

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Měření mechanických vlastností kůže po aplikaci přípravku proti vráskám

Rigorózní práce

Školitel:

Mgr. Monika Kuchařová, PhD.

Hradec Králové 2013

Mgr. Alžběta Lejsalová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

Alžběta Lejsalová

Děkuji své školitelce, Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D. za odborné vedení a rady při plánování, realizaci a dokončení tohoto projektu. Děkuji za její čas a ochotu, kterou mi věnovala. Mé poděkování patří i firmě L'Oréal za poskytnutí testovaného přípravku. A v neposlední řadě velký dík všem dobrovolnicím, za jejich odvahu, trpělivost a vytrvalost.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Mgr. Alžběta Lejsalová

Konzultant: Mgr. Monika Kuchařová, PhD.

Název rigorózní práce: Měření mechanických vlastností kůže po aplikaci přípravku proti vráskám

Vzhled jedince je důležitý pro jeho kontakt s okolím a trendem dnešní doby je udržet si ho co nejdéle mladistvý. Proto je stárnutí a jeho projevy předmětem zkoumání mnoha oborů. Účinnost přípravků a metod působících proti znakům spojených s vyšším věkem však bývá sporná nebo těžko měřitelná.

Viskoelastometr vyvinutý na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové nabízí možnost rychlého a bezbolestného změření základních mechanických parametrů kůže, kterými jsou tuhost a viskozita. Předchozí výzkumy ukázaly, že tyto parametry se mění s věkem. Zajímalo nás, zda aplikace kosmetického přípravku, který má zmírnit projevy stárnutí, ovlivní i tyto mechanické parametry. Experimentu se zúčastnilo dvacet dobrovolníků (ženy ve věku 25 až 67 let) a testovaný přípravek Vichy Liftactiv Serum 10 byl aplikován dvakrát denně dva měsíce. Během této doby byly dobrovolníkům měřeny mechanické parametry kůže v místě aplikace a získané hodnoty byly porovnány pomocí t-testu.

Tato práce ve své teoretické části charakterizuje základní anatomické, fyziologické a biomechanické vlastnosti kůže. Popisuje proces stárnutí a některé metody korekce stárnoucí pleti. Experimentální část shrnuje princip použité metody a *in vivo* měření změn mechanických parametrů kůže.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of biophysics and physical chemistry

Candidate: Mgr. Alžběta Lejsalová

Supervisor: Mgr. Monika Kuchařová, PhD.

Title of Thesis: Measurement of the skin mechanical properties after application of the anti-aging product

The maintenance of youthful skin appearance is strongly desired by the society nowadays. A lot of anti-aging strategies, agents and procedures have been already described but it is difficult to measure the effectiveness of these products and methods.

Viscoelastometer developed at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové offers a quick and painless measurement of basic mechanical parameters of the skin, stiffness and viscosity. Previous researches indicate that these parameters vary with age. The aim of this study was to determine the effect of anti-aging product on these mechanical parameters. Twenty volunteers (women aged 25 - 67 years) used the tested product Vichy Liftactiv Serum 10 twice a day for two months. During the experiment skin mechanical properties were measured at the application site and the obtained values were compared by the t-test.

The theoretical part is focused on characterizing the basic anatomical, physiological and biomechanical properties of the skin, describes the aging process and some rejuvenating methods. Experimental part summarizes the principles of the method employed and *in vivo* measurement of mechanical parameter's changes of the skin.

Obsah

1	Úvod	8
2	Kůže	9
2.1	Anatomie kůže	9
2.1.1	Epidermis	9
2.1.2	Dermis.....	10
2.1.3	Podkožní vazivo.....	10
2.1.4	Extracelulární matrix	11
2.2	Funkce kůže	14
2.2.1	Bariérová funkce kůže	14
2.2.2	Další funkce kůže.....	14
2.3	Stárnutí kůže	16
2.3.1	Přirozené stárnutí kůže.....	16
2.3.2	Vnější faktory ovlivňující stárnutí kůže.....	17
2.3.3	Vzhled a morfologie stárnoucí kůže	19
3	Metody korekce příznaků stárnutí	22
3.1	Kosmetické přípravky	22
3.1.1	Aktivní substance kosmetických přípravků proti stárnutí pleti	23
3.2	Rejuvenační metody	26
3.2.1	Nepřístrojové metody rejuvenace	26
3.2.2	Přístrojové metody rejuvenace.....	27
4	Biomechanika kůže	28
4.1	Biomechanické vlastnosti kůže	28
4.2	Měření biomechanických vlastností	28
4.2.1	Principy některých <i>in vivo</i> metod určených k měření biomechanických vlastností kůže.....	29
4.3	Křivka mechanického namáhání	32
5	Cíl práce	35
6	Experimentální část	36
6.1	Aparatura měření	36
6.2	Použité vztahy a postup	37
6.3	Metodika měření	38
6.3.1	Použitý materiál	38
6.3.2	Podmínky měření	39
6.3.3	Postup měření	39
6.4	Zpracování výsledků	41
6.4.1	Dotazník.....	41
6.4.2	Souhrn naměřených hodnot	43
6.4.3	Závislost Hookeova koeficientu, Newtonova koeficientu a časové konstanty na věku	45

6.4.4	Změny parametrů po aplikaci séra.....	46
6.4.5	Celkové zhodnocení působení anti-aging přípravku	53
7	Diskuze	54
7.1	Aplikovaný přípravek.....	54
7.2	Vlastnosti kůže testovaných dobrovolníků	54
7.3	Závislost Hookeova koeficientu, Newtonova koeficientu a časové konstanty na věku	55
7.4	Změny mechanických parametrů po aplikaci séra.....	55
8	Závěr.....	57
9	Použitá literatura	58
10	Příloha.....	63

1 Úvod

Kůže jako největší orgán lidského těla zastává řadu důležitých fyziologických funkcí, ale vytváří i „bariéru“ mezi jedincem a okolím. S věkem a vlivem vnějšího prostředí však dochází ke změnám její kvality a vzhledu. Objevují se vrásky, kožní záhyby, kůže je ochablá, mění se její barva. Protože s estetickým vzhledem kůže úzce souvisí profesní a společenský úspěch, jsou tyto změny hlavním důvodem, proč se úsilí dermatologie soustředí jak na léčebný, tak na kosmetický význam prostředků a metod. Ačkoliv omlazující přípravky a postupy doslova zaplavily dnešní oblast kosmetologie, je jejich účinnost sporná, nebo těžce identifikovatelná. K zaznamenání jejich účinků se využívá řada technik, jedná se o metody instrumentální a zobrazovací.

Biomechanika je mutlidisciplinární obor využívající řadu jednotlivých disciplín, ať už jsou to znalosti matematiky, fyziky nebo biologie. V případě reologie jde o samostatnou vědní nauku o deformaci a tečení látek. Otázku deformace tkáně a její průběh v čase v závislosti na mechanickém zatížení bychom mohli zařadit do problematiky bioreologie. Mezi studované veličiny patří extensibilita, tuhost a viskoelasticita kůže a jiných tkání. Tyto parametry úzce souvisí s výskytem a uspořádáním proteinů kolagenu a elastinu a komponent extracelulární matrix. K jejich kvantitativním i kvalitativním přeměnám dochází v důsledku nejen opakovaného mechanického zatížení, ale především díky vzrůstajícímu věku a vlivem vnějšího prostředí. Identifikace míry změny mechanických vlastností kůže nám může pomoci s testováním účinnosti látek, které mají zastavit, zpomalit či vylepšit horšící se stav kožních struktur, a tím zmenšit projevy společností negativně vnímaného stárnutí vzhledu.

2 Kůže

2.1 Anatomie kůže

Stavba kůže umožňuje přizpůsobivost pohybům a změnám tvaru. Skládá ze tří vrstev: z pokožky (*epidermis*), škáry (*dermis*) a z podkožního vaziva (*tela subcutanea*).

2.1.1 Epidermis

Epidermis je svrchní zrohovatělá buněčná vrstva. Její tloušťka je asi 0,1 mm, na chodidlech a dlaních je asi 1 mm, na patě 3-4 mm. Je bezcévná a její výživa je zajištěna tkáňovým mokem. Je tvořena pěti vrstvami: *stratum basale*, *spinosum*, *granulosum*, *lucidum* a nejsvrchnější *corneum*.

Stratum corneum je tvořeno asi z 80% proteiny, 5-15% lipidy a zbytek tvoří voda a organické sloučeniny, které kůži zvlhčují a zvláčňují (Hrabálek a Vávrová 2005).

Mezi základní buňky se řadí keratinocyty vznikající ve *stratum basale*. Nově tvořenými buňkami jsou posunovány k povrchu, kde jako plně diferencované korneocyty postupně stárnou a odlupují se. V těchto buňkách vzniká keratin, protein odpuzující vodu, který je navíc rezistentní vůči chemickému působení.

Intracelulární prostor je vyplněn specifickými lipidy tvořícími několikvrstevné lamely s vnitřní hydrofobní a vnější hydrofilní částí. Tyto lipidy jsou složeny převážně z ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin.

Melanocyty jsou buňky uložené v hlubokých vrstvách *epidermis*. Melanocyty tvoří polymerizací tyroxinu černo-hnědý pigment melanin. Jeho syntéza probíhá v melanosomech, které po dozrání putují ve výběžcích melanocytů do sousedních keratinocytů. Na počtu, velikosti a rozložení melanosomů v keratinocytech pak záleží barva kůže. Melanin chrání kůži před UV zářením.

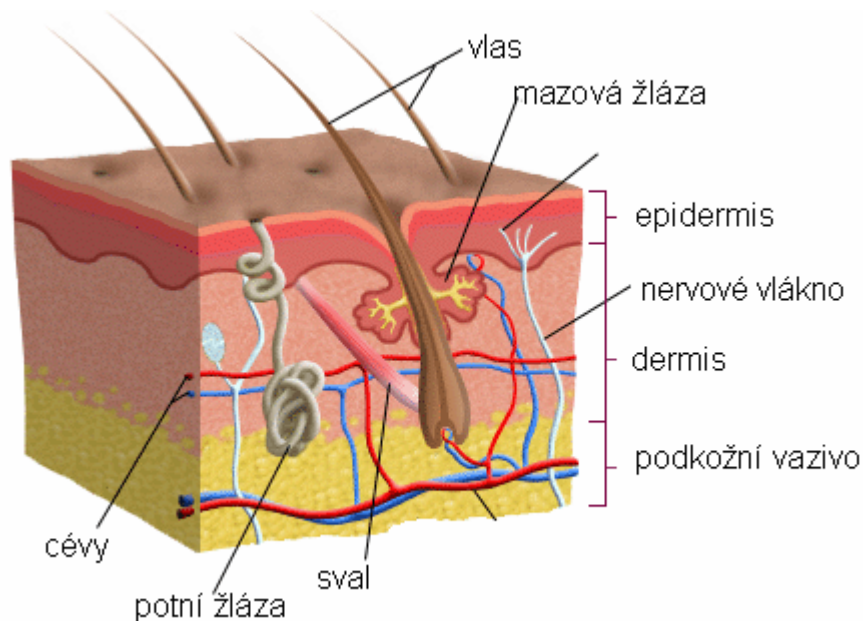
Ve *stratum spinosum* se nachází imunokomponentní Langerhansovy buňky, s funkcí podobnou makrofágům. Zprostředkovávají alergické reakce, včetně tzv. fotoalergie na UV záření. Langerhansovy buňky tvoří asi 5% buněčné populace *epidermis*. V nejhlubších částech jsou pak Merkelovy buňky. Jedná se o smyslové buňky, podílejí se jak na mechanorecepci, tak na neurosekreci (Petrovický 2002; Trojan 2003; Hrabálek a Vávrová 2005).

2.1.2 Dermis

Dermis je vazivová část kůže silná asi 0,5 – 3 mm tvořena dvěma vrstvami. Svrchní *stratum papillare* je poměrně tenká vrstva řídkého kolagenního vaziva a nezralého elastinu. *Stratum reticulare* je tvořeno hustým neuspořádaným kolagenním vazivem a tlustými elastickými vlákny s proteoglykany, které zodpovídají za vysokou elasticitu kůže. Tato část dodává mechanickou pevnost, pružnost a tažnost (Konrádová, Uhlík et al. 2000; Trojan 2003).

2.1.3 Podkožní vazivo

Podkožní vazivo spojuje *dermis* s periostem. Mimo místa spojení je podkoží prostoupeno tukovým vazivem, místy až několik centimetrů silným tukovým polštářem. Rozložení tuku se na těle liší pohlavím a mění se s věkem a hormonálními změnami. Ve stáří tuku v kůži ubývá, což mimo jiné vede k ochablosti kůže (Petrovický 2002).



Obr.:1: Anatomie kůže.

(www.childrenshospital.org/az/Site784/mainpageS784P0.html, 2013)

2.1.4 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix je mezibuněčná hmota, jejíž hlavní komponenty jsou vlákna proteinů a tzv. základní substance. Nejvíce zastoupenou proteinovou složkou je kolagen, důležitý pro pevnost kůže a elastin, významný pro elasticitu a pružnost. Mezi další bílkoviny patří fibrilin, laminin a fibronectin. Ty plní funkci především jako adhezní molekuly. Na syntéze těchto komponent se podělejí především fibroblasty a fibrocyty.

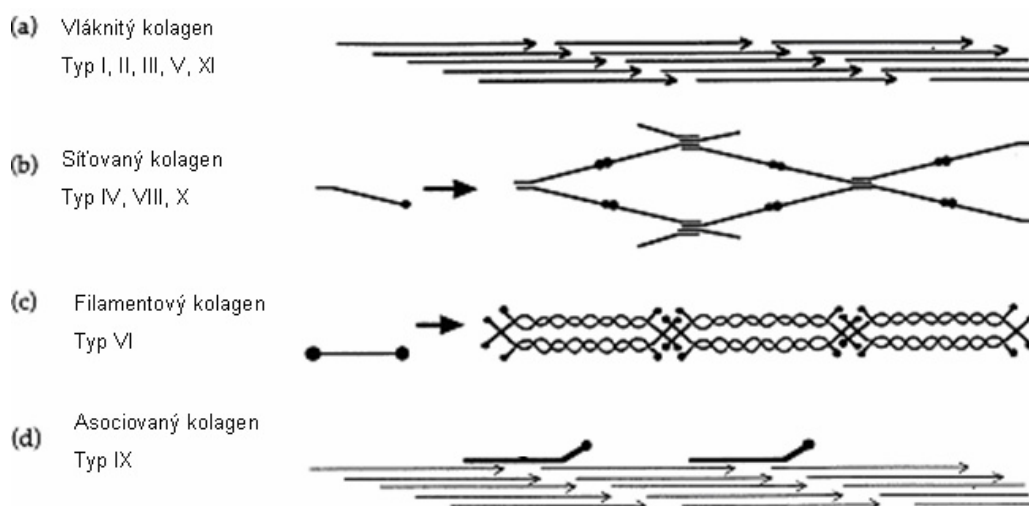
Základní substance je tvořena glykosaminoglykany a glykoproteiny, které jsou syntetizovány metabolicky aktivními buňkami: fibroblasty a fibrocyty. Optimální množství a jemné interakce těchto komponent jsou nezbytné pro udržení normálních fyziologických vlastností kůže.

Glykosaminoglykany se skládají z opakujících se disacharidových jednotek z aminocukru a uronové kyseliny. Nejdůležitější z aminocukrů jsou glukosamin, galaktosamin, mannosamin a N-acetylneuraminová kyselina. Z glykosaminoglykanů se v pojivu vyskytuje jako volná jediné kyselina hyaluronová, ostatní vytvářejí tzv. proteoglykany. Proteoglykany jsou vysoce hydrofilní, váží ionty a vytváří značný osmotický tlak a tím se podílejí na vysokém stupni hydratace. Pro kůži to má velký význam – tímto mechanismem je zajištěn vysoký tonus pokožky v mládí, s úbytkem hydratace je spojena tvorba vrásek ve stáří.

Glykoproteiny se skládají z aminokyseliny serinu nebo threoninu, na které je navázána oligosacharidová, většinou rozvětvená, jednotka na konci obvykle s N-acetylneuraminovou kyselinou (Ledvina, Stoklasová et al. 2006).

2.1.4.1 Kolagen

Kolagen je souhrnný název pro několik typů proteinů. Těch je dnes známo až dvacet sedm (Gómez-Guillén, Giménez et al. 2011). Liší se od sebe tvarem, zastoupením a funkcí. Jako „klasický“ kolagen můžeme označit typ I až typ IV. Typ I se vyskytuje převážně v cévách, šlachách, vazech, kostech, v dentinu a ve vazivu plic a jater. Pro chrupavku je typický kolagen II. Typ III kolagenu se nachází v podobných místech jako I typ, ale jen v minoritním podílu. Kolagen IV je přítomný v bazálních membránách, např. kůže (Ledvina, Stoklasová et al. 2006). V samotné kůži bylo detekováno nejméně šest typů kolagenu (Uitto, Olsen et al. 1989).



Obr.2: Typy kolagenových vláken. a) vláknitý typ kolagenu, b) síťovaný kolagen, c) filamentový typ kolagenu d) asociovaný typ kolagenu (Bailey, Paul et al. 1998)

Základní aminokyseliny tvořící kolagenní α řetězec jsou glycin a prolin, který je posttranslační modifikací přeměněn na 4-hydroxyprolin a lysin, který se mění na hydroxylysin. Základem zralé kolagenní fibrily je trojšroubovice tropokolagenu, která je složena ze tří řetězců α_1 a α_2 v různém poměru. Na jejich zastoupení pak záleží výsledná molekulární struktura. Jednotlivé α řetězce jsou dlouhé kolem 1000 aminokyselinových zbytků a jejich konce tvoří tzv. extenční peptidy, které netvoří trojitou šroubovici. Maturace kolagenu v buňce probíhá ve 3 stupních. První je hydroxylace prolinu a lysinu za přítomnosti železnatých iontů, 2-oxoglutarátu a askorbátu jako kofaktorů. Druhý stupeň je glykosylace. Na hydroxylysin se v různé míře váže galaktosa a galaktosylglukosa. Poslední fází je agregace tří řetězců do šroubovice. Vzniká prokolagen, který je pak mimo buňku enzymaticky upravován, dochází k polymeraci tropokolagenů a výsledkem je kolagenní mikrofibrila. Její zpevnění je nutné pro zajištění vyhovujících mechanických vlastností. Stabilizaci získá vytvářením příčných vazeb. Takový kolagen je vysoce inertní a v některých tkáních může takto setrvat po dobu několika let. Metabolismus kolagenu se ale zrychluje například při hojení ran nebo při některých patologických pochodech (Ledvina, Stoklasová et al. 2006).

Biosyntéza kolagenu klesá s věkem, kolem třetí nebo čtvrté dekády života je natolik nízká, že není možné nahradit věkem degenerovaný kolagen (Uitto 2008).

2.1.4.2 Elastin

Elastin je bílkovina ohebná, elastická a v tahu poměrně pevná. Zajišťuje ohebnost a pružnost kůže, vazů, chrupavek, cév a dalších tkání. Z aminokyselin podílejících se na složení elastinu je zastoupen především glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin. Podobně jako kolagen i elastin představuje rodinu bílkovin. Základem je řetězec - globule tropoelastinu s úseky α helixu a β spirály. Tropoelastin po opuštění buňky koacervuje vytvořením hydrofobních interakcí mezi globulemi a mezi α helixovými úseky se tvoří příčné vazby do trojrozměrné síťoviny (Ledvina, Stoklasová et al. 2006).

2.2 Funkce kůže

Kůže vykonává řadu důležitých fyziologických funkcí, které souvisí s její anatomickou strukturou. Nejdůležitější funkcí je vytvořit efektivní bariéru mezi vnějším okolím a organismem. Kůže poskytuje ochranu proti mechanickému, tepelnému a chemickému poškození i proti ztrátě důležitých látek z organismu (Trojan 2003).

2.2.1 Bariérová funkce kůže

Za bariérovou funkci zodpovídá především vnější vrsta kůže *stratum corneum*: systém korneocytů a extracelulární lipidová matrix. Tato vrstva je nejdůležitější z hlediska fyzikální ochrany. Jde o omezení nebo zpomalení průniku látek zevního prostředí do vitálních epidermálních vrstev. Zachování funkčních vlastností kožního povrchu je závislé na udržování optimálního množství zde nacházející se vody. Funkční kožní povrch je podstatný i pro jeho plastičnost zajišťující jak mechanickou ochranu, tak mikrobiální ochranu. Optimální hydratace a slabě kyselé pH brání přemnožení nebo změnám ve složení mikroorganismů (Záhejský 2011).

Na optimální hydrataci kůže se podílí několik faktorů. Jedná se o pevné spojení korneocytů, obnovující se ochranný film složený z mazu, potu a odlupujících se buněk, hyaluronan sodný, mezibuněčné prostory ve *stratum corneum*, obsahující látky aktivně vážící vodu (NHF, Natural Hydrophylic Factors) a tzv. lipidní dvojvrstvy složené z ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin, které se tvoří v horní části *stratum corneum* z tzv. lamelárních tělísek v průběhu keratinizace. Lipidy spolu s obsahem NHF regulují i výdej vody kožním povrchem do vnějšího prostředí. Poruchy v jednotlivých mechanismech mají za následek např. tvorbu potniček, zánětu a vývoj suché kůže (Záhejský 2011).

2.2.2 Další funkce kůže

Chemickou a imunitní bariéru zastávají lipidy, kyseliny, hydrolytické enzymy a Langerhansovy buňky, které mají významnou úlohu v detekci antigenu. Výkonnou a paměťovou funkci pak zastávají T_{H1} – lymfocyty. Keratinocyty a melanocyty se podílejí na produkci cytokinů a mediátorů zánětu (Proksch, Brandner et al. 2008; Záhejský 2011).

Mezi další neméně důležité funkce patří funkce termoregulační. Kůže umožňuje výměnu tepla mezi organismem a prostředím díky podkožnímu tuku, který slouží jako

tepelný izolátor a cévnímu systému, který tepelnou regulaci ovlivňuje změnami průsvitu cév. Druhý kožní mechanismus sloužící k termoregulaci spočívá v odvádění přebytečného tepla odpařováním – sekrecí potu. Exkreční funkci zastávají kromě potních žláz ještě mazové žlázy. Mazové žlázy jsou vázány na vlasové folikuly a jsou rovnoměrně rozděleny po celém těle. Tukový maz chrání kůži před účinky vlhka, vysycháním a také bakteriemi. Funkce resorpční je důležitá pro aplikaci léčebných masť. Resorpce může probíhat několika cestami: omezeně potní nebo mazovou žlázou transfolikulárně, nejčastěji však transcelulárně (přes korneocyty) i intercelulárně (přes lipidové lamely).

V kůži se vlivem UV záření vytváří vitamin D. Kůže zprostředkovává informace ze zevního prostředí, a tak působí jako smyslový orgán. A v neposlední řadě má kůže sociální význam (Gawkrodger 2002; Hrabálek a Vávrová 2005; Proksch, Brandner et al. 2008).

2.3 Stárnutí kůže

Podobně jako celý organismus i kůže podléhá neodvratitelným změnám spojeným se stárnutím. S vyšším věkem je nejčastěji spojována změna barvy vlasů, šedivění, mužská plešatost, vrásky a váčky pod očima, pigmentové skvrny, vrásky v obličeji a pokles barevného sjednocení pleti (Gunn, Rexbye et al. 2009). Stárnutí kůže, označované také jako aging (z anglického termínu), je ovlivněno řadou faktorů zahrnujících genetiku, hormonální změny a metabolické procesy, ale také zátěž vnějšího prostředí. Podle těchto faktorů je stárnutí kůže rozdělováno na tzv. vnější stárnutí, převážně způsobené slunečním zářením – photoaging a na stárnutí vnitřní. Stárnutím kůže dochází k alteraci struktury, funkce a vzhledu. Stárnoucí kůže je například tenčí a méně odolná (Callaghan and Wilhelm 2008; Kohl, Steinbauer et al. 2011).

2.3.1 Přirozené stárnutí kůže

Vnitřní stárnutí kůže je přirozeným důsledkem fyziologických změn v průběhu času (Farage, Miller et al. 2008). Existuje mnoho teorií zmiňovaných v souvislosti s tímto typem stárnutí. Jedná se například o teorii zkracování telomer, mutace mitochondriální DNA, genetické mutace a pokles hladin některých hormonů, zejména nedostatek estrogenů a androgenů s přibývajícím věkem. Největší roli hraje ale pravděpodobně působení volných radikálů, které je příčinou i photoagingu (Kohl, Steinbauer et al. 2011).

Buněčné stárnutí je pravděpodobně výsledek kombinace snížení proliferační schopnosti buněk, snížené syntézy extracelulární matrix, zvýšené exprese degradačních enzymů a hromadění starých buněk v kůži, které se stávají rezistentní vůči apoptóze. Snížení dělení keratinocytů, melanocytů a fibroblastů je dáno mimo jiné potlačením regulačních růstových genů, jejichž exprese je důležitá pro G1 fázi buněčného cyklu a syntézu DNA a aktivací inhibitorů růstu (Jenkins 2002; Wulf, Sandby-Moller et al. 2004).

Telomery jsou specializované opakující se sekvence nukleotidů na koncích chromozomů. Jejich úkolem je bránit zkracování chromozomu při replikaci tím, že se zkracují samy. Maximální počet dělení je nazýván Hayflickovým limitem. Pokud se

telomery zkrátí natolik, že ztratí svou ochrannou funkci, buňka se už dále nemůže dělit a vstupuje do období senescence, které může vyústit v apoptózu. Na obnově telomer se podílí enzym telomeráza, která je ale u většiny fyziologických lidských somatických buněk pravděpodobně inaktivní (Nečas 2000). Naopak u buněk nádorového bujení lze zaznamenat telomerázu aktivní (Baumann 2007).

Během řady fyziologických procesů jako jsou například fagocytóza, syntéza prostaglandinů, funkce enzymů P450, ale i reakce ionizujícího záření, vznikají v organismu volné radikály. Nejvýznamnější je jejich tvorba v dýchacím řetězci v mitochondriích. Volné radikály jsou reaktivní kyslíkové molekuly (reactive oxygen species – ROS). Jejich přítomnost je důležitá pro některé fyziologické signalizační procesy organismu, ale nadměrná tvorba ROS a jejich vazba na důležité makromolekuly organismu poškozuje funkci těchto struktur a vyvolává jejich stárnutí. Mezi ně patří především lipidy, proteiny nebo DNA. Působením kyslíkových radikálů dochází i k mutacím mitochondriální DNA, což má za následek narušení správné mitochondriální funkce (Callaghan and Wilhelm 2008).

Maillardova reakce - neenzymatická glykace proteinů a nukleových bazí je dalším jevem objevujícím se při stárnutí tkání. Jde o reakci volných aminoskupin s redukujícími cukry. Dochází k ní přirozeně s rostoucím věkem, ale i zvýšenou glykemií v důsledku diabetu a ve světě stále více rozšířenou obezitou. Tzv. AGE-s produkty této reakce (advanced glycation end-products) cirkulují v krevním oběhu a váží se na komponenty extracelulární matrix. Jejich cytotoxicita hraje důležitou roli ve ztrátě a změně buněčné funkce a struktury tkání zvýšením odumírání buněk a aktivitou elastázy. V kůži dochází ke zvýšení tuhosti kolagenových vláken a poklesu elasticity (Pageon and Asselineau 2005; Ravelojaona, Molinari et al. 2006; Robert, Labat-Robert et al. 2009). *In vitro* bylo prokázáno, že poškození lidských fibroblastů těmito molekulami může být přeneseno na další generaci buněk, ačkoliv se již dále v prostředí AGE-s nenachází (Ravelojaona, Molinari et al. 2006).

2.3.2 Vnější faktory ovlivňující stárnutí kůže

Do určité míry kontrolovatelné vnější faktory, které mají vliv na stárnutí kůže, zahrnují například znečištění prostředí a jeho vliv na ozonovou vrstvu, dále komponenty

životního stylu jako spánek nebo stravu. Omezení kalorií se ukazuje jako možnost zpomalení tvorby ROS, naopak obezita tomuto jevu pravděpodobně přispívá. Tvorbu vrásek způsobí i opakované svalové pohyby jako je mračení, ale hlavně kouření a nadměrné vystavování kůže slunečnímu záření (Callaghan and Wilhelm 2008; Farage, Miller et al. 2008)

2.3.2.1 Efekt kouření

Ukázalo se, že ti, kteří kouří, mají méně kolagenových a elastinových vláken v dermis, jejich kůže je ochablá, šedá a méně elastická. Kouření snižuje přísun kyslíku a živin kožním tkáním, způsobuje zúžení cév, což může přispět k tvorbě vrásek. Kouření zvyšuje dysplazii keratinocytů a hrubost kůže. Byl prokázán jasný, na dávce závislý, vztah mezi kouřením a tvorbou vrásek. Kouření zvyšuje tvorbu volných radikálů a je rizikovým faktorem pro tvorbu spinocelulárního kožního karcinomu (Leow and Maibach 1998; Farage, Miller et al. 2008).

2.3.2.2 UV záření – photoaging

Účinky slunečního záření jsou velmi silné, odhaduje se, že až 80-90% viditelných známek stárnutí kůže je dáno právě slunečním zářením, a to především na těch místech, které nejsou před slunečním zářením běžně chráněny (Farage, Miller et al. 2008; Kohl, Steinbauer et al. 2011).

Míra poškození photoagingem je velmi individuální. Je to dáno rozdílnými návyky při pobytu na slunci a schopností regenerace ozářené tkáně. Obecně lze říci, že photoaging nejvíce postihuje osoby se světlou pletí (Gilchrest 1996). Pigmentace hraje důležitou roli v ochraně před vznikem rakoviny kůže. Poměr mezi výskytem rakoviny mezi bělochy a afroameričany naznačuje, že pigmentace poskytuje až 500násobnou úroveň ochrany před UV zářením (Rees 2004).

Spektrum ultrafialového slunečního záření můžeme z biologického hlediska rozdělit na tři oblasti záření: UVC, UVB a UVA. UVC (100-290 nm) je do značné míry blokováno ozonovou vrstvou a má zanedbatelný vliv na kůži. UVB (290-320 nm) proniká do epidermis, je zodpovědné např. za erytém a za poškození DNA vznikem pyrimidinových dimerů. UVA (320-400 nm) proniká hlouběji, do dermis a je nejvíce spojováno s photoagingem. Změny v dermis zahrnují degeneraci kolagenu, tvorbu vrásek a zbarvení kůže (Farage, Miller et al. 2008; Kohl, Steinbauer et al. 2011).

Ultrafialové záření produkující v kůži ROS vyvolá signální kaskádu. Dochází k aktivaci řady receptorů, například receptorů pro epidermální růstový faktor (EGF), tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), insulinového receptoru, interleukin 1 (IL-1) receptoru. Následně dojde k intracelulární signalizaci díky stimulaci mitogen-aktivující protein kinázy (MAP) p38 a c-Jun amino-terminální kinázy (JNK). To vede k indukci transkripčního faktoru AP-1 a AP-1 aktivuje transkripci matrix-metaloproteináz (MMP). Kolagenáza 1 (MMP1) zahájí degradaci kolagenu typu I a III, gelatináza B (MMP9) degraduje vzniklé fragmenty kolagenu a stromelysin 1 (MMP3) se podílí na degradaci kolagenu typu IV a zároveň aktivuje kolagenázu 1. UV záření také poškozuje syntézu nového kolagenu. AP-1 totiž negativně reguluje transkripci genů kódujících pro-kolagen typu I blokací transformačního růstového faktoru β (TGF β) (Yaar and Gilchrist 2007; Callaghan and Wilhelm 2008).

Na rozdíl od kolagenu, kterého ve sluncem exponované kůži ubývá, množství elastinu vlivem slunečního záření stoupá, kumuluje se, což vede také ke vzniku vrásek (Smith, Davidson et al. 1962), zatímco v chráněné kůži množství elastických vláken spíše klesá (Seite, Zucchi et al. 2006).

2.3.3 Vzhled a morfologie stárnoucí kůže

Stárnutí kůže je nejčastěji spojováno se vznikem vrásek. Vrásky můžeme rozdělit na několik typů podle vzniku (Růžičková Jarešová 2012):

- mimické – vznik v místech pohybu svalů, viditelné při pohybu nebo viditelné v klidu
- statické – přirozený důsledek stárnutí
- ztrátové – důsledek ubývání hmoty tukové tkáně a kolagenu
- habituální – důsledek negativního působení vnějších faktorů (kouření, UV záření)
- kombinované

Kromě vrásek, jasně viditelného projevu stárnutí, je možné zaznamenat i další změny charakteristické pro stárnoucí pokožku např. na buněčné úrovni.

2.3.3.1 Charakteristika před sluncem chráněné stárnoucí kůže

S postupujícím věkem se snižuje proliferační schopnost a terminační diferenciaci keratinocytů ve *stratum corneum* a klesá jejich schopnost odpovědi na signální podněty z okolních buněk. To může přispět ke zpomalení hojení drobných poranění nebo sklonu

k tvorbě nehojících se ulcerací a k suché, drsné a často i svědivé pokožce typické pro starší osoby. Kožní adnexa jsou změnou keratinocytů také poznamenána. Vlasy a nehty jsou tenčí a pomaleji rostou, snižuje se sekrece holokrinních žlázek. Kůže se s věkem stává tenčí a bledší. To může být dáno snižováním hustoty melanocytů nebo snížením vaskularizace. Depigmentace se výrazně projevuje na vlasech, kde dochází k typickému šedivění (Yaar and Gilchrest 2001). V důsledku změn v extracelulární matrix je kůže méně pružná. Klesá počet fibroblastů, je narušeno množství a uspořádání kolagenu a elastinu. Zvyšuje se aktivita kolagenázy degradující kolagen a objevují se vrásky (Callaghan and Wilhelm 2008). Další možné hodnocení vrásek než předchozí je možné tzv. Fitzpatrickovým rozdělením:

- Třída 1, skóre 1-3 – jemné vrásky
- Třída 2, skóre 4-6 – jemné až středně hluboké vrásky, vrásky patrné i v klidu
- Třída 3, skóre 7-9 – hluboké a četné vrásky, viditelné kožní záhyby



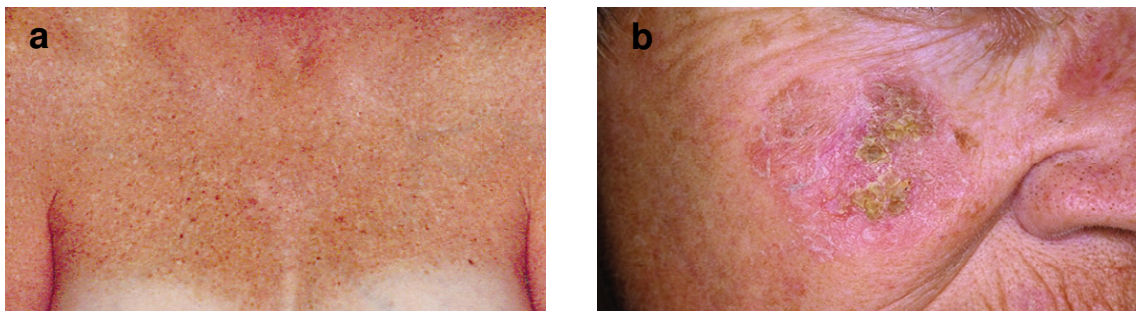
Obr. 3: Fitzpatrickovo skóre. Fitzpatrickova škála hodnocení vrásek dělí výskyt vrásek na 3 základní skupiny: jemné vrásky, pokročilé a velmi hluboké vrásky (Shoshani, Markovitz et al. 2008).

2.3.3.2 Charakteristika UV zasažené kůže – photoaging

Kombinace krátkovlnného UVB a dlouhovlnného UVA záření vede k poškození *epidermis* i *dermis*. Změny v takovéto kůži jsou více variabilní a vážnější a závisí na síle a historii sluneční expozice. *Epidermis* může být hyperplastická až silně atrofická v porovnání s místy před sluncem chráněnými. Objevuje se atypické dozrávání keratinocytů, což může vyústit do tzv. aktinické keratózy. Zřetelné jsou i změny v počtu a funkci melanocytů. Pihy se objevují již v prvních letech života v místech zhuštění

melanocytů. Během let se v závislosti na typu pokožky a slunečním záření stává pokožka hyperpigmentovaná, částečně i díky zvýšení množství epidermálního melaninu a počtu melanofágů (Bhawan, Andersen et al. 1995; Yaar and Gilchrest 2001). V pozdním věku se na kůži objevují tmavá ohraničená místa někdy označovaná jako stařecké skvrny. U světlých jedinců se na kůži vystavené slunečnímu záření může objevit i oblast celkové depigmentace, a to v místech, kde byly melanocyty UV zářením zničeny anebo névy, což je naopak nahromaděný pigment. S photoagingem je silně spojen výskyt malignit. Jedná se o od keratinocytů odvozený basocelulární a spinocelulární karcinom a melanomy odvozené od melanocytů (Yaar and Gilchrest 2001). Závažnost photoagingu a stupně vrásek jsou klasifikovány podle Glogauova skóre jako:

- Mírné (věk 28 - 35): pár vrásek, bez keratóz
- Střední (věk 35 - 50): prvotní vrásky, bledá pleť s časnými aktinickými keratózami
- Pokročilé (věk 50 - 65): přetrvávající vrásky, zbarvení kůže – teleangiektázie a aktinické keratózy
- Těžké (věk 65 - 70): hluboké vrásky, ochablost kůže, aktinické keratózy až rakovina kůže



Obr. 4: Permanentní hyperpigmentace a aktinická keratóza. a) 54 letá žena, každoroční opalování během léta (Yaar and Gilchrest 2001) b) aktinická keratóza (Werschler 2008).

3 Metody korekce příznaků stárnutí

Ke zmírnění projevů stárnutí je v dnešní době k dispozici velké množství kosmetických přípravků a rejuvenačních metod. Po procedurách a prostředcích vedoucích k redukci vrásek a modelaci kontur roste poptávka především v posledním desetiletí, ačkoliv snahu o zachování mladistvého vzhledu zaznamenáváme již od starověku.

3.1 Kosmetické přípravky

Na trhu existuje tisíce kosmetických přípravků. Některé mají odstranit vrásky, vyhladit pokožku, odstranit začervenání nebo povadlost pleti, jiné slibují kompletně omladit vzhled. Problémem je jejich skutečná účinnost. Kosmetické přípravky totiž nemusí splňovat podmínky, jaké splňují léčivé přípravky. Zevní léčiva se od kosmetických přípravků liší tím, že musí obsahovat přesně definovanou schválenou účinnou látkou s vymezením léčebné indikace. Musí splňovat podmínky vyhlášky č. 229/2008 Sb. o výrobě a distribuci léčiv, zdravotní bezpečnost, všechny komponenty musí odpovídat Evropskému a Českému lékopisu a při registraci se předkládají výsledky klinických studií prokazujících bezpečnost a účinnost. Legislativní podmínky pro kosmetické přípravky stanovuje pouze zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a vyhláška č. 26/2013 o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, zajišťující bezpečnost přípravku (Záhejský 2011). Pokud je účinnost testována, tak převážně *in vitro* a je velmi těžké odlišit efekt aktivní substance od efektu emolienčního a zvláčňujícího (Choi and Berson 2006).

Od 80. let se objevuje nová kategorie kosmetických přípravků označených jako „cosmeceuticals“. Jedná se o výrobky převážně velkých firem, které jsou schopné do určité míry určit léčebný účinek jednotlivých přípravků. Tento termín je ale mezinárodně chápán a uznáván velmi odlišně. U nás se prozatím objevuje snaha označit některé kosmetické výrobky jako zdravotnické prostředky, pro které platí přísnější směrnice než pro kosmetické přípravky (Horák 2011; Záhejský 2011).

3.1.1 Aktivní substance kosmetických přípravků proti stárnutí pleti

Aktivních složek použitých v kosmetických přípravcích je nepřehledné množství a jejich počet se neustále zvyšuje.

3.1.1.1 Alfa hydroxykyseliny

Alfa hydroxykyseliny zlepšují texturu kůže a sjednocují vzhled pleti pomocí keratolytického efektu na korneocyty. Fungují jako humektanty - pravděpodobně zvyšují množství dermálních glykosaminoglykanů a zlepšují funkční bariéru ve *stratum corneum*. Mechanismus účinku omlazení pleti alfa hydroxykyselinami není zcela znám. Mladší vzhled pokožky je dán pravděpodobně podpořením buněčného růstu a zpomalením buněčné diferenciaci díky snížení množství iontů vápníku v kožních buňkách (Choi and Berson 2006; Rivers 2008).

3.1.1.2 Antioxidanty

Antioxidanty zmírňují nebo předchází poškození volnými radikály. Do této skupiny řadíme vitamíny (A, B, C, E), alfa lipoovou kyselinu, koenzym Q10 a polyfenoly obsažené např. v zeleném čaji, nebo grepových semínkách (Yaar and Gilchrest 2007).

Aplikace vitamínu A (retinolu), zvyšuje obsah vody v *epidermis*, podílí se na obnově buněk a zvyšuje syntézu kolagenu. Retinol inhibuje metaloproteinázy matrix, podílející se na destrukci kolagenu. Kromě vyhlazení jemných vrásek pomáhá retinol při projasnění pokožky a při odstranění pigmentových skvrn (Stefanaki, Stratigos et al. 2005).

Z komplexu vitamínů B je pro pleť pravděpodobně nejdůležitější niacinamid a panthenol. Niacinamid zlepšuje lipidovou kožní bariéru. Zvyšuje podíl ceramidů, mastných kyselin i proteinů a tím zabraňuje ztrátě vody. Niacinamid také stimuluje tvorbu kolagenu. Podobně jako vitamin A sjednocuje barvu pleti a odstraňuje jemné vrásky. Panthenol funguje jako humektant ve *stratum corneum*, má protizánětlivé a antipruriginózní účinky a stimuluje proliferaci fibroblastů (Choi and Berson 2006).

Vitamín C je nezbytný pro správnou syntézu kolagenu. Chrání pokožku před UV poškozením, snížením syntézy elastinu brání solární elastóze. Vitamín E (alfa tokoferol) také snižuje popálení po expozici UV záření a redukuje volné radikály. Kombinace obou vitamínů zvyšuje jejich fotoprotektivní účinky (Oresajo, Pillai et al.).

Kyselina alfa lipoová má protizánětlivé vlastnosti a působí jako exfoliant. Podle jedné studie dvanáctitýdenní topická aplikace přípravku 5% kyseliny alfa lipoové snížila nerovnosti pleti, lentiga a jemné vrásky (Beitner 2003). Tato substance nechrání před UV zářením, ale regeneruje endogenní antioxidanty jako je vitamin C, E a koenzym Q10 (Choi and Berson 2006).

Ubichinon (CoQ10) obsažený v téměř všech buňkách je silným antioxidantem. Podílí se na snížení aktivity metaloproteináz, potlačuje aktivitu kolagenáz, zpomaluje úbytek kyseliny hyaluronové a zvyšuje podíl glykosaminoglykanů (Gao, Zhang et al. 2008).

3.1.1.3 Hydratační složky

Hydratační složky zlepšují vlastnosti *stratum corneum*. Zvyšují jeho hydrataci, kůže je měkčí, pružnější a hladší. Patologická ztráta vody z této vrstvy kůže může mít za následek různé problémy spojené se suchou kůží: svědění, bodání, zarudnutí, šupinatý vzhled nebo praskliny. Hydratace je tedy důležitá při léčbě různých kožních onemocnění. Na lepší hydrataci a zamezení transepidermální ztráty vody se podílí kyselina panthotenová a nikotinamid (Gao, Zhang et al. 2008). Nejdůležitějším tělu vlastním regulátorem hydratace je kyselina hyaluronová. V kůži se nachází 50% kyseliny hyaluronové z celkového zastoupení v těle. Tato komponenta extracelulární matrix je schopna vázat vodu až do tisícinásobku svého objemu. Kromě této funkce má také antioxidační a protizánětlivý efekt. Topická aplikace kyseliny hyaluronové prokazatelně zlepšuje hydrataci a elasticitu pleti a zjemňuje viditelné vrásky (Pavicic, Gauglitz et al. 2011).

3.1.1.4 Přípravky s UV faktory

Expozice kůže UV zářením může vyvolat akutní zánětlivé změny jako je erytém, edém a následně pigmentace a opálení, a chronické změny - photoaging. Opalovací krémy jsou určeny ke snížení těchto škodlivých účinků a to buď přímým blokováním světla, nebo absorpcí UV paprsků. Mezi první skupinu patří anorganické neboli minerální filtry: oxid zinečnatý, titanium dioxid, kaolín, talek, do druhé pak organické filtry: deriváty paraaminobenzoové kyseliny, benzofenonů, oktokryleny a další. SPF faktor (sun protection factor) udává kolikrát déle lze při použití daného faktoru vystavovat pokožku slunci bez rizika spálení než bez ochranného přípravku (Latha, Martis et al.; Gao, Zhang et al. 2008).

3.1.1.5 Termální voda

Léčebné účinky termálních vod jsou dlouhodobě známé. Vody jsou bohaté svým obsahem na řady různých minerálů, obsahují množství železa, draslíku, vápníku, manganu, křemíku nebo bikarbonátů. Jejich topické použití má protizánětlivé účinky, chrání pleť před volnými radikály a snižuje začervenání pleti po vystavení slunečnímu záření. Bylo prokázáno, že voda z Vichy stimuluje aktivitu katalázy, která rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu a tím brání vzniku volných radikálů (Bruneau, Bernard et al. 1996; Seite 2013). Fibroblasty kultivované v médiu s podílem termální vody z La Roche Posay vykazují větší rezistenci vůči stresu navozenému UVB zářením. Podobné účinky byly prokázány i *in vivo*. Místa ošetřená krémem s obsahem termální vody, následně vystavená UVB záření vykazují méně podrážděných buněk (Seite 2013).

3.1.1.6 Rhamnosa

Oligosacharidy a polysacharidy obsahující rhamnosu prokazují *in vitro* pozitivní účinek na stimulaci buněčné proliferace, syntézu kolagenu a snížení aktivity elastázy. Dále vykazují protizánětlivé vlastnosti a ochranný efekt na kyselinu hyaluronovou před poškozením volnými radikály (Andres, Molinari et al. 2006). Tyto sacharidy chrání extracelulární matrix před cytotoxicitou produktů Maillardovy reakce (Kohl, Steinbauer et al. 2011). Rhamnosa redukuje adhezi bakterií na kůži a chrání před UV indukovaným erytémem. Předpokládá se, že účinky jsou zprostředkovány lektinovým receptorem na keratinocytech (Andres, Molinari et al. 2006).

3.1.1.7 Salicyloylphytosfingosin

Pozitivní účinek sfingolipidů na kůži je sledován teprve posledních pár let. Sfingosin, phytosfingosin a 6-hydroxysfingosin ovlivňují buněčnou signalizaci a diferenciaci buněk, ačkoliv přímý účinek na zmírnění vrásek ověřen nebyl. Derivát salicyloylphytosfingosin ale zvyšuje produkci prokolagenu I, fibrilinu I a redukuje množství MMP-1. Krém s jeho obsahem snížil viditelnost periorbitálních vrásek v porovnání s placebo krémem (Farwick, Watson et al. 2007).

3.1.1.8 Adenosin

In vivo placebem kontrolované studie ukazují, že přípravky s obsahem adenosinu zvyšují hebkost pokožky a po dvouměsíční aplikaci dvakrát denně zlepšují glabellární vrásky a vrásky kolem očí. Testovány byly krémy a rozpustné fólie s obsahem

adenosinu a hodnocení bylo provedeno optickým topometrem (Abella 2006; Legendre, Schnitzler et al. 2007).

3.2 Rejuvenační metody

Rejuvenací rozumíme zmírnění projevů stáří a omlazení. Fotorejuvenace pak zmírňuje následky negativních účinků slunečního záření. Cílem je vyhlazení vrásek, redukce pórů, odstranění nežádoucích pigmentace a rozšířených cévek nebo obnovení tvorby kolagenu a následné zmírnění ochablosti pleti nejen v oblasti obličeje a dekoltu (Kulíková 2012).

3.2.1 Nepřístrojové metody rejuvenace

3.2.1.1 Chemický peeling

Jde o aplikaci chemické látky na kůži za účelem kontrolovaného poškození epidermis a části dermis. Následným hojením dojde ke zlepšení barvy a textury kůže. Zvyšuje se množství fibroblastů a glykosaminoglykanů. U hlubšího peelingu dochází k remodelaci kolagenu již za 2 týdny po aplikaci. K zákroku se používají různé látky, například kyselina glykolová, salicylová nebo trichloroctová (Mansfeldová 2011).

3.2.1.2 Aplikace botulotoxinu a výplňových materiálů

Jejich výhodou je poměrně rychlý omlazovací efekt. Aplikace botulotoxinu slouží k odstranění mimických vrásek blokadou nervosvalové inervace v místě vpichu. V aplikaci výplňových materiálů zaujímá přední místo kyselina hyaluronová. Kromě ní se používají i jiné typy výplní, například kalcium hydroxyapatit, polyethylenglykol-diakrylát, polymethylmetakrylát. Dalším typem je mezoterapie. Jedná se o injekční aplikaci účinných látek do kůže. Aplikované roztoky obsahují hlavně vitamíny a kyselinu hyaluronovou. Novinkou je také použití plasmy, která má urychlit hojení, zlepšit revaskulizaci a aktivaci fibroblastů a tvorbu kolagenu. Další novinkou je použití kmenových buněk. Tyto nezralé buňky se nacházejí kromě kostní dřevě i v tukové tkáni, odkud jsou v estetické medicíně získávány. Při jejich aplikaci do vazivové tkáně jsou schopné potlačit její odumírání a pomáhat při regeneraci tvorbou mnoha růstových faktorů (Kulíková 2012).

3.2.2 Přístrojové metody rejuvenace

3.2.2.1 Laserová rejuvenace

Používají se lasery s různou vlnovou délkou zasahující různé vrstvy kůže. Pomocí laseru lze odstranit nežádoucí pigmentaci, odstranit rozšířené žilky a remodelovat pleť. Zahřátím hlubších vrstev kůže dochází k denuraci bílkovin kolagenu. Vazivová vlákna se „stáhnou“ a v místě aplikace se aktivují mediátory zánětu, aktivují se fibroblasty a proteázy. Poškozený kolagen je odstraněn a je nahrazen novým (Liu, Dang et al. 2008). K navození tvorby nového kolagenu dochází asi po 1-2 měsících po aplikaci a k dosažení uspokojivého výsledku je nutné zákrok opakovat. K zahřátí různých míst kůže se používá i novější metoda frakcionované fototermolýzy. Mezi místy dopadu mikropaprsků zůstávají neporušená místa, ze kterých poté dochází k rychlé regeneraci (Basso, Oliveira et al.; Kulíková 2012).

3.2.2.2 Nelaserová rejuvenace

Do této kategorie patří např. použití intenzivního pulsního světla (IPL). Jde o světelný zdroj polychromatického světla produkující žluté, červené a infračervené záření. Další jsou například radiofrekvenční metody, jejichž principem je využití vysokofrekvenční elektromagnetické energie na kůži. Účinkem je opět prohřátí ošetřované tkáně (Kulíková 2012).

4 Biomechanika kůže

4.1 Biomechanické vlastnosti kůže

Kůže je multifunkční a velmi složitá struktura. Jedná se o vícevrstevný materiál s nejasnými hranicemi. Její mechanické vlastnosti se liší v různých směrech, v různých místech zatížení, dobou, po kterou je zatížení zachováno, okolními podmínkami a věkem (Edwards and Marks 1995).

Kůži můžeme definovat jako nelineární, anisotropický, viskoelastický a prakticky nestlačitelný materiál (Daly and Odland 1979). Protože se odstraněním *epidermis* viskoelastické vlastnosti kůže prakticky nemění, je za mechanické vlastnosti kůže odpovědná především *dermis* (Silver, Freeman et al. 2001; Ventre, Mollica et al. 2009).

Základními stavebními a mechanickými prvky jsou vlákna elastinu a kolagenu. Elastin se vyznačuje poměrně nízkou tuhostí a dovoluje dosažení velkých pružných deformací. Kolagen je v tahu naopak velmi pevný. Komponenty extracelulární matrix, jako je voda, proteiny a proteoglykany, mají důležitou roli lubrikantů a jsou zodpovědné za viskózní složku deformace (Agache, Monneur et al. 1980).

Stárnutí způsobuje funkční i strukturální změny kůže. Je to vznik vrásek, pigmentace, ale i větší rigidita dermis, která není schopná v takové míře reagovat adekvátně na zatížení (Diridollou, Vabre et al. 2001). Kolagenová vlákna se s věkem ukazují být více pevná a tuhá, elastická vlákna jsou křehčí. Klesá obsah proteoglykanů. Proto se mechanické vlastnosti kůže mění s věkem (Silver, Freeman et al. 2001).

Biomechanika a reologie zkoumá otázku deformace tkáně a její průběh v čase v závislosti na mechanickém zatížení. Mezi základní studované veličiny patří pevnost a tuhost - schopnost odolávat působení vnějších sil, elasticita - schopnost deformovaného materiálu vrátit se do svého původního tvaru a velikosti a viskozita - schopnost zachovat deformaci i po ukončení zatížení. Z hlediska reologie řadíme kůži mezi viskoelastická tělesa.

4.2 Měření biomechanických vlastností

K měření biomechanických parametrů kůže existuje mnoho *in vitro* a *in vivo* metod, které se vzájemně doplňují. Neinvazivní techniky dostupné pro měření mechanických vlastností kůže zahrnují metody založené na torzi, sání

a prodloužitelnosti. Jedná se o testy statické, kde je měřena změna po jednom aplikovaném impulsu a testy dynamické, kde je měřený objekt namáhán cyklickými stimuly. Pro testování biologických materiálů je vhodný především druhý typ měření (Diridollou, Vabre et al. 2001; Ďoubal a kolektiv 2011). Míra deformace a čas potřebný k navrácení do původního stavu jsou důležité parametry pro hodnocení stavu kůže. K charakterizaci kůže lze použít několik parametrů. Velmi důležitý je **Youngův modul pružnosti** určující tuhost vzorku. Vyšší hodnoty znamenají i vyšší tuhost a jsou zaznamenány u osob s vyšším věkem. Studie ukazují narůstání hodnot asi od 30 let a až dvojnásobné hodnoty ve stáří (Agache, Monneur et al. 1980). Naměřené hodnoty se ale často velmi liší, od 0,02 MPa do 57 MPa. Je to dáno tím, že měření je ovlivněno aplikovaným napětím, tloušťkou kůže, či místem měření a nezahrnuje počáteční napětí, které je pro každého jedince specifické (Diridollou, Vabre et al. 2001).

UER (unrestored energy ratio) je index kožní ne-elasticity, který charakterizuje viskozitu intersticiální tekutiny v síti glykosaminoglykanů. Jeho hodnoty se v dětství snižují až do puberty a poté lineárně rostou. Viskozita totiž souvisí s množstvím glykosaminoglykanů, které s věkem klesá (Diridollou, Vabre et al. 2001).

4.2.1 Principy některých *in vivo* metod určených k měření biomechanických vlastností kůže

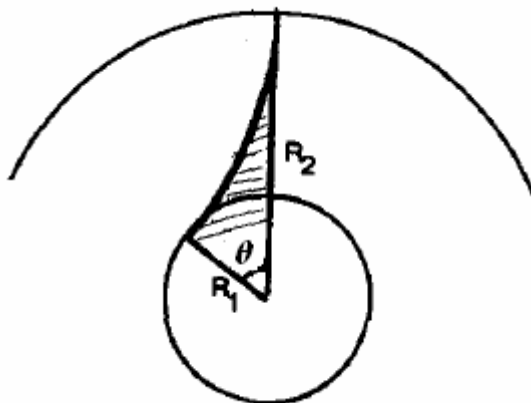
4.2.1.1 Instrumentální metody

Metoda založená na torzi

Tato metoda využívá speciálně sestavené aparatury zvané twistometr. Vzorek měřené kůže je uchycen mezi centrální disk a obvodový prstenec. Centrální disk je uveden do točivého pohybu, kůže se kroučí a výsledný rotační úhel θ je zaznamenán. Disk a prstenec musí být ke kůži pevně přilepeny oboustrannou lepicí páskou. Podle typu přístroje lze deformaci kroucením opakovat v různé frekvenci a délce působení deformace. Odlišit lze také plochu testované kůže, což je důležité pro měření vlastností různých vrstev kůže (Agache and Humbert 2004). Závislost mezi Youngovým modulem pružnosti a deformací je následující:

$$E = \frac{M}{2\pi \cdot 0,4e \cdot r_1 r_2 \cdot \theta} \quad (1)$$

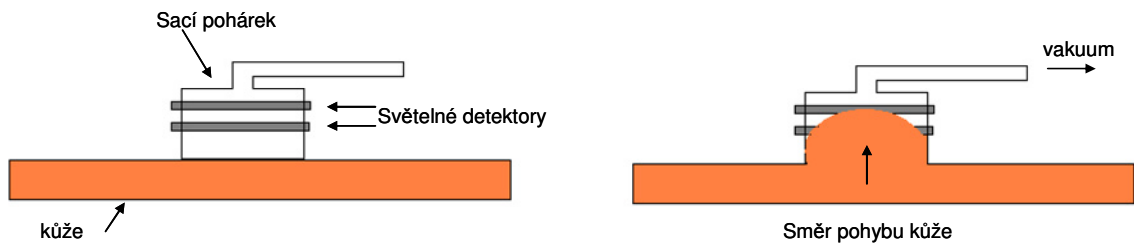
E Youngův modul pružnosti, M točivý moment, e tloušťka kůže, r_1 poloměr centrálního disku, r_2 vnitřní poloměr obvodového prstence, θ úhel rotace mezi diskem a prstencem.



Obr. 5: Torzní deformace. R_1 poloměr centrálního disku, R_2 vnitřní poloměr obvodového prstence, θ úhel rotace mezi diskem a prstencem (Agache, Monneur et al. 1980).

Metoda založená na sání

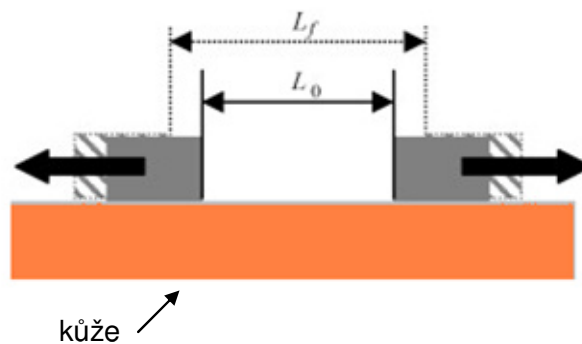
Aparatura je tvořena sacím pohárkem, který je pevně připevněn ke kůži a tak se vytvoří uzavřená komora. Deformace je měřena buď opticky anebo pomocí ultrazvuku (Edwards and Marks 1995). V prvním případě probíhají skrz pohárek dva úzké světelné paprsky v různých výškách rovnoběžně s povrchem kůže. Uvnitř pohárku se zvyšuje sání díky připojení na počítačem řízenou vakuovou pumpu a kůže se zvedá až do okamžiku, kdy zakryje oba světelné paprsky (Serup, Jemec et al. 2006). Ultrazvuková detekce na rozdíl od optické umožňuje sledovat odpověď na sání v jednotlivých kožních vrstvách (Edwards and Marks 1995).



Obr. 6: Průběh metody založené na sání s optickým měřícím systémem. Pohárek se připevní ke kůži a při spuštění vakuové pumpy dojde k nasání kůže do pohárku (Serup, Jemec et al. 2006).

Metoda založená na natažení vzorku

Pro jednoosý extensometr jsou typické dvě destičky, které se pevně připojí k měřenému objektu paralelně k jeho povrchu. Při měření jsou tyto dvě destičky od sebe odtahovány, čímž dochází deformaci povrchu. Tato změna je detekována tensometry, které mění svůj odpor úměrně k prodloužení materiálu. Prodloužení je možno přepočítat na mechanické napětí (Delalleau, Josse et al. 2006).



Obr. 7: Princip in vivo extensometru. L_0 značí původní vzdálenost destiček, L_f značí finální vzdálenost po deformaci (Delalleau, Josse et al. 2006).

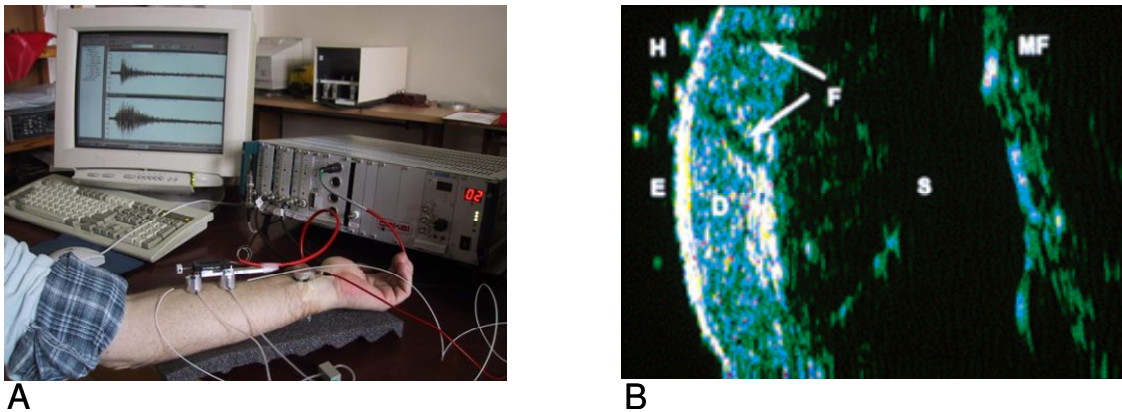
4.2.1.2 Zobrazovací metody

Nelineární ultrazvuková spektroskopie

Ultrazvuk je běžná zobrazovací technika ve zdravotnictví, ale i v hodnocení různých konstrukčních součástí. Základem je šíření ultrazvukových vln materiálem,

v našem případě tkání, a jejich detekce. Vlny mohou být odraženy, ohýbány a lomeny na základě změny v kožní struktuře, čímž se liší i výsledné zobrazení (Jemec, Gniadecka et al. 2000).

Nelineární ultrazvuková spektroskopie byla navržena Ústavem termomechaniky Akademie věd pod vedením Ing. Zdeňka Převorovského, CSc. Tato metoda je založena na studiu nelineárních jevů při buzení ultrazvukových vln v tělese. Na rozdíl od klasických ultrazvukových metod je až tisíckrát citlivější. Velmi přesná je zejména při buzení tělesa dvěma či více ultrazvukovými frekvencemi a nelinearity měřeného materiálu mají za následek vznik postranních pásem ve spektrech přijímaných signálů (www.it.cas.cz/cs/d4/I042, 2013).

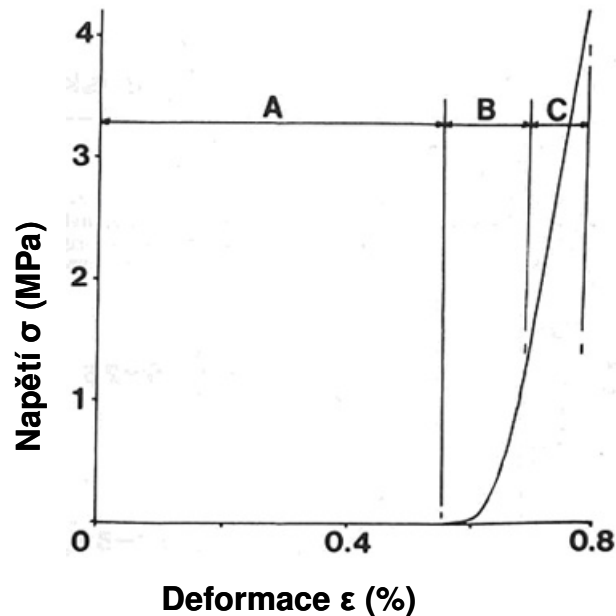


Obr. 8: Měření kůže pomocí ultrazvuku. A): Praktické provedení měření mechanických vlastností živé kožní tkáně v Ústavu termomechaniky, B): Ultrazvukové zobrazení hřbetu předloktí 32leté ženy: E: epidermis, H: chlup, D: dermis, F: folikuly chloupků, S: podkoží, MF: svalová facie (www.it.cas.cz/cs/d4/I042, 2013, (Jemec, Gniadecka et al. 2000).

4.3 Křivka mechanického namáhání

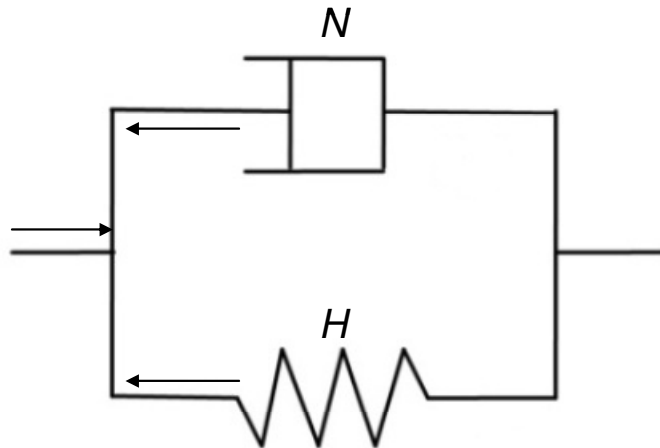
Mechanické namáhání je popisováno křivkou namáhání – deformace (stress-strain curve). Za namáhání je považována aplikovaná síla a za deformaci absolutní deformace. Může to být délka při měření v tahu a tlaku, nebo např. úhel, při měření ve smyku. Poměr namáhání a deformace pak můžeme popsat jako tuhost (Ďoubal a kolektiv 2011). Čím vyšší je tento poměr, tím vyšší musí být vynaloženo úsilí k deformaci (T.M. Kajs and Gartstein 1991).

Z obrázku 9 je vidět, že kůže je nelineární struktura a její chování v závislosti na napětí můžeme rozdělit do tří částí. V první fázi stoupá křivka jen zvolna. Za to zodpovídají pružná elastická vlákna. V další části začínají klást odpor vlákna kolagenu a rovnají se ve směru napětí a tím jsou namáhány vlákna elastinu. Vlákna kolagenu jsou nakonec velmi zpevněná a k další deformaci nemůže dojít (Daly and Odland 1979; Silver, Siperko et al. 2003).



Obr.9: Křivka napětí-deformace lidské kůže. Kůže byla získána od 45leté ženy. A = iniciální deformace, B = střední fáze deformace, některá vlákna jsou již narovnána, C = maximální deformace, všechna vlákna jsou zpevněna (Daly and Odland 1979).

Mechanické chování zahrnuje složku elastickou a viskózní (Silver, Siperko et al. 2003). Chování reálných těles se nejčastěji přibližuje Voigtovu modelu. Jde o paralelní kombinaci Hookova a Newtonova tělesa.



Obr.10: Voigtův model. H = Hookovo těleso, N = Newtonovo těleso

Hookeovo těleso reprezentuje elastickou složku chování. Můžeme ho znázornit jako pružinu, která se po zatížení deformuje:

$$F = H \cdot \Delta L \quad (2)$$

F je působící síla, L deformace tělesa a H tuhost pružiny ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

Při namáhání v tahu můžeme pružinu popsat:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (3)$$

σ je normálové napětí, E modul pružnosti v tahu (Youngův modul), ε relativní prodloužení

Newtonovo těleso (píst) charakterizuje viskózní složku:

$$F = N \cdot \frac{dL}{dt} \quad (4)$$

F je působící síla, L deformace tělesa, t čas a N Newtonův koeficient ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$)

Mechanické chování Newtonova tělesa při namáhání v tahu se vyjadřuje:

$$\sigma = \eta_N \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (5)$$

σ je normálové napětí, η_N je normálová viskozita, ε relativní prodloužení

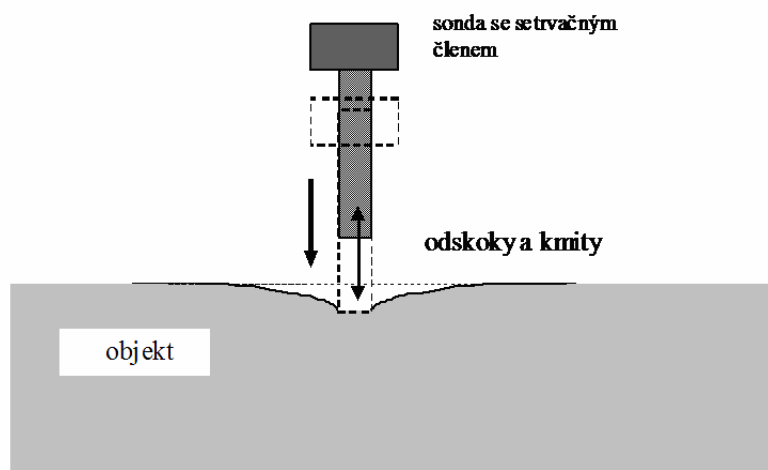
5 Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit, zda *in vivo* aplikace kosmetického přípravku určeného ke zmírnění projevů stárnutí ovlivní mechanické parametry kůže. Kůže dobrovolníků byla monitorována speciálním přístrojem, dynamickým viskoelastometrem, vyvinutým na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové na Katedře biofyziky a fyzikální chemie, a hodnoty zpracovány adekvátním softwarem.

6 Experimentální část

6.1 Aparatura měření

Viskoelastometr použitý k měření je na Katedře biofyziky a fyzikální chemie vyvíjen od roku 2002. Kromě měření parametrů lidské kůže *in vivo* může být použit pro měření tkání a biologických materiálů *in vitro* a vzorků průmyslových materiálů v tlaku, tahu, ohybu i krutu. Přístroj je tvořen panelem, na kterém je připevněna měřící sonda, dále z fixačního zařízení pro upevnění měřeného objektu, zařízení pro aplikaci deformační síly, A/D převodníku a počítače. Sonda působí na měřený objekt fixovaný v definované poloze. Snímač je tvořen elektromechanickým čidlem induktivního typu a elektronickým obvodem pro zpracování signálu ze snímače. Výsledný průběh je převáděn A/D převodníkem do digitální formy a přiváděn do počítače. (Ďoubal a kolektiv 2011).



Obr. 11: Schéma pro měření viskoelastivity povrchu z odskoků a kmitů
(Ďoubal a kolektiv 2011)

K testování mechanických parametrů povrchu těles a lidské kůže jsou vhodné impulsní charakteristiky. Základním principem impulsního měření je určení závislosti mezi silou působící po velmi krátkou dobu a následnými deformacemi. Sonda - skleněná tyčinka o hmotnosti 10,4 g se setrvačným členem se rychlým impulsem spustí ze zvolené výšky a dochází k deformaci systému (vzorku). Po ukončení impulsu se deformace systému dále mění - sonda odskakuje a kmitá pouze

v závislosti na parametrech systému. Odezva na impuls síly má dvě složky, to znamená, že reologický model popisující mechanické chování kůže je tvořen dvěma Voigtovými modely. Rychlá složka odpovědi má tvar tlumených harmonických kmitů. Pomalá složka má exponenciální charakter. Podle předchozích měření představuje pomalá složka dynamické odpovědi malý podíl reakce na impuls síly (přibližně 10%) a lze ji zanedbat (Ďoubal and Klemra 2002). Pro analýzu deformační reakce je tedy možné se soustředit na rychlou složku deformační odpovědi. Software vyhodnotí pohyb sondy a z intervalů, kdy je sonda v kontaktu s tělesem, určí frekvenci a tlumení kmitů. Zároveň odečte intervaly, kdy se sonda pohybuje balistickou dráhou. Z těchto dat vypočítá Hookeův a Newtonův parametr měřeného povrchu.

6.2 Použité vztahy a postup

Software z frekvence a tlumení kmitů vypočítá Hookeův a Newtonův koeficient. Pohybová rovnice soustavy je:

$$F = M \frac{dL^2}{dt^2} + N \frac{dL}{dt} + HL \quad (6)$$

F je síla, M hmotnost pohyblivé části systému, L absolutní deformace, t čas, N je Newtonův koeficient, H je Hookeův koeficient.

Časová závislost deformace tělesa je popsána vztahem:

$$L(t) = L_0 e^{-\alpha t} \cdot \sin(\omega t) \quad (7)$$

α je tlumení kmitů, ω je úhlová rychlost

Frekvence oscilací je dána vztahem:

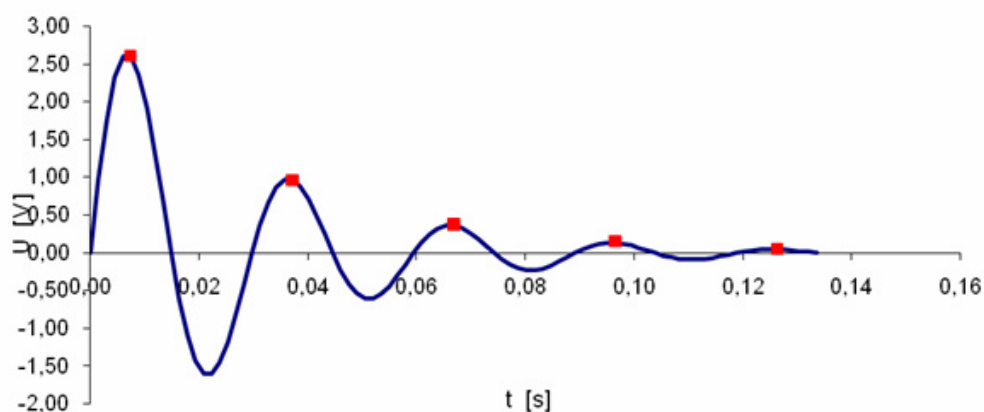
$$\omega = \frac{\sqrt{4M \cdot H - N^2}}{2M} \quad (8)$$

Pro tlumení oscilací platí:

$$\alpha = \frac{N}{2M} \quad (9)$$

Rychlostní konstantu určíme podle vztahu:

$$\tau = \frac{N}{H} \quad (10)$$



Obr. 12: Průběh tlumených kmitů.

6.3 Metodika měření

6.3.1 Použitý materiál

K testování jsme vybrali přípravek Vichy Liftactiv Serum 10. Sérum je určeno pro ženy ve věku od 35 let, které chtějí vyhladit vrásky, zlepšit jas a pevnost pleti.

Složení přípravku uvedené výrobcem je: voda, rhamnosa, glycerin, denaturovaný alkohol, dimetikon, hydroxyethylpiperazinethansulfonová kyselina, PEG-20 methylglukososesquisteárat, hyaluronát sodný, salicyloylphytosfingosin, phenoxyethanol, adenosin, amonium polyakryldimethyltauramid, disodium EDTA, kaprylylglykol, kyselina citronová, xanthanová guma, oktyldodekanol, parfemace.



Obr. 13: Vichy Liftactiv Serum 10. (www.vichy.cz/anti-age/LIFTACTIV-S%C3%89RUM-10-LIFTACTIV/p6506.aspx, 2013)

6.3.2 Podmínky měření

Experimentu se zúčastnilo dvacet dobrovolníků – žen ve věku 25 až 67 let. Více než polovina dobrovolníků byla starší 40 let. Jednotlivci byli za účelem zachování anonymity experimentu označeni písmeny a věkem.

Sérum bylo adjustováno do náhradního obalu s kapátkem, aby testované osoby nevěděly, o jaký přípravek se jedná.

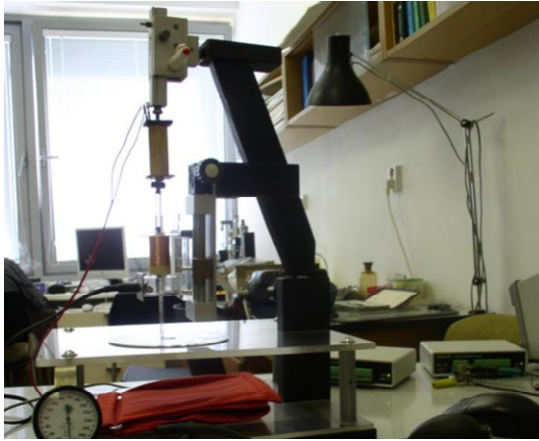
Před samotným měřením byl dobrovolníky vyplněn dotazník (viz. příloha), ve kterém jsme zjišťovali faktory, které by mohly výsledky měření ovlivnit.

Místem měření byl palcový val (thenarový polštář) ruky, která nebyla pro jednotlivce dominantní (až na výjimky ze zdravotních důvodů). Na toto místo si dobrovolníci aplikovali výše uvedené sérum po dobu dvou měsíců a to dvakrát denně. Dobrovolníci byli poučeni, že po bezprostřední aplikaci se mají vyhnout mytí rukou a nechat sérum dostatečně vstřebat.

Kontrolní měření (měření číslo 1) proběhlo před zahájením aplikace, další měření v intervalu jednoho měsíce (měření číslo 2) a dvou měsíců (měření číslo 3). Protože variabilita povrchu kůže je obrovská, bylo měření prováděno vždy na třech různých místech palcového valu a to vždy pětkrát za sebou. Získané hodnoty pak byly zprůměrovány.

6.3.3 Postup měření

1. Osoba byla posazena k přístroji v místnosti s pokojovou teplotou a kůže v místě měření byla očištěna lihomethanolem. Před měřením jsme se ujistili pohmatem, že i kůže jedince je temperována na pokojovou teplotu. Měření se provádí v klidu, dobrovolník by se neměl hýbat.
2. Ruka byla pneumaticky fixována pomocí manžety za použití tlaku 120 mm Hg, aby se zabránilo nežádoucím i jemným pohybům ruky.
3. Sonda byla spuštěna na kůži a byla ponechána volně odskakovat. Signál se přenesl do počítače a byl vyhodnocen softwarem.
4. Měření bylo zopakováno pětkrát na stejném místě.
5. Po 10 minutové pauze byly kroky 1. – 4. dvakrát zopakovány na jiném místě palcového valu.



A



B

Obr. 14: A) Měřící aparatura pro měření odskoků, B) Ruka fixovaná k aparatuře (foto Mgr. M. Kuchařová, PhD.)

6.4 Zpracování výsledků

6.4.1 Dotazník

Tab. 1: Vypracování dotazníku. Ve dvou levých sloupcích jsou heslovitě uvedené otázky a možné odpovědi. V dalších sloupcích jsou odpovědi dobrovolníků označené hvězdičkou „*“, křížek „x“ znamená, že dobrovolnice neodpověděla na otázku.

	Označení dobrovolníka	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
	Věk	25	26	30	38	39	39	40	47	47	48	54	55	55	55	56	57	57	59	60	67
Typ pokožky	suchá				*		*			*				*				*	*		*
	normální, smíšená	*	*	*		*		*	*		*	*	*		*	*	*			*	
	mastná																				
Opaluje se	ráda, často								*			*								*	*
	výjimečně	*		*	*		*				*		*	*	*	*	*	*	*		
	jen o dovolené		*			*		*		*											
	navštěvuje i solárium																				
Používání opalovacích krémů	ano	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X		*	*		*	*	
	ne													X	*			*			*
Velké zatížení rukou během dne	ano	*		*	*		*	*		*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
	ne		*			*			*						*						
Mytí rukou často během dne	ano	*	*	*			*			*	*	*	*	*		*	*	*	*		
	ne				*	*		*	*						*					*	*

Označení dobrovolníka	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
Věk	25	26	30	38	39	39	40	47	47	48	54	55	55	55	56	57	57	59	60	67
Použití krému na ruce	ano, několikrát za den	*				*					*		*		*	*		*		*
	ano, nepravidelně		*	*	*		*	*	*	*		*							*	
	ne													*			*			
Denní péče o pleť	ano	*	*		*	*		*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*
	ano, nepravidelně			*			*			*	*					*				
	ne																			
Používání péče proti vráskám	ano				*	*	*		*	*		*	*	*			*	*		
	ne	*	*	*				*			*	*			*	*			*	*
Užívání léků	ano					*	*			*	*	*		*		*	*	*	*	*
	ne	*	*	*	*			*	*			*		*					*	
Kouření	ano												*							*
	ne	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*

6.4.2 Souhrn naměřených hodnot

Pomocí softwaru v připojeném počítači byly získány hodnoty Hookeova a Newtonova koeficientu. Hookeův koeficient odpovídá tuhosti měřeného materiálu, Newtonův koeficient viskozitě. Časová konstanta je podíl Newtonova a Hookeova koeficientu a udává rychlost návratu materiálu po deformaci do původního stavu.

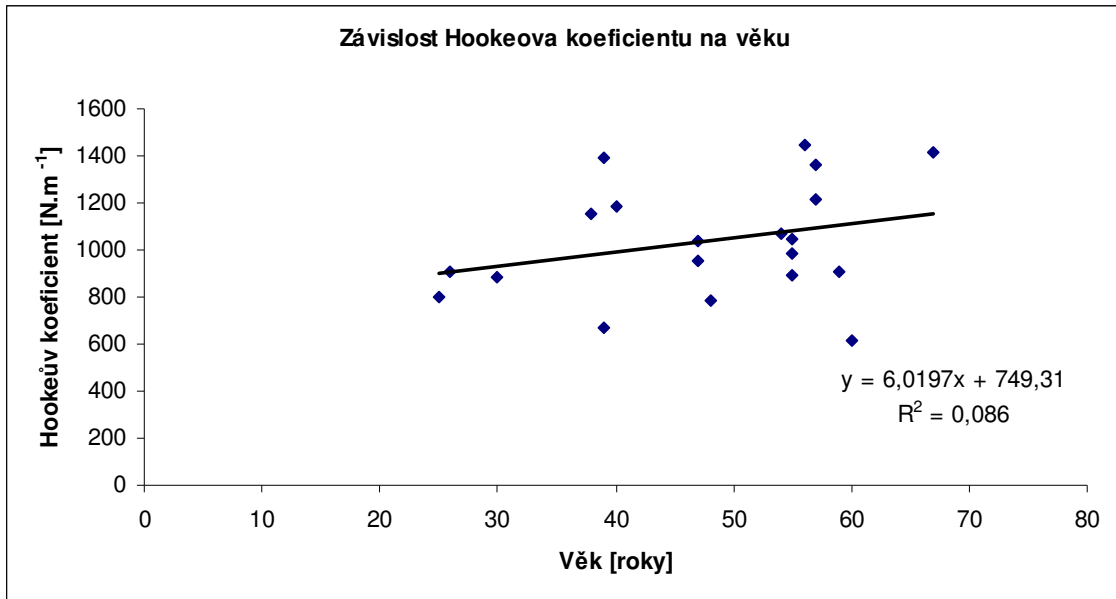
Tab. 2: Souhrnný přehled naměřených hodnot. Průměrné hodnoty Hookeova a Newtonova koeficientu pro sérii měření číslo 1 (kontrolní měření před aplikací), číslo 2 (po měsíci aplikace séra) a číslo 3 (po dvou měsících aplikace séra) a příslušných směrodatných odchylek a časových konstant.

Označení/ Věk	Číslo měření	Hookeův koeficient [N.m ⁻¹]	Směrodatná odchylka [N.m ⁻¹]	Newtonův koeficient [N.s.m ⁻¹]	Směrodatná odchylka [N.s.m ⁻¹]	Časová konstanta (s)
A/25	1	7,98E+02	9,00E+00	5,61E-01	6,00E-03	7,03E-04
	2	8,63E+02	8,70E+01	7,98E-01	7,50E-02	9,37E-04
	3	7,26E+02	1,43E+02	3,64E-01	6,40E-02	5,22E-04
B/26	1	9,10E+02	1,66E+02	5,14E-01	7,50E-02	5,70E-04
	2	9,50E+02	8,50E+01	8,33E-01	7,20E-02	8,79E-04
	3	9,24E+02	1,90E+01	4,35E-01	2,90E-02	4,71E-04
C/30	1	8,86E+02	5,70E+01	8,61E-01	1,52E-01	9,76E-04
	2	9,66E+02	6,60E+01	7,53E-01	4,90E-02	7,81E-04
	3	6,51E+02	9,80E+01	3,91E-01	9,60E-02	6,10E-04
D/38	1	1,15E+03	1,11E+02	5,35E-01	1,50E-01	4,67E-04
	2	1,18E+03	5,10E+02	5,62E-01	1,52E-01	4,79E-04
	3	1,17E+03	1,00E+01	4,76E-01	2,29E-01	4,09E-04
E/39	1	6,66E+02	1,90E+01	4,11E-01	4,80E-02	6,23E-04
	2	5,58E+02	7,60E+01	5,51E-01	1,04E-01	1,02E-03
	3	6,36E+02	1,31E+02	4,36E-01	1,24E-01	6,97E-04
F/39	1	1,34E+03	1,60E+02	8,19E-01	1,92E-01	6,04E-04
	2	1,28E+03	1,70E+02	6,12E-01	1,69E-01	4,99E-04
	3	1,30E+03	1,30E+02	4,43E-01	2,33E-01	3,39E-04
G/40	1	1,19E+03	6,00E+01	5,41E-01	2,10E-01	4,58E-04
	2	1,17E+03	1,90E+02	1,01E+00	1,00E-01	8,98E-04
	3	1,22E+03	2,90E+02	5,20E-01	2,26E-01	4,58E-04
H/47	1	1,03E+03	9,00E+01	4,69E-01	1,80E-02	4,58E-04
	2	1,03E+03	2,50E+02	5,95E-01	1,52E-01	5,90E-04
	3	1,06E+03	1,70E+02	4,95E-01	2,36E-01	4,78E-04

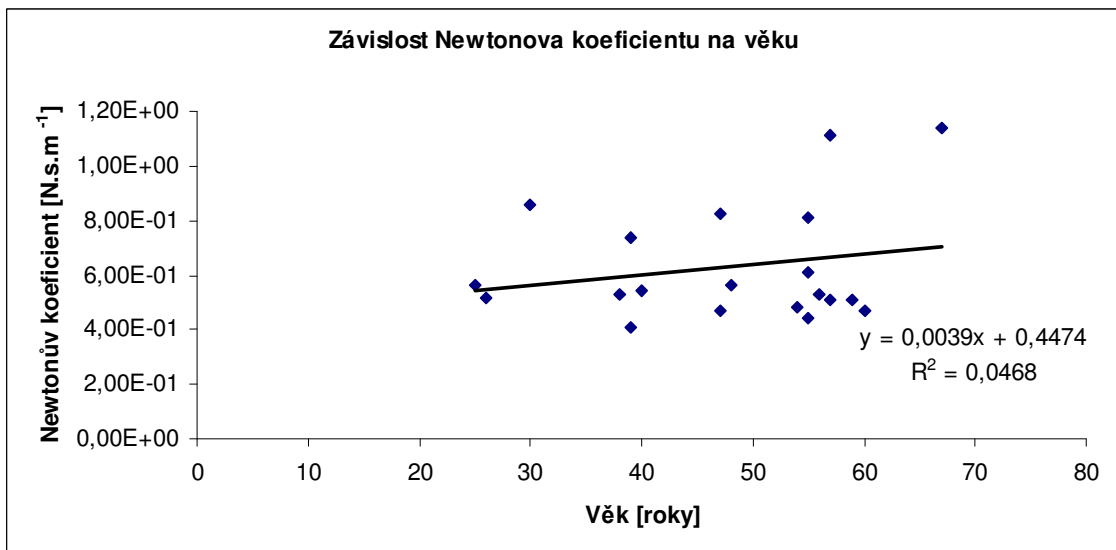
Označení/ Věk	Číslo měření	Hookeův koeficient [N.m ⁻¹]	Směrodatná odchylka [N.m ⁻¹]	Newtonův koeficient [N.s.m ⁻¹]	Směrodatná odchylka [N.s.m ⁻¹]	Časová konstanta (s)
I/47	1	9,52E+02	1,07E+02	8,26E-01	1,68E-01	8,96E-04
	2	8,19E+02	9,00E+01	4,28E-01	7,90E-02	5,29E-04
	3	8,31E+02	1,27E+02	4,24E-01	1,27E-01	5,15E-04
J/48	1	7,79E+02	8,20E+01	5,55E-01	1,23E-01	7,06E-04
	2	8,11E+02	8,40E+01	5,64E-01	1,44E-01	6,97E-04
	3	9,76E+02	1,08E+02	4,17E-01	1,18E-01	4,31E-04
K/54	1	1,07E+03	8,00E+01	4,32E-01	1,21E-01	4,06E-04
	2	7,83E+02	1,53E+02	4,15E-01	1,15E-01	5,57E-04
	3	1,09E+03	1,70E+02	2,79E-01	2,70E-02	2,63E-04
L/55	1	9,74E+02	1,79E+02	6,18E-01	1,30E-01	6,48E-04
	2	1,27E+03	1,00E+02	5,19E-01	3,40E-02	4,11E-04
	3	1,43E+03	1,00E+01	6,49E-01	2,35E-01	4,56E-04
M/55	1	1,12E+03	1,30E+02	1,02E+00	3,40E-01	8,96E-04
	2	1,48E+03	2,20E+02	1,10E+00	1,80E-01	7,66E-04
	3	1,14E+03	1,30E+02	3,42E-01	1,17E-01	3,07E-04
N/55	1	8,80E+02	1,18E+02	4,94E-01	1,25E-01	5,71E-04
	2	8,98E+02	1,55E+02	5,59E-01	1,20E-01	6,37E-04
	3	8,47E+02	1,51E+02	3,91E-01	1,70E-01	4,74E-04
O/56	1	1,44E+03	2,50E+02	6,28E-01	1,83E-01	4,54E-04
	2	1,27E+03	1,10E+02	6,93E-01	2,17E-01	5,55E-04
	3	měření nedokončeno z rodinných důvodů				
P/57	1	1,37E+03	1,60E+02	1,12E+00	2,00E-01	8,18E-04
	2	1,52E+03	1,70E+02	1,16E+00	1,00E-01	7,74E-04
	3	2,01E+03	3,00E+02	3,97E-01	1,07E-01	1,99E-04
Q/57	1	1,21E+03	6,00E+01	5,17E-01	7,10E-02	4,28E-04
	2	1,35E+03	1,80E+02	5,39E-01	9,60E-02	4,00E-04
	3	1,23E+03	3,00E+02	4,65E-01	2,46E-01	3,67E-04
R/59	1	9,07E+02	1,02E+02	5,08E-01	6,70E-02	5,70E-04
	2	6,81E+02	5,90E+01	7,58E-01	1,49E-01	1,11E-03
	3	7,18E+02	6,60E+01	4,04E-01	6,00E-02	5,73E-04
S/60	1	6,14E+02	2,90E+01	5,08E-01	1,40E-01	8,35E-04
	2	8,36E+02	1,36E+02	4,75E-01	8,00E-02	5,84E-04
	3	8,83E+02	1,40E+02	3,44E-01	1,59E-01	3,87E-04
T/67	1	1,42E+03	9,00E+01	1,12E+00	1,30E-01	7,95E-04
	2	1,64E+03	2,80E+02	1,02E+00	2,20E-01	6,34E-04
	3	1,35E+03	2,50E+02	5,96E-01	1,69E-01	4,58E-04

6.4.3 Závislost Hookeova koeficientu, Newtonova koeficientu a časové konstanty na věku

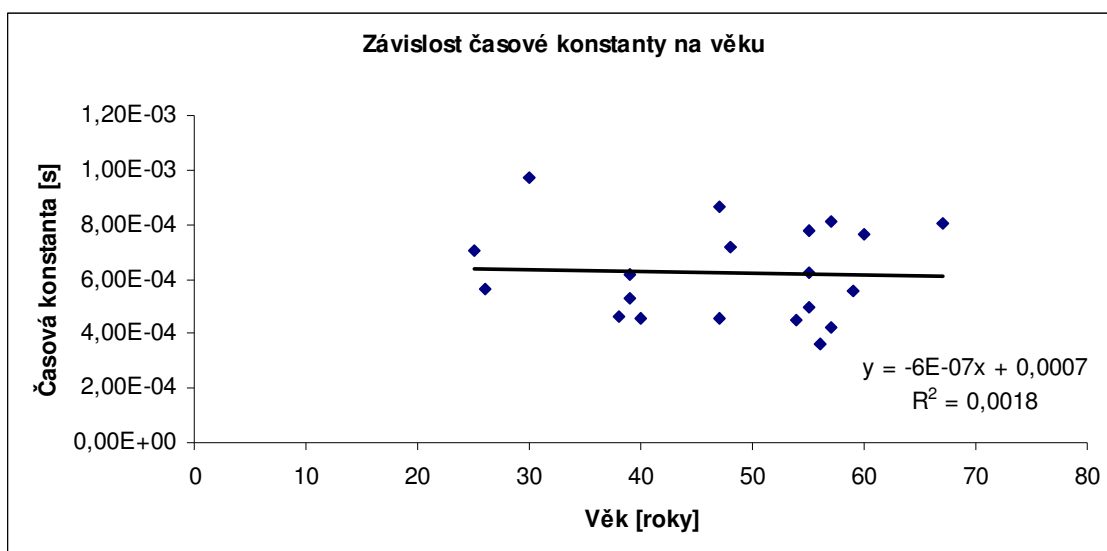
Hodnoty mechanických parametrů zjištěných v první sérii měření byly zaneseny do grafu v závislosti na stáří dobrovolníků. Graf závislosti Hookeova koeficientu na věku naznačuje možný nárůst hodnot, ovšem bez statistické významnosti. Mezi naměřenými hodnotami Newtonova koeficientu časové konstanty a stáří jedinců se žádná tendence neprojevila.



Obr. 15: Závislost Hookeova koeficientu na věku.



Obr. 16: Závislost Newtonova koeficientu na věku.

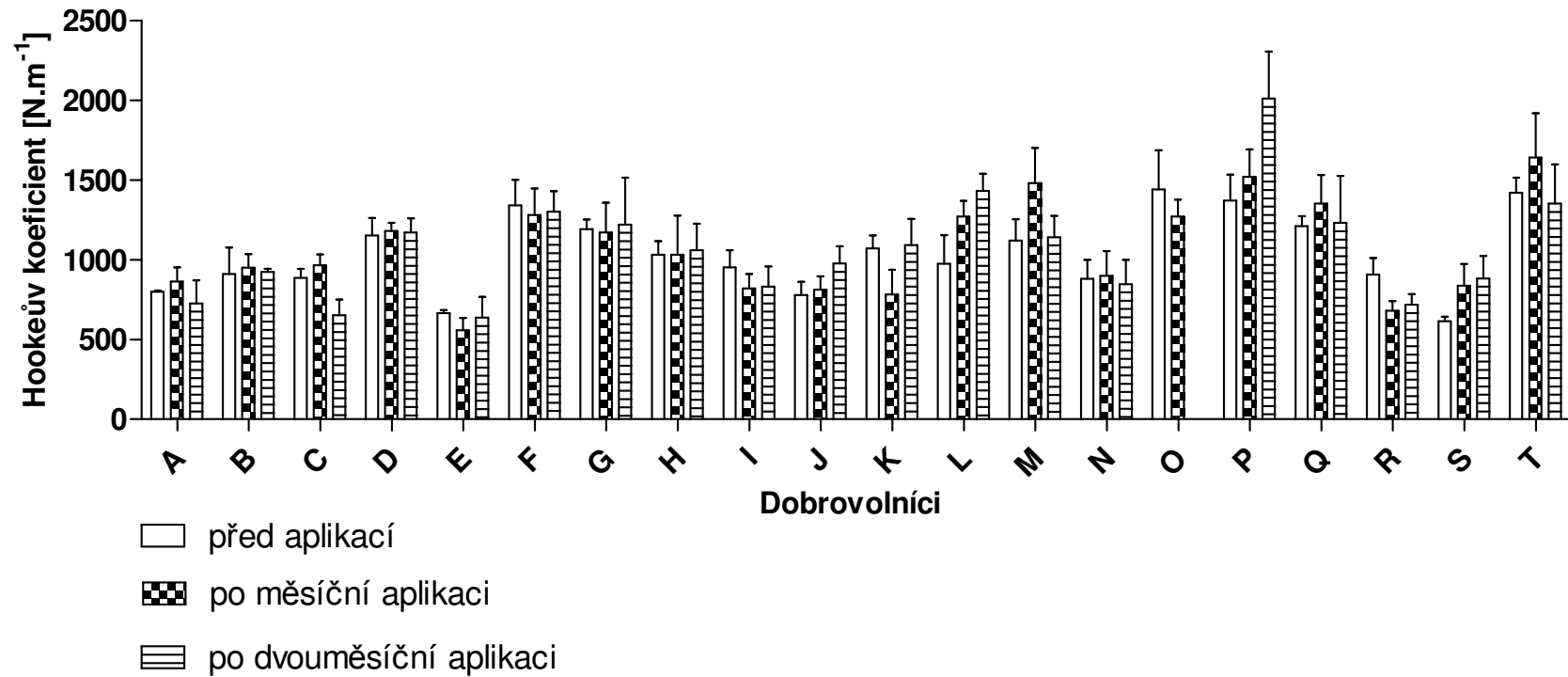


Obr. 17: Závislost časové konstanty na věku.

6.4.4 Změny parametrů po aplikaci séra

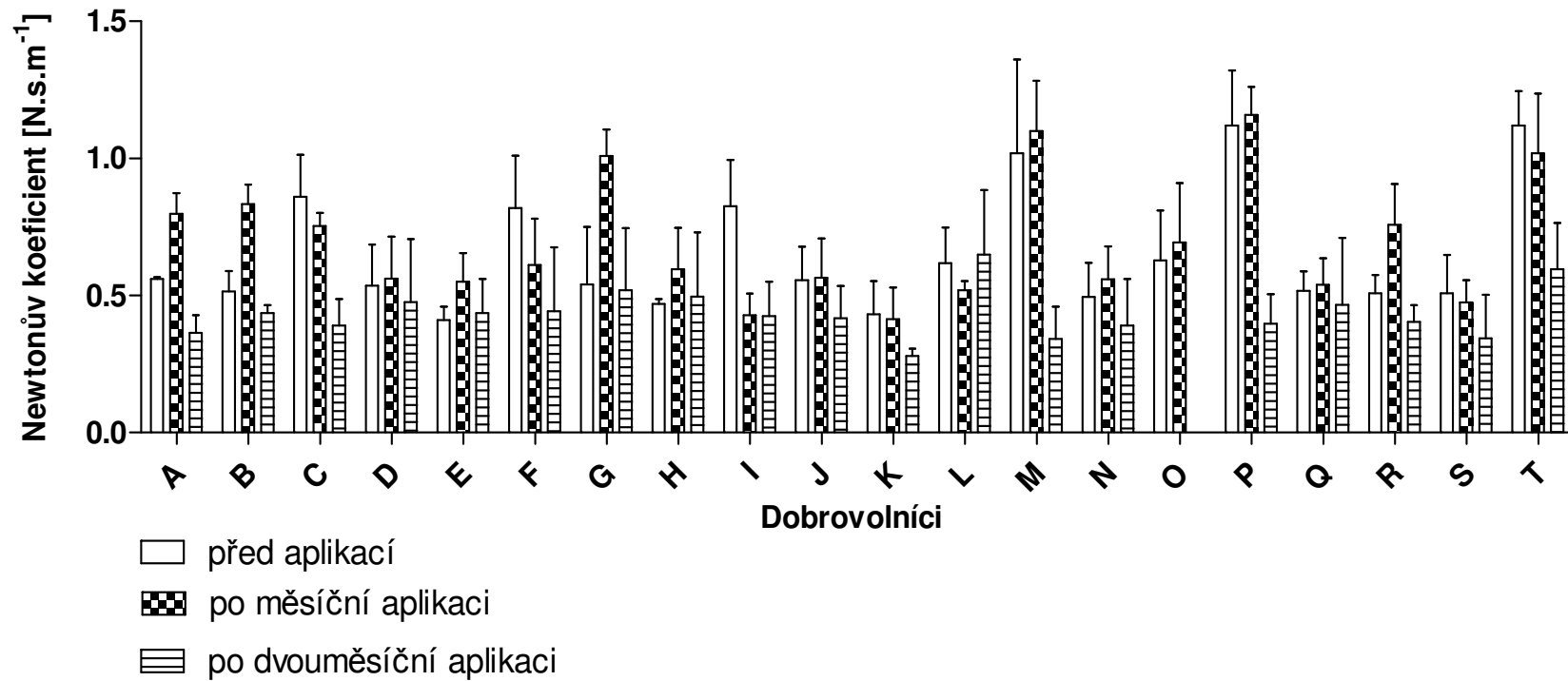
Změny Hookeova a Newtonova koeficientu po měsíční a dvouměsíční aplikaci séra byly zaznamenány v grafu a porovnány s kontrolním měřením před aplikací séra.

Změny Hookeova koeficientu



Obr. 18: Změny Hookeova koeficientu před aplikací séra, po měsíční a dvouměsíční aplikaci u jednotlivých dobrovolníků označených písmeny A-T.

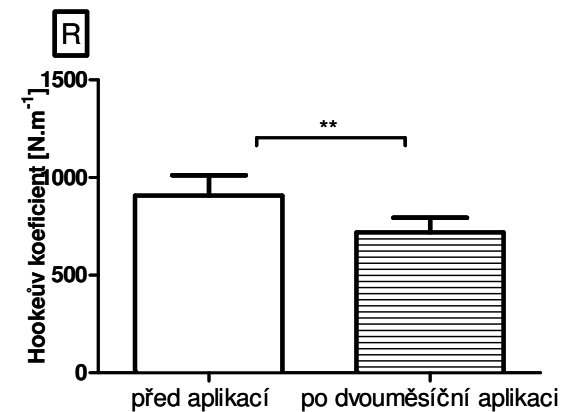
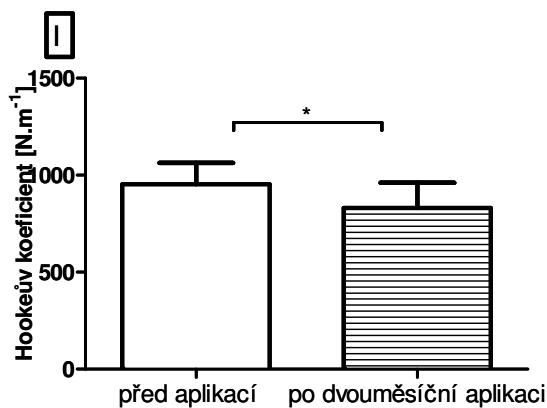
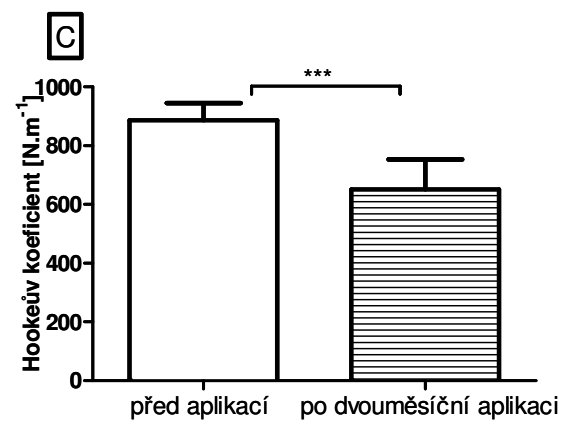
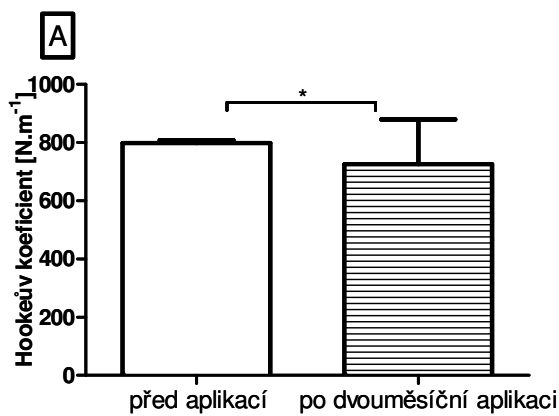
Změny Newtonova koeficientu

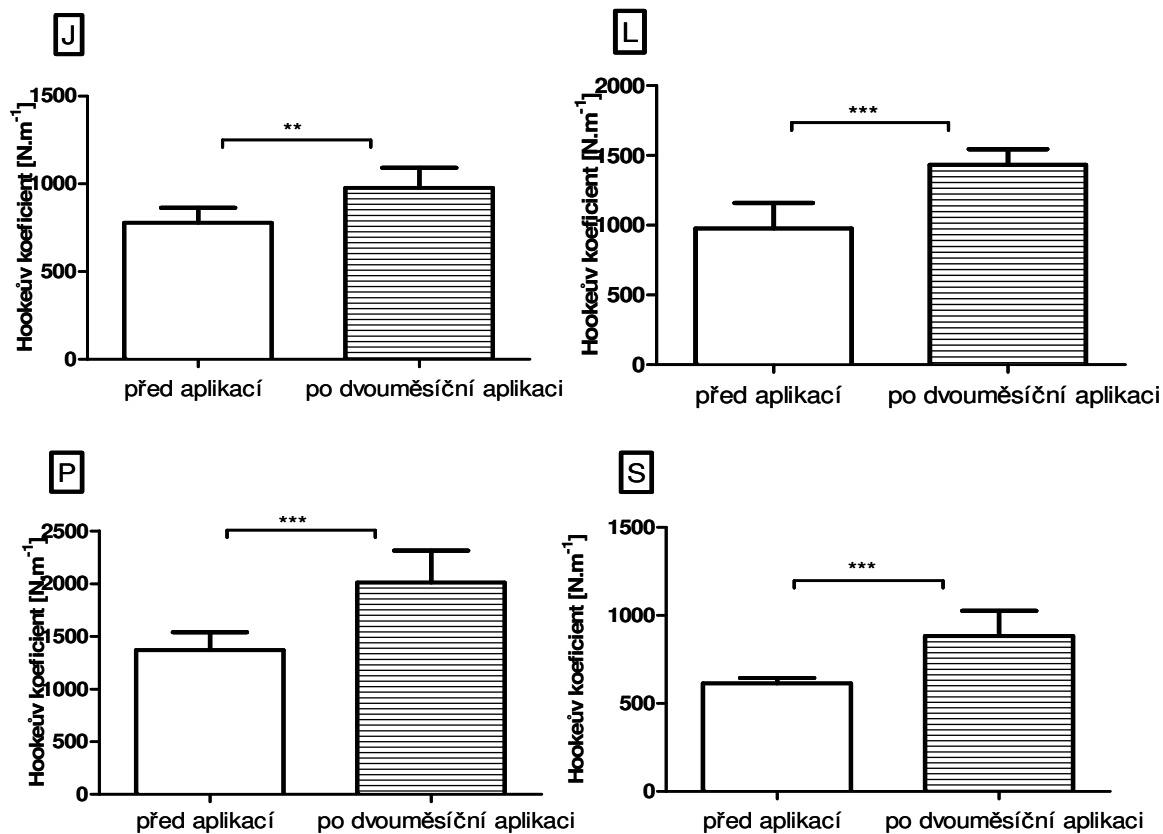


Obr. 19: Změny Newtonova koeficientu před aplikací séra, po měsíční a dvouměsíční aplikaci u jednotlivých dobrovolníků označených písmeny A-T.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno párovým t-testem. Testovány byly hodnoty získané před aplikací a v závěrečném měření (po dvouměsíční aplikaci) a to vždy všechny jednotlivé hodnoty získané opakovaným měřením.

Signifikantní pokles Hookeova koeficientu byl potvrzen u čtyř dobrovolníků: A, C, I, R, nárůst u dobrovolníků J, L, P a S. Signifikantní pokles Newtonova koeficientu můžeme sledovat u jedenácti dobrovolníků: A, B, C, F, I, J, K, M, P, S, T, signifikantní nárůst u žádného z nich. U ostatních dobrovolníků nedošlo ke statisticky významnému růstu nebo poklesu hodnot Hookeova a Newtonova koeficientu.

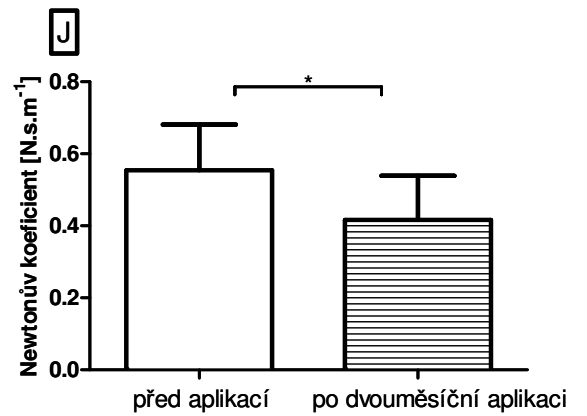
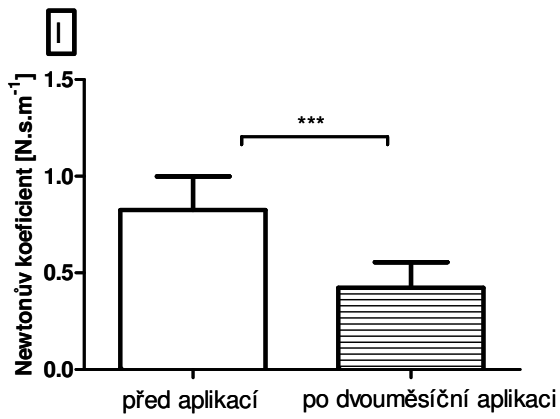
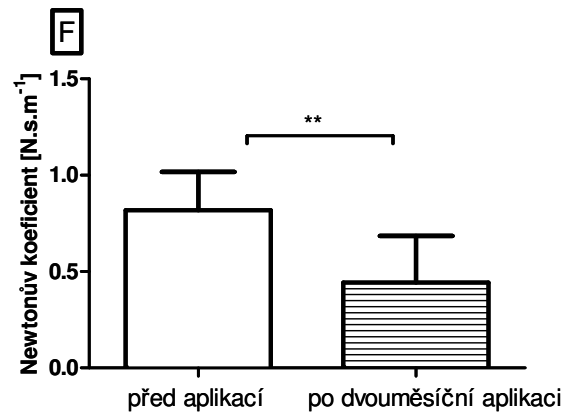
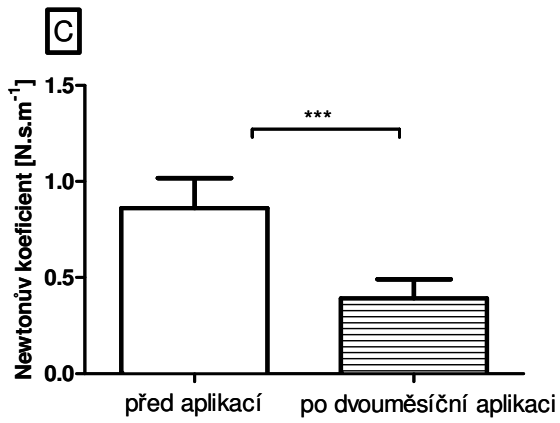
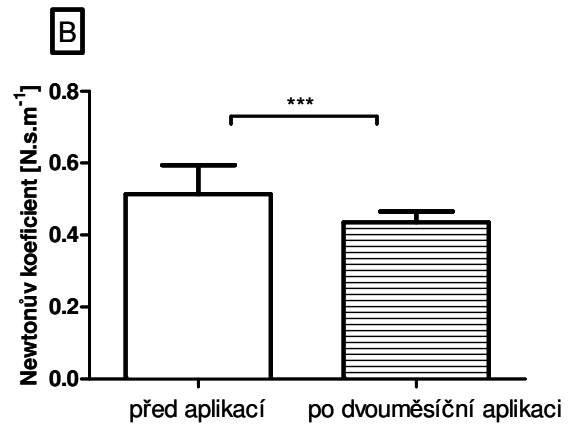
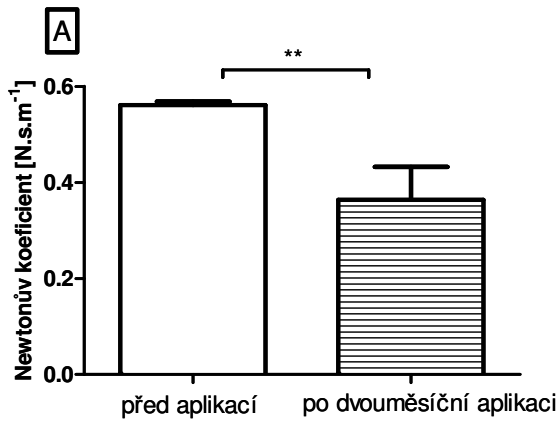


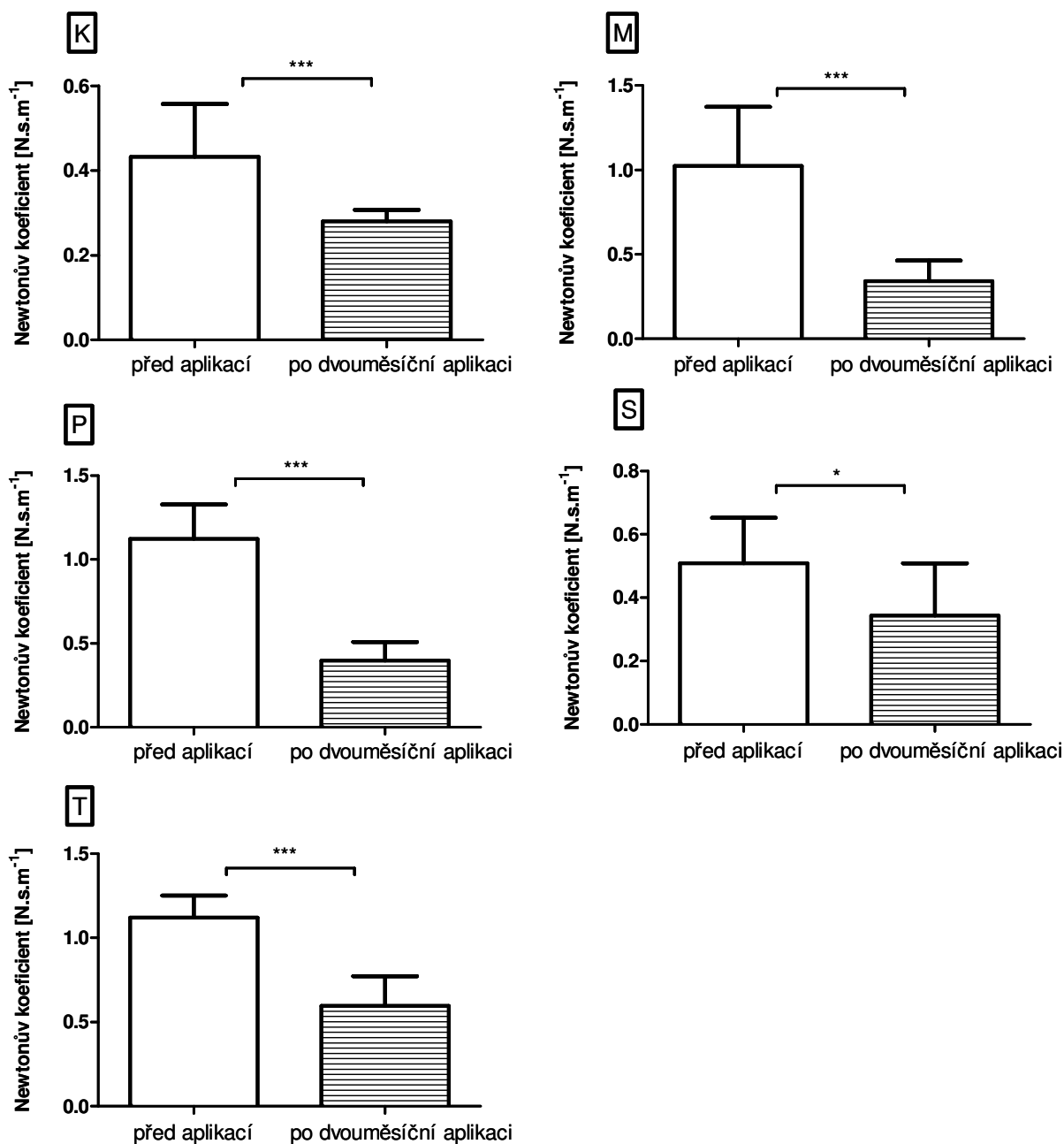


Obr. 20: Signifikantní změny Hookeova koeficientu po dvouměsíční aplikaci séra.

Na prvních čtyřech grafech vidíme pokles koeficientu u dobrovolníků A, C, I a R. Na druhých čtyřech grafech vidíme nárůst koeficientu u dobrovolníků J, L, P, S.

* signifikantní (A: $p = 0,0397$, I: $p = 0,0168$), ** velmi signifikantní (R: $p = 0,0068$, J: $p = 0,0018$), *** extrémně signifikantní (C, L, P, S: $p < 0,0001$)

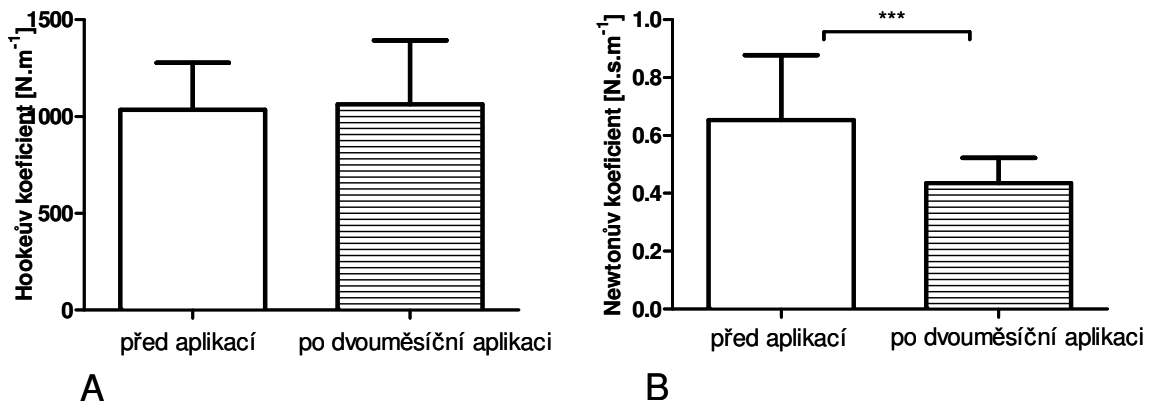




Obr. 21: Signifikantní změny Newtonova koeficientu po dvouměsíční aplikaci séra. K poklesu hodnot došlo u jedenácti žen. * signifikantní (J: $p = 0,0207$, S: $p = 0,0446$), ** velmi signifikantní (A: $p = 0,0022$, F: $p = 0,0015$, * extrémně signifikantní (B, C, I, M, P, T: $p < 0,0001$, K: $p = 0,0005$))**

6.4.5 Celkové zhodnocení působení anti-aging přípravku

K celkovému zhodnocení byly použity průměrné hodnoty obou koeficientů před aplikací a po dvouměsíční aplikaci séra všech dobrovolníků. Testování bylo provedeno metodou párového t-testu. U Hookeova koeficientu nedošlo ke statisticky významnému poklesu ani nárůstu hodnot. Naopak u Newtonova koeficientu byl prokázán vysoce signifikantní pokles v čase.



Obr. 22: Celkové zhodnocení vlivu anti-aging přípravku. A) U Hookeova koeficientu nedošlo k žádnému statisticky významnému ovlivnění pokožky. B) Graf znázorňuje signifikantní pokles Newtonova koeficientu (***) extrémně signifikantní: $p < 0,001$).

7 Diskuze

7.1 Aplikovaný přípravek

Jako aplikovaný přípravek bylo zvoleno Vichy Liftactiv Serum 10, a to hned z několika důvodů. Výrobce uvádí, že přípravek působí proti známkám stárnutí, obnovuje pleť, která je po použití hladká, jemná a rozjasněná. Dle společnosti Vichy se jedná o koncentrovanou péči, která díky rhamnose rostlinného původu aktivuje *dermis*, čímž by mělo dojít k podpoře omlazení pleti. Podle studií výrobce došlo po jednom měsíci pravidelné aplikace k dramatické redukci hlavních typů vrásek (www.vichy.com). Rhamnosa, získávána např. z rostlin čeledi řešetlákovitých má protizánětlivé účinky a stimuluje buněčnou proliferaci, syntézu kolagenu a snižuje aktivitu elastázy (Andres, Molinari et al. 2006). Sérum obsahuje i další látky působící proti stárnutí jako salicyloylphytosfingosin, který podporuje tvorbu prokolagenu, fibrilinu a redukuje množství MMP-1 (Farwick, Watson et al. 2007) nebo adenosin, který také zmenšuje viditelnost vrásek (Abella 2006). Termální voda brání působení volných radikálů (Bruneau, Bernard et al. 1996) a kyselina hyaluronová zlepšuje hydrataci a elasticitu (Pavicic, Gauglitz et al. 2011).

7.2 Vlastnosti kůže testovaných dobrovolníků

Kvalitu a vzhled kůže ovlivňuje řada faktorů. Kromě věku to jsou především ovlivnitelné komponenty životního stylu: pravidelná a častá expozice slunečnímu záření, kouření, nevhodná strava a obezita a užívání léků. Zajímalo nás, s jakou pleťí dobrovolníků do projektu vstupujeme. Zda je jejich pokožka suchá, zda se rádi opalují, kouří nebo zda se a jak se o svoji pleť starají.

Z dotázaných 35 % uvedlo, že má pleť suchou, zbývající dobrovolníci uvedli, že mají pleť normální. Při hodnocení mechanických vlastností kůže vykazuje suchá kůže vyšší tuhost (Cooper, Missel et al. 1985). Sluneční záření jednoznačně zhoršuje projevy stárnutí. Příčinou jsou volné radikály vznikající při dopadu UV záření na kůži, které spouští celou kaskádu škodlivých procesů. Výsledkem je kromě nadměrné pigmentace také degenerace kolagenu a vznik vrásek (Kohl, Steinbauer et al. 2011). 80 % dobrovolníků se opaluje jen výjimečně či o dovolené, zbývajících 20 % se opaluje často a nikdo z dotázaných nenavštěvuje solárium. Jen tři ženy uvedly, že nepoužívají opalovací přípravky s ochranným SPF faktorem, z nichž dvě se ale opalují výjimečně

a jen jedna často. Během dne zatěžuje své ruce prací 80 % žen a 65 % si je často musí mýt. Žádný krém na ruce nepoužívají pouze dvě dotázané. O svoji pleť byt i nepravidelně pečuje každá z dobrovolnic a přesně polovina z nich používá i nějaký antiaging přípravek. 55 % užívá nějaké léky, nikdy dobrovolnice neuvedly léky aplikované lokálně na kůži, jednalo se výhradně o léky na tlak a antikoncepci, ale i léky na snížení hladiny cukru, nebo na podporu funkce štítné žlázy. Jen dvě z dotázaných kouří. Kouření, velmi rizikový a navíc ovlivnitelný faktor je spojovaný s řadou systémových onemocnění, ale i s kožními problémy. Kromě předčasného stárnutí pleti se jedná i o špatné hojení ran, vznik karcinomů a melanomů, přispívá k tvorbě akné nebo vypadávání vlasů (Morita 2007).

Obecně však nemůžeme říct, že by zjištěné vlastnosti měly vliv na naměřené hodnoty Hookeova a Newtonova koeficientu a časové konstanty, pokud porovnáváme dobrovolníky mezi sebou. Ovlivnění hodnot těchto parametrů je velmi široké a soubor dobrovolníků nebyl pravděpodobně dostatečně velký, aby tyto souvislosti mohly být dokázány.

7.3 Závislost Hookeova koeficientu, Newtonova koeficientu a časové konstanty na věku

V předchozím experimentu (Ďoubal a kolektiv 2011) se projevila závislost Hookeova koeficientu a časové konstanty na věku: zatímco Hookeův koeficient s věkem roste, časová konstanta má tendenci klesat. V našem experimentu se žádná významná tendence těchto závislostí neprojevila. Velmi zvolné stoupání s věkem lze sice zaznamenat u Hookeova koeficientu (obr. 15), nicméně koeficient determinace R^2 je velmi nízký ($R^2 = 0,086$). Závislost Newtonova koeficientu (obr. 16, $R^2 = 0,0468$) a časové konstanty na věku (obr. 17, $R^2 = 0,0018$) se v našem experimentu nepotvrdila. Takové nízké hodnoty koeficientů determinace a tedy jen nepatrné nebo žádné závislosti sledovaných veličin na stáří mohou být dána několika faktory. Měření probíhalo na třech různých místech kůže, s poměrně velkou směrodatnou odchylkou. Tu pravděpodobně způsobuje variabilita kůže v místě a ve směru působení deformace. Na výsledcích se mohly dále projevit i interindividuální rozdíly kůže.

7.4 Změny mechanických parametrů po aplikaci séra

Během stárnutí dochází ke změnám v množství a uspořádání strukturních jednotek kůže. Kolagen se zdá být více pevný a tuhý, vlákna elastinu se shlukují a jsou křehčí,

klesá množství proteoglykanů (Farage, Miller et al. 2008). Jsou to složky, které zodpovídají za mechanické vlastnosti kůže, a proto se tyto parametry s věkem mění. Předpokládali jsme, že aplikací přípravku proti znakům stárnutí docílíme pozitivních změn na tyto mechanické parametry, a to následovně: Hookeův koeficient, který představuje tuhost kůže, klesne. Newtonův koeficient představující viskozitu kůže klesne.

K signifikantnímu poklesu Hookeova koeficientu došlo u 20% dobrovolníků: A (věk 25), C (věk 30), I (věk 47), R (věk 59). Ke zlepšení tedy došlo nezávisle na věku osob. U čtyř osob došlo ale k nárůstu hodnot: J (věk 48), L (věk 55), P (věk 57), S (věk 60). Proč tomu tak je, není jasné. U tří z těchto osob totiž došlo k poklesu dalšího měřeného parametru, Newtonova koeficientu, proto se nám non-compliance dobrovolníka jeví jako nepravděpodobná. V celkovém hodnocení všech dobrovolníků v porovnání průměrných hodnot před a po aplikaci séra se žádná změna Hookeova koeficientu nepotvrdila (obr. 22A), neprokázali jsme tedy kauzální působení studovaného přípravku na kvalitu kůže.

U Newtonova koeficientu jsme zaznamenali signifikantní pokles u většího počtu dobrovolníků: A (věk 25), B (věk 26), C (věk 30), F (věk 39), I (věk 47), J (věk 48), K (věk 54), M (věk 55), P (věk 57), S (věk 60), T (věk 67). Newtonův koeficient představuje viskozitu kůže, která souvisí s hydratací a počtem proteoglykanů v kůži. S věkem jich ubývá a viskozita roste (Diridollou, Vabre et al. 2001). Z výsledků vidíme, že sérum dokázalo tuto hydrataci obnovit nebo zlepšit u 55 % dobrovolníků. Z celkového hodnocení je vidět statisticky významný pokles tohoto koeficientu (obr. 22B).

Při hodnocení musíme ale do úvahy vzít skutečnost, že sérum je určené k aplikaci na obličej a krk, místa, která jsou sice denně vystavena okolí a nejsou chráněna oděvem, ale zároveň místa, která nejsou zatěžována prací a nejsou během dne opakovaně vystavena působení chemikálií (mýdla, čistící prostředky aj.) jako ruce, kde byl přípravek testován.

8 Závěr

V práci jsme hodnotili vliv anti-aging přípravku na mechanické vlastnosti kůže. Jako testovaný přípravek bylo zvoleno Vichy Liftactiv Serum 10 pro své jedinečné složení a vysokou koncentraci účinných látek uváděných výrobcem. Sérum bylo aplikováno na palcový val ruky, kde se pomocí dynamického viskoelastometru dají změřit hodnoty charakterizující tuhost a viskozitu kůže. Z konečných celkových výsledků vidíme, že dvouměsíční aplikace séra neovlivnila tuhost kůže, ale jen její viskozitu. Přesnější výsledky bychom jistě dosáhli i zvětšením počtu probandů nebo testováním dalších přípravků. Bylo by bezpochyby zajímavé podrobit dobrovolníky dalším, na jiném principu fungujícím testům, které hodnotí mechanické vlastnosti kůže a získané výsledky porovnat. Tím bychom mohli lépe ověřit účinnost přípravku.

9 Použitá literatura

- Abella, M. L. (2006). "Evaluation of anti-wrinkle efficacy of adenosine-containing products using the FOITS technique." Int J Cosmet Sci **28**(6): 447-51.
- Agache, P. G. and P. Humbert (2004). Measuring the skin, Springer Verlag.
- Agache, P. G., C. Monneur, et al. (1980). "Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo." Arch Dermatol Res **269**(3): 221-32.
- Andres, E., J. Molinari, et al. (2006). "Pharmacological properties of rhamnase-rich polysaccharides, potential interest in age-dependent alterations of connectives tissues." Pathol Biol (Paris) **54**(7): 420-5.
- Bailey, A. J., R. G. Paul, et al. (1998). "Mechanisms of maturation and ageing of collagen." Mech Ageing Dev **106**(1-2): 1-56.
- Basso, F. G., C. F. Oliveira, et al. "Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro." Lasers Med Sci **28**(2): 367-74.
- Baumann, L. (2007). "Skin ageing and its treatment." J Pathol **211**(2): 241-51.
- Beitner, H. (2003). "Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% alpha-lipoic acid related to photoageing of facial skin." Br J Dermatol **149**(4): 841-9.
- Bhawan, J., W. Andersen, et al. (1995). "Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin." J Cutan Pathol **22**(2): 154-9.
- Bruneau, F., D. Bernard, et al. (1996). "Effect of Vichy water on catalase activity in the stratum corneum." Int J Cosmet Sci **18**(6): 269-77.
- Callaghan, T. M. and K. P. Wilhelm (2008). "A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin." Int J Cosmet Sci **30**(5): 323-32.
- Callaghan, T. M. and K. P. Wilhelm (2008). "A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing." Int J Cosmet Sci **30**(5): 313-22.
- Cooper, E. R., P. J. Missel, et al. (1985). "Mechanical properties of dry, normal, and glycerol-treated skin as measured by the gas-bearing electrodyname." J. Soc. Cosmet. Chem. **36**: 335-348.

- Daly, C. H. and G. F. Odland (1979). "Age-related changes in the mechanical properties of human skin." J Invest Dermatol **73**(1): 84-7.
- Delalleau, A., G. Josse, et al. (2006). "Characterization of the mechanical properties of skin by inverse analysis combined with the indentation test." J Biomech **39**(9): 1603-10.
- Diridollou, S., V. Vabre, et al. (2001). "Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo." Int J Cosmet Sci **23**(6): 353-62.
- Řoubal, S. and P. Klemra (2002). "Visco-elastic response of human skin and aging." J Am Aging Assoc **25**(3): 115-7.
- Řoubal, S. a kolektiv (2011). "Mechanické chování viskoelastických těles.", Karolinum: 7-8, 11, 38, 41, 44-46, 69, 81, 99-100.
- Edwards, C. and R. Marks (1995). "Evaluation of biomechanical properties of human skin." Clin Dermatol **13**(4): 375-80.
- Farage, M. A., K. W. Miller, et al. (2008). "Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review." Int J Cosmet Sci **30**(2): 87-95.
- Farwick, M., R. E. Watson, et al. (2007). "Salicyloyl-phytosphingosine: a novel agent for the repair of photoaged skin." Int J Cosmet Sci **29**(4): 319-29.
- Gao, X. H., L. Zhang, et al. (2008). "Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals." Clin Dermatol **26**(4): 367-74.
- Gawkrodger, J. D. (2002). Dermatology: an illustrated colour text, Elsevier Health Sciences.
- Gilchrest, B. A. (1996). "A review of skin ageing and its medical therapy." Br J Dermatol **135**(6): 867-75.
- Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez, et al. (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." Food Hydrocolloids **25**(8): 1813-1827.
- Gunn, D. A., H. Rexbye, et al. (2009). "Why some women look young for their age." PLoS One **4**(12): e8021.
- Horák, P. (2011). "Volně prodejné přípravky v dermatologii. Kosmetika, nebo léky?" Dermatologie pro praxi **5**(3): 164-166.
- Hrabálek, A. a K. Vávrová (2005). "Lze překonat kožní bariéru?" Praktické lékařství **1**: 8-11.
- Choi, C. M. and D. S. Berson (2006). "Cosmeceuticals." Semin Cutan Med Surg **25**(3): 163-8.

- Jemec, G. B., M. Gniadecka, et al. (2000). "Ultrasound in dermatology. Part I. High frequency ultrasound." Eur J Dermatol **10**(6): 492-7.
- Jenkins, G. (2002). "Molecular mechanisms of skin ageing." Mech Ageing Dev **123**(7): 801-10.
- Kohl, E., J. Steinbauer, et al. (2011). "Skin ageing." J Eur Acad Dermatol Venereol **25**(8): 873-84.
- Konrádová, V., J. Uhlík, et al. (2000). Funkční histologie, H+H Vyšehradská, s.r.o.: 253-258
- Kulíková, Z. (2012). "Nové možnosti rejuvenace v korektivní dermatologii." Dermatologie pro praxi **6**(1): 30-32.
- Latha, M. S., J. Martis, et al. "Sunscreening agents: a review." J Clin Aesthet Dermatol **6**(1): 16-26.
- Ledvina, M., A. Stoklasová, et al. (2006). Biochemie pro studující medicíny I a II., Karolinum: 149-152, 505-516
- Legendre, J. Y., I. Schnitzler, et al. (2007). "Formulation, characterization, and efficacy of an adenosine-containing dissolvable film for a localized anti-wrinkle effect." J Cosmet Sci **58**(2): 147-55.
- Leow, Y. H. and H. I. Maibach (1998). "Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen." Clin Dermatol **16**(5): 579-84.
- Liu, H., Y. Dang, et al. (2008). "Laser induced collagen remodeling: a comparative study in vivo on mouse model." Lasers Surg Med **40**(1): 13-9.
- Mansfeldová, L. (2011). "Chemický peeling - přehled a využití v korektivní dermatologii." Dermatologie pro praxi **5**(3): 160-162.
- Morita, A. (2007). "Tobacco smoke causes premature skin aging." J Dermatol Sci **48**(3): 169-75.
- Nečas, O. (2000). Obecná biologie pro lékařské fakulty, H+H:138
- Oresajo, C., S. Pillai, et al. "Antioxidants and the skin: understanding formulation and efficacy." Dermatol Ther **25**(3): 252-9.
- Pageon, H. and D. Asselineau (2005). "An in vitro approach to the chronological aging of skin by glycation of the collagen: the biological effect of glycation on the reconstructed skin model." Ann N Y Acad Sci **1043**: 529-32.
- Pavicic, T., G. G. Gauglitz, et al. (2011). "Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment." J Drugs Dermatol **10**(9): 990-1000.

- Petrovický, P. (2002). Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi. Praha, Osveta, spol. s.r.o.: 509-519
- Proksch, E., J. M. Brandner, et al. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-72.
- Ravelojaona, V., J. Molinari, et al. (2006). "Protection by rhamnase-rich polysaccharides against the cytotoxicity of Maillard reaction products." Biomed Pharmacother **60**(7): 359-62.
- Rees, J. L. (2004). "The genetics of sun sensitivity in humans." Am J Hum Genet **75**(5): 739-51.
- Rivers, J. K. (2008). "The role of cosmeceuticals in antiaging therapy." Skin Therapy Lett **13**(8): 5-9.
- Robert, L., J. Labat-Robert, et al. (2009). "Physiology of skin aging." Pathol Biol (Paris) **57**(4): 336-41.
- Růžičková Jarešová, L. (2012). "Stárnutí kůže a péče o ni." Dermatologie pro praxi **9**(6-7): 293-296.
- Seite, S. (2013). "Thermal waters as cosmeceuticals: La Roche-Posay thermal spring water example." Clin Cosmet Investig Dermatol **6**: 23-8.
- Seite, S., H. Zucchi, et al. (2006). "Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme." J Eur Acad Dermatol Venereol **20**(8): 980-7.
- Serup, J., G. Jemec, et al. (2006). Handbook of Non-Invasive Methods And The Skin, CRC/Taylor & Francis.
- Shoshani, D., E. Markovitz, et al. (2008). "The modified Fitzpatrick Wrinkle Scale: a clinical validated measurement tool for nasolabial wrinkle severity assessment." Dermatol Surg **34 Suppl 1**: S85-91; discussion S91.
- Silver, F. H., J. W. Freeman, et al. (2001). "Viscoelastic properties of human skin and processed dermis." Skin Res Technol **7**(1): 18-23.
- Silver, F. H., L. M. Siperko, et al. (2003). "Mechanobiology of force transduction in dermal tissue." Skin Res Technol **9**(1): 3-23.
- Smith, J. G., Jr., E. A. Davidson, et al. (1962). "Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage." J Invest Dermatol **39**: 347-50.
- Stefanaki, C., A. Stratigos, et al. (2005). "Topical retinoids in the treatment of photoaging." J Cosmet Dermatol **4**(2): 130-4.

- T.M. Kajs and V. Gartstein (1991). "Review of the instrumental assessment of skin: Effects of cleansing products." J. Soc. Cosmet. Chem. **42**: 249-271.
- Trojan, S., Ed. (2003). Lékařská fyziologie. Praha, Grada Publishing, a.s.:417-422
- Uitto, J. (2008). "The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure." J Drugs Dermatol **7**(2 Suppl): s12-6.
- Uitto, J., D. R. Olsen, et al. (1989). "Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress." J Invest Dermatol **92**(4 Suppl): 61S-77S.
- Ventre, M., F. Mollica, et al. (2009). "The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis." J Biomech **42**(4): 430-5.
- Werschler, W. P. (2008). "Considerations for Use of Fluorouracil Cream 0.5% for the Treatment of Actinic Keratosis in Elderly Patients." J Clin Aesthet Dermatol. **1**(2): 22-27.
- Wulf, H. C., J. Sandby-Moller, et al. (2004). "Skin aging and natural photoprotection." Micron **35**(3): 185-91.
- Yaar, M. and B. A. Gilchrest (2001). "Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes." Clin Exp Dermatol **26**(7): 583-91.
- Yaar, M. and B. A. Gilchrest (2007). "Photoageing: mechanism, prevention and therapy." Br J Dermatol **157**(5): 874-87.
- Záhejský, J. (2011). "Kosmetologické aspekty v dermatologické zevní terapii." Dermatologie pro praxi **5**(4): 29-31, 35, 222-226.
- www.childrenshospital.org/az/Site784/mainpageS784P0.html, 16.4.2013
- www.vichy.com, 8.6.2013
- www.it.cas.cz/cs/d4/1042, 12.5.2013
- www.vichy.cz/anti-age/LIFTACTIV-S%C3%89RUM-10-LIFTACTIV/p6506.aspx, 1.5.2013

10 Příloha

VSTUPNÍ DOTAZNÍK

- **Jméno a věk:**

- **Váš typ pokožky:**
 - a) Suchá
 - b) Normální, smíšená
 - c) Mastná
- **Opalujete se:**
 - a) Ráda a často
 - b) Výjimečně
 - c) Jen o dovolené
 - d) Navštěvuji i solárium
- **Používáte při pobytu na slunci opalovací krémy?**
 - a) Ano – uveďte jaký faktor:
 - b) Ne
- **Zatěžujete své ruce často během dne - práce bez rukavic, práce na zahrádce apod.?**
 - a) Ano
 - b) Ne
- **Jste nucena si často během dne mýt ruce (např. kvůli charakteru zaměstnání – práce s penězi, chemikáliemi apod.)?**
 - a) Ano
 - b) Ne
- **Používáte krém na ruce?**
 - a) Ano, několikrát za den – prosím uveďte název:
 - b) Ano, nepravidelně – prosím uveďte název:
 - c) Ne
- **Pečujete o svoji pleť?**
 - a) Denně
 - b) Nepravidelně
 - c) Ne

- **Používáte v rámci péče o pleť přípravky proti vráskám?**
 - a) Ano – prosím uveďte název:
 - b) Ne
- **Užíváte pravidelně nějaké léky?**
 - a) Ano – prosím uveďte jaké:
 - b) Ne
- **Kouříte?**
 - a) Ano
 - b) Ne