Fucogel

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za podnětné rady, ochotnou pomoc a především čas, který mi věnovala při zpracování testů i vlastní diplomové práce.

Dále děkuji Dr. Jiřímu Pantůčkovi a firmě TOPVET za poskytnutí přístrojového a laboratorního vybavení i všem probandům, bez jejichž trpělivosti a shovívavosti by nemohla praktická část diplomové práce vzniknout.

V neposlední řadě děkuji Ing. Blance Pelikánové z oddělení vývoje fy TOPVET za odborné konzultace týkající se surovin a za vývoj receptur použitých v diplomové práci.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že na vypracování diplomové práce jsem pracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Věry Kašpárkové, CSc. a všechny použité literární zdroje jsem řádně citovala.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 HYDRATACE POKOŽKY.....	12
1.1 INTEGRITA KŮŽE A HYDRATACE	12
1.1.1 Role korneocytů a NMF	13
1.1.2 Role lipidů SC	13
1.2 KONCENTRACE VODY V EPIDERMIS	14
1.2.1 Úloha proteinu AQP3.....	14
1.2.2 Úloha těsných spojovacích struktur	14
2 KOSMETICKÉ AKTIVNÍ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ HYDRATACI.....	16
2.1 HUMEKTANTY	16
2.2 OKLUZIVA	17
2.3 EMOLIENTY	17
3 POLYSACHARIDY	19
3.1 POLYSACHARIDY LIDSKÉHO TĚLA A ZE ŽIVOČIŠNÝCH ZDROJŮ	20
3.2 POLYSACHARIDY Z ROSTLINNÝCH ZDROJŮ.....	20
3.3 POLYSACHARIDY MIKROBIÁLNÍHO PŮVODU	21
4 ÚČINNÉ LÁTKY S HYDRATAČNÍM POTENCIÁLEM POUŽITÉ V DIPLOMOVÉ PRÁCI	23
4.1 FUCOGEL.....	23
4.1.1 Struktura.....	23
4.1.2 Vlastnosti.....	24
4.2 KYSELINA HYALURONOVÁ	24
4.2.1 Struktura HA	25
4.2.2 Vlastnosti.....	26
4.2.3 Chování kyseliny hyaluronové v roztoku	26
4.2.4 Reologické vlastnosti HA	27
4.3 AQUAREGUL K.....	28
4.4 STUDIE ÚČINNOSTI FUCOGELU VE SROVNÁNÍ S KYSELINOU HYALURONOVOU.....	28
5 METODY PRO CHARAKTERIZACI ÚČINNOSTI KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	30
5.1 STANDARDNÍ METODY <i>IN VIVO</i>	30
5.1.1 Měření elasticity pokožky	30
5.1.2 Transepidermální ztráta vody (TEWL).....	31
5.1.3 Měření hydratace <i>stratum corneum</i>	32
5.2 OPTICKÉ A SPEKTROSKOPICKÉ METODY	33
5.2.1 Laserová skenovací mikroskopie (LSM)	33
5.2.2 Optická koherentní tomografie (OCT).....	33
6 CÍL PRÁCE	34

II PRAKTICKÁ ČÁST	35
7 PŘÍPRAVA FORMULACÍ S OBSAHEM POLYSACHARIDŮ	36
7.1 MATERIÁLY A POMŮCKY	36
7.2 PŘÍPRAVA FORMULACÍ	37
7.3 RECEPTURY JEDNOTLIVÝCH FORMULACÍ.....	37
7.4 KOMERČNÍ PŘÍPRAVKY S HYDRATAČNÍM EFEKTEM	39
7.5 METODIKA	39
7.5.1 Působení aktivních látek Fucogel a HA (TEST I)	39
7.5.2 Dlouhodobý test komerčních přípravků (TEST II).....	41
7.6 METODIKA MĚŘENÍ	41
7.6.1 Soubor probandů	41
7.6.2 Vlastní metodika	41
7.6.3 Zpracování dat.....	43
8 VÝSLEDKY A DISKUSE	44
8.1 VÝSLEDKY PŮSOBNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK FUCOGEL A HA (TEST I.).....	44
8.1.1 Volba surovin pro formulaci	44
8.1.2 Vyhodnocení hydratační účinnosti.....	44
8.1.2.1 Krém s obsahem 5 % Fucogelu	45
8.1.2.2 Krém s obsahem 10 % Fucogelu	46
8.1.2.3 Krém s obsahem 0,1 % HA	47
8.1.2.4 Krém s obsahem 1 % HA	48
8.1.2.5 Srovnání účinků Fucogelu a HA.....	49
8.1.2.6 Krém s obsahem kombinace 0,1 % HA a 5 % Fucogelu.....	50
8.1.2.7 Krém s obsahem kombinace 0,05 % HA a 10 % Fucogelu.....	51
8.1.2.8 Krém s obsahem kombinace 0,1 % HA, 5 % Fucogelu a 2,5 % Aquaregulu.....	52
8.1.3 Vyhodnocení vlivu testovaných formulací krémů na elasticitu pokožky	53
8.2 VÝSLEDKY DLOUHODOBÉHO TESTU KOMERČNÍCH PŘÍPRAVKŮ (TEST II.).....	56
8.2.1 Hyaluronové sérum	56
8.2.2 Hydratační krém.....	57
8.2.3 Day cream – Vital care s $\Omega 6$	58
8.2.4 Astaxanthin aktivní pleťový krém.....	58
ZÁVĚR	61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68
SEZNAM OBRÁZKŮ	69
SEZNAM TABULEK.....	70
SEZNAM PŘÍLOH.....	71

ÚVOD

Pokožka plní nejen ochranou, termoregulační a smyslovou funkci, ale v dnešní době je jí přikládána i funkce sociální a estetická. Vlivem působení vnitřních i vnějších vlivů, jako je stárnutí nebo UV záření, dochází ke zhoršování stavu pokožky. Snižuje se množství kolagenních vláken, zkracují se elastinová vlákna, zpomaluje se obnova buněk, klesá množství ceramidů a snižuje se obsah vody v pokožce. To vše má za následek viditelné negativní změny jejího vzhledu.

Nejvýznamnější vliv na potlačení nežádoucích změn pokožky má prevence, která může tyto změny výrazně potlačit. Změny kůže, které již vznikly, jsou pak jen obtížně vratné.

Existuje mnoho možností, jak udržet pokožku v dobrém stavu a oddálit její stárnutí. Mezi nejčastější a nejdostupnější metody patří metody neinvazivní, především lokální aplikace kosmetických přípravků s obsahem aktivních látek podporujících zpevnění kůže, její vyhlazení a hydrataci.

Již mnoho let se v kosmetické péči používá kyselina hyaluronová. Je prokázáno, že tento přirozeně se v těle vyskytující polysacharid, hydratuje pokožku a zvyšuje její pružnost. Mezi novější kosmetické suroviny s výraznými hydratačními schopnostmi patří také polysacharid Fucogel. Ten se díky svým vlastnostem stále více využívá především v kosmetických krémech, do kterých se na rozdíl od kyseliny hyaluronové snadno zapracovává.

V této diplomové práci byl testován vliv výše zmíněných polysacharidů především na hydrataci a elasticitu pokožky. Byly zjišťovány rozdíly v rychlosti nástupu i délce účinku aktivních látek. Testovány byly různé koncentrace látek a následně i kombinace obou polysacharidů pomocí bioinženýrských metod *in vivo* jak v krátkodobém, tak dlouhodobém testu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HYDRATAČE POKOŽKY

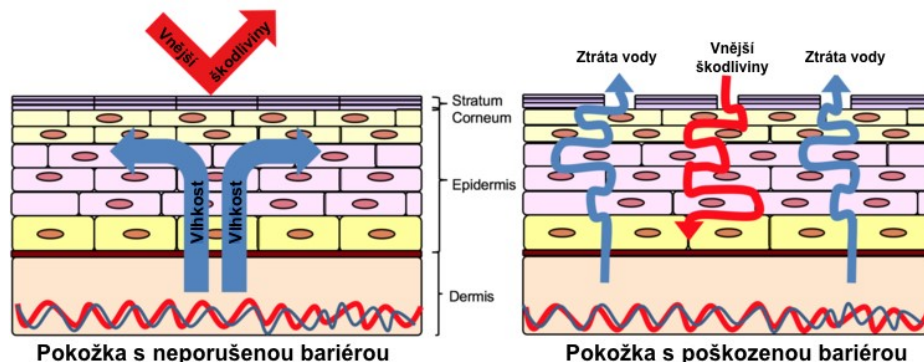
Kůže je velké mezifázové rozhraní oddělující lidské tělo a vnější prostředí. [1, s. 1] Její důležitou funkcí je ochrana proti mechanickému poškození, chladu, teplu, UV záření, chemickým látkám, vysušení a infekci. [2, s. 192] Hydratace je klíčovou vlastností kůže, která ovlivňuje její fyzikální a mechanické vlastnosti a je rozhodující pro udržení zdravé pokožky. Schopnost pokožky udržovat vodu se vztahuje především ke *stratum corneum* (SC), které funguje jako bariéra proti ztrátě vody. [3, s. 75]

Odhaduje se, že bez *stratum corneum* by se zvýšila ztráta vody z 0,5 na 8,5 litrů vody za den. Optimální obsah vody v SC je 10-15 %. Obsah vody v *dermis* je důsledkem hydrofilních vlastností proteoglykanů a glykosaminoglykanů (kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, dermatan sulfát), jejich schopnosti vázat velké množství vody v řádech několika set násobků své hmotnosti. Ačkoliv je voda na tyto molekuly vázána, uvolňuje se a migruje k povrchu kůže, kde se odpařuje. Úroveň vlhkosti je pak dána rozdílem mezi příjmem a ztrátou vody. [4, s. 69]

Hydratace *epidermis* jako jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících odolnost a zevní vzhled kůže, úzce souvisí s působením mnoha vnějších vlivů. Pokud jimi není narušována, je hodnotou konstantní. Čím je tato hodnota určována, není přesně známo, je však zřejmé, že v pokročilém věku klesá, dále klesá při degenerativních změnách způsobených např. světelnou expozicí a je závislá i na celém komplexu vnitřních faktorů. [5, s. 33]

1.1 Integrita kůže a hydratace

Zadržení vody v SC je závislé na dvou hlavních faktorech, na přítomnosti přírodních hygrokopických činidel uvnitř korneocytů, které jsou souhrnně označovány jako přírodní hydratační faktor (NMF) a mezibuněčné lipidové dvojvrstvě uspořádané jako bariéra transepidermální ztráty vody (TEWL). Obsah vody v SC je nutný pro správné zrání buněk a deskvamaci kůže. Zvýšená TEWL totiž zhoršuje enzymatické funkce potřebné pro normální deskvamaci a pokud obsah vody v SC klesne pod kritickou úroveň, jsou tyto enzymatické funkce narušeny, což vede k adhezi korneocytů a jejich akumulaci na kožním povrchu. [3, s. 76]



Obr. 1 Transepidermální ztráta vody (TEWL) [6]

1.1.1 Role korneocytů a NMF

Korneocyty představují cca 85 % z celkové hmotnosti SC v suchém stavu. Při vystavení kůže vlhkému prostředí, absorbují korneocyty velké množství vody. Při plné hydrataci mohou bobtnat zhruba o 50 %. [1, s. 1-2] Korneocyty fungují jako fyzikální bariéra SC. Obsahují keratinová vlákna, aminokyseliny a molekuly NMF, tedy směs hygrokopických molekul, které pomáhají udržet vodu v korneocytech a tím i ve SC. SC obsahuje přibližně 10-15 % vody, z nichž je část pevně vázána na hygrokopické molekuly NMF a lipidy v kůži. Množství této části vody je úměrné vnější relativní vlhkosti. Zbývající podíl vody je vázán v intracelulárním keratinu a obvykle se v závislosti na vnějších podmínkách nemění. [3, s. 76] Co se týká podrobnějšího složení NMF, zahrnuje látky, jako jsou aminokyseliny, močovina, močová kyselina, glukosamin, kreatin, fosfáty, laktáty, chloridy, citráty, cukry, peptidy a další. Jejich koncentrace činí 10 % suché hmotnosti SC. [2, s. 192]

1.1.2 Role lipidů SC

V současnosti se SC charakterizuje strukturou „zed“, přičemž „cihly“ v ní tvoří korneocyty a „malta“ je složená z lamelárních lipidových vrstev. [4, s. 69] Bariérová funkce SC, která má schopnost zabránit nadměrné ztrátě vody a elektrolytu, je zprostředkována mezibuněčnými lipidy. Tyto lipidy, které jsou organizovány s vodou do fází a jsou popisovány jako série paralelních lamelárních membrán, poskytují těsnou a účinnou bariéru pro TEWL. Organizace lipidů má zásadní význam pro bariérovou funkci. Supravodivé lipidy sestávají z ekvimolární směsi ceramidů (45-50 %), cholesterolu (20-25 %) a volných mastných kyselin (10-15 %). Lipidy jsou vylučovány na přechodu z granulární buňky do korneocytu. [3, s. 77-78]

1.2 Koncentrace vody v epidermis

Obsah vody v epidermis je vysoký (70 %), ale prudce klesá na přechodu *stratum granulosum* (SG) a *stratum corneum* (SC) (15-30 %). Tato nerovnováha v obsahu vody „izoluje“ SC z těla a pomáhá zachovat důležité rozpustné látky uvnitř životaschopné epidermis. Prudký nárůst obsahu vody ve spodní části SC spouští důležité funkce keratinocytů, jako je proteolýza filagrinu a v důsledku toho tvorba NMF v hlubší části SC. Nerovnováha v obsahu vody rovněž souvisí s nárůstem sekrece lipidů v SC. Oba procesy jsou nezbytné pro hydrataci a správnou bariérovou funkci kůže. [3, s. 78]

V úrovni vnitřních partií rohové vrstvy je lokalizována tzv. „vodní bariérová zóna“, která vytváří hranici mezi zrohovatělými vrstvami *epidermis*, které jsou dehydratované, a vrstvami neúplně zrohovatělými, které obsahují intracelulární vodu. Obsah vody na úrovni této bariérové zóny je výslednicí mezi množstvím vody, která sem z hlubších vrstev kůže proniká difúzí a obsahem vody v okolní atmosféře nad kožním povrchem. Voda je zde vázána především osmotickými silami. Rozdíl v podílu vody v rohové vrstvě *epidermis* nad bariérovou zónou a pod ní je fyziologicky velice významný. Keratin zevní vrstvy mu vděčí za svou mechanickou i chemickou odolnost. Tento podíl musí být optimální. Při přílišném poklesu hydratace ztrácí SC svoje charakteristické vlastnosti a svou odolnost stejně, jako když dojde k jejímu bobtnání. [5, s. 32-33]

1.2.1 Úloha proteinu AQP3

Protein AQP3 patří mezi aquaglyceroporiny. Aquaglyceroporiny jsou membránové proteiny, které tvoří vodní kanály přes buněčnou membránu. Usnadňují transport vody a rozpuštěných látek, jako je glycerol nebo močovina. AQP3 umožňuje rychlou prostupnost vody mezi základnou *epidermis* a SC, a zajišťuje tak udržení konstantního obsahu vody v životaschopné *epidermis*. [3, s. 78-79]

1.2.2 Úloha těsných spojovacích struktur

Prudký nárůst množství vody v dolní části SC znamená, že bariéra proti TEWL není homogenně distribuována v celém SC, ale nachází se na spojení SC a SG. Toto těsné spojení je tvořeno mezibuněčnými strukturami, které řídí paracelulární propustnost. [3, s. 79-80]

Korneocyty jsou pokryty obalem ze strukturálních proteinů a lipidovým obalem z ceramidů a jsou stmeleny mezibuněčnou hmotou, složenou především z ceramidů, cholesterolu a lamelárně uspořádaných mastných kyselin. Speciální zaklesnutí buněk a stmelení mezibuněčnou hmotou zabezpečuje dokonalé hydrofobní utěsnění SC. [2, s. 192]

2 KOSMETICKÉ AKTIVNÍ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ HYDRATAČI

Hydrataci rohové vrstvy lze zajistit aplikací hydratačních kosmetických přípravků s obsahem pomocných látek ze skupiny humektantů, emolientů, popř. okluziv, z nichž každá má vlastní mechanismus účinku. [2, s. 192] Hydratační kosmetické přípravky zlepšují hydrataci pokožky, zvyšují obsah vody ve SC a zabraňují transepidermální ztrátě vody, ale také kryjí drobné kožní praskliny, poskytují ochranný film a chrání pokožku před třením. Navíc vyhlazují povrch kůže a obnovují schopnost mezibuněčné lipidové dvojvrstvy absorbovat, zadržet a redistribuovat vodu. [7, s. 77] Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) uvádí několik tisíc složek v přípravcích péče o pokožku. Přes 3000 složek je pak uvedeno jako změkčující, zvlhčující, okluzivní nebo jinak ošetřující pokožku. [8]

2.1 Humektanty

Humektanty jsou látky používané v kosmetických přípravcích ke zvýšení obsahu vody v horních vrstvách kůže, především v SC, a k doplnění látek NMF, které se průběžně odstraňují z kožního povrchu např. mytím. Jsou to málo prchavé látky schopné po delší dobu zadržovat vlhkost při relativně široké změně vnější vlhkosti. [2, s. 193] Humektanty jsou hygrokopické sloučeniny, což znamená, že mají schopnost absorbovat vodu, a to ze dvou zdrojů, z *dermis* do *epidermis* a ve vlhkých podmínkách i z okolního prostředí. Řada humektantů má i emolientní vlastnosti. [9, s. 280] Používají se především organické sloučeniny ze skupiny polyolů, a to glycerol, propylenglykol a sorbitol. Dále jsou to látky přirozeného hydratačního faktoru, jako např. močovina a kyselina mléčná. Z polysacharidů se do této skupiny řadí kyselina hyaluronová, její sodná sůl hyaluronan a chitosan. Mezi další hydratační látky působící v kosmetických přípravcích patří např. alantoin, kyselina arachidonová, kyselina askorbová, azulen, bisabolol, kolagen, želatina, glukóza, hydrolyzovaný keratin, hydrolyzovaný sójový škrob, maltodextrin, mléčné proteiny, medový extrakt, minerální soli a mořská sůl. [2, s. 193] Humektanty mohou usnadnit TEWL zvýšením absorpce vody z *dermis* do *epidermis*, kde se snadno odpařuje. Proto je často nutná jejich kombinace s okluzivy, které pomáhají zvýšit funkci epidermální bariéry. [7, s. 77]

2.2 Okluziva

Okluziva se používají v kosmetických přípravcích ke zvýšení obsahu vody ve SC tím, že zpomalují vypařování vody. [2, s. 193] Jsou to látky, které fyzicky blokují TEWL. Okluziva mají nejvýraznější účinek při aplikaci na mírně navlhčenou pokožku, kde vytváří hydrofobní bariéru kůže a přispívají k matici mezi korneocyty. V praxi je k dispozici široká škála okluziv. Mohou to být např. minerální oleje na bázi z ropy. [9, s. 281] Nejdůležitějšími okluzivními materiály jsou pak kapalný parafin a vazelína, což jsou směsi uhlovodíků. Vazelína je nejúčinnějším klasickým okluzivním činidlem. Ve srovnání s olivovým olejem může její minimální koncentrace 5 %, snížit ztráty transepidermální vody o více než 98 %. Dalším účinným a široce používaným okluzivem je lanolin. Je to živočišný vosk, který je vylučován mazovými žlázami ovcí a obsahuje ve své struktuře estery, diestery a hydroxyestery o vysoké molekulové hmotnosti. Na rozdíl od lidského mazu neobsahuje triacylglyceroly. Lanolin může snížit transepidermální ztrátu vody o 20–30 %. K negativním účinkům okluziv lze řadit přecitlivělost některých osob na jejich působení a mastnou konzistenci. [7, s. 77]

2.3 Emolienty

Emolienty jsou přípravky, které změkčují, zvláčňují, vyhlazují kůži, upravují pH kůže a regenerují, a jsou tedy zvláště významné v obnově kožní bariéry. [10, s. 120] Jedná se o hydrofobní látky, především lipidy a oleje, které po aplikaci pokrývají kožní povrch a doplňují tak úbytek kožního lipidního filmu, čímž se omezí pasivní TEWL,lepší se hydratace SC a celkový vzhled pleti. [2, s. 193] Emolienty ovlivňují fyziologii a patologii kůže tím, že působí na funkci kožní bariéry. Ovlivňují např. produkci eikosanoidů, tekutost membrány a buněčnou signalizaci a zlepšují rovněž hojení kůže. [7, s. 77] K emolientům se řadí jak samotné konstitutivní látky, tak i jednotlivé druhy topicky aplikovaných kosmetik, které tyto látky obsahují. Mohou to být např. emulzní přípravky typu o/v, emulze či krémy nebo přípravky mastné, a to kapalné a polotuhé emulze typu v/o obsahující vazelínu, parafíny a jiné lipofilní látky, popř. hydrogely s vysokým obsahem vody, které jsou schopné tvořit tenký film. [2, s. 193]

Tab. 1. Typy hydratačních složek dle mechanismu účinku [10, s. 121]

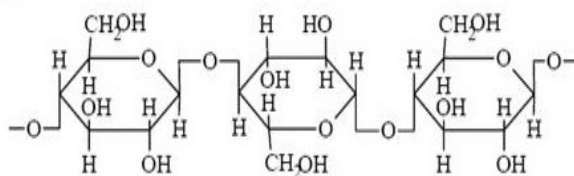
Typ	Mechanismus účinku	Hydratační látky	Příklady komerčně dostupných extern
Okluziva	Hydrofobní látky: na povrchu kůže tvoří okluzi, čímž nepřímě snižují TEWL, podporují biosyntézu lipidů	Vazelína, lanolin, silikonové oleje (dimetikon), rostlinné oleje (slunečnicový, olivový, mandlový, bambucké máso)	Vazelín Synderman Pontin Simplex
Emolienty	Lipidy rostlinného původu pronikají částečně do SC, zabraňují odpařování vody, obnovují kožní bariéru (stimulují tvorbu lipidů a také bílkovin kožní bariéry)	Ceramidy, esenciální mastné kyseliny (linolová, linolenová), cholesterol	Lipobase repair A-Derma Linola Lipikar Baume AP+
Humektanty	Vážou vodu v SC, a tím zvyšují příjem vody z <i>dermis</i> do <i>epidermis</i> , ve vlhkém prostředí pomáhají rohově vrstvě absorbovat vodu ze zevního prostředí	Glycerol, urea, propylenglykol, hyaluronan sodný, kyselina mléčná, kyselina pyrrolidinkarbonová	Excipial U Lipolotio

3 POLYSACHARIDY

Polysacharidy jsou přírodní makromolekulární polymery, které jsou obvykle složeny z více než 10 monosacharidů spojených glykosidickými vazbami v lineárních nebo rozvětvených řetězcích. Jejich molekulová hmotnost je v řádu desítek tisíc nebo dokonce milionů g/mol. Široce se vyskytují v rostlinách, mikroorganismech, řasách a tělech živočichů. Polysacharidy jsou nezbytné pro řadu biologických procesů, jako je mezibuněčná komunikace, adheze buněk a buněčná imunita. [11, s. 91]

Polysacharidy vyskytující se v mikroorganismech, řasách, rostlinách i zvířatech jsou vždy spojeny s dalšími biomolekulami, např. proteiny, polynukleotidy, lipidy a některými minerálními látkami, a to prostřednictvím jak fyzikálních, tak chemických vazeb. Polysacharidy lze klasifikovat mnoha možnými způsoby, například na základě jejich struktury, chemického složení, rozpustnosti, zdroje získávání a aplikace. S ohledem na chemické složení jsou polysacharidy klasifikovány do dvou skupin. První skupinu tvoří homo-polysacharidy, které jsou složeny z jednoho typu monosacharidu, zde jako příklad slouží celulóza a glykogen, kde je stavební jednotkou glukóza. Heteropolysacharidy se pak skládají z více než jednoho typu monosacharidu a jako příklad lze uvést heparin. [12, s. 32]

Oproti syntetickým polymerům vykazují polysacharidy a jejich deriváty řadu výhod. Jsou netoxické, biologicky odbouratelné, biologicky kompatibilní a řada z nich je i levnější. To umožňuje široké spektrum aplikací polysacharidů v různých oblastech. Jako příklad je možné uvést jejich využití v biomedicíně nebo farmacii, potravinářství a kosmetice. Polysacharidy a jejich deriváty se využívají pro tkáňovou buněčnou signalizaci, buněčnou adhezi, buněčnou proliferaci, buněčnou diferenciaci. Díky jejich biokompatibilitě a nízké toxicitě jsou různé polysacharidy, jako například chitosan, celulóza, hyaluronan a alginát, používány pro přípravu materiálů k hojení ran. [12, s. 50]



Obr. 2. Celulóza [13]

Biologická aktivita polysacharidů je významně ovlivněna jejich chemickou strukturou a konformací polymerního řetězce. [12, s. 32] Polysacharidy vykazují protinádorovou aktivitu, imunoregulační aktivitu, aktivitu proti diabetes, antikoagulační aktivitu, antivirovou aktivitu, antioxidační aktivitu a další. [11, s. 92]

S ohledem na původ lze polysacharidy klasifikovat na ty, které se vyskytují v lidském těle a polysacharidy z ostatních zdrojů. Mezi polysacharidy lidského těla patří kyselina hyaluronová a chondroitin sulfát. Polysacharidy pocházející z ostatních zdrojů pak mohou být živočišného, rostlinného nebo bakteriálního původu. Zde lze zařadit např. chitin a chitosan, kyselinu alginovou a algináty, xanthanovou gumu, arabskou gumu, škrob, celulózu, pektin nebo karagenan. [14, s. 806-810]

3.1 Polysacharidy lidského těla a ze živočišných zdrojů

Do skupiny bioaktivních polysacharidů pocházejících z lidského těla a ze živočišných zdrojů lze zařadit především sulfatované glykosaminoglykany, jako je heparan sulfát, chondroitin sulfát, dermatan sulfát a keratin sulfát. Heparin, vysoce sulfatovaný heparan sulfát, je široce používán jako nejúčinnější klinický antikoagulant. Chondroitin sulfát a dermatan sulfát jsou klíčové molekuly extracelulární matrix mozku, regulují adhezi buněk, proliferaci a migraci během hojení ran a signalizaci růstového faktoru ve skeletu. Kyselina hyaluronová (HA) je základní složkou extracelulární matrix, zprostředkovává buněčnou signalizaci, hojení ran a morfogenezi. Chitin je po celulóze druhý nejčastěji se vyskytující přírodní polymer, který se nachází primárně v exoskeletech členovců, např. skořápkách krabů a krevet, a v kůži hmyzu. Parciální deacetylaci chitinu za alkalických podmínek se získává nejdůležitější derivát chitinu, chitosan. Oligomery z částečné kyselé hydrolyzy chitinu a chitosanu jsou uznávány pro svoji biologickou aktivitu, vykazují rovněž hemostatické působení, protizánětlivé účinky a mají rovněž protinádorové, antibakteriální a fungicidní vlastnosti. [12, s. 36-37]

3.2 Polysacharidy z rostlinných zdrojů

Polysacharidy z rostlin, ve své nativní formě, stimulují lidský imunitní systém, inhibují replikaci virů, zachycují volné radikály a brání oxidaci lipidů. Polysacharidy z řas a lišejníků pak mají vynikající fyzikální vlastnosti a fungují jako zahušťovadla, gelační činidla a stabilizátory. Vykazují také biologickou aktivitu, jako je antikoagulační,

antitrombotická, antioxidační, antivirová, protinádorová a imunomodulační aktivita. Sulfatované polysacharidy, jako jsou např. karagenany v červených řasách, jsou jednou z nejdůležitějších složek mořských řas. [12, s. 33] Hnědé řasy jsou bohaté a snadno obnovitelný zdroj biologicky aktivních polysacharidů, včetně kyseliny alginové a fucoidanů. [11, s. 95]

Polysacharidy izolované z lišejníků jsou tvořené především lineárními nebo substituovanými α -a/nebo β -glukany. Rovněž tyto glukany jsou biologicky aktivní. Vykazují imunomodulační aktivitu, stimulují široké spektrum imunitních odpovědí, jako je uvolňování cytokinů, tvorba reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého a uvolňování metabolitů kyseliny arachidonové. Biologická aktivita sulfatovaných polysacharidů z řas a lišejníků velmi závisí na jejich struktuře, obsahu síranu, distribuci sulfátových skupin v hlavním řetězci, molekulové hmotnosti a prostorovém uspořádání.

K dalším rostlinným polysacharidům patří celulóza a několik primárních skupin hemicelulóz, tj. xylany, glukomannany, arabinany, galaktany a glukany. Většina těchto polysacharidů nevykazuje biologickou aktivitu. [12, s. 33-36]

3.3 Polysacharidy mikrobiálního původu

Mikrobiální polysacharidy jsou biodegradibilní a biokompatibilní polymery z obnovitelných zdrojů, které jsou atraktivní pro široké spektrum aplikací. I když se používají především jako hydrokoloidy, řada z nich má i filmotvorné vlastnosti, které je činí vhodné pro přípravu membrán s různými vlastnostmi. [15, s. 1]

Mikroorganismy jsou schopné převést zdroje uhlíku na polysacharidy s různými chemickými a materiálovými vlastnostmi. Mikrobiální polysacharidy jsou pomocí bakterií získávány prostřednictvím udržitelného procesu, z obnovitelných zdrojů a za kontrolovaných kultivačních podmínek. Tyto podmínky zajišťují výrobu produktu o známém složení a neovlivňují negativně životní prostředí. Rozšíření mikrobiálních polysacharidů brání především výrobní náklady, které jsou vyšší než u většiny tradičních polymerů.

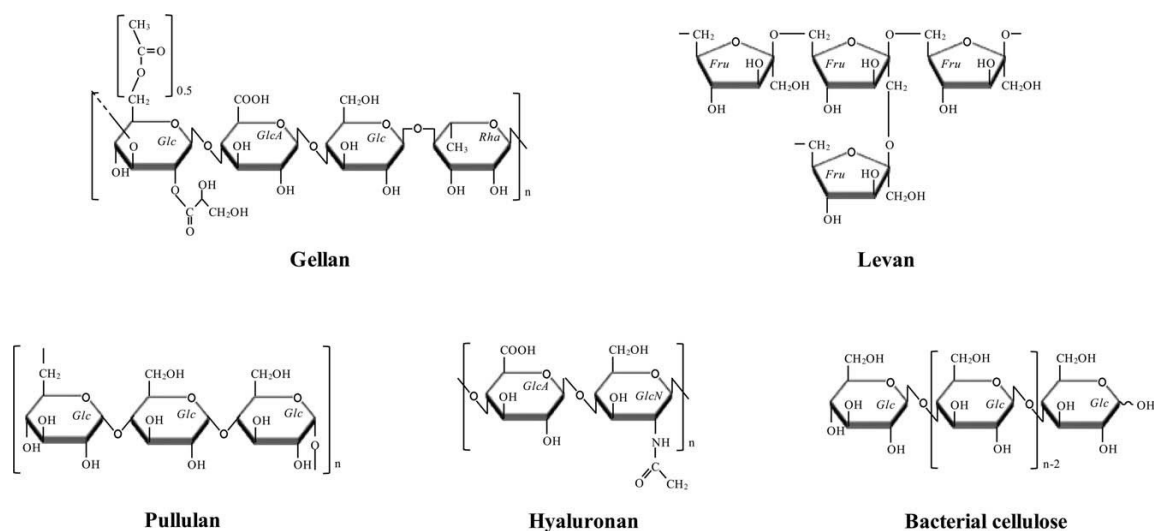
Funkční vlastnosti mikrobiálních polysacharidů jsou určeny nejen jejich chemickým složením, ale také jejich molekulární strukturou, střední molekulovou hmotností a polydisperzitou. Vyznačují se vysokou variabilitou molekulární struktury, což umožňuje

jejich široké možnosti uplatnění v mnoha různých oblastech, od chemického po potravinářský průmysl, farmacii a kosmetiku. [15, s. 4]

V medicíně se mikrobiální polysacharidy využívají v prostředcích k podávání léčiv, na povlaky zdravotnických prostředků, v chirurgických lepidlech a tmelech. Bakteriální celulóza byla rovněž použita pro přípravu obvazů na popáleniny, hojení ran nebo výrobu umělých cév pro mikrochirurgii.

V potravinářském průmyslu jsou mikrobiální polysacharidy široce používány jako zahušňovač, stabilizátory, texturní nebo gelotvorná činidla, která zlepšují sensorické vlastnosti výrobku, prodlužují jeho trvanlivost a usnadňují zpracování. Gelan, xanthan a pullulan jsou používány při výrobě jedlých povlaků, které se skládají z tenké vrstvy materiálu naneseného a vytvořené přímo na povrch potravinářského výrobku.

Vzhledem k hydrofilnímu charakteru a náboji jsou membrány na bázi mikrobiálních polysacharidů používány pro čištění odpadních vod, prokázaly vysokou adsorpční kapacitu pro aromatické sloučeniny, barviva a ionty těžkých kovů. Také byly použity pro vývoj součástek pro elektronické přístroje. [15, s. 5]



Obr. 3. Chemická struktura některých mikrobiálních polysacharidů [15, s. 3]

4 ÚČINNÉ LÁTKY S HYDRATAČNÍM POTENCIÁLEM POUŽITÉ V DIPLOMOVÉ PRÁCI

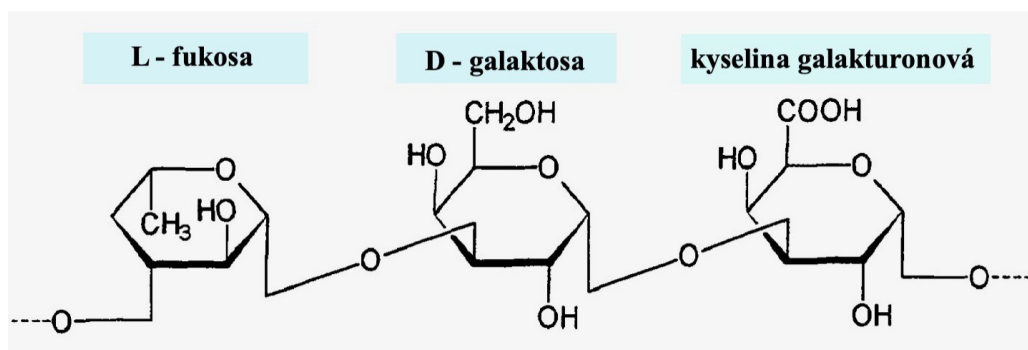
4.1 Fucogel

Fucogel je vysoce viskozní hydrofilní polysacharid mikrobiálního původu. V kosmetických přípravcích je jeho funkce založena především na jedinečných hydratačních a emulgačních vlastnostech. [16, s. 1362]

Fucogel je získáván cestou biotechnologického procesu fermentací původního bakteriálního kmene *Klebsiella pneumoniae* I-1507 na živných půdách. Složení makromolekul polysacharidu dává Fucogelu schopnost vytvořit na povrchu kůže ochranný a hydratační film. Tento film vytváří mikroklima bránící ztrátě vody. Prodloužená účinnost Fucogelu je způsobena pozvolnou degradací polysacharidů do kratších jednotek, které přirozeně zadržují vodu. [17, s. 26]

4.1.1 Struktura

Fucogel je hydrofilní polysacharid s opakující se jednotkou acetylovaného nabitého lineárního trisacharidu složeného z L-fukosy, D-galaktosy a kyseliny galakturonové. Který je částečně acetylovaný na čtvrtém uhlíku kyseliny galakturonové. [18, s. 239]



Obr. 4. Struktura Fucogelu [17, s. 6]

4.1.2 Vlastnosti

Fucogel je viskozní, opalescentní roztok se slabou, ale charakteristickou vůní. Je rozpustný ve vodě, propylene glykolu a glycerolu, nerozpustný v ethanolu a nemísitelný s minerálními oleji.

Fucogel obsahuje vysoký podíl (33 %) fukózy. [17, s. 11] Fukóza má značnou antibakteriální, antikoagulační, protivirovou, či protinádorovou biologickou aktivitu. [19, s. 72] Díky vysokému obsahu fukózy se Fucogel např. podílí na tlumení zánětů a zmírňuje alergické reakce. Jednou z funkcí T-lymfocytů je M.I.F. (Macrophage Migration Inhibiting Factor). Za normálních podmínek je tento makrofág spouštěčem hypersenzitivních reakcí. Pokud je však na jeho specifické receptory navázána fukóza, dojde k inhibici této vlastnosti. Fucogel je tedy možné považovat za aktivní látku s modulačním účinkem, tlumícím alergické reakce. [17, s. 11]

Fucogel je stabilní v širokém rozpětí pH a je rovněž zcela stabilní do teploty 70 °C po dobu 10 minut. Fucogel má samoemulgační schopnost. Pokud je použit v koncentraci nad 7 %, stabilizuje emulzi bez potřeby přidávat jiný emulgátor. [17, s. 26]

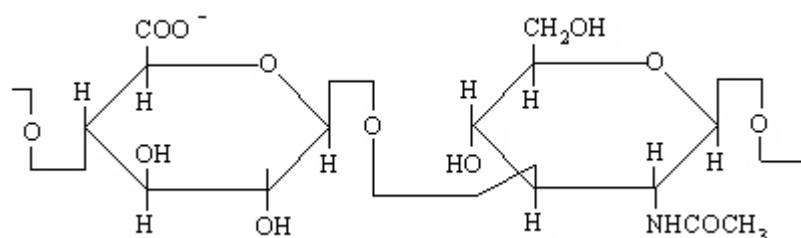
4.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (hyaluronan, HA) je polysacharid ze skupiny glukosaminoglykanů. Název této sloučeniny pochází z řeckého hyalos (skelný). HA je přírodní, hustá a transparentní látka, která se hojně vyskytuje ve všech živých organismech. U člověka se nachází v celé řadě tkání, např. pokožce, kloubní chrupavce, očním sklivci a stěnách krevních cév. Nejvyšší koncentrace HA se však nachází v extracelulární matrix kůže. Hladina HA v těle s věkem klesá a kolem 80 let vymizí úplně. [20, s. 133] HA se v organismu většinou vyskytuje v podobě sodné soli, hyaluronátu sodného. Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 15 g HA, přičemž jedna třetina se obnovuje každý den. HA se v podobě signální molekuly aktivně podílí na imunologických procesech a ovlivňuje adhezi a mobilitu buněk. [21, s. 75] Za fyziologických podmínek může HA v kůži také zachytávat volné radikály a antioxidanty. Spektroskopická studie dokonce naznačuje, že dvojná vazba v jednotce D-glukuronové kyseliny, která je součástí HA, může tvořit komplex s reaktivní formou kyslíku a snížit toxicitu volných radikálů. [22, s. 2-3] Hyaluronan je syntetizován mnoha buňkami organismu, zejména těmi, které jsou zapojeny do tvorby extracelulární matrix, resp. pojivové tkáně (např. fibroblasty, keratinocyty, ale i

třeba krevní destičky). Syntézu zajišťuje enzym hyaluronan syntáza, který je lokalizován v membráně buněk. [23, s. 7] Unikátní viskoelastický charakter HA spolu s její biokompatibilitou vedou k použití v řadě klinických aplikací, včetně doplnění kloubní tekutiny při artritidě, jako chirurgická pomoc v oční chirurgii a pro usnadnění hojení a regenerace chirurgických ran. [24, s. 398] Kyselina hyaluronová a její sodné a draselné soli jsou aktivní složky mnoha hydratačních, ochranných přípravků a přípravků proti stárnutí pleti. Působí v kosmetice jako látky pro ošetření pokožky v koncentracích až do 2 %. [20, s. 133]

4.2.1 Struktura HA

Typickým znakem HA je struktura tvořená z opakujících se disacharidových jednotek složených z monosacharidu kyseliny D-glukuronové, která je β 1-3 glykosidickou vazbou spojena s dalším monosacharidem *N*-acetylglukosaminem. Jednotlivé disacharidové jednotky jsou pak pomocí β 1-4 glykosidických vazeb pospojovány v polymer s vysokým stupněm polymerace. [23, s. 7] Jediný glukosaminoglykanový řetězec je obvykle tvořen z 20 až 200 opakujících se disacharidových sekvencí, ale jejich počet může dosáhnout 10000 nebo dokonce více. [20, s. 133]



D-glukuronová kyselina *N*-acetyl-D-glukosamin

Obr. 5. Chemická struktura kyseliny hyaluronové [25]

Jak je uvedeno výše, primární struktura HA se skládá z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminu. Sekundární strukturu HA pak představuje dvojšroubovice stočených disacharidových jednotek, pootočených k sobě v úhlu 180° , která tvoří řetězec makromolekuly. Terciární struktura je tvořena prostřednictvím interakcí hydrofobní části řetězce a intramolekulárních vodíkových vazeb.[26] Bylo prokázáno, že spirálová forma HA v pevném stavu závisí na protiiontu,

pH, teplotě a rozsahu hydratace. Spirálová konformace v pevném stavu vyvolala otázku, zda by některé uspořádané formy mohly vůbec existovat za hydratovaných podmínek. Provedené experimenty poskytly důkazy o významných konformačních rozdílech mezi HA v pevném stavu a HA v roztocích. Při měření nukleární magnetické relaxace na roztocích HA byly identifikovány dva typy zbytků v řetězcích HA. Vztah mezi relaxačními dobami a konformační mobilitou ukázal, že existují dva typy domén s různou pohyblivostí. Zatímco jedna měla pohyblivost flexibilního polymeru, druhá byla tuhá a musela tedy obsahovat kooperativní strukturu. Tuhá část představovala 50-70 % struktury HA a tento podíl nebyl ovlivněn změnami iontové síly nebo teploty, přidávkem denaturačního činidla, jako je močovina, nebo mírnými změnami pH. Řetězce HA si stále zachovávaly vysoký stupeň tuhosti, i při redukci počtu disacharidových jednotek (od 2500 do méně než 60). [27, s. 2666-2668]

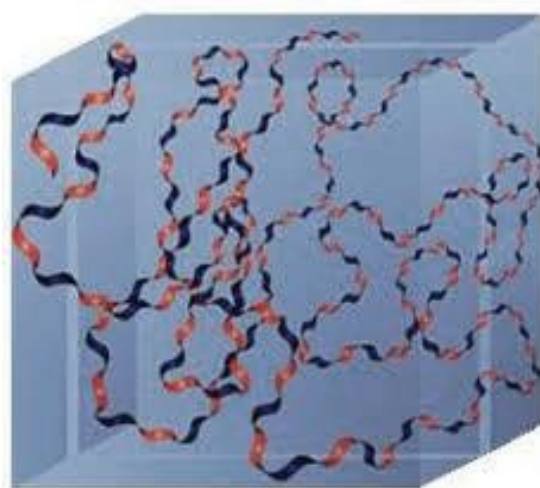
4.2.2 Vlastnosti

Vlastnosti HA jsou silně závislé na její molekulové hmotnosti. Pokud je molekulová hmotnost HA vyšší než 100 kDa, je schopnost tohoto polymeru pronikat do epidermis omezena. [20, s. 133] Obecně platí, že hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu ve smyslu regulace pochodů v organismu nebo regulace buněk a slouží hlavně jako strukturní jednotka. Naproti tomu hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách, přičemž bylo prokázáno, že čím je molekulová hmotnost nižší, tím vyšší je biologická aktivita. Je známo, že hyaluronan má poměrně rychlou obnovu, např. v kůži je jeho metabolický poločas v řádu desítek minut až hodin. [23, s. 7-8] HA je vysoce hygroskopický polymer. Každá jednotka kyseliny glukuronové obsahuje karboxylovou skupinu, což vede k polyaniontové povaze celé molekuly při fyziologickém pH. Z toho důvodu, v přítomnosti vody, molekuly HA mohou expandovat v objemu a mohou tvořit síť stabilizovanou vodíkovými vazbami. Jedna molekula HA může navázat přibližně 250 molekul vody. Charakteristickou vlastností vodných roztoků HA je pseudoplasticita. [20, s. 133]

4.2.3 Chování kyseliny hyaluronové v roztoku

Molekula HA obsahuje disociovatelné karboxylové skupiny, díky čemuž se ve vodných roztocích chová jako negativně nabitý polyelektrolyt. Ten dokáže vázat kladné ionty různého mocenství. HA vykazuje v roztoku množství konformací a vazebných interakcí.

Rozměry, konformace, tvar i stupeň hydratace molekuly HA jsou ovlivněny stupněm disociace, který závisí na přítomnosti kladně nabitých iontů, pH, specifických iontových interakcích, iontové síle a relativní permitivitě rozpouštědla. Podstatné změny konformace mohou nastat i ve směsných rozpouštědlech. [28, s. 285-286] Ve fyziologickém roztoku se řetězce molekuly hyaluronanu navzájem proplétají do náhodného klubka, a to již za velmi nízkých koncentrací. Tato klubka na sebe dokáží vázat až tisícinásobně více vody, než je jejich hmotnost. Axiální vodíkové atomy vytváří nepolární, relativně hydrofobní část molekuly a postranní řetězce molekuly tvoří převážně polární, hydrofilní část. V důsledku toho vzniká typická struktura šroubovice molekuly HA. [24, s. 399]



Obr. 6. Struktura hyaluronanu v roztoku [29]

4.2.4 Reologické vlastnosti HA

Kyselina hyaluronová se chová jako pseudoplastický materiál s viskoelastickými vlastnostmi. [20, s. 133] Při vyšších koncentracích mají roztoky extrémně vysokou viskozitu závislou na smykovém napětí. Mimořádné reologické vlastnosti roztoků HA je činí ideálními pro použití jako lubrikanty v řadě odvětví, včetně kosmetiky a medicíny. [24, s. 399]

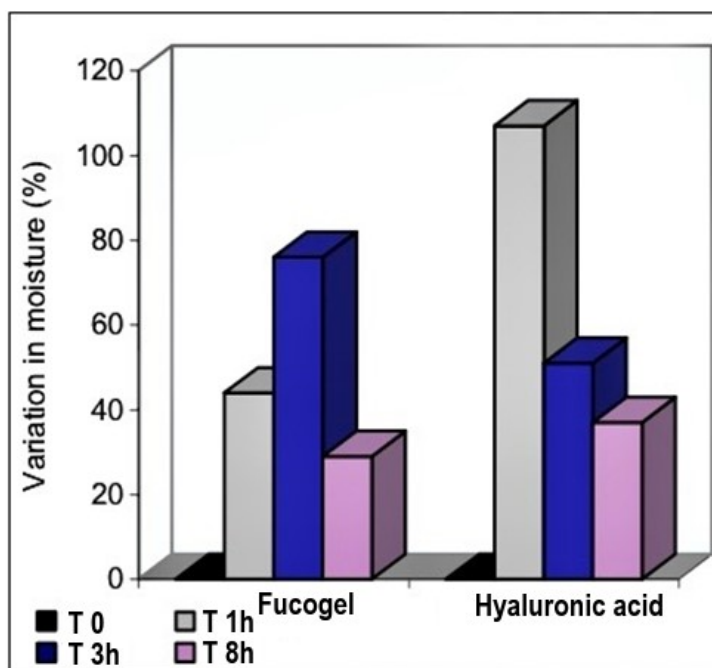
4.3 Aquaregul K

Aquaregul K® je komplex vytvořený z draselné soli L-pyrrolidone karboxylové kyseliny (L-PCA) a vodného extraktu kaktusu *Opuntia ficus indica*. Opuncie je pouštní rostlina patřící do rodu *Cactaceae*, která je známá svými schopnostmi přizpůsobit se různým klimatům a půdním druhům. V kosmetice je využíváno její schopnosti získat vodu a uchovávat ji ve svých tkáních. [30]

4.4 Studie účinnosti Fucogelu ve srovnání s kyselinou hyaluronovou

Fucogel je na komerční bázi dodáván společností Solabia, která provedla řadu studií pro ověření jeho účinnosti a bezpečnosti. Hydratační schopnosti Fucogelu byly ověřovány spektroskopii na živé tkáni proti 1% roztoku kyseliny hyaluronové. Rovněž Fucogel byl použit v 1% koncentraci.

Tato metoda byla použita pro hodnocení celkové úrovně hydratace pokožky. Měřena byla změna rezonance H^+ iontů v magnetickém poli. Fucogel i kyselina hyaluronová byly aplikovány ve standardních dávkách na předloktí. Úroveň hydratace rohové vrstvy byla změřena před aplikací a za 1, 3 a 8 hodin po aplikaci. Výsledky této práce jsou uvedeny na Obr. 7.



Obr. 7. Srovnání stupně hydratace pokožky po aplikaci Fucogelu a kyseliny hyaluronové

[17, s. 15]

Jednu hodinu po aplikaci zvyšuje Fucogel hydrataci rohové vrstvy o 44 %, zatímco kyselina hyaluronová o 107 %. Tento rozdíl je dán rozdílnou strukturou obou polysacharidů. Kyselina hyaluronová je molekula s vysokou molekulovou hmotností ($1,5 - 2 \times 10^6$ D). Fucogel je jednoduchý sacharidový řetězec, jehož průměrná molekulová hmotnost je 1×10^6 D.

Tři hodiny po aplikaci je však již efekt obou surovin opačný. Po aplikaci Fucogelu činí hydratace pokožky 79 %, zatímco hydratační schopnost kyseliny hyaluronové klesá na 51 % v poměru k situaci před aplikací obou látek.

Hydratační schopnost Fucogelu vzrostla na svou maximální hodnotu v průběhu prvních 3 hodin. Naopak u kyseliny hyaluronové se hydratační schopnosti po celou dobu testu postupně snižovaly. [17, s. 16]

Mechanismu působení Fucogelu na buněčné úrovni se ve své práci věnovali Péterszegi a kol. Autoři práce zjistili, že v závislosti na aplikované dávce, tento polysacharid zvyšuje viabilitu a proliferaci fibroblastů a snižuje cytotoxicitu vyvolanou působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) z askorbátu. [31, s. 194]

5 METODY PRO CHARAKTERIZACI ÚČINNOSTI KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ

5.1 Standardní metody *in vivo*

Hydratace a elasticita pokožky patří k hlavním ukazatelům stavu pokožky. Elasticita kůže je ovlivněna přirozenými vlivy, jako je stárnutí, ale také vnějšími faktory. [32, s. 405] Hydratace pokožky je definována jako obsah vody ve *stratum corneum*. Neporušenou bariérovou funkci pokožky pak určuje měření transepidermální ztráty vody (TEWL). TEWL je definován jako ustálená ztráta vodních par z povrchu kůže, teoreticky s vyloučením aktivity desorpce a potních žláz. TEWL je považován za výsledek pasivní difúze vody z hydratovaných vrstev *dermis* a *epidermis* k povrchové vrstvě *stratum corneum*. Pro měření elasticity, hydratace pokožky a TEWL byla vyvinuta řada neinvazivních technik. [33, s. 859]

5.1.1 Měření elasticity pokožky

Mezi nejpoužívanější instrumentální techniky pro měření elasticity pokožky patří sací testy prováděné sondou cutometru. Zařízení vytváří podtlak, který se může měnit mezi 20 a 500 mbar. Oblast kůže, která má být měřena je v důsledku tohoto podtlaku vtažena do otvoru sondy, což způsobí vertikální deformaci. Hloubka pronikání kůže do sondy je určena bezdotykově pomocí optického měřicího systému. Následně je podtlak vypnut a kůže se vrací do původního tvaru. Měří se schopnost kůže odolávat tlaku a její schopnost vrátit se na výchozí hodnotu. [32, s. 407]

Další možností je stanovení elasticity pomocí Reviscometru. Sonda tohoto přístroje obsahuje dva senzory, z nichž jeden vysílá akustické vlny a druhý je přijímá. Princip činnosti přístroje je založen na měření časového průběhu jedné rezonance akustické vlny, který závisí na hydrataci a elasticitě pokožky. Čas průchodu vlny z vysílače do přijímače je měřitelný parametr. Čím delší je doba potřebná pro průchod akustické vlny kůží, tím větší je naměřená hodnota a nižší elasticita kůže [32, s. 406].

5.1.2 Transepidermální ztráta vody (TEWL)

Měření TEWL se stalo důležitým neinvazivním nástrojem v dermatologii i kosmetologii. Je to metoda, která se často používá ke zkoumání bariérové funkce kůže, k objektivizaci a zpřesnění klinické diagnózy, k vyhodnocování iritačních testů a ke sledování účinků léků a kosmetických přípravků. V současnosti se používají tři druhy měřících přístupů, metoda uzavřené, ventilované a otevřené komůrky. [34, s. 319]

Gradient odpařování vody z povrchu kůže, se měří pomocí sondy umístěné kolmo na měřené místo. Sonda se obvykle skládá z válce se dvěma senzory spojenými se dvěma termistory umístěnými v různých vzdálenostech od povrchu kůže. V obou místech lze tedy měřit teplotu a relativní vlhkost. Rozdíl mezi oběma tlaky par podél gradientu přímo souvisí s rychlostí ztráty vody. [35, s. 844-845]

Difuzní tok se řídí Fickovým zákonem pasivního transportu přes membránu. *SC* vykazuje jistou afinitu k vodě, proto je podoba Fickova zákona (1) korigována koeficientem K_m , kde K_m je rovno 0,06 (2).

$$J = -K_m \cdot D \cdot \frac{\Delta C}{\Delta \delta} \quad (1)$$

Kde:

J difúzní tok vodních par [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$],

ΔC koncentrace vodních par [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$],

$\Delta \delta$ vzdálenost povrchu od senzoru [cm],

D difuzní koeficient [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$].

$$K_m = \frac{\textit{koncentrace vody v rohové vrstvě}}{\textit{koncentrace vody v mezibuněčném prostoru živé epidermis}} \quad (2)$$

5.1.3 Měření hydratace *stratum corneum*

Přístroje pro posouzení hydratace jsou založeny na měření elektrických vlastností pokožky, jako jsou odpor, kapacita, vodivost a impedance. Kapacita a vodivost kůže koreluje a vykazují podobné chování. [33, s. 859]

Korneometrie je metodou, která slouží k přesnému a spolehlivému určení úrovně hydratace povrchu pokožky pomocí měření elektrické kapacity *stratum corneum*. Tato metoda je založena na skutečnosti, že závislost mezi touto elektrickou vlastností *epidermis* a její hydratací je lineární. Čím více vody se v *epidermis* vyskytuje, tím vyšší je její elektrická kapacita (3). [36, s. 478]

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{A}{d} \quad (3)$$

Kde:

ϵ_0 permitivita vakua [F. m⁻¹],

ϵ_r relativní permitivita [F. m⁻¹],

A plocha povrchu destičky kondenzátoru [m²],

d vzdálenost mezi destičkami kondenzátoru [m].

Sonda je měřicí kondenzátor, který se skládá ze dvou kovových desek, které jsou odděleny dielektrickým médiem. Pokud na kondenzátoru působí napětí, pak se na elektrodě objeví přebytek kladného náboje, zatímco druhá elektroda poskytuje nadbytek záporného náboje. V elektrickém poli vzniká střídavé napětí. Elektrické pole proniká do povrchových vrstev *epidermis*. Množství náboje uloženého kondenzátorem odpovídá jeho kapacitě. [35, s. 845]

5.2 Optické a spektroskopické metody

Rychlý vývoj optických a spektroskopických technik umožnil v posledních letech jejich využití k neinvazivnímu hodnocení vlastností kůže. [35, s. 846]

5.2.1 Laserová skenovací mikroskopie (LSM)

Konfokální LSM je novou technikou pro vizualizaci povrchových a podpovrchových detailů v lidské pokožce *in vivo* v reálném čase. Struktura různých vrstev kůže může být hodnocena po topické nebo intrakutánní aplikaci fluorescenčního barviva. [35, s. 846]

Obvyklý postup zahrnuje použití argonového laseru o vlnové délce 488 nm. Měřená plocha pokožky činí 250 x 250 μm a maximální hloubka detekce je 250 μm . Poloha zaostření je ručně nastavitelná, což umožňuje analyzovat kožní vrstvy v různých hloubkách. [37, s. 687]

5.2.2 Optická koherentní tomografie (OCT)

Optická koherentní tomografie je neinvazivní optická zobrazovací technika s vysokým rozlišením, založená na interferenci mezi signálem z vyšetřovaného objektu a referenčním signálem. OCT může v reálném čase vytvářet dvojrozměrný obraz v prostoru. [38, s. 1] Zobrazuje virtuální kožní řezy ve vertikálním směru, které jsou podobné těm, získaným histologií. [37, s. 687]

6 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo představit teoretický přehled o vlivu bioaktivních polysacharidů na pokožku a charakterizovat polysacharidy jako aktivní látky používané v kosmetice. Cílem literární studie rovněž bylo popsat polysacharidy na bázi fukózy.

V praktické části bylo cílem práce připravit modelové formulace kosmetických přípravků se zastoupením vybraných, komerčně dostupných polysacharidů a tyto připravené formulace pak charakterizovat pomocí bioinženýrských metod *in vivo* a sledovat jejich vliv na pokožku. Hlavním cílem praktické části práce bylo stanovit korelaci mezi složením a účinky formulací s obsahem studovaných polysacharidů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 PŘÍPRAVA FORMULACÍ S OBSAHEM POLYSACHARIDŮ

Za účelem studia vlivu komerčně dostupných polysacharidů na pokožku bylo v prvním kroku připraveno sedm originálních formulací krémů s různým obsahem studovaných hydratačních látek (hyaluronátu sodného, Fucogelu) a jejich kombinací. Množství jednotlivých aktivních látek bylo zvoleno v souladu s doporučením výrobců a s hodnotami publikovanými ve vědeckých studiích. Ve druhé fázi testování pak byly použity komerční kosmetické přípravky s obsahem polysacharidů a byl studován jejich dlouhodobý vliv na vlastnosti pokožky.

7.1 Materiály a pomůcky

- Polylaktát sodný (sodium polyacrylate) (dodavatel Krátoška chemin s.r.o.);
- Hyaluronát sodný (Sodium Hyaluronate 0,05 – 0,1 × 10⁶ D) (dodavatel Krátoška chemin s.r.o.);
- Fucogel (Biosaccharide Gum – 1), (dodavatel M + H, Míča a Harašta s.r.o.);
- Opuntia Ficus Indica Stem Extract (dodavatel M + H, Míča a Harašta s.r.o.);
- Euxyl PE 9010 (Pheoxyethanol, Ethylhexylglycerin) (dodavatel ACE Trade spol. s.r.o.);
- Cetylstearylalkohol 50:50 (Cetearyl Alcohol) (dodavatel M + H, Míča a Harašta s.r.o.);
- Shea butter (Butyrospermum Parkii Butter) (dodavatel M + H, Míča a Harašta s.r.o.);
- Včelí vosk bílý (Cera Alba) (dodavatel Včelpo, spol. s.r.o.);
- Tocomix L70–IP/Tocopherol (Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil) (4COS s.r.o.);
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate);
- NaCl (Sodium Chloride);
- Destilovaná voda (Aqua Destilata);
- Multi Skin Test Center MC 750 (Courage + Khazaka electronic GmbH) s korneometrickou sondou a sondou pro měření elasticity);
- Míchadlo hřidelové, VOS40 digital
- pH metr;
- Analytické váhy;

- Běžné laboratorní sklo a pomůcky z plastu;
- Komerčně dostupné kosmetické přípravky: Hyaluronové sérum, Astaxanthin aktivní pleťový krém, Hydratační aktivní krém, Day cream – vital care s $\Omega 6$ (bližší specifikace viz Tab. 6).

7.2 Příprava formulací

Do kádinky byla připravena vodná fáze. V množství uvedených v Tab. 3–10 byly smíchány voda, sodium polyacrylate a hydratační látky (Sodium Hyaluronát, Biosaccharide Gum - 1, Opuntia Ficus Indica Stem Extract,). Směs byla důkladně zhomogenizována, aby se vytvořil gel, který byl poté zahřát na 80 °C.

Do druhé kádinky byla namíchána olejová fáze, jejíž složení bylo následující: Cera Alba, Butyrospermum Parkii Butter a Cetearyl Alcohol. Směs byla rovněž zahřáta na 80 °C, aby došlo k rozpuštění jednotlivých komponent. Po dosažení požadované teploty byl do tukové fáze vmíchán Tocopherol Helianthus Annuus Seed Oil, Ethylhexylglycerin a Phenoxyethanol. Poté byly obě fáze smíchány (olejová fáze se opatrně za stálého míchání spojila s vodnou fází). Vzniklá směs byla důkladně homogenizována. V posledním kroku byla změřena hodnota pH, která byla (podle potřeby) upravena pomocí 80 % kyseliny mléčné na hodnotu pH 5-6.

7.3 Receptury jednotlivých formulací

V následující části práce jsou ve formě tabulek (Tab. 3–10) uvedeny receptury jednotlivých testovaných formulací.

Tab. 2. Složení základu krému bez hydratajících látek (na 100 g krému)

Obchodní název suroviny	INCI	[g]
Voda	Aqua	86,8
Gelinnov Easy	Sodium Polyacrylate	1,5
Euxyl PE 9010	Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	1
Cetylstearylalkohol 50:50	Cetearyl Alcohol	2,5
Shea Butter rafinovaný	Butyrospermum Parkii Butter	5
Včelí vosk bílý	Cera Alba	3
Tocomix L70-IP/Tocopherol	Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	0,2

Tab. 3. Složení krému s obsahem 0,1 a 1 % hyaluronanu sodného (HA), (na 100 g krému)

INCI	HA-0.1 % [g]	HA-1 % [g]
Aqua	86,7	85,8
Sodium Polyacrylate	1,5	1,5
Sodium Hyaluronate	0,1	1
Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	1	1
Cetearyl Alcohol	2,5	2,5
Butyrospermum Parkii Butter	5	5
Cera Alba	3	3
Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	0,2	0,2

Tab. 4. Složení krému s obsahem 5 a 10 % Fucogelu (na 100 g krému)

INCI	Fucogel – 5 % [g]	Fucogel – 10 % [g]
Aqua	81,8	76,8
Sodium Polyacrylate	1,5	1,5
Biosaccharide Gum1	5	10
Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	1	1
Cetearyl Alcohol	2,5	2,5
Butyrospermum Parkii Butter	5	5
Cera Alba	3	3
Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	0,2	0,2

Tab. 5. Složení krému s obsahem HA, Fucogelu a Aquaregulu (na 100 g krému)

INCI	0,1 % HA + 5 % Fucogel (100 g)	0,05 % HA + 10 % Fucogel (100 g)	0,1 % HA + 5 % Fucogel + 2,5 % Aquaregul (100 g)
Aqua	81,7	76,75	79,2
Sodium Polyacrylate	1,5	1,5	1,5
Biosaccharide Gum-1	5	10	5
Sodium Hyaluronate	0,1	0,05	0,1
Opuntia Ficus Indica Stem Extract, Potassium PCA, Aqua	/	/	2,5
Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin	1	1	1
Cetearyl Alcohol	2,5	2,5	2,5
Butyrospermum Parkii Butter	5	5	5
Cera Alba	3	3	3
Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil	0,2	0,2	0,2

7.4 Komerční přípravky s hydratačním efektem

K testování dlouhodobého hydratačního efektu kosmetických přípravků byly vybrány čtyři produkty tuzemských výrobců. Každý z produktů má jiné složení a jejich působení je založeno na odlišné skladbě a koncentraci aktivních látek. Tři produkty obsahují mimo jiné i polysacharidy studované v diplomové práci. Pro srovnání byl dále do testu zařazen jeden přípravek, který neobsahuje polysacharidy, a jeho účinky jsou založeny na obsahu jiných aktivních látek, a to především antioxidantu Astaxanthinu. Ten byl aplikován nejen jako složka krému, ale probandi jej přijímali i jako potravinový doplněk. Přehled použitých přípravků je stručně uveden v Tab. 6 a jejich kompletní složení lze pak nalézt v Příloze III diplomové práce.

7.5 Metodika

V rámci testování hydratačního působení aktivních látek Fucogel a HA byla provedena *in vivo* studie na dobrovolných probandech, u kterých bylo provedeno korneometrické měření hydratační účinnosti a měření elasticity pokožky. Testování bylo rozděleno na dvě části. V první části bylo provedeno měření hydratační účinnosti výše zmíněných aktivních látek Fucogel a HA v čase 1 až 48 hodin po aplikaci přípravků a byl rovněž stanoven jejich vliv na elasticitu pokožky. V druhé části byl pak testován dlouhodobý efekt komerčních kosmetických přípravků s obsahem polysacharidů na hydrataci a elasticitu pokožky.

7.5.1 Působení aktivních látek Fucogel a HA (TEST I)

Před vlastním testováním byla pokožka volární strany předloktí každého z probandů odmaštěna 0,5 % roztokem SDS ve fyziologickém roztoku. K odmaštění byl použit filtrační papír o rozměrech 2 × 4 cm namočený v tomto roztoku. Kousky filtračního papíru byly na volárním zápěstí probandů zafixovány náplastí a ponechány působit po dobu 2 hodin. Po jejich odstranění byla místa na zápěstí označena.

Takto odmaštěná a označená místa byla změřena korneometrickou sondou a sondou pro měření elasticity. Následně byl na každé z těchto míst nanesen jeden ze vzorků testovaných formulací v množství 0,1 ml a rozetřen skleněnou tyčinkou. Následná měření byla prováděna v časech 1, 2, 4, 6, 24 a 48 hodin po nanesení vzorku.

Tab. 6. Přehled komerčních přípravků použitých v DP pro test dlouhodobého efektu

Kosmetický přípravek (Výrobce)	Hlavní aktivní látky (INCI)	Ilustrační foto
<p>Hydratační aktivní krém s vysokým obsahem hydratační bylinné kompozice</p> <p><i>Dr. Jiří Pantůček, TOPVET</i></p>	<p>Aqua, Caprylic/Capric Triglyceride, Prunus Amygdalus Dulcis Oil, Biosaccharide Gum-1, Butyrospermum Parkii Butter, Glycerin, Peg-8 Beeswax, Urea</p>	
<p>Day cream – vital care s $\Omega 6$ Ceramide®, výtažky z Opuncie a vysokomolekulárními kukuřičnými a sójovými cukry</p> <p><i>Biovitality spol. s.r.o.</i></p>	<p>Aqua, Persea Gratissima Oil, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Cetearyl alcohol, Biosaccharide Gum – 1, Opuntia Ficus-Indica Stem Extract, $\Omega 6$ Ceramide®</p>	
<p>Hyaluronové sérum kombinující dvě velikosti molekul kyseliny hyaluronové</p> <p><i>Dr. Jiří Pantůček, TOPVET</i></p>	<p>Biosaccharide Gum-1, Glycerin, Sodium Hyaluronate, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Helichrysum Italicum Extract, Jania Rubens Extract, Allantoin, Butylene Glycol,</p>	
<p>Astaxanthin - aktivní pleťový krém - jeden z nejsilnějších přírodních antioxidantů, hydratuje, regeneruje, tlumí projevy stárnutí</p> <p><i>Dr. Jiří Pantůček, TOPVET</i></p>	<p>Vitis Vinifera Seed Oil, Olea Europea Fruit Oil, Glycerin, Rosa Canina Fruit Oil, Persea Gratissima Oil, Butyrospermum Parkii Butter, Panthenol, Astaxanthin</p>	

7.5.2 Dlouhodobý test komerčních přípravků (TEST II)

V další části diplomové práce byl testován dlouhodobý efekt používání komerčních hydratačních přípravků. Testovala se tři místa na obličeji, a to čelo, pravý a levý spánek. Každý z probandů obdržel k pravidelnému používání pleťovou vodu Avene pro intolerantní pleť a jeden z testovaných přípravků. Probandi používali kosmetické přípravky v souladu s doporučením výrobce denně po dobu 6 týdnů.

Před měřením bylo každé místo očištěno pleťovou vodou Avene a po 20 minutové aklimatizaci byla u každého probanda na daných místech zjištěna hydratace a elasticita pokožky. Měření pak byla opakována po 2, 4 a 6 týdnech pravidelného používání přípravků.

7.6 Metodika měření

7.6.1 Soubor probandů

Soubor probandů pro Test I tvořilo 25 osob ve věku od 18 do 70 let. Nejvíce zastoupené byly věkové skupiny 18–28 let (10 probandů), a 31–45 let (rovněž 10 probandů). Pět probandů pak bylo starších 50 let. Průměrný věk činil 35,6 let a medián 36 let. Mezi probandy bylo 24 žen a 1 muž. Všichni probandi souhlasili s účastí ve studii a před jejím začátkem vyplnili dotazník pro účastníka měření (Příloha I) a podepsali prohlášení účastníka (Příloha II).

Probandi byli požádáni, aby během testu používali k mytí předloktí pouze vodu. Mytí testovaných míst mýdlem by negativně ovlivnilo výsledky testu.

Do Testu II, tedy studia dlouhodobého používání přípravků, bylo zahrnuto 8 probandů, kteří se studie zúčastnili za stejných etických podmínek jako probandi v Testu I. Průměrný věk probandů činil 26,5 let (nejstarší 45 let, nejmladší 18 let). Každý ze čtyř použitých kosmetických přípravků byl tedy testován dvěma probandy.

7.6.2 Vlastní metodika

K měření účinnosti přípravků byl použit přístroj Multi Skin Test Center MC 750. Výrobce je německá firma Courage + Khazaka electronic GmbH. Přístroj je vybaven třemi sondami pro zjišťování vlastností kůže: korneometrickou sondou k měření hydratace, sondou cutometru k měření elasticity a kazetou pro fotometrické stanovení množství seba.



Obr. 8. Multi Skin Test Center MC 750 [39]

Měření hydratace bylo prováděno 11 cm dlouhou korneometrickou sondou s frekvencí 0,99 – 1,2 MHz, na jejímž konci je měřicí ploška. Sonda byla přiložena kolmo na měřenou oblast a lehce přitlačena. Doba měření byla 1 sekunda a výsledek byl vyhodnocen pomocí software Complete Skin Investigation (CSI).

Výsledná hodnota byla zobrazena na stupnici 0–99 korneometrických jednotek [k.j.], kde hodnota <30 označuje velmi suchou, hodnota 30-45 suchou a hodnota >45 normální pokožku. Na každé měřené oblasti bylo odečteno minimálně 5 hodnot, aby byla získána relevantní průměrná hodnota. Mezi měřeními jednotlivých oblastí byla sonda lehce ořena buničinou, aby na ní neulpívaly zbytky vzorků.

Měření elasticity pokožky bylo provedeno sondou o velikosti 13 x 2,4 cm s tlakem sání 400 mbar a otvorem o průměru 2 mm. Doba testu byla 6 sekund (3 sekundy sání / 3 sekundy relaxace). Měření bylo prováděno přiložením sondy kolmo k pokožce a lehkým přitlačením. Měření bylo vždy několikrát zopakováno a výsledek byl vyhodnocen softwarem CSI na stupnici 0–99 %. Elasticita byla stanovena podle Rovnice (4), kde parametr (a) představuje odolnost kůže vůči aplikovanému podtlaku a parametr (b) její schopnost vrátit se do původní polohy.

$$E = \frac{a-b}{a} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

7.6.3 Zpracování dat

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena a zpracována pomocí programu Microsoft Office Excel 2010. Z naměřených hodnot všech probandů byl vypočítán aritmetický průměr $\hat{\mu}$ (5) a směrodatná odchylka σ (6). Pro zhodnocení formulací byl zvolen postup, kdy jejich účinnost v čase byla zhodnocena jako rozdíl jejich působení v daném časovém okamžiku vzhledem k počátečnímu efektu.

$$\hat{\mu} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (5)$$

Kde:

$\hat{\mu}$ aritmetický průměr

N počet měření

x_i hodnota měření

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N (x_i - \hat{\mu})^2} \quad (6)$$

Kde:

$\hat{\sigma}$ směrodatná odchylka

N počet měření

x_i hodnota měření

$\hat{\mu}$ aritmetický průměr

Vyhodnocení naměřených dat, respektive statistické rozdíly v účinnosti testovaných formulací, byly dále zpracovány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Vzhledem ke skutečnosti, že v práci byla prováděna opakovaná měření téhož parametru (elasticita, hydratace) byl použit Tukey test. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$. Výpočty byly provedeny pomocí software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad USA).

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

Statisticky zpracovaná a vyhodnocená data získaná z experimentu byla uspořádána do tabulek a byla vytvořena grafická podoba závislosti hydratace (respektive elasticity) na čase a na koncentraci účinných látek. Ze získaných informací byl zhodnocen vliv jednotlivých formulací, tedy složení krémů na hydrataci a elasticitu testované pokožky. Obdobným způsobem byla zpracována a zhodnocena data z testu dlouhodobého účinku komerčních formulací.

8.1 Výsledky působení aktivních látek Fucogel a HA (TEST I.)

8.1.1 Volba surovin pro formulaci

Pro diplomovou práci byl vytvořen vlastní krémový základ, do kterého byly poté přidány jednotlivé aktivní látky a jejich kombinace. Základ receptury tvoří voda, která po smíchání se polyakrylátem sodným vytvoří gel. Polyakrylát, sodná sůl kyseliny polyakrylové, je gelotvorná látka, která má schopnost absorbovat vodu až do trojnásobku vlastní hmotnosti. Cetearyl alkohol v receptuře působí jako emulgátor, který zajišťuje, aby došlo k dokonalému spojení vodné a olejové fáze. Včelí vosk byl použit pro vylepšení struktury krému, který je potom hutnější, déle ulpívá na pokožce a vytváří ochrannou vrstvu. Butyrospermum parkii (Bambucké máslo) bylo ve formulaci použito jednak pro zlepšení struktury krému a jednak proto, že má zjemňující a vyživující funkci. Tocopherol, phenoxyethanol a ethylhexylglycerin jsou přidány konzervační látky.

8.1.2 Vyhodnocení hydratační účinnosti

Nejprve byl vyhodnocen Test I, tedy hydratační účinnost jednotlivých formulací krémů s obsahem aktivních látek Fucogel a HA, které byly v recepturách obsaženy ve dvou různých koncentracích (viz Tab. 3 a 4).

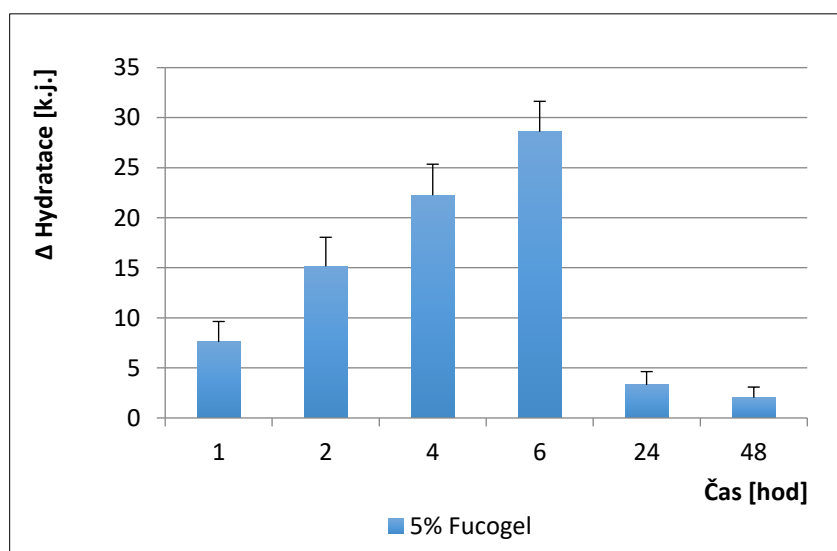
Dále byl hodnocen účinek kombinace těchto aktivních látek, přičemž složení jednotlivých krémů je uvedeno v Tab. 5. Zde byla v jedné z formulací použita i další aktivní látka, Aquaregul. Všechny hodnoty hydratace získané měřením a statistickým vyhodnocením jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7. Hydratační účinnost testovaných formulací krémů vyjádřená jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky)

Formulace	Doba působení [hod]					
	1	2	4	6	24	48
Reference	0,7 ± 0,8	1,4 ± 0,8	1,9 ± 1,0	2,6 ± 1,0	2,0 ± 0,8	2,0 ± 0,6
Fucogel 5 %	7,6 ± 2,0	15,2 ± 2,9	22,3 ± 3,1	28,6 ± 3,0	3,3 ± 1,3	2,0 ± 1,1
Fucogel 10 %	12,4 ± 4,5	20,9 ± 5,2	28,9 ± 6,0	36,6 ± 6,2	3,4 ± 1,8	2,3 ± 1,5
HA 0,1 %	4,5 ± 1,6	5,8 ± 1,2	4,8 ± 1,1	3,6 ± 1,1	2,2 ± 1,0	1,7 ± 1,0
HA 1 %	24,3 ± 5,3	21,1 ± 5,9	16,7 ± 5,4	11,8 ± 4,5	4,0 ± 1,7	2,9 ± 1,8
HA 0,05 %, Fucogel 10 %	13,6 ± 3,6	22,4 ± 3,3	29,0 ± 4,4	36,1 ± 4,0	3,6 ± 1,5	2,7 ± 1,4
HA 0,1 % Fucogel 5 %	9,0 ± 2,5	16,9 ± 4,0	23,7 ± 3,6	29,3 ± 3,0	3,4 ± 1,4	2,3 ± 1,5
HA 0,1%; Fucogel 5 % Aquaregul	10,2 ± 2,5	18,3 ± 2,5	26,0 ± 2,9	32,0 ± 3,8	6,9 ± 4,2	4,8 ± 3,2

8.1.2.1 Krém s obsahem 5 % Fucogelu

Hydratační účinnost této formulace v závislosti na čase je znázorněna na Obr. 9. Hydratace pokožky po použití tohoto krému kulminovala v 6. hodině po aplikaci, kdy se oproti počátečnímu stavu zvýšila o $28,6 \pm 3,1$ [k.j.].



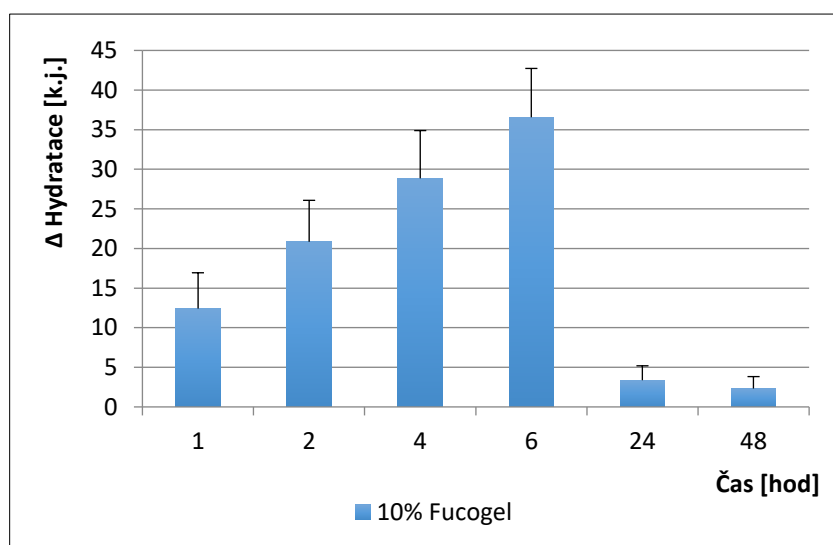
Obr. 9. Závislost hydratačního účinku 5 % Fucogelu na čase

Tento krém vykazoval hydratační účinek po celou dobu testování. Hydratace se od začátku testování zvyšovala postupně a rovnoměrně. Po uplynutí 24 hodin od aplikace krému byl hydratační účinek již pouze nepatrný. Pokud budeme uvažovat absolutní hodnoty hydratace, tak pleť všech probandů dosáhla hydratace pokožky označené jako „normální“ za 2 hodiny po aplikaci krému.

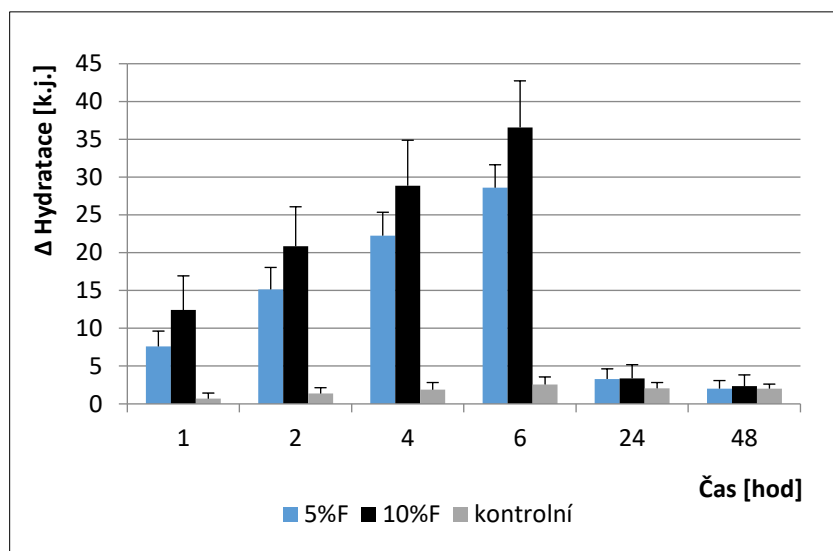
8.1.2.2 Krém s obsahem 10 % Fucogelu

Grafické znázornění závislosti hydratace na čase po aplikaci této testované formulace je na Obr. 10. Průběh hydratačních účinků tohoto krému byl velmi podobný předchozí testované formulaci. Krém znatelně hydratoval a účinek se postupně a rovnoměrně zvyšoval až do jeho maxima v 6. hodině od aplikace. Při maximální hydrataci došlo ke zvýšení o $36,6 \pm 6,2$ [k.j.]. Tato formulace tedy vykazovala nejvyšší míru hydratace ze všech testovaných vzorků a pleť probandů byla normálně hydratovaná již po jejím hodinovém působení.

Ve srovnání s krémem, který obsahoval o 50 % méně této aktivní látky, zvýšení hydratace neodpovídalo navýšenému množství aktivní látky. Oproti formulaci s 5 % Fucogelu došlo ke zvýšení hydratace o ca 8 [k.j.]. Statistické zpracování výsledků však ukázalo, že rozdíly v hydratační účinnosti krémů s 5 a 10 % Fucogelu jsou po 1 – 6 hodinách od aplikace statisticky signifikantní ($P < 0,05$) a účinky obou formulací se vyrovnají po 24 a 48 hodinách působení na pokožku.



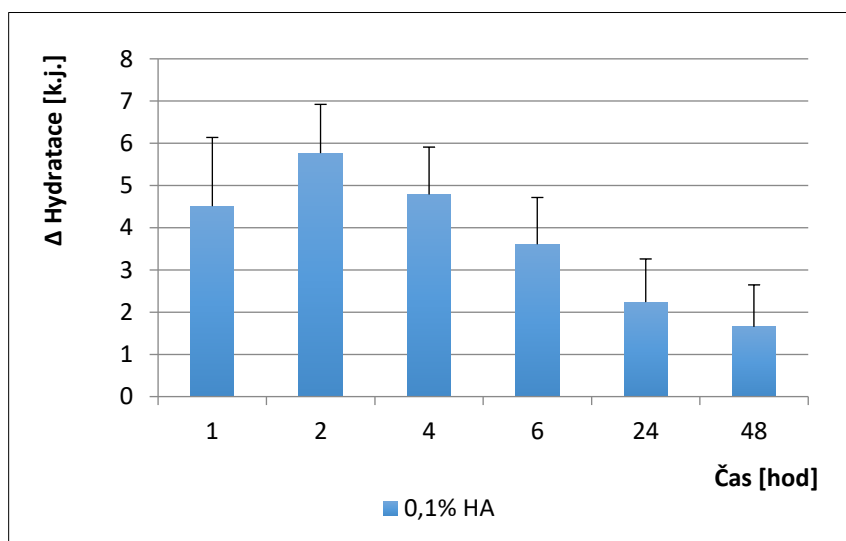
Obr. 10. Závislost hydratačního účinku 10 % Fucogelu na čase



Obr. 11. Srovnání účinků formulací s obsahem 5 a 10 % koncentrace Fucogelu a kontrolního místa, kde nebyl aplikován žádný přípravek

8.1.2.3 Krém s obsahem 0,1 % HA

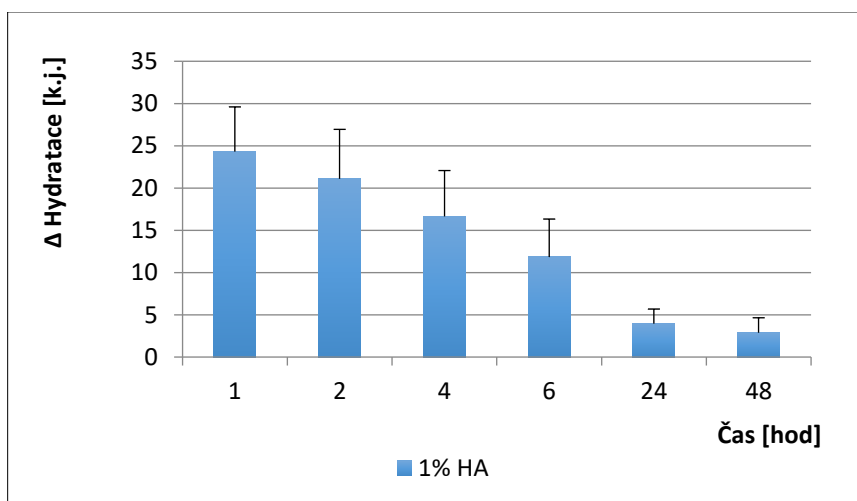
Jak je patrné z Obr. 12, hydratační účinky formulace s 0,1% HA nebyly příliš významné. Maximální naměřené zvýšení hydratačního účinku (po 2 hod) bylo $5,8 \pm 1,2$ [k.j.], což znamenalo přibližně 14 % zvýšení hydratace oproti původním hodnotám. Trend účinku byl rovněž jiný než u formulací s obsahem Fucogelu. HA hydratovala nejvíce na začátku testu. Maxima účinku dosáhla ve 2. hodině po aplikaci krému a v dalších hodinách se již účinek pouze snižoval.



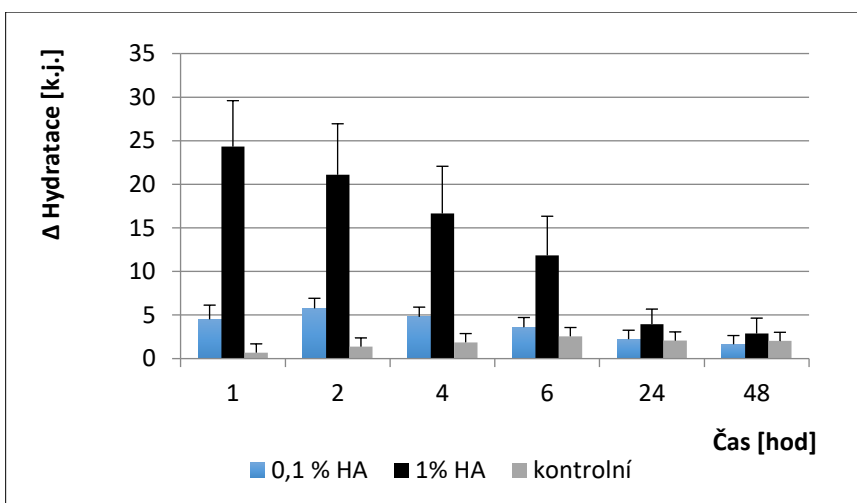
Obr. 12. Závislost hydratačního účinku 0,1 % HA na čase

8.1.2.4 Krém s obsahem 1 % HA

Závislost hydratační účinnosti formulace na čase je znázorněna na Obr. 13. Nástup hydratace se projevil okamžitě po nanesení krému a ihned v 1. hodině bylo dosaženo maxima hydratačního účinku. Toto maximum dosáhlo při 1 % koncentraci HA zvýšení o $24,3 \pm 5,3$ [k.j.], to je přibližně o 60 % oproti počátečnímu stavu. V dalších hodinách testování již účinek krému postupně klesal. Na rozdíl od předchozích formulací byly u tohoto krému zaznamenány mírně zvýšené hodnoty hydratace i po 24 a 48 hodinách od aplikace, avšak ve srovnání s formulací obsahující 0,1 % HA nebyly tyto rozdíly statisticky významné ($P < 0,05$).



Obr. 13. Závislost hydratačního účinku 1 % HA na čase



Obr. 14. Srovnání účinků formulací s různým obsahem HA

8.1.2.5 Srovnání účinků Fucogelu a HA

Zajímavé informace lze získat ze srovnání hydratační účinnosti všech výše uvedených formulací, ze kterého je zřejmé, že při použitých koncentracích aktivních látek, je účinek Fucogelu a HA v čase rozdílný (Obr. 15).

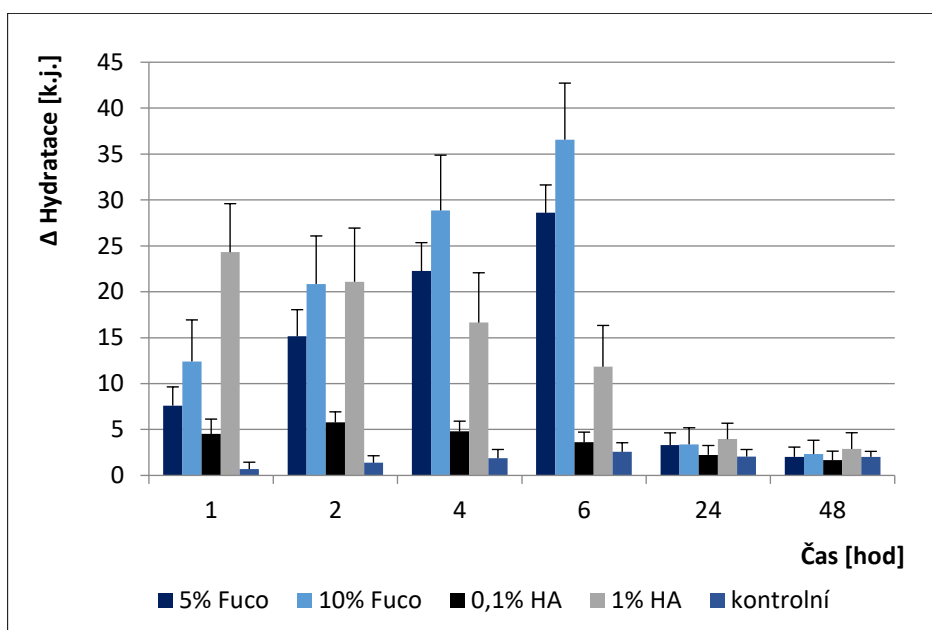
Fucogel je dle výsledků experimentu v konečném důsledku účinnější, ale má významně pomalejší nástup. Hydratační účinnost se plně projeví až v šesté hodině působení. Nástup hydratačního efektu u HA je naopak rychlý. Nejvyššího účinku dosahuje již v první hodině po aplikaci, v dalších hodinách pak již účinek pozvolna klesá. Je zajímavé, že po dvou hodinách působení krémů s 10 % koncentrací Fucogelu a 1 % koncentrací HA je hydratace pokožky zcela srovnatelná.

Výsledky ze studie v této diplomové práci jsou v souladu testy společnosti Solabia [17], pokud se týká doby nástupu a délky trvání účinku. Hodnoty celkového zvýšení hydratace se však mírně liší. V testech společnosti Solabia projevila HA vyšší maximální úroveň hydratace než Fucogel. Fucogel hydratoval méně, ale po delší dobu. Rozdíl mezi výsledky testů v publikaci [17] a této diplomové práci je zřejmě způsoben rozdílnými koncentracemi účinných látek. Testy společnosti Solabia byly prováděny s koncentrací 1 % HA a 1 % Fucogelu. Testy v této diplomové práci byly provedeny s koncentracemi, které se nejčastěji používají ve formulacích komerčních přípravků, a to 1 % HA a 5 % Fucogelu. Dalším důvodem rozdílů mezi výsledky této diplomové práce a uvedenou studií může být rozdílná metodika zpracování dat.

Další zajímavou studií mapující účinky HA je studie uvedená v práci [40], která se zabývá účinností HA s rozdílnou molekulovou hmotností. Výsledky publikované v *Journal of Drugs in Dermatology* ukázaly, že formulace s obsahem 0,1 % HA vedly k významnému zlepšení hydratace a elasticity kůže. Cílem experimentu bylo porovnat účinnost topické aplikace formulací s obsahem kyseliny hyaluronové s různou molekulovou hmotností (50, 130, 300, 800, 2000 kDa). Sedmdesát šest žen mezi 30 a 60 lety bylo požádáno, aby používaly jednu z formulací dvakrát denně na oblast periokulárních vrásek po dobu 60 dnů. Po ukončení testu bylo pozorováno významné zlepšení pleti probandek a měřením drsnosti bylo zjištěno, že došlo k redukci vrásek, a to především po aplikaci nízkomolekulární HA (50 a 130 kDa). To je zřejmě způsobeno lepší schopností nízkomolekulární HA proniknout kůží ve srovnání s HA s vysokou molekulovou hmotností. Avšak i použití HA s vysokou molekulovou hmotností se ukázalo být účinné.

Tato HA je schopná tvořit film na povrchu pokožky, který chrání *stratum corneum* a brání transepidermální ztrátě vody (TEWL). HA s vyšší molekulovou hmotností tak hydratuje vnitřní stranu *epidermis*.

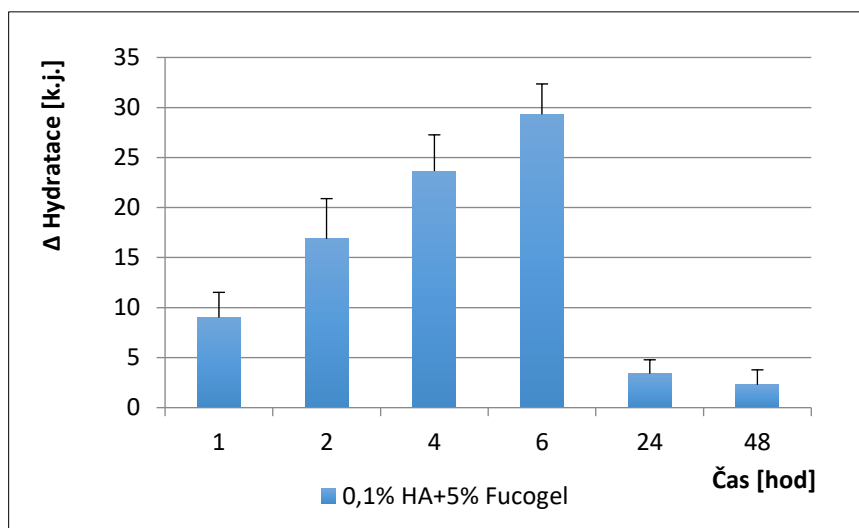
V této diplomové práci byla použita nízkomolekulární HA o molekulové hmotnosti 50-100 kDa. I při krátkodobém testu byl prokázán její nezanedbatelný vliv na zvýšení hydratace pokožky.



Obr. 15. Srovnání účinnosti formulací s obsahem Fucogelu a HA

8.1.2.6 Krém s obsahem kombinace 0,1 % HA a 5 % Fucogelu

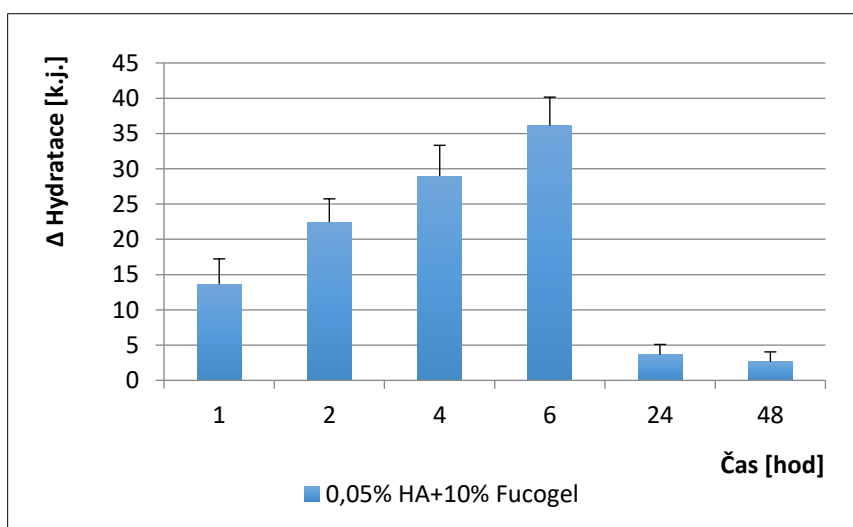
V další části diplomové práce byly testovány kombinace obou aktivních látek s cílem zjistit, jestli jsou schopny synergického působení. Průběh testování účinku formulace na zvýšení hydratace pokožky je znázorněn na Obr. 16. Hydratační účinek krému byl podobný jako u formulace bez HA. Podobná byla rovnoměrně rostoucí tendence v prvních hodinách, i maximum dosažené v 6. hodině po aplikaci, které dosáhlo přibližně stejné hodnoty, a to $29,3 \pm 3$ [k.j.]. Nepatrný rozdíl byl zaznamenán v hodnotách hydratace v prvních hodinách testování, kdy se díky přítomnosti HA projevil o něco rychlejší nástup hydratace, než u formulace bez HA.



Obr. 16. Závislost hydratačního účinku kombinace 0,1% HA a 5 % Fucogelu na čase

8.1.2.7 Krém s obsahem kombinace 0,05 % HA a 10 % Fucogelu

Na Obr. 17 je graficky znázorněn vliv testovaného krému na hydrataci pokožky a její závislost na čase. Z naměřených hodnot je patrné, že i tato formulace má vliv na hydrataci pokožky. Její účinek nastupuje postupně a maximálních naměřených hodnot dosahuje v 6. hodině po aplikaci na pokožku. Tyto maxima dosahují podobných hodnot, jako u formulací bez HA, a to $36,1 \pm 4$ [k.j.]. Ale stejně jako u předchozí formulace jsou mírně vyšší hodnoty v 1. a 2. hodině po nanesení, oproti formulaci bez HA. Je tedy možné se domnívat, že obě aktivní látky působí synergicky a malé množství HA sice nezvýší celkovou míru hydratace, ale urychlí nástup účinku, který má samotný Fucogel obvykle pomalejší.

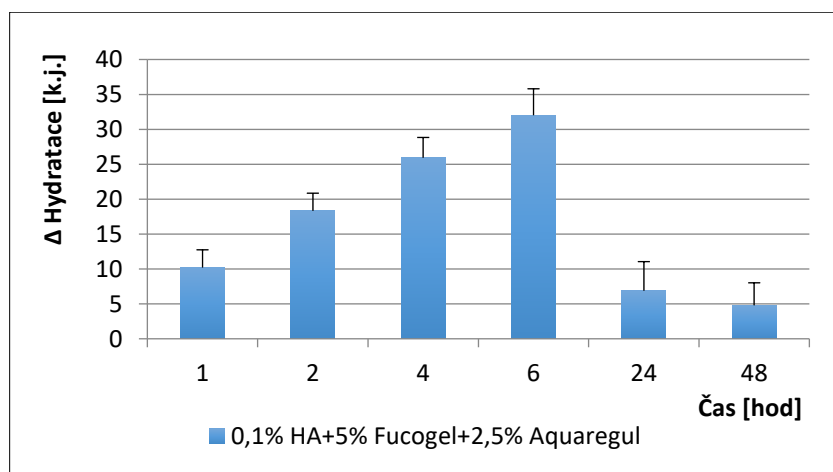


Obr. 17. Závislost hydratačního účinku kombinace 0,05 % HA a 10 % Fucogelu na čase

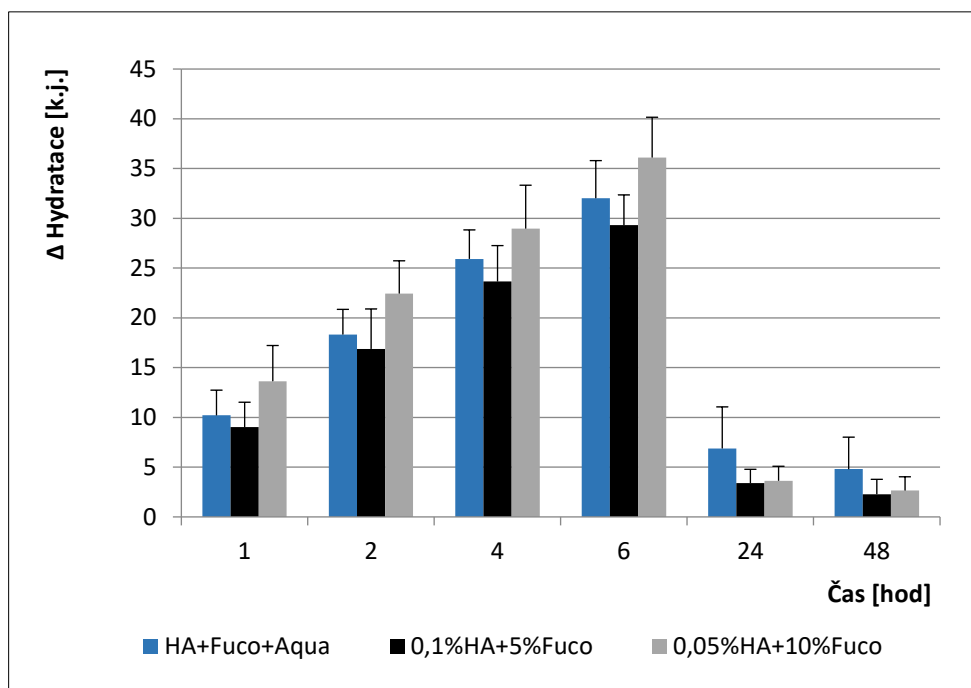
8.1.2.8 Krém s obsahem kombinace 0,1 % HA, 5 % Fucogelu a 2,5 % Aquaregulu

Průběh hydratace pokožky v čase po aplikaci krému, který kromě HA a Fucogelu obsahoval další hydratační složku Aquaregul je znázorněna na Obr. 18. Tato kombinace aktivních látek vykazuje nejefektivnější výsledky při daném množství použitých surovin. Již v 1. hodině po aplikaci krému se hydratace zvýšila o $10,2 \pm 2,5$ [k.j.], pravděpodobně díky společnému působení HA a Aquaregulu. Maximální hodnoty zvýšení hydratace o $32,0 \pm 3,8$ [k.j.] bylo díky podílu Fucogelu dosaženo opět v 6. hodině testu. Největší rozdíl mezi formulací s Aquaregulem a všemi ostatními recepturami byl dlouhodobý hydratační efekt, který se projevil po 24 a 48 hodinách od nanesení krému. Hodnota zvýšení hydratace po 24 a 48 hodinách byla oproti ostatním formulacím přibližně dvojnásobná, přičemž po 24 hodinách byl tento rozdíl signifikantní ($P < 0,05$).

Účinností samotného Aquaregulu, respektive extraktu z *Opuntia ficus-indica* se zabývala studie Damasceno et al. [41] Test byl proveden na 12 probandech, kterým byly na pokožku naneseny studované formulace a jejich účinnost byla stanovena po 1, 2, 3 a 5 hodinách od aplikace. Výsledky testu prokázaly, že formulace s obsahem 3 % extraktu z opuncie zvýšila hydrataci kůže po pěti hodinách ve srovnání s vehikulem o 7,25 %. Přípravky obsahující 1 a 3 % extraktu zlepšily bariérovou funkci kůže snížením TEWL o 6,84 % a 14,66 % až na čtyři hodiny po aplikaci ve srovnání s neošetřenou kontrolní oblastí, vehikulem a dalšími formulacemi. Emulze se obsahem 3 % extraktu tedy vykazovala jak hydratační vlastnosti, tak redukci TEWL a tím i nejlepší celkový účinek.



Obr. 18. Závislost hydratačního účinku kombinace 0,1 % HA, 5 % Fucogelu a 2,5 % Aquaregulu



Obr. 19. Srovnání účinku formulací s kombinacemi Fucogelu, HA a Aquaregulu

Všechny testované polysacharidy měly prokazatelný vliv na zvýšení hydratace pokožky. V průběhu několika hodin po aplikaci všech formulací se hydratace viditelně zvýšila. HA prokázala rychlejší nástup účinku, ale kratší dobu působení, zatímco efekt Fucogelu byl pomalejší, ale účinkoval déle. Po uplynutí 24, resp. 48 hodin se hodnoty hydratace vrátily v podstatě k počátečním hodnotám. Mírně zvýšený efekt hydratace, který byl viditelný i po 24-48 hodinách od aplikace, byl zaznamenán pouze u formulace s Aquaregulem.

8.1.3 Vyhodnocení vlivu testovaných formulací krémů na elasticitu pokožky

V dalším kroku byl testován vliv jednotlivých formulací na elasticitu pokožky v průběhu 48 hodin po aplikaci krémů. Obdobně jako v případě hydratace byla i v tomto případě naměřená data statisticky vyhodnocena a výsledky jsou uvedeny v Tab. 8.

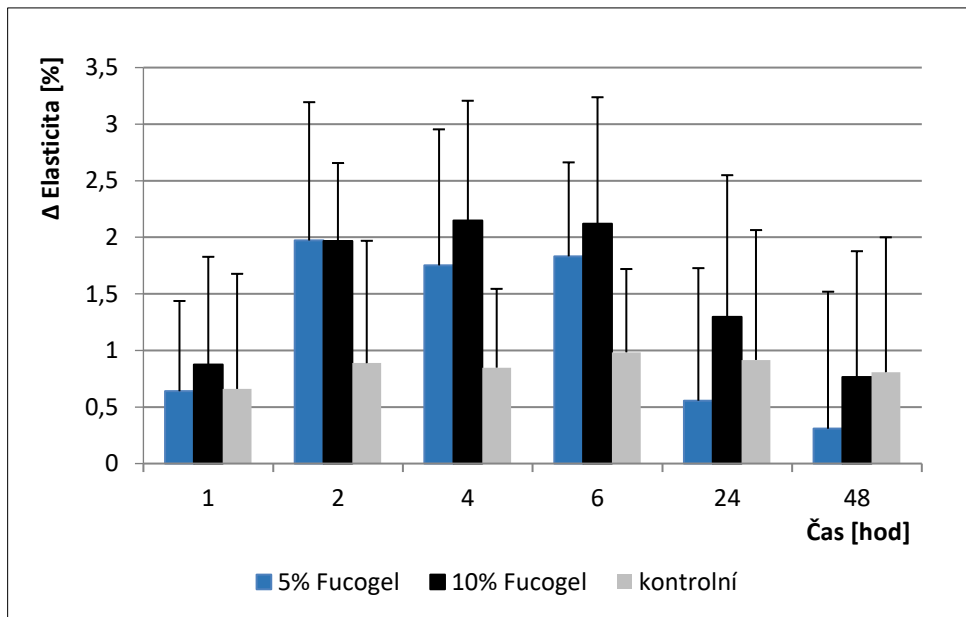
Tab. 8. Vliv testovaných formulací na elasticitu pokožky, vyjádřený jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky)

Formulace	Doba působení [hod]					
	1	2	4	6	24	48
Reference	0,7 ± 1	0,9 ± 1,1	0,8 ± 0,7	1 ± 0,7	0,9 ± 1,1	0,8 ± 1,2
Fucogel 5 %	0,6 ± 0,8	2,0 ± 1,2	1,8 ± 1,2	1,8 ± 0,8	0,6 ± 1,2	0,3 ± 1,2
Fucogel 10 %	0,9 ± 1,0	2,0 ± 0,7	2,1 ± 1,1	2,1 ± 1,1	1,3 ± 1,3	0,8 ± 1,1
HA 0,1 %	0,8 ± 0,8	1,7 ± 0,8	1,9 ± 0,8	1,7 ± 1,1	0,9 ± 1,1	0,4 ± 1,0
HA 1 %	0,7 ± 0,5	1,4 ± 0,9	2,2 ± 1,1	2,5 ± 1,0	1,1 ± 1,4	0,5 ± 1,2
HA 0,05%, Fucogel 10 %	0,3 ± 0,7	0,8 ± 0,9	0,7 ± 0,9	0,8 ± 0,9	0,7 ± 1,1	0,3 ± 0,8
HA 0,1 %, Fucogel 5 %	0,3 ± 0,9	0,7 ± 0,7	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,8	0,6 ± 0,9	0,2 ± 1,0
HA 0,1%, Fucogel 5 %, Aquaregul	0,5 ± 0,7	1,2 ± 1,2	1,9 ± 1,0	1,3 ± 1,4	0,7 ± 1,7	0,3 ± 1,5

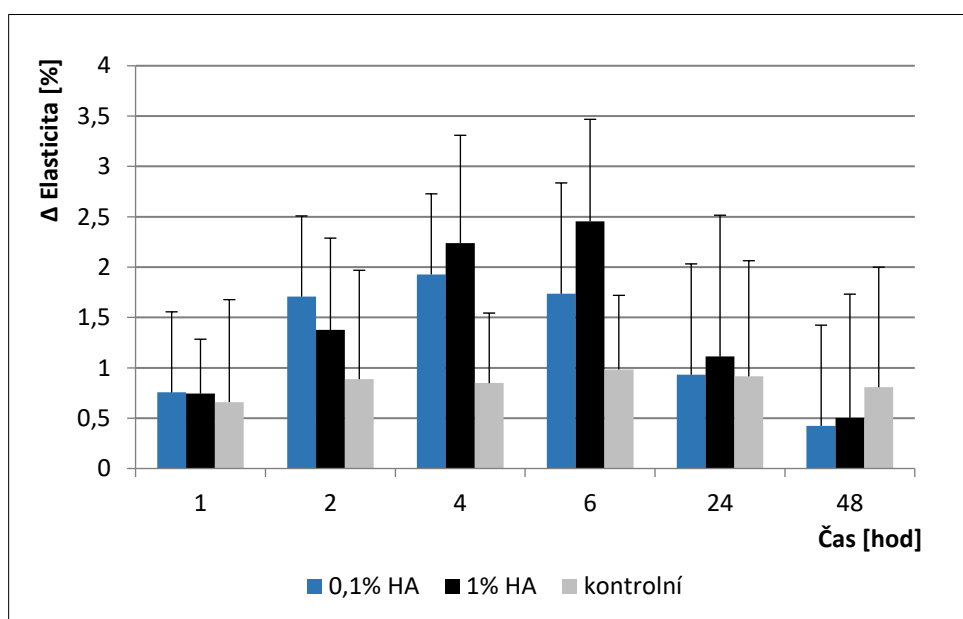
Na rozdíl od hydratace se vliv všech testovaných formulací na elasticitu v krátkodobém horizontu 48 hodin jevil jako zanedbatelný. Všechny formulace vykazovaly jistý vliv na zvýšení elasticity převážně v prvních šesti hodinách od aplikace. Zjištěné zvýšení elasticity však leželo pouze v rozmezí od 0,3 do 2,5 % oproti počátečním hodnotám (Obr. 20, 21). Nejvyšších hodnot 2,5 % dosahovala formulace s obsahem 1 % HA. V tomto ohledu lze konstatovat, že tato jednorázová a krátkodobá aplikace HA výrazně elasticitu pokožky neovlivnila. Statistické zpracování dat prokázalo, že žádná z uvedených formulací neměla na elasticitu signifikantní vliv. Tento závěr platí rovněž pro kombinace hydratačních látek.

Obdobnou problematikou se ve své práci [42] zabývali Farwick et al., kteří však sledovali působení HA v delším časovém období. Placebem kontrolovaná osmitýdenní *in vivo* studie, zveřejněná v SOFW Journal, byla provedena na 12 ženách ve věku 30-60 let. Testována byla HA o třech různých molekulárních hmotnostech (50, 300 a 800 kDa) v koncentraci 0,1 % zapracovaná do krému. Výsledky studie (která zahrnovala i řadu testů na buňkách) jasně ukázaly, že HA má nejen příznivý vliv na kůži, ale její účinky mohou být regulovány i změnou velikosti molekuly. Bylo zjištěno, že nízkomolekulární HA

vykazuje lepší penetrační schopnosti, než větší velikosti HA klubek, a tedy i vliv na expresi řady genů, včetně těch, které přispívají diferenciaci keratinocytů a formování těsných mezibuněčných komplexů, které bývají věkem a vlivem UV záření redukovány. Rozdílné molekulární hmotnosti HA se lišily rovněž v *in vivo* účincích. Vysokomolekulární HA prokázala silný vliv na zvýšení elasticity a hydratace pokožky, zatímco nízkomolekulární HA prokázala výraznou redukci vrásek.



Obr. 20. Vliv formulací s Fucogelem na elasticitu pokožky



Obr. 21. Vliv formulací s HA na elasticitu pokožky

8.2 Výsledky dlouhodobého testu komerčních přípravků (TEST II.)

Hydratační složky použité ve výše uvedeném krátkodobém testu jsou rovněž složkami mnoha běžně dostupných kosmetických přípravků. Z řady formulací byly zvoleny čtyři krémy, jejichž nejdůležitější aktivní látky jsou uvedeny v Tab. 6. Studie účinnosti těchto komerčních přípravků vykazala, že při dlouhodobém používání (6 týdnů) mají tyto krémy nezanedbatelný vliv jak na zvýšení hydratace, tak elasticity pokožky. Mezi jednotlivými přípravky však byly při měření zjištěny značné rozdíly v jejich působení. Ze získaných dat byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka, které byly zpracovány do Tab. 9. Graficky je pak vliv studovaných krémů na hydrataci a elasticitu pokožky znázorněn na Obr. 22 a 23.

Tab. 9. Účinek komerčních přípravků na hydrataci a elasticitu pokožky vyjádřený jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky)

Přípravek	Hydratace [k.j.]			Elasticita [%]		
	Doba aplikace [týdny]					
	2	4	6	2	4	6
Hyaluronové sérum (HA, Fucogel)	12,9 ± 0,9	22,0 ± 1,0	27,2 ± 1,2	2,4 ± 0,3	4,5 ± 0,3	8,6 ± 0,5
Hydratační krém (Fucogel)	9,4 ± 0,6	15,6 ± 0,5	20,9 ± 0,4	1,5 ± 0,8	3,4 ± 0,7	8,0 ± 0,6
Biovitální (Fucogel, Aquaregul)	5,9 ± 0,6	11,0 ± 0,6	16,2 ± 0,7	3,6 ± 0,4	7,6 ± 0,5	12,4 ± 0,7
Astaxantin krém (Astaxantin)	3,6 ± 0,7	5,8 ± 0,8	7,7 ± 0,9	11,5 ± 0,3	20,0 ± 0,5	27,1 ± 0,6

8.2.1 Hyaluronové sérum

Sérum obsahuje vysoké množství obou testovaných polysacharidů, Fucogelu i HA. V originální formulaci tohoto přípravku je zpracována HA se dvěma velikostmi molekuly, tedy se dvěma molekulovými hmotnostmi (50–100 kDa a 800–1500 kDa). Důvodem použití těchto dvou typů HA je snaha ovlivnit hydrataci v různých vrstvách pokožky, která souvisí s hloubkou průniku daných molekul. Tato problematika je již diskutována v souvislosti s krátkodobým testem hydratačních látek (kap. 8.1.2.5). Ze všech testovaných

přípravků vykazalo sérum v dlouhodobém horizontu nejlepší výsledky ve zvýšení hydratace pokožky. Hydratace se zvyšovala v průběhu prvních čtyř týdnů rovnoměrně. V posledních dvou týdnech se zvyšování viditelně zpomalilo, ale přesto celkový nárůst hydratace pokožky, při pravidelném používání séra, dosáhl zvýšení o $27,2 \pm 1,2$ [k.j.]. Toto zvýšení činilo přibližně 35 % oproti počátečnímu stavu. Při srovnání s výsledky krátkodobého testu, kdy bylo použito 1 % HA ve formulaci je zřejmé, že dlouhodobá aplikace HA hydratuje pokožku obdobným způsobem. Statistické zpracování dat rovněž prokázalo, že tento přípravek působil po celou dobu signifikantně lepší ($P < 0,05$) hydrataci pleti ve srovnání se všemi dalšími testovanými produkty.

Na rozdíl od hydratace, elasticita pokožky po použití séra rostla rovnoměrně po celou dobu testování. Nejvyšší nárůst hodnot byl zaznamenán v posledních 14 dnech testu. Celkové zvýšení elasticity po pravidelném používání séra bylo asi 9 %. Z těchto výsledků lze tedy vyvodit závěr, že zlepšení elasticity pokožky je primárně způsobeno její výrazně lepší hydratací.

8.2.2 Hydratační krém

Krém obsahuje kromě testovaného Fucogelu i další hydratační složky, jako je mandlový olej, glycerin a ureu.

V průběhu testu vykazoval krém dobré hydratační účinky. Nejvyšší nárůst hydratace se projevil již po 2 týdnech používání. V dalších 4 týdnech se hydratace nadále zvyšovala, ale tempo zvyšování se stále mírně zpomalovalo. Po šesti týdnech používání krému bylo naměřeno zvýšení hydratace o $20,9 \pm 0,4$ [k.j.], což činí asi 29 % oproti stavu na počátku testování.

Používání hydratačního aktivního krému mělo prokazatelný vliv i na zvýšení elasticity pokožky, ale toto zvýšení bylo nejmenší, ze všech námi testovaných přípravků. Celkové zvýšení elasticity po 6 týdnech testování dosáhlo přibližně 8 %. Z počátku testu bylo zvyšování elasticity nevýrazné, ale v posledních 2 týdnech testu došlo k významnějšímu zlepšení. Zde lze učinit obdobné závěry jako v případě Hyaluronového séra, a to že zlepšení elasticity pokožky je způsobeno její lepší hydratací.

8.2.3 Biovitality Day cream – Vital care s $\Omega 6$

Další krém zařazený do studie obsahuje nejen testovaný polysacharid Fucogel, ale i jiné aktivní hydratační látky, jako avokádový olej, jojobový olej a Aquaregul, rovněž použitý v krátkodobém testu. Déle pak obsahuje aktivní látku Omega6 Ceramid® (fy Solabia), což je biomimetická kyselina linolová, stabilizovaná do struktury podobné ceramidu. Získává se enzymatickým procesem ze světlicového, bavlníkového nebo pupalkového oleje. Vykazuje restrukturalizaci (zvýšení soudržnosti korneocytů) a protizánětlivé aktivity potřebné k zachování integrity pleti. Má proto schopnost chránit kožní integritu a snižovat záněty kůže. [43]

Jako u jediného přípravku se během testovací doby neprojevyly žádné výkyvy v míře účinnosti. Jak u měření hydratace, tak elasticity se účinky v průběhu celých šesti týdnů projevovaly postupně a rovnoměrně. Po uplynutí testovacího období byly naměřeny výsledné hodnoty zvýšení hydratace o $16,2 \pm 0,7$ [k.j.], tedy asi o 23 % ve srovnání s počátečním stavem pokožky, a zvýšení elasticity přibližně o 12 %.

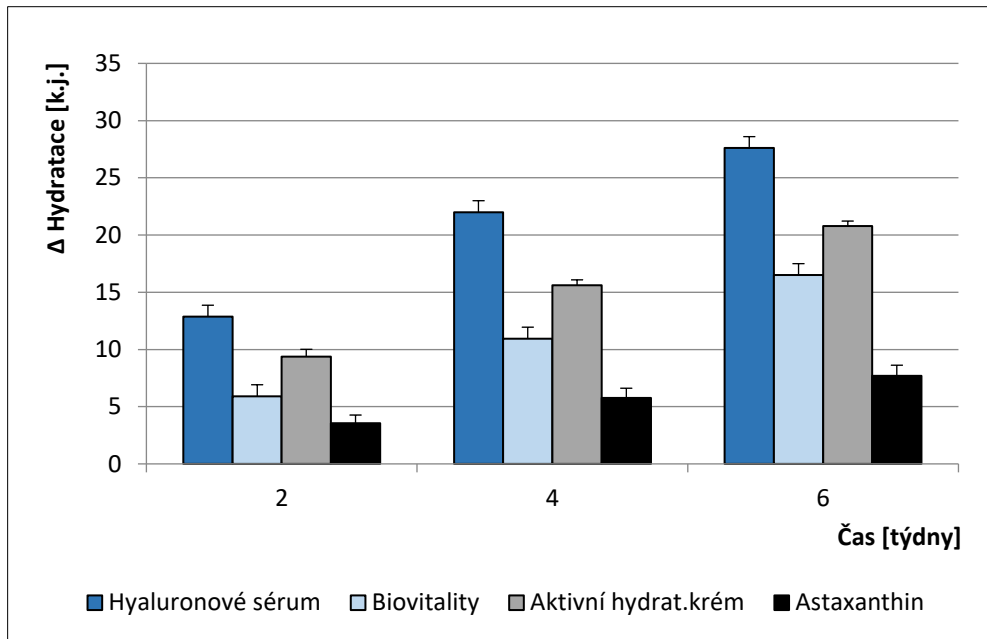
Krém hydratoval méně než ostatní hydratační přípravky obsahující Fucogel, ale měl z nich největší vliv na zlepšení elasticity pleti, což lze přičítat právě přítomnosti Omega6 Ceramidu.

8.2.4 Astaxanthin aktivní plet'ový krém

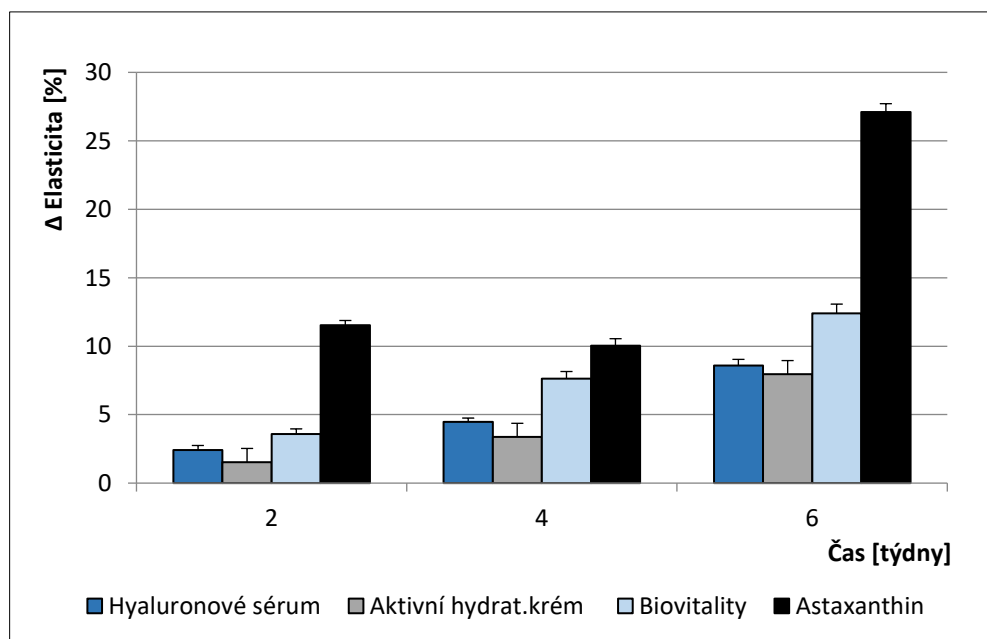
Tento krém je, co se týká složení, výjimkou v řadě přípravků testovaných v této diplomové práci, jelikož neobsahuje testované polysacharidy. Hydratační účinek aktivního krému je založen na obsahu rostlinných olejů, a to hroznového, olivového, šípkového a avokádového oleje. Důležitou aktivní látkou v receptuře je Astaxanthin, který je v současné době jedním z nejsilnějších známých antioxidantů a má pozitivní vliv na elasticitu pokožky a redukci vrásek. Astaxanthin (karotenoid), je sekundární metabolit přirozeně syntetizovaný řadou bakterií, mikrořas a kvasinek. Komerční produkce tohoto karotenoidu byla tradičně prováděna chemickou syntézou, ale nejslibnějším zdrojem pro jeho průmyslovou biotechnologickou výrobu je sladkovodní řasa *Haematococcus pluvialis*, která ho produkuje jako ochranu před UV zářením. K jeho významným vlastnostem dále patří např. protizánětlivé a fotoprotektivní vlastnosti.

Během šestitýdenního testování tohoto krému došlo sice k viditelnému zvýšení hydratace pokožky, které však nebylo velké. Přibližně se jednalo o 8 [k.j.], což znamená zvýšení o ca

15 % oproti počátečnímu stavu. Nejvyšší efekt ve zvýšení hydratace byl zaznamenán po 2 týdnech používání. V dalších týdnech testu se hydratace dále zvyšovala, ale již pomalejším tempem. Je tedy zřejmé, že tento krém není primárně určen pro zvýšení hydratace pokožky.



Obr. 22. Vliv dlouhodobého působení komerčních přípravků obsahujících studované aktivní látky na hydrataci pokožky



Obr. 23. Vliv dlouhodobého působení komerčních přípravků na elasticitu pokožky

Na druhou stranu, výsledky testu elasticity ukázaly výrazně pozitivní působení tohoto krému na stav pokožky. Elasticita se na všech měřených místech zvyšovala po celou dobu testu, ale tempo růstu se s dobou aplikace přípravku zpomalovalo. Přesto tento krém vykázal ze všech testovaných přípravků největší vliv na zvýšení elasticity pleti. Zlepšení elasticity bylo oproti všem ostatním testovaným přípravkům signifikantní. Celkové zvýšení elasticity po šesti týdnech používání dosáhlo přibližně 27 %. Tento výsledek byl pravděpodobně ovlivněn nejen používáním krému s Astaxanthinem, ale i skutečností, že probandky po celou dobu testu užívaly denně 4 mg Astaxanthinu vnitřně, ve formě tobolek. Podle studie uvedené v publikaci [40] je kombinace vnitřního a lokálního užívání Astaxanthinu významně účinnější pro zlepšení stavu pokožky než samotná vnější aplikace. Astaxanthin zlepšuje stav *dermis* pomocí regenerace kolagenových vláken. Příznivý vliv Astaxanthinu na pokožku byl dokumentován i dalšími, aktuálními odbornými studiemi [44], [45]

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá vlivem polysacharidů na pokožku, její hydrataci a elasticitu. Testovány byly dva polysacharidy, kyselina hyaluronová a Fucogel, které jsou v kosmetických přípravcích používány především jako hydratační složky. Pro experiment bylo připraveno sedm vzorků krémů s různými koncentracemi účinných látek a jejich kombinací. V jedné z formulací byla použita i další hydratační složka, extrakt z *Opuntia ficus indica* s komerčním názvem Aquaregul. Experiment byl prováděn na skupině dobrovolných probandů v průběhu 48 hodin. Úroveň hydratace byla měřena korneometrickou sondou a úroveň elasticity sondou cutometru.

Všechny testované formulace měly prokazatelný vliv na zvýšení hydratace pokožky, působení obou účinných látek bylo ale odlišné. Zatímco účinek HA nastupoval téměř okamžitě po aplikaci a následně se již po celou dobu testu snižoval, Fucogel hydratoval pomaleji, maximálního účinku dosahoval přibližně v šesté hodině od aplikace, ale celkové zvýšení hydratace dosahovalo vyšších hodnot. Nejvyšší vliv na zvýšení hydratace byl naměřen u formulace s obsahem 10 % Fucogelu a to o ca 37 [k.j.]. Příznivé účinky spočívající v synergickém efektu obou polysacharidů se projevily u kombinace HA a Fucogelu, kdy HA urychlila nástup účinku krému a Fucogel prodloužil dobu jeho působení.

Na elasticitu pokožky neměly testované formulace při jednorázovém, krátkodobém použití zásadní vliv. Projevila se pouze mírná tendence zvýšení elasticity v prvních hodinách po aplikaci přípravků. Maximální zvýšení elasticity bylo naměřeno u formulace s obsahem 1 % HA, a to pouze o 2,5 %.

V druhé části práce byly testovány komerčně dostupné přípravky – Hydratační aktivní krém, Biovitality Vital care, Hyaluronové sérum a Astaxanthin aktivní krém. Experiment byl opět prováděn na skupině dobrovolníků, a to po dobu 6 týdnů.

Všechny testované přípravky prokázaly výrazný vliv jak na zlepšení hydratace, tak na zvýšení elasticity pokožky. Nejlepší hydratační účinek byl zaznamenán u Hyaluronového séra, které obsahuje vysoké koncentrace jak HA, tak Fucogelu.

Významné byly i výsledky měření elasticity pokožky. Na rozdíl od krátkodobého testu byl účinek přípravků, při pravidelném používání po dobu 6 týdnů, prokazatelný. Z přípravků obsahujících testované polysacharidy, projevil nejvýraznější vliv na zvýšení elasticity

Biovitality Vital care obsahující Fucogel a Aquaregul, po jehož používání se elasticita se zvýšila o 12,5 % oproti počátečnímu stavu.

Ze všech testovaných přípravků měl na zvýšení elasticity nejlepší vliv Astaxanthin aktivní krém, který ale neobsahuje testované polysacharidy. Celkové zvýšení elasticity pokožky po používání krému s Astaxanthinem činilo 27 % oproti počátečnímu stavu a bylo umocněno i vnitřním užíváním Astaxanthinu ve formě tobolek.

Z experimentů provedených v diplomové práci jasně vyplývá, že polysacharidy působí aktivně především proti ztrátě hydratace. Zvýšení množství vody v pokožce způsobené jejich aktivitou se následně odráží i na elasticitě pokožky.

Je evidentní, že používání kosmetických přípravků má na stav pokožky nezanedbatelný vliv a při pravidelném používání prokazatelně působí jako prevence proti stárnutí pokožky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MOJUMDAR, Enamul Haque, Quoc Dat PHAM a Daniel TOPGAARD. Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific reports*. 2017, , 1-13.
- [2] CHALUPOVÁ, Zuzana a Ruta MASTEIKOVÁ. Hydratace kůže a kosmetické prostředky. *Praktické lékařství*. 2006, **4**, 191-194.
- [3] VERDIER-SÉVRAIN, Sylvie a Frédéric BONTÉ. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*. Blackwell Publishing, 2007, **6**, 75-82.
- [4] VETCHÝ, David. DMS (Derma Membrane Structure) technologie a její pozitivní vliv na hydrataci kůže. *Dermatologie pro praxi*. 2013, **7(2)**, 69-72.
- [5] FEŘTEKOVÁ, Vlasta. *Kosmetika v teorii a v praxi*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. ISBN isbn-80-7345-046-1.
- [6] *Transepidermal water loss* [online]. In: . SKINETRATE PTE LTD, 2018 [cit. 2018-10-16].
- [7] PURNAMAWATI, Schandra, Niken INDRAMASTUTI, Retno DANARTI a Tatan SAEFUDIN. The Role of Moisturizers in Addressing Various Kinds of Dermatitis: A Review. *Clinical Medicine* [online]. 2017, **15(34)**, 75-87 [cit. 2018-10-17]. ISSN 15394182.
- [8] LEYDEN, James J a Anthony V RAWLINGS. *Skin moisturization*. New York: Marcel Dekker, 2002. Cosmetic science and technology series, v. 25. ISBN isbn08-247-0643-9.
- [9] SETHI, Anisha, Tejinder KAUR, SK MALHOTRA a GAMBHIR. Moisturizers: The Slippery Road. *Indian Journal of Dermatology*. 2016, **61**, 279-285.
- [10] DRAHOTUSKÁ, Zdeňka. Postavení emoliencií v současné léčbě atopické dermatitidy. *Dermatologie pro praxi*. 2017, **11(3)**, 120-125.
- [11] YU, Yue, Mingyue SHEN, Qianqian SONG a Jianhua XIE. Biological activities and

- pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **183**, 91-101 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717314066>
- [12] LIU, Jun, Stefan WILLFÖR a Chunlin XU. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* [online]. 2015, **5**(1), 31-61 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1016/j.bcdf.2014.12.001. ISSN 22126198. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212619814000564>
- [13] Celuloza (polysacharid). In: *ELUC* [online]. Olomoucký kraj, b.r. [cit. 2018-11-13]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2540>
- [14] AUGUSTINE, Robin, Rajakumari RAJENDRAN, Uroš CVELBAR, Miran MOZETIČ a Anne GEORGE. Biopolymers for Health, Food, and Cosmetic Applications. *Handbook of Biopolymer: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2013, , 801-810.
- [15] FREITAS, Filomena, Vítor D. ALVES, Maria A. REIS, João G. CRESPO a Isabel M. COELHO. Microbial polysaccharide-based membranes: Current and future applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2014, **131**(6), - [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1002/app.40047. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.40047>
- [16] GUETTA, O., K. MAZEAU, R. AUZELY, M. MILAS a M. RINAUDO. Structure and Properties of a Bacterial Polysaccharide Named Fucogel. *American Chemical Society: Biomacromolecules*. 2003, (4), 1362-1372.
- [17] SOLABIA GROUP, . *Multi-sensory moisturiser Fucogel*. France, 2006. Dostupné také z: www.solabia.com
- [18] SAKKA, Medhi, Raphael LESCHIERA a Christelle LE GALL-LANOTTO. A new tool to test active ingredient using lactic acid in vitro, a help to understand cellular mechanism involved in stinging test: An example using a bacterial polysaccharide (Fucogel®). *Experimental Dermatology*. 2018, (27), 238-244. DOI: <https://doi.org/10.1111/exd.13489>.

- [19] MORYA, V.K., Jungeun KIM a Eun-Ki KIM. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *National Research Lab of Bioactive Materials*. 2012, (93), 71-82. DOI: DOI 10.1007/s00253-011-3666-8.
- [20] OLEJNÍK, Anna, Joanna GOŚCIAŃSKA a Izabela NOWAK. *Chemik* 2012 66, 2. *Chemik*. Poznaň, 2012, **66**(2), 129-135.
- [21] SLÍVA, J. a J. MINÁRIK. Hyaluronát - nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, **1**(2), 75-79.
- [22] PAVICIC, Tatajana, Gerd GAUGLITZ, Peter LERSCH, Khadija SCHWACH-ABDELLAOUI, Brigitte MALLE, Hans Christian KORTING a Mike FARWICK. Efficacy of Cream-Based Novel Formulations of Hyaluronic Acid of Different Molecular Weights in Anti-Wrinkle Treatment. *Journal of drugs in dermatology*. 2011, **10**(9), 990-1000.
- [23] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství: Hyaluronan - biopolymer for tissue engineering : teze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2012. ISBN 978-80-214-4420-1.
- [24] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLAR. Kyselina hyaluronová (hyaluronan): přehled. *Veterinární medicína*. 2008, **53**(8), 397-411.
- [25] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLÁŘ. Kyselina hyaluronová (hyaluronan): přehled. *Veterinární medicína*. 2008, **53**(8), 397-411.
- [26] LAURENT, T.C. a E.A. BALAZS. Structure of hyaluronic acid. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix 2*. Academic Press, 1970, , 703-732.
- [27] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Petr CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical reviews*. 1998, **98**(8), 2664-2681.
- [28] LAPČÍK, Lubomír Jr., M. BOHDANECKÝ a L. LAPČÍK. Kyselina hyaluronová - příprava, struktura, vlastnosti, aplikace. *Chemické listy*. 1991, **85**(3), 281-299.
- [29] HASCLL, Vincent. Hyaluronan: Structure and Physical properties. *Glycoforum* [online]. 2013 [cit. 2018-10-12]. Dostupné z:

- <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [30] SOLABIA GROUP, . *Aquaregul-K®*. France, b.r. Dostupné také z:
http://www.solabia.com/Produto_26,1/Cosmetics/Aquaregul-K.html
- [31] PÉTERSZEGI, G., N. ISNARD, A.M. ROBERT a L. ROBERT. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003, **57**(5-6), 187-94.
- [32] NETO, Patrícia, Marta FERREIRA, Fernanda BAHIA a Paulo COSTA. Improvement of the methods for skin mechanical properties evaluation through correlation between different techniques and factor analysis. *Skin Research and Technology*. 2013, **19**, 405-416.
- [33] MOHAMAD, M., A.R. MSABBRI a M.Z. MATJAFRI. Non Invasive Measurement of Skin Hydration and Transepidermal Water Loss in Normal Skin. *Science & Engineering Research*. 2012, (3-4), 859-862.
- [34] RESL, V., M. LEBA a I. RAMPL. Měření transepidermální ztráty vody TEWL. *Česko-slovenská dermatologie*. 2008, **83**(6), 319-324.
- [35] PATZELT, A., W. STERRY a J. LADEMANN. *In vivo measurements of skin barrier: comparison of different methods and advantages of laser scanning microscopy*. 2010, **7**(12), 843-852. DOI: 10.1002/lapl.201010071.
- [36] LUEBBERDING, S., N. KRUEGER a M. KERSCHNER. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. *International Journal of Cosmetic Science*. 2013, (35), 477-483.
- [37] CZAİKA, V., A. ALBOROVA, W. STERRY, J. LADEMANN a S. KOCH. Application of laser scan microscopy in vivo for wound healing characterization. *Laser Physics Letters*. 2010, **7**(9), 685-692.
- [38] PODOLEANU, A.Gh. Optical coherence tomography. *Journal of Microscopy*. 2012, , 1-11.

- [39] *Courage + Kazaka Electronic GmbH* [online]. Köln, Germany, b.r. [cit. 2019-03-07].
Dostupné z: <https://www.courage-khazaka.de/en/>
- [40] PAVICIC, Tatjana, Gerd GAUGLITZ, Peter LERSCH, Khadija SCHWACHABDELLAOUI, Brigitte MALLE CORTING a Mike FARWICK. Efficacy of Cream-Based Novel Formulations of Hyaluronic Acid of Different Molecular Weights in Anti-Wrinkle Treatment. *Journal of drugs in dermatology*. 2011, **10**(9), 990-1000.
- [41] GABRIEL, Azevedo de Brito Damasceno. Use of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extracts from Brazilian Caatinga as an alternative of natural moisturizer in cosmetic formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, **52**(3), 459-470.
- [42] M., Farwick, Lersch P. a Strutz G. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid: Its Effects on Epidermal Gene Expression & Skin Ageing. *SOFW Journal*. 2008, (134), 2-6.
- [43] *Ω6 Céramide®* [online]. 2018 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://cosmetics.specialchem.com/product/i-solabia-omega-6-ceramide-safflower>
- [44] TOMINAGA, Kumi, Nobuko HONGO, Mariko KARATO a Eiji YAMASHITA. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*. 2012, **59**(1), 43-47.
- [45] DAVINELLI, Sergio, Michael E. NIELSEN a Giovanni SCAPAGNINI. Astaxanthin in Skin Health, repair and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2018, **10**(522).

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SC	<i>Stratum corneum</i>
SG	<i>Stratum granulosum</i>
NMF	Přirozený hydratační faktor
TEWL	Transepidermální ztráta vody
HA	Kyselina hyaluronová
L-PCA	Kyselina L-pyrrolidon karboxylová
ROS	Reaktivní kyslíkový radikál
OCT	Optická koherentní tomografie
SDS	Sodium dodecyl sulfát
INCI	Ingredients
CSI	Complete skin investigation
Obr.	Obrázek
Tab.	Tabulka
k.j.	Korneometrické jednotky
NaCl	Chlorid sodný
MIF	Macrophage Migration Inhibiting Factor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Transepidermální ztráta vody (TEWL) [6].....	13
Obr. 2. Celulóza [13]	19
Obr. 3. Chemická struktura některých mikrobiálních polysacharidů [15, s. 3].....	22
Obr. 4. Struktura Fucogelu [17, s. 6]	23
Obr. 5. Chemická struktura kyseliny hyaluronové [25].....	25
Obr. 6. Struktura hyaluronanu v roztoku [29]	27
Obr. 7. Srovnání stupně hydratace pokožky po aplikaci Fucogelu a kyseliny hyaluronové [17, s. 15].....	28
Obr. 8. Multi Skin Test Center MC 750 [38].....	42
Obr. 9. Závislost hydratačního účinku 5 % Fucogelu na čase	45
Obr. 10. Závislost hydratačního účinku 10 % Fucogelu na čase	46
Obr. 11. Srovnání účinků formulací s různým obsahem 5 a 10 % koncentrace Fucogelu a kontrolního místa, kde nebyl aplikován žádný přípravek.....	47
Obr. 12. Závislost hydratačního účinku 0,1 % HA na čase	47
Obr. 13. Závislost hydratačního účinku 1 % HA na čase	48
Obr. 14. Srovnání účinků formulací s různým obsahem HA.....	48
Obr. 15. Srovnání účinnosti formulací s obsahem Fucogelu a HA	50
Obr. 16. Závislost hydratačního účinku kombinace 0,1% HA a 5 % Fucogelu na čase	51
Obr. 17. Závislost hydratačního účinku kombinace 0,05 % HA a 10 % Fucogelu na čase	51
Obr. 19. Srovnání účinku formulací s kombinacemi Fucogelu, HA a Aquaregulu.....	53
Obr. 20. Vliv formulací s Fucogelem na elasticitu pokožky	55
Obr. 21. Vliv formulací s HA na elasticitu pokožky	55
Obr. 22. Vliv dlouhodobého působení komerčních přípravků obsahujících studované aktivní látky na hydrataci pokožky	59
Obr. 23. Vliv dlouhodobého působení komerčních přípravků na elasticitu pokožky	59

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Typy hydratačních složek dle mechanismu účinku [10, s. 121].....	18
Tab. 2. Složení základu krému bez hydratujících látek	37
Tab. 3. Složení krému s obsahem 0,1 a 1 % hyaluronanu sodného (HA)	38
Tab. 4. Složení krému s obsahem 5 a 10 % Fucogelu (INCI Biosaccharide Gum-1)	38
Tab. 5. Složení krému s obsahem HA, Fucogelu a Aquaregulu.....	38
Tab. 6. Přehled komerčních přípravků použitých v DP.....	40
Tab. 7. Hydratační účinnost testovaných formulací krémů vyjádřená jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky)	45
Tab. 8. Vliv testovaných formulací na elasticitu pokožky, vyjádřený jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky)	54
Tab. 9. Účinek komerčních přípravků na hydrataci a elasticitu pokožky vyjádřený jako rozdíl hodnot měřených ihned po aplikaci a v daném čase působení (průměr a směrodatné odchylky).....	56

SEZNAM PŘÍLOH

- P I Dotazník pro účastníka měření
- P II Prohlášení účastníka
- P III Kompletní složení použitých komerčních přípravků

PŘÍLOHA P I: DOTAZNÍK PRO ÚČASTNÍKA MĚŘENÍ

Dotazník pro účastníka měření

Kód pokusné osoby (evidenční číslo):

Věk:

Pohlaví:

Současný zdravotní stav:

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

Užívání léků

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

Alergologická léčba

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

Pouze pro ženy

Jste:	ano	ne
těhotná nebo kojící		

Alergie

Projevila se u vás někdy alergie na:	specifikujte:
detergenty a čisticí prostředky	
kosmetické přípravky a vůně parfémů	
přípravky do koupele a na mytí (šampón, mýdlo)	
pleťové krémy a mléka, lotiony	

antiperspiranty a deodoranty	
léky	
jiné materiály	

Doplňující údaje

Zdravotní stav:	specifikujte:
používáte pravidelně jakýkoliv přípravek pro léčbu kůže	
používáte pravidelně jakékoliv léčivo (na předpis, či volně prodejné)	
navštěvujete v současné době lékaře kvůli:	
alergiím	
kožním problémům	
z jiného důvodu	
máte nějaké jiné zdravotní potíže	

Účast v dalších studiích

Studie:	Typ studie:	Datum poslední studie:
účastnil(a) jste se někdy kožního testu	-----	
účastníte se v současné době jiné studie jakéhokoliv druhu		

PŘÍLOHA P II: PROHLÁŠENÍ ÚČASTNÍKA

Prohlášení účastníka

Souhlasím se svou účastí v hodnocení kosmetických přípravků, které mně bylo popsáno a které bude garantováno doc. MUDr. M. Bučkem, CSc. Beru na vědomí, že experiment může zahrnovat riziko nežádoucích účinků na kůži. Toto riziko mi bylo detailně objasněno a mohl(a) jsem se informovat o všech podrobnostech experimentu.

Vím, že mohu kdykoliv odvolat svůj souhlas s účastí v experimentu a mohu kdykoliv odstoupit od své účasti.

Mohu si vyžádat další informace o experimentu a oznámit nežádoucí účinky u pracovníka provádějícího hodnocení.

Souhlasím, že data získaná během měření mohou být statisticky zpracována. Veškeré údaje o průběhu a výsledcích měření, které mne mohou identifikovat, zůstanou přísně důvěrné.

Prohlašuji, že toto poučení plně chápu a podepisuji ho při plném vědomí na příložený list.

V.....

Datum.....

Podpis.....

PŘÍLOHA III: KOMPLETNÍ SLOŽENÍ POUŽITÝCH KOMERČNÍCH PŘÍPRAVKŮ

HYALURONOVÉ SÉRUM

Ingredients (INCI): Aqua, Biosaccharide Gum - 1, Glycerin, Sodium Hyaluronate, Aloe Barbadosensis Leaf Juice, Helichrysum Italicum Extract, Jania Rubens Extract, Allantoin, Butylene Glycol, Sodium Levulinate, Potassium Sorbate.

HYDRATAČNÍ AKTIVNÍ KRÉM

Ingredients(INCI): Aqua, Caprylic/Capric Triglyceride, Prunus Amygdalus Dulcis Oil, Biosaccharide Gum-1, Butyrospermum Parkii Butter, Glycerin, Cetearyl Alcohol, Dimethicone, PEG-8 Beeswax, Glyceryl Stearate, Potassium Lauroyl Wheat Amino Acids, Phospholipids, Urea, Hydrolyzed Wheat Protein, Glucose, Sorbitol, Fructose, Hydrolyzed Elastin, Ethylhexyl Palmitate, Sodium PCA, Sodium Glutamate, Glycine, Lysine, Malic Acid, Citric Acid, Glycolic Acid, Tartaric Acid, Lactic Acid, Cetareth-20, Tocopheryl Acetate, Sodium Hydroxide, Potassium Hydroxide, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Disodium Distyrylbiphenyl Disulfonate, Parfum

BIOVITALITY VITAL CARE

Ingredients (INCI): Aqua, Persea Gratissima Oil, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Cetearyl Alcohol, Biosaccharide Gum – 1, Glyceryl Stearate, Cetearyl Glucoside, Polysorbate 80, Potassium PCA, Opuntia Ficus-Indica Stem Extract, Phenoxyethanol, Potassium Sorbate, Sodium Benzoate, Tocopheryl Acetate, Parfum, Safflower oil/Palm Oil aminopropanediol esters, Triethanolamine, Citric Acid, Hydroxycitronellal, Geraniol, Hydroxysohexyl 3-Cyclohexene Carboxaldehyde, Butylphenyl Methylpropional, Linalool, Citronellol, Alpha-Isomethyl Ionone

ASTAXANTHIN AKTIVNÍ KRÉM

Ingredients (INCI): Aqua, Vitis Vinifera Seed Oil, Olea Europea Fruit Oil, Glycerin, Rosa Canina Fruit Oil, Cetearyl Alcohol, Persea Gratissima Oil, Butyrospermum Parkii Butter, Sodium Polyacrylate, Panthenol, Parfum, Astaxanthin, Cera Alba, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Polysorbate 80, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin.