

# **Studium účinnosti formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu in vivo**

Adam Srnec

---

Bakalářská práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adam Srnec**  
Osobní číslo: **T17156**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Studium účinnosti formulací s obsahem kolagenního hydrolyzátu in vivo**

### **Zásady pro vypracování**

#### **I. Teoretická část**

Zpracujte literární rešerši na zadané téma, soustředte se na zdroje, vlastnosti a možnosti využití bílkovinných preparátů v kosmetice.

#### **II. Praktická část**

V praktické části připravte modelové formulace s obsahem kolagenového hydrolyzátu. Pomocí neinvazivních bioinženýrských metod sledujte jejich účinnost na skupině dobrovolníků. Získané výsledky zpracujte a formulujte závěry práce.

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

**Seznam doporučené literatury:**

Vědecké články z databází *Web of Science*, *Scopus* a další; databáze elektronických knih (např. *Knovel*).

Rodríguez M.I. A., Barroso L.G. R. and Sánchez, M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2017; 17:20-26.

Draelos, Z. D. *Cosmetic Dermatology Products & Procedures*. 1st ed. UK: Blackwell Publishing, 2010.

Barel, A.O., Paye, M., Maibach, H.I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*, Boca Raton: CRC Press, 2014.

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

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

---

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

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- 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 užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá účinností kosmetických formulací s obsahem *Hydrolyzed Collagen (HC)*. Teoretická část práce shrnuje vlastnosti, zdroje a možnosti využití kolagenu, respektive jeho hydrolyzátů v oblasti kosmetických a biomedicínských aplikací. V praktické části byly připraveny gelové a krémové formulace s obsahem 0,5 a 2,0 % *HC* a na skupině 9 zdravých žen byl poté studován jejich vliv na transepidermální ztrátu vody (Transepidermal Water Loss – TEWL), hydrataci a pH kožního povrchu. Přídavek *HC* do formulací snižoval množství vody unikající z pokožky. Vyšší účinnost vykazovaly v tomto ohledu formulace obsahující 0,5 % *HC*. Obsah *HC* nezvyšoval hydratační účinnost formulace ve srovnání s výchozím kosmetickým základem. Žádná z připravených formulací nenarušovala přirozeně kyselé prostředí pokožky.

Klíčová slova: *Collagen, Hydrolyzed Collagen*, TEWL, hydratace, pH

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis deals with the efficacy of cosmetic formulations with the content of the *Hydrolyzed Collagen (HC)*. The theoretical part summarizes the characteristics, sources and possibilities of using collagen or its hydrolysates in the field of cosmetic and biomedical applications. In the practical part, gel and cream formulations containing 0.5 and 2.0 % *HC* were prepared and in a group of 9 healthy women the effect of these formulations on transepidermal water loss (TEWL), hydration and skin surface pH was studied. The addition of *HC* to the formulations reduced the amount of water escaping from the skin. In this respect, formulations containing 0.5 % *HC* showed higher efficacy. Content of *HC* did not increase the hydrating efficiency of the formulation compared to the initial cosmetic base. None of the prepared formulations disturbed the naturally acidic environment of the skin.

Keywords: *Collagen, Hydrolyzed Collagen*, TEWL, hydration, pH

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Janě Pavlačkové, Ph.D., která mi poskytovala cenné rady, materiály a připomínky. Především za její čas, vstřícnost, lidskost a trpělivost, které mi při psaní této práce věnovala.

Dále bych rád poděkoval všem dobrovolnicím, jež se účastnily studie, jelikož bez nich by tato práce nemohla vzniknout.

Mé velké díky patří taktéž mé rodině a nejbližším přátelům za podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 KOLAGEN</b> .....	<b>11</b>
1.1 STRUKTURA KOLAGENU .....	11
1.2 FUNKCE KOLAGENU .....	14
1.3 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI KOLAGENU .....	15
1.3.1 Polyelektrolytický charakter .....	15
1.3.2 Hydratace kolagenu.....	16
1.3.3 Gelační vlastnosti a botnání .....	16
1.3.4 Rozpustnost .....	17
1.4 BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	18
1.5 TYPY KOLAGENU.....	18
1.5.1 Fibrilární kolageny .....	19
1.5.2 Síťotvorné (mikrofibrilární) kolageny .....	20
1.5.3 Další typy kolagenu.....	21
1.6 MECHANISMUS SYNTÉZY KOLAGENU V LIDSKÉM TĚLE .....	22
1.7 ZDROJE KOLAGENU .....	24
1.7.1 Přírodní zdroje.....	24
1.7.2 Syntetické zdroje .....	26
<b>2 APLIKAČNÍ POTENCIÁL KOLAGENU</b> .....	<b>28</b>
2.1 BIOMATERIÁLY NA BÁZI KOLAGENU .....	28
2.1.1 Kolagenové membrány .....	28
2.1.2 Kolagenové hydrogely .....	29
2.1.3 Kolagenové houby .....	29
2.1.4 Kolagenové štíty.....	29
2.1.5 Další biomateriály na bázi kolagenu .....	30
2.2 KOSMETICKÉ VYUŽITÍ .....	30
2.2.1 Topické aplikace .....	30
2.2.2 Periorální aplikace.....	31
<b>3 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
4.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	36

4.2	POUŽITÉ POMŮCKY A ZAŘÍZENÍ .....	36
4.2.1	Stanice MPA 5 .....	37
4.3	PŘÍPRAVA FORMULACÍ .....	39
4.4	SOUBOR DOBROVOLNIC .....	40
4.5	ORGANIZACE MĚŘENÍ .....	40
4.6	ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT .....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY MĚŘENÍ .....</b>	<b>43</b>
5.1	VYHODNOCENÍ MĚŘENÍ TRANSEPIDERMÁLNÍ ZTRÁTY VODY .....	43
5.2	VYHODNOCENÍ MĚŘENÍ HYDRATAČNÍCH ÚČINKŮ .....	45
5.3	VYHODNOCENÍ MĚŘENÍ PH .....	47
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>49</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>66</b>



## ÚVOD

Nenarušená bariérová funkce pokožky a její dostatečná hydratace jsou jedny ze základních předpokladů pro udržení kvalitní a zdravé kůže. Porucha epidermální bariéry úzce souvisí se zvýšenou ztrátou vody a je jednou z nejčastějších příčin vzniku nadměrně suché kůže, pro kterou je typická přítomnost šupin, hrubé textury a pocitu pálení či svědění. K porušení bariéry může dojít na základě vrozeném, takovým příkladem může být atopická dermatitida, nebo získaném, kdy její poškození souvisí s působením škodlivých faktorů z vnějšího prostředí. Další příčinou může být i proces stárnutí organismu, který se taktéž promítá do snížené úrovně hydratace kůže.

Díky poznatkům kosmetologů je dnes na trhu k dostání celá řada topických přípravků, jejichž hlavním cílem je tyto stavy korigovat. Kromě běžných zvlhčujících látek jako je např. *Glycerin*, *Propylene Glycol* a *Urea* se v těchto přípravcích můžeme setkat i s různými formami kolagenu, především jeho hydrolyzáty a peptidy. Přídavek těchto látek do kosmetických formulací vede ke spouštění sledu biochemických reakcí, které zvyšují obsah vody v pokožce, anebo naopak k redukci množství vody z ní unikající.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KOLAGEN

Kolagen se řadí mezi bílkoviny s mimořádným technickým potenciálem. Je dominantní součástí pojivových tkání, kterým poskytuje jedinečné mechanické vlastnosti. Tato skutečnost úzce souvisí s jeho specifickou strukturou, pro kterou je typická vysoká vnitřní uspořádanost. Kolagen patří mezi nejrozšířenější živočišné proteiny, tvoří 25–30 % všech bílkovin v lidském těle. Hraje důležitou roli ve struktuře mezibuněčné hmoty *dermis*, kde představuje jednu z hlavních složek společně s elastinem a kyselinou hyaluronovou [1, s. 371], [2, s. 29], [3, s. 21], [4, s. 1061].

Kolagen náleží do skupiny tzv. strukturálních bílkovin. Obecně vytváří bílé, neprůhledné a vláknité útvary, které jsou strukturně napojeny na velké množství proteoglykanů a jiných bílkovin. Tento protein se významně podílí na správném fungování fyziologických procesů v lidském těle. Mezi velké přednosti kolagenu patří fakt, že se jedná o obnovitelnou surovinu [1, s. 371], [3, s. 21].

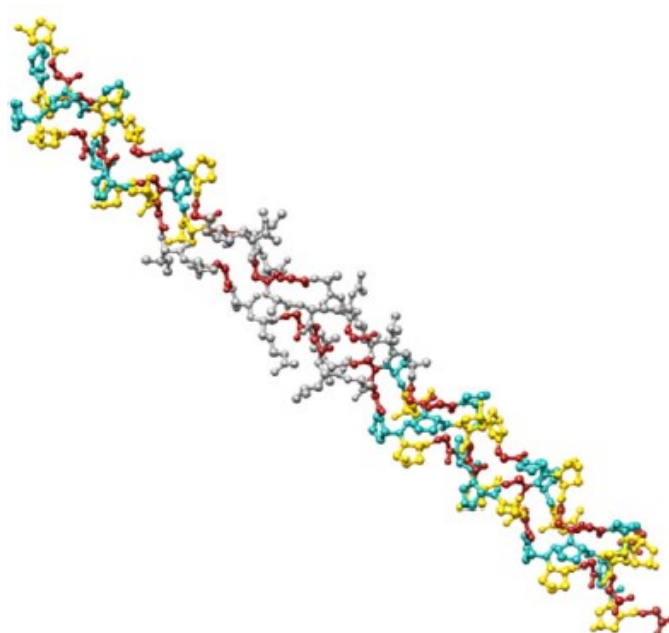
### 1.1 Struktura kolagenu

Nejnižší morfologickou jednotkou kolagenu je kolagenní vlákno [5, s. 39]. Struktura vlákna je však komplexní, skládá se z několika úrovní. Samotná molekula kolagenu je tvořena trojřetězcovou helikální strukturou, označovanou jako tzv. triple helix (Obr. 1). Spojení tří levotočivých polypeptidických  $\alpha$ -řetězců dává vzniknout pravidelné pravotočivé superšroubovici [6, s. 10], [7, s. 94], [8, s. 44], [9, s. 4].

Jednotlivé  $\alpha$ -řetězce jsou tvořeny přibližně tisícem aminokyselin (AMK), délka těchto řetězců dosahuje 280 nm, přičemž samotná molekula kolagenu je dlouhá asi 300 nm a její průměr se pohybuje v rozmezí 1,4–1,6 nm [6, s. 10], [7, s. 94], [10, s. 123]. Charakteristický rýhovaný vzhled kolagenních vláken pozorovatelný na snímcích z elektronové mikroskopie vychází z posunu sousedních molekul o 64–67 nm (tzv. D-perioda) [11, s. 893], [12, s. 1535]. Tak dochází ke vzniku mezer o velikosti přibližně 35 nm mezi po sobě jdoucími molekulami v řadě. Toto uspořádání pravděpodobně zajišťuje agregátům velkou pevnost v tahu. Průměrná relativní molekulová hmotnost ( $M_r$ ) kolagenu se pohybuje v rozmezí 265 až 300 kDa [1, s. 375], [7, s. 94].

Kolagen je možné charakterizovat vysokým obsahem glycinu (Gly) a cyklických iminokyseliny – prolinu (Pro) a hydroxyprolinu (Hyp). Průměrné zastoupení jednotlivých AMK v kolagenu typu I je uvedeno v Tab. 1. Aminokyseliny Hyp a hydroxylysin (Hyl) jsou specifické pouze pro kolagen [1, s. 372], [5, s. 34].

Hydroxyprolin společně s Pro tvoří cca 25 % všech AMK kolagenu. Obsah Hyp má pravděpodobně vliv na hydrotermální stabilitu kolagenu. Mořský kolagen, který se ve srovnání se savčím kolagenem vyznačuje nižším obsahem této AMK, vykazuje nižší hydrotermální stabilitu [5, s. 34–35].



*Obr. 1. Triple-helix molekuly kolagenu [3, s. 21]*

Obecně molekuly kolagenu obsahují pouze velmi malé množství methioninu a aromatických AMK – např. tyrosinu. Tyrosin (Tyr) plní v rámci fyziologie kolagenu velmi důležitou roli. Při působení trypsinu na kolagen dochází k odštěpení částí molekuly kolagenu, které obsahují téměř všechny přítomný Tyr. Tyto části molekuly se označují jako tzv. telopeptidy. Aminokyseliny cystein a tryptofan v molekulách kolagenu zcela absentují [5, s. 34–35].

Polypeptidický řetězec je vytvořen z opakujících se jednotek tripeptidů, kdy každá třetí pozice je obsazena Gly:  $(\text{Gly-X-Y})_n$  a kde jsou pozice X a Y zaplněny různými AMK. Přibližně 35 % těchto neglycinových pozic je obsazeno Pro, který se téměř výhradně nachází v poloze X, zatímco poloha Y je často obsazena Hyp, sekvence Gly-Pro-Hyp je tedy

pro kolagen velmi typická. Existence repetitivních sekvencí je obecnou vlastností kolagenu, keratinu a také fibroinu, představuje navíc kontrast ke struktuře globulárních bílkovin, kde je přítomnost těchto opakujících se sekvencí výjimečná [1, s. 372], [7, s. 94], [8, s. 44].

Tab. 1. Průměrné zastoupení AMK v kolagenu typu I<sup>1</sup> [13, s. 336]

AMK	Hodnota	AMK	Hodnota
Hydroxyprolin	173	Prolin	91
Kyselina asparagová	36	Hydroxylysin	16
Serin	29	Tyrosin	6
Kyselina glutamová	61	Valin	20
Histidin	4	Methionin	6
Glycin	333	Lysin	24
Arginin	47	Isoleucin	14
Threonin	20	Leucin	28
Alanin	79	Fenylalanin	17

<sup>1</sup>Data vyjádřena jako AMK zbytky/1000 zbytků

Glycinové zbytky jsou umístěny ve vnitřní části trojitě spirály. Toto uspořádání je dáno prostorovými důvody – jejich rozměry jim dovolují obsadit právě tuto vnitřní část, což vede k těsnějšímu semknutí  $\alpha$ -řetězců ve finálním kolagenním superhelixu [1, s. 372], [8, s. 44]. Aminokyselina s bočním řetězcem větším než samotný atom vodíku v případě Gly, by totiž narušila konformační stabilitu trojitě šroubovice [7, s. 95]. Kruhová struktura pro vytváří levotočivou konformaci každého  $\alpha$ -řetězce se třemi AMK zbytky na otáčku [1, s. 372], [4, s. 1062]. Prolin taktéž přispívá ke zvýšení stability molekuly kolagenu – jeho inkorporace do polypeptidických řetězců omezuje volnou rotaci okolo peptidických vazeb, protože přítomnost pyrrolidonového kruhu v jeho struktuře mu uděluje mnohem menší flexibilitu [7, s. 94].

Pro stabilitu kolagenních fibril má velký význam existence inter- a intramolekulárních vazeb. Jedná se o van der Waalsovy interakce, hydrofobní interakce mezi nepolárními postranními řetězci a také vodíkové vazby různého typu [5, s. 39–41].

Vodíkové můstky se vytvářejí mezi amidovou skupinou jednoho Gly zbytku a páteřní karbonylovou skupinou zbytku X na sousedních řetězcích, k jejich vzniku ale dochází také mezi amidovými skupinami a hydroxylovou skupinou Hyp. Vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce udělují trojšroubovici kolagenu značnou stabilitu, hlavním předpokladem pro funkci kolagenu jakožto strukturálního komponentu je však agregace samotných molekul za vzniku kolagenního vlákna (fibrily) [7, s. 95–96].

Oblasti, které jsou bohaté na nízkomolekulární AMK, můžeme charakterizovat jako krystalické úseky s vysokým stupněm uspořádanosti. Na straně druhé, oblasti s vyšším zastoupením polárních AMK s vyšší  $M_r$ , např. kyselina asparagová (Asp) a glutamová (Glu), lysin (Lys), arginin (Arg), se nevyznačují uspořádanou strukturou a mohou být až amorfní. Právě jejich nižší uspořádanost a značné zastoupení polárních skupin má vliv na jejich reaktivitu, proto lze tyto oblasti považovat za reaktivní místa molekuly kolagenu [1, s. 372].

Na povrchu kolagenních fibril se vyskytují i nebílkovinné komponenty, látky z řady glykosaminoglykanů (GAG), vázané vodíkovými a tzv. solnými můstky. I ve vysoce rafinovaném kolagenu se můžeme setkat s malým obsahem jednoduchých sacharidů – pentos a hexos. V kolagenu rozpustném v kyselém prostředí je obsaženou hexosou glukosa, zatímco kolagen nerozpustný v tomto prostředí obsahuje jak glukosu, tak i galaktosu. Kromě výše zmíněných monosacharidů se můžeme setkat taktéž s manosou, fukosou, rhamnosou či ribosou [1, s. 373].

## 1.2 Funkce kolagenu

Kolagen, společně s dalšími proteiny, tvoří extracelulární matici pojivových tkání (ECM), která je zodpovědná za mechanické vlastnosti (tj. soudržnost, pružnost, podporu) kůže, šlach, vazů a dalších tkání, kromě toho se však podílí i na celé řadě fyziologických funkcí. Složení a struktura ECM značně závisí na daném typu pojivové tkáně, kde se kolagen, v kombinaci s elastomerními molekulami (např. elastinem), přirozeně vyskytuje. To jí uděluje jedinečné funkce a biologické vlastnosti. Specifické potřeby jednotlivých tkání mají vliv na uspořádání kolagenních fibril v ECM. V případě kůže kolagen vytváří v celém objemu *dermis* hustou síť vláken, jejichž hlavní funkcí je poskytovat strukturální podporu pro *epidermis*. Organizace je zde taková, aby byla vlákna schopna odolávat napětí ve všech směrech [2, s. 29–30], [6, s. 11].

Ve šlachách, které umožňují přenos sil ze svalů do kostí, jsou vlákna organizována do paralelních svazků podél hlavní osy napětí působícího na šlachu, zatímco u plně vyvinuté kosti a rohovky tvoří vrstevnaté, pravidelně se opakující struktury, jež jsou na sebe navzájem kolmé, svým vzhledem tedy připomínají překližku. V případě rohovky je navíc nutné, aby tkáň propůjčovala oční bulvě nejen dostatečnou mechanickou stabilitu, ale i transparentnost, což na ni klade určitá strukturální omezení. Pro kůži a stěny tepen rovněž platí, že musejí být dostatečně pevné, aby odolávaly působení tlaku, a zároveň by měly být i dostatečně flexibilní [1, s. 373], [6, s. 11].

V kostech a dentinu by samotná organická matrice nestačila zabezpečit dostatečnou tuhost, která je u těchto tkání vyžadována, proto jsou jejich kolagenová vlákna mineralizována částicemi hydroxyapatitu. Jedním z aspektů obzvláště důležitým pro zabezpečení všech těchto mechanických vlastností vláken je přítomnost kovalentních vazeb mezi molekulami. Vznik těchto vazeb je podmíněn procesem maturace tkání obsahujících kolagen, v závislosti na stupni zesíťování se pak liší svou odolností v tahu – vyšší stupeň zesíťování jim uděluje vyšší pevnost [1, s. 373], [6, s. 11].

### 1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti kolagenu

#### 1.3.1 Polyelektrolytický charakter

Kolagen se řadí, stejně jako i jiné proteiny, mezi amfoterní polyelektrolyty. K ionizaci skupin postranních řetězců dochází v závislosti na pH prostředí – část se ionizuje v alkalické oblasti pH, část v kyselé. Izoelektrický bod, tedy hodnota pH, při které amfoterní látka vykazuje nulový celkový náboj – počet ionizovaných kyselých skupin se rovná počtu ionizovaných bazických skupin, je v případě nativního kolagenu roven hodnotě pH 7, nicméně působením dalších chemických látek se může pohybovat v rozmezí pH 4,5–8,0. V silně kyselé oblasti je celkový náboj molekuly kolagenu kladný, pokud se molekula nachází v prostředí silně zásaditém, celkový náboj je pak záporný. K další charakterizaci se využívá tzv. izoiontový bod. Ten představuje hodnotu pH, při níž je počet vodíkových protonů připojených na amino skupiny bílkoviny roven počtu protonů, které byly oddisociovány z karboxylových skupin [1, s. 374], [5, s. 43]. Dle Freudenbergova [14, s. 2108] tato hodnota pro nativní kolagen odpovídá pH 7,5, jeho hodnota ale může být ovlivněna přítomností dalších chemických látek, stejně jako je tomu v případě izoelektrického bodu.

### 1.3.2 Hydratace kolagenu

Ve struktuře proteinů můžeme nalézt dva typy hydrofilních center, která jsou schopna vázat vodu působením elektrostatických sil a pomocí vodíkových můstků. Prvním typem jsou polární skupiny vyskytující se v postranních řetězcích některých AMK zbytků, druhým typem jsou samotné atomy dusíku a kyslíku peptidické vazby. Pro zachování fyzikálních vlastností kolagenu je nutná přítomnost určitého minimálního množství vody, jež představuje cca 20 % jeho hmotnosti. Pokud jsou molekuly kolagenu plně hydratovány, dochází k částečnému rozvolnění řetězců protofibril, vzdálenost mezi sousedními polypeptidickými řetězci se zvětší z 1 nm (suchý kolagen) na 1,5–1,6 nm. Přítomnost vody je tedy jeden z klíčových faktorů pro výsledné fyzikální vlastnosti proteinu [1, s. 374].

### 1.3.3 Gelační vlastnosti a botnání

Kolagen můžeme charakterizovat jako přechodnou koloidní soustavu – gel. Gely vykazují zvláštní mechanické a fyzikálně mechanické vlastnosti, jsou schopny zabezpečovat příslušným útvarům náležitou pevnost, pružnost či ohebnost, svými vlastnostmi jsou však blízké i kapalinám, jelikož umožňují pohyb a vzájemnou interakci látek v nich rozpouštěných. Mezi významné vlastnosti gelů patří schopnost botnat [1, s. 374], [5, s. 45].

Kožní vazivo je tvořeno až ze 70 % vodou, část této vody se označuje jako tzv. voda volná (botnací), jež je v kůži držena kapilárními silami, a druhá část jako voda hydratační, která je vázána koloidně. Hydratační voda představuje integrující složku vaziva a má vliv na samotnou stabilitu struktury kolagenu. Nachází se podél osy molekuly a je vázána vodíkovými můstky na kyslík peptidických skupin. Hydratačně vázaná voda je specifická tím, že nerozpouští elektrolyty. Pokud se vlákno kolagenu dostane do kontaktu s vodou, během procesu botnání se mění objem, délka i samotná pružnost vlákna. Na rozdíl od botnací vody, kterou je možno odstranit mechanicky, lze vodu hydratační odstranit pouze sušením [1, s. 374], [5, s. 45].

Dle mechanismu rozlišujeme botnání osmotické a lyotropní. Osmotické botnání spočívá v pronikání molekul vody styčnou plochou mezi pevnou látkou a rozpouštědlem v důsledku existence gradientu osmotického tlaku, který je založen na rozdílné koncentraci pohyblivých iontů v gelu a rozpouštědle. Gel v tomto případě představuje vnitřní fázi, roztok fázi vnější. Po určité době dojde k ustanovení rovnováhy (tzv. Donnanova membránová rovnováha), kdy je botnací tlak vyrovnán rigiditou makromolekulární sítě. V případě lyotropního



botnání dochází k rozrušení vazeb stabilizujících strukturu, čímž se sníží odpor pevné fáze proti penetraci vody a posun rovnováhy vede ke zvýšení množství vody, které je látka schopna pojmout [1, s. 374], [5, s. 45–46].

#### 1.3.4 Rozpustnost

Fibrilární bílkoviny jsou obecně mnohem méně rozpustné než bílkoviny globulární, částečně se však rozpouštějí v koncentrovanějších roztocích solí. Jejich molekuly jsou tvořeny lineárně orientovanými molekulami. Roztoky rozpuštěných vláknitých bílkovin vykazují poměrně vysokou viskozitu, jelikož při proudění si molekuly těchto bílkovin vzájemně překážejí. Z tohoto důvodu tvoří tyto roztoky gely, a to i v případě poměrně nízkých koncentrací. U těchto solí můžeme pozorovat tixotropní chování, které se projevuje zkapalněním gelu při míchání a opětovným zvýšením viskozity, pokud je ponechán v klidu. Vlivem míchání dochází k orientaci vláken ve směru pohybu, eliminuje se tak efekt vzájemného spletení molekul [5, s. 25].

Rozpustnost kolagenu je závislá na pH a iontové síle roztoku. Určité druhy kolagenu je možné rozpouštět ve zředěných roztocích organických kyselin. Existují rovněž typy kolagenů, jež je možné rozpouštět ve studených, slabě alkalických roztocích solí, případně také v roztocích s neutrálním prostředím a s dostatečnou iontovou, respektive hypertonicnou silou. Nativní kolagen je možné rozpustit pouze v případě, že se jedná o jeho agregační formy, v nichž se ještě nevyskytují intermolekulární příčné kovalentní vazby. V případě nerozpustných forem kolagenu můžeme jejich rozpustnost zvýšit strukturálními úpravami, které vedou k rozštěpení těchto vazeb (chemické úpravy, částečná či celková tepelná denaturace). Pro využití kolagenu jako biomateriálu je vhodnější úprava alkalická, ta má totiž pozitivní vliv na termální stabilitu kolagenu a přispívá k zamezení tvorby fibril v neutrálním prostředí odpovídajícím fyziologickým podmínkám [1, s. 375], [5, s. 48].

Rozpustnost kolagenu je velmi závislá i na stáří tkáně, ze které byl kolagen izolován. Kolagen dospělých jedinců vykazuje mimořádnou robustnost a je téměř nerozpustný. Za tento fakt může znatelné zesílení kolagenních molekul, které do určité míry u tkáně mladých jedinců absentuje [1, s. 374], [7, s. 94].

## 1.4 Biologické vlastnosti

Kolagen patří mezi látky netoxické, s obecně nízkou mírou imunogenicity. Výskyt alergických reakcí je v případě jeho použití relativně nízký, nicméně u některých živočišných zdrojů kolagenu se přeci jen můžeme setkat i s více či méně vážnými alergickými reakcemi. Hlavními nositeli antigenních vlastností jsou ve struktuře kolagenů oblasti telopeptidů. K dalším přednostem tohoto proteinu patří rovněž jeho výborná biologická rozložitelnost a vstřebatelnost, přičemž tyto vlastnosti lze dále korigovat vhodnou úpravou struktury, např. zesíťováním. Na základě těchto vlastností můžeme kolagen považovat za dobrý standard pro výrobu biomateriálů [3, s. 21], [15, s. 1–4], [16, s. 2].

Biologická kompatibilita kolagenu je spjata se synergickým působením ve vztahu k některým dalším bioaktivním látkám, navíc je možné jej kombinovat i s celou řadou syntetických látek, nejčastěji dalších polymerů. Kolagen bývá někdy označován za látku biologicky plastickou, a to díky jeho vysoké mechanické odolnosti a pevnosti v tahu [15, s. 1–4], [16, s. 2].

K hlavním nevýhodám kolagenu patří jeho značná biologická variabilita. Hustota zesíťování, velikost vláken a přítomnost stopových nečistot má značný vliv na kvalitu tohoto skleroproteinu, jedná se tedy o velmi důležité parametry z pohledu jeho dalšího biotechnologického využití. Hydrofilní charakter molekul kolagenu vede k bobtnání a rychlejšímu procesu uvolňování. Ve srovnání s hydrolytickou degradací je také nutno počítat s proměnlivou rychlostí enzymatické degradace [15, s. 4].

## 1.5 Typy kolagenu

V současnosti je známo přibližně 28 různých typů tohoto proteinu [2, s. 29]. Whitford [7, s. 93] dokonce uvádí, že bylo dodnes identifikováno minimálně 30 specifických typů kolagenu, jež se mírně odlišují v sekvenci AMK v jejich polypeptidickém řetězci.

Na základě své struktury a trojrozměrné organizace lze kolagenové proteiny rozdělit do několika skupin, tzv. kolagenních rodin: kolageny tvořící fibrily (fibrilární), kolageny síťotvorné (mikrofibrilární), kolageny kotvicí fibrily, kolageny asociované s fibrilami (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices – FACIT), kolageny asociované s membránami (Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices – MACIT) a ostatní, např. multiplexinové kolageny. Jednotlivé rodiny včetně typických zástupců a jejich výskytu jsou uvedeny v Tab. 2 [2, s. 29], [3, s. 21], [16, s. 3].

Tab. 2. Přehled rodin kolagenů, včetně jejich zástupců a výskytu [3, s. 23], [16, s. 3]

Rodina	Typ	Výskyt
Fibrilární	I	Šlachy, vazy, kosti, kůže a oční rohovka
	II	Plíce, oční rohovka, retikulární vlákna, chrupavka, cévní stěna, meziobratlová ploténka, sklivec a <i>dermis</i>
	III	
	V	
	XI	Sklivec a chrupavka
Síťotvorné (Mikrofibrilární)	IV	Bazální membrána
	VI	<i>Dermis</i> , placenta, plíce, chrupavka, meziobratlová ploténka, svalová tkáň
Kotvicí	VII	Sliznice ústní dutiny, děložní hrdlo, močový měchýř, dermální a epidermální spoje
FACIT	IX	Oční rohovka a sklivec, chrupavka
	XII	Šlachy, vazy, <i>dermis</i>
	XIV	Cévní stěna, placenta, játra, <i>dermis</i> a plíce
	XVI	Keratinocyty a fibroblasty
MACIT	XIII	Vlasový folikul, endotel střevní sliznice, játra, dermální a epidermální spoje, <i>epidermis</i>
	XVII	Dermální a epidermální spoje
Ostatní (Multiplexiny)	XV	Ledviny, hladká svalovina, fibroblasty a slinivka břišní
	XVIII	Játra a plíce

### 1.5.1 Fibrilární kolageny

Fibrilární kolageny představují 80 až 90 % veškerého kolagenu obsaženého v lidském těle a jedná se tedy o nejhojněji zastoupenou skupinu. Pro tuto rodinu kolagenů je typická asociace do vysoce uspořádaných vláknitých struktur. Řadíme mezi ně typy I, II, III, V a XI, které jsou běžnou součástí kůže, šlach či chrupavek [2, s. 29–30], [12, s. 1534–1535].

Kolagen typu I je v lidském těle zastoupen nejhojněji – tvoří více než 90 % kostní organické hmoty a je hlavním kolagenem šlach, vazů, rohovky a mnoha intersticiálních pojivových tkání. Je také hlavní složkou lidské kůže (80 %), přičemž je zde doprovázen především kolagenem typu III (15 %) [2, s. 30], [6, s. 16], [7, s. 94], [12, s. 1535].

Typ II je charakteristický především pro chrupavku, kde jeho zastoupení dosahuje často hodnoty vyšší než 50 %. Ve srovnání s typem I, obsahují řetězce typu II větší množství Hyp, glukosy a galaktosy, které zprostředkovávají interakce s proteoglykany, tedy s dalšími typickými komponenty vysoce hydratované ECM hyalinní chrupavky [7, s. 94], [12, s. 1536].

Typ III vyztužuje stěny dutých struktur a je součástí relativně elastických tkání, např. plicích, krevních cévách, střevech a děloze. Typ V se vyskytuje velmi zřídka, doprovází kolagen typu I, jeho relativně vysoké množství je obsaženo v rohovce. Typ XI můžeme společně s typem II nalézt v chrupavce [6, s. 16], [7, s. 94], [12, s. 1536].

Molekuly kolagenu mohou být složeny jak ze tří stejných, tak i různých polypeptidických  $\alpha$ -řetězců. V prvním případě se bavíme o tzv. homotrimerických molekulách, se kterými se můžeme setkat u kolagenů typů II a III, v opačném případě se jedná o molekuly heterotypické, jež obsahují minimálně jeden odlišný  $\alpha$ -řetězec. Kolageny typu V a XI obsahují ve své struktuře dokonce tři zcela odlišné řetězce, které se navíc, v závislosti na konkrétní formě proteinu, mohou odlišovat i v rámci samotného typu [6, s. 16], [12, s. 1536].

V literatuře se často můžeme setkat se zavedenou nomenklaturou pro značení  $\alpha$ -řetězců:  $\alpha n(N)$ , kde N je označení konkrétního typu kolagenu římskou číslicí a  $n$  je počet  $\alpha$ -řetězců. Tím pádem, složení řetězců např. pro kolagen typu II může být zapsáno  $[\alpha 1(II)]_3$ , jelikož jeho trojšroubovice je tvořena třemi identickými  $\alpha$ -řetězci. Pro kolagen typu I, který je složen ze dvou identických  $\alpha 1$  řetězců a třetího odlišného  $\alpha 2$  řetězce, můžeme zapsat jeho strukturní složení jako  $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$  [6, s. 17], [7, s. 94], [12, s. 1536].

### 1.5.2 Síťotvorné (mikrofibrilární) kolageny

Typy IV a VI řadíme mezi kolageny síťotvorné (mikrofibrilární) [16]. Pro tuto podskupinu je charakteristická častá přítomnost nonhelikálních domén, kde dochází k přerušení motivu Gly-X-Y [6, s. 19], [15, s. 3]. Nejvýznamnějším zástupcem je typ IV, někdy označovaný jako tzv. kolagen bazální membrány. Bazální membrány jsou specializované struktury na-

cházející se pod epiteliální a endoteliální výstelkou, tukovou, svalovou, respektive nervovou tkání. Jedná se o relativně tenké vrstvy (obvykle o tloušťce 40–50 nm) složené nejen z kolagenu typu IV, ale také lamininů, proteoglykanů a heparin sulfátu [4, s. 1068], [7, s. 94]. Typ IV integruje tyto další komponenty do dvojrozměrné sítě, která je díky specifické struktuře tohoto typu relativně flexibilní [12, s. 1538]. Molekuly kolagenu typu IV jsou ve srovnání s fibrilárními kolageny také delší a nevytvářejí žádné prekurzorové formy. Na rozdíl od fibrilárních kolagenů jsou jeho N- a C-terminální oblasti aktivně zapojovány do formování jeho konečné biologické struktury [6, s. 19].

Kolagen typu VI se nachází pod samotnou bazální membránou a zabezpečuje spojení *dermis* a *epidermis* skrz tzv. kotvicí fibrily. Hraje roli v procesu hemostázy a je strukturální součástí plic, svalové tkáně a také chrupavek, jedná se tedy o relativně hojně se vyskytující typ. Jeho molekuly jsou složeny ze třech různých řetězců, řadí se tedy mezi heterotrimerní zástupce. Samotná helikální oblast tvoří méně než 10 % jeho struktury. Od ostatních typů kolagenu se odlišuje samotným mechanismem asociace molekul, ta totiž začíná už v intracelulárním prostoru, tzn. uvnitř buňky [3, s. 23], [6, s. 20–21], [12, s. 1538].

### 1.5.3 Další typy kolagenu

#### Kotvicí kolageny

Typ VII, řadící se mezi kolageny kotvicí, ukotvuje samotné fibrilární kolageny. Tento typ kolagenu je esenciální součástí dermálních a epidermálních spojů, vytváří navíc nejdelší helikální oblast mezi kolageny obratlovců, dosahuje délky až 420 nm [3, s. 23], [6, s. 19], [15, s. 3].

#### FACIT

Kolageny s přerušovanými helikálními oblastmi asociované s fibrilami typu IX, XII a XIV mají v porovnání s fibrilárními kolageny spíše menší řetězce. Základním představitelem této rodiny kolagenů je typ IX, který se společně s kolageny typu II a XI vyskytuje ve tkáni chrupavek. Molekula typu IX je rovněž tvořena třemi různými řetězci, přičemž řetězec  $\alpha_2(\text{II})$  může být substituován řetězcem GAG, je tedy možné jej řadit mezi proteoglykany. Typ XIV, vyskytující se zejména ve fibroblastech a keratinocytech, je mediátorem intracelulárních signálů, které ovlivňují proliferaci a buněčnou adhezi. Se zástupci této rodiny kolagenů se dále můžeme setkat ve stěnách cév, v *dermis*, placentě či játrech [3, s. 23], [6, s. 21], [12, s. 1537], [15, s. 3], [16, s. 3].

## MACIT

Kolageny asociované s membránami typu XIII a XVII se podílí na struktuře vlasového folikulu, endoteliální výstelky střev a společně s kolagenem typu VII jsou součástí dermálních a epidermálních spojů. Typ XIII ovlivňuje tvorbu kostí a podílí se na vaskulogenezi. Funkce typu XVII v lidském těle není dodnes zcela jasná, předpokládá se, že je schopen stabilizovat adhezi epitelálních buněk k okolní extracelulární matici [3, s. 23], [9, s. 9].

## Multiplexiny

Multiplexiny, kolageny typu XV a XVIII, se sestávají z několika nonhelikálních domén. Oba typy jsou asociovány s bazálními membránami a ve své struktuře obsahují kovalentně vázané GAG řetězce, patří tedy zároveň mezi proteoglykany. Kolagen typu XV je součástí fibroblastů, buněk hladké svaloviny, vyskytuje se také ve výstelce ledvin a slinivky břišní. Předpokládá se, že typ XV přispívá k udržení porézní sítě pod bazální membránou, jež má význam pro difúzi extracelulárních signálních molekul. Typ XVIII se vyskytuje ve tkáni plic a ledvin [3, s. 23], [6, s. 20], [17, s. 1, 6].

## 1.6 Mechanismus syntézy kolagenu v lidském těle

Proces biosyntézy kolagenu je velmi komplexní, zahrnuje nespočet intra- a extracelulárních dílčích reakcí, jež celkově přispívají ke vzniku komplexní struktury a zabezpečují biomechanické vlastnosti konečných fibril [6, s. 22].

Molekuly kolagenu jsou syntetizovány zejména fibroblasty, což jsou buňky pojivové tkáně *dermis*, které jsou odpovědné za produkci a organizaci kolagenové matrice. Tyto buňky jsou většinou diferenciovány z pluripotentních kmenových buněk nebo z buněk retikulárních [15, s. 2].

Fibroblasty jsou citlivé na fyzikální a chemické podněty, které mohou indukovat jak aktivaci fibroblastů, tak jejich proliferaci. Chemické podněty jsou založeny na mechanismu „key-lock“, kdy se malé ligandy vážou na receptory umístěné na extracelulární membráně fibroblastů, což vyvolává jejich aktivaci. Fyzické podněty přímo souvisejí s interakcemi mezi kolagenem a fibroblasty [2, s. 30], [18, s. 463].

Syntéza kolagenního prekursoru ve formě jednotlivých  $\alpha$ -řetězců probíhá na membráně ribozomů, kde dochází ke kondenzační reakci jednotlivých AMK za současného odštěpení molekuly vody. V této formě kolagenní prekursor obsahuje signální sekvenci, jež řídí jeho

transport na membránu drsného endoplazmatického retikula (ER) a usnadňuje tak průchod do jeho vnitřního prostoru, kde je tento signální peptid odštěpen působením specifických proteáz [1, s. 372], [6, s. 22], [7, s. 97], [12, s. 1540].

Tomuto transportu předchází hydroxylace Pro a Lys zbytků. Jedná se o velmi důležitou posttranslační modifikaci, jelikož hydroxylace vede k tvorbě vodíkových můstků, které stabilizují kolagen a zabezpečují tak jeho strukturální rigiditu, která mu umožňuje plnění role „biologického lešení“, respektive kostry [7, s. 289–290].

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1, vodíkové můstky se tvoří mezi atomem kyslíku karboxylové skupiny jedné peptidové vazby a atomem vodíku iminoskupiny druhé peptidové vazby. Hydroxylové skupiny Hyp vytvářejí vodíkové můstky i mimo hlavní řetězec, což dále přispívá ke stabilizaci molekuly [1, s. 372], [7, s. 95], [11, s. 893].

Hydroxylace probíhá hlavně na zbytcích Pro v poloze Y tripletu Gly-X-Y, a to prostřednictvím enzymu prolyl-4-hydroxylázy, k hydroxylaci může ale docházet i v poloze X působením prolyl-3-hydroxylázy, tato varianta je ale mnohem méně obvyklá. Ze sterických důvodů dochází k prolyl-hydroxylaci před samotnou asociací trojhelikální molekuly prokolagenu. Pro tuto reakci je nutná přítomnost kyslíku, askorbátu (vitamin C) a 2-oxoglutarátu. V případě, že se tyto látky nevyskytují v organismu v dostatečném množství, dochází k inhibici tvorby prokolagenu [6, s. 24], [7, s. 289–290], [12, s. 1540].

Zcela analogickým způsobem, působením lysyl-5-hydroxylázy, jsou na pátém uhlíku hydroxylovány i Lys zbytky kolagenu. Míra hydroxylace Lys se v různých tkáních liší, relativně vysoké je její zastoupení v kolagenech typu IV a VI. K hydroxylaci Lys zbytků může docházet pouze v případě, že se nacházejí v poloze Y repetitivního tripletu Gly-X-Y. Díky takto vzniklým hydroxylovým skupinám je možné následné připojení glykosylových skupin, které vytvářejí příčné vazby mezi vlákny, což značně přispívá ke stabilitě trojšroubovice [6, s. 24–26], [7, s. 289–290].

Glykosylace prostřednictvím atomu kyslíku (tzv. O-glykosylace) Hyl zbytků je specifická pro kolagenní proteiny a představuje vznik kovalentní vazby mezi molekulou proteinu a cukernou složkou – galaktózou, na níž se váže další molekula glukózy. Často jsou tyto cukry připojovány ve formě disacharidových jednotek. V této fázi se modifikované  $\alpha$ -řetězce spojují za tvorby molekuly tzv. prokolagenu, v N- a C- terminálních oblastech se mezi řetězci vytvářejí disulfidické můstky a centrální regiony se balí do trojitě šroubovice.

Molekuly prokolagenu putují před samotnou exkrecí z ER do Golgiho aparátu (GA), kde jsou sbaleny do sekrečních vezikul [6, s. 26–28], [7, s. 98–99], [8, s. 44].

Po exkreci do extracelulárního prostoru jsou z molekul prokolagenu působením prokolagenových N- a C-proteáz odstraněny úseky bohaté na disulfidické můstky – tzv. propeptidy, které usměrňují tvorbu trojšroubovice a zabraňují vzniku velkých kolagenních fibril ve vnitřním prostoru buněk. Takto modifikované molekuly kolagenu se označují jako tropokolagen. Na jejich koncových oblastech se vyskytují odštěpitelné nonhelikální polypeptidické oblasti bohaté na aromatickou AMK tyrosin – telopeptidy. Molekuly tropokolagenu se sdružují a dohromady se podílí na tvorbě vyšších strukturních celků – kolagenních fibril [1, s. 372–373], [7, 98–99], [12, s. 1541].

Posledním krokem biosyntézy kolagenu je tvorba kovalentního zesílení, které je v případě vláknitých kolagenů většinou iniciováno enzymy ze skupiny lysyl-oxidáz. Tato skupina enzymů je schopna přeměnit Lys nebo Hyl zbytky v N- a C- terminálních oblastech telopeptidů na příslušné peptidyl aldehydy. Tyto aldehydy poté spontánně kondenzují s dalšími aldehydy nebo s nepřeměněnými Hyl a Lys zbytky za vzniku intra- a intermolekulárních kovalentních vazeb [1, s. 373], [6, s. 23, 30–31].

## 1.7 Zdroje kolagenu

### 1.7.1 Přírodní zdroje

K nejběžnějším přírodním zdrojům kolagenu patří hovězí, vepřová či kuřecí tkáň. Hlavní předností živočišného kolagenu je jeho dobrá dostupnost a relativně nízká pořizovací cena. V konkrétních případech může ale s opakovanou aplikací živočišný kolagen provokovat zánětlivé a alergenní reakce. Možným řešením tohoto problému je modifikace struktury samotných molekul kolagenu. Mezi další nevýhody patří přirozená variabilita v jeho kvalitě a možné riziko přenosu nemocí (zoonóz). Dalším aspektem, který brání v případě některých zemí v používání kolagenů živočišného původu, je rovněž kulturní (náboženské) hledisko [3, s. 22], [10, s. 124–125], [19, s. 1492].

V případě hovězího kolagenu bylo zejména v dřívějších dobách negativně pohlíženo na možné riziko nákazy bovinní spongiformní encefalopatií (BSE). I přes tuto skutečnost je hovězí tkáň stále běžně používaným zdrojem kolagenu. Jednou z hlavních nevýhod hovězího kolagenu je jeho alergický potenciál, který se týká přibližně 3 % populace. Hovězí



šlachy se průmyslově využívají k získání kolagenu typu I. Typ IV se získává z placentárních klků a typu II z nosní nebo kloubní chrupavky [10, s. 124–125], [19, s. 1492].

Vepřový kolagen se řadí mezi druhý nejčastěji používaný živočišný zdroj pro extrakci kolagenu a souvisejících produktů, přičemž se využívají hlavně vepřové kosti a kůže, které jsou dobrým zdrojem kolagenu typu I. Vepřový kolagen je velmi blízký tomu lidskému, riziko potenciální alergické reakce je tedy relativně malé, ale i v jeho případě existuje riziko přenosu zoonóz [3, s. 24], [10, s. 124–125], [19, s. 1492].

Kuřecí běháky jsou taktéž dominantním zdrojem kolagenu typu I. Dalšími zdroji typů I a II jsou kuřecí kůže a krky, typy III a V se rovněž nachází v kuřecích krcích, typ IV může být extrahován z kuřecí svalové tkáně [3, s. 22], [20, s. 1].

Vzhledem k obavám z možného přenosu nemocí, provokace zánětlivých reakcí a potenciální imunologické odpovědi organismu byly zahájeny výzkumy alternativních přírodních zdrojů. V současnosti jsou pravděpodobně za ten nejvíce bezpečný zdroj považováni mořští živočichové [3, s. 22, 24], [10, s. 124].

Ryby, hvězdice, medúzy, houby, mořští ježci, chobotnice, sépie, mořské sasanky a krevety představují potenciální zdroj kolagenu, který má ve srovnání s výše uvedenými zdroji celou řadu předností. Mezi ty hlavní patří vysoký obsah kolagenu v samotných tkáních mořských živočichů, lepší schopnost absorpce v důsledku nižší Mr, téměř zanedbatelná přítomnost biologických kontaminantů a toxinů, mimo jiné také nízké riziko vzniku zánětlivé a imunogenní reakce a případného přenosu nemocí. Můžeme na něj pozitivně nahlížet i z pohledu environmentální přívětivosti. Rybí hlavy, šupiny, kůže, ploutve a kosti mohou tvořit až 75 % hmotnosti těla, ale z hlediska průmyslového zpracování jsou považovány za odpadní materiál, nicméně právě tyto části ryb jsou významnými zdroji kolagenu, především typu I. Mořské houby a medúzy jsou pak taktéž zdrojem typů II, IV a V [3, s. 22], [8, s. 45], [10, s. 124].

Použití kolagenu v různých aplikacích často závisí na tepelné stabilitě, jež úzce souvisí s tělesnou teplotou a životním prostředím organismů, z nichž je kolagen získáván. Tepelná stabilita mořského kolagenu je nízká, což omezuje jeho použití v konečných aplikacích. I přesto toto omezení je však v posledních letech možno pozorovat znatelný příklon právě k mořskému kolagenu [3, s. 24], [21, s. 1484].

### 1.7.2 Syntetické zdroje

Syntetické materiály mají řadu žádoucích vlastností, jako je celkově snadnější kontrola nad materiálem, konzistentnost samotné syntézy a možnost funkcionalizace. Hlavní nevýhodou těchto syntetických alternativ je však často *in vivo* toxicita a špatná biodegradabilita [19, s. 1491].

Příkladem syntetického analogu kolagenu je materiál komerčně pojmenovaný KOD. Jedná se o syntetický protein skládající se z 36 aminokyselin, které se samy sestavují do triplehelikálních nanovláken a hydrogelů. Tato látka napodobující přírodní kolagen obsahuje ve své struktuře sekvence peptidu (Pro-Lys-Gly), (Pro-Hyp-Gly) a (Asp-Hyp-Gly). Tento materiál je využitelný především v oblasti biomedicíny. Díky své schopnosti zachycovat červené krvinky se může uplatňovat jako hemostatikum, dále je také schopen vázat a aktivovat krevní destičky za vzniku sraženin, aniž by docházelo k provokaci zánětu [21, s. 1484–1487].

Další syntetický zdroj kolagenních bílkovin byl vyvinut pomocí postupu odvozeného z technologie rekombinantní deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Tato technologie využívá poznatků genového inženýrství k produkci rekombinantní molekuly DNA, jež vzniká kombinací dvou nebo více segmentů nepříbuzných molekul DNA. Tyto rekombinantní molekuly jsou poté vloženy do hostitelského organismu tak, aby došlo k vytvoření nové genetické kombinace s požadovanými vlastnostmi. Stejného principu se využívá k produkci různých typů kolagenu. Syntéza rekombinantního kolagenu zahrnuje expresi specifických sekvencí DNA kolagenu v hostitelských buňkách hmyzu, rostlin, kvasinek, ale také savců. Výsledkem tohoto postupu je vysoce kvalitní protein odvozený ze živočišných zdrojů bez případných kontaminantů [22, s. 2–3].

Velkou předností kolagenu získaného touto technologií je přítomnost intaktní (netknuté) trojšroubovice, což je důležitý znak biologické aktivity kolagenu. V některých případech by totiž tato biologická aktivita mohla být ztracena v důsledku chemického ošetření během procesu extrakce kolagenu z živočišné matrice [22, s. 2–3].

Rekombinantní kolagen dále vykazuje nízkou imunogenitu, dobrou biologickou kompatibilitu, rozložitelnost a výbornou zpracovatelnost. Rekombinantní kolageny byly použity v kostních, očních i kožních aplikacích většinou ve formě hub, v poslední době ale také jako vlákna a gely [19, s. 1491–1492], [22, s. 2–3].

---

Například bioaktivní kolagen typu II se stabilní trojšroubovicí specifický pro lidskou chrupavku lze získat za použití hostitelských buněk larev bource morušového (*Bombyx mori*). Takto získaný kolagen pak může sloužit k léčbě revmatoidní artritidy a dalších onemocnění spojených s deficitem kolagenu typu II a genetickými defekty. Ačkoliv rekombinantní technologie umožňuje produkovat stabilní bioaktivní kolagen, je cenově nákladná a poskytuje obecně nízký výnos. Další problém spojený s touto technologií je nedostatek kofaktorů či enzymů v systémech, které jsou rozhodující pro stabilní tvorbu biofunkčních a bioaktivních kolagenů. Kvůli těmto nedostatkům zůstává kolagen živočišného původu nadále standardem pro použití jak ve výzkumu, tak v klinické praxi. Tyto okrajové oblasti nicméně mohou být dále využity jako testovací pole pro zhodnocení pozitiv rekombinantních kolagenů a případně mohou pomoci dostat tyto technologie do popředí výzkumu tkáňového inženýrství [19, s. 1491–1492], [22, s. 2–3].

## 2 APLIKAČNÍ POTENCIÁL KOLAGENU

Kolagen má díky svým biologickým vlastnostem (viz kapitola 1.4) velký potenciál pro celou řadu biomedicínských aplikací. Kromě jeho fyziologické kompatibility a vstřebatelnosti, jež je navíc ovlivnitelná samotným stupněm zesítnění, je další předností kolagenu vysoká absorpční schopnost, která vyplývá z jeho velkého vnitřního povrchu (řádově  $\text{m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$ ). Biomateriály na bázi kolagenu jsou široce využívány ve tkáňovém inženýrství, nicméně své místo má tento protein i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [1, s. 378], [10, s. 125], [23, s. 5883].

V roce 2016 byla velikost globálního trhu s kolagenem odhadnuta na 3,71 miliard USD a očekává se, že do roku 2025 by jeho velikost mohla dosáhnout až 6,63 miliard USD, a to i v důsledku stále rostoucí poptávky po kosmetických výrobcích a zdravotní péči z důvodu zvětšující se světové populace [3, s. 25].

### 2.1 Biomateriály na bázi kolagenu

Biomateriály na bázi kolagenu jsou využívány v řadě medicínských oborů. Jednotlivé typy těchto biomateriálů se liší svou funkcí, složením i konečnou aplikací. V oblasti kardiologie a chirurgie se kolagen uplatňuje při vaskulárních a srdečních rekonstrukcích např. ve formě umělých krevních cév či srdečních chlopní. Aplikační potenciál kolagenu je ale mnohem širší – náhrady kůže, krytí ran, rekonstrukce vazů, obvazové kontaktní čočky, to je jen krátký výčet potenciálních aplikací tohoto proteinu. Pro výrobu biomateriálu na bázi kolagenu jsou nejčastěji využívány fibrilární kolageny (typy I, II, III, V a XI), především kvůli jejich dostatečné pevnosti [10, s. 125–126], [24, s. 1871–1872].

Podpůrné systémy tkání na bázi kolagenu hrají v moderní medicíně zásadní roli. Své využití nalézají při rekonstrukcích chrupavek, kostí a také kůže. Jelikož jsou tyto podpůrné systémy jen omezeně elastické, během procesu hojení dochází k jejich smršťování. Tato vlastnost je často potlačována přítomností dalšího proteinu – elastinu, který přispívá ke snížení tuhosti a umožňuje lépe korigovat smršťování kolagenu [16, s. 5].

#### 2.1.1 Kolagenové membrány

Kolagenové membrány o tloušťce 0,01–0,5 mm se využívají ke krytí ran (především popálenin), opravě cév, ale mohou být využity i jako nosiče aktivních látek a kmenových buněk. Aktivní látky jsou do kolagenových membrán inkorporovány na základě vodíkových

či kovalentních vazeb, anebo na základě jednoduchého zachycení samotnou strukturou. V praxi se nejčastěji využívají membrány vyrobené z atelokolagenu, jenž je produkován odstraněním telopeptidů z molekuly kolagenu působením proteáz (např. pepsinu) [1, s. 378], [15, s. 4–5, 11].

### 2.1.2 Kolagenové hydrogely

Kolagenové hydrogely jsou díky jednoduché výrobě a snadné aplikaci běžně používány jako podpůrné systémy a nosiče aktivních látek. V minulosti byly např. využity jako nosiče chondrocytů pro korekci defektů chrupavky [24]. Formulace hydrogelů mohou být dle požadovaných mechanických a biologických vlastností tvořeny různou kombinací kolagenu a dalších přírodních či syntetických polymerů. Kolagenové hydrogely v kombinaci s pláty keratinocytů jsou využívány k léčbě chronických nebo akutních typů ran jako tzv. umělá kůže [15, s. 10–11], [16, s. 5].

### 2.1.3 Kolagenové houby

Kolagenové houby jsou dalším materiálem vhodným pro ošetřování vážných popálenin a také pro krytí různých typů ran, typicky bércových vředů. Ze strukturního hlediska se jedná o houbovitě resorbovatelné polymery, založené např. na bázi kyseliny mléčné a plněně atelokolagenem. Tyto houby mají schopnost velmi snadno přilnout k mokrému podloží rány, ze kterého jsou schopné odvést značná množství přebytečné vlhkosti (tkáňového exsudátu), snižují tak riziko sekundární bakteriální infekce. Pro podpoření těchto vlastností je kolagen v houbách často kombinován s GAG [1, s. 378], [15, s. 9–10].

### 2.1.4 Kolagenové štíty

Kolagenové štíty ve formě vstřebatelných obvazových kontaktních čoček nacházejí své uplatnění v oftalmologii. Tyto štíty slouží zároveň jako nosiče aktivních látek a jejich výhodou je jednoduchá aplikace na povrch oční bulvy. Kolagenová matrice funguje jako rezervoár, aktivní látky jsou zachyceny buď v mezerách matrice ve formě roztoku (pro aktivní látky rozpustné ve vodě), anebo jsou začleněny do samotného štítu (pro aktivní látky ve vodě nerozpustné). Díky slzám dochází k proplachování štítu, ten se v důsledku toho rozpouští a poskytuje tak vrstvu biologicky kompatibilního kolagenu. Vrstva minimalizuje tření víček o rohovku, čímž chrání uzdravující se epitel rohovky, a podporuje tak proces léčby [3, s. 24], [15, s. 7].

### 2.1.5 Další biomateriály na bázi kolagenu

Mezi další medicínské aplikace kolagenu patří šicí vlákna užívaná v chirurgii – tzv. „cat-gut“. Na rozdíl od syntetických vláken na bázi polyamidu, jsou tato vlákna vstřebatelná a doba nutná k jejich vstřebání je závislá na stupni zesítnění. Kolagenní netkané textilie, které se připravují buď mechanickým rozmělněním vláknenného pletiva, nebo rekonstitucí z roztoku, jsou využívány zejména v mechanismech pro zastavení krvácení [1, s. 378].

## 2.2 Kosmetické využití

### 2.2.1 Topické aplikace

Pro kosmetické aplikace se uplatňují především kolageny typu I a II [22, s. 9]. V oblasti kosmetické péče lze tento protein využít pro formulaci topických kosmetických přípravků, kde se jeho vlastnosti promítají zejména do vývoje krémů a gelů pro suchou pleť [3, s. 24], [16, s. 6].

Suchá kůže (xerodermie) je běžný stav pokožky, ke kterému dochází v důsledku nedostatečné hydratace kůže a omezené tvorby kožního mazu. Tento stav je obvykle způsoben klimatickými změnami, zejména v zimě, kdy je relativní vlhkost vzduchu nízká, ale může být zapříčiněn také určitými chorobnými stavy, jako je např. avitaminóza (zejména nedostatek vitamínu A či D), užívání některých léků nebo výskyt systémových onemocnění. Přípravky pro péči o suchou pokožku jsou tvořeny komplexními formulacemi kosmetických ingrediencí, mezi hlavní přísady těchto přípravků patří zvlhčující látky – humektanty, které jsou schopné přímo zvyšovat obsah vody v *epidermis*, a emolienty, jež díky svým vlastnostem omezují únik vody z pokožky [22, s. 8].

*Collagen* je častou přísadou v mnoha kosmetických formulacích, zejména pleťových krémech a tělových mlécích. Díky jeho přirozené schopnosti vázat vodu se uplatňuje jako přírodní zvlhčující látka. Na rozdíl od humektantů s nízkou molekulovou hmotností (např. *Glycerin* a *Urea*), *Collagen* spadá mezi látky s relativně velkou molekulou, neproniká tedy přímo do pokožky a zůstává na její svrchní vrstvě – *stratum corneum* (SC), kde vytváří tenký film, který redukuje množství vody unikající z pokožky – snižuje TEWL a zároveň váže vlhkost ze vzduchu, čímž dále přispívá k udržení hydratace pokožky [3, s. 24], [22, s. 8], [25, s. 1–2], [26, s. 107].

Kromě přípravků pro suchou pokožku se *Collagen* vyskytuje i v kosmetických přípravcích pro korekci projevů stárnutí a redukci vrásek. Tvorba vrásek je jedním z typických příznaků stárnutí kůže, nicméně samotný proces stárnutí je velmi komplikovaný. Změny související se stárnutím kůže jsou způsobeny strukturálními modifikacemi kožní tkáně, k čemuž dochází zejména působením volných radikálů produkovaných většinou ultrafialovým (UV) zářením a do jisté míry buněčným metabolismem. Důležitým faktorem je ale i samotný věk, např. schopnost doplňovat kolagen ve tkáních s přibývajícím věkem klesá přibližně o 1,5 % ročně. Jak již ale bylo zmíněno, molekuly kolagenu jsou příliš velké na to, aby byly schopny pronikat rohovinovou vrstvou kůže až k fibroblastům dermální vrstvy, nemájí tedy přímý vliv na produkci kolagenu v kůži [2, s. 30–37], [16, s. 6], [22, s. 9], [27, s. 150–152].

V případě kolagenních peptidů je ale situace odlišná. Chai a kol. [28] ve své studii zhodnotili vlastnosti kolagenních peptidů izolovaných z rybích šupin. Výsledky ukázaly, že tyto peptidy, jejichž průměrná  $M_r$  se pohybovala v rozmezí 1,3–4,5 kDa, byly s využitím Francova typu komůrek schopny v různé míře proniknout skrz *SC* do *epidermis* a *dermis*.

Potenciálním využitím mořského kolagenu v topických aplikacích se ve své studii zabývají také Swatschek a kol. [26]. Cílem jejich studie bylo srovnat účinek formulací s obsahem *Collagen* izolovaného z mořské houby *Chondrosia reniformis* a komerčně běžně dostupného přípravku s obsahem tohoto proteinu z konvenčních zdrojů. Výsledky experimentální části studie ukázaly jen velmi nepatrné rozdíly ve vlivu testovaných vzorků na biofyzikální parametry kůže. Mořský kolagen je tedy možné považovat za plnohodnotnou alternativu ke konvenčním zdrojům.

### 2.2.2 Periorální aplikace

Kromě topicky aplikovaných kosmetických přípravků se s kolagenem ve formě jeho hydrolyzátů můžeme setkat i v rámci doplňků stravy bojujících proti stárnutí kůže. *Hydrolyzed Collagen* se obecně sestává z drobných peptidů o nízké  $M_r$ , která se pohybuje v rozmezí 0,3–8 kDa. Biologická hodnota konečného *HC* závisí na jeho průměrné molekulové velikosti, která se může lišit v závislosti na metodice použité k jeho extrakci. Kolagenové molekuly jsou denaturovány a částečně hydrolyzovány za vzniku želatiny ( $M_r = 100$  kDa). Želatina může být poté rozložena na malé peptidy pomocí specifických enzymů se štěpnou aktivitou (proteázy) [2, s. 32–33], [22, s. 9].

Řada peptidů, které vykazují aktivitu *in vitro*, nicméně ztrácí svou aktivitu v důsledku trávení, jelikož jsou náchylné k účinkům hydrolytických peptidáz v gastrointestinálním traktu. Určité skupiny peptidů, zejména ty s C-terminálními Pro nebo Hyp zbytky, mohou procházet střevní bariérou, vstupovat do oběhu v kvantitativně významných množstvích a být tak biologicky aktivní. Pro efektivní biologickou účinnost musí být peptidy absorbovány ze střeva v neporušeném stavu a musí tak být odolné vůči degradačnímu účinku plazmatických peptidáz. Jen tak může být zabezpečena jejich biologická aktivita v cílových orgánech [22, s. 9], [29, s. 2315].

Stupeň přestupu přes tuto střevní bariéru může ovlivňovat účinnost peptidů *HC* v cíleném orgánu – např. kůži. Je tedy důležité brát v potaz, v jaké formě a množství mohou být kolagenní peptidy vůbec absorbovány. Tuto skutečnost nám blíže popisují pojmy biodostupnost a biodistribuce [2, s. 34].

Pojem biodostupnost můžeme definovat jako relativní množství dieteticky bioaktivní látky, která je schopná překonat intestinální bariéru, dosáhnout krevního řečiště a je tím pádem k dispozici pro metabolické procesy nebo uložení v těle (v tomto kontextu, v kůži). Biodistribuce je běžně definována jako proces, kterým látka dosahuje cílené tkáně skrze krevní cirkulaci. Mezi faktory, které mohou ovlivnit stupeň biodistribuce, patří krevní oběh, ale i chemické vlastnosti dané látky – např. molekulová hmotnost a polarita [2, s. 36], [30, s. 228].

Watanabe-Kamiyama a kol. [31] studovali distribuci kolagenních peptidů v kůži a ostatních tkáních potkanů *in vivo*. Během studie byly laboratorním potkanům podány peptidy *HC* označené radioizotopem uhlíku  $^{14}\text{C}$ . Radioaktivita byla poté měřena v různých tkáních během 0. až 6. hodin a po 14 dnech od podání. Výsledky prokázaly, že radioaktivita byla v kůži stále přítomná v relativně vysokých hladinách i 14 dní po provedení experimentu. To poukazuje na schopnost těchto peptidů dosáhnout *dermis* v kůži, kde je pozorován jejich hlavní přínos.

Kolagenové oligopeptidy působí jako signální molekuly, které se vážou na receptory přítomné na membráně fibroblastů a stimulují tak produkci kolagenu, elastinu a kyseliny hyaluronové, která dále přispívá ke zvýšení hydratace kůže a omezuje tvorbu vrásek [22, s. 9], [32, s. 32]. To dokládá i studie Ohary a kol. [33], jež se zabývá účinkem peptidů *HC* na stimulaci proliferace fibroblastů a syntézy kyseliny hyaluronové *in vitro*. Nejvyšší efekt byl pozorován u dipeptidu Pro-Hyp v koncentraci  $200 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ , kdy došlo ke zvý-



šení proliferace fibroblastů o 150 % a ke zvýšení syntézy kyseliny hyaluronové o 380 %. Dle Zhanga [34] má *HC* schopnost redukovat i zánětlivé procesy v organismu. Tento efekt je pravděpodobně založen na inhibici produkce prozánětlivého cytokinu přes chemicky řízené iontové kanály.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo zpracovat literární rešerši zabývající se vlastnostmi, zdroji a možnostmi využití kolagenu a jeho hydrolyzátů v oblasti kosmetických a biomedicínských aplikací.

V praktické části bylo cílem připravit modelové formulace s obsahem *Hydrolyzed Collagen* v různých poměrech, a to s využitím gelového a krémového základu; pomocí neinvazivních bioinženýrských metod na skupině dobrovolníků sledovat účinnost těchto formulací na vlastnosti pokožky – TEWL, hydrataci a pH; naměřená data statisticky vyhodnotit a vhodně diskutovat.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité materiály a chemikálie

#### *Hydrolyzed Collagen*

Příslušné formulace byly připraveny s kolagen-elastinovým hydrolyzátem z krátkých šlach, jenž byl izolován v neutrálním prostředí při teplotě 100 °C. Hydrolyzát o  $M_r = 4,6$  kDa byl vyroben v laboratoři Ústavu inženýrství polymerů Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně v červnu 2018.

#### Krémový a gelový základ

- krémový základ (Fagron a.s., Olomouc); složení dle INCI: *Aqua, Paraffin, Paraffinum Liquidum, Cetearyl Alcohol, Laureth 4, Sodium Hydroxide, Carbomer, Methylparaben, Propylparaben*;
- gelový základ (Fagron a.s., Olomouc), složení dle INCI: *Carbomer, Aqua, Methylparaben, Propylparaben, Sodium Hydroxide*.

#### Chemikálie

- destilovaná voda;
- dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich, ČR).

### 4.2 Použité pomůcky a zařízení

Během přípravy formulací a měření jejich účinnosti byly použity tyto laboratorní pomůcky: filtrační papír, pinzeta, náplast, nůžky, popisovací lihový fix, skleněné Petriho misky, odměrné baňky (objem 250 ml), váženka, plastové tyčinky, plastová odměrná kádinka (objem 250 ml), laboratorní lžička, plastové kelímky (objem 50 ml) s víčkem, 2ml injekční stříkačky, exsikátor.

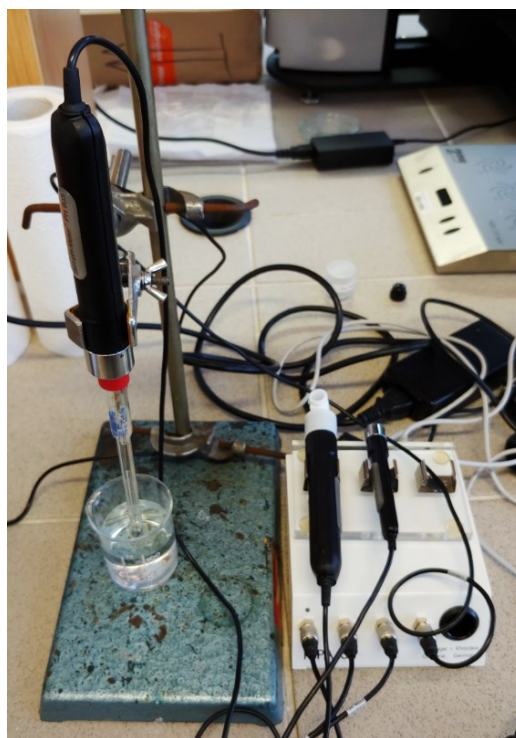
Dále bylo využito níže uvedených přístrojů:

- Lednice;
- Laboratorní váhy (KERN & Sohn GmbH, Německo);
- Míchadlo RZR 2020 (Heidolph, Německo);
- Stanice MPA5 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo);

- Sonda Corneometr CM 825 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo);
- Sonda Tewametr TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo);
- pH metr Skin-pH-Meter pH 905 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo).

#### 4.2.1 Stanice MPA 5

Stanice MPA 5 (Obr. 2) představuje adaptérový systém (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo) vybavený pro účely měření sondami: tewametr, korneometr a pH metr.



*Obr. 2. Stanice MPA 5 (zleva sonda pH metru, tewametru a korneometru)*

Tewametr TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo) s otevřenou konstrukcí komůrky slouží k měření TEWL. Sonda ve tvaru válce je z obou stran otevřená a obsahuje senzory relativní vlhkosti (hygrosenzory) společně s teplotními čidly (termistory). Na základě těchto snímačů je měřen gradient tlaku vodní páry nad povrchem kůže. Tento gradient závisí jak na rychlosti difúze vody ze  $SC - TEWL [g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}]$ , tak i na rychlosti odpařování vody z povrchu kůže – tzn. na okolním mikroklimatu. Proto je nutné v rámci možností co nejvíce eliminovat případné pocení. Narušení bariérové funkce kůže vede ke zvýšení TEWL, což je detekováno zvýšením hodnoty naměřené sondou. Samotné zvýšení hodnoty TEWL však nemusí přímo indikovat poškození bariérové funkce, vždy

je totiž nutné brát v potaz i úroveň hydratace kůže a vliv okolní teploty, nicméně měření je dobrým ukazatelem funkce kožní bariéry a stavu *epidermis* [35, s. 64, 99–100], [36, s. 85], [37, s. 4].

Stupnice pro interpretaci hodnot tewametru je uvedena v Tab. 3.

Tab. 3. Stupnice pro interpretaci hodnot tewametru [38]

Interpretace	Hodnoty TEWL [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
Velmi dobrý stav	0–9
Dobrý stav	10–14
Normální stav	15–25
Napjatý stav	26–29
Kritický stav	Nad 30

Ke stanovení úrovně hydratace kůže bylo využito korneometrické měření. Metoda je založena na monitorování změn elektrické kapacity na povrchu kůže, přičemž je využíváno relativně vysoké dielektrické konstanty vody. Korneometrická sonda CM 825 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo) se skládá z keramické destičky, ke které jsou zapojeny zlaté proužky plnicí charakter desek kondenzátoru. Díky konstrukci měřicí hlavy sondy je po jejím přiložení na povrch kůže zabezpečena stejná hloubka měření (přibližně prvních 10 až 20  $\mu\text{m}$  v SC), což zajišťuje reprodukovatelnost měření. Naměřené hodnoty se uvádějí v korneometrických jednotkách [k. j.] [35, s. 250–252], [39, s. 35].

Stupnice pro vyhodnocení měřených hodnot korneometrem je uvedena v Tab. 4.

Tab. 4. Stupnice korneometru [40]

Typ kůže	Hydratace [k. j.]
Normální	Nad 45
Suchá	30–45
Velmi suchá	Pod 30

K měření pH byl využit integrovaný pH metr pH 905 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Německo) vybavený planární membránovou sondou, která umožňuje spolehlivé potenciometrické určení změn pH kožního povrchu [41, s. 59–60].

Stupnice pro vyhodnocení pH je uvedena v Tab. 5.

Tab. 5. Stupnice pH metru [42]

pH	Od 3,5	3,8	4,0	4,3	4,5	5,0	5,3	5,5	5,7	5,9	6,2	6,5	Nad 6,5
<b>Žena</b>	Kyselé			Neutrální				Zásadité					
<b>Muž</b>	Kyselé			Neutrální				Zásadité					

Postup měření je velmi podobný, všechny tři sondy se na dané místo přikládají pod pravým úhlem. V případě tewametry se sonda přiloží na měřené místo, tlačítkem na rukojeti zařízení se aktivuje měření a opětovným stiskem tlačítka se měření ukončí. Sonda korneometru po přiložení a zatlačení automaticky zaznamenává jednu hodnotu. Na rukojeti sondy pH-metru se rovněž nachází tlačítko, jeho stisk vede k přímému zaznamenání hodnoty pH.

### 4.3 Příprava formulací

V první fázi bylo připraveno 50 g kosmetických formulací s 0,5 a 2 % HC, které byly homogenizovány na míchadle RZR 2020 (Heidolph, Německo) po dobu 10 minut při 1050 ot·min<sup>-1</sup> do gelového a krémového základu (Fagron a.s., Olomouc). Navážky jednotlivých složek uvádí Tab. 6. Formulace byly převedeny do plastových kelímků o objemu 50 ml s víčkem a byly skladovány v lednici při teplotě 5 ± 1 °C.

Tab. 6. Navážky jednotlivých složek pro přípravu formulací

Formulace	Navážka HC [g]	Navážka základu [g]
Krém + 0,5 % HC	0,2489	49,8741
Krém + 2,0 % HC	0,9987	49,0071
Gel + 0,5 % HC	0,2501	49,7663
Gel + 2,0 % HC	1,0050	49,0331

#### 4.4 Soubor dobrovolnic

Cílem experimentu bylo zhodnocení *in vivo* účinnosti formulací s obsahem HC. Měření se zúčastnilo 9 dobrovolnic ve věku 21–45 let (průměrný věk  $27,2 \pm 8,5$ ).

Dobrovolnice byly před začátkem experimentu seznámeny s průběhem měření, poučeny o bezpečnosti a možných rizicích spojených s měřením. Vyplnily dotazník o svém zdravotním stavu (příloha P I) a podepsaly individuální informovaný souhlas (příloha P II). Dále byly poučeny, aby v průběhu experimentu nepoužívaly k mytí testované oblasti žádné kosmetické přípravky, ale pouze vodu, dále aby daná místa osušily jen mírným poklepem měkkého ručníku. V den realizace bylo dobrovolnicím vždy připomenuto, aby nevykonávaly před vlastním měřením náročnou fyzickou aktivitu a dostavily se 15 minut před jeho začátkem kvůli aklimatizaci.

#### 4.5 Organizace měření

Praktické měření účinnosti formulací s obsahem HC probíhalo ve dnech 22. 1. – 8. 2. 2019 za standardních podmínek v klimatizované laboratoři ( $T = 22,5\text{--}23,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH} = 31\text{--}33\%$ ).

Testované formulace byly nadávkovány do popsaných injekčních stříkaček, které byly uloženy do exsikátoru (Obr. 3).



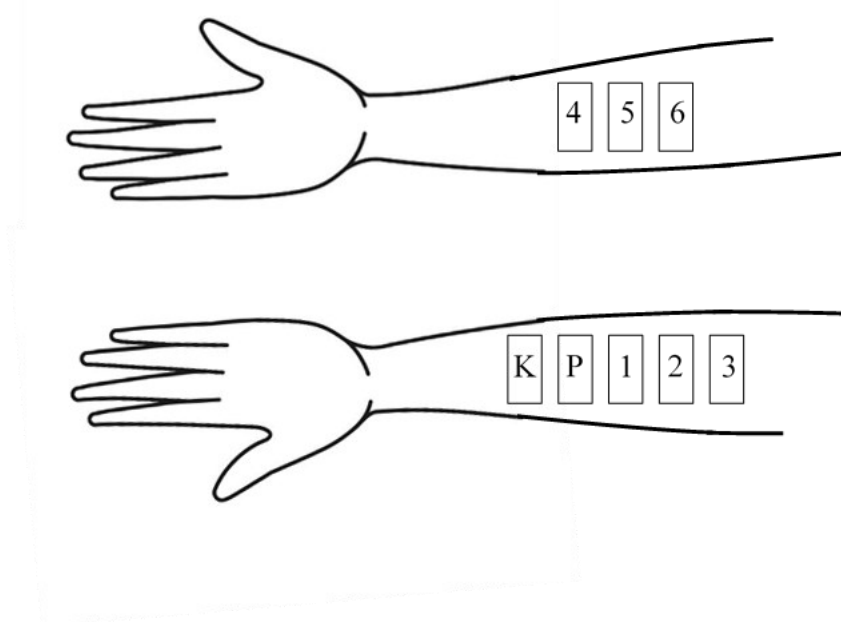
Obr. 3. Předpřipravené formulace  
v exsikátoru



Pro předúpravu (odmaštění) pokožky volární strany předloktí dobrovolnic byl použit 0,5% roztok dodecylsulfátu sodného (SDS) v 0,9% fyziologickém roztoku. Proužky filtračního papíru pro předúpravu pokožky byly nastříhány na obdélníky o velikosti 2 x 4 cm. Náplast pro zafixování připravených papírků na kůži byla nastříhána v délce cca 7 cm.

Předpřipravené proužky filtračního papíru napuštěné 0,5% roztokem SDS byly přikládány na místa volární strany předloktí dobrovolnic a zafixovány náplastí po dobu 4 hodin. Po uplynutí této doby byly odstraněny a místa jejich lokalizace byla označena lihovým fixem.

Takto předpřipravená pole (Obr. 4) byla před nanesením formulací postupně proměřena jednotlivými sondami. Sondami byly na levé ruce také zjišťovány parametry přirozeného stavu pokožky, dále v textu je toto místo prezentováno jako kontrola.



Obr. 4. Aplikační schéma (K – kontrola; P – předúprava; 1 – gel základ; 2 – gel 0,5 % HC; 3 – gel 2,0 % HC; 4 – krém základ; 5 – krém 0,5 % HC; 6 – krém 2,0 % HC)

Měření probíhalo vždy ve stejném pořadí, nejprve bylo naměřeno celkově 15 hodnot TEWL pomocí tewametru TM 300, poté 5 hodnot hydratace pokožky pomocí korneometru CM 825 a nakonec byla změřena jedna hodnota pH kožního povrchu pomocí pH metru 905.

Po dokončení tohoto úvodního měření byly na daná místa (Obr. 4) pomocí injekční stříkačky nanесeny modelové formulace v objemu 0,1 ml a pomocí plastové tyčinky pak byly rozetřeny po celé ploše označeného pole. Pro srovnávací účely bylo kromě kontroly ponecháno bez aplikované formulace i jedno z odmaštěných polí.

U všech probandů byl dodržen stejný postup – všechna měření byla opakována po 1., 2., 3., 4., 24. a 48. hodině.

#### 4.6 Zpracování naměřených dat

Veškerá naměřená data byla zpracována a statisticky vyhodnocena v programu Microsoft Office Excel (2019). Vyhodnocení získaných hodnot příslušných veličin v časech 0, 1, 2, 3, 4, 24 a 48 hodin bylo provedeno následujícím způsobem:

Hydratace – po vyloučení odlehlých hodnot Dean-Dixonovým testem byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

TEWL – z naměřených 15 hodnot bylo prvních 5 vyloučeno z důvodu vyšší relevantnosti dalších měření, eliminace chyb a vyrovnávání teploty uvnitř komůrky sondy a teploty povrchu pokožky vyznačeného místa, ze zbylých 10 hodnot byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

pH – stejně jako v případě předešlých veličin byl ze získaných hodnot vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

## 5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

Kapitola shrnuje výsledky *in vivo* testování modelových formulací (gel a krém) s 0,5 a 2% obsahem *HC*. Ve studii byl sledován vliv použitého vehikula a aktivní látky na bariérový a hydratační účinek a hodnotu pH.

Účinky formulací na vlastnosti pokožky stanovené postupy popsány v kapitolách 4.5 a 4.6 jsou prezentovány sloupcovými grafy (Obr. 5–7), které vyjadřují průměrné hodnoty včetně odchylek sledovaného parametru (TEWL, hydratace, pH) v příslušných časových intervalech. Horizontální linie umístěné v grafu prezentují průměrné hodnoty parametru monitorovaného přirozeného stavu pokožky volární strany předloktí (---) a pokožky upravené 0,5% roztokem SLS po 4 hodinách působení tohoto roztoku (—).

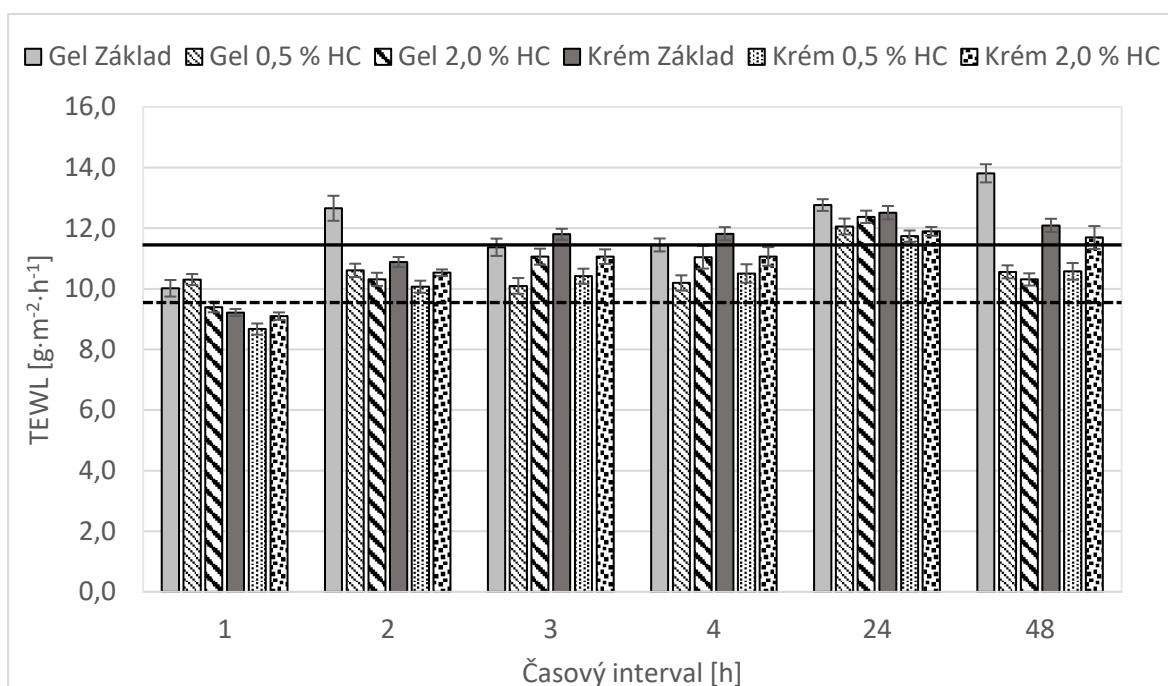
Úroveň působení studovaných formulací vůči použitým základům (gel a krém bez *HC*) doplňují Tab. 7–9.

### 5.1 Vyhodnocení měření transepidermální ztráty vody

Tato část práce shrnuje výsledky vyhodnocení vlivu formulací s obsahem *HC* na úroveň TEWL. Výsledné hodnoty TEWL se směrodatnými odchylkami za sledovaný časový interval shrnuje Obr. 5. Zhodnocení procentuálních rozdílů sledovaných formulací s obsahem *HC* vůči výchozím kosmetickým základům poskytuje Tab. 7.

Tab. 7. Změna bariérové účinnosti formulací s *HC* vůči základním formulacím

Čas [hod]	Rozdíl TEWL [%]			
	Gel 0,5 % <i>HC</i>	Gel 2,0 % <i>HC</i>	Krém 0,5 % <i>HC</i>	Krém 2,0 % <i>HC</i>
1	3,0	-6,0	-5,4	-1,1
2	-16,5	-18,9	-7,3	-3,7
3	-11,4	-2,6	-11,9	-5,9
4	-10,5	-3,5	-11,0	-5,9
24	-5,5	-3,1	-6,4	-4,8
48	-23,2	-25,4	-12,4	-3,3



Obr. 5. Vliv formulací na TEWL (kontrola ---; předúprava —)

Jak je patrné z Obr. 5, předúprava pokožky volární strany předloktí odmaštěním 0,5% roztokem SDS po dobu 4 hodin vedla ke zvýšení hodnoty TEWL. Iritací roztok byl použit z důvodu eliminování individuálních faktorů (přítomnost kožního mazu, potu atd.), tedy pro nastavení stejných výchozích podmínek.

V 1. hodině po aplikaci bylo pozorováno snížení hodnoty TEWL z pokožky, které mohlo být způsobeno vytvořením okluzivního filmu díky přítomnosti *HC* ve formulacích a nastolením reparačních mechanismů pokožky. Filtrovatelný efekt byl nejvíce patrný u gelových formulací s přídavkem *HC*.

Během dalšího sledování účinnosti všech testovaných formulací došlo k nárůstu TEWL, ale v rozsahu hodnot odpovídajících velmi dobrému či dobrému stavu pokožky dle stupnice uvedené v Tab. 3. Dalším poznatkem je snížení hodnot TEWL formulacemi s obsahem *HC* oproti formulacím základním, a to během trvání celého experimentu.

Nejvýznamnější změny byly zaznamenány po dvou hodinách působení. Gel s 0,5 % *HC* vůči gelovému základu upravoval odpařování epidermální vody o 16,5 % na hodnotu  $10,6 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ , gel s 2,0 % *HC* dokonce o 18,9 %, ( $10,3 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Taktéž krémové formulace obsahující *HC* snižovaly ztrátu vlhkosti pokožky výrazněji než krémový základ. V rámci 3. a 4. hodiny byly pozorovány podobné účinky testovaných formulací na kožní bariéru.

Hodnoty získané po 24 hodinách od aplikace patřily k těm nejvyšším, rozdíly v účinnosti mezi jednotlivými formulacemi s *HC* byly nepatrné.

K poslednímu měření došlo po 48 hodinách. Nejvyšší hodnotu v tomto případě vykazovala oblast předloktí ošetřená gelovým základem, u níž byla zjištěna i celkově nejvyšší hodnota v rámci všech časových intervalů experimentu,  $13,8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Velmi dobré výsledky byly překvapivě pozorovány u pokožky s aplikací gelových formulací s obsahem *HC*.

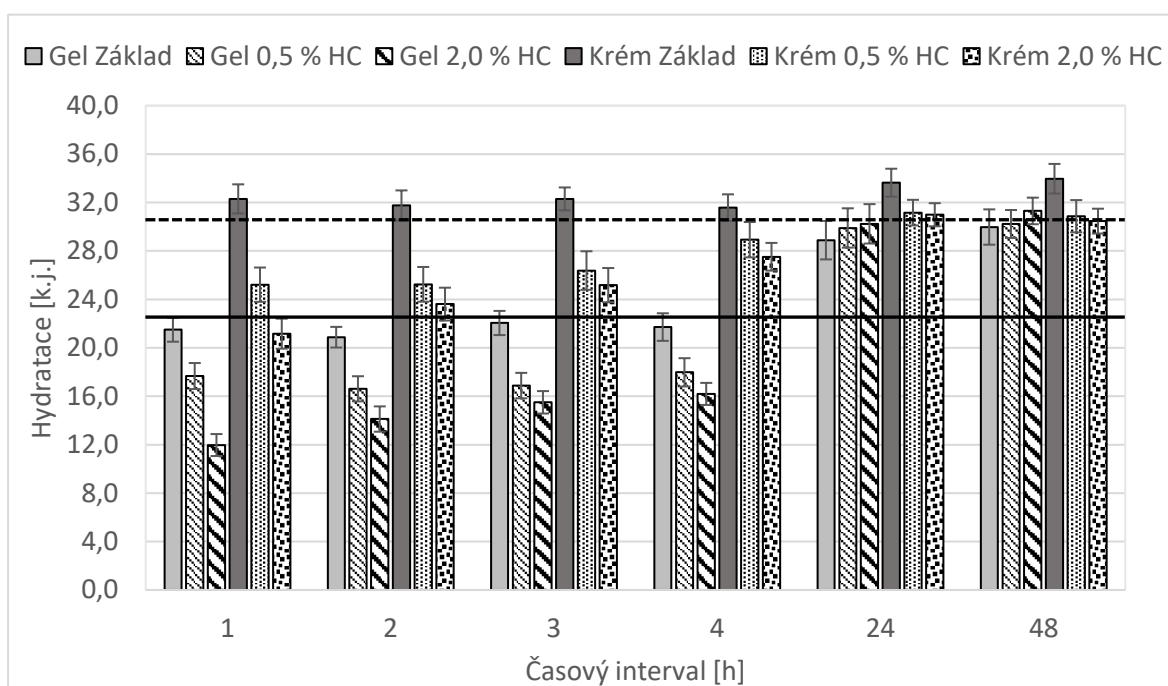
Celkově je možné říci, že obsah *HC* ve formulacích snižuje míru TEWL z pokožky. Co se týče optimálního přídavku *HC*, lepších výsledků bylo ve většině případů dosaženo u formulací s nižším obsahem *HC* – 0,5 %. Oproti kosmetickým základům bez obsahu *HC* tyto formulace snižovaly množství vody unikající z pokožky často o více než 10 %. Velmi zajímavý je zejména výsledek měření po 48 hodinách od aplikace, kdy byly u gelových formulací s obsahem 0,5 % *HC* pozorovány oproti základům hodnoty nižší o více než 20 %.

## 5.2 Vyhodnocení měření hydratačních účinků

Dále budou v práci uvedeny výsledky naměřených hodnot hydratace, jejich souhrn je ve formě aritmetických průměrů a směrodatných odchylek uveden na Obr. 6. Stejně jako v případě hodnocení TEWL byly srovnány rozdíly v účinnosti samotných kosmetických základů a formulací s obsahem *HC* aplikovaných na pokožku (Tab. 8).

Tab. 8. Změna hydratační účinnosti formulací s *HC* vůči základním formulacím

Čas [hod]	Rozdíl hydratace [%]			
	Gel 0,5 % <i>HC</i>	Gel 2,0 % <i>HC</i>	Krém 0,5 % <i>HC</i>	Krém 2,0 % <i>HC</i>
1	-17,7	-44,2	-22,0	-34,4
2	-20,6	-32,5	-20,8	-25,8
3	-23,5	-29,9	-18,3	-22,0
4	-17,1	-25,3	-8,5	-13,0
24	3,5	4,5	-7,1	-7,7
48	0,7	4,3	-9,1	-10,3



Obr. 6. Vliv formulací na hydrataci (kontrola ---; předúprava —)

Hodnota hydratace kontroly v 0. hodině byla stanovena na 30,7 k. j., předúprava pokožky roztokem SDS vedla ke snížení hodnoty hydratace pokožky na 22,6 k. j.

Hydratace zjištěná během 4 hodin od aplikace testovaných formulací ukazuje pokles hodnot oproti pokožce neošetřené. Výjimkou byla hydratace naměřená na místě s aplikací krémového základu. Přídavek *HC* měl negativní efekt na hydratační účinek formulací ve srovnání s výchozími kosmetickými základy, konkrétní změny jsou uvedeny v Tab. 8. Po 4. hodině došlo vlivem působení především krémových formulací s *HC* ke zvýšení hydratace pokožky.

Měření po 24 hodinách ukázalo nárůst hydratace u všech sledovaných míst na pokožce volární strany předloktí. Nejvyšší hydratace – 33,6 k. j. bylo dosaženo krémovým základem, naopak nejmenší míra hydratace byla pozorována u gelového základu – 28,9 k. j. V případě formulací s *HC* byla pokožka hydratována stejnoměrně bez vlivu koncentrace hydrolyzátu. U pokožky s aplikací gelových formulací s *HC* byly monitorovány vyšší hodnoty hydratace než u pokožky ošetřené pouhým gelovým základem.

Během posledního hodnoceného časového intervalu, tedy po 48. hodině byl zjištěn obdobný hydratační efekt jako po 24 hodinách působení testovaných vzorků formulací.

Přídavek *HC* ve většině případů snižoval hydratační účinek formulací. Krém a gel s obsahem 2,0 % *HC* vykazovaly obecně horší efektivitu ve vztahu k hydrataci pokožky než jejich analogy s obsahem pouze 0,5 % *HC*.

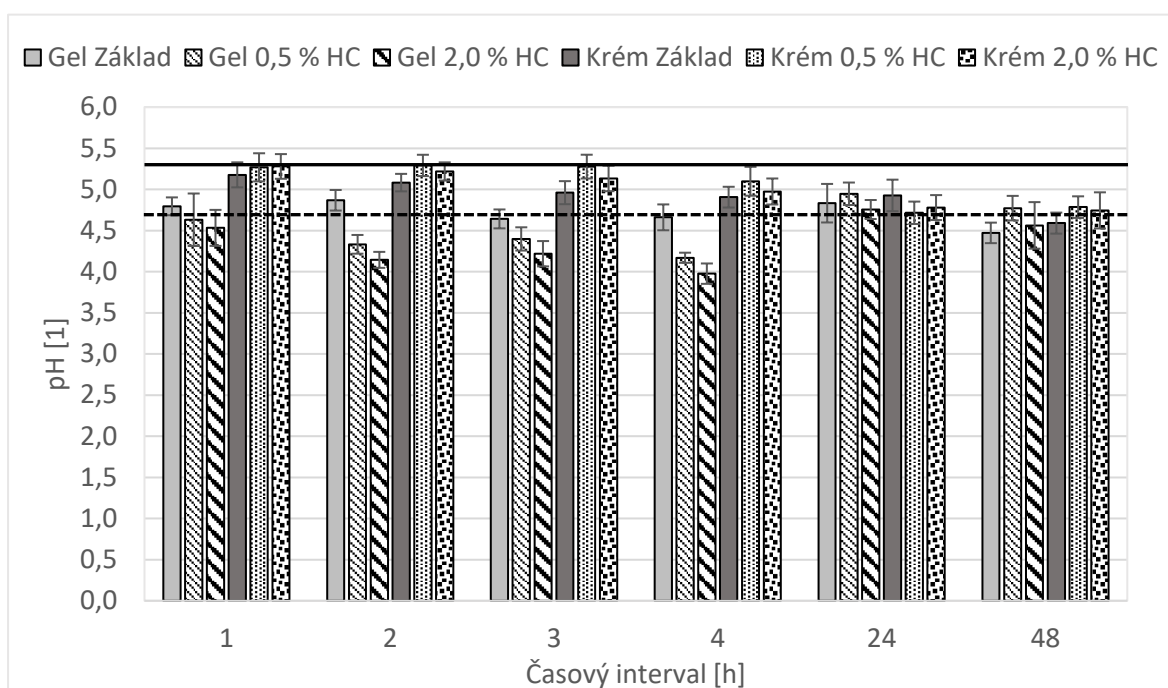
Výjimky tvořila měření provedená po 24. a 48. hodině, kdy gelové formulace s obsahem *HC* nejenže vykazovaly vyšší úroveň hydratace ve srovnání se samotným gelovým základem, ale překvapivě byla vyšší míra hydratace pozorována u gelové formulace s vyšším obsahem *HC* – 2,0 %. Je nutné ovšem podotknout, že po 48 hodinách se úroveň hydratace vracela k původním hodnotám zjištěných na začátku experimentu, jinými slovy působení aplikovaných formulací po tomto čase odeznívalo.

### 5.3 Vyhodnocení měření pH

Posledním hodnoceným parametrem bylo pH kožního povrchu. Stejně jako v případě dvou předchozích veličin byly vypočteny aritmetické průměry naměřených hodnot pH i jejich směrodatné odchylky. Grafické vyjádření je zobrazeno na Obr. 7. Rozdíly mezi pH pokožky ošetřené základní gelovou a krémovou formulací a formulacemi s *HC* shrnuje Tab. 9.

Tab. 9. Změna pH pokožky vlivem formulací s *HC* vůči základním formulacím

Čas [hod]	Rozdíl pH [%]			
	Gel 0,5 % <i>HC</i>	Gel 2,0 % <i>HC</i>	Krém 0,5 % <i>HC</i>	Krém 2,0 % <i>HC</i>
1	-4,2	-6,3	1,9	1,9
2	-12,2	-16,3	3,9	2,0
3	-4,3	-8,7	6,0	2,0
4	-10,6	-14,9	4,1	2,0
24	2,1	0,0	-4,1	-2,0
48	6,7	2,2	4,3	2,2



Obr. 7. Vliv formulací na pH pokožky (kontrola ---; předúprava —)

Výchozí hodnota pH kontrolního místa byla stanovena na 4,7. Odmaštění pokožky mělo vliv na zvýšení pH, které dosáhlo hodnoty 5,3.

Pokožka ošetřená gelovými formulacemi už během 1. hodiny měření vykazovala nižší hodnoty pH ve srovnání s jejich analogy na krémové bázi. Tento efekt byl pozorován i během 2. až 4. hodiny.

U pokožky s krémovými formulacemi došlo během 1. až 4. hodiny, na rozdíl od pokožky s nanesenými gelovými formulacemi, k mírnému nárůstu pH vůči výchozí hodnotě zjištěné na místě s krémovým základem. Nejvyšší rozdíl – 6 % byl pozorován u pokožky ošetřené krémovou formulací s 0,5 % HC ve 3. hodině.

Během 24. hodiny byly hodnoty pH na všech sledovaných místech poměrně vyrovnané a na závěr měření, tedy po 48 hodinách, byly naměřené hodnoty pH téměř na přirozené úrovni kyselosti pláště pokožky z počátku experimentu a odpovídaly fyziologicky neutrálním hodnotám uvedeným v Tab. 5.



## 6 DISKUSE

Vývoj nových kosmetických formulací je iniciován potřebou kosmetologů řešit problémy především se vznikem suché pokožky a vyvíjet tak přípravky s hydratačním či okluzivním účinkem. U zvlhčujících přísad – humektantů se velmi často setkáváme s nesprávnou interpretací mechanismu jejich účinku, a to že dodávají pokožce přímo potřebnou vlhkost. Jelikož humektanty patří mezi látky hygroskopické a tím pádem velmi snadno vážou vzdušnou vlhkost, jejich účinek tkví především v omezení množství vody unikající z pokožky, což vede k podpoření přirozené hydratace přímo z kůže [43, s. 492].

K transportu vody dochází z *dermis* směrem do *epidermis*, v důsledku jejího následovného odpařování dochází ke změně koncentrace vlhkosti. Vyšší obsah vody pozorujeme na úrovni *dermis* a směrem k povrchu klesá. Neporušené *SC* je velmi účinnou bariérou proti ztrátě nebo naopak nárůstu vlhkosti [44, s. 178].

Ze získaných hodnot vyplývá, že obsah *HC* zvyšoval bariérový účinek u všech testovaných formulací, přičemž nejvíce patrný byl tento účinek u přídatku 0,5 % *HC*. Na pokožce byl po aplikaci gelových formulací patrný okluzivní film, který bránil úniku vody z epidermálních vrstev, což způsobilo pokles hodnot TEWL. Tento výsledek se shoduje se závěry studie Berardesca a kol. [45], během které byl na 40 dobrovolnicích s citlivou pokožkou testován krém s *HC*. Po 4 týdnech lokální aplikace bylo zaznamenáno zlepšení TEWL, hydratace a textury kožního povrchu právě díky *HC*. Z krémového základu vycházeli i Xhaufaire-Uhoda a kol. [46], kteří ve své studii popisují pozitivní vliv formulace s obsahem *Collagen* a výtažku z řas na hydratační vlastnosti kosmetických formulací.

Zlepšení bariérových vlastností a zvýšení hydratace kůže bývá velmi často zmiňováno ve studiích věnovaných perorálnímu podávání kolagenu. Například Petersen a kol. [47] ve své klinické studii provedené na 22 dobrovolnicích zhodnotili účinek příjmu kyseliny ortokřemičité stabilizované mořským *HC*. Po 90 dnech bylo zaznamenáno zlepšení mechanických vlastností kůže, její textury i hydratace.

Ohara a kol. [48] se zabývali účinkem denního příjmu *HC* na úroveň hydratace pokožky. Celkem 214 dobrovolnicím bylo denně podáváno 2,5–10 g rybího *HC* a výsledky byly porovnány s kontrolní placebo skupinou. Po 4 týdnech byl u žen nad 30 let pozorován statisticky významný rozdíl v hodnotě hydratace vůči placebo skupině.

Bolke a kol. [49] zkoumali účinek tekutého doplňku stravy s obsahem kolagenního peptidu, vitamínu C a E, biotinu, zinku a výtažku z aceroly. Do této studie bylo zahrnuto celkově 72 žen ve věku 35–73 let. Po 12 týdnech bylo zaznamenáno znatelné zvýšení úrovně hydratace a elasticity a došlo také ke zjemnění celkové textury pokožky. K podobnému závěru dospěla i studie Proksche a kol. [50] provedená na 69 ženách ve věku 35–55 let. Denní příjem *HC* vedl po 8 týdnech ke značnému zvýšení elasticity pokožky.

Studie Schwartze a Parka [51] zkoumající efekt denního příjmu doplňku stravy s obsahem *HC*, kyseliny hyaluronové a chondroitin sulfátu na 26 ženách dokládá, že denní příjem tohoto doplňku po dobu 12 týdnů pozitivně ovlivňuje mikrovaskulární krevní cirkulaci v kůži, snižuje množství vrásek, redukuje suchost pokožky a zvyšuje obsah kolagenu v *dermis*. Na základě námi naměřených hodnot po 24. a 48. hodině vyplývá, že přídavek *HC* do gelového základu měl pozitivní vliv na úroveň hydratace pokožky, u krémových formulacích obsahujících *HC* tento efekt pozorován nebyl.

Pro udržení kožní bariéry je důležitá úroveň kyselosti kožního povrchu. Individuální pH pokožky závisí na mnoha faktorech, jako je endogenní vlhkost pokožky, složení apokrinního a ekrinního potu, pohlaví a věk. Nemalou měrou mohou přispívat i faktory exogenní, mezi které patří používání kosmetických přípravků. Změny pokožky nad 6,5–8 působí dráždivě na ochrannou funkci kožní bariéry ve smyslu změn v kožní mikroflóře a enzymatické aktivitě v horních vrstvách *epidermis* [52, s. 5].

Ciszek [53] studoval účinky kolagenových gelů na kůži u skupiny 49 žen. Po 20 a 60 minutách působení těchto topických aplikací byla zjištěna významná změna pH pokožky ve srovnání s jejími výchozími hodnotami (z 5,67 na 5,76). V našem případě gelové formulace s obsahem 0,5 i 2,0 % *HC* snižovaly hodnoty pH v porovnání s gelovým základem a výchozím pH pokožky (kontrola) po dobu 4 hodin od aplikace. Naopak po 24. a 48. hodině byl na místech, které byly ošetřeny gelovými formulacemi s *HC*, pozorován podobný efekt, který zmiňuje Ciszek.

Negativní působení UV záření na stav pokožky je obecně známý fakt. Tanaka a kol. [54] zhodnotili účinek denního příjmu kolagenních peptidů na stav kůže vystavené opakovanému působení UVB záření u lysích myší *in vivo*. U suplementované skupiny byla pozorována eliminace degenerativních změn kůže a rovněž nedošlo k tak významnému úbytku kolagenu typu I. Peptidy kolagenu by tedy na základě těchto výsledků mohly sloužit k potlačení UVB-indukovaného poškození kůže a photoageingu.

Polášková a kol. [55] se zabývali vlivem kosmetického vehikula (krém a gel) na hydratační účinek zvlhčujících látek. Výsledky studie provedené na 20 dobrovolnicích jsou ve shodě s poznatky námi provedené studie – vyššího hydratačního účinku bylo dosaženo při použití krémového vehikula.

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývá vlastnostmi, zdroji a možnostmi využití kolagenu a jeho hydrolyzátů v oblasti kosmetických a biomedicínských aplikací. Pozornost je věnována zejména jeho roli v topických formulacích a biologickým účinkům jeho užívání.

V praktické části byly s využitím 2 typů kosmetického základu – gel a krém připraveny modelové formulace s různým obsahem *HC*. Pomocí neinvazivních bioinženýrských metod byla na skupině dobrovolníků sledována účinnost těchto formulací ve vztahu k bariérovým vlastnostem kůže – TEWL, hydratace a pH kožního povrchu. Naměřená data byla poté zpracována a statisticky vyhodnocena.

Obsah *HC* ve formulacích snižoval míru ztráty vody z pokožky ve srovnání s použitými kosmetickými základy i vůči hodnotám odmaštění pokožky roztokem SDS. Testované formulace zamezovaly úniku vody z pokožky o více než 10 %. Nejvyšší redukce hodnoty TEWL byla pozorována 48 hodin od aplikace u přípravků s obsahem *HC* na gelové bázi, vůči gelovému základu byly naměřené hodnoty o více než 20 % nižší. Na základě získaných hodnot lze dále konstatovat, že ve většině případů bylo lepších výsledků dosaženo u formulací obsahujících 0,5 % *HC*.

Přídavek *HC* nicméně v drtivé většině případů snižoval hydratační účinek výchozích kosmetických základů, přičemž obecně horší míra efektivity ve vztahu k hydrataci pokožky byla pozorována u formulací s obsahem 2,0 % *HC*. Výjimku tvoří měření provedená po 24. a 48. hodině, kdy gelové formulace s *HC* vykazovaly vyšší úroveň hydratace ve srovnání se samotným gelovým základem. Tyto výsledky pravděpodobně souvisely se značnou redukcí ztráty vody z pokožky, která byla u těchto formulací během 48. hodiny pozorována. I když u krémových formulací s *HC* nebylo dosaženo vyšších hodnot hydratace než u výchozího krémového základu, zejména krém 0,5 % *HC* nezpůsobil tak výrazné snížení hydratace a zároveň dokázal efektivně zlepšit bariérovou ochranu pokožky.

Žádný z přípravků nenarušoval fyziologicky mírně kyselé prostředí pokožky. Nižších hodnot pH bylo dosaženo u gelových formulací, naopak krémové formulace pH pokožky mírně zvyšovaly. Přídavek *HC* měl však ve většině případů relativně malý vliv na změnu pH testované formulace. Výsledky experimentu tedy celkově potvrzují, že *HC* je účinnou kosmetickou ingrediencí, která je vhodná pro zakomponování do kosmetických přípravků určených pro zlepšení bariérové ochrany kůže související s redukcí ztráty vody z pokožky.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] PETERKOVÁ, P. a L. LAPČÍK. Kolagen – Vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chemické Listy* [online]. 2000, **94**(6), 371-379 [cit. 2019-11-17]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2501>
- [2] SIBILLA, S., M. GODFREY, S. BREWER, A. BUDH-RAJA a L. GENOVESE. An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *The Open Nutraceuticals Journal* [online]. 2015, **8**(1), 29-42 [cit. 2019-11-17]. DOI: 10.2174/1876396001508010029. ISSN 1876-3960. Dostupné z: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TONUTRAJ-8-29>
- [3] AVILA RODRÍGUEZ, M. I., L. G. RODRÍGUEZ BARROSO a M. L. SÁNCHEZ. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2018, **17**(1), 20-26 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1111/jocd.12450. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jocd.12450>
- [4] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group, 2015, 1464 s. ISBN 978-0-8153-4464-3. s. 1061–1062, 1068
- [5] MLÁDEK, M. *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu*. Praha: SNTL, 1971, 322 s, s. 25, 34–35, 39–41, 43, 45–46, 48
- [6] FRATZL, P. *Collagen: structure and mechanics*. New York: Springer, 2008, 504 s. ISBN 978-0-387-73905-2. s. 10–11, 16–17, 19–22, 24–28, 30–31
- [7] WHITFORD, D. *Proteins: structure and function*. Hoboken: J. Wiley, c2005, 542 s. ISBN 978-0471498940. s. 93–99, 289–290
- [8] BHAGWAT, P. K. a P. B. DANDGE. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2018, **15**, 43-55 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.05.005. ISSN 1878-8181. Dostupné z : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818118302147>

- [9] RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2011, **3**(1), 1-19 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978. ISSN 1943-0264. Dostupné z:  
<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a004978>
- [10] SILVIPRIYA, K., K. KUMAR, A. BHAT, B. KUMAR, A. JOHN a P. LAKSHMANAN. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2015, 123-127 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50322. ISSN 2231-3354. Dostupné z:  
[http://www.japsonline.com/abstract.php?article\\_id=1466](http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=1466)
- [11] BELLA, J., B. BRODSKY a H. M. BERMAN. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* [online]. 1995, **3**(9), 893-906 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00224-6. ISSN 0969-2126. Dostupné z:  
<http://europepmc.org/article/med/8535783>
- [12] GELSE, K. Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2003, **55**(12), 1531-1546 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002. ISSN 0169-409X. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03001820>
- [13] DEB-CHOUDHURY, S. a G. E. NORRIS. *Improved binary high performance liquid chromatography for amino acid analysis of collagens* [online]. 2005, 332-337 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z:  
[https://www.researchgate.net/publication/242419395\\_Improved\\_binary\\_high\\_performance\\_liquid\\_chromatography\\_for\\_amino\\_acid\\_analysis\\_of\\_collagens](https://www.researchgate.net/publication/242419395_Improved_binary_high_performance_liquid_chromatography_for_amino_acid_analysis_of_collagens)
- [14] FREUDENBERG, U., S. H. BEHRENS, P. B. WELZEL a kol. Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen I. *Biophysical Journal* [online]. 2007, **92**(6), 2108-2119 [cit. 2020-05-16]. DOI: 10.1529/biophysj.106.094284. ISSN 0006-3495. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349507710159>
- [15] LEE, Chi H., Anuj SINGLA a Yugyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, 221(1-2), 1-22 [cit. 2019-11-19]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00691-3. ISSN 0378-5173. Dostupné z:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006913>

- [16] SAMAD, Nur a Archana SIKARWAR. Collagen: New Dimension in Cosmetic and Healthcare. *International Journal of Biochemistry Research & Review* [online]. 2016, **14**(3), 1-8 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.9734/IJBCRR/2016/27271. ISSN 2231-086X. Dostupné z: <http://www.sciencedomain.org/abstract/16739>
- [17] ARVANITIDIS, A. a M. A. KARSDAL. Type XV Collagen. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 97-99 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/B978-0-12-809847-9.00015-5. ISBN 9780128098479. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128098479000155>
- [18] NARAYANAN, A. S., R C PAGE a J SWANSON. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor- $\beta$  in the presence of other inflammatory mediators. *Biochemical Journal* [online]. 1989, **260**(2), 463-469 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1042/bj2600463. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/260/2/463/24852/Collagen-synthesis-by-human-fibroblasts-Regulation>
- [19] BROWNE, S., D. I. ZEUGOLIS a A. PANDIT. Collagen: Finding a Solution for the Source. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2013, **19**(13-14), 1491-1494 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0721. ISSN 1937-3341. Dostupné z: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2012.0721>
- [20] ARAÚJO, Í. B. da S., T. K. A. BEZERRA, E. S. do NASCIMENTO, C. A. de A. GADELHA, T. SANTI-GADELHA a M. S. MADRUGA. Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Science and Technology* [online]. 2018, **38**(suppl 1), 167-173 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1590/fst.27517. ISSN 1678-457X. Dostupné z: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612018000500167](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612018000500167)
- [21] KUMAR, V. A., N. L. TAYLOR, A. A. JALAN, L. K. HWANG, B. K. WANG a J. D. HARTGERINK. A Nanostructured Synthetic Collagen Mimic for Hemostasis. *Biomacromolecules* [online]. 2014, **15**(4), 1484-1490 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1021/bm500091e. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm500091e>

- [22] FELICIAN, F. F., Ch. XIA, W. QI a H. XU. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2018, **15**(5) [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1002/cbdv.201700557. ISSN 1612-1872. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.201700557>
- [23] SILVA, T., J. MOREIRA-SILVA, A. MARQUES, A. DOMINGUES, Y. BAYON a R. REIS. Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Marine Drugs* [online]. 2014, **12**(12), 5881-5901 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.3390/md12125881. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/12/5881>
- [24] PARENTEAU-BAREIL, R., R. GAUVIN a F. BERTHOD. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* [online]. 2010, **3**(3), 1863-1887 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.3390/ma3031863. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/3/3/1863>
- [25] ALVES, A., A. MARQUES, E. MARTINS, T. SILVA a R. REIS. Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.3390/cosmetics4040039. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/4/4/39>
- [26] SWATSCHEK, D., W. SCHATTON, J. KELLERMANN, W. E. G. MÜLLER a J. KREUTER. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2002, **53**(1), 107-113 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1016/S0939-6411(01)00192-8. ISSN 0939-6411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641101001928>
- [27] HAYDONT, Valérie, Bruno A. BERNARD a Nicolas O. FORTUNEL. Age-related evolutions of the dermis: Clinical signs, fibroblast and extracellular matrix dynamics. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 2019, **177**, 150-156 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1016/j.mad.2018.03.006. ISSN 00476374. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637418300435>



- [28] CHAI, H.-J., J.-H. LI, H.-N. HUANG, T.-L. LI, Y.-L. CHAN, Ch.-Y. SHIAU a Ch.-J. WU. Effects of Sizes and Conformations of Fish-Scale Collagen Peptides on Facial Skin Qualities and Transdermal Penetration Efficiency. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2010, **2010**, 1-9 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1155/2010/757301. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/757301/>
- [29] YAZAKI, M., Y. ITO, M. YAMADA, S. GOULAS, S. TERAMOTO, M. NAKAYA, S. OHNO a K. YAMAGUCHI. Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(11), 2315-2322 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05679. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b05679>
- [30] RICHELLE, M., M. SABATIER, H. STEILING a G. WILLIAMSON. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *British Journal of Nutrition* [online]. 2006, **96**(2), 227-238 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1079/BJN20061817. ISSN 0007-1145. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000711450600198X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000711450600198X/type/journal_article)
- [31] WATANABE-KAMIYAMA, M., M. SHIMIZU, S. KAMIYAMA a kol. Absorption and Effectiveness of Orally Administered Low Molecular Weight Collagen Hydrolysate in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(2), 835-841 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1021/jf9031487. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9031487>
- [32] ASSERIN, J., E. LATI, T. SHIOYA a J. PRAWITT. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2015, **14**(4), 291-301 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1111/jocd.12174. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jocd.12174>

- [33] OHARA, H., S. ICHIKAWA, H. MATSUMOTO, M. AKIYAMA, N. FUJIMOTO, T. KOBAYASHI a S. TAJIMA. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *The Journal of Dermatology* [online]. 2010, **37**(4), 330-338 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2010.00827.x. ISSN 0385-2407. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1346-8138.2010.00827.x>
- [34] ZHANG, Y, T. KOUGUCHI, K. SHIMIZU, M. SATO, Y. TAKAHATA a F. MORIMATSU. Chicken Collagen Hydrolysate Reduces Proinflammatory Cytokine Production in C57BL/6.KOR-ApoE<sup>shl</sup> Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* [online]. 2010, **56**(3), 208-210 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.3177/jnsv.56.208. ISSN 0301-4800. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jnsv/56.208?from=CrossRef>
- [35] FLUHR, J. *Bioengineering of the Skin: Water and the Stratum Corneum*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005, 440 s. ISBN 978-0849314438. s. 64, 99–100, 250–252
- [36] VOEGELI, D. The Effect of Washing and Drying Practices on Skin Barrier Function. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing* [online]. 2008, **35**(1), 84-90 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1097/01.WON.0000308623.68582.d7. ISSN 1071-5754. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00152192-200801000-00017>
- [37] QASSEM, M. a P. KYRIACOU. Review of Modern Techniques for the Assessment of Skin Hydration. *Cosmetics* [online]. 2019, **6**(1), 1-28 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.3390/cosmetics6010019. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2079-9284/6/1/19>
- [38] The Tewametr TM 300: Technical charges. 2013
- [39] CONSTANTIN, M.-M., E. POENARU, C. POENARU a T. CONSTANTIN. Skin Hydration Assessment Through Modern Non-invasive Bioengineering Technologies. *Maedica* [online]. 2014, **9**(1), 33-38 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4268288/>
- [40] The Corneometr CM 825: Technical Charges. 2013

- [41] STEFANIAK, A. B., J. du PLESSIS, S. M. JOHN a kol. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: part 1. pH. *Skin Research and Technology* [online]. 2013, **19**(2), 59-68 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1111/srt.12016. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/srt.12016>
- [42] The skin-pH-metr PH 905: Technical charges 2013.
- [43] SPADA, F., T. M. BARNES a K. A. GREIVE. Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2018, **11**, 491-497 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.2147/CCID.S177697. ISSN 1178-7015. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/skin-hydration-is-significantly-increased-by-a-cream-formulated-to-mim-peer-reviewed-article-CCID>
- [44] GIOIA, F. a L. CELLENO. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. *Skin Research and Technology* [online]. 2002, **8**(3), 178-186 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1034/j.1600-0846.2002.10342.x. ISSN 0909-752X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0846.2002.10342.x>
- [45] BERARDESCA, E., E. ABRIL, M. SERIO a N. CAMELI. Effects of topical glucosaccharide and collagen tripeptide F in the treatment of sensitive atopic skin. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2009, **31**(4), 271-277 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2009.00495.x. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2009.00495.x>
- [46] XHAUFLAIRE-UHODA, E., K. FONTAINE a G. E. PIÉRARD. Kinetics of moisturizing and firming effects of cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2008, **30**(2), 131-138 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2008.00436.x. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2008.00436.x>
- [47] PETERSEN VITELLO KALIL, C. L., V. CAMPOS, S. CIGNACHI a kol. Evaluation of cutaneous rejuvenation associated with the use of ortho-silicic acid stabilized by hydrolyzed marine collagen. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2018, **17**(5), 814-820 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1111/jocd.12430. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jocd.12430>

- [48] OHARA, H., K. ITO, H. IIDA a H. MATSUMOTO. Improvement in the Moisture Content of the Stratum Corneum Following 4 Weeks of Collagen Hydrolysate Ingestion. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* [online]. 2009, **56**(3), 137-145 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.3136/nskkk.56.137. ISSN 1341-027X. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/nskkk/56.137?from=CrossRef>
- [49] BOLKE, L., G. SCHLIPPE, J. GERSS a W. VOSS. A Collagen Supplement Improves Skin Hydration, Elasticity, Roughness, and Density: Results of a Randomized, Placebo-Controlled, Blind Study. *Nutrients* [online]. 2019, **11**(10), 2494 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.3390/nu11102494. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2494>
- [50] PROKSCH, E., D. SEGGER, J. DEGWERT, M. SCHUNCK, V. ZAGUE a S. OESSER. Oral Supplementation of Specific Collagen Peptides Has Beneficial Effects on Human Skin Physiology: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2014, **27**(1), 47-55 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1159/000351376. ISSN 1660-5535. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/351376>
- [51] SCHWARTZ, S. R. a J. PARK. Ingestion of BioCell Collagen®, a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract; enhanced blood microcirculation and reduced facial aging signs. *Clinical Interventions in Aging* [online]. 2012, **2012**(7), 267-273 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.2147/CIA.S32836. ISSN 1178-1998. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/ingestion-of-biocell-collagenreg-a-novel-hydrolyzed-chicken-sternal-ca-peer-reviewed-article-CIA>
- [52] AGUIRRE-CRUZ, G., A. LEÓN-LÓPEZ, V. CRUZ-GÓMEZ, R. JIMÉNEZ-ALVARADO a G. AGUIRRE-ÁLVAREZ. Collagen Hydrolysates for Skin Protection: Oral Administration and Topical Formulation. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(2), 1-17 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.3390/antiox9020181. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/181>
- [53] CISZEK, A. Variability of skin pH after the use of different collagen gels. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2017, **16**(4), 531-536 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1111/jocd.12303. ISSN 1473-2130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jocd.12303>

- 
- [54] TANAKA, M., Y. KOYAMA a Y. NOMURA. Effects of Collagen Peptide Ingestion on UV-B-Induced Skin Damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2014, **73**(4), 930-932 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1271/bbb.80649. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.80649>
- [55] POLASKOVA, J., J. PAVLACKOVA a P. EGNER. Effect of vehicle on the performance of active moisturizing substances. *Skin Research and Technology* [online]. 2015, **21**(4), 403-412 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1111/srt.12206. ISSN 0909752X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/srt.12206>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

<i>HC</i>	<i>Hydrolyzed Collagen</i>
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
pH	Potenciál vodíku
AMK	Aminokyselina
nm	Nanometr
$M_r$	Relativní molekulová hmotnost
kDa	Kilodalton
Gly	Glycin
Pro	Prolin
Hyp	Hydroxyprolin
Hyl	Hydroxylysin
Tyr	Tyrosin
$(\text{Gly-X-Y})_n$	Repetitivní tripeptid primární struktury kolagenu
Asp	Kyselina asparagová
Glu	Kyselina glutamová
Lys	Lysin
Arg	Arginin
GAG	Glykosaminoglykan
ECM	Extracelulární matrice
FACIT	Kolageny asociované s fibrilami
MACIT	Kolageny asociované s membránami
N	Dusík
C	Uhlík
ER	Endoplazmatické retikulum
O	Kyslík

---

GA	Golgiho aparát
BSE	Bovinní spongiformní encefalopatie
KOD	Komerční označení syntetického analogu kolagenu
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
$\text{m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$	Metr čtvereční na centimetr krychlový
USD	Americký dolar
mm	Milimetr
SC	<i>Stratum corneum</i>
UV	Ultrafialové
$\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$	Nanomol na mililitr
°C	Stupeň Celsia
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad
$\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$	Gram na metr čtvereční za hodinu (jednotka TEWL)
$\mu\text{m}$	Mikrometr
k. j.	Korneometrická jednotka (jednotka hydratace)
g	Gram
$\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$	Otáček za minutu
ml	Mililitr
T	Teplota
RH	Relativní vlhkost
SDS	Sodium dodecyl sulfát
UVB	Středněvlonné záření

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Triple-helix molekuly kolagenu [3, s. 21]</i> .....	12
<i>Obr. 2. Stanice MPA 5 (zleva sonda pH metru, tewametru a korneometru)</i> .....	37
<i>Obr. 3. Předpřipravené formulace v exsikátoru</i> .....	40
<i>Obr. 4. Aplikační schéma (K – kontrola; P – předúprava; 1 – gel základ; 2 – gel 0,5 % HC; 3 – gel 2,0 % HC; 4 – krém základ; 5 – krém 0,5 % HC; 6 – krém 2,0 % HC)</i> .....	41
<i>Obr. 5. Vliv formulací na TEWL (kontrola ---; předúprava —)</i> .....	44
<i>Obr. 6. Vliv formulací na hydrataci (kontrola ---; předúprava —)</i> .....	46
<i>Obr. 7. Vliv formulací na pH pokožky (kontrola ---; předúprava —)</i> .....	48



**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Průměrné zastoupení AMK v kolagenu typu I<sup>1</sup> [13, s. 336] .....</i>	13
<i>Tab. 2. Přehled rodin kolagenů, včetně jejich zástupců a výskytu [3, s. 23], [16, s. 3] .....</i>	19
<i>Tab. 3. Stupnice pro interpretaci hodnot tewametru [38] .....</i>	38
<i>Tab. 4. Stupnice korneometru [40] .....</i>	38
<i>Tab. 5. Stupnice pH metru [42] .....</i>	39
<i>Tab. 6. Navážky jednotlivých složek pro přípravu formulací .....</i>	39
<i>Tab. 7. Změna bariérové účinnosti formulací s HC vůči základním formulacím .....</i>	43
<i>Tab. 8. Změna hydratační účinnosti formulací s HC vůči základním formulacím .....</i>	45
<i>Tab. 9. Změna pH pokožky vlivem formulací s HC vůči základním formulacím .....</i>	47

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha P I A: Dotazník pro účastníka měření

Příloha P I B: Dotazník pro účastníka měření

Příloha P 2: Individuální informovaný souhlas

# PŘÍLOHA P I A: DOTAZNÍK PRO ÚČASTNÍKA MĚŘENÍ

## Dotazník pro účastníka měření

Jméno:

Příjmení:

Věk:

Pohlaví:

Kód pokusné 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 znamínka, jiné vady kůže v místě testu			----- -----
zarudnutí kůže po slunění nebo z jiného důvodu v místě testu			----- -----
astma vyžadující denní příjem léků			----- -----
jiné chronické respirační onemocnění			
diabetes vyžadující léčbu inzulínem			----- -----
onemocnění imunitního systému			

### 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			----- ----- ---

## PŘÍLOHA P I B: DOTAZNÍK PRO ÚČASTNÍKA MĚŘENÍ

### Pouze pro ženy

<b>Jste:</b>	<b>ano</b>	<b>ne</b>
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 2: INDIVIDUÁLNÍ INFORMOVANÝ SOUHLAS**

## **Individuální informovaný souhlas**

V rámci realizace experimentální části bakalářské práce budou na Vaši kůži aplikovány různé testované výrobky. U všech výrobků byla posouzena dokumentace z hlediska jejich bezpečnosti. Všechny známé informace o zkoumaných výrobcích dovolují testování na dobrovolnících.

### **Cíl studie**

Cílem práce je zjistit odezvu Vaší pokožky na aplikovaný přípravek pomocí exaktně změřených veličin.

### **Podmínky účasti**

Před zahájením vlastního experimentu je nutno vyplnit dotazník. 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 experimentu.

### **Metodika testu**

Experiment bude prováděn studentem bakalářského studijního programu pod dohledem kvalifikovaných pracovníků Ústavu technologie tuků, detergentů a kosmetiky. Plánovaná práce zahrnuje jednorázový otevřený kožní test (epikutánní test na vnitřní straně předloktí).

### **Odstoupení z laboratorní práce**

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

### **Rizika nepříjemnosti**

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