

Bioaktivní peptidy a jejich vliv na pokožku

Bc. Eva Mužíková, DiS.

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Mužíková, DiS.**
Osobní číslo: **T19765**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Bioaktivní peptidy a jejich vliv na pokožku**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Věnujte se problematice aktivních látek ze skupiny kosmeceutik na bázi krátkých, bioaktivních peptidů a soustředte se na peptidy působící jako inhibitory neurotransmiterů.
3. Charakterizujte jejich složení, vlastnosti a mechanismus působení.

II. Praktická část

1. V praktické části práce připravte modelové kosmetické formulace se zastoupením zvoleného krátkého peptidu.
2. Stanovte jejich základní charakteristiky a pomocí bioinženýrských metod sledujte vliv těchto kosmetických přípravků na pokožku.
3. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] BAREL, A. O., PAYE M., MAIBACH, H. I. Handbook of cosmetic science and technology. 1. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, ISBN 0-8247-0292-1.
- [2] HOPPE, M., REZNICEK, G., KAEHLING, H., KOTISH, H., RESCH, G.P. a VALENTA, C., Topical delivery of acetyl hexapeptide-8 from different emulsions: Influence of emulsion composition and internal structure. Eur. J. Pharm. Sci. 2015, 68, 27-35.
- [3] ZHANG, L; FALLA, T. J. Cosmeceuticals and peptides. Clinics in Dermatology (2009) 27 (5), 485-494.
- [4] WANG, Y., WANG, M., XIAO, S., PAN, P., LI, P. a HUO, J., The anti-wrinkle efficacy of argireline, a synthetic hexapeptide, in Chinese subjects: A randomized, placebo controlled study, J. Clin. Dermatol. 2013, 14(2), 147-153.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo hodnocení vlivu kosmeceutika Argirelinu na stav pokožky. Práce srovnávala rozdílné působení Argirelinu v různých koncentracích a v různých formulacích. Studie byla rozdělena na dvě části. V první části studie byl testován jednoduchý gel s koncentrací Argirelinu 5 a 12,5 %. Druhá část studie hodnotila komerční přípravky Dermabotexin (Argireline) a Renovia (kyselina hyaluronová, retinol, ceramidy). U všech argirelinových formulací a krému Renovia byl sledován stav hydratace pokožky, TEWL, elasticita a objem vrásek.

Výsledky diplomové práce potvrzují deklarovanou účinnost Argirelinu na redukci vrásek. Důležité je zjištění, že Argireline v porovnání s jinými běžně používanými kosmeceutiky má na zmírnění projevů vrásek silnější vliv. Dalším přínosným výsledkem této práce je zjištění, že Argireline zapracovaný do gelu snižuje hydrataci pokožky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby byl Argireline v kosmetických formulacích kombinován s aktivními látkami, které hydrataci zvyšují.

Klíčová slova: kosmeceutika, Argireline, vrásky, hydratace, elasticita,

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to evaluate the effect of the cosmeceutical Argireline on the skin. The work compared the different effects of Argireline being present in different concentrations and in different formulations. The study consisted of two parts. In the first part of the study, a simple gels with Argireline in concentrations of 5 and 12.5% were tested. The second part of the study evaluated the commercial products Dermabotexin (Argireline) and Renovia (hyaluronic acid, retinol, ceramides). The skin hydration, TEWL, elasticity and volume of the wrinkles were measured for all Argireline formulations and Renovia cream. The results of the thesis confirm the declared efficacy of Argireline in the reduction of wrinkles. It is important to stress that Argireline shows a stronger effect on wrinkle reduction than other commonly used cosmeceuticals. Another beneficial result of this work is the finding that Argireline incorporated into the gels reduced skin hydration. For this reason, it is desirable for Argireline formulations to be supplemented active ingredients that increase hydration.

Keywords: cosmeceuticals, Argireline, wrinkles, hydration, elasticity

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za odborné vedení mé práce, za její čas, cenné poznámky a možnost častých konzultací. Dále bych chtěla poděkovat Dr. et Mgr. et Bc. Petru Svobodovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí a vzorků ve společnosti Syncare, které byly potřebné k realizaci této diplomové práce a také za jeho cenné rady. Velký dík patří i slečně Tomáškové, která mi pomáhala s realizací a organizací měření. Poděkování patří i prof. RNDr. Petru Ponižilovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním.

Ráda bych touto cestou poděkovala i celé své rodině za pomoc a trpělivost.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KOSMETICKÉ AKTIVNÍ LÁTKY	12
1.1 KOSMECEUTIKA	12
1.2 HLAVNÍ SKUPINY KOSMECEUTIK	13
1.2.1 Hydroxykyseliny	13
1.2.2 Vitaminy.....	14
1.2.3 Růstové faktory	16
1.2.4 Krátké peptidy	16
1.3 KRÁTKÉ PEPTIDY	16
1.3.2 Nosné peptidy.....	19
1.3.3 Peptidy působící na neurotransmitery	19
1.3.4 Další bioaktivní peptidy a proteiny	21
1.4 ARGIRELIN	23
1.4.1 Složení a vlastnosti.....	23
1.4.2 Mechanismus účinku.....	24
1.4.3 Použití	24
2 BIOINŽENÝRSKÉ METODY STUDIA POKOŽKY.....	25
2.1 HYDRATACE POKOŽKY	25
2.2 ZTRÁTA VODY PŘES EPIDERMIS (TEWL).....	26
2.3 ELASTICITA POKOŽKY	27
2.4 PH POKOŽKY	28
2.5 MĚŘENÍ HLOUBKY VRÁSEK	29
3 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	30
4 CÍLE PRÁCE	34
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
5 MATERIÁLY A METODIKA.....	36
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	36
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	37
5.3 DOBROVOLNICE	38
5.4 METODIKA TESTOVÁNÍ.....	38
5.5 MĚŘENÍ HYDRATACE POKOŽKY	39
5.6 MĚŘENÍ TEWL	40
5.7 MĚŘENÍ ELASTICITY POKOŽKY	40
5.8 HODNOCENÍ STAVU VRÁSEK.....	40
5.9 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	41

6	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
6.1	HODNOCENÍ HYDRATAČE	43
6.1.1	Gel s 5 a 12,5 % Argirelinu.....	43
6.1.2	Komerční přípravky Dermabotexin a Renovia	46
6.2	HODNOCENÍ TEWL.....	51
6.2.1	Gel s obsahem 5 a 12,5 % Argirelinu	51
6.3	HODNOCENÍ ELASTICITY POKOŽKY	54
6.3.1	Gel s 5 a 12,5 % Argirelinu.....	54
6.4	HODNOCENÍ STAVU VRÁSEK.....	56
6.4.1	Gel s 5 a 12,5 % Argirelinu.....	56
6.4.2	Komerční přípravky Dermabotexin a Renovia	58
6.4.3	Porovnání účinku gelu s 12,5% Argirelinem a přípravku Dermabotexin	61
6.4.4	Srovnání stanovení stavu vrásek různými technikami	62
7	DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ.....	64
7.1	STUDIE I.....	64
7.2	STUDIE II.....	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	79
	SEZNAM ROVNIC	80
	SEZNAM PŘÍLOH.....	81

ÚVOD

Vzhledem k tomu, že kůže je hlavním orgánem, na kterém jsou viditelné změny vznikající v důsledku stárnutí, je kladen velký důraz na vyvinutí metod a kosmetických přípravků, které tyto projevy zmírňují. Stárnutí kůže je složitý proces, skládá se z chronologického vnitřního stárnutí, které je spojeno s genetikou, a z vnějšího stárnutí, které vzniká v důsledku nadměrného vystavení kůže UV záření, užívání alkoholu a tabáku a negativních vlivů životního prostředí. V dnešní době je na trhu velké množství přípravků, které slibují eliminaci již vzniklých vrásek, hyperpigmentací a projevů dehydratace pokožky. V souvislosti s tím byla vyvinuta a zkoumána řada kosmetických látek, které mají vliv na fyziologické procesy v kůži a tím mohou ovlivnit její vzhled. Mezi tyto kosmeticky aktivní látky patří i kosmeceutika, která nejsou v legislativě zatím nijak definována. Mezi velmi slibné látky ze skupiny kosmeceutik se řadí bioaktivní peptidy, které prostřednictvím různých mechanismů zlepšují stav a vzhled pokožky. V této práci bude testován jeden z bioaktivních peptidů, acetylhexapeptide-3, který je jako kosmeceuticky aktivní látka znám pod komerčním názvem Argireline. Argireline patří do skupiny peptidů, které ovlivňují neurotransmitery a má stejný mechanismus účinku jako botulotoxin. Na rozdíl od botulotoxinu Argireline nevykazuje nežádoucí účinky a při jeho aplikaci nedochází k narušení kůže. Je přidáván do kosmetických formulací, které mají deklarované anti-age účinky.

Hlavním cílem této práce bylo posoudit účinky formulací s Argirelinem po jejich měsíční aplikaci na pokožku obličeje, a to prostřednictvím hodnocení stavu hydratace kůže, transepidermální ztráty vody (TEWL), elasticity a změny hloubky vrásek. Dalším cílem bylo zhodnotit rozdíly ve stavu kůže po aplikaci kosmetických přípravků s různou koncentrací Argirelinu a věnovat pozornost vlivu ostatních pomocných a aktivních látek, které jsou přítomny v testovaných formulacích. Získané výsledky byly srovnány a diskutovány se současnými publikovanými studiemi o Argirelinu, které prokazují jeho účinnost a bezpečnost.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KOSMETICKÉ AKTIVNÍ LÁTKY

Kosmeticky aktivní látky jsou látky, které mají specifický účinek na pokožku, vlasy a nehty. Mezi tyto účinky můžeme řadit zvlhčení, změkčení, zpevnění či dodání vitamínů. Kosmeticky aktivní látky mají vliv na zlepšení stavu kůže, např. redukují viditelnost vrásek, zlepšují stav celulitidy, dodávají hebkost a lesk vlasům a pevnost nehtům.

1.1 Kosmeceutika

Kosmeceutika (cosmeceuticals) jsou kosmetické přípravky obsahující aktivní složky, které pomáhají zlepšení vzhledu kůže a přispívají k udržení jejího normálního stavu (Farris ed., 2014, str. 11–23). V roce 1984 použil tento výraz Albert Kligman a jedná se o kombinaci pojmů kosmetika (cosmetic) a léčivo (pharmaceutical). Mezi kosmeceutika se řadí převážně krémy a pleťové přípravky určené pro zlepšení vzhledu stárnoucí pokožky. Nejsou testovány jako léčivé přípravky, ale předpokládá se, že jejich účinek je ověřen testováním *in vitro*, a o těchto účincích existují teoretické podklady a znalosti (Sadick a kol. ed., str. 19). Tyto produkty péče o pleť tedy slouží jako kosmetika, ale zároveň mohou obsahovat účinné látky podobné jako léčiva (Farris ed., 2014, str. 11–23).

Evropská legislativa, konkrétně Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 1223/2009 o kosmetických přípravcích definuje pojem kosmetický přípravek jako *„jakoukoliv látku nebo směs určenou k pro styk s vnějšími částmi lidského těla nebo zuby a sliznicemi dutiny ústní, která se používá výhradně nebo převážně za účelem čištění, parfemace, změny vzhledu, ochrany, udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů“* (Nařízení EP a Rady 1223, 2009). Pojem kosmeceutikum však není v této legislativě specifikován.

Vývoj kosmeceutik je založen na znalostech anatomie, fyziologie a biochemie kůže. Při vývoji kosmetického produktu existuje řada legislativních hledisek a požadavků, které je třeba vzít v úvahu. Mezi tyto hlediska patří složení přípravku, kategorie použití, výroba a značení. Při vývoji kosmeceutik je důležitým faktorem správného působení průnik aktivních látek do určité požadované vrstvy kůže. Například zvlhčující látky by měly pokrývat *stratum corneum* a zabraňovat transepidermální ztrátě vody. Podobně opalovací krémy musí zůstat na povrchu kůže a záření odrážet nebo absorbovat. Naopak antioxidanty by měly pronikat do *dermis*, aby zabránily

působení škodlivých kyslíkových radikálů. Pro zlepšení průniku účinných látek do *dermis* se přidávají přísady zlepšující penetraci, které působí fyzikálně, nebo chemicky. Fyzikální metody spočívají v mechanickém odstranění korneocytů, například mikrodermabrazí, a mezi chemické látky, které upravují kožní bariéru pro lepší absorpci dalších aktivních látek, patří propylenglykol, isopropylmyrystát, kyselina glykolová, močovina nebo retinoidy (Farris ed., 2014, str.11–23).

1.2 Hlavní skupiny kosmeceutik

Kosmeceutika můžeme rozdělit do několika skupin. Patří mezi ně látky přírodního původu, vitaminy, krátké peptidy nebo růstové faktory. Podrobně budou představeny v následujících kapitolách.

1.2.1 Hydroxykyseliny

Hydroxykyseliny jsou organické karboxylové kyseliny, které mají připojenou hydroxylovou skupinu do polohy alfa nebo beta na karboxylovém řetězci. Podle toho, v jaké pozici je hydroxylová skupina připojena, rozlišujeme alfa-hydroxykyseliny (AHA) a beta-hydroxykyseliny. Mnoho hydroxykyselin se vyskytuje v ovoci a zelenině a proto jsou také označovány jako ovocné kyseliny. V kosmetických přípravcích se využívají nejvíce AHA, a to zejména kyselina glykolová, kyselina mléčná a kyselina mandlová (Farris ed., 2014, str. 69–80). Účinek AHA na pokožku spočívá ve zvýšení její deskvamace snížením soudržnosti korneocytů ve *stratum corneum*. Hydroxykyseliny mají schopnost absorbovat se do *stratum corneum* a tato absorpce je ovlivněna hodnotou pH přípravku. Aktivita hydroxykyselin se značně zvyšuje snížením pH. Z výzkumů na hlodavcích vyplývá, že by používáním přípravků s AHA není narušena kožní bariéra, ale zároveň je prokázáno, že kosmetické přípravky obsahující AHA mohou zvýšit citlivost kůže vůči slunečnímu záření (Walters a Roberts ed., 2007, str. 297–300). AHA mají exfoliační účinky, zvyšují obsah ceramidů ve *stratum corneum* a do anti-aging přípravků se přidávají kvůli schopnosti zvýšit syntézu glykosaminoglykanů (GAG) a kolagenu, čímž zvyšují kvalitu elastinu a kolagenu. Některé AHA vykazují antioxidační účinky a také fungují jako inhibitory matricové metaloproteinázy, která degraduje kolagen, a tím pomáhají zachovat mladistvý vzhled pokožky. Bylo prokázáno, že AHA snižují shlukování pigmentu v *epidermis* a proto se přidávají do kosmetických přípravků, které mají za úkol sjednotit pokožku a zmírnit projevy hyperpigmentace (Farris ed., 2014, str. 69 – 80).

1.2.2 Vitaminy

1.2.2.1 Vitamin B3 (Niacinamid)

V kosmetických produktech můžeme najít vitamin B3 ve třech formách: niacinamid (nicotinamid), kyselinu nikotinovou a jako estery kyseliny nikotinové. Vitamin B3 slouží jako prekurzor pro enzymové kofaktory – nikotinamid adenin dinukleotid NAD a jeho fosforylovaný derivát nikotinamid adenin dinukleotid fosfát NADP a jejich redukované formy NADH a NADPH. Tyto látky mají antioxidační vlastnosti. Kofaktory jsou zapojeny do mnoha enzymatických reakcí v kůži a tak mohou ovlivnit řadu procesů, které v ní probíhají. Niacinamid inhibuje produkci kožního mazu, konkrétně triacylglycerolů a mastných kyselin, což má vliv na zmenšení velikosti pórů a zlepšení struktury pokožky. V *epidermis* niacinamid zvyšuje produkci lipidů, zejména ceramidů, a tím se podílí na zlepšení její bariérové funkce a zabraňuje transepidermální ztrátě vody. To má za následek zvýšení odolnosti kůže proti vlivům zevního prostředí. Niacinamid inhibuje zánětlivé cytokiny a z tohoto důvodu působí protizánětlivě. Má vliv na zvýšení produkce kolagenu a snižuje hyperpigmentace tím, že inhibuje přenos melanosomu z melanocytů na keratinocyty. Z klinických studií vyplývá, že niacinamid redukuje jemné vrásky, jeho efekt se s délkou používání zvyšuje a významných výsledků je dosaženo po 8 až 12 týdnech. Pokožka niacinamid dobře toleruje, proto je možné vyšší dávky aplikovat dlouhodobě. Problematické je však působení kyseliny nikotinové, která může i při nižších dávkách vyvolat zarudnutí, svědění a pálení kůže v obličeji. Proto je důležité zabránit tomu, aby se kyselina nikotinová do kosmetických formulací uvolňovala (Drealos ed., 2010, str. 321–323).

1.2.2.2 Vitamin B5

Aktivní formou vitamínu B5 je kyselina pantothenová, jejím prekurzorem je panthenol nebo provitamin pantothenol. Známý a hodně používaný *D*-optický izomer panthenolu je dexpanthenol. Panthenol je ve vodě rozpustný a má nízkou molekulovou hmotnost, proto dobře proniká přes *stratum corneum*. Používá se k léčbě ran, jizev, popálenin a dermatóz. Mechanismus jeho působení není přesně znám, nicméně kyselina pantothenová je součástí koenzymu A, který hraje roli v přenosu acylových skupin během syntézy mastných kyselin a glukoneogeneze. Právě zvyšováním syntézy lipidů v kůži dochází k posílení kožní bariéry, což má za následek např. lepší hojení ran. Na podporu hojení má vliv i to, že panthenol podporuje proliferaci fibroblastů. Panthenol je pokožkou velmi dobře snášen, zlepšuje její

hydrataci a navíc má i zklidňující, protizánětlivé a protisvědivé účinky. Hydratační účinek panthenolu pramení z jeho hygroskopických vlastností. Účinně hydratuje *stratum corneum* a ještě lepších hydratačních účinků dosahuje v kombinaci s glycerolem. Panthenol je vhodný na zmírnění suchosti pokožky při onemocněních jako jsou atopická dermatitida, ichtyóza nebo psoriáza. Můžeme jej najít i v přípravcích péče o vlasy, kde zlepšuje jejich pružnost a usnadňuje rozčesávání (Drealos ed., 2010, str. 323–324).

1.2.2.3 Vitamin C

Vitamin C se může vyskytovat v několika formách. Mezi nejběžněji používané patří kyselina askorbová, askorbyl fosfát, askorbyl palmitát nebo askorbyl glukosid. Vitamin C, který patří do skupiny alfa-ketolaktonů, existuje jako hydrofilní monovalentní hydroxylový aniont. Pokud je k němu přidán jeden elektron, vytvoří se volný radikál askorbátu. Ten je stabilnější než ostatní volné radikály a může přijmout elektrony. Tímto způsobem efektivně inaktivuje volné radikály a působí jako účinný antioxidant. Díky tomu, že vitamin C inhibuje tyrozinázu, používá se ke zesvětlení pokožky a léčbě melasmy. Dále hraje významnou roli v biosyntéze kolagenu (typ I a III) tím, že působí jako kofaktor pro enzymatickou aktivitu prolyl hydroxylázy. Tento enzym hydroxyluje prolylové zbytky v prokolagenu a elastinu a tím pomáhá vytvářet trojšroubovici kolagenu. Tato jeho aktivita by měla mít vliv na redukci vrásek (Drealos ed., 2010, str. 325–326; Baumann a kol. ed., 2009, str. 284–285). Užívání vitamínu C perorálně má pouze omezený vliv na jeho množství v kůži a vlivem slunečního záření a znečištěného prostředí může dojít k jeho vyčerpání. Vitamin C je používán v topických přípravcích za účelem prevence poškození kůže UV zářením a k léčbě melasmy (Baumann a kol. ed., 2009, str. 284–285). Je rovněž známé, že kyselina askorbová vykazuje i protizánětlivé účinky. Problém využití vitamínu C v kosmetických formulacích je jeho nízká stabilita. I přes různé pokusy tuto stabilitu zlepšit, jako například vyloučit kyslík při přípravě, snížit pH nebo minimalizovat obsah vody, není stabilita vitamínu C ideální. (Drealos ed., 2010, str. 325–326).

1.2.2.4 Retinoidy

Retinoidy jsou látky, mezi které se řadí vitamin A (retinol) a jeho přírodní a syntetické deriváty. V organismu fungují jako regulátory diferenciací a proliferace buněk v různých tkáních. Oxidací retinolu vznikne retinaldehyd a poté kyselina retinová, což je biologicky aktivní forma vitamínu A. Retinol je možné i esterifikovat mastnými kyselinami za vzniku

retinylesterů. Jako biologicky aktivní látky pro humánní použití můžeme retinoidy rozdělit na terapeutika a kosmeceutika. Mezi retinoidy, které se používají k terapeutickým účelům, patří tretinoin, alitretinoin a isotretinoin, které jsou vázány lékařským předpisem. Tyto látky jsou endogenní aktivní metabolity retinolu a modulují genovou expresi tím, že se naváží na jaderné receptory. Používají se na léčbu akné, psoriázy a onkologických onemocnění. Naproti tomu endogenní prekurzory retinových kyselin – retinylestery, retinol a retinaldehyd se neváží na jaderné receptory a mohou být použity ve volně prodejných přípravcích a kosmetice. Některé klinické studie ukazují, že použití topických retinoidů může mít pozitivní vliv na nápravu strukturálních změn, které jsou vyvolány nadměrnou expozicí UV záření. Nevýhodou je, že při dlouhodobém podávání retinoidů dochází k dráždění pokožky (Drealos ed., 2010, str. 309–315).

1.2.3 Růstové faktory

Ke slibným kosmeceuticky aktivním složkám patří rovněž růstové faktory. Buněčné růstové faktory jsou proteiny odpovědné za stimulaci buněčného růstu, proliferaci a dělení buněk a jsou důležité pro průběh řady buněčných procesů. V posledních letech byly růstové faktory hojně studovány pro jejich potenciál při hojení ran, ale zjistilo se, že mohou být využívány i v kosmetických formulacích jako látky, které mají schopnost zlepšovat vzhled stárnoucí pokožky. Mechanismus účinku růstových faktorů spočívá v tom, že pomáhají aktivovat fibroblasty k produkci extracelulární matrix a následně stimulovat množení keratinocytů a vytvářet tak novou *epidermis*. Použití růstových faktorů v kosmetických přípravcích za účelem omlazení je novinkou v potlačení projevů stárnutí. Právě to, že ovlivňují proliferaci kožních fibroblastů a produkci extracelulární matrix, je klíčovým faktorem vedoucím ke zmírnění známek stárnutí (Drealos ed., 2010, str. 302–307).

1.2.4 Krátké peptidy

Další významnou skupinou kosmeceutik jsou krátké peptidy. Jelikož jeden z těchto peptidů, acetylhexapeptide-3, je použit v této diplomové práci, jsou podrobněji popsány v následující kapitole

1.3 Krátké peptidy

Peptidy jsou řetězce bioaktivních aminokyselin a jsou významnými činiteli v mnoha různých biologických procesech. Nejdůležitější funkci mají jako signální a regulační látky v procesech jako je obrana, imunita, růst, homeostáza a reprodukce organismu. Jejich použití

se rozšířilo i do kosmeceutických formulací, kde působí jako složky, které mají za cíl zlepšení stavu kůže. Kosmeceutické peptidy mohou působit jako signální peptidy, které moduluji složky extracelulární matrix a fungují jako strukturní peptidy. Další známé peptidy jsou nosné peptidy, které dodávají důležité prvky do kůže, peptidy inhibující neurotransmitery a peptidy inhibující enzymy. Výhodou peptidů je možnost jejich průniku až do dermis, který lze dále zefektivnit pomocí zesilovačů penetrace, chemické modifikace nebo zapouzdření peptidů do vhodných nosičů. Další výhodou je možnost jejich zapojení do mnoha fyziologických funkcí kůže. Mezi nevýhody lze řadit nedostatečné klinické důkazy jejich kosmetické účinnosti, riziko špatné absorpce kvůli nízké lipofilitě, vysoké molekulové hmotnosti některých peptidů a v neposlední řadě i vysoká cena (Pai a kol., 2017).

1.3.1 Signální peptidy

Tato skupina peptidů stimuluje růst dermálních fibroblastů v kůži. V *in vitro* studiích bylo prokázáno, že dokáží stimulovat produkci extracelulárních látek včetně kolagenu, elastinu a fibronektinu a snižují produkci glykosaminoglykanů (Sadick a kol. ed., str. 19–25). Mezi tyto signální peptidy zahrnujeme matrikiny, cathelicidiny a lidské beta defensiny.

Matrikiny

Matrikiny pochází z rozkladu většího peptidu nebo proteinu, který byl vyvolán patologickými vlivy jako je zánět, poranění nebo vystavení UV záření. Působením těchto vlivů dochází ke štěpení extracelulárních proteinů a peptidové fragmenty pak působí v procesu stimulace a hojení extracelulární matrix (ECM) (Farris, ed. 2014, str. 142–152). Matrikiny jsou tedy krátké peptidy, které vznikají proteolýzou makromolekul v extracelulární matrix a mohou ovlivňovat buněčnou proliferaci, přesun buněk a jejich apoptózu (Aldag a kol., 2016). Můžeme je rozdělit do dvou skupin: matrikiny, které vznikají přímo v extracelulárním prostředí, a kryptické matrikiny (matrikryptiny), které před tím, než se stanou aktivními, musí být nejdříve enzymaticky zpracovány (Zhang a Falla, 2009). Mezi funkce matrikinů patří schopnost indikovat záněty, mohou podporovat nebo tlumit tumorogenezi a podílí se na hojení ran. Díky malé velikosti jejich molekuly pronikají do kůže lépe než cytokiny a růstové faktory. Peptidy podobné matrikinům jsou obsaženy v mnoha různých komerčně dostupných formulacích. Často bývají kombinovány s kyselinou palmitovou, což pomáhá penetraci peptidu do *epidermis* (Aldag a kol., 2016). Do skupiny matrikinů se řadí např. následující peptidy.

KTTKS (lysine-threonine-threonine-lysine-serine pentapeptide)

KTTKS je jeden z prvních peptidů, které byly vyvinuty za účelem použití v kosmetických přípravcích (Pai a kol., 2017). Byl odvozen z mnohem většího peptidu, obsahujícího 34-44 aminokyselin, a přitom u něj bylo zachováno 80 % aktivity. Je to nejběžnější a nejrozšířenější signální peptid a bylo prokázáno, že je šetrný ke kožní bariéře. Tento matrikin vzniká proteolytickou hydrolýzou kolagenu, podporuje produkci ECM a expresi fibronektinu a kolagenu typu I a II. Je známý také jako palmitoyl pentapeptid 3 (PAL-KTTKS), což je jeho stabilnější forma, díky níž může lépe penetrovat do kůže. V *in-vitro* testech bylo prokázáno, že PAL-KTTKS zvyšuje sekreci prokolagenu a syntézu kyseliny hyaluronové. To potvrzují i klinické studie, ze kterých vyplývá, že stav vrásek byl po aplikaci krému s PAL-KTTKS výrazně lepší a přitom nedošlo ke změnám v bariérové funkci kůže (Aldag a kol., 2016; Zhang a Falla, 2009).

GHK (glycine-histidine-lysine tripeptide)

Tento peptid je známý jako nosný peptid, protože vykazuje vysokou afinitu k mědi a tvoří s ní komplexy (GHK-Cu), ale má i účinky signálního peptidu (Sadick a kol. ed., 2010 str. 19-20). GHK byl poprvé izolován z lidské plazmy v roce 1973. Později bylo zjištěno, že zlepšuje hojení ran a aktivuje remodelaci tkáně (Gorouhi a Maibach, 2008). Zvyšuje produkci kolagenu tím, že stimuluje fibroblasty a zvyšuje syntézu ECM. Klinické studie prokázaly zvýšení množství kolagenu v pokožce po měsíčním používání krému s obsahem GHK-Cu (Sadick a kol. ed., 2010 str. 19–20; Aldag a kol., 2016). Z počátku byl popisován jako růstový faktor, ale časem u něj bylo sledováno mnoho dalších biologických efektů. Ukázalo se, že má vliv na urychlení hojení ran, stimuluje regeneraci nervové tkáně, angiogenezi a expresi různých složek v ECM (Zhang a Falla, 2009).

Tripeptide-10 citrulin (L-lysyl-L-alpha-aspartyl-L-isoleucyl-L-citrullinamide)

Jedná se o další peptid, který můžeme zařadit do skupiny matrikinů. Tripeptide-10 citrulin-lysyl-L-alpha-aspartyl-L-isoleucyl-L-citrullinamide je tetrapeptid ze sekvence proteinu dekorinu. Dekorin je malý proteoglykan, který má vliv na fibrilogenezi. Fibrilogeneze je hlavním procesem při tvorbě tkáně, ale musí být kontrolována a regulována, jinak může dojít k nadměrné agregaci kolagenu. Právě dekorin kontroluje správný proces fibrilogeneze. Stárnoucí pokožka obsahuje už zkrácenou formu dekorinu, které chybí vazebné místo s kolagenovými vlákny, to má negativní vliv na pružnost pokožky. Bylo prokázáno, že tripeptide-10 citrulin se specificky váže na kolagenové fibrily a tím reguluje fibrilogenezi a

reguluje průměr kolagenových vláken. Díky těmto vlastnostem zlepšuje pružnost pokožky a zajišťuje její větší odolnost. Tripeptid-10 citrulin je vyráběn pod obchodním názvem DECORINYL španělskou společností Lipotec (Raikou a kol., 2017).

Kathelicidiny a beta defensiny

Druhou skupinou signálních peptidů jsou kathelicidiny a beta defensiny, které jsou syntetizovány organismem přímo pro specifické účely. Jsou označovány jako peptidy vrozené imunity. U savců a vyšších organismů tyto peptidy chrání epiteliální povrchy před působením patogenů, modulují hojení ran, angiogenezi a regulaci zánětu. Jejich zvýšené množství lze detekovat u onemocnění, jako jsou rosacea, atopická dermatitida nebo psoriasis (Farris ed., 2014, str. 142–152).

1.3.2 Nosné peptidy

Nosné peptidy zvyšují a urychlují proces průniku látek do kůže (Gorouhi a Maibach, 2008). Tyto peptidy dodávají do kůže stopové prvky, které jsou nezbytné při hojení ran. Do kosmeceutik se nejčastěji přidává nosný peptid, který do buněk dodává měď. Měď je prvek, který podporuje hojení ran, enzymatické procesy a angiogenezi. Existuje několik mechanismů, jak může měď působit na pokožku. Měď má vliv na lysin oxidázu, což je enzym, který je důležitý při produkci kolagenu a elastinu. I další enzymy jako například tyrozináza, cytochrom-c oxidáza nebo superoxid dismutáza (důležitý antioxidant) vyžadují také měď pro svou správnou funkci. Měď je základní kofaktor pro tvorbu kolagenu a elastinu, snižuje aktivitu kolagenázy a reguluje působení matrix metaloproteinázy. Příkladem peptidu z této skupiny je GAK (glycyl-L-histidil-L-lysin tripeptid). Tento tripeptid patří mezi nosné peptidy. Vytváří spontánně komplexy s mědí a usnadňuje její absorpci do buněk. Nachází se v alfa-řetězci kolagenu a uvolňuje se při poranění nebo zánětu. Do kosmetických formulací se přidává za účelem zlepšení pevnosti a struktury pokožky a zmírnění hyperpigmentace (Sadick a kol. ed., 2010 str. 20–221).

1.3.3 Peptidy působící na neurotransmitery

Při hledání účinného způsobu, jak redukovat vrásky je potřeba pochopit, jak vrásky vznikají. Podle jejich vývoje je můžeme rozdělit na čtyři typy:

- 1) Atrofické zvrásněné linie – tyto linie jsou vzájemně rovnoběžné. Objevují se na různých částech obličeje a těla a při napnutí kůže mizí. Jsou spojené se ztrátou elasticity a kolagenu.
- 2) Permanentní elastické záhyby – stávají se postupem času trvalými a vznikají v důsledku nadměrného vystavení pokožky UV záření a vlivem nezdravého životního stylu.
- 3) Vrásky způsobené pohybem obličejových svalů (mimické vrásky) – jsou kolmé na dlouhou osu svalu a při uvolnění svalu dochází k jejich redukci.
- 4) Vrásky způsobené gravitací

Permanentním elastickým záhybům lze zabránit zdravým životním stylem a ochranou proti UV záření. Zmenšení dalších typů vrásek lze podpořit kolagenovými stimulatory. Při redukci vrásek, které jsou způsobeny pohybem mimických svalů má největší efekt aplikace injekcí s botulotoxinem a peptidy, které působí na neurotransmitery (Andoni a kol., 2014). Tyto peptidy jsou v kosmetických přípravcích používány jako „napodobeniny“ botulinových neurotoxinů. Botulinové neurotoxiny (sérotypy A-G) jsou jedno-řetězcové polypeptidy, které inhibují uvolňování acetylcholinu při nervosvalovém spojení. Používají se k intradermálnímu a subkutánnímu injekčnímu podání do pokožky za účelem redukce vrásek. Mechanismus účinku spočívá v tom, že se polypeptidy vlivem působení proteáz štěpí na těžký a lehký řetězec (Sadick a kol. ed., 2010 str. 21–22). Těžký řetězec se naváže na receptor na presynaptické membráně, lehký řetězec proniká do presynaptického zakončení a štěpí specifický protein (SNAP-25) třídy SNARE (Ehler, 2013). Tento protein SNAP-25 je nezbytný k uvolnění a upevnění acetylcholinu v presynaptických vezikulách. V důsledku jeho rozštěpení se acetylcholin neuvolní do nervosvalového spojení a dojde k inhibici kontrakce mimických svalů obličeje a tím ke snížení projevů vrásek (Sadick a kol. ed., 2010 str. 21–22). Výzkumem bylo zjištěno, že syntetické peptidy představují méně invazivní ekvivalenty botulinových toxinů (Gorouhi a Maibach, 2008).

Acetyl hexapeptid-3 (Argirelin)

Jedná se o syntetický peptid, který inhibuje vznik komplexu SNARE. Tento peptid vykazuje při redukci vrásek skvělé výsledky a jeho výhodou je nízká akutní toxicita ve srovnání s botulotoxinem typu A (Gorouhi a Maibach, 2008). Tento peptid bude podrobněji popsán v kapitole 1.4.

Pentapeptid-18 (Leuphasyl)

Leuphasyl inhibuje neuromuskulární synapse v mimických svalech. Napodobuje přirozený mechanismus enkefalinů (endogenní pentapeptidy). Při svém působení se spojí s nervovou buňkou a tím moduluje uvolňování acetylcholinu v synaptickém prostoru a ve výsledku tak inhibuje aktivitu neuronů zabráněním uvolnění katecholaminů (adrenalin, noradrenalin, dopamin). Díky této aktivitě dojde k uvolnění svalu a redukci mimických vrásek (Gorouhi a Maibach, 2008; Andoni a kol., 2014). Studie prokazují účinnost této molekuly v minimální koncentraci 2 % při topické aplikaci. Její účinnost je sice výrazně horší než injekční aplikace botulotoxinu, výhodou však je, že způsobuje redukci vrásek bez vedlejších účinků. Velkým benefitem při použití Leuphasylu je zachování přirozeného výrazu obličeje (Andoni a kol., 2014). V kontrolovaných studiích Leuphasyl vykazoval synergický účinek s Argirelinem, jejichž kombinace vedla ke snížení vrásek v průměru o 24,6 % (Gorouhi a Maibach, 2008).

Pentapeptid-3 (Viaxol)

Jedná se o syntetický peptid, jehož funkce spočívá v kompetitivním antagonismu acetylcholinových receptorů. V *in vitro* studiích bylo prokázáno snížení svalové kontrakce o 71 % během první minuty a o 58 % po dvou hodinách po ošetření pokožky přípravkem s obsahem Vialoxu. Snížení svalové kontrakce mělo za následek snížení viditelnosti vrásek. Při používání po dobu 28 dní dvakrát denně byla hloubka vrásek snížena o 49 % (Gorouhi a Maibach, 2008).

1.3.4 Další bioaktivní peptidy a proteiny

Používání bioaktivních peptidů jako funkčních přísad kosmetice je doporučováno vzhledem k jejich výbornému bezpečnostnímu profilu, hypoalergenitě a finančně nenáročné výrobě. Bioaktivní peptidy, odvozené z potravinářských surovin mohou být použity pro vývoj kosmeceutik, a to díky své enzymově inhibiční, antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé aktivitě. Díky těmto vlastnostem jsou důležité pro udržení zdravého stavu kůže a chrání ji před negativními vlivy okolního prostředí.

Ze skupiny bioaktivních peptidů hrají při prevenci stárnutí nejdůležitější roli peptidy inhibující enzymy. Během přirozeného stárnutí dochází ke změnám v biosyntetické aktivitě buněk kůže, proteinů a polysacharidů, které vznikají z fibroblastů v dermis (kolagen, elastin a kyselina hyaluronová) a zajišťují pevnost a pružnost kůže. Zároveň dochází k nadprodukci enzymů (elastáza, kolagenáza, tyrozináza a hyaluronidáza), které se na degradaci proteinů a polysacharidů v kůži podílí. V důsledku těchto vlivů dochází ke stárnutí pokožky (ztrátě

pevnosti a pružnosti), které je ještě umocněno vnějšími faktory, jako je UV záření, zevní znečištění a nezdravý životní styl. Vlastnosti bioaktivních peptidů, které působí proti stárnutí pokožky, spočívají v inhibici výše jmenovaných enzymů (Aguilar-Toalá a kol., 2019). Peptidy mohou inhibovat enzymy přímo nebo nepřímo (Gorouhi a Maibach, 2008). Proteiny inhibující enzymy pochází z přírodních zdrojů a v další části práce jsou uvedeni jejich zástupci:

Sójové proteiny – jsou proteiny bránící tvorbě proteáz. Jsou používány jako látky s anti-aging účinkem a zvlhčujícím účinkem na pokožku. Klinické studie prokázaly jejich vliv na zlepšení stavu stárnoucí pokožky (Gorouhi a Maibach, 2008).

Rýžové proteiny – jsou přírodní peptidy, které inhibují aktivitu metaloproteinázy a indukují expresi genu hyaluronan syntázy v keratinocytech (Gorouhi a Maibach, 2008). Protein rýžových otrub byl podrobně studován jako potenciální zdroj aktivních složek v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Peptidy z rýžových otrub podle studií vykazují tyrozinázové inhibiční účinky a měď chelatuující aktivitu (Kubglomsong a kol., 2018).

Hedvábné proteiny – jsou proteiny, které se extrahují z kokonů bource morušového (*Bombyx mori*). Vyznačují se výjimečnými vlastnostmi, jako je biokompatibilita, propustnost pro kyslík a páry a enzymatická odbouratelnost. Hedvábná vlákna jsou složena převážně z fibroinu (vláknitý protein), který tvoří vnitřek vlákna a sericinu (globulární protein), který pokrývá fibroin. Fibroin je strukturální protein a tvoří 70 % hedvábných vláken. Sericin pak tvoří 30 % hedvábného kokonu. Hedvábné proteiny jsou skupinou proteinů, které jsou bohaté na serin a slepují vlákna fibroinu dohromady. Sericin obsahuje 18 různých aminokyselin, které jsou organizovány jako polární postranní řetězce. V současné době mnoho studií prokazuje, že sericin má nízký alergenní a imunogenní potenciál, vykazuje antioxidační účinky, anti-tyrozinázovou aktivitu, chrání před UV zářením a má zvlhčující účinky. Díky těmto vlastnostem jsou na bázi sericinu vyráběny hydrogely, které mají vysoký potenciál pro léčbu a regeneraci chronických ran (Baptista-Silva a kol., 2021). K dalším vlastnostem sericinových hydrogelů patří antioxidační účinky, schopnost tvořit cheláty s mědí, inhibovat peroxidaci lipidů a aktivitu tyrozinázy (Gorouhi a Maibach, 2008).

Peptidy z hadího jedu – jsou peptidy biologicky zajímavé jako zdroj bioaktivních látek. Bylo prokázáno, že vykazují baktericidní aktivitu na celé spektrum klinicky významných bakterií (Sachidananda a kol., 2017). Z hadího jedu byl konkrétně izolován pentapeptid-3 (GPRPA), který podle klinických studií způsobuje redukci vrásek a drsnosti pokožky (Aguilar-Toalá a kol., 2019).

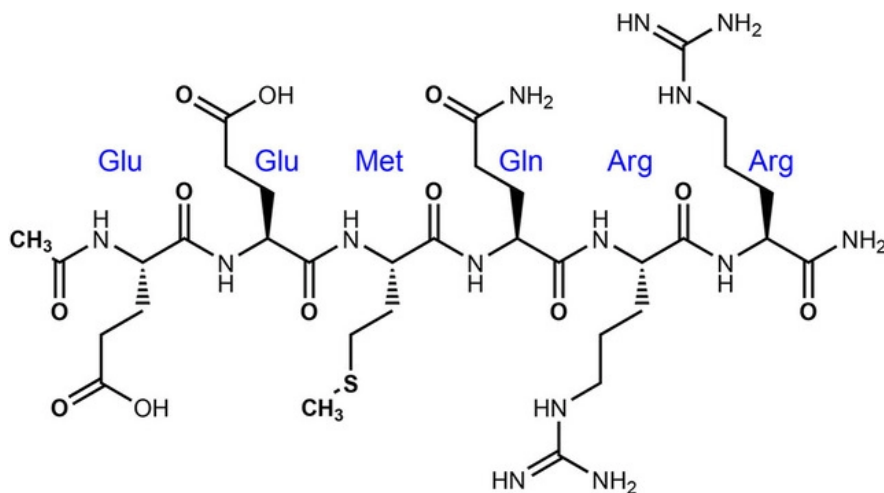
Peptidy izolované z kvasničných extraktů – jedná se například o extrakty z fermentace *Saccharomyces cerevisiae*, u kterých bylo prokázáno, že dokáží zlepšovat hojení ran. Tato schopnost je přičítána zlepšení syntézy kolagenu a zvýšení spotřeby kyslíku v buňkách. Jeden ze známých peptidů, který je izolovaný z kvasničného extraktu je Hexapeptid-11, jenž má aminokyselinovou sekvenci *Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro*. Tato aminokyselinová sekvence byla nalezena v různých proteinech včetně proteinů, které souvisí se stresem nebo proteostázou. U Hexapeptidu-11 bylo prokázáno, že nevykazuje žádnou toxicitu vůči fibroblastům, potlačuje předčasné stárnutí způsobené oxidačním stresem a zlepšuje pružnost pokožky (Sklirou a kol., 2015).

1.4 Argirelin

Argirelin je syntetický peptid, který je odvozen od *N*-terminálního konce proteinu SNAP-25. Jeho vznik je výsledkem snahy najít méně toxickou, syntetickou verzi botulin-neurotoxinu typu A. Je prokázáno, že tento peptid zlepšuje vzhled existujících vrásek a působí preventivně proti jejich rozvoji. Dosavadní studie ukazují, že Argirelin má významný účinek proti vráskám, je bezpečný a je dobře snášen. Důležitým pozitivním faktorem je i jeho dobrá prostupnost kůži (Wang a kol., 2013).

1.4.1 Složení a vlastnosti

Argirelin je krátký peptid, známý pod názvem acetylhexapeptide-3 (WHO Drug dictionary) nebo acetylhexapeptide-8 (INCI). Pod názvem Argireline ho vyrábí společnost Lipotec (Kluczyk a kol., 2021). Strukturální vzorec Argirelinu je uveden na Obr. 1



Obrázek 1 Chemická struktura Argirelinu (Kluczyk a kol., 2021)

Bylo potvrzeno, že účinky acetylhexapeptidu-3 jsou podobné účinkům botulinového neurotoxinu, a to díky tomu, že acetylhexapeptide-3 napodobuje *N*-terminální konec proteinu SNAP-25 k jehož inhibici vlivem působení botulotoxinu dochází. Ve srovnání s botulotoxinem je však acetylhexapeptid-3 mnohem méně toxický a díky tomu může být aplikován lokálně, každodenně, prostřednictvím pleťových krémů. V *in vitro* studiích bylo prokázáno, že acetylhexapeptid-3 proniká kůží a díky studiím *in vivo* byl prokázán jeho vliv na syntézu kolagenu (Raikou a kol., 2017).

1.4.2 Mechanismus účinku

Argirelin působí tak, že inhibuje uvolňování neurotransmiterů v neuromuskulárním spojení (Wang a kol., 2013). Při uvolňování neurotransmiterů z neuronů dochází ke kontrakci svalů. Jedná se o proces, který je zprostředkován proteinem receptoru SNAP, který přispívá k tvorbě komplexu SNARE. Komplex SNARE indukuje uvolňování acetylcholinu do synapse mezi svalem a nervem, což vede ke svalové kontrakci (Kluczyk a kol., 2021). Argirelin brání tvorbě rozpustného *N*-ethylmaleimidového proteinu, který je důležitý pro vytvoření komplexu SNARE a tím pádem nedojde ke spojení vezikul v neuromuskulární junkci a nenastane kontrakce svalu. Tímto mechanismem Argirelin inhibuje opakující se kontrakci mimických svalů v obličeji a díky tomu dochází k redukci hyperkinetických linií (Wang a kol., 2013).

1.4.3 Použití

Acetylhexapeptid-3 je účinnou látkou, která působí proti projevům stárnutí. Vykazuje pozitivní účinky při snížení anizotropie kůže v obličeji. Dále se doporučuje ke každodennímu používání po aplikaci injekčního botulotoxinu při léčbě *blepharospasmu*, kdy prodlužuje jeho účinek (Raikou a kol., 2017). Použití Argirelinu v kosmetických formulacích a průkaz jeho účinnosti v klinických studiích jsou dále uvedeny v kap. 3.

2 BIOINŽENÝRSKÉ METODY STUDIA POKOŽKY

Kůže je největším zevním orgánem lidského těla. Vytváří ochrannou bariéru, která organismus chrání před mechanickým poškozením, znečištěním z životního prostředí a před ztrátou vody. Zásadní ochrannou funkci má zevní vrstva epidermis zvaná *Stratum corneum* (SC). U člověka je SC tvořena třemi hlavními lipidy, a to ceramidy z 50 %, volnými mastnými kyselinami z 25 % a cholesterolem z 25 %. K monitorování složení a vlastností mezibuněčných lipidů bylo zavedeno několik *in vivo* metod. Posouzení stavu kůže je možné provést pomocí různých parametrů, jako jsou transepidermální ztráta vody (TEWL), úroveň hydratace, elasticita pokožky, množství kolagenu, obsah melaninu, mazu a pH. Uvedené neinvazivní metody lze definovat jako postupy, při kterých nedochází k žádné újmě, změně struktury nebo funkce a je zachována integrita organismu. V dnešní době jsou neinvazivní techniky často využívány ke stanovení fyziologických vlastností pokožky a charakterizaci kožní bariéry (Ariffin a Hasman, 2020).

2.1 Hydratace pokožky

Hydratace pokožky je jedním z důležitých parametrů, který slouží k posouzení ochranné funkce epidermis. Její dostatečná hydratace má vliv na celkové zdraví a vzhled kůže (Ariffin, a Hasman, 2020). Hydratace pokožky je nezbytná pro správnou funkci procesů, které v kůži probíhají (např. buněčný metabolismus) a pro normální deskvamaci a zrání SC. Bariérová funkce SC souvisí s jejím jedinečným fyzikálně-chemickým složením a strukturou několika vrstev korneocytů (zploštělé a zrohovatělé keratinocyty, které neobsahují buněčné jádro), které jsou suspendovány v extracelulární lipidové matrici (Westermann a kol., 2020). Metody měření hydratace kůže můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi přímé metody řadíme metody, které jsou založeny na měření kapacity, vodivosti a impedance. Nepřímé metody, které můžeme využít k měření hydratace, jsou echografie, nukleární magnetická rezonance NMR nebo spektrofotometrie.

V této práci bude měření hydratace prováděno pomocí přístroje Corneometer®. Tento přístroj pracuje na principu fungování kondenzátoru. Kondenzátor je systém, který se skládá ze dvou kovových desek, které jsou odděleny dielektrikem. V dielektriku se hromadí a uchovává elektrický náboj, tato vlastnost vyjadřuje elektrickou kapacitu (Tosti a Hexsel ed., 2013, str.17). Princip fungování je založen na korelaci mezi obsahem vody v kůži a elektrickou kapacitou (Ariffin a Hasman, 2020). Corneometr je v literatuře označován za nejcitlivější přístroj k hodnocení obsahu vody v pokožce. SkinUp® je další přístroj, který se

používá ke stanovení úrovně hydratace pokožky. Principem měření je skutečnost, že hydratované tkáně mají menší elektrický odpor, což usnadňuje průchod elektrického proudu. Toto zařízení je však méně používané a není tolik zmiňované ve vědecké literatuře. Jeho výhodou je podstatně nižší cena (Westermann a kol., 2020).

Hydrataci pokožky ovlivňují různé faktory, jako je věk, pohlaví a povrchová teplota kůže. Měření hydratace může být ovlivněno teplotou okolního vzduchu, relativní vlhkostí vzduchu a přímé proudění vzduchu, což je potřeba při měření vzít v úvahu (Ariffin a Hasman, 2020).

2.2 Ztráta vody přes epidermis (TEWL)

Transepidermální ztráta vody (TEWL) je definována jako množství vody, které prochází přes SC v důsledku snahy o minimalizaci koncentračních gradientů mezi pokožkou a vzduchem (Johnsen a kol., 2008). Hodnoty TEWL poskytují informaci o bariérové funkci *epidermis*. Nízké hodnoty TEWL ukazují na správnou bariérovou funkci pokožky, a naopak vysoké hodnoty TEWL ukazují sníženou funkci kožní bariéry, která může být příčinou vzniku různých kožních onemocnění (Ariffin, a Hasman, 2020).

TEWL je možné měřit pouze nepřímými metodami. Tyto metody zjišťují tok vodní páry ve vzduchu nad SC. V praxi jsou nejčastěji využívány otevřená komůrková metoda a uzavřená komůrková metoda. Jedním z nejpoužívanějších zařízení, který byl k měření použit i v této práci je přístroj Tewameter®. Tento přístroj pracuje se sondou, kterou je otevřená komůrka. Sonda se přiloží na kůži a měří tlak par ve dvou různých výškách. TEWL pak odpovídá rozdílu těchto dvou naměřených hodnot (Tosti a Hexsel, 2013, str. 17). Jedná se o metodu, která poskytuje měření s minimálním dopadem na vyšetřovanou pokožku a nízké statistické zkreslení (Ariffin a Hasman, 2020). Dalším přístrojem určeným k měření TEWL je analyzátor elektrolytické vlhkosti Meeco, který pracuje na principu uzavřené smyčky a je naplněn suchým plynným dusíkem. Zařízení, které využívá systém uzavřené komůrky je například Vapometer®. Výhoda této metody je eliminace vlivů okolního prostředí. Tato metoda může být prováděna pomocí sondy s neodvětranou komůrkou nebo sondou s kondenzační komůrkou. Pomocí všech těchto zařízení je možné vyhodnotit bariérovou funkci SC, ale pro každodenní praktické použití jsou poměrně finančně náročné (Kikuchy a kol., 2017).

2.3 Elasticita pokožky

Kůže reprezentuje vlastnosti viskoelastického materiálu, kde elasticou složku zastupují elastinová a kolagenová vlákna a viskózní složku představuje tkáňová voda a v ní suspendované látky. Proteinová vlákna vytváří síť, která zajišťuje tuhost a pružnost kůže, proto má na kvalitu kůže vliv množství a složení těchto proteinových vláken. Vlivem stárnutí dochází k degradaci elastinových a kolagenových vláken, a proto je elasticita pokožky jedním z faktorů, podle kterých je možné hodnotit úroveň stárnutí pokožky (Kim a kol., 2018).

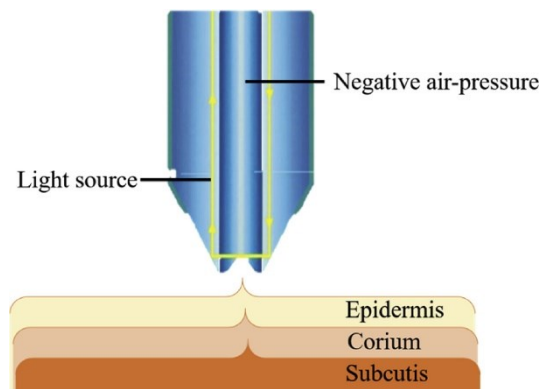
Mechanické vlastnosti kůže mohou být hodnoceny podle její tloušťky a podle kvality pokožky, škály a podkožního vaziva. Během stárnutí dochází v kůži ke změnám, jako je ztráta elasticity, snížení tloušťky *epidermis* a snížení obsahu kolagenu, což má za následek tvorbu vrásek a pigmentových skvrn (Ariffin a Hasman, 2020).

V současné době je dostupné množství různých nástrojů a metod pro neinvazivní měření biomechanických vlastností kůže, mezi které patří i elasticita. Většina technik je založena na principu působení kroutivé síly, tahové síly, vibrací, akustických rázových vln nebo působení podtlaku (Kim a kol., 2018).

Jedním z přístrojů, kterým je možné hodnotit elasticitu pokožky je Cutometer®. Tento přístroj pracuje na principu působení podtlaku a měření míry deformace kůže, kterou tento podtlak způsobí. Dochází k měření pružnosti horní vrstvy kůže pomocí podtlaku, který mechanicky deformuje pokožku a míra deformace je detekována optickým měřicím systémem (Ariffin, a Hasman, 2020).

Dalším přístrojem, který umožňuje stanovení míry elasticity pokožky je Skinfibrometer®. Přístroj funguje na principu měření indurace (ztvrdnutí) kůže. Na kůži je pomocí zkušebního tělíka (indentor o délce 1 mm) vyvíjen tlak a kůže i podkožní tkáň této působící síle do určité míry odolávají. Měřením se určí hodnota indurace, ze které se poté vyhodnotí pevnost/pružnost tkáně. Jedná se o relativně novou metodu, která zatím není dostatečně odzkoušena v klinických studiích (Kim a kol. 2018).

V některých studiích je elasticita hodnocena pomocí přístroje Elastimer, který měří míru odolnosti kůže a změnu jejího tvaru při působení vnější síly. Přístroj se skládá z indentoru, referenční desky a vestavěných snímačů síly a sondy. Sonda se přikládá na povrch kůže doporučeným standardním tlakem. Indentor vyvolává konstantní deformaci a pružnost kůže je dána odolností vůči této deformaci (Palmieri a kol., 2020).



Obrázek 2 Ilustrace principu měření Cutometerem (Ariffin a Hasman, 2020)

2.4 pH pokožky

Hodnota pH pokožky vypovídá o kvalitě hydrolipidového filmu. To, jaké má kůže pH ovlivňuje její ochrannou schopnost proti mikroorganismům, rovnováhu v propustnosti látek do a z kůže a také integritu pokožky. Z toho důvodu může vést změna pH ke snížení bariérové funkce pokožky (Ariffin a Hasman, 2020). Zdravá pokožka má přirozeně kyselé pH. Jeho hodnota se může lišit podle různých faktorů, jako jsou věk, pohlaví či produkce kožního mazu. Hodnotu pH může být rovněž ovlivněna hygienou a použitím kosmetických přípravků. Na regulaci hodnoty pH mají vliv i produkty degradace fillagrinu, kyselina urokanová, fosfolipáza A2 a další (Adawiyah a Choon, 2020).

Měření pH pokožky má v dermatologii zásadní význam, protože povrchová kyselost je důležitou součástí kožního ekosystému. Pomocí měření pH je možné charakterizovat onemocnění, jako jsou atopická dermatitida nebo xeroderma a hodnotit i účinnost jejich léčby. Mezi nejčastější techniky používané ke zjištění pH patří potenciometrie, cyklická voltmetrie nebo elektrochemické sensory. Při využití potenciometrie ke stanovení pH kůže se tradičně používá skleněná membránová elektroda, která má své nevýhody, jako je teplotní závislost a křehkost skleněné membrány. Jak hodnota pH, tak celkový redoxní stav kůže může být stanoven cyklickou voltmetrií s platinovou mikroelektrodou (Ruffien-Ciszak a kol., 2008). Jedním z přístrojů vhodných ke stanovení hodnoty pH je např. PH Meter® PH 905. Tento přístroj se skládá z ploché sondy a voltmetru, které jsou propojeny a je navržen speciálně pro stanovení hodnot pH pokožky (Ariffin, a Hasman, 2020).

2.5 Měření hloubky vrásek

Ke sledování účinnosti kosmetických přípravků na potlačování projevů stárnutí pokožky, konkrétně na redukci hloubky vrásek jsou používány nejrůznější techniky. (Isik a kol., 2013). Hloubku vrásek, celkový reliéf a texturu kůže lze obtížně zhodnotit pouze vizuálně. Za tímto účelem vzniklo množství metod pro objektivní posouzení těchto parametrů. Metody hodnocení stavu vrásek můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin na přímé a nepřímé. Nepřímé metody jsou prováděny *in vitro* a jsou založeny na měření profilu otisku kůže. Pro získání otisku se nejčastěji používají různé typy silikonů. Z této kategorie metod je jedním z přístrojů Skinvisiometer®, který pracuje na principu Lambert-Beerova zákona. Při měření tímto přístrojem dochází k měření tloušťky kolmému otisku profilu kůže. Vyhodnocení se provádí pomocí *chargé-coupled device* (CCD) kamery. Použití nepřímých metod není příliš komfortní a jsou citlivé ke zkreslení při nesprávném provedení otisku. Z tohoto důvodu jsou v současnosti preferovány přímé metody *in vivo*. Mezi přímé metody řadíme fotografické metody, které pracují na principu 2 D fotografií nebo metody, které fungují na principu technologie aktivní obrazové triangulace. Při této metodě dochází k nasvícení povrchu snímaného objektu světelným zdrojem a zároveň je povrch snímán CCD kamerou. Je vytvořen tzv. triangulační trojúhelník a triangulační báze, ze kterých je možné určit hloubku vrásky (Tosti a Hexsel ed., 2013, str. 10).

Jedním z přístrojů, kterým je možné hodnotit hloubku vrásek je Visioscope®. Tento přístroj se skládá z kamery s USB rozhraním a software Complete Skin Investigation – CSI. Princip fungování Visioscopu spočívá v kombinaci zdroje polarizovaného světla a zdroje křížově polarizovaného světla, díky čemuž je možné sledovat určité oblasti pokožky v detailech a je možné hodnotit nejen strukturu pokožky, ale i hlubší vrstvy kůže. Následně je možné posoudit hloubku vrásek, velikost pórů, přítomnost skvrn, množství mazu a deskvamaci (Isik a kol., 2013).

V této práci je diagnostika stavu vrásek prováděna pomocí přístroje Visioface®1000 D. Tento přístroj osvětluje obličej bílou světelnou diodou a snímá obličej fotoaparátem s rozlišením se 14 miliony pixelů a vytváří fotografie, které lze pomocí softwaru CSI zpracovat a porovnávat (Courage a Khazaka, 2016, Visioface).

3 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Tato část diplomové práce shrnuje poznatky z odborných článků, které se týkají problematiky, kterou se tato práce zabývá. Jsou zde uvedeny výsledky z publikovaných studií, ve kterých byly používány kosmetické formulace s obsahem Argirelinu.

Ve studii z roku 2017 Raikou a kolektiv posuzovali synergické působení acetylhexapeptidu-3 (Argirelinu) a tripeptidu citrulinu (Decorinyly). Hodnocení stavu vrásek před a po aplikaci těchto peptidů na pokožku prováděli pomocí přístroje Skin Visioscan a hodnocení TEWL pomocí přístroje Tewameter. Posoudili i subjektivní vnímání dobrovolnic po aplikaci studovaných peptidů. Studie se zúčastnilo 24 dobrovolnic ve věku 30-60 let (průměrný věk 45 let). První skupina používala formulaci, která obsahovala kombinaci Argirelinu a tripeptidu citrulinu. Druhá skupina obdržela formulaci, která obsahovala tripeptid citrulin, třetí skupina formulaci s Argirelinem a čtvrté skupině byla poskytnuta formulace bez aktivních látek (placebo). Argirelin byl ve formulacích obsažen v koncentraci 10 % w/w a Decorinyl v koncentraci 5 % w/w. Přidělenou formulaci ženy používaly 2× denně po dobu 60 dnů na čelo a periorbitální oblast. Během studie dobrovolnice používaly jen studovanou formulaci a přestaly používat jiné kosmetické přípravky. Bylo jim poskytnuto stejné čisticí pleťové mléko a v případě potřeby směly použít opalovací krém.

Hlavním cílem studie bylo získat informace o možném synergickém účinku mezi Argirelinem a Decorinylem měřením vrásek v oblasti čela a periorbitální oblasti. Výsledky této studie potvrzují účinnost acetylhexapeptidu, který v 10% koncentraci snížil hloubku vrásek až o 30 % po 30 dnech požívání. Při použití acetylhexapeptidu-3 bylo také prokázáno statisticky významné snížení TEWL. I když účinnost tripeptidu citrulinu nebyla v předešlých klinických studiích potvrzena, tato studie prokázala, že citrulin zlepšuje mikrotopografii kůže a zlepšuje funkci dermis, ale je potřeba jeho dlouhodobějšího používání. Studie rovněž prokázala bezpečnost a nízký iritační potenciál obou peptidů. Výsledky testování naznačují možné synergické působení obou peptidů, ale pro jednoznačnou odpověď, jestli skutečně synergicky působí, budou potřeba další studie (Raikou a kol., 2017).

V roce 2013 provedli Wang a kolektiv studii, ve které zkoumali vliv Argirelinu na zmenšení hloubky vrásek. Studie se zúčastnilo 60 dobrovolníků s hlubokými až středními periorbitálními vráskami. Studie byla dvojitě zaslepená, randomizovaná a placebem kontrolovaná ve dvou paralelních skupinách, ve kterých byli dobrovolníci ošetřeni buď

Argirelinem nebo placebem. Dobrovolníkům z obou skupin byly Argirelin nebo placebo aplikovány na periorbitální oblast dvakrát denně po dobu 4 týdnů. Argirelin byl podáván v emulzi typu olej-voda (o/v) v koncentraci 10 % bez konzervačních látek. Placebem byla samotná emulze typu o/v.

Po čtyřech týdnech používání bylo provedeno subjektivní i objektivní vyhodnocení výsledků. Subjektivní hodnocení bylo provedeno pomocí Daniellovy klasifikace a posouzení vzhledu periorbitálních linií podle metody Seemana. Objektivní vyhodnocení bylo provedeno pomocí silikonových otisků hodnocené oblasti před a po aplikaci Argirelinu, resp. placeba. Silikonové otisky byly vyhodnoceny pomocí přístroje Skin Visiolinie VL 650 principem konfokální laserové skenovací mikroskopie. Pomocí tohoto přístroje byly vyhodnoceny parametry vrásek, jako jsou drsnost a hloubka. Výsledky Wangovy studie ukazují, že po aplikaci Argirelinu došlo ke zlepšení vzhledu vrásek ve všech parametrech, které oproti placebo činilo 48 %. To naznačuje významnou aktivitu Argirelinu proti vráskám. Důležitým aspektem této studie je i skutečnost, že u žádného dobrovolníka nebyly po použití tohoto tripeptidu zaznamenány nežádoucí vedlejší účinky (Wang a kol., 2013).

Další studii, která se zabývá účinností Argirelinu uskutečnili v roce 2015 Tadini a kolektiv. V této studii stanovili účinnost Argirelinu na redukci vrásek pomocí biofyzikálních metod. Studie se zúčastnilo 40 dobrovolníků, kterým byla aplikována formulace s Argirelinem o koncentraci 10 % nebo bez něj po dobu čtyř týdnů na volární část předloktí a na obličej. Tato dvě místa byla vybrána z toho důvodu, že kůže na předloktí není tolik vystavena působení slunečního záření a není namáhána svalovými kontrakcemi. Dobrovolníkům bylo doporučeno, aby dva týdny před a po dobu aplikace Argirelinu nepoužívali žádné jiné kosmetické produkty, kromě přípravků na čištění pleti a aby nevystavovali kůži UV záření. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí přístrojů Corneometer, Cutometer a Reviscometer. Díky těmto přístrojům bylo možné hodnotit hydrataci, pružnost a viskoelasticitu pokožky. Hydratace pokožky byla hodnocena pomocí korneometru. Výsledky ukazují, že aplikace formulace s Argirelinem po dobu čtyř týdnů nezvyšuje obsah vody ve SC v porovnání s kontrolní formulací. Data získaná prostřednictvím přístroje Reviscometer ukazují, že formulace s Argirelinem významně zlepšuje anizotropii (míra uspořádání) pokožky. V závěru této studie je uvedeno, že kosmetické přípravky s Argirelinem jsou vhodné ke zlepšení vzhledu stárnoucí kůže (Tadini a kol., 2015).

Zajímavá studie byla publikována v roce 2020 a Palmiery a kol. se v ní zabývají vlivem Argirelinu na redukci a zlepšení vzhledu jizev a změn na kůži po chirurgických zákrocích a po léčbě nádorových onemocnění. Studie se zúčastnilo 26 dobrovolnic ve věku 23–63 let, které trpěly chronickými jizvami, vzniklými po léčbě nádorového onemocnění nebo jako důsledek chirurgického zákroku. Dobrovolnicím byl aplikován gel s obsahem 10% Argirelinu pod obchodním názvem Instant Ageback. Dalšími složkami aplikovaného gelu byly: voda, křemičitan sodný, křemičitan hořečnatohlinitý, propylenglykol, fenoxylethanol, ethylhexylglycerin. Gel byl ženám aplikován vždy prostřednictvím zdravotnického pracovníka.

Po aplikaci gelu s Argirelinem byly hodnoceny parametry jako je hydratace, pružnost a množství kožního mazu. Hydratace byla měřena před a po ošetření tímto gelem. Hodnocení probíhalo pomocí hydratační sondy. Pružnost kůže byla posuzována pomocí přístroje Elastimer, jehož princip je podrobněji popsán v kap. 2.3 této práce. K měření množství mazu byl použit Sebumeter.

Z výsledků studie vyplývá, že po aplikaci gelu s Argirelinem došlo k výraznému zvýšení pružnosti kůže, mírnému snížení hydratace a výraznému snížení množství kožního mazu na postižené oblasti oproti oblasti okolní zdravé kůže. I z fotografií dobrovolníků, které byly pořízeny před a po léčbě je viditelné prokazatelné zlepšení vzhledu jizev a kožních defektů. Studie rovněž ukazuje pozitivní vliv Argirelinu na redukci vrásek, váček, tmavých skvrn a rozšířených pórů a dokumentuje liftingový efekt tohoto přípravku (Palmiery a kol., 2020).

Studie z roku 2015, kterou provedli Hoppel a kol., byla věnována vlivu vehikula kosmetické formulace na penetraci Argirelinu do SC. V této studii byla porovnávána schopnost pronikání Argirelinu z násobné emulze typu v/o/v (voda/olej/voda) ve srovnání s jednoduchými emulzemi typu o/v a v/o. Emulze typu v/o/v byla připravena pomocí přírodních povrchově aktivních látek, jejichž koncentrace byla 4 %. Ke stabilizaci emulzí o/v a v/o byly použity povrchově aktivní látky na bázi cukrů. Experiment sledující postup Argirelinu kůží byl prováděn *in vitro* pomocí difuzních buněk Franzova typu. Jako kožní model byla použita prasečí kůže (uši), která byla vybrána pro svou podobnost s lidskou kůží, co se týká tloušťky *epidermis*, lipidového složení a propustnosti. Pro hodnocení propustnosti byla vybrána metoda stripování páskou. Páska byla nalepena na kůži a po odtržení bylo množství korneocytů kvantifikováno NIR denzitometrií. Obsah Argirelinu v každém stripu byl analyzován pomocí LC-MS-MS.

Výsledky studie ukazují, že Argirelinu prostupuje rychleji a ve větším množství z emulze v/o/v a o/v a u emulze v/o nebyl prostup SC detekován. I díky statistické analýze je průkazné, že rozdíly v penetraci Argirelinu z různých typů emulzí jsou významné.

Autoři této studie vysvětlují lepší propustnost z emulzí typu v/o/v a o/v vysokým obsahem vody, která podporuje prostup Argirelinu kůží. Naopak špatnou penetraci z emulze v/o vysvětlují usazením oleje na povrchu kůže a vytvořením bariéry pro hydrofilní peptid.

Z výsledků této studie vyplývá, že typ a složení emulze mají velký vliv na průnik Argirelinu do kůže (Hoppel a kol., 2015).

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium účinků kosmetických přípravků, které obsahují aktivní látku Argireline, na pokožku. Pro splnění cíle byly provedeny dílčí studie, ve kterých bylo úkolem

- stanovit vliv koncentrace Argirelinu (5 % a 12,5 %) v jednoduchém nosiči (karbomerový gel) na hydrataci, TEWL, elasticitu a redukci vrásek;
- stanovit vliv Argirelinu v komerčně vyráběném přípravku na výše uvedené charakteristiky pokožky a srovnat jeho účinek s přípravkem obsahujícím jiné kosmeceuticky aktivní látky (ceramidy, retinol, arganový olej);
- porovnat účinnost Argirelinu v gelové formulaci s jeho účinností v komerčně vyráběném přípravku.
- Porovnat výsledky zjištěné pomocí přístroje Visioface (hloubka vrásek stanovená fotografickou metodou) s výsledky získanými pomocí přístroje Visiometer (hloubka vrásek získaná metodou otisku kůže).

PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLY A METODIKA

5.1 Použité materiály

- Argireline® (Lipotec SAU, Španělsko)
- Carbomerový gel neutralizovaný triethanolaminem (M+H, s.r.o.)
- Euxyl PE 9010 (Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin) (AC Trade spol. s.r.o.)
- Jarischův roztok:
 - *Složení: Acidum boricum, Glycerolum, Aqua purificata, Methylparabenum, Propylparabenum, Methylparabenum*
- Dermabotexin krém noční (Syncare plus, s.r.o.)
 - *Složení dle INCI: Aqua, Cyclopentasiloxane, Dibutyl Adipate, Dimethiconol, Bis-PEG/PPG-14/14 Dimethicone, Propylene Glycol, Algae Extract, Dimethicone, Magnesium Sulfate, Cera Alba, Paraffin, Acetyl Hexapeptide-3, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin*
- Renovia noční výživný krém (Syncare plus, s.r.o.)
 - *Složení dle INCI: Aqua, Cyclomethicone, Ethylhexyl Stearate, Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone, Glycerin Sodium Chloride, Argania Spinosa Kernel Oil, Oenothera Biennis Oil, Hydrogenated Castor oil, Retinyl Palmitate, Cera Alba, Rosmarinus Officinalis Oil, Hyaluronic Acid, Ceramide 3, Coenochloris Signiensis Extract, Maltodextrin, Lecithin, Isocetyl Alcohol, Cetyl Alcohol, Aurantium, Cymbopogon Citratus, Sesamum Indicum, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin)*
- Modelové karbomerové gely s obsahem Argirelinu 5 a 12,5 %.
 - Gely byly připraveny v laboratořích společnosti Syncare a jejich složení je uvedeno v Tabulce 1

Tabulka 1 Složení gelů s Argirelinem

Koncentrace Argirelinu (%)	Množství carbomeru (g)	Hmotnost roztoku Argirelinu (g)
5	350	19
12,5	350	51

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- Visioface® 1000 D (COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Germany)
 - MPA stanice se sondami
 - Tewameter® TM Hex Probe
 - Corneometer® CM 825
 - MPA CTplus Software (vše COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Germany)
 - Multi skin test center® MC 750
 - Sonda k detekci elasticity
- CSI Software (vše COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH, Germany)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky z plastu;



Obrázek 3 Přístrojové vybavení: zprava Visioface, PC se softwar, MPA stanice s Corneometrem a Tewametrem a Multi skin test center se sondou na detekci elasticity

5.3 Dobrovolnice

Studie byla rozdělena do dvou částí. Každé části se zúčastnilo deset zdravých žen ve věku od 25 do 65 let. V první části testování (Studie I) byl věkový průměr žen 47 let a medián 50 let. V druhé části testování (Studie II) byl věkový průměr žen 43,8 let a medián 39,5 let. Před testováním obdržely všechny ženy informace, které se týkaly organizace a průběhu měření. Dále všechny ženy vyplnily Dotazník pro účastníka měření (Příloha 1), na jehož základě bylo rozhodnuto, zda se mohou testování zúčastnit. Podepsaly Individuální informovaný souhlas (Příloha 2) a Prohlášení účastníka (Příloha 3). Po ukončení testování vyplnily účastnice Dotazník kosmetické péče, kde mimo jiné hodnotily subjektivní pocity stavu pleti před a po aplikaci modelových formulací s Argirelinem (Příloha 4). Ve Studii II dobrovolnice hodnotily v dotazníku subjektivní pocity stavu pleti před a po aplikaci komerčně vyráběných přípravků Renovia a Dermabotexin (Příloha 5). Všechny dobrovolnice byly poučeny, že v den měření a večer před měřením nesmí používat žádný kosmetický přípravek kromě produktů určených k čištění pleti. V průběhu období obou studií, kdy si dobrovolnice aplikovaly formulace s Argirelinem, byly instruovány, aby nepoužívaly žádné jiné kosmetické produkty do očního okolí a na místa aplikace testovaných formulací. Výběr dobrovolnic byl proveden v souladu s principy mezinárodní etické směrnice pro biomedicínský výzkum zahrnující lidské účastníky.

5.4 Metodika testování

Testování bylo rozděleno do dvou částí. V první části (Studie I) obdržely dobrovolnice modelové formulace s Argirelinem, které byly připraveny v laboratořích Syncare a obsahovaly pouze Argirelin, carbomerový gel a byly konzervovány Euxylem PE 9010. Formulace byly dobrovolnicím poskytnuty ve dvou koncentracích (5 a 12,5 %), které představují množství základního roztoku Argirelinu o koncentraci (0,05 %). Gel s Argirelinem byl rozplněn do lahviček s dávkovačem, čímž byla zajištěna aplikace jednotné dávky. Gel s 5% koncentrací Argirelinu si dobrovolnice aplikovaly na pravou oblast očního okolí a gel s 12,5% koncentrací si aplikovaly na levou oblast očního okolí, dvakrát denně, po dobu jednoho měsíce.

Ve druhé části testování (Studie II) dobrovolnice obdržely komerční přípravky vyráběné společností Syncare, noční krém Dermabotexin a noční výživný krém Renovia. Krémy byly rozplněny z velkého balení pro profesionální použití do lahviček s aplikátorem. Na pravou část obličeje – periorbitální oblast a nosoretní rýhu si ženy aplikovaly noční krém

Dermabotexin s aktivní látkou Argireline a na levou část obličeje noční výživný krém Renovia, který jako hlavní aktivní látky obsahuje ceramidy, retinyl palmitát a kyselinu hyaluronovou. Tyto přípravky si dobrovolnice aplikovaly dvakrát denně, po dobu jednoho měsíce.

Před zahájením aplikace argirelinových formulací a komerčně vyráběných krémů byla všem dobrovolnicím měřena hydratace pokožky, úroveň transepidermální ztráty vody TEWL a stav elasticity pokožky. Úroveň TEWL byla hodnocena pomocí přístroje Tewameter a stav hydratace byl stanoven pomocí přístroje Corneometer. Tyto přístroje byly napojeny na MPA stanici a výsledky byly vyhodnoceny pomocí software (SW) MPA CT plus. Ke zjištění úrovně elasticity byl použit přístroj Multi skin test center se sondou k detekci elasticity a software CSI. Všechny dobrovolnice byly rovněž diagnostikovány pomocí přístroje Visioface, který snímá obličej digitálním fotoaparátem s vysokým rozlišením 14×10^6 pixelů. Stejným měřením byly dobrovolnice podrobeny po měsíční aplikaci testovaných vzorků. Před měřením bylo oční okolí vždy očištěno Jarischovým roztokem.

Ve Studii I byla pomocí přístrojů sledována periorbitální oblast, na kterou byly aplikovány argirelinové formulace. Ve Studii II byla diagnostikována jak periorbitální oblast, tak i oblast nasolabiální rýhy, na které byly aplikovány komerčně vyrobené přípravky.

Testování probíhalo při teplotě 22 ± 2 °C při relativní vlhkosti 50–60 %.

5.5 Měření hydratace pokožky

Úroveň hydratace pokožky byla všem dobrovolnicím měřena v oblasti očního okolí a oblasti nosoretní rýhy pomocí korneometru. Korneometrická sonda byla mírným tlakem přikládána dobrovolnicím na sledovaná místa a výsledky odečteny pomocí SW. Výsledky jsou v SW interpretovány pomocí relativních korneometrických jednotek. Toto měření bylo provedeno vždy na začátku studie a po měsíční aplikaci gelu s Argirelinem nebo komerčně vyráběných krémů. Stupnice použitá pro vyhodnocení hydratace pokožky je uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 2 Stupnice pro vyhodnocení korneometrických měření (Courage a Khazaka, 2016, Corneometer)

Typ kůže	Hydratace (c.j.)
Velmi suchá	< 30
Suchá	30–45
Normální	> 45

5.6 Měření TEWL

Hodnoty TEWL, které vypovídají o stavu kožní bariéry byly měřeny pomocí přístroje Tewameter. Měření pomocí sondy pro stanovení TEWL bylo provedeno v oblasti očního okolí a nosoretní rýhy následujícím způsobem. Po přiložení byla sonda na měřené oblasti ponechána nejprve asi 10 sekund, než se hodnota TEWL ustálila, a teprve poté byla odečtena hodnota transepidermální ztráty vody. Sonda byla na každou oblast přiložena 5 ×. Úroveň TEWL byla vykazována v jednotkách g/m²/h. Interpretace hodnot použitých pro vyhodnocení stavu TEWL je uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3 Interpretace měření TEWL pomocí přístroje Tewameter (Courage a Khazaka, 2016, Tewameter)

Interpretace	Hodnoty TEWL (g /m ² /h)
Velmi dobrý stav	0–9
Dobrý stav	10–14
Normální stav	15–25
Napjatý stav	26–29
Kritický stav	Nad 30

5.7 Měření elasticity pokožky

Elasticita pokožky byla stanovena pomocí kutometrické sondy, která náleží ke stanici Multi skin test center, a byla vyhodnocena pomocí softwaru CSI. Sonda pracuje na principu sání a sleduje nejen schopnost kůže odolávat aplikovanému podtlaku, ale i její schopnost vrátit se do původního stavu. Měření bylo prováděno přikládáním sondy do očního okolí a oblasti nasolabiální rýhy.

5.8 Hodnocení stavu vrásek

Hodnocení stavu vrásek bylo provedeno pomocí přístroje Visioface, který funguje jako velmi přesný fotoaparát. Obličej každé dobrovolnice byl vyfotografován před a po aplikaci testovaných vzorků. Pořízení fotografií probíhalo tak, že dobrovolnice vložila hlavu do přístroje Visioface a byla pořízena její fotografie zepředu, z pravého a levého boku. Při kontrolním fotografování provedeném po měsíční aplikaci testovaných přípravků bylo díky

záznamu v SW možné, aby byl obličej dobrovolnice zobrazen přesně ve stejné poloze a se stejnou intenzitou osvětlení, což umožnilo přesné porovnání změn stavu vrásek. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí SW CSI. Na fotografiích byla označena sledovaná vráska a program zaznamenal její objem, povrch a hloubku před a po aplikaci studovaných formulací.

5.9 Statistické zpracování

Hydratace pokožky

Z každé sledované oblasti bylo získáno pět hodnot hydratace (korneometrické jednotky, c.j.) a byl z nich vypočítán aritmetický průměr (Rovnice 1) a směrodatná odchylka (Rovnice 2). Údaje byly zpracovány do grafu a byly vyhodnoceny pomocí Studentova párového t-testu. Za statisticky významné byly považovány hodnoty na hladině významnosti $P < 0,05$. Hodnoty byly zpracovány pomocí SW CT Plus a výpočty byly provedeny v Excelu. Hodnoty měření byly zpracovány jako celek (data zaznamenaná u všech dobrovolnic) a dále rozděleny do dvou skupin, a to výsledky pro skupinu žen do 50 let a výsledky u žen nad 50 let. Z výsledků byly sestrojeny grafy. V prvním grafu je vždy pro každou studii porovnána hydratace před a po aplikaci formulací u všech dobrovolnic a v druhém a třetím grafu je zvlášť uvedena skupina žen pod 50 let a nad 50 let.

TEWL

Z každé sledované oblasti bylo získáno pět hodnot TEWL ($\text{g/ m}^2/\text{h}$), ze kterých byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Údaje byly zpracovány a vyhodnoceny obdobně jako v případě měření hydratace.

Elasticita pokožky

Sonda kutometru byla na každé z měřených míst přiložena $5\times$ a pro odečtení hodnoty ji bylo nutné ponechat při každém měření přiloženou 5 až 10 sekund, než přístroj zaznamenal hodnotu elasticity. Z každé oblasti bylo získáno pět hodnot, z nich byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Údaje byly opět zpracovány do grafu a byly vyhodnoceny pomocí Studentova párového t-testu obdobným způsobem jako ve výše uvedených testech. Vyhodnocení elasticity a zpracování dat bylo však provedeno pouze pro Studii I. Z technických důvodů (porucha na přístroji) nebylo možné elasticitu hodnotit ve Studii II.

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

Rovnice 1 je \bar{x} aritmetický průměr, N počet měření a x_i hodnota měření.

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

Rovnice 2 je S směrodatná odchylka, N počet měření, \bar{x} aritmetický průměr a x_i hodnota měření

Hloubka vrásek

Pro každou z dobrovolnic byly získány pomocí SW přístroje Visioface hodnoty hloubky vrásek před a po čtyřtýdenním používání formulací ze Studie I a Studie II. Vzhledem k povaze získaných dat byl pro hodnocení změn v hloubce vrásek použit Wilcoxonův test. Tento test se používá pro hodnocení párových pokusů, kdy sledovaná veličina neodpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Srovnává dvě měření provedená u jednoho výběrového souboru. Test vychází z párových hodnot dvou měření na jednom výběrovém souboru a zjišťuje rozdíly mezi párovými hodnotami. Za statisticky významné jsou považovány rozdíly na hladině významnosti ($p < 0.05$) (Bedáňová a Večerek, 2019).

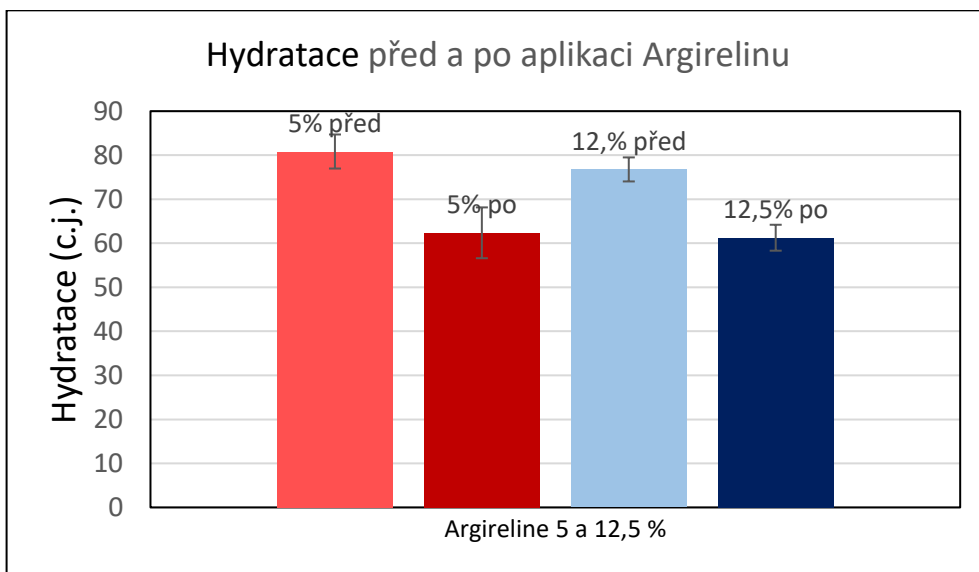
6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Hodnocení hydratace

Hydratace pokožky dobrovolnic byla nejdříve sledována před a po aplikaci modelové kosmetické formulace, kterou byl karbomerový gel s 5 a 12,5% obsahem Argirelinu (Studie I). Tento gel neobsahovat žádné jiné kosmetické ingredience. V další studii pak byla hodnocena hydratace před a po aplikaci komerčních kosmetických přípravků Dermabotexin a Renovia (Studie II). Prvním cílem práce bylo zjistit stav hydratace pokožky po měsíční aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu a porovnat, jestli vyšší koncentrace této aktivní látky pozitivně ovlivní hydrataci pokožky. Dalším cílem práce bylo zjistit, jestli existuje rozdíl po aplikaci modelového gelu s Argirelinem a komerčního přípravku Dermabotexin, který kromě Argirelinu obsahuje i další kosmeticky aktivní ingredience. Konečně pak bylo provedeno srovnání působení kosmeceutické látky Argirelinu zapracované do komerčního krému s jinými kosmeceutickými látkami (ceramidy, retinol, kyselina hyaluronová), které jsou součástí přípravku Renovia. Hydratace byla porovnána jak u skupiny deseti dobrovolnic, tak i zvlášť u skupiny žen do 50 let a skupiny žen nad 50 let.

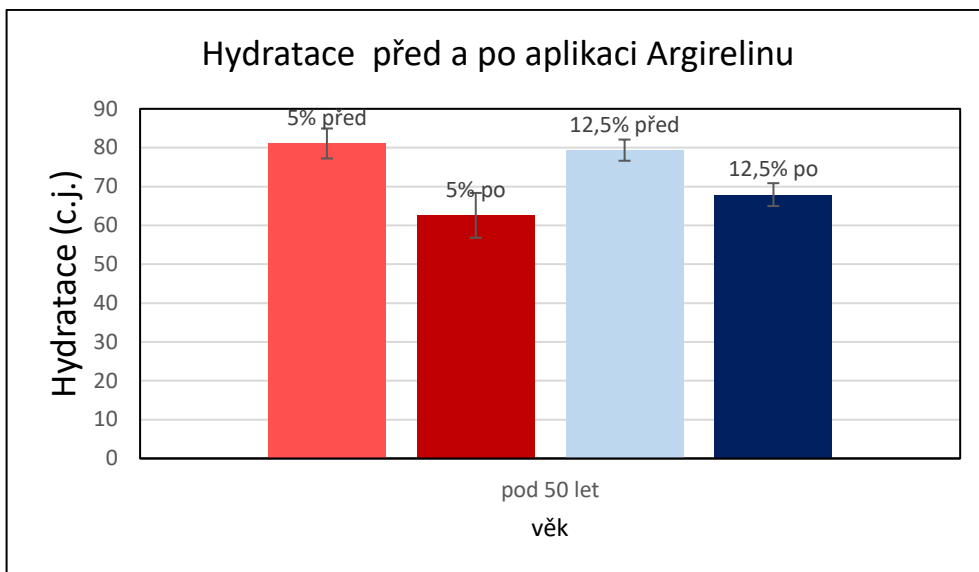
6.1.1 Gel s 5 a 12,5 %Argirelinu

Na Obrázku 4 je uvedeno srovnání hydratace gelové formulace s dvěma koncentracemi Argirelinu pro celý soubor dobrovolnic. Obrázky 5 a 6 pak znázorňují změny hydratace u žen ve věku vyšším a nižším než 50 let. Tato věková hranice byla zvolena proto, že kolem padesátého roku nastupuje u žen menopauza doprovázená hormonálními změnami v jejich organismu. Jedním z průvodních jevů těchto změn jsou, mimo jiné, i změny v kvalitě pokožky. Dochází k degradaci kolagenových a elastinových vláken a celkovému ztenčení kůže a v důsledku toho i k prohloubení vrásek a ztrátě plnosti a pružnosti kůže (Park, 2022).



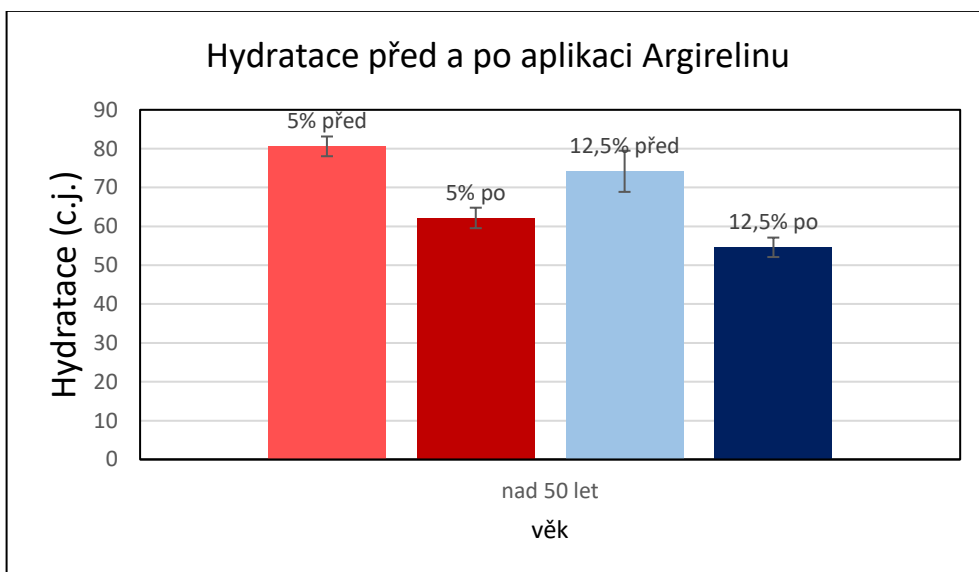
Obrázek 4 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u všech dobrovolnic

Z Obrázku 4 je zřejmé, že stav hydratace pokožky po aplikaci 5 i 12,5% formulace s Argirelinem se dobrovolnicím po měsíčním používání zhoršil. Je to zřetelné z grafu a potvrzují to i statistické výpočty Studentova párového t-testu. Statisticky významné zhoršení hydratace pokožky nastalo po aplikaci obou formulací. Uvedená měření byla potvrzena i pozorováním, kdy většina dobrovolnic v závěrečném dotazníkovém šetření uvádí pocity pnutí a svědění, nedostatek hydratace a výživy poté, co gelové formulace používaly po dobu jednoho měsíce.



Obrázek 5 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen mladších než 50 let

U skupiny dobrovolnic mladších než 50 let (Obrázek 5) došlo ke zhoršení hydratace po aplikaci obou formulací. Ke statisticky významnému zhoršení však došlo pouze u gelu s koncentrací 5 %.



Obrázek 6 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let

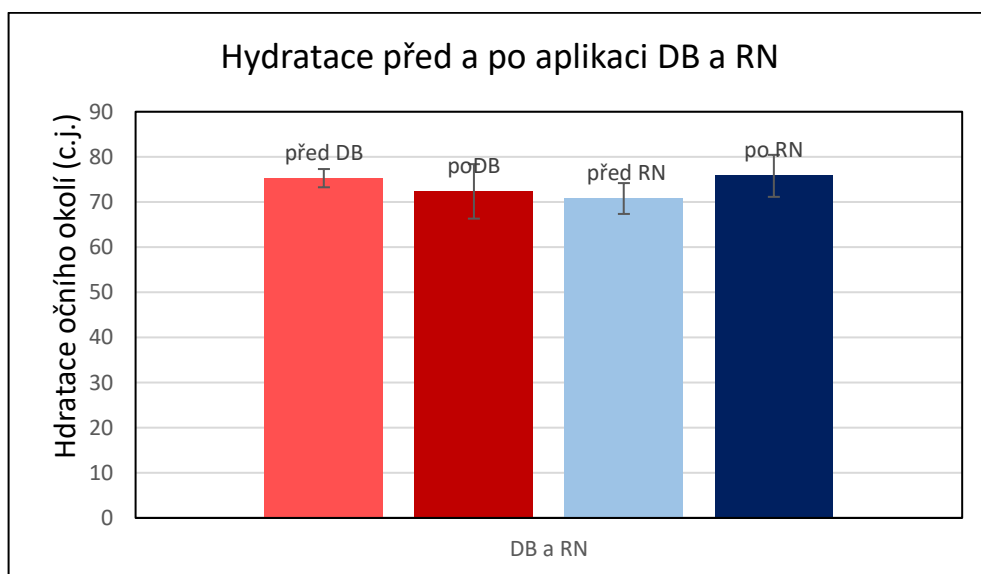
U skupiny dobrovolnic starších než 50 let (Obrázek 6) došlo také ke snížení hydratace pokožky poté, co používaly gel s oběma koncentracemi Argirelinu. Statisticky významné snížení bylo i zde zaznamenáno po aplikaci gelu s nižší koncentrací aktivní látky 5 %. Zajímavé je, že u obou skupin žen významnější pokles hydratace vyvolala nižší koncentrace Argirelinu.

Celkové snížení hydratace pokožky po aplikaci gelů s Argirelinem nastalo pravděpodobně z toho důvodu, že gely obecně pokožku vysušují. Aplikace gelů je vhodná spíše na mastnou pokožku a ne na oční okolí. Oční okolí nemá velké množství mazových žláz, proto je vhodné v péči o ně používat přípravky s obsahem výživných a hydratačních složek.

Srovnání změny stavu hydratace po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu není statisticky významné.

6.1.2 Komerční přípravky Dermabotexin a Renovia

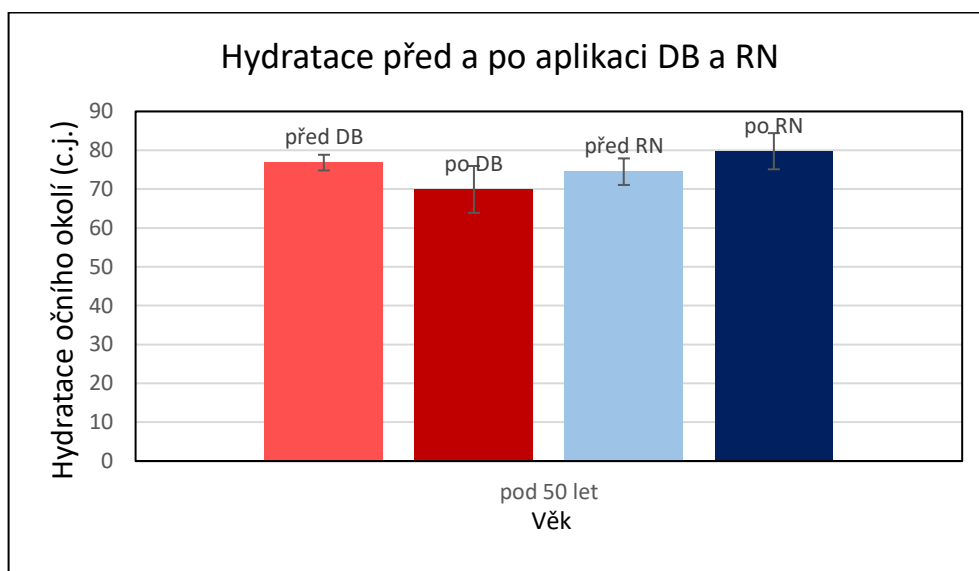
Hydratace pokožky po použití komerčních přípravků Dermabotexin a Renovia byla měřena na dvou oblastech, a to v očním okolí a nosoretní rýze. Výsledky jsou znázorněny na Obrázcích 7, 8 a 9.



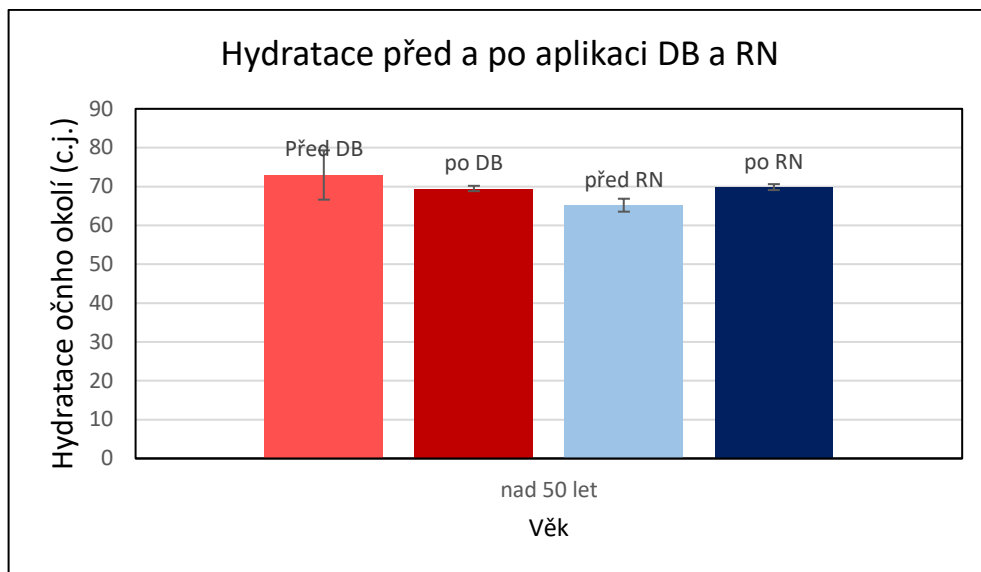
Obrázek 7 Srovnání hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic

Po aplikaci přípravku Dermabotexin na oblast očního okolí došlo k mírnému snížení hydratace, což se shoduje s vlivem gelů s Argirelinem, které hydrataci výrazně snižovaly.

Zhoršení hydratace po aplikaci tohoto komerčního přípravku však není tak výrazné a není statisticky významné jako u gelů s Argirelinem. Je to dáno tím, že Dermabotexin obsahuje i další aktivní látky, které pokožku hydratují (glycerol, propylenglykol) a působí rovněž okluzivně (dimeticon, včelí vosk). Jelikož i přes obsah těchto látek došlo k mírnému zhoršení hydratace, dá se předpokládat, že kosmeceutikum Argirelin hydrataci zhoršuje a je proto potřeba, aby komerční kosmetické formulace s Argirelinem obsahovaly také dostatek dalších vhodných složek, které budou hydrataci pokožky zvyšovat. Naopak po aplikaci přípravku Renovia došlo ke zvýšení hydratace, což je v souladu s obsahem aktivních látek, jako je kyselina hyaluronová a arganový olej, které mají na zvýšení hydratace pozitivní vliv. Stejně výsledky ukazuje i měření hydratace pokožky u žen v obou sledovaných věkových skupinách, mladších i starších než 50 let (Obrázky 8 a 9).



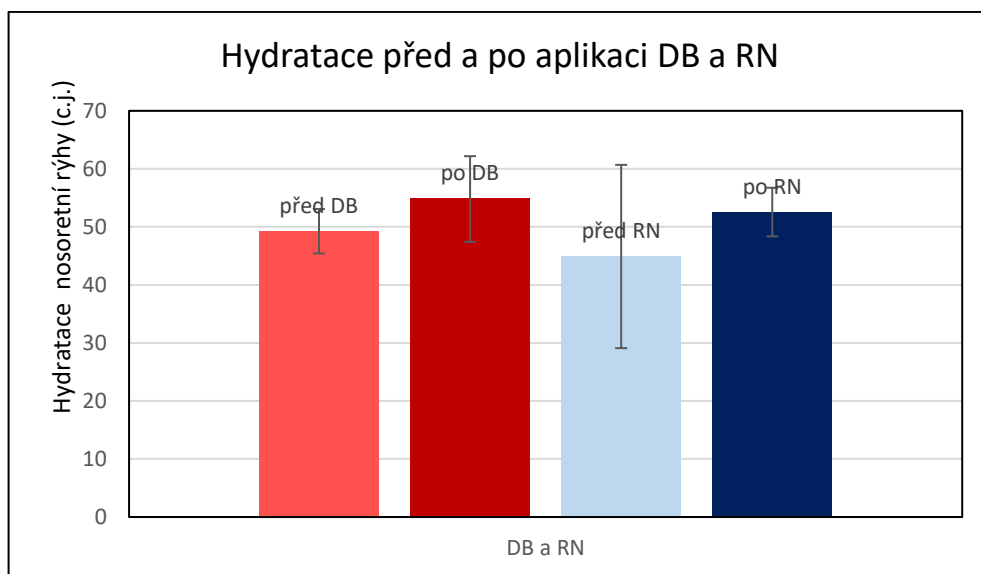
Obrázek 8 Hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny pod 50 let



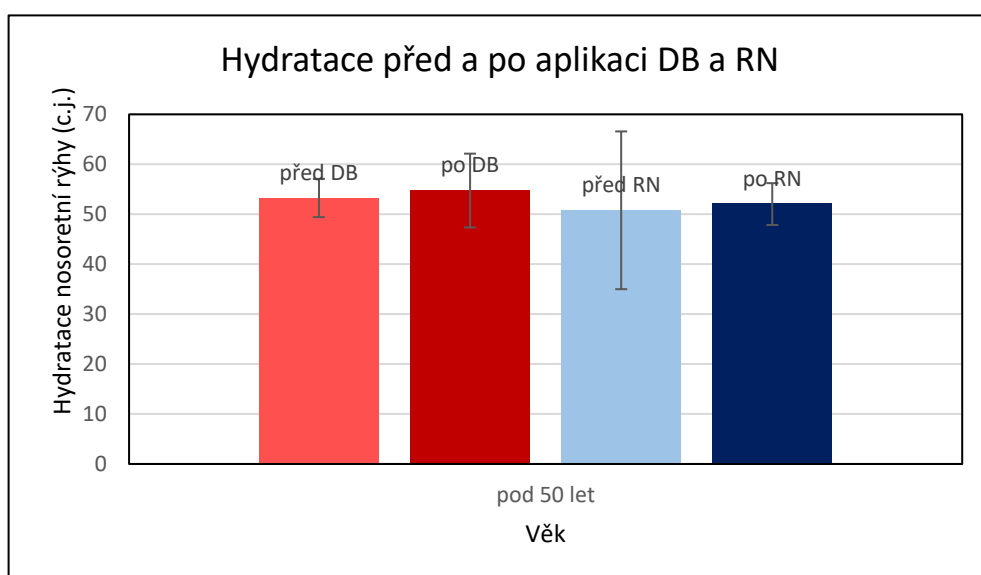
Obrázek 9 Hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny nad 50 let.

Po aplikaci přípravků Dermabotexin a Renovia do oblasti nosoretní rýhy byla situace odlišná (Obrázek 10). Na tomto místě pokožky naopak došlo v obou případech ke zlepšení hydratace. Zlepšení hydratace po aplikaci Dermabotexinu v oblasti nosoretní rýhy, který hydrataci v oblasti očního okolí zhoršil, můžeme vysvětlit tím, že oblast nosoretní rýhy je na rozdíl od oblasti očního okolí bohatá na mazové žlázy a kůže zde není tak tenká. Po aplikaci přípravku Renovia došlo i zde ke zlepšení hydratace, které je statisticky významné. Jak již bylo zmíněno výše, tato skutečnost je dána obsahem hydratačních aktivních látek v tomto přípravku (ricinový olej, kyselina hyaluronová, glycerol).

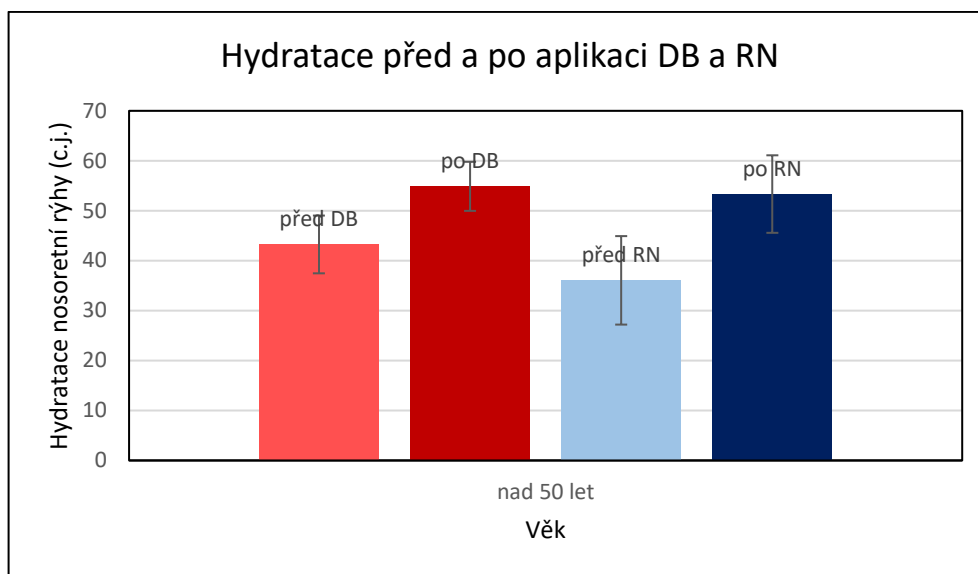
Z Obrázku 11 a 12, kde jsou data uvedena pro dobrovolnice rozdělené do věkových skupin pod 50 a nad 50 let, je zřejmé, že k podstatně výraznějšímu zlepšení hydratace došlo u skupiny žen starších než 50 let; po aplikaci přípravku Renovia je u této skupiny žen zlepšení hydratace statisticky významné.



Obrázek 10 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic



Obrázek 11 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny pod 50 let



Obrázek 12 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny nad 50 let

Celkový stav hydratace byl podstatně vyšší v oblasti očního okolí oproti oblasti nosoretní rýhy. Podle stupnice pro vyhodnocení korneometrických měření (Tabulka 2) měly všechny dobrovolnice stav hydratace v oblasti očního okolí vyšší než 45 c.j., tedy normální. V oblasti nosoretní rýhy byly hodnoty hydratace stanovené na pokožce některých z dobrovolnic v oblasti, která udává, že je pokožka suchá (30-40 c.j.).

Při srovnání výsledků publikovaných studií, které se zabývají Argirelinem a jeho vlivem na hydrataci pokožky, s výsledky této diplomové práce je možné nalézt korelaci se závěry studie, kterou uskutečnili v roce 2020 Palmiery a kol. (Palmiery a kol., 2020). V této práci si dobrovolnice aplikovaly na pokožku formulaci s 10% Argirelinem a došlo u nich k mírnému snížení hydratace. U dobrovolnic, které se účastnily testů provedených v rámci diplomové práce došlo po aplikaci gelu s 12,5 % Argirelinu rovněž k mírnému snížení hydratace. K výraznějšímu, statisticky významnému zhoršení hydratace, došlo po aplikaci 5% gelu s Argirelinem. Další studií, která se zabývá vlivem Argirelinu na stav hydratace pokožky, je práce z roku 2015, kterou uskutečnili Tadini a kol. (Tadini a kol., 2015). Podle výsledku této studie používání formulace s obsahem 10% Argirelinu nemá na stav hydratace pokožky žádný vliv.

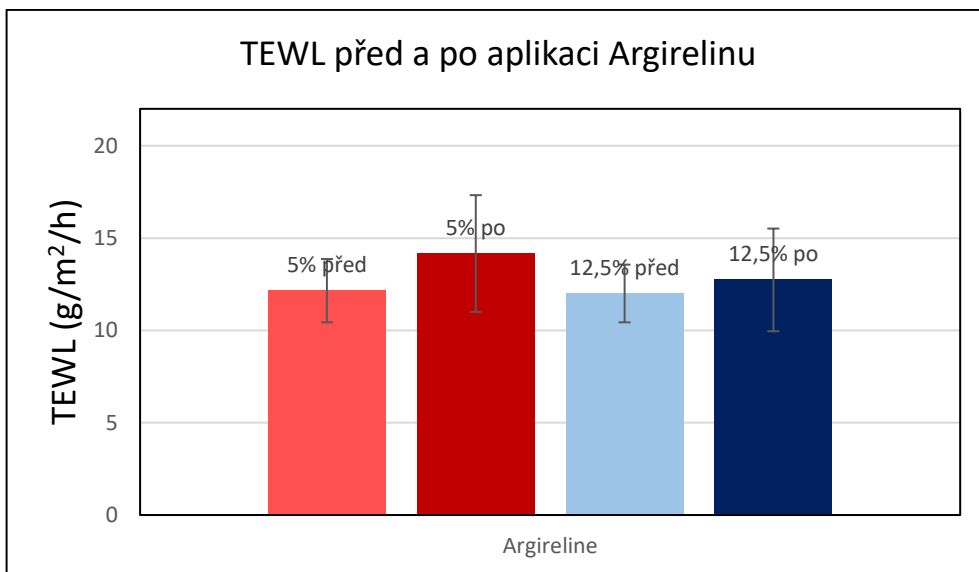
6.2 Hodnocení TEWL

Kosmetické přípravky, které jsou schopné omezit ztrátu vody přes *epidermis*, jsou důležitými formulacemi s pozitivním vlivem na funkci kožní bariéry. Z tohoto důvodu byly hodnoty TEWL sledovány i v této diplomové práci.

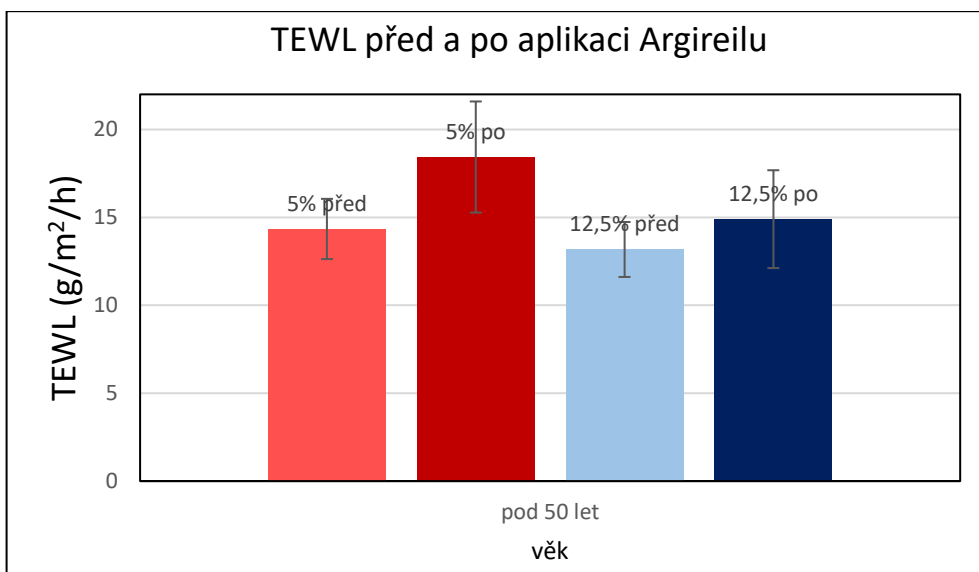
6.2.1 Gel s obsahem 5 a 12,5 % Argirelinu

Z grafu na Obrázku 13 je patrné, že po aplikaci gelů s Argirelinem došlo k mírnému nárůstu TEWL, který ale není statisticky významný. Tento výsledek koreluje s výsledkem zhoršení hydratace, protože tyto dva parametry spolu souvisí. Při zvýšení TEWL dochází ke snížení hydratace. Z tohoto důvodu je vhodné do formulací s Argirelinem, zvláště těch, které jsou určeny na oblast očního okolí a pro suchou pokožku, přidávat hydratační, emolienční a okluzivní složky. Pokud jsou naměřené hodnoty srovnány s hodnotami TEWL v Tabulce 3, kde jsou přiřazeny numerické hodnoty TEWL ke stavu pokožky, je možné konstatovat, že i po zvýšení hodnot TEWL je pokožka stále hodnocena jako „normální“.

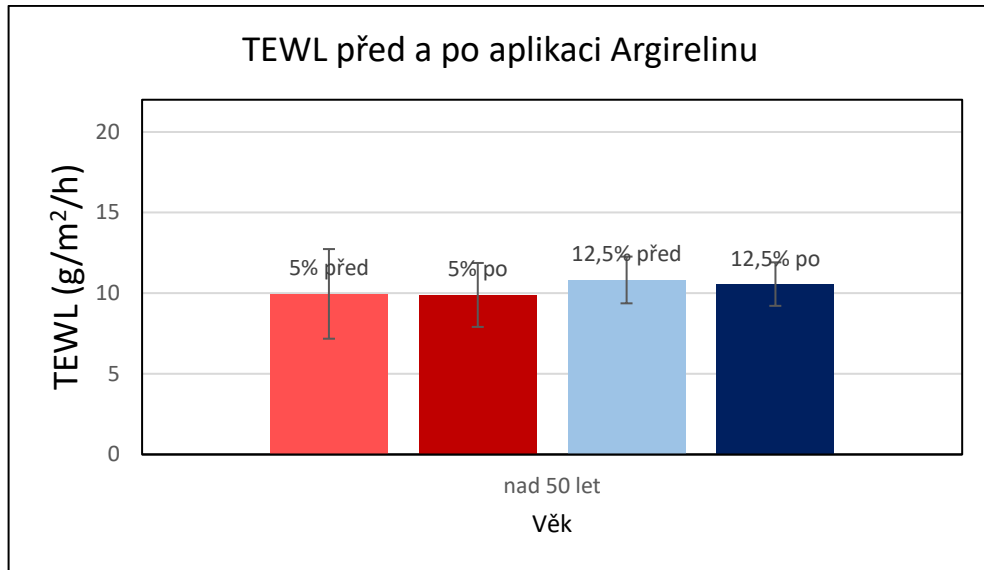
Při hodnocení vlivu gelových formulací s Argirelinem na TEWL lze pozorovat zajímavou skutečnost, pokud se díváme zvláště na hodnoty naměřené u žen starších a mladších než 50 let. U skupiny žen mladších než 50 let dochází k detekovatelnému, ne však statisticky významnému zvýšení TEWL, hlavně po aplikaci 5% argirelinového gelu (Obrázek 14), zatímco u skupiny žen nad 50 let téměř k žádné změně TEWL nedochází (Obrázek 15). Ze srovnání Obrázků 14 a 15 je rovněž patrné, že hodnoty TEWL ve věkové skupině žen starších než 50 let jsou nižší než u žen mladších.



Obrázek 13 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u všech dobrovolnic



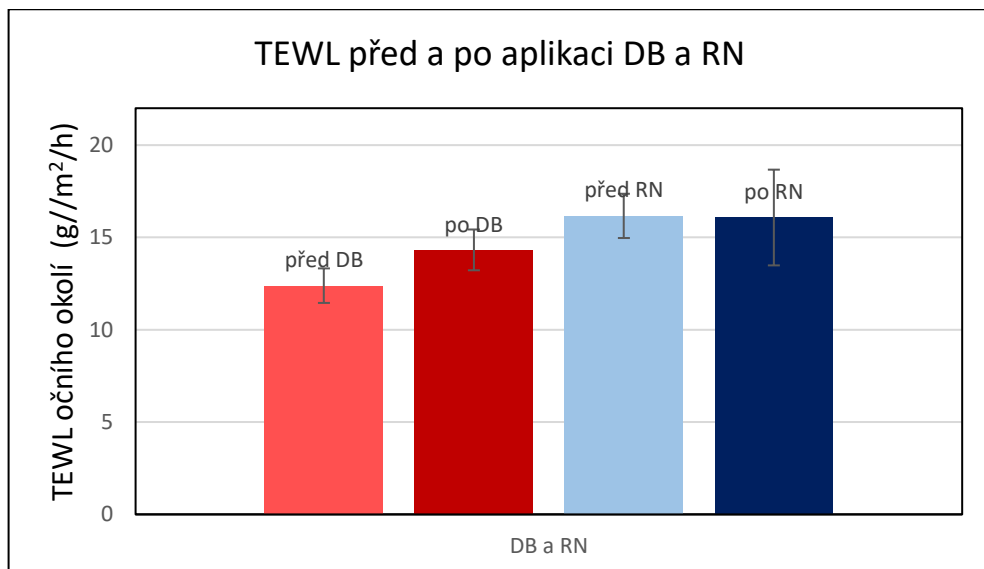
Obrázek 14 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny žen mladších než 50 let



Obrázek 15 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let

6.2.2 Komerční přípravky Dermatotexin a Renovia

Při testování komerčních přípravků Dermatotexin a Renovia byly hodnoty TEWL měřeny ve dvou oblastech pokožky obličeje, a to očním okolí a nosoretní rýze.



Obrázek 16 TEWL očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermatotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic

Po měsíční aplikaci přípravku Dermabotexin do očního okolí došlo k mírnému zvýšení TEWL, které však není statisticky významné. Aplikace přípravku Renovia neměla na hodnoty TEWL žádný vliv (Obrázek 16). Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že přípravek Renovia obsahuje více výživných a hydratačních složek. Z výsledků hodnocení stavu hydratace a TEWL v obou studiích zahrnutých do diplomové práce je patrné, že Argireline obsažený v kosmetických formulacích může zhoršovat v očním okolí úroveň hydratace i TEWL.

Ve studiích, které se zabývají vlivem Argirelinu na pokožku, je jeho vliv na stav TEWL sledován jen omezeně. Jedna ze studií, která se touto problematikou zabývá, byla publikována v roce 2017 Raikou a kol. (Raikou a kol., 2017). Z jejich práce vyplývá, že Argirelin v 10% koncentraci snižuje úroveň TEWL, což není v souladu s výsledky mé diplomové práce, ve které bylo zjištěno, že gel s Argirelinem v koncentraci 12,5 % úroveň TEWL zvyšuje. Toto zhoršení je však mírné a není statisticky významné.

Při porovnání stavu TEWL po aplikaci gelů s Argirelinem a komerčního přípravku Dermabotexin, můžeme sledovat stejný trend mírného zvýšení TEWL. Naproti tomu přípravek Renovia nemá na stav TEWL téměř žádný vliv.

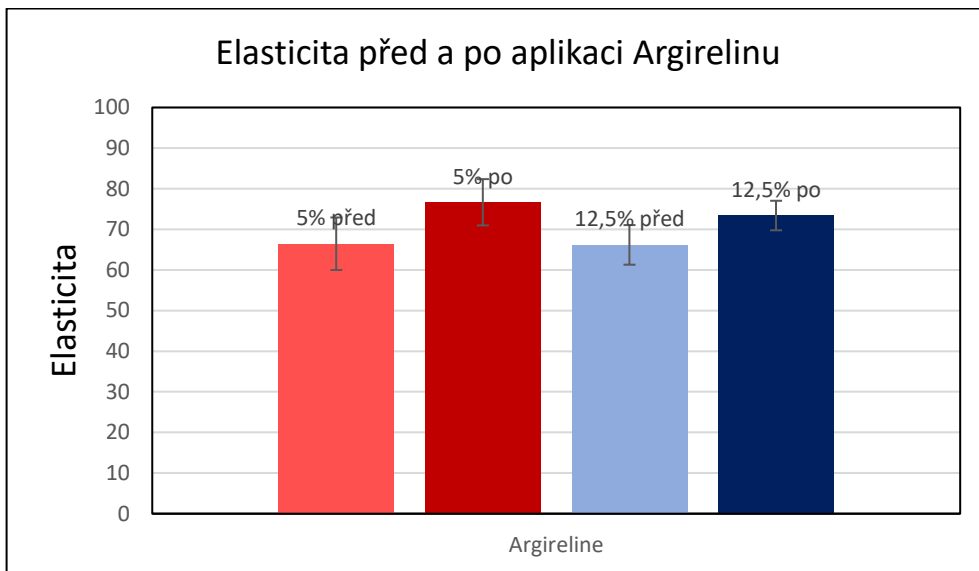
6.3 Hodnocení elasticity pokožky

Elasticita je velmi důležitým parametrem stavu pokožky a souvisí se stavem vrásek, a proto byla rovněž posuzována v této diplomové práci.

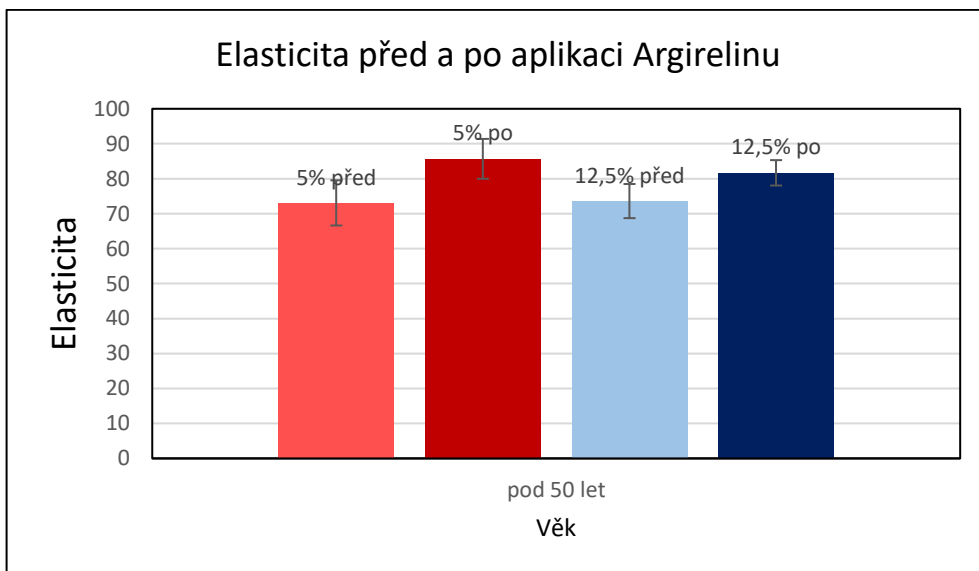
6.3.1 Gel s 5 a 12,5 % Argirelinu

Po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu po dobu čtyř týdnů došlo k výraznému zlepšení elasticity pokožky, což je viditelné v grafu uvedeném na Obrázku 17 a potvrzuje to statistický test, podle kterého je zlepšení elasticity statisticky významné. U jednotlivých věkových skupin dobrovolnic ve věku pod 50 a nad 50 let je zlepšení elasticity rovněž viditelné (Obrázek 18 a 19), avšak v těchto skupinách není statisticky významné. Stav elasticity pokožky má vliv na její celkový vzhled a souvisí se vznikem a viditelností vrásek. Výsledky diplomové práce korelují s výsledky publikovaných studií, které prokazují zlepšení elasticity pokožky po aplikaci Argirelinu. Například studie z roku 2020, kterou realizoval již zmíněný Palmiery a kol., se mimo jiné zabývá měřením elasticity pokožky

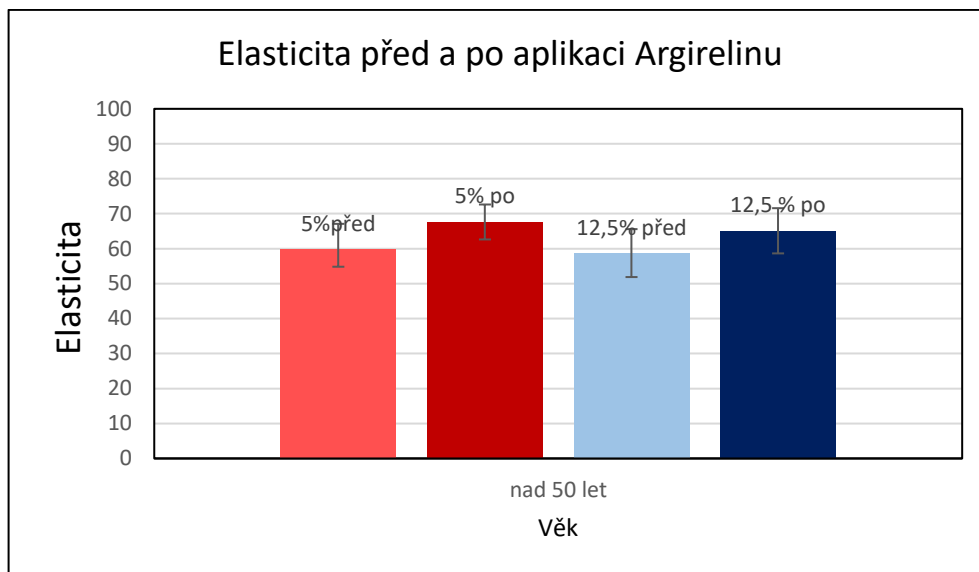
před a po aplikaci formulace s obsahem 10% Argirelinu. V této studii bylo prokázáno výrazné zvýšení elasticity pokožky, což potvrzují i výsledky této diplomové práce.



Obrázek 17 Elasticita před a po aplikaci gelu s obsahem 5 a 12,5 % Argirelinu u všech dobrovolnic



Obrázek 18 Elasticita před a po aplikaci 5% a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny pod 50 let



Obrázek 19 Elasticita před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let

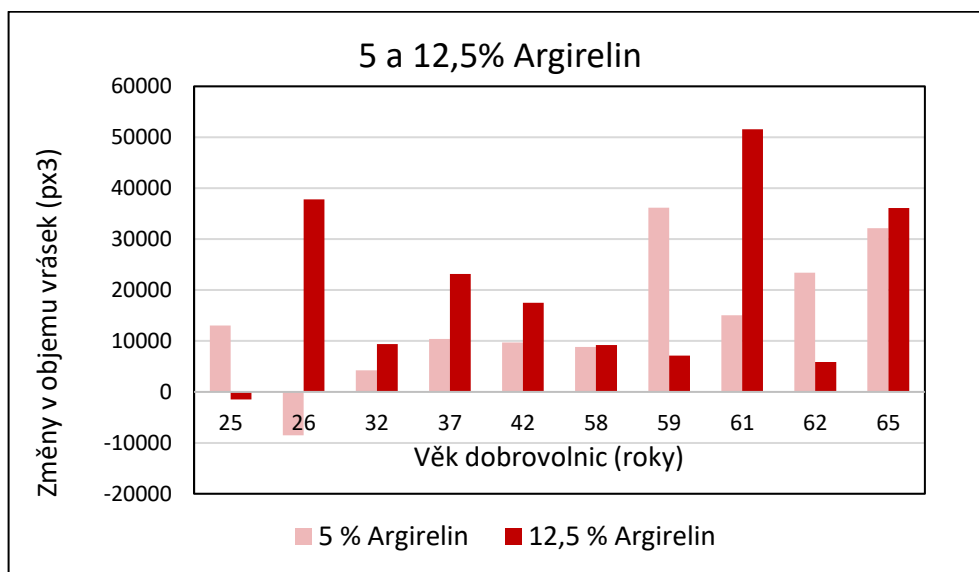
V druhé části studie (Studie II) bylo provedeno pouze počáteční měření, ale z technických důvodů (porucha sondy) nebylo možné provést kontrolní měření a zjistit změnu stavu elasticity po aplikaci komerčních přípravků (Dermabotexin, Renovia).

6.4 Hodnocení stavu vrásek

6.4.1 Gel s 5 a 12,5 % Argirelinu

Pomocí přístroje Visioface bylo možné hodnotit změny ve stavu vrásek pomocí tří parametrů, a to jejich objemu, plochy a hloubky. Pro zpracování jsme po úvodních testech zvolili hodnoty objemu vrásek, jelikož hodnoty povrchu a hloubky vrásek s těmito hodnotami korelovaly.

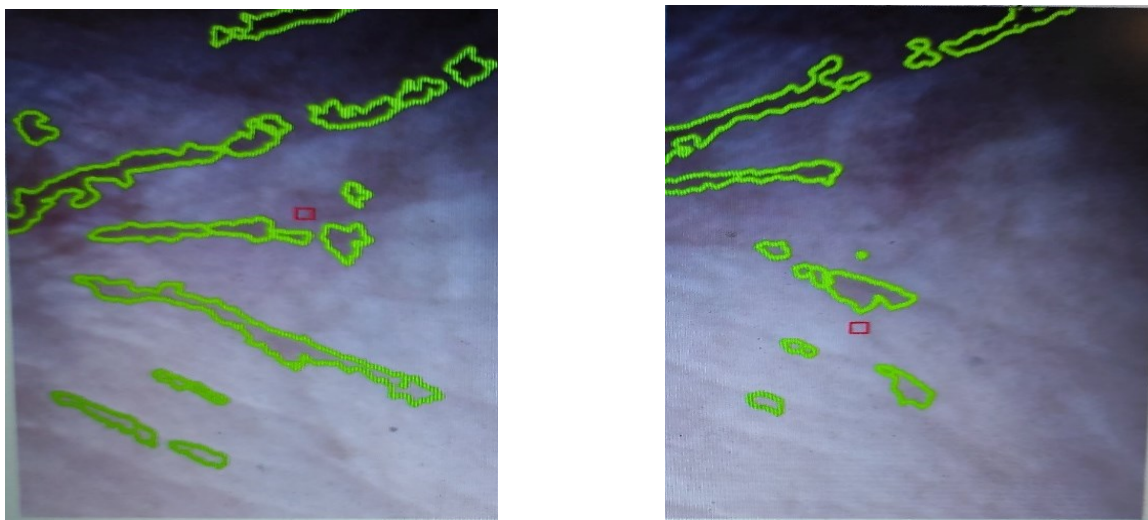
Vzhledem k povaze získaných dat byl pro zpracování těchto výsledků použit Wilcoxonův test pro hodnocení párových pokusů, kdy sledovaná veličina neodpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Data byla zpracována jako celek, tedy souhrnně pro všechny dobrovolnice bez rozdělení do věkových kategorií. Výsledky této části studie jsou představeny jako rozdíly v objemu vrásek před a po aplikaci testovaných přípravků. Kladná hodnota pak představuje zmenšení hloubky vrásek, naopak záporná její zvětšení.



Obrázek 20 Změny v objemu vrásek před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u všech dobrovolnic. Kladná hodnota reprezentuje zmenšení a záporná zvětšení objemu vrásek.

Změny v hloubce vrásek před a po aplikaci gelů s 5 a 12,5 % Argirelinu jsou pro každou dobrovolnici uvedeny na Obrázku 20. Z tohoto grafického znázornění je zřejmé, že po měsíčním používání formulací došlo v obou případech ke zlepšení stavu vrásek. Z Obrázku je rovněž zřejmé, že vliv Argirelinových gelů byl individuální a gely působily na pleť dobrovolnic odlišným způsobem. Ke zhoršení stavu vrásek došlo pouze ve dvou případech, a to jednou po aplikaci gelu s 5 % a jednou s 12,5 % Argirelinu. Účinnost obou formulací potvrdil i statistický test, podle kterého je zmenšení objemu vrásek statisticky významné na hladině významnosti $p < 0.05$. Pokud je zmenšení objemu vrásek vyjádřeno jako průměrná hodnota stanovená z jednotlivých zmenšení zaznamenaných u všech dobrovolnic, tak v případě gelu s 5% Argirelinem činilo toto zlepšení 26 % a u gelu s 12.5 % Argirelinu to bylo 27 %. Statistické vyhodnocení rovněž prokázalo, že mezi působením gelu s 5 a 12,5 % není ve zvolené skupině dobrovolnic staticky signifikantní rozdíl. Vizualizace stavu vrásek před a po aplikaci gelů je uvedena na Obrázku 21.

Data získaná v této diplomové práci byla srovnána s výsledky studií uvedených v Kapitole 3 Současný stav poznání, které se vlivem Argirelinu na stav vrásek zabývají. Při tomto srovnání je možné konstatovat dobrou shodu, jelikož ve všech těchto studiích byl účinek Argirelinu na redukci vrásek potvrzen.

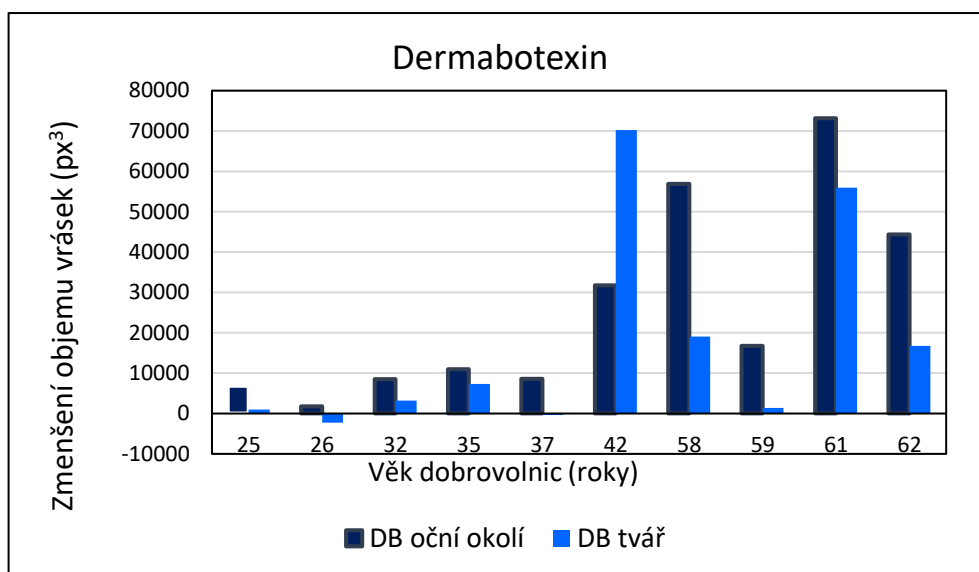


Obrázek 21 Vizualizace stavu vrásek před (vlevo) po (vpravo) aplikaci gelu s 12,5% Argirelinu po 1 měsíci používání u dobrovolnice ze skupiny nad 50 let

6.4.2 Komerční přípravky Dermabotexin a Renovia

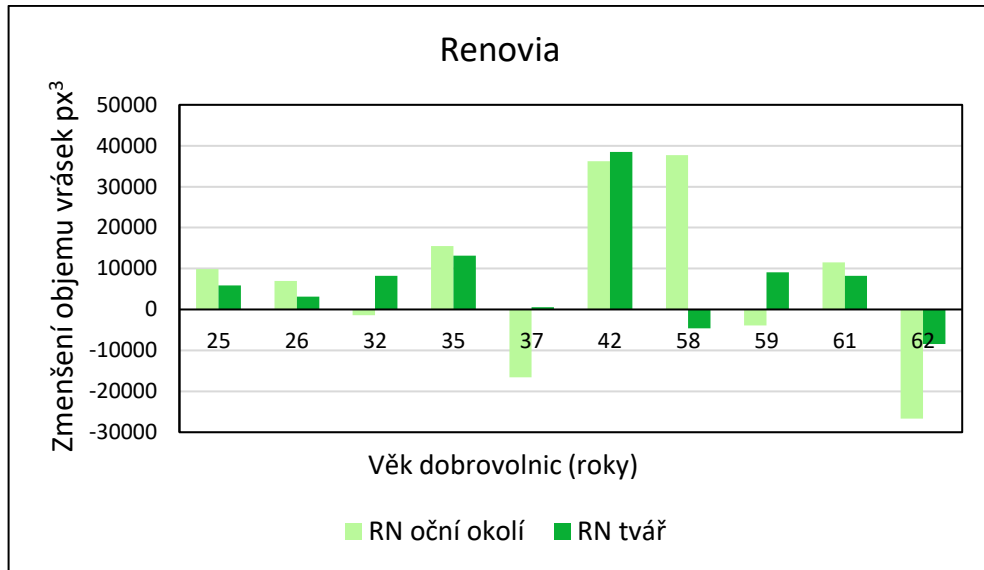
Při hodnocení objemu vrásek v oblasti očního okolí a oblasti nosoretní rýhy je z grafu na Obrázku 22 patrné, že po aplikaci přípravku Dermabotexin došlo k jeho zmenšení v obou sledovaných oblastech. Nejvýraznějšího a statisticky významného výsledku bylo dosaženo po aplikaci tohoto přípravku do oblasti očního okolí.

Data z grafu rovněž naznačují, že u věkové skupiny starších žen dochází ke zmírnění hloubky vrásek výrazněji než u žen mladších. Z této skutečnosti vyplývá, že účinná látka Argireline, obsažená v přípravku Dermabotexin, má vliv na zmírnění vrásek u všech žen, ale efekt je znatelnější u starších žen, které mají vrásky hlubší a viditelnější.



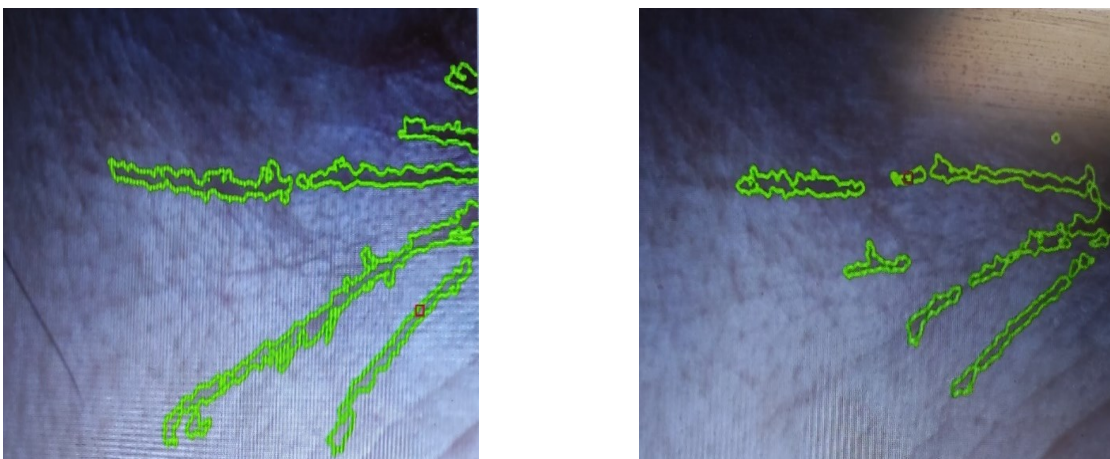
Obrázek 22 Změny v objemu vrásek v oblasti očního okolí a nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravku Dermabotexin (DB) u všech dobrovolnic. Kladná hodnota reprezentuje zmenšení a záporná zvětšení objemu vrásek.

Data znázorňující změnu hloubky vrásek u zvolené skupiny dobrovolnic po měsíční aplikaci přípravku Renovia jsou uvedena na Obrázku 23. Ten ukazuje, že vliv tohoto krému na zmenšení objemu vrásek není jednoznačný, což potvrdilo i statistické zpracování dat, které neprokázalo statisticky významnou změnu po jeho aplikaci (hladina významnosti $p < 0.05$). U čtyř mladších žen (25–35 let) lze po aplikaci tohoto přípravku zmenšení objemu vrásek pozorovat, a to jak v oblasti očního okolí, tak i nosoretní rýhy, avšak u většiny dalších dobrovolnic pozitivní vliv tohoto krému dokumentovat nelze.



Obrázek 23 Zmenšení objemu vrásek v oblasti očního okolí a nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravku Renovia (RN) u všech dobrovolnic. Kladná hodnota reprezentuje zmenšení a záporná zvětšení objemu vrásek.

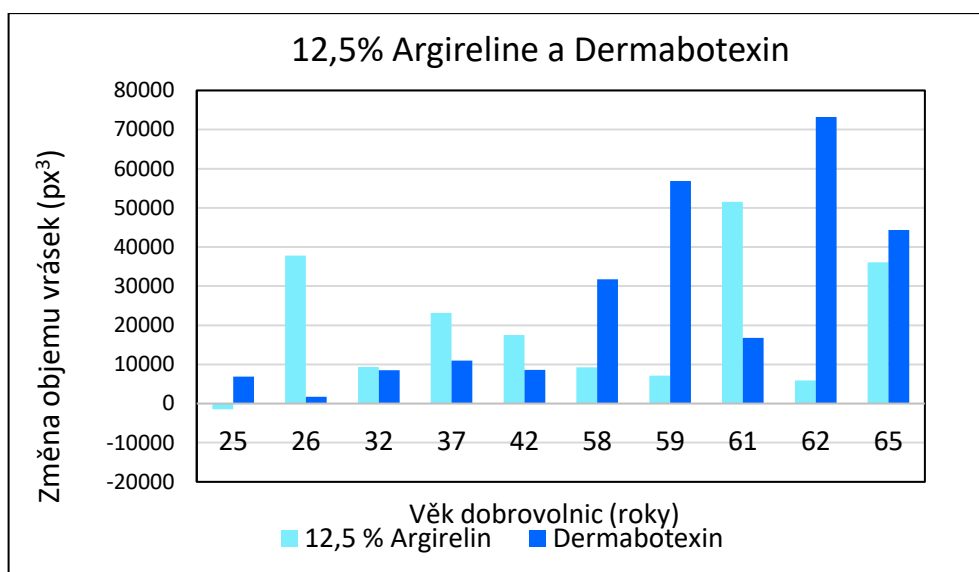
Srovnání změn v objemech vrásek po aplikaci obou testovaných krémů Dermabotexin a Renovia ukazuje, že i když přípravek Renovia obsahuje známé a ověřené kosmeceutické látky (kyselina hyaluronová, retinol, arganový olej, ceramidy), které mají pozitivní efekt na vzhled vrásek, zlepšení hydratace i TEWL, tak aktivní látka Argireline obsažená v Dermabotexinu má na zmenšení objemu vrásek výraznější účinek. Příklad vizualizace stavu vrásek před a po aplikaci přípravku Dermabotexin je uveden na Obrázku 24.



Obrázek 24 Vizualizace stavu vrásek před po aplikaci přípravku Dermabotexin po 1 měsíci používání u dobrovolnice ze skupiny nad 50 let

6.4.3 Porovnání účinku gelu s 12,5% Argirelinem a přípravku Dermabotexin

Na Obrázku 25 jsou porovnány změny v objemu vrásek po měsíčním používání dvou rozdílných formulací s Argirelinem, gelu a krému. Z grafu je viditelné, že kosmeceutikum Argirelin zmenšuje objem vrásek, a to jak v jednoduché formulaci, ve které je Argirelin zapracován pouze do carbomerového gelu, tak i v komerčním přípravku (Dermabotexin), který obsahuje 10 % tohoto kosmeceutika a je dále obohacen o další aktivní látky, které podporují hydrataci a výživu pokožky. Z grafu je patrné, že po aplikaci Dermabotexinu, je účinek na zmenšení objemu vrásek výraznější, což je dáno právě přítomností látek, které dodávají pokožce hydrataci a výživu a tím ještě víc zlepšují vzhled pokožky a zmírňují projevy vrásek. Rozdíl mezi účinkem těchto dvou formulací není statisticky významný. Průměrná hodnota zmenšení objemu vrásek stanovená pro všechny dobrovolnice pak činí pro gel s 12,5 % Argirelinu 27 % a krém Dermabotexin 31 %.



Obrázek 25 Srovnání změn v objemu vrásek po aplikaci gelové formulace s 12,5% Argirelinu (A) a komerčního přípravku Dermabotexin(DB) v očním okolí.

6.4.4 Srovnání stanovení stavu vrásek různými technikami

Dalším z cílů této práce bylo porovnání výsledků redukce vrásek po aplikaci argirelinových formulací získaných dvěma odlišnými metodami. V této diplomové práci byl pro stanovení objemu vrásek použit přístroj Visioface, který pracuje na principu přímého zobrazení pokožky pomocí fotografie. Vlivem Argirelinu na redukci vrásek se zabývala i diplomová práce (Hanáková, 2019), ve které byly změny po aplikaci stejných argirelinových formulací hodnoceny pomocí metody založené na měření profilu otisků kožního povrchu do modrého silikonu. Měření bylo provedeno pomocí přístroje Skin Visiometer (Courage+Kazaka), který k hodnocení stavu vrásek používá spektroskopii a stanovuje intenzitu světelného záření propuštěného tímto otiskem pokožky. Vzhledem k analýze stejných formulací (gely s 5 a 12,5 % Argirelinu) je zajímavé obě studie porovnat a stručně zhodnotit výsledky získané pomocí přístroje Visioface.

Studie provedené Hanákovou se zúčastnilo 25 žen, jejichž věkový průměr byl 50 let. Dobrovolnice si aplikovaly 5 a 12,5% argirelinový gel na periorbitální oblast po dobu 4 týdnů, stejným způsobem a za stejných podmínek jako v této diplomové práci. K vyhodnocení výsledků byly použity parametry drsnosti, které udávají změnu stavu pokožky, resp. vrásek. Z výsledků práce Hanákové lze vyčíst, že po aplikaci argirelinových formulací došlo k redukci vrásek, stejně jako tomu je v této diplomové práci, kde bylo hodnocení redukce vrásek zjišťováno pomocí přístroje Visioface. Překvapivým zjištěním v práci Hanákové je, že k výraznější redukci vrásek došlo po aplikaci nižší, 5% koncentrace Argirelinu, což je vysvětleno vlivem nosného vehikula – gelu. Naopak při měření pomocí přístroje Visioface nebyl prokázán výrazný rozdíl na redukci vrásek po aplikaci gelů s různými koncentracemi Argirelinu. Po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu byl však zjištěn rozdíl ve stavu hydratace pokožky, kde prokazatelně výraznější účinek na snížení hydratace měla nižší koncentrace Argirelinu.

Hanáková ve své práci rovněž uvádí, že na redukci vrásek po aplikaci argirelinových formulací má vliv i zvolené vehikulum. To potvrzuje i tato práce. Při srovnání působení Argirelinu na stav pokožky v gelu a v komerčním přípravku, který má charakter emulze a obsahuje i další aktivní látky, je patrné, že výraznější vliv na hydrataci a tím pádem i na redukci vrásek má forma emulze.

Obě metody shodně potvrzují, že gel s Argirelinem po měsíční aplikaci zmenšuje objem vrásek (Visioface) a zlepšuje parametry drsnosti pokožky, tedy redukuje vrásky (Skin

Visiometr). Data získaná z otisků a spektroskopického měření jsou však více konzistentní a výsledky reprodukovatelnější ve srovnání s fotografickou metodou.

Toto hodnocení práce s přístrojem Visioface souhlasí i se závěry z odborné literatury, kdy například Janiš a kol. (Janiš a kol., 2017) ve své publikaci konstatují, že výhody fotografických metod (použili visioskopii) spočívají v rychlosti skenování a relativně jednoduchém hodnocení výsledků, nicméně je to na úkor přesnosti.

7 DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ

V rámci první i druhé části studie dobrovolnice po měsíční aplikaci testovaných přípravků vyplňovaly dotazník kosmetické péče (Příloha 4 a 5). Účelem tohoto dotazníku bylo zjistit, jak jsou dobrovolnice zvyklé se o pleť starat a jaký mají subjektivní pocit po aplikaci kosmetických formulací testovaných v rámci této diplomové práce.

7.1 Studie I

Z dotazníkového šetření vyplývá, že 80 % dobrovolnic si čistí pleť pravidelně dvakrát denně a 20 % jednou denně, většina z nich si pleť čistí oplachem (mycím gelem, krémem) nebo oplachově v kombinaci s bezoplachovým čištěním (micelární voda, pleťové mléko). Pouze jedna dobrovolnice používá k čištění pleti vodu z vodovodu. Co se týče následné péče, všechny dobrovolnice jsou zvyklé používat denní a noční krém. Oční krém používá 70 % z nich, pleťové sérum 60 % a masku 50 %. Na pravidelné ošetření pleti ke kosmetičce chodí 60 % dobrovolnic, které se účastnily této studie.

Po aplikaci gelu s 5 % Argirelinu udává 30 % dobrovolnic nežádoucí účinky, ke kterým patřily následující negativní pocity: suchá, napnutá kůže, svědění kůže a štípání v místě, kde byl gel nanesen. Po aplikaci gelu s 12,5 % aktivní látky udává dokonce 50 % dobrovolnic výše jmenované nežádoucí účinky.

Spokojenost se stavem pokožky před aplikací argirelinových gelů uvádí 40 % dobrovolnic, 20 % dobrovolnic by si po jejich aplikaci přálo mít pleť více hydratovanou a pružnou a 50 % by očekávalo, že bude mít po aplikaci méně vrásek. Po aplikaci argirelinových gelů uvádí spokojenost se stavem pokožky pouze 30 % dobrovolnic, 60 % očekávalo lepší stav hydratace pokožky, ale pouze jedna žena uvádí, že by požadovala další zlepšení stavu vrásek.

Dotazníkové šetření potvrzuje závěry z provedených měření. Jak bylo prokázáno, Argireline jako aktivní látka lehce snižuje hydrataci pokožky a ve formulaci s gelem vede k výraznému snížení hydratace, což je provázeno nežádoucími účinky, jako je pnutí a svědění pokožky.

7.2 Studie II

Z dotazníkového šetření provedeného v rámci této studie vyplývá, že 80 % dobrovolnic si čistí pleť pravidelně dvakrát denně a 20 % jednou denně, všechny dobrovolnice si pleť čistí oplachově (mycím gelem, krémem) nebo oplachově v kombinaci s bezoplachovým čištěním

(micelární voda, mléko). Všechny dobrovolnice jsou zvyklé pravidelně používat denní a noční krém, 70 % z nich používá i pleťové sérum, 80 % oční krém a 50 % masku. Na ošetření pleti ke kosmetičce pravidelně chodí 50 % dobrovolnic.

Po aplikaci přípravku Dermabotexin uvádí jen jedna dobrovolnice nepříjemné pocity, které se projevovaly lehkým štípáním. Po aplikaci přípravku Renovia neuvádí žádná klientka nežádoucí účinky. To je významný rozdíl oproti účinkům, které se vyskytovaly po aplikaci obou koncentrací gelů s Argirelinem.

Spokojenost se stavem pokožky před aplikací přípravku Dermabotexin uvádí 30 % žen, 60 % by chtělo zlepšit stav hydratace a pružnosti pokožky a 40 % by chtělo zlepšit stav vrásek. Po aplikaci tohoto krému uvádí spokojenost se stavem pokožky 50 % žen, 30 % žen by si po aplikaci přálo zvýšení hydratace pokožky i zmenšení vrásek. Pouze zvýšení hydratace by si po aplikaci tohoto krému přálo 20 % dobrovolnic. Po aplikaci přípravku Renovia uvádí spokojenost se stavem pokožky 70 % dobrovolnic, 10 % by si přálo další zvýšení hydratace a 20 % zmírnění stavu vrásek.

Dalším důležitým aspektem, který je nutné brát v úvahu při hodnocení obou studií, je, že 90 % dobrovolnic jsou nekuřačky. To v kombinaci s důslednou péčí, kterou v dotazníku tyto ženy uvádí (pravidelné čištění a používání denního a nočního krému), může znamenat, že zmírnění projevů vrásek nemusí být tak výrazné jako kdybychom do studie zařadili skupinu žen, ve které jsou kuřačky a které o pleť nepečují.

ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byl definován pojem kosmeceutikum a popsán přehled nejznámějších a nejvíce používaných kosmeceutik. Dále byly podrobněji klasifikovány a popsány kosmeceutické látky – krátké peptidy. Jedním z těchto krátkých peptidů je aktivní látka acetyl hexapeptide-3 s komerčním názvem Argireline, kterému je věnována praktická část diplomové práce. V rámci teoretické části jsou také popsány bioinženýrské metody, kterými se zjišťují parametry stavu pokožky, a je zde shrnut současný stav poznání o této aktivní látce použité v kosmetických přípravcích.

Cílem praktické části diplomové práce bylo především stanovit účinky Argirelinu na zmenšení objemu vrásek a zjistit jeho vliv na hydrataci, TEWL a elasticitu pokožky. Cílem rovněž bylo porovnat, jaké jsou rozdíly po aplikaci Argirelinu, pokud je používán v jednoduché modelové formulaci s carbomerovým gelem nebo v komerčním kosmetickém přípravku. Dalším z cílů bylo porovnat rozdíl působení různých koncentrací carbomerového gelu (5 a 12,5 % Argirelinu) a srovnat účinek Argirelinu s jinými kosmeceutickými látkami. Byly rovněž shrnuty zkušenosti z práce s přístrojem Visioface.

Výsledky této diplomové práce potvrzují pozitivní vliv aktivní látky Argirelinu na redukci vrásek. Ať už se jednalo o aplikaci přípravků s různými koncentracemi i různými formulacemi, vždy došlo ke zmírnění hloubky vrásek. Koncentrace Argirelinu však neměla na redukci vrásek významný vliv. Argirelin v koncentraci 5 % snížil vrásky o 23 % a v koncentraci 12,5% o 26 %. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky studií, které byly již dříve na toto téma provedeny. Zároveň je však patrné, že Argireline může zhoršovat úroveň hydratace a TEWL. Vzhledem tomu, že dostatečná hydratace je základním předpokladem pro zdravý vzhled pokožky a má vliv i na viditelnost drobných vrásek, je velice důležité, aby byl Argireline v kosmetických formulacích kombinován s kosmeceutickými aktivními látkami, které podporují hydrataci a zvyšují úroveň TEWL. Důležité je rovněž zjištění, že Argireline, ať už aplikovaný ve formulaci s carbomerovým gelem nebo ve formě komerčního přípravku, má lepší účinek na zmírnění projevů vrásek ve srovnání s jinými běžně používanými kosmeceutiky.

Přístroj Visioface se ukázal jako dobrý pomocník při individuálním hodnocení stavu vrásek. Při hodnocení větších skupin dobrovolnic však může být měření nepřesné z důvodu individuální interpretace výsledků jednotlivými pozorovateli. Roli může hrát i chybné vyhodnocení kožního útvaru jako vrásky. Další z faktorů, které mohou ovlivnit výsledky

měření, je individuální stav jednotlivých dobrovolnic v den měření. Stav vrásek v očním okolí může zhoršit únava, nedostatečný pitný režim a celkový psychický stav dobrovolnice. I přes tyto skutečnosti jsou výsledky zjištěné přístrojem Visioface kvalitní a jsou v souladu s obdobnými studii publikovanými v odborné literatuře.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGUILAR-TOALÁ, J.E., A. HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. F. GONZÁLEZ-CÓRDOVA, B. VALLEJO-CORDOBA a A.M. LICEAGA. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides* [online]. 2019, 122 [cit. 2021-4-26]. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2019.170170

ADAWIYAH, J., S. L. CHOON. Skin pH and its relationship with transepidermal water loss and disease severity in children with atopic dermatitis: A cross-sectional study. *Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery* [online]. 2020, **24**(2), 84-87 [cit. 2021-7-19]. ISSN 23522410. Dostupné z: doi:10.4103/jdds.jdds_33_20

ALDAG, C. a P. S. LEVENTHAL. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: a review of the literature. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2016, **9**, 411-419 [cit. 2022-04-29]. ISSN 11787015 Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsdoj&an=edsdoj.03edb017b4e5407a8318666dcc3695bd&scope=site>

ANDONI, M., D. IONESCU a F. ANDREI. The Efficiency and Safety of Leuphasyl—A Botox-Like Peptide. *Cosmetics* [online]. 2014, **1**(2), 75-81 [cit. 2021-7-22]. ISSN 20799284. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics1020075

ARRIFIN, N.H.M., a R. Hasman, Assessment of non-invasive techniques and herbal-based products on dermatological physiology and intercellular lipid properties. *Heliyon* [online]. 2020, **6**(5), [cit. 2021-6-27]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03955

BAPTISTA-SILVA, S., S. BORGES, A. R. COSTA-PINTO, et al. In Situ Forming Silk Sericin-Based Hydrogel: A Novel Wound Healing Biomaterial. *ACS biomaterials*

science [online]. 2021, 7(4), 1573-1586 [cit. 2021-7-21]. ISSN 23739878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.0c01745

BAUMANN, L., S. SAGHARI, a E. WEISBERG. *Cosmetic dermatology: principles and practice*.ed. 2nd. New York: McGraw-Hill, 2009. 381. ISBN 9780071490627.

BEDÁŇOVÁ I., V. VEČEREK. Základy statistiky

pro studující veterinární medicíny a farmacie. [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2019. [cit. 2022-4-22]. Dostupné on-line <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Skripta.pdf>

COURAGE a KHAZAKA electronic, Corneometer CM 825 [online]. Corneometer CM 825. Germany, 2016 [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <http://courage-khazaka.de>

COURAGE a KHAZAKA electronic, Tewameter TM Hex

[online]. Tewameter TM Hex. Germany, 2016 [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <http://courage-khazaka.de>

COURAGE a KHAZAKA electronic, Visioface RD 1000

[online]. Visioface RD 1000. Germany, 2016 [cit. 2022-04-15]. Dostupné z: <http://courage-khazaka.de>

DRAELOS, Z. D. *Cosmetic dermatology: products and procedures*. ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010. 550. ISBN: 9781118655580

EHLER, E. Použití botulotoxinu v neurologii. *Cesk Slov Neurol N* 2013; 76/109: p. 7–21[on-line, cit. 2021-09-22.] Dostupné z <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2013-1-6/pouziti-botulotoxinu-v-neurologii-39590>

ES.NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. In: <https://eur-lex.europa.eu> [on-line, cit. 2021-05-11] Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=ET>

FARRIS P. K. *Cosmeceuticals and Cosmetic Practice*. ed. [online]. New Orleans, USA: Wiley Blackwell, 2014. 309. [cit. 2021-12-18]. ISBN 9781118384831. Dostupné také z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&an=662711&scope=site>

FERREIRA, M.R.P., P.C. COSTA a M. BAHIA, Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods. *Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* [online]. 2010, 16(4), 444-9 [cit. 2021-7-13]. ISSN 16000846. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0846.2010.00458.

GOROUHI, F. a H. I. MAIBACH, Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2009, 31(5), 327-345 [cit. 2021-03-24]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x

HANÁKOVÁ, L., *Kosmeceutika a jejich vliv na pokožku*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019. 87. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/45611>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce Kašpárková, Věra.

HOPPEL, M., G. REZNICEK, H. KÄHLIG, H. KOTISCH, G. P. RESCH a C., VALENTA. Topical delivery of acetyl hexapeptide-8 from different emulsions: Influence of emulsion

composition and internal structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **68**, 27-35 [cit. 2021-10-25]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejps.2014.12.006.

ISIK, B., M. S. GUREL, A. T. ERDEMIR a O. KESMEZACAR. Development of skin aging scale by using dermoscopy. *Skin research and technology: Official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* [online]. 2013, **19**(2), 69-74 [cit. 2021-7-13]. ISSN 16000846. Dostupné z: doi:10.1111/srt.12033.

JOHNSEN, G. K., A. B. HAUGSNES, O. G. MARTINSEN a S. GRIMNES, Stratum corneum in vivo water content from TEWL-measurements. 2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Engineering in Medicine and Biology Society, 2008. EMBS 2008. 30th Annual International Conference of the IEEE [online]. 2008, 3166 [cit. 2021-7-22]. ISBN 9781424418145. ISSN 1557170X. Dostupné z: doi:10.1109/IEMBS.2008.4649876

KIKUCHI, K., M. ASANO, H. TAGAMI, M. KATO a S. AIBA, Comparison of the measuring efficacy of transepidermal water loss of a reasonably priced, portable closed-chamber system device H4500 with that of rather expensive, conventional devices such as Tewameter (R) and Vapometr (R). *SKIN RESEARCH AND TECHNOLOGY* [online]. 2017, **23**(4), 597-601 [cit. 2021-7-22]. ISSN 0909752X. Dostupné z: doi:10.1111/srt.12377

KIM, M.A., E.J. KIM a H.K. LEE, Use of SkinFibrometer® to measure skin elasticity and its correlation with Cutometer® and DUB® Skinscanner. *Skin Research and Technology* [online]. 2018, **24**(3), 466-471 [cit. 2021-7-20]. ISSN 16000846. Dostupné z: doi: 10.1111/srt.12455

KLUCZYK, A., J. LUDWICZAK, M. MODZEL, M. KUCZER, M. CEBRAT, M. BIERNAT a R. BĄCHOR. Argireline: Needle-Free Botox as Analytical

Challenge. Chemistry [online]. 2021, **18**(3), [cit. 2021-4-28]. ISSN 16121872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.202000992

KUBGLOMSONG, S., C. THEERAKULKAIT, R.L. REED, J.F. STEVENS, L. YANG a C.S. MAIER. Isolation and Identification of Tyrosinase-Inhibitory and Copper-Chelating Peptides from Hydrolyzed Rice-Bran-Derived Albumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2018, **66**(31), 8346-8354 [cit. 2021-7-22]. ISSN 15205118. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jafc.8b01849

PAI V.V., P. BHANDARI a P. SHUKLA, Topical peptides as cosmeceuticals. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology [online]. 2017, **83**(1), 9-18 [cit. 2021-03-28]. ISSN 03786323. Dostupné z: doi:10.4103/0378-6323.186500

PARK, S., Biochemical, structural and physical changes in aging human skin, and their relationship. Biogerontology [online]. 2022, 1-14 [cit. 2022-04-29]. ISSN 13895729. Dostupné z: doi:10.1007/s10522-022-09959-w

JANIŠ, R., P. EGNER, J. PAVLAČKOVA, A. ZAPLETALOVÁ, V. PATA a K. KEJLOVA. Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. *Biointerphases* [online]. 2017, **12**(2) [cit. 2022-05-05]. ISSN 15594106. Dostupné z: doi:10.1116/1.4985696

RAIKOU, V., A. VARVARESOU, I. PANDERI a E. PAPAGEORGIOU. The efficacy study of the combination of tripeptide-10citrulline and acetyl hexapeptide-3. A prospective, randomized controlled study. Journal of Cosmetic Dermatology [online]. 2017, **16**(2), 271-278 [cit. 2021-7-23]. ISSN 14732130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12314

RUFFIEN-CISZAK, A., J. BAUR, P. GROS, E. QUESTEL a M. COMTAT. Electrochemical microsensors for cutaneous surface analysis: Application to the

determination of pH and the antioxidant properties of stratum corneum. *IRBM* [online]. 2008, **29**(2), 162-170 [cit. 2021-7-19]. ISSN 19590318. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmret.2007.11.020

SACHIDANANDA M. K., S. K. MURARI., G. D. CHANNE. Characterization of an antibacterial peptide from indian cobra (*Naja naja*) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* [online]. 2007, **13**(2), 446-461 [cit. 2021-4-27]. ISSN 16789199. Dostupné z: doi:10.1590/S1678-91992007000200004

SADICK, N. S., M.P. LUPO, D. S. BERSON a Z. D. DRAELOS. *Cosmeceutical Science in Clinical Practice*. ed. UK: Informa, 2010. 116. ISBN 9781841846989.

SKLIROU, A.D., I. PAPASSIDERI, I.P. TROUGAKOS, M. RALLI, M. DOMINGUEZ a A.-L. SKALTSOUNIS. Hexapeptide-11 is a novel modulator of the proteostasis network in human diploid fibroblasts. *Redox Biology* [online]. 2015, **5**, 205-215 [cit. 2021-7-21]. ISSN 22132317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2015.04.010

TADINI, K. A., D. G. MERCURIO a P. M. B.G. M. CAMPOS. Acetyl hexapeptide-3 in a cosmetic formulation acts on skin mechanical properties-clinical study. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **51**(4), 901-909 [cit. 2021-8-5]. ISSN 21759790. Dostupné z: doi:10.1590/S1984-82502015000400016

TOSTI, A. a D. HEXSEL. *Update in Cosmetic Dermatology*. [online]. ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2013, 221 [cit. 2021-8-5]. ISBN 978-3-642-34029-1. Dostupné také z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&an=548981&scope=site>

WALTERS, K.A. a M.S. ROBERTS. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*. ed. USA, NY: Informa, 2007. 644. ISBN 978-084937589-7.

WANG, Y., M. WANG, X.S. XIAO, J. HUO a W.D. ZHANG. The anti-wrinkle efficacy of Argireline. *Journal of Cosmetic* [online]. 2013, **15**(4), 237-241 [cit. 2021-4-28]. ISSN 14764172. Dostupné z: doi:10.3109/14764172.2013.769273

WESTERMANN, T.V.A., C.B. DETONI DA SILVA, E.L.S. CARVALHO, C.G. PUPE, V.R. VIANA a C. BERTO JUNIOR. Measurement of skin hydration with a portable device (SkinUp® Beauty Device) and comparison with the Corneometer®. *Skin Research and Technology* [online]. 2020, **26**(4), 571-576 [cit. 2021-7-1]. ISSN 16000846. Dostupné z: doi:10.1111/srt.12833

ZHANG, L. a T. J. FALLA. Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in Dermatology* [online]. 2009, **27**(5), 485-494 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2009.05.013

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AHA	Alfa hydroxykyseliny
Arg	Arginin
CCD	Charge-coupled device (Snímač obrazové informace)
CSI	Comlete Skin Investigation
Cu	Měď
DB	Dermabotexin
ECM	Extracelulární matrix
Euxyl PE	Phenoxyethanol 90 % Ethylhexylglycerin 10 %
g	Gram
GAG	Glykosaminoglykan
Gln	Glutamin
Glu	Kyselina glutamová
Gly	Glycin
h	Hodina
His	Histidin
INCI	International nomenclature of cosmetic ingredients (Název. kosmet. ingrediencí)
c.j.	Kutometrická jednotka
LC-MS-MS	Liquid Chromatography, Mass spektrometry (Kap. chrom. s hmot. spektrometrií)
Lys	Lysin
m	Metr
Met	Methionin
n	Počet členů výběrového souboru
N	Počet měření
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NIR	Near Infrared (nízký infračervený)
M + H	Míča a Harašta
O/V	Olej ve vodě
p	Hladina významnosti
Pal	Palmitoyl
PEG	Hydrogenated Castor Oil (hydrogenovaný ricinový olej)
pH	Potential of hydrogen

Phe	Fenylalanin
PPG	Polyoxypropylenový a polyethylenový ether
Pro	Prolin
Px	Pixel
RN	Renovia
s ²	Rozptyl výběrového souboru
S	Směrodatná odchylka
SC	Stratum corneum
s.r.o.	společnost s ručením omezeným
SW	SoftWare
SNARE	SNAP receptor (označení pro 20 proteinů)
t	Testovací kritérium
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
Thr	Threonin
Try	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
USB	Universal Seriál Bus
UV	Ultrafialové záření
UVA	Dlouhovlnné záření
UVB	Krátkovlnné záření
Val	Valin
WHO	World Health Organizatiom (Světová zdravotnická organizace)
% w/w	Hmotnostní procentuální koncentrace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura Argirelinu (Kluczyk a kol., 2021).....	23
Obrázek 2 Ilustrace principu měření Cutometerem (Ariffin a Hasman, 2020).	28
Obrázek 3 Přístrojové vybavení: zprava Visioface, PC se softwar, MPA stanice s Corneometrem a Tewametrem a Multi skin test center se sondou na detekci elasticity...	37
Obrázek 4 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u všech dobrovolnic	44
Obrázek 5 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen mladších než 50 let	45
Obrázek 6 Hydratace pokožky před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let	45
Obrázek 7 Srovnání hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic	46
Obrázek 8 Hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny pod 50 let.....	47
Obrázek 9 Hydratace očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny nad 50 let.....	48
Obrázek 10 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic	49
Obrázek 11 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny pod 50 let.....	49
Obrázek 12 Hydratace oblasti nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u věkové skupiny nad 50 let.....	50
Obrázek 13 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u všech dobrovolnic..	52
Obrázek 14 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny žen mladších než 50 let	52
Obrázek 15 TEWL před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5 % Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let.....	53
Obrázek 16 TEWL očního okolí před a po aplikaci přípravků Dermabotexin (DB) a Renovia (RN) u všech dobrovolnic.....	53
Obrázek 17 Elasticita před a po aplikaci gelu s obsahem 5 a 12,5 % Argirelinu u všech dobrovolnic	55
Obrázek 18 Elasticita před a po aplikaci 5% a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny pod 50 let	55
Obrázek 19 Elasticita před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u věkové skupiny žen starších než 50 let.....	56
Obrázek 20 Změny v objemu vrásek před a po aplikaci gelu s 5 a 12,5% Argirelinu u všech dobrovolnic. Kladná hodnota reprezentuje zmenšení a záporná zvětšení objemu vrásek. ...	57

Obrázek 21 Vizualizace stavu vrásek před (vlevo) po (vpravo) aplikaci gelu s 12,5% Argirelinu po 1 měsíci používání u dobrovolnice ze skupiny nad 50 let	58
Obrázek 22 Změny v objemu vrásek v oblasti očního okolí a nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravku Dermabotexin (DB) u všech dobrovolnic. Kladná hodnota reprezentuje zmenšení a záporná zvětšení objemu vrásek.	59
Obrázek 23 Zmenšení objemu vrásek v oblasti očního okolí a nosoretní rýhy před a po aplikaci přípravku Renovia (RN) u všech dobrovolnic	60
Obrázek 24 Vizualizace stavu vrásek před po aplikaci přípravku Dermabotexin po 1 měsíci používání u dobrovolnice ze skupiny nad 50 let.....	60
Obrázek 25 Srovnání změn v objemu vrásek po aplikaci gelové formulace s 12,5% Argirelinu (A) a komerčního přípravku Dermabotexin(DB) v očním okolí	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Složení gelů s Argirelinem	36
Tabulka 2 Stupnice pro vyhodnocení korneometrických měření (Courage a Khazaka, 2016, Corneometer)	39
Tabulka 3 Interpretace měření TEWL pomocí přístroje Tewameter (Courage a Khazaka, 2016, Tewameter)	40

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 je \bar{x} aritmetický průměr, N počet měření a x_i hodnota měření.	42
Rovnice 2 je S směrodatná odchylka, N počet měření, \bar{x} aritmetický průměr a x_i hodnota měření	42

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Dotazník pro účastníka měření

Příloha P II: Individuální informovaný souhlas

Příloha P III: Prohlášení účastníka

Příloha P IV: Dotazník kosmetické péče Studie I

Příloha P V: Dotazník kosmetické péče Studie II

PŘÍLOHA P I:

Příloha č.3

Dotazník pro účastníka měření

Věk:

Pohlaví:

Kód testované osoby (evidenční číslo):

Současný zdravotní stav:

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

Zdravotní stav v minulosti

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

Užívání léků

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

Alergologická léčba

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

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		

podpis účastníka měření:

datum:

Pouze pro účely organizátora měření

Na základě zjištěných údajů je účastník a) přijat
b) nepřijat

Zdůvodnění:

Datum:

Podpis organizátora:

PŘÍLOHA P II:

Individuální informovaný souhlas

V rámci realizace experimentální části diplomové práce budou na Vaši kůži aplikovány kosmetické přípravky s obsahem aktivní látky Argirelin® (Acetylhexapeptid-3). Bezpečnost této látky je prověřena řadou studií a u komerčních přípravků byla posouzena dokumentace z hlediska jejich bezpečnosti. Všechny známé informace o zkoumaných výrobcích dovoluji testování na dobrovolnících.

Cíl studie

Cílem práce je zjistit odezvu Vaší pokožky na aplikované přípravky pomocí exaktně změřených veličin.

Podmínky účasti

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

Metodika testu

Experiment bude prováděn diplomantkou pod dohledem kvalifikovaných pracovníků Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a dermatologa. Plánovaná práce zahrnuje hodnocení hydratace, pH elasticity pokožky a vlivu přípravků na hloubku vrásek. Měření bude prováděno pomocí bioinženýrských metod, které se běžně k tomuto účelu využívají.

Odstoupení z laboratorní práce

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

Rizika a nepříjemnosti

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

PŘÍLOHA P III:

Prohlášení účastníka

Souhlasím se svou účastí ve studii, kde bude sledován vliv komerčně dostupné a běžně používané aktivní látky Argirelin na kvalitu pokožky, konkrétně její hydrataci, elasticitu, redukci vrásek . Test bude veden pod záštitou kvalifikovaných pracovníků Ústavu tuků, tenzidů a kosmetiky FT UTB ve Zlíně a firmy Syncare. 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 v testu bez udání důvodů.

O experimentu si mohu vyžádat další informace a oznámit nežádoucí účinky u vedoucího studie, a to kdykoliv na určeném telefonním čísle.

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

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

.....
plné jméno účastníka testu

.....
podpis účastníka testu

V Brně dne

PŘÍLOHA P IV:

Dotazník kosmetické péče Studie I

Jak často jste zvyklá si čistit pleť?

- 1) Pravidelně, 2x denně (ráno a večer)
- 2) Pravidelně, 1x denně (ráno nebo večer)
- 3) Nepravidelně
- 4) Nečistím
- 5) Jiné.....

Jakým způsobem si čistíte pleť?

- 1) Bezoplachově, pomocí tamponku (micelární vodou, odličovacím mlékem...)
- 2) Oplachově (mycím gelem, krémem, olejem)
- 3) Kombinace obou způsobů
- 4) Jiné.....

Jakou kosmetiku používáte při péči o pleť?

- 1) Denní krém
- 2) Noční krém
- 3) Sérum
- 4) Oční krém.
- 5) Maska
- 6) Jiné.....

Chodíte na kosmetické ošetření?

- 1) Ano, pravidelně. Jak často?.....
- 2) Nepravidelně
- 3) Nechodím

Jste kuřačka?

- 1) Ano
- 2) Ne

Podstoupila jste nějaký neinvazivní zákrok (chemický peeling, laserové ošetření, mezoterapie, atd.) ke zmírnění projevu vrásek nebo jiných nedokonalostí?

- 1) Ano. Jaké?.....
- 2) Ne

Podstoupila jste nějaký invazivní zákrok (plastická operace, výplně k. hyaluronovou, aplikace botulotoxinu) ke zmírnění projevu vrásek nebo jiných nedokonalostí?

- 1) Ano. Jaké?.....
- 2) Ne

Pocítovala jste po aplikaci Argirelinu nějaký nežádoucí účinek?

- 1) Ano, po aplikaci 5% gelu s Argirelinem.
Jaký?.....
- 2) Ano, po aplikaci 12% gelu s Argirelinem.
Jaký?.....
- 3) Ne

Jak jste vnímala stav kůže v očním okolí před aplikací gelů s Argirelinem?

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....

Jak vnímáte stav kůže v očním okolí po aplikaci gelů s Argirelinem?

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....

V rámci studie jste si aplikovala dvě různé koncentrace gelů s Argirelinem (pravá strana 5% a levá strana 12,5% koncentrace. Máte pocit, že se výsledek používání po různých koncentracích liší?

- 1) Ano, po aplikaci 5% koncentrace na pravou stranu je vzhled očního okolí lepší
- 2) Ano, po aplikaci 12,5% koncentrace na levou stranu je vzhled očního okolí lepší
- 3) Ne, nevidím rozdíl

Je něco, co plánujete změnit v péči o pleť po zkušenostech z této studie?

- 1) Ano .Co?
- 2) Ne

PŘÍLOHA P V:

Dotazník kosmetické péče Studie II

Jak často jste zvyklá si čistit pleť?

- 1) Pravidelně, 2x denně (ráno a večer)
- 2) Pravidelně, 1x denně (ráno nebo večer)
- 3) Nepravidelně
- 4) Nečistím
- 5) Jiné.....

Jakým způsobem si čistíte pleť?

- 1) Bezoplachově, pomocí tamponku (micelární vodou, odličovacím mlékem...)
- 2) Oplachově (mycím gelem, krémem, olejem)
- 3) Kombinace obou způsobů
- 4) Jiné.....

Jakou kosmetiku používáte při péči o pleť?

- 1) Denní krém
- 2) Noční krém
- 3) Sérum
- 4) Oční krém.
- 5) Maska
- 6) Jiné.....

Chodíte na kosmetické ošetření?

- 1) Ano, pravidelně. Jak často?.....
- 2) Nepravidelně
- 3) Nechodím

Jste kuřačka?

- 1) Ano
- 2) Ne

Podstoupila jste nějaký neinvazivní zákrok (chemický peeling, laserové ošetření, mezoterapie, atd.) ke zmírnění projevu vrásek nebo jiných nedokonalostí?

- 1) Ano. Jaké?.....
- 2) Ne

Podstoupila jste nějaký invazivní zákrok (plastická operace, výplně k. hyaluronovou, aplikace botulotoxinu) ke zmírnění projevu vrásek nebo jiných nedokonalostí?

- 1) Ano. Jaké?.....
- 2) Ne

Pocítovala jste po aplikaci krému Dermabotexin nějaký nežádoucí účinek?

- 1) Ano. Jaký?.....
- 2) Ne

Pocítovala jste po aplikaci krému Renovia nějaký nežádoucí účinek?

- 1) Ano. Jaký?.....
- 2) Ne

Jak jste vnímala stav kůže v očním okolí před aplikací krému Dermabotexin

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....

Jak vnímáte stav kůže v očním okolí po aplikaci krému Dermabotexin?

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....

Jak jste vnímala stav kůže v očním okolí před aplikací krému Renovia?

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....
- 5)

Jak vnímáte stav kůže v očním okolí po aplikaci krému Renovia?

- 1) Jsem spokojená, nic bych neměnila
- 2) Chtěla bych dodat více hydratace a pružnosti
- 3) Chtěla bych zlepšit stav vrásek
- 4) Jiné.....

Je něco, co plánujete změnit v péči o pleť po zkušenostech z této studie?

- 1) Ano. Co?.....
- 2) Ne