

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA JAZBEC

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA JAZBEC

**VREDNOTENJE VPLIVA KREM NA OSNOVI  
EMULZIJSKEGA GELA ALI LAMELARNIH TEKOČIH  
KRISTALOV NA BARIERNO FUNKCIJO KOŽE**

**IMPACT OF CREAMS BASED ON AN EMULSION GEL OR  
LAMELLAR LIQUID CRYSTALS ON SKIN BARRIER  
FUNCTION**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.

## **Zahvala**

*Mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin se zahvaljujem za vso prijaznost ter strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici asist. dr. Mirjam Gosenca za pomoč pri eksperimentalnem delu, strokovne nasvete pri pisanju diplomskega dela, ter za prijaznost in potrpežljivost.*

*Posebna zahvala prostovoljkam Tjaši J., Heleni, Samri, Elizabeti, Kimm, Tini, Astrid, Mateji, Ani, Špeli G., Tjaši G., Djellzi, Saši, Tinki, Anji, Urški, Timeji, Andreji, Barbari, Špeli Č., Špeli K. in Ajdi za sodelovanje pri izvedbi ekperimentalnega dela.*

*Zahvalila bi se direktorici Oddelka za razvoj in kakovost Ilirija d.d., mag. Zdenki Koren za ponujeno možnost in sodelovanje. Hvala tudi Nataši Simonič, dipl. kozm., za vso deljeno znanje in pomoč pri delu.*

*Hvala Maji, Petri, Nilsu in Barbari za vso pomoč pri pregledu in lektoriranju.*

*Posebna zahvala staršem, sestri in najbližjim, ki so me tekom študija ter pisanja diplomskega dela spodbujali in brezpogojno verjeli vame ter mi stali ob strani. Navsezadnje hvala tudi prijateljem za vse spodbudne besede.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.

Anja Jazbec

## VSEBINA

POVZETEK .....	I
ABSTRACT .....	II
SEZNAM OKRAJŠAV .....	III
1 UVOD.....	1
1.1 KOŽA .....	1
1.2 NEINVAZIVNE METODE ZA MERJENJE TEWL IN HIDRATACIJE KOŽE.....	2
1.2.1 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL .....	3
1.3 VLAŽILCI.....	4
1.3.1 OKLUZIVI.....	4
1.3.2 HUMEKTANTI.....	5
1.3.3 EMOLIENTI.....	5
1.3.4 PROTEINSKE SESTAVINE ZA POMLADITEV (ANTI-AGE PROTEINSKE SESTAVINE).....	6
1.4 TEKOČI KRISTALI.....	7
2 NAMEN DELA.....	10
3 MATERIALI IN METODE .....	11
3.1 MATERIALI .....	11
3.2 METODE.....	13
3.2.1 IZDELAVA KREM .....	13
3.2.2 FIZIKALNO-KEMIJSKO VREDNOTENJE KREM .....	14
3.2.3 <i>IN VIVO</i> ŠTUDIJA DOLOČANJA HIDRATACIJE KOŽE IN TEWL.....	15
3.2.3.1 Preliminarno testiranje.....	15
3.2.3.2 Izvedba <i>in vivo</i> študije.....	16
3.2.3.3. Statistična analiza rezultatov .....	18
3.2.4 IZVEDBA MERITEV HIDRATACIJE KOŽE.....	18
3.2.5 IZVEDBA MERITEV TRANSEPIDERMALNE IZGUBE VODE .....	21
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	23
4.1 FIZIKALNO VREDNOTENJE KREM .....	23
4.2 <i>IN VIVO</i> ŠTUDIJA: VREDNOTENJE PO NANOSU KREM .....	25
4.2.1 PRELIMINARNO TESTIRANJE .....	26
4.2.2 <i>IN VIVO</i> ŠTUDIJA.....	29
4.3 REZULTATI HIDRATACIJE KOŽE.....	30

4.3.1 HIDRATACIJA KOŽE NA NOTRANJI STRANI PODLAKTI.....	30
4.3.2 HIDRATACIJA KOŽE NA ČELU.....	36
4.4 REZULTATI MERITEV TEWL.....	39
5 SKLEP.....	44
6 LITERATURA .....	46

## POVZETEK

Uporaba negovalnih kozmetičnih izdelkov je ključnega pomena za ohranjanje zdrave kože. Pri tem sta najbolj pomembna dejavnika primerna hidratiranost kože in primerna vrednost transepidermalne izgube vode. Na ta dva dejavnika najlažje vplivamo z uporabo vlažilcev v kozmetičnih izdelkih. Poleg uporabe specifičnih sestavin pa lahko na lastnosti kože vpliva tudi notranja struktura kozmetičnega izdelka, na primer lamelarni tekoči kristali, saj je njihova struktura podobna intercelularnim lipidom v roženi plasti kože.

V diplomskem delu smo izvedli *in vivo* študijo vpliva štirih krem na hidratacijo kože in vrednosti transepidermalne izgube vode. Vse štiri testirane kreme smo izdelali v laboratoriju podjetja Ilirija d.d., in sicer sta bili strukturi dveh krem na osnovi emulzijskega gela, medtem ko sta bili strukturi ostalih dveh krem na osnovi lamelarnih tekočih kristalov. Najprej smo na eni testni osebi izvedli preliminarno testiranje, s katerim smo določili področje merjenja, velikost testiranega območja, optimalno količino nanosa kreme in optimalne časovne točke merjenja hidratacije kože in transepidermalne izgube vode. Na podlagi ugotovitev preliminarne študije smo nato izvedli *in vivo* študijo na 20 prostovoljkah, kjer smo na notranji strani podlakti izvajali meritve hidratacije kože in transepidermalne izgube vode, na čelu pa le meritve hidratacije kože. Hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode smo na vsakem označenem področju izmerili pred nanosom štirih testiranih krem, meritve smo nato ponovili še 30 minut in 2 uri po nanosu krem. Pri 5 prostovoljkah pa smo meritve hidratacije kože in transepidermalne izgube vode ponovili še po 3 dnevni uporabi testiranih krem dvakrat na dan (zjutraj in zvečer).

Na podlagi rezultatov *in vivo* študije smo ugotovili, da so vse štiri testirane kreme povečale hidratacijo kože, niso pa imele vpliva na transepidermalno izgubo vode. Učinek hidratacije kože se je med posameznimi kremami razlikoval zaradi različnih sestavin v kremi. Kljub temu, da sta kremi na osnovi emulzijskega gela najbolj povečali hidratacijo kože, smo potrdili, da tudi kreme, ki vsebujejo lamelarne tekoče kristale, povečujejo hidratacijo kože. Hidratacija kože se je najbolj povečala po nanosu krem na zelo suho kožo, nekoliko manj po nanosu na suho kožo in najmanj v primeru dobro hidratirane kože.

**Ključne besede:** barierna funkcija kože, transepidermalna izguba vode, hidratacija kože, lamelarni tekoči kristali, klasični emulzijski gel

## ABSTRACT

The use of skin care cosmetic products is crucial for maintaining healthy skin. The most important factors of healthy skin are skin hydration and transepidermal water loss. These two factors are most easily influenced by the use of moisturizers in cosmetic products. In addition, skin properties can also be influenced by the specific inner structure of the used cosmetic product, for example by lamellar liquid crystals due to the similar structure of the intercellular lipids in the stratum corneum.

In the thesis we performed an *in vivo* study of the impact of four creams on skin hydration and transepidermal water loss. All four creams were prepared in the laboratory of company Ilirija d.d. Two creams were based on an emulsion gel and the other two were based on lamellar liquid crystals. First a preliminary testing was performed on one volunteer. With the preliminary testing the measuring area on the body, the size of the tested area, the optimum amount of applied cream and the optimal time point of the measurement of skin hydration and transepidermal water loss were determined. Based on the observations of the preliminary testing, an *in vivo* study was performed on 20 volunteers. Measurements of skin hydration and transepidermal water loss were performed on the inside part of the forearm and on the forehead only skin hydration was measured. First, skin hydration and transepidermal water loss were measured before the application of four tested creams, then 30 minutes and 2 hours after the application of creams the measurements were repeated. The measurements of skin hydration and transepidermal water loss were repeated on 5 volunteers after 3 days of having used tested creams twice a day (in the morning and in the evening).

Based on the results of the *in vivo* study we discovered that all four tested creams increased skin hydration, however no effect was observed in case of transepidermal water loss. The effect of skin hydration differs between the tested creams because of the different ingredients in the creams. Despite the fact that creams based on an emulsion gel increased the skin hydration the most, we also confirmed that the creams based on lamellar liquid crystals also increased skin hydration. Skin hydration increased the most after applying tested creams on very dry skin, a little less when it was applied on dry skin and at least after applying creams on well hydrated skin.

**Key words:** skin barrier function, transepidermal water loss, skin hydration, lamellar liquid crystalline phases, classic emulsion gel

**SEZNAM OKRAJŠAV**

AE	arbitrarne enote
KAU	kozmetično aktivna učinkovina
O/V	olje v vodi
PAS	površinsko aktivna snov
PEG	polietilen glikol
RH	relativna vlažnost v zraku
T	temperatura
TEWL	transepidermalna izguba vode
V/O	voda v olju
V/O/V	voda v olju v vodi

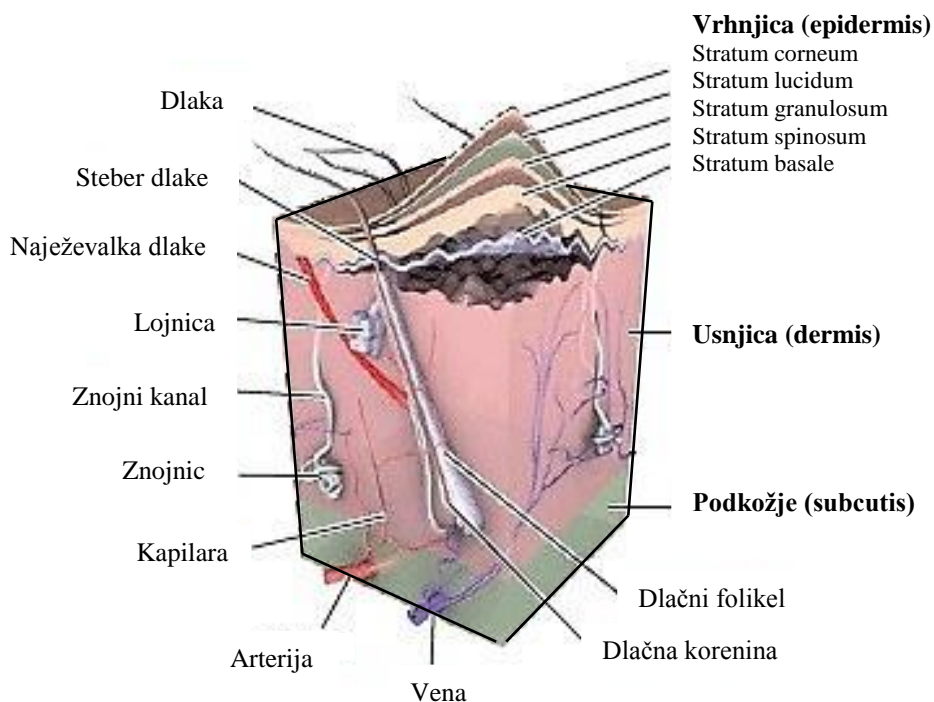


## 1 UVOD

Glavni namen in funkcija krem za nego kože je, da izboljšajo izgled kože. Izgled kože je odvisen od vsebnosti vlage v roženi plasti ter od kvalitete in kvantitete površinskih lipidov kože. Za vrednotenje barierne funkcije kože je pomembna tudi vsebnost vlage v roženi plasti. Zgolj dobro hidratirana koža lahko opravlja vse funkcije kože. Vsebnost vode v roženi plasti je rezultat ravnovesja med oskrbo z vodo iz notranjih plasti kože in izhlapevanjem vode iz površine kože. Prav tako se po skoraj celotni površini telesa nahajajo lojnice, ki na dan proizvedejo 1-5 g kompleksne mešanice lipidov (1, 2).

### 1.1 KOŽA

Koža je največji človeški organ in predstavlja prvo obrambno linijo telesa pred bakterijami in virusi, ohranja ravnovesje tekočin ter pomaga uravnati telesno temperaturo (3). Sestavljena je iz treh plasti, iz vrhnjice (epidermis), usnjice (dermis) in podkožja (subcutis). Vrhnjica je sestavljena iz petih plasti, in sicer iz bazalne plasti (stratum basale), trnaste plasti (stratum spinosum), zrnaste plasti (stratum granulosum), svetleče plasti (stratum lucidum) in rožene plasti (stratum corneum) (slika 1) (4).



**Slika 1:** Shema kože z označenimi posameznimi plastmi in kožnimi priveski (5).

Rožena plast je zunanja plast vrhnjice in je večinoma sestavljena iz korneocitov (6). Med korneociti se nahajajo sestavine naravnega vlažilnega faktorja, ki je mešanica higroskopskih molekul, katere vzdržujejo vlago v korneocitih in tako ohranjajo hidratacijo rožene plasti kože. Aminokisliline in 2-pirolidonkarboksilna kislina so higroskopske komponente naravnega vlažilnega faktorja in so zelo učinkoviti humektanti, saj so med korneociti prisotne v veliki koncentraciji, ostale sestavine naravnega vlažilnega faktorja pa so še laktati, sečnina, mineralne soli, sladkorji, organske kisline, peptidi in urokonska kislina (7). Rožena plast kože preprečuje izhlapevanje vode iz kože ali penetracijo snovi in alergenov iz okolja v kožo, prav tako pa nudi tudi mehansko zaščito koži (4, 8). Za ohranjanje prijetnega občutka in zdrave kože mora biti vsebnost vode v roženi plasti višja od 10 %. Idealna vsebnost vode v roženi plasti je med 13 in 20 %. Če vsebnost vode pade pod 10 %, je encimska funkcija kože, ki je potrebna za normalno deskvamacijo, oslABLJENA, kar vodi v adhezijo korneocitov in akumulacijo korneocitov na površino kože. Te spremembe sovpadajo s suhostjo kože, grobostjo in luščenjem in največkrat nastanejo kot posledica zunanjih dejavnikov, kot so nizka vlažnost v okolju, izpostavljenost vetru in soncu, ali notranjih, kot so kronološko staranje, genetika in hormoni (7, 9).

## **1.2 NEINVAZIVNE METODE ZA MERJENJE TEWL IN HIDRATACIJE KOŽE**

Rožena plast kože sicer predstavlja učinkovito bariero pred pretiranim izhlapevanjem vode iz kože, vendar pa iz zdrave kože vseeno izhlapeva majhen delež vode, ki mu pravimo TEWL oz. transepidermalna izguba vode (pasivna izguba vode) (6). TEWL predstavlja izhlapevanje vode iz rožene plasti kože. Komercialno dostopne aparature, s katerimi lahko merimo TEWL, so Aquaflux, AS-CT1, DermaLab, Evaporimeter EP1 in EP2, H4300\*, Tewameter TM210 in TM300, VapoMeter SWL3 (8).

TEWL je pomemben dejavnik, ki podaja informacije o barierni funkciji kože. Poleg TEWL je za vrednotenje barierne funkcije kože pomembna tudi vrednost hidratacije kože (8). Nižje vrednosti TEWL in visoke vrednosti hidratacije kože so značilnosti zdrave, nepoškodovane barierne funkcije kože (10). Znano je, da je povišana vrednost TEWL pri poškodovani koži velikokrat v povezavi z nizko hidratacijo rožene plasti (8).

Hidratacija kože predstavlja količino vode v roženi plasti in jo izmerimo posredno; električne lastnosti kože se namreč spreminjajo v odvisnosti od vsebnosti vode v roženi plasti. Če kožo primerjamo z uporom, ki je v preprostem električnem modelu vzporedno vezan s kondenzatorjem, lahko ugotovimo, da tako upornost kot tudi kapacitivnost prispevata k skupni impedanci oz. uporu na površini kože. Hidratacija kože je tako lahko izmerjena kot impedanca kože, upornost kože ali prevodnost kože. Aparature, ki so komercialno dostopne in temeljijo na omenjenih načinih merjenja, so ASA-M2, Corneometer CM820 in 825, Dermalab Moisture Unit, MoistureMeter SC, Nova Dermal Phase Meter DPM 9003 in Skicon 200 in 200 EX (8).

Poleg naprave, s katero merimo hidratacijo kože ali TEWL, je v prostoru, kjer izvajamo meritve, za zagotavljanje primernih pogojev merjenja, potrebno imeti tudi termometer za preverjanje temperature (T) in napravo za merjenje relativne vlažnosti (RH) (8). S pomočjo teh dodatnih naprav nadzorujemo aklimatizacijo testirancev. Pred izvedbo meritev se morajo testiranci namreč aklimatizirati na razmere v prostoru, saj na ta način zagotovimo, da se koža adaptira na pogoje prostora, s tem pa se izognemo napakam pri merjenju, ki so posledica neustrezne temperature v prostoru oz. so posledica znojenja. Aklimatizacija naj bi trajala vsaj 15 do 30 minut pri sobni temperaturi 20-22 °C in RH 40-60 % (8). Vlažnost kože se povečuje z vlažnostjo v okolju in z višjo temperaturo v prostoru. Če je v okolju višja vlažnost, iz rožene plasti voda težje izhlapeva, s tem pa je koža bolj navlažena (3). Zaradi navedenih dejstev je aklimatizacija ključnega pomena pri izvajanju *in vivo* študije.

### **1.2.1 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA HIDRATACIJO KOŽE IN TEWL**

Endogeni faktorji, ki vplivajo na vrednosti hidratacije kože in TEWL, so starost, narodnost, anatomsko mesto, temperatura kože, potenje, cirkadiani ritem in zdravje kože. Eksogeni faktorji, ki vplivajo na vrednosti hidratacije kože in TEWL, so umivanje kože, topila in površinsko aktivne snovi (PAS), okluzija, poškodovana koža, pa tudi kofein in kajenje. Okoljski dejavniki, ki vplivajo na vrednosti hidratacije kože in TEWL, pa so kroženje zraka v prostoru, temperatura zraka, relativna vlažnost v okolju, direktna svetloba ter letni čas, v katerem izvajamo meritve (8).

Vrednosti TEWL varirajo glede na anatomsko mesto merjenja, saj je na različnih področjih

telesa drugačna mišična sestava, ožilje in toničnost kože. Vrednosti TEWL so najvišje na dlani. Prav tako je vrednost TEWL na notranji strani podlakti najvišja blizu zapestja in komolca, saj so na teh področjih žile bližje površini kože. Blizu zapestja so tudi koščice, ki prav tako vplivajo na izmerjene vrednosti TEWL. Sonda se mora namreč pri izvajanju meritev prilegati koži in če izvajamo meritve preblizu zapestja prileganje ni dobro (8).

Različno anatomsko mesto ima tudi velik vpliv na hidratacijo kože. Najvišje vrednosti hidratacije kože zaznamo na čelu in na dlani, najnižje vrednosti hidratacije kože pa so na območju trebuha, stegna in na spodnjem delu nog. Najvišja hidratacija kože naj bi bila na področjih pregiba (npr. pazduhe) ali na mestih z veliko ekrinih žlez (npr. čelo), medtem ko je na lobanji izmerjena najnižja vrednost hidratacije kože. Tako kot pri TEWL se tudi meritve hidratacije kože razlikuje glede na mesto merjenja na notranji strani podlakti (8).

### **1.3 VLAŽILCI**

Primerna hidratacija kože oz. vzdrževanje vlage v koži je ključnega pomena za ohranjanje zdrave kože, zato so vlažilci pomemben del osnovne nege kože (7, 11). Poznamo štiri večje razrede vlažilcev: okluzivi, humektanti, emolienti in proteinske sestavine za pomladitev (anti-age proteinske sestavine) (6).

#### **1.3.1 OKLUZIVI**

Okluzivi delujejo tako, da tvorijo hidrofobno plast na površini kože, s tem pa naredijo dodatno bariero pred izhlapevanjem vode iz kože. Okluzivi so najbolj pogosti tip vlažilcev, ki so uporabljeni v kozmetičnih izdelkih. Značilno za okluzive je, da na koži lahko pustijo masten občutek, vendar so med vlažilci vseeno najbolj učinkoviti, saj naj bi zmanjšali TEWL tudi za 99 % (6).

V kozmetičnih izdelkih sta največkrat uporabljena okluziva vazelin in dimetikon, ostali okluzivi pa so še mineralno olje, parafin in skvalen. Prav tako med okluzive prištevamo tudi rastlinske maščobe, kot je kokosovo maslo, in živalske maščobe, kot je lanolin, ter tudi polihidroksi alkohole, estre, rastlinske voske, fosfolipide, sterole in silikone (12).

Vazelin, zelo pogosto uporabljen v formulacijah, je sicer primarno okluziv, vendar ima v formulacijah tudi vlogo emolienta, saj zapolni prostore med luščecimi korneociti ter

ohranja kožo gladko in mehko. Je hipoalergen, nekomedogen in preprečuje nastanek in pojavljanje aken (6).

Dimetikon je drugi najbolj uporabljen vlažilec v kozmetičnih izdelkih. Prav tako kot vazelin je tudi dimetikon hipoalergen, nekomedogen in preprečuje nastanek aken. Uvrščamo ga med »oil-free«  
vlažilce, torej vlažilce, ki ne vsebujejo olja. Prav tako kot vazelin lahko dimetikon deluje kot emolient (6).

### **1.3.2 HUMEKTANTI**

Humektanti so, glede na pogostost uporabe, druga največja skupina vlažilcev, in sicer povečajo hidratacijo kože na način, da pritegnejo vodo v roženo plast kože iz usnjice in vrhnjice, hkrati pa so sposobni vezati vodo tudi iz okolja (6, 12). Za razliko od okluzivov so humektanti higroskopne snovi, ki imajo hidrofilne skupine (najpogosteje hidroksilne skupine), in so sposobni nase vezati molekule vode iz svoje okolice (12). Primeri humektantov: hidrokisi kisline, propilenglikol, urea, natrijev laktat, sorbitol in pirolidon karboksilna kislina (6, 12).

Glicerol oz. glicerol je najbolj znan in največkrat uporabljen humektant. Vpliva na hidratacijo kože še dolgo potem, ko na koži ni več prisoten. Učinek je posledica njegovega vpliva na regulacijo vodnih kanalov v koži, natančneje v vrhnjici, ki jim pravimo tudi akvaporini. Hara in sodelavci so ugotovili, da akvaporini transgenih miši, katerim primanjkuje vode oz. glicerola, ne morejo transportirati glicerola iz vrhnjice, zato pride do povečane hidratacije rožene plasti in znižane vrednosti glicerola. Choi s sodelavci pa je potrdil, da slednje velja tudi pri ljudeh (6, 7).

Kreme, ki vsebujejo zgolj humektante, povečajo hidratacijo kože tako, da pritegnejo vodo v roženo plast. Da povečamo sam učinek hidratacije kože, humektante ponavadi uporabimo skupaj z okluzivi (12).

### **1.3.3 EMOLIENTI**

Emolienti izboljšajo videz kože in njeno teksturo s tem, da zapolnijo prostore med korneociti. Koža je zato po nanosu emolientov gladka in mehka ter ima boljši izgled. S tem, ko povečajo hidratacijo kože, pa poskrbijo, da je koža bolj voljna. Podobno kot okluzivi tudi emolienti na površini kože naredijo okluzivni film, ki preprečuje izhlapevanje

vode iz globljih plasti kože, vrhnjici pa omogoča, da se sama rehidrira. Nekateri emolienti vsebujejo esencialne maščobne kisline, ki jih najdemo v različnih naravnih oljih (6, 13). Snovi, ki so dobri emolienti, vsebujejo alkohole in estre. Primeri alkoholov, ki mehčajo kožo in je pri tem ne izsušijo, so oktildodekanol, heksildodekanol in oleilalkohol. Primeri estrov, ki jih vsebujejo dobri emolienti, pa so oleil, oleat in oktilstearat, PEG-7, glicerol, kokoat, miristilmiristat, izopropilmiristat in stearylizononat (12).

#### **1.3.4 PROTEINSKE SESTAVINE ZA POMLADITEV (ANTI-AGE PROTEINSKE SESTAVINE)**

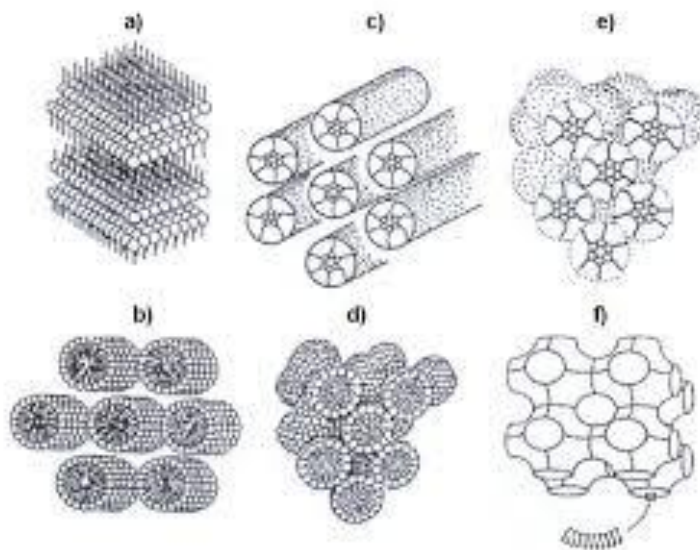
Proteinske sestavine za pomladitev so sposobne dopolniti esencialne proteine v koži. Kolagen, keratin in elastin so kožni proteini, ki jih pogosto najdemo kot sestavine za pomladitev. Ti proteini so relativno veliki, zato težka prehajajo v roženo plast kože. Kljub temu, da večinoma ne prodrejo do rožene plasti, pa imajo podobno vlogo kot emolienti in izboljšajo izgled kože s tem, da naredijo film in zgladijo kožo ter zapolnijo manjše gubice (6).

V okviru študije, ki sta jo izvedla Moldovan in Ciortea, so preučevali vpliv emolientov (parafina, tekočega parafina in vazelina) in humektantov (sečnine, glicerola in alantoina) na hidracijo kože in vrednosti TEWL. Želela sta ovrednotiti vpliv treh različnih formulacij na hidracijo kože in na barierno funkcijo kože po enkratni uporabi krem. Med seboj sta primerjala tri kreme, in sicer prva krema je vsebovala emoliente (parafin, parafinsko olje in vazelin), druga formulacija je vsebovala humektante (urea, glicerol in alantoin). Obe formulaciji sta bili O/V emulziji. Tretja krema pa je bila multipla emulzija (V/O/V) in je vsebovala tako emoliente (parafinsko olje) kot tudi humektante (urea in glicerol). Kljub temu, da v študiji niso podane dejanske vrednosti, sta dokazala oz. zaključila, da je najmanjši vpliv na hidracijo kože v primeru formulacije, ki je vsebovala le emoliente. Čeprav emolienti vplivajo na hidracijo kože na ta način, da zmanjšajo izhlapevanje vode iz površine kože, je njihova glavna naloga povečanje fleksibilnosti kože in izboljšanje gladkosti kože, to pa je verjetno razlog za majhen vpliv emolientov na hidracijo kože. Formulacija, ki je vsebovala le humektante, je v primerjavi s formulacijo, ki je vsebovala samo emoliente, bolj povečala hidracijo kože. Vgrajena humektanta sta namreč nase vezala vodo iz notranjih plasti kože (iz usnjice v vrhnjico) oz. sta vodo

absorbirala iz okolja, hidratacija kože je bila zaradi tega najvišja takoj po nanosu kreme. Vrednosti hidratacije kože sicer niso podane, je pa navedeno, da se je hidratacija najbolj povečala v primeru formulacije, ki je vsebovala tako emoliente kot tudi humektante, prav tako se je stopnja hidratacije ohranila daljše časovno obdobje do 4 ure, kolikor je bila tudi zadnja točka testiranja. Zaključila sta, da kreme najbolj vplivajo na hidratacijo kože, ko je v kremi prisotna kombinacija emolientov in humektantov (1).

## 1.4 TEKOČI KRISTALI

Poleg sestavin kozmetičnih izdelkov, ki vplivajo na hidratacijo kože in TEWL, pa na ta dva parametra lahko vpliva tudi notranja struktura nosilnega sistema, kot so na primer lamelarni tekoči kristali. Le-ti imajo strukturo, podobno urejenosti intercelularnim lipidom v roženi plasti, ki je najbolj učinkovita pri povečanju vlage v koži in za zagotavljanje zdrave kože (14). Sistemi z lamelarnimi tekočimi kristali postajajo čedalje bolj uporabljani v kozmetični industriji. Tekoče kristale tvorijo površinsko aktivne snovi (PAS), natančneje njihovi hidrati ali solvati, ob prisotnosti vodne in/ali oljne faze (15). Tekoči kristali predstavljajo vmesno stanje snovi med trdnim in tekočim, saj imajo tako lastnosti trdne snovi (dvolomnost, anizotropnost, mehanska stabilnost in urejenost) kot tekočine (tok). Tekoče kristale glede na nastanek delimo na liotropne in termotropne. Za oba tipa molekul je značilna anizotropnost, kar pomeni, da imajo molekule gibljive stranske verige in rigidni osrednji del. Liotropni tekoči kristali nastanejo z dodajanjem topila trdni snovi. Liotropni tekoči kristali se urejajo v tri različne strukture, in sicer v lamelarne, kubične ali heksagonalne (slika 2). V katero strukturo se bodo uredili, je odvisno od oblike hidratiranih molekul PAS. Heksagonalne strukture nastanejo, kadar je koncentracija PAS 30-50 % v širokem temperaturnem območju. Lamelarne faze nastanejo pri višjih koncentracijah PAS kot heksagonalne faze. Kadar pride do nastanka lamelarnih faz, viskoznost izdelka drastično pade, če jo primerjamo z viskoznostjo izdelka, v katerem so prisotne heksagonalne faze. Lamelarne faze nastanejo v najvišjem temperaturnem in koncentracijskem območju. Kubične faze so izotropne in zaradi tega ne izkazujejo dvolomnosti. Zanje je značilna visoka viskoznost, ki je posledica tridimenzionalne ureditve agregatov (16).



**Slika 2:** Primeri struktur liotropnih tekočih kristalov: a) heksagonalna; b) inverzna heksagonalna; c) lamelarna; d) kubična tip I; e) inverzna kubična tip IV; f) kubična tip II

Tekoči kristali imajo veliko prednosti za uporabo na koži, zlasti liotropni tekoči kristali z lamelarno strukturo. So enostavni za izdelavo, imajo veliko sposobnost solubilizacije in so termodinamsko stabilni. Strukturno so podobni medceličnim lipidom v vrhnjici, s čimer omogočajo vključitev vode v hidrofilna področja dvoslojev. V primerjavi s hidrofilnimi emulzijami tako povečajo hidratacijo kože in zmanjšajo izhlapevanje vode (16). Vpliv krem na hidratacijo kože je raziskoval Iwai s sodelavci, in sicer primerjali so vpliv kreme s strukturo lamelarnih tekočih kristalov in vpliv kreme s klasično emulzijo na lastnosti kože. Zaradi prisotnih lamelarnih tekočih kristalov v kremi so predvidevali, da bo učinek na hidratacijo kože po uporabi teh krem večji. Testirali so tri kreme, prva krema je bila V/O emulzija, druga O/V, tretja krema pa je vsebovala lamelarne tekoče kristale. Vse tri kreme so vsebovale psevdo-ceramide, stearinsko kislino, holesterol, tekoči izoparafin, glicerol in vodo. Krema, ki je vsebovala lamelarne tekoče kristale, in O/V emulzija sta imeli enako sestavo, medtem ko sta O/V in V/O emulziji vsebovali različne PAS. Pri emulziji O/V so pri raziskavah opazili, da je voda iz zunanje faze takoj povečala hidratacijo kože, tako da le-ta po nanosu ni bila več suha. Po uporabi emulzije V/O pa so ugotovili, da ima le-ta šibek okluzivni učinek. Krema, ki je vsebovala lamelarne tekoče kristale, pa je imela učinek obeh emulzij O/V in V/O. Hidratacija kože se je povečala enako kot pri O/V emulziji, hkrati pa je imela krema enak okluzivni efekt kot V/O emulzija. Zaključili so, da je krema, ki vsebuje lamelarne tekoče kristale, primerna za nanos na kožo, ki je suha in luskasta, saj nudi zadostno oskrbo z vodo takoj po nanosu. Po uporabi kreme s tekočimi



kristali se je koži ponovno vrnila vlaga, gube pa so izginile, ko se je koža ponovno hidratirala na normalno raven. Zaključili so, da izdelki s strukturo lamelarnih tekočih kristalov povečujejo hidratacijo kože in posledično izboljšajo videz kože (14).

Zaradi vseh zgoraj naštetih lastnosti so tekoči kristali pogosta sestavina kozmetičnih in dermalnih izdelkov z vlažilnim delovanjem. Na koži puščajo prijeten občutek in imajo ugodno konsistenco, prav tako pa so tudi zelo pomembni za stabilizacijo hidrofilnih emulzij in krem. Vsebujejo namreč presežek PAS in zaradi tega okrog kapljic notranje faze nastanejo področja tekočih kristalov. Zaradi tega pojava je gibanje kapljic omejeno, poveča pa se tudi viskoznost, kar posledično poveča fizikalno stabilnost sistema (16).

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ovrednotiti *in vivo* učinek štirih krem, ki se razlikujejo glede na notranjo strukturo, in sicer sta dve kremi klasična emulzijska gela, medtem ko imata dve strukturo lamelarnih tekočih kristalov. Preučevali bomo vpliv in učinek krem na hidratacijo kože in transepidermalno izgubo vode (TEWL).

Testirane kreme bomo izdelali v laboratoriju podjetja Ilirija d.d. ter jih fizikalno-kemijsko ovrednotili. Izvedli bomo obremenilni test (centrifugiranje), določili pH vrednost in viskoznost ter kreme ovrednotili pod polarizacijskim mikroskopom.

V okviru preliminarne študije vrednotenja *in vivo* učinka na koži bomo optimizirali področje/mesto ter površino nanosa, količino nanosa kreme in čas meritev. Na podlagi rezultatov preliminarne testiranja bomo izvedli *in vivo* študijo v kontroliranih pogojih na 20-ih prostovoljkah. S pomočjo Corneometra<sup>®</sup> CM 825 in Tewametra<sup>®</sup> TM 300 bomo izvedli meritve hidratacije kože in TEWL vnaprej določen čas po nanosu krem. Rezultate bomo nadalje ovrednotili v treh različnih skupinah glede na tip kože oziroma glede na bazalne vrednosti hidratacije kože.

V okviru diplomskega dela želimo ugotoviti, kako testirane kreme vplivajo na hidratacijo kože ter na vrednosti TEWL. Glavni poudarek je ugotoviti, kako se spreminjajo omenjeni parametri glede na notranjo strukturo krem.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

V laboratoriju podjetja Ilirija d.d. smo izdelali 4 različne kreme (označene krema A, B, C, D). Strukturi dveh krem (A in B) sta bili na osnovi emulzijskega gela, medtem ko sta bili strukturi ostalih dveh krem (C in D) na osnovi lamelarnih tekočih kristalov.

V preglednicah I, II in III so podane sestavine testiranih krem s pripadajočo vlogo in deležem posamezne sestavine v formulaciji. Z oranžno barvo so označeni emolienti, s svetlo modro barvo pa vlažilci.

**Preglednica I:** Sestavine kreme A

KREMA A	VLOGA SESTAVIN	% V IZDELKU
<b>LIPOFILNA FAZA</b>		<b>42</b>
Stearinska kislina	O/V emulgator	0-1
Poligliceril-3 metilglukoza distearat	O/V emulgator	1-3
Glicerilstearat	O/V emulgator	3-10
Cetearilalkohol, natrijev cetearilsulfat	O/V emulgator	1-3
Natrijev stearoilglutamat	O/V emulgator	0-1
Dimetikon	Emolient	1-3
Ciklopentasiloksan (in) dimetikon krosopolimer	Silikon, emolient	1-3
Saharoznipolistearat, hidrogeniran poliizobutan, koko-kaprilat	O/V emulgator, vlažilec	1-3
<i>Macadamia ternifolia seed oil</i>	Emolient	1-3
<i>Persea gratissima oil</i>	Emolient	1-3
<i>Mangifera indica seed butter</i>	Emolient	1-3
Etilheksilstearat	Emolient	1-3
Polisorbat 60	O/V emulgator, PAS	1-3
<b>HIDROFILNA FAZA</b>		<b>31</b>
Voda	Hidrofilna faza	Do 100
Butilenglikol	Vlažilec	3-10
Glicerol	Vlažilec	3-10
Metilglucet-10	Vlažilec	1-3
Dinatrijev EDTA	Organski kelator kovinskih ionov	0-1
Mlečna kislina	Vlažilec, uravnavanje pH	0-1
<b>POLIMERI</b>		<b>3</b>
Natrijev poliakrilat	Povečanje viskoznosti	0-1
Amonijev akriloidimetiltaurat/VP kopolimer	Povečanje viskoznosti	0-1
Poliakrilamid (in) C13-14 izoparafin (in) lauret-7	Povečanje viskoznosti	0-1
<b>KAU IN PARFUMI</b>		<b>24</b>
<i>Saponaria pumila callus culture extract</i> (in) izomalt (in) lecitin	Vitalizacija celic, anti-age učinek	1-3

Fenoksietanol, benzilalkohol, kalijev sorbat, tokoferol	Mikrobiološka stabilizacija	0-1
Parfum	Dišava	0-1
Saharid izomerat	Vlažilec	1-3
Hidrolizirani pšenični proteini	Vlaženje kože, površinsko zapolni gube	1-3
Etoksidiglikol, propilenglikol, butilenglikol, <i>Chamomilla recutita flower extract</i>	Pomirja razdraženo kožo	1-3
Propilenglikol, <i>Calendula officinalis extract</i>	Pomirja razdraženo kožo in poveča celjenje ran	1-3
Propilenglikol, <i>Aloe Barbadensis extract</i>	Pomirja razdraženo kožo	1-3
<i>Echinacea purpurea extract</i> , glicerol	Protivnetno delovanje	1-3
<i>Helianthus annuus</i> (sončnica) seed oil (in) <i>Rosmarinus officinalis</i> (rožmarin) leaf extract	Antioksidant, anti-mikrobno in protivnetno delovanje	0-1

### Preglednica II: Sestavine kreme B

KREMA B	VLOGA SESTAVIN	% V IZDELKU
<b>LIPOFILNA FAZA</b>		<b>35</b>
Dikaprilil karbonat	Emolient	1-3
Ciklopentasiloksan	Silikon, emolient	1-3
<i>Prunus armeniaca kernel oil</i>	Emolient	1-3
<i>Simmondsia chinensis oil</i>	Emolient	1-3
Kaprilni/kapriinski trigliceridi	Emolient	1-3
Cetearilizononat	Emolient	3-10
Cetilalkohol	Emolient, O/V emulgator	0-1
Dimetikon	Silikon, emolient	1-3
Glicerilstearat	O/V emulgator	0-1
Stearilalkohol	Stabilizator emulzij, surfaktant	0-1
Stearinska kislina	O/V emulgator, surfaktant	0-1
PEG-100 stearat, glicerilstearat	O/V emulgator	1-3
<b>HIDROFILNA FAZA</b>		<b>44</b>
Voda	Hidrofilna faza	Do 100
Glicerol	Vlažilec	3-10
Butilenglikol	Vlažilec	1-3
Dinatrijev EDTA	Organski kelator kovinskih ionov	0-1
Poloksamer 184	PAS	0-1
<b>POLIMERI</b>		<b>3</b>
Natrijev poliakrilat	Povečanje viskoznosti	0-1
Amonijev akriloildimetiltaurat/VP kopolimer	Povečanje viskoznosti	0-1
Hidroksipropilmetilceluloza	Povečanje viskoznosti	0-1
<b>KAU IN PARFUMI</b>		<b>18</b>
<i>Crocus chrysanthus bulb extract</i> (in) <i>Acacia Senegal gum</i>	Anti-age učinek	1-3
Natrijev hialuronat	Vlaženje kože, poveča elastičnost kože	1-3
Saharid izomerat	Vlažilec	1-3
Ektoin	Vlažilec	0-1
Fenoksietanol, decilenglikol 1,2-heksadiol	Konzervans	1-3

Propilenglikol, <i>Calendula officinalis extract</i>	Pomirja razdraženo kožo in poveča celjenje ran	0-1
Propilenglikol, <i>Aloe Barbadensis extract</i>	Pomirja razdraženo kožo	0-1
Hidrolizirani pšenični proteini	Vlaženje kože, površinsko zapolni gube	0-1
<i>Helianthus annuus</i> (sončnica) <i>seed oil</i> (in) <i>Rosmarinus officinalis</i> (rožmarin) <i>leaf extract</i>	Antioksidant, anti-mikrobno in protivnetno delovanje	0-1
Parfum	Dišava	0-1

**Preglednica III:** Sestavine kreme C in kreme D

KREMA C, D	VLOGA SESTAVIN	% V IZDELKU
<b>LIPOFILNA FAZA</b>		<b>59</b>
Cetearilalkohol, kokoglukoizid	O/V emulgator	1-3
* Arahidilalkohol, behenilalkohol, arahidilglukoizid	O/V emulgator, promotor lamelarnih faz	3-10
** C14-22 alkohol, C12-20 alkilglukoizid		
Cetearilalkohol	Reguliranje viskoznosti	1-3
Dimetikon	Silikon, emolient	1-3
Skvalen	Emolient, okluziv	3-10
Cetearilizononanoat	Emolient	10-30
<b>HIDROFILNA FAZA</b>		<b>36</b>
Voda	Hidrofilna faza	Do 100
Dinatrijev EDTA	Organski kelator kovinskih ionov	0-1
<b>POLIMER</b>		<b>1</b>
Amonijev akriloidimetiltaurat/VP kopolimer	Povečanje viskoznosti	0-1
<b>NA T OBCUTLJIVE SESTAVINE</b>		<b>4</b>
Fenoksietanol, decilenglikol, 1, 2-heksadiol	Konzervans	1-3
Butilhidroksitoluen	Antioksidant	0-1

\* Sestavina kreme C

\*\* Sestavina kreme D

## 3.2 METODE

### 3.2.1 IZDELAVA KREM

#### Krema A in krema B

Kremi A in B smo izdelali po enakem postopku, in sicer smo v čašo natehtali vse sestavine lipofilne faze (preglednica I in II) in sestavine na kuhalniku segreti na 80 °C. V drugo čašo smo natehtali vse sestavine hidrofilne faze (preglednica I in II) in jih prav tako na kuhalniku segreti na 80 °C. Nato smo hidrofilno fazo počasi dodajali lipofilnim sestavinam ob konstantnem mešanju na mešalu. V dobljeno zmes smo nato dodali še polimere

(preglednica I in II). Ko sta se kremi ohladili na približno 38 °C, smo vgradili še KAU in parfume, saj so le-ti občutljivi na višjo temperaturo. Kremi smo mešali do ohladitve ter pustili 24 ur, da sta se stabilizirali. Nato smo jima izmerili pH vrednost in viskoznost ter izvedli obremenilni test.

#### Krema C in krema D

Kremi C in D smo prav tako izdelali po enakem postopku, in sicer smo v čašo natehtali vse sestavine lipofilne faze (preglednica III) in sestavine na kuhalniku segreli na 85 °C. V drugo čašo smo natehtali sestavine hidrofilne faze (preglednica III) in jih prav tako na kuhalniku segreli na 85 °C. Nato smo hidrofilno fazo počasi dodajali lipofilnim sestavinam ob konstantnem mešanju na mešalu. V dobljeno zmes smo nato dodali še polimer (preglednica III). Ko sta se kremi ohladili na približno 40 °C, smo vgradili še antioksidant in konzervans, saj sta le-ta občutljiva na visoko temperaturo. Kremi smo mešali do ohladitve ter pustili 24 ur, da sta se kremi stabilizirali, nato smo jima izmerili pH vrednost in viskoznost ter izvedli obremenilni test.

### **3.2.2 FIZIKALNO-KEMIJSKO VREDNOTENJE KREM**

Izdelane kreme smo pustili 24 ur, da so se stabilizirale, nakar smo izvedli osnovno fizikalno-kemijsko vrednotenje: obremenilni test, meritve pH vrednosti krem in viskoznosti, pri čemer smo sledili osnovnemu protokolu testiranja, kot ga izvajajo na Iliriji d.d. za vse izdelane poltrdne kozmetične izdelke. Izdelane kreme smo ovrednotili tudi pod polarizacijskim mikroskopom.

#### Obremenilni test

Obremenilni test je preliminarni test, s katerim preverimo fizikalno stabilnost izdelanih formulacij. V ta namen smo v posamezno centrifugirko natančno natehtali okrog 3 g posamezne kreme ter s centrifugo (Hettich Universal 32R, Velika Britanija) vzorce centrifugirali 10 minut na 5000 obratih na minuto pri sobni T.

#### Merjenje pH

Izdelanim kremam smo s pH metrom (Mettler Toledo MP220, Singapore) neposredno izmerili pH vrednosti pri temperaturi 25 °C.

### Meritve viskoznosti

Viskoznost vzorcev smo izmerili z rotacijskim viskozimetrom (Brookfieldov viskozimeter, Brookfield engineering laboratories, U.S.A). Naprava meri viskoznost vzorca z vretenom, ki se z določeno hitrostjo vrti v posodi z vzorcem. Uporabili smo vreteno RVT-D, meritve smo izvedli pri hitrosti 10 rpm ter izmerjene vrednosti pomnožili z ustreznim koeficientom, da smo dobili viskoznost kreme. Za posamezen vzorec smo izdelali eno meritev pri sobni T.

### Določanje strukture tekočih kristalov

Izdelanim kremam smo s polarizacijskim mikroskopom (Physica MCR 301 reometer, Anton Paar, Graz, Austria) določili notranjo strukturo pri 20× povečavi.

## **3.2.3 IN VIVO ŠTUDIJA DOLOČANJA HIDRATACIJE KOŽE IN TEWL**

V okviru *in vivo* študije določanja hidratacije kože in TEWL smo najprej izvedli preliminarno testiranje na eni prostovoljki z namenom določiti področja meritev ter velikost testiranega območja, optimalno količino nanosa kreme in časovne točke meritev hidratacije kože ter TEWL. Na podlagi rezultatov, dobljenih s preliminarnim testiranjem, smo potem izdelali načrt za izvedbo *in vivo* študije na 20-ih prostovoljkah.

### **3.2.3.1 Preliminarno testiranje**

V preliminarnem testiranju je sodelovala ena testna oseba ženskega spola, starosti 22 let. Pred izvedbo meritev je potekala aklimatizacija 30 minut; na ta način smo zagotovili, da se je koža adaptirala na pogoje prostora ( $T = 25,1 \pm 0,75$  °C,  $RH = 55,9 \pm 7$  %), in da se je oseba umirila, zato je aklimatizacija ključnega pomena pri izvajanju *in vivo* študije.

### Področje merjenja

Hidratacijo kože in TEWL smo izmerili na notranji strani podlakti, na čelu, bradi in licu. Na podlagi dobljenih rezultatov smo določili področje izvajanja meritev.

### Količina nanosa

Optimalno količino nanosa smo določili tako, da smo na testno področje na notranji strani

podlakti nanесли različne količine krem in določili, katera količina kreme je optimalna za nanos, da se krema lepo razmaže in vpije v kožo.

#### Časovne točke meritev

Optimalne časovne točke meritev hidratacije kože in TEWL smo določili tako, da smo vsako kremo nanесли na testna področja na notranji strani podlakti in izmerili posamezne parametre v časovnem razmiku do 5 ur po nanosu. Meritve smo izvajali vsakih 10 minut in na podlagi izvedenih meritev določili optimalne časovne točke meritev. Najprej smo izmerili vrednosti TEWL in nato še vrednosti hidratacije kože. Meritev TEWL z odprto celico namreč nima vpliva na kožo, prav tako je meritev TEWL bolj občutljiva in bi lahko prišlo do napačnih rezultatov, če bi pred meritvami vrednosti TEWL izmerili hidratacijo kože. Prav tako smo za posamezne kreme izmerili hidratacijo kože in TEWL tudi v daljšem časovnem obdobju, in sicer po 1, 3, 7 in 10-tih dneh vsakodnevnne uporabe krem zjutraj in zvečer. Na podlagi teh rezultatov smo nato določili optimalno časovno točko meritev hidratacije kože in TEWL po daljšem časovnem obdobju uporabe krem.

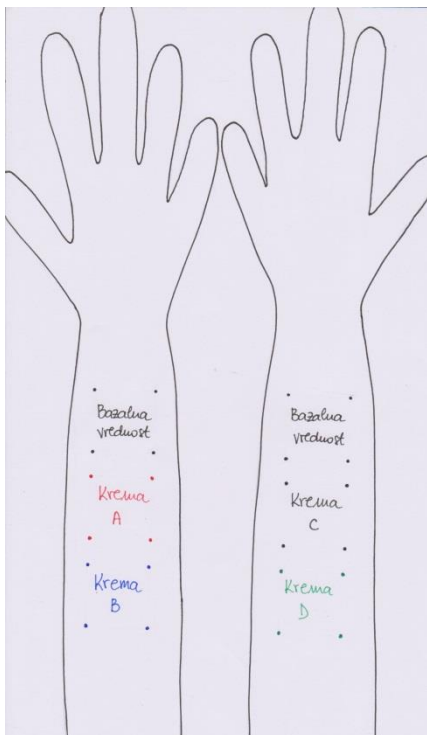
#### **3.2.3.2 Izvedba *in vivo* študije**

*In vivo* študijo smo izvedli na 20 prostovoljkah starosti od 19 do 24 let, s povprečno starostjo 22 let in 10 mesecev s standardnim odklonom 1 leto. Prostovoljkam je bilo naročeno, da en večer pred testiranjem na notranjo stran podlakti ne nanašajo kozmetičnih izdelkov za čiščenje ali nego kože, in da si čelo umijejo samo z vodo ter naj ne uporabljajo kozmetičnega izdelka za nego obraza. Prostovoljkam, ki so prišle na meritve v dopoldanskem oz. popoldanskem času, je bilo naročeno, naj zjutraj oz. minimalno dve uri pred meritvami ne pijejo kave in ne kadijo, saj ti dejavniki vplivajo na vrednosti hidratacije kože in TEWL (8). Testiranke so bile pred meritvijo v prostoru za aklimatizacijo najmanj 30 minut; na ta način zagotovimo, da se koža adaptira na pogoje prostora, da se oseba umiri in da na meritev ne vpliva potenje in drugi dejavniki. *In vivo* študijo smo izvajali v laboratoriju pod kontroliranimi pogoji ( $T=25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $RH=55 \pm 7 \text{ } \%$ ).

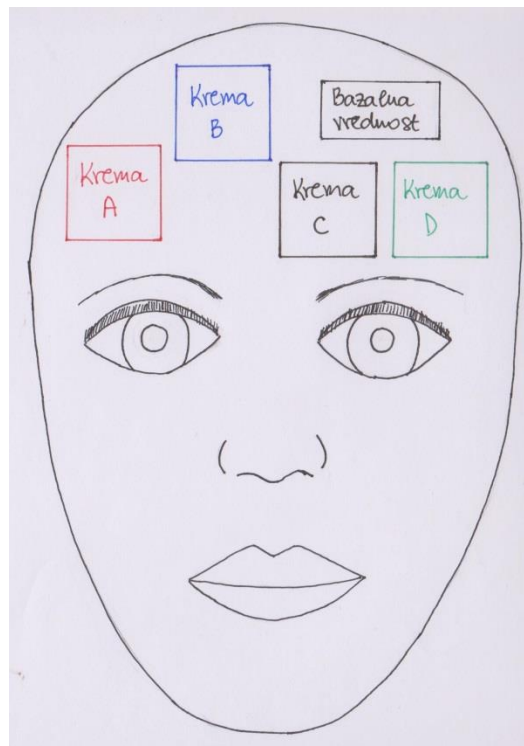
Prostovoljkam smo na notranjo stran podlakti z alkoholnim flomastrom s štirimi pikicami označili področja merjenja, in sicer za kremi A in B na levi roki in za kremi C in D na desni roki (slika 3). Na vsaki roki pa smo označili tudi področje, kjer smo izmerili bazalne



vrednosti. Na sredini čela smo jim naredili samo pikico, ki je služila za orientacijo pri pravilni namestitvi šablone (slika 4).



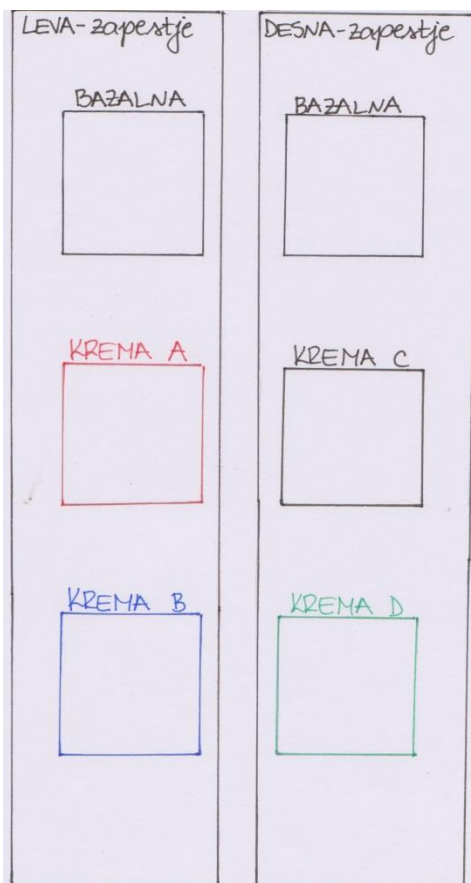
**Slika 3:** Področja merjenja na notranji strani podlakti.



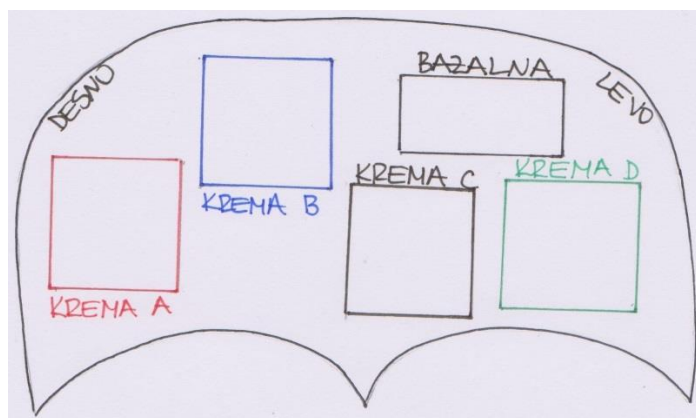
**Slika 4:** Področja merjenja na čelu.

Po 30 minutni aklimatizaciji smo prostovoljkam na označenih območjih izmerili bazalne vrednosti, in sicer vedno najprej TEWL in nato še hidratacijo kože. Nato smo na ustrezna področja nanесли kreme, in sicer na notranjo stran podlakti približno 60 mg (površina kvadratka = 12,25 cm<sup>2</sup>), na ustrezna področja na čelu pa približno 30 mg (površina kvadratka = 7,29 cm<sup>2</sup>), in jo razmazali s 50-imi krožnimi gibi. Krema je bila na ta način enakomerno nanešena in nanos ni bil predebel. 30 minut po nanosu krem smo izmerili TEWL in hidratacijo kože, meritev smo ponovili še 2 uri po nanosu krem.

Dodatno smo testirali še dolgotrajni vpliv uporabe krem, in sicer na petih prostovoljkah. Krema so prostovoljke uporabljale 3 dni, zjutraj in zvečer, na dan predvidenih ponovnih meritev pa jih niso uporabile. Prostovoljkam smo pripravili šablone (slika 5 in slika 6), s pomočjo katerih so lažje izvedle nanašanje krem na določeno področje, prav tako smo jim pripravili tabelo, v kateri so za namen časovne kontrole vnašale podatke o doslednem nanašanju krem (slika 7). Tekom teh dni niso smele uporabljati ostalih kozmetičnih izdelkov na področjih meritev (podlakt in čelo).



**Slika 5:** Šablona za meritve na notranji strani podlakti.



**Slika 6:** Šablona za meritve na čelu.

Kinua - 7.7.2015 - 10.7.2015 (meritev torek in petek)

	TOREK		SREDA		ČETRTEK	
	Zvečer	Zjutraj	Zvečer	Zjutraj	Zvečer	Zjutraj
KREMA A	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓
KREMA B	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓
KREMA C	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓
KREMA D	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓	ROKA ✓ ČELO ✓

**Slika 7:** Primer tabele, v kateri so testiranke označevale podatke o pravočasnosti nanašanja krem.

### 3.2.3.3. Statistična analiza rezultatov

Da bi ugotovili, če imajo testirane kreme signifikanten vpliv na hidracijo kože in TEWL v določenih časovnih intervalih, smo rezultate statistično analizirali. Z F-testom smo preverili podobnost varianc, nato pa smo izvedli dvostranski Studentov T-test neodvisnih vzorcev. Eksperimentalno dobljene vrednosti hidracije kože in TEWL po nanosu vseh štirih testiranih krem smo primerjali s stopnjo tveganja  $\alpha = 0,05$ . V primeru, ko je bila stopnja tveganja manjša od 0,05, opredelimo spremembe hidracije oz. TEWL kot statistično značilne, v primeru, ko je bila stopnja tveganja večja od 0,05, pa spremembe opredelimo kot statistično zanemarljive.

### 3.2.4 IZVEDBA MERITEV HIDRACIJE KOŽE

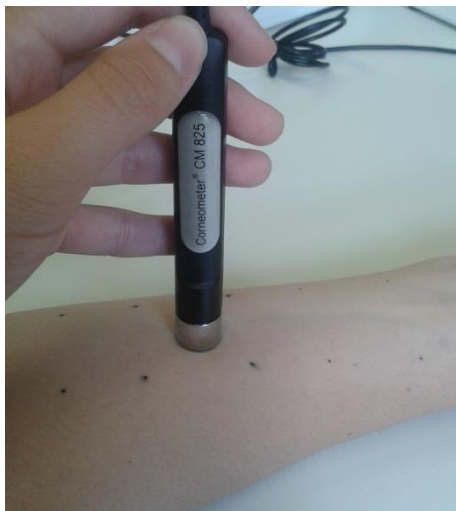
Meritve hidracije kože smo izvedli s Corneometrom® CM 825 (Couraga+ Khazaka electronic GmbH, Köln, Nemčija), ki omogoča hitre, natančne in ponovljive meritve.

Meritve hidratacije kože temeljijo na metodi kapacitivnosti dielektrika, ki ga v tem primeru predstavlja koža. Merilni kondenzator kaže spremembe kapacitivnosti glede na vsebnost vlage v koži. Natančneje, zlate žice v sondi so pokrite s stekleno ploščo, ki preprečuje trenutno prevodnost v vzorcu. Električno polje se med žicama izmenično razvija, in sicer ena žica kopiči presežek elektronov (negativen naboj), druga pa njihovo pomanjkanje (pozitiven naboj). Električno polje med meritvijo prodre v prvo plast kože in posredno tako določimo kapacitivnost (2).

Prednosti korneometra:

1. Na merjenje kapacitivnosti ne vplivajo kemične snovi ali soli proizvodov, ki se uporabljajo na koži.
2. Globina penetracije električnega polja je zelo majhna, tako da se izmeri le hidratacija na površini kože.
3. Sonda je temperaturno stabilna.
4. Čas merjenja je zelo kratek (1 sekunda na meritev), tako da ne pride do učinka okluzije, ki bi lahko vplival na rezultat.
5. Konstanten, ampak nizek pritisk sonde na kožo, omogoča natančne in ponovljive meritve, ki ne vplivajo na kožo.
6. Sonda je lahka in zato omogoča enostavno rokovanje.
7. Sonda ima majhno merilno glavico, tako da lahko meritve izvedemo tudi na zelo majhnih delih telesa, kot so npr. ustnice in ušesa (2).

Pri izvajanju meritev moramo biti pozorni, da vzdržujemo konstantne pogoje (T in RH). Optimalni pogoji so 20 °C in 40-60 % RH, meritev prav tako ne izvajamo pod direktno umetno ali sončno svetlobo. Sondo postavimo vertikalno na ustrezno področje in je ne premikamo med meritvijo (slika 8). Če je možno, meritve izvajamo na koži brez dlak ali pa področje pobrijemo. Glavo sonde moramo očistiti po vsaki meritvi (2).



**Slika 8:** Primer meritve s korneometrom.

Paziti moramo, da meritve ne izvajamo zaporedno v prekratnem času na istem področju kože, saj lahko pride do okluzije, posledično se voda, ki bi sicer izhlapela v procesu TEWL, zadrži pod sondo in dobimo lažne višje vrednosti. Meritve zato izvedemo v različnih točkah znotraj testiranega področja oz. počakamo vsaj 5 sekund med posameznimi meritvami, v kolikor jih izvedemo na istem mestu (2).

Prav tako moramo biti pozorni, da meritve ne izvajamo takoj po nanosu kozmetičnega izdelka oz. preden se le-ta vpije v kožo, saj bi na ta način izmerili vsebnost vode v izdelku in ne hidracije kože (2).

Vrednosti hidracije kože, podane v preglednici IV, veljajo za zdravo in nepoškodovano kožo pri normalnih sobnih pogojih ( $T=20\text{ °C}$  in  $RH=40-60\%$ ). Vrednosti so podane v arbitrarnih enotah (AE) in lahko varirajo glede na vplive okolja (temperatura, relativna vlažnost, letni čas, ...) (2).

**Preglednica IV:** Interpretacija rezultatov hidracije kože, izmerjene z Corneometrom<sup>®</sup> CM 825

	Notranja stran podlakti
Zelo suha koža	<30
Suha koža	30 - 45
Dobro hidratirana koža	>45

### 3.2.5 IZVEDBA MERITEV TRANSEPIDERMALNE IZGUBE VODE

Vrednost TEWL predstavlja izhlapevanje vode skozi roženo plast kože, ki smo jo izmerili s Tewametrom<sup>®</sup> TM 300 (Couraga+ Khazaka electronic GmbH, Köln, Nemčija) in je izražena v enotah  $\text{g/m}^2/\text{h}$  (8, 10). Tewameter je svetovno najbolje sprejet merilni instrument za določanje TEWL. Merilna celica je v obliki ozkega votlega valja z odprtima koncema (premer 10 mm, višina 20 mm), ki zmanjša vpliv vrtnčenja zraka znotraj celice. Merilna celica ima dva senzorja vlage in temperature ter predstavlja metodo merjenja z odprto celico. Pri merjenju z odprto celico instrument meri gostoto toka vodnih hlapov v zraku nad kožo in izračuna gradient iz meritev dveh senzorjev. Senzorja se nahajata v celici in merita vlago ter temperaturo in nam omogočata točne in ponovljive rezultate. V celici se nahaja tudi mikroprocesor, ki analizira vrednosti (17, 18).

Pri izvajanju meritev z odprto celico je pomembno, da celico držimo v horizontalni legi in pri miru (slika 9). Previdni moramo biti, da se celica dobro prilega koži in da pritisk na kožo ni premočan. Meritve se morajo izvajati na neporaščeni koži (8). Majhna velikost celice minimalizira vpliv turbolence zraka v celici na meritev. Celica je zelo lahka, kar omogoča lahko rokovanje in ne vpliva na strukturo kože (18).

Meritve TEWL so nepogrešljive pri testiranju učinkovitosti kozmetičnih in farmacevtskih izdelkov, prav tako se metoda uporablja za osnovne dermatološke raziskave (18).



**Slika 9:** Primer meritve s tewametrom.

Vrednosti TEWL, podane v preglednici V, veljajo za zdravo in nepoškodovano kožo pri normalnih sobnih pogojih ( $T=20\text{ °C}$  in  $RH=40-60\%$ ), za meritve opravljene z odprto celico (17).

**Preglednica V:** Interpretacija rezultatov TEWL, izmerjenih s Tewametrom<sup>®</sup> TM 300

	Vrednost TEWL g/h/m <sup>2</sup>
Zelo zdrava bariera	0-10
Zdrava bariera	10-15
Normalna bariera	15-25
Omejena bariera	25-30
Kritično stanje	Nad 30

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 FIZIKALNO VREDNOTENJE KREM

Za zagotovitev ustrezne funkcije kozmetičnih izdelkov je primarna optimalna fizikalno-kemijska stabilnost (9). Cilj fizikalnega vrednotenja krem je ugotoviti, če kreme ustrezajo fizikalno-kemijskim standardom kakovosti. Pomembno je tudi, da se po fizikalnem vrednotenju, še posebej po obremenilnem testu, ohranjajo estetske in funkcionalne lastnosti. Kot parametre za vrednotenje fizikalno-kemijske stabilnosti smo izbrali obremenilni test (centrifugiranje) ter merjenje pH vrednosti in viskoznosti. Testirane kreme smo ovrednotili še pod polarizacijskim mikroskopom. Vse parametre smo merili po standardnem protokolu kot ga izvajajo na Iliriji d.d. za izdelane poltrdne kozmetične izdelke.

#### Obremenilni test

Za vrednotenje fizikalne stabilnosti vseh štirih testiranih krem smo najprej naredili obremenilni test - centrifugiranje (10 minut, 5000 obratov/min), ki je osnovna metoda za ugotavljanje nestabilnosti krem (19, 20). Princip centrifugiranja je, da vrteči tok povzroča visoko centrifugalno silo, ki lahko vodi v razplastitev v primeru nestabilnih formulacij (21). Rezultati obremenilnega testa so podani v preglednici VI. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da so vse štiri testirane formulacije fizikalno stabilne. Nobena se namreč ni razplastila oz. kazala drugih znakov nestabilnosti, kar kaže na optimalno sestavo (tako kvalitativno kot kvantitativno) in jih zato lahko vključimo v nadaljnje testiranje stabilnosti.

**Preglednica VI:** Stabilnost testiranih krem pri centrifugiranju.

	Centrifugiranje (5000 obratov/min, 10 min, sobna T)
Krema A	Krema je stabilna, ni prišlo do razplastitve, ni usedlin
Krema B	Krema je stabilna, ni prišlo do razplastitve, ni usedlin
Krema C	Krema je stabilna, ni prišlo do razplastitve, ni usedlin
Krema D	Krema je stabilna, ni prišlo do razplastitve, ni usedlin

#### Meritve pH

Koža nas ščiti pred okužbami in okoljskimi obremenitvami, pri tem ima pomembno vlogo tudi ustrezen pH kože. Nudi ga tanek zaščitni sloj na površini, ki se imenuje kislini plašč, in je sestavljen iz sebuma (prostih maščobnih kislin), ki se izloči iz žlez lojnic na koži in se

meša z mlečno kislino iz znoja ter tako ustvari optimalen, rahlo kisel pH kože, ki se giblje med 4 in 6 (znaša približno 5,5) (22, 23). Ustrezna pH vrednost kozmetičnih izdelkov je pomembna, ker ohranja ustrezno homeostazo kože in ga določamo v okviru testiranja izdelka. Vse štiri testirane kreme so primerne za nanos na kožo, saj se pH vrednosti krem gibljejo od 5,35 do 5,63, kar je razvidno iz preglednice VII.

**Preglednica VII:** Vrednosti pH testiranih krem (pri 25 °C).

	pH vrednost
Krema A	5,35
Krema B	5,44
Krema C	5,45
Krema D	5,63

### Meritve viskoznosti

Viskoznost je merilo notranjega trenja tekočin, ko se je ena plast tekočine prisiljena premakniti nad drugo snovjo. Glede na viskoznost sisteme razdelimo na newtonske in ne-newtonske. Za newtonske sisteme je značilno, da je viskoznost konstantna pri različnih strižnih hitrostih (npr. voda, olje). Za ne-newtonske sisteme pa velja, da se viskoznost spreminja v odvisnosti od strižne hitrosti. Večina kozmetičnih izdelkov spada med ne-newtonske sisteme (24).

Rezultati meritev viskoznosti testiranih krem so podani v preglednici VIII. Iz preglednice je razvidno, da imata kremi A in B, ki sta emulzijska gela, večjo viskoznost kot kremi C in D, ki imata strukturo lamelarnih tekočih kristalov. Razlog za razliko v viskoznosti je v sestavi krem, kremi A in B imata namreč večjo količino polimerov (natrijev poliakrilat, amonijev akriloiddimetiltaurat/VP kopolimer, hidroksiipropilmetilceluloza in mešanica poliakrilamida, C13-14 izoparafina in lauret-7) in ostalih sestavin, v trdnem agregatnem stanju (kot so cetilalkohol, glicerilstearat, stearilalkohol, maslo manga...) (preglednice I do III). Razlog za nižjo viskoznost krem C in D najdemo v dejstvu, da pri strukturi z lamelarnimi tekočimi kristali plasti drsijo druga ob drugi, vendar pa imajo še vedno značilno poltrdno konsistenco (16).



**Preglednica VIII:** Viskoznost testiranih krem v mPas

	Viskoznost (mPas)
Krema A	36.000
Krema B	38.000
Krema C	24.000
Krema D	24.000

Glede na zgornje rezultate fizikalnega vrednotenja lahko zaključimo, da so vse štiri testirane kreme fizikalno stabilne, saj so vse kreme po obremenilnem testu ostale nerazplastene, imajo primerno pH vrednost ter izkazujejo ustrezno viskoznost glede na svojo sestavo.

#### Določanje strukture tekočih kristalov

Notranjo strukturo krem C in D smo proučevali s pomočjo polarizacijskega mikroskopa. Ker tekoči kristali izkazujejo dvolomnost, jih lahko opazujemo in dokažemo njihov obstoj s polarizacijskim mikroskopom. Obstoj lamelarnih tekočih kristalov tako vidimo kot oljne črte z malteškimi križi (16). Ko smo vzorce krem C in D ovrednotili pod polarizacijskim mikroskopom, smo videli, da se sicer nakazujejo malteški križi, ki pa so neizraziti. Povečava uporabljenega mikroskopa je bila zgolj 20 $\times$ , tako da je slednja najverjetneje eden izmed razlogov za to, da strukture nismo mogli bolj natančno določiti. Predvidevamo tudi, da razlog za neizrazito vidne malteške križe ni le premajhna povečava, ampak tudi kompleksna sestava testiranih krem. Kremi C in D namreč vsebujeta velik delež oljne faze, ki otežuje vidnost malteških križev, prav tako so lamelarni tekoči kristali zaradi prisotnih oljnih komponent prisotni na zelo ozkem območju in so tudi zato težje vidni. Kot navajajo že Savič, Pantelič in Lukič je vidnost in organizacija lamelarnih tekočih kristalov odvisna od oljne faze kreme, prav tako navajajo, da ni vidne kristalinične strukture v sistemu emulzij z estri ali rastlinskimi olji. Lamelarni tekoči kristali so tako prisotni v zelo ozkem območju zaradi oljne faze in so zato težje vidni in razpoznavni (25). Dodatno smo pod polarizacijskim mikroskopom preverili tudi kremi A in B in potrdili, da ne vsebujeta lamelarnih tekočih kristalov, saj ni bilo vidnih malteških križev.

## **4.2 IN VIVO ŠTUDIJA: VREDNOTENJE PO NANOSU KREM**

Vrednotenje vpliva izdelanih krem na kožo smo izvedli v okviru *in vivo* študije na prostovoljcih. Zanimal nas je vpliv krem na hidratacijo kože in TEWL. Predhodno smo na

eni prostovoljki izvedli tudi preliminarno testiranje, s pomočjo katerega smo nato načrtovali in izvedli *in vivo* študijo na 20 prostovoljkah.

#### 4.2.1 PRELIMINARNO TESTIRANJE

Pred izvedbo *in vivo* študije smo izvedli preliminarno testiranje na eni prostovoljki. Namen preliminarne testiranja je bil določiti področja merjenja, velikost testiranega območja, optimalno količino nanosa kreme in optimalne časovne točke merjenja hidratacije kože in TEWL.

##### Področja merjenja

Na podlagi literaturnih podatkov smo se odločili, da bomo hidratacijo kože in TEWL pred in po nanosu krem testirali na notranji strani podlakti, in sicer višje od zapestja. V *in vivo* študijah je namreč to anatomsko mesto priporočljivo za meritve hidratacije kože in TEWL, saj je najmanj poraščeno in ima majhno število žlez lojnic (100 lojnic/cm<sup>2</sup> ali manj) (4, 8). Dodatno smo se odločili, da bomo meritve hidratacije kože izvajali še na obrazu, saj so testirane kreme namenjene negi obraza. Kreme bi tako v bistvu lahko testirali samo na obrazu, vendar je kljub temu priporočljivo, da za primerjavo naredimo meritve tudi na notranji strani podlakti (8). V preliminarnih testih smo tako meritve hidratacije kože izvajali na čelu, licu in bradi. Ugotovili smo, da je zaradi kosti ličnice, na licu težje meriti hidratacijo kože, zaradi tega rezultati niso bili ponovljivi. Na bradi pa je bilo področje premajhno, da bi lahko izvedli meritve vseh štirih krem. Glede na navedeno smo se odločili, da bomo meritve hidratacije kože izvajali na čelu. Prav tako smo se za meritve na čelu odločili zaradi ugotovitve, da je bila hidratacija kože, v primerjavi z izmerjeno hidratacijo kože na licu (60,92 AE) in bradi (54,05 AE), na čelu najvišja (70,46 AE). Kot je poročal že Kleest s sodelavci, naj bi bila hidratacija kože najvišja na območjih, ki so bogata z ekrinimi žlezami, in čelo je prav eno izmed teh področij (8). Zanimalo nas je tudi, ali bodo kljub že tako visoki bazalni vrednosti, testirane kreme še vplivale na povečanje hidratacije kože.

##### Velikost merjenega področja

Po določitvi področja merjenja smo določili še velikost merjenega področja, in sicer smo

na notranji strani podlakti določili velikost enega kvadratka, ki znaša 3,5 cm krat 3,5 cm (površina kvadratka 12,25 cm<sup>2</sup>) ter velikost enega kvadratka na čelu 2,7 cm krat 2,7 cm (površina kvadratka 7,29 cm<sup>2</sup>). Za takšno velikost področja smo se odločili, ker lahko na istem področju naredimo več meritev, ne da bi med meritvami prišlo do okluzije, hkrati pa zajamemo ustrezno veliko področje in na ta način zagotovimo reprezentativne rezultate.

#### Količina nanosa

Optimalno količino nanosa smo določili tako, da smo na označena področja nanесли različne količine kreme. Najprej smo nanесли 160 mg kreme in ugotovili, da je takšna količina prevelika za predhodno določeno površino področja merjenja. Krema se namreč ni vpila v kožo in se je po določenem času začela luščiti z nje. Nato smo na označeno področje nanесли 40 mg kreme in ugotovili, da je takšna količina kreme premajhna za nanos. Krema je bilo namreč premalo, da bi jo lahko nanесли na celotno področje, zato tudi meritve hidracije kože in TEWL niso bile relevantne. Hidracija kože se pri tako majhnem nanosu ni povečala. Na podlagi predhodnih ugotovitev smo na označeno področje nanесли 60 mg kreme. Takšna količina kreme se je v kožo vpila v optimalnem času, na koži prav tako ni bilo zaostanka krem, ki bi lahko vplival na samo meritve hidracije kože ali TEWL. Na podlagi izvedenega predhodnega postopka smo določili, da bomo uporabili 60 mg kreme za nanos na notranji strani podlakti (kar znaša približno 5 mg na 1 cm<sup>2</sup>), tako da smo na področju čela nanесли približno 30 mg kreme na kvadratak.

#### Optimalne časovne točke merjenja

Optimalne časovne točke merjenja smo določili tako, da smo kreme nanесли na testna področja in merili hidracijo kože in TEWL do 5 ur po nanosu. Meritve smo izvajali vsakih 10 minut. Na podlagi preliminarne testiranja smo nato določili, da bomo merili hidracijo kože in TEWL 30 minut po nanosu kreme, drugo meritve pa bomo naredili 2 uri po nanosu. Podoben časovni protokol navaja tudi Tagami, in sicer, da lahko primerjamo vlažilni učinek različnih krem, če na kožo nanesimo enako količino vsakega izdelka in izmerimo hidracijo kože vsaj 30 minut po nanosu, nato pa nekaj ur opazujemo, kako se hidracija kože spreminja v odvisnosti od časa nanešenega izdelka (26). Na osnovi preliminarne testiranja smo opazili, da je vrednost TEWL takoj po nanosu kreme oz. do 30 minut po nanosu precej visoka, saj smo merili zgolj izhlapevanje vode iz kreme in ne iz kože. Prav tako takoj po nanosu kreme vrednosti hidracije niso bile pravilne, saj je

naprava v tem primeru merila vsebnost vode v še nevpiti kremi in ne hidratacije kože (2). Hidratacija kože se je v odvisnosti od časa povečevala: 2 uri po nanosu kreme je hidratacija kože dosegla svojo maksimalno vrednost, 3 ure in 5 ur po nanosu je bila vrednost hidratacije kože še vedno približno enaka kot 2 uri po nanosu, tako smo se odločili, da bomo v nadaljnjem sklopu testiranja končno hidratacijo kože izmerili 2 uri po nanosu.

Kreme smo testirali tudi v daljšem časovnem obdobju, in sicer smo jih testirali po 1, 3, 7 in 10 dneh uporabe, in sicer zjutraj in zvečer. Hidratacija kože se je čez daljše časovno obdobje povečevala: po 1 dnevu uporabe krem je bila hidratacija že višja kot 2 uri po nanosu krem, po 3 dnevni uporabi krem se je hidratacija kože še bolj povišala, prav tako tudi po 7 dnevni in 10 dnevni uporabi krem. Na podlagi teh rezultatov smo določili, da bomo kreme testirali po 3 dneh nanašanja krem, saj se vrednosti po 7 dnevni oz. 10 dnevni uporabi krem zanemarljivo razlikujejo od vrednosti po 3 dnevni uporabi. Slednje je v skladu z ugotovitvami, kot jih navaja Tagami, in sicer, da je dolgotrajnejši učinek mogoče oceniti z nanosom izdelka dvakrat dnevno v obdobju petih dni (26).

#### Razlika v hidrataciji kože in TEWL glede na anatomsko mesto na roki

Proučevali smo, ali obstaja razlika v bazalnih vrednostih hidratacije kože in TEWL na različnih mestih notranje strani podlakti od zapestja do komolca. Ugotovili smo, da glede na mesto nanosa ni bistvenih razlik v rezultatih, torej ni pomembno, na katerem mestu izvajamo meritve. Paziti moramo le, da meritev ne izvajamo preblizu zapestja oz. komolca, saj so vrednosti TEWL tam značilno višje in tudi hidratacija kože je drugačna (8). Razlog za odstopanje vrednosti na teh področjih pa je v dejstvu, da so blizu zapestja in komolca žile bližje površini kože, kar povzroča povišane vrednosti TEWL. Blizu zapestja so tudi koščice, ki prav tako vplivajo na izmerjene vrednosti TEWL.

#### Število ponovitev

Določili smo, da bomo za TEWL naredili 3 ponovitve, tako kot priporoča tudi Plessis s sodelavci (8). Meritve hidratacije kože pa smo izvedli v šestih ponovitvah znotraj določenega področja.

#### 4.2.2 *IN VIVO* ŠTUDIJA

V diplomskem delu smo izvedli *in vivo* študijo vpliva testiranih krem na hidratacijo kože in TEWL. Meritve hidratacije kože in TEWL smo izvajali na označenih področjih notranje strani podlakti, na čelu pa smo izvedli le meritve hidratacije kože.

*In vivo* študijo smo izvedli na 20 prostovoljkah z naslednjimi formulacijami:

1. Krema A (krema na osnovi emulzijskega gela)
2. Krema B (krema na osnovi emulzijskega gela)
3. Krema C (krema na osnovi lamelarnih tekočih kristalov)
4. Krema D (krema na osnovi lamelarnih tekočih kristalov)

Dodatno smo na petih prostovoljkah izmerili hidratacijo kože in TEWL še po dolgotrajni uporabi, tj. po 3 dneh uporabe testiranih krem zjutraj in zvečer.

Prostovoljke so bile nameščene v sobo, kjer je bila temperatura prostora  $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,75 \text{ } ^\circ\text{C}$  in relativna vlažnost  $55 \pm 9 \text{ } \% \pm 7 \text{ } \%$ . Pred samim začetkom meritev so se testirane osebe 30 minut aklimatizirale na pogoje v prostoru.

Pred nanosom štirih vrst krem smo v vsakem narisanem področju izmerili hidratacijo kože in TEWL (na čelu le hidratacijo kože) ter ponovili meritve še 30 minut in 2 uri po nanosu testiranih krem. Na podlagi podatkov pred nanosom smo lahko izračunali odstotek povečanja hidratacije kože in spremembo TEWL po nanosu krem. Meritve s Corneometrom<sup>®</sup> CM 825 in Tewametrom<sup>®</sup> TM 300 so bile opravljene v skladu z navodili, kot smo jih opisali v poglavju Materiali in metode (3.2.4 in 3.2.5).

Ker so se bazalne vrednosti hidratacije kože razlikovale med osebami, kar je pričakovano, smo za optimalnejšo in tudi bolj natančno predstavitev rezultatov dobljene vrednosti (tudi za TEWL) posebej obravnavali za zelo suho kožo (AE <30), posebej za suho kožo (AE 30-45) in posebej za dobro hidratirano kožo (AE >45). Vsi rezultati so prikazani v stolpičnih grafikonih (slika 8-18).

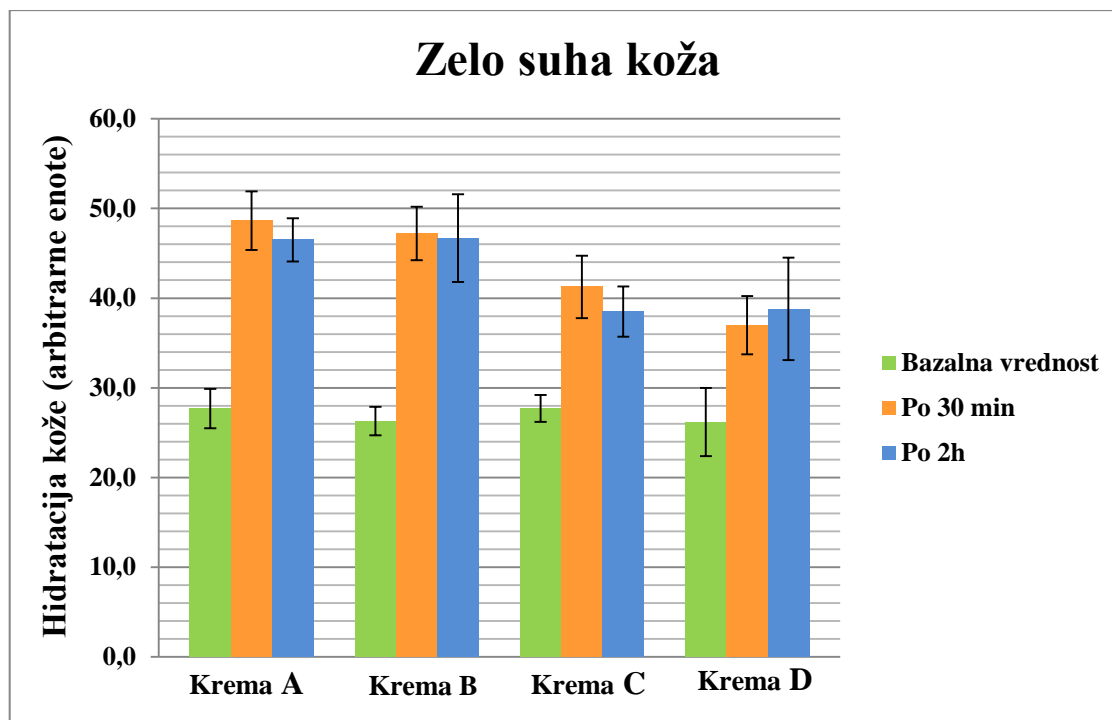
### 4.3 REZULTATI HIDRATACIJE KOŽE

Hidratacija kože predstavlja vsebnost vode v roženi plasti kože (8) in smo jo izmerili s korneometrom, ki je učinkovit instrument za meritve hidratacije rožene plasti kože. Hidratacija kože je zelo pomemben parameter v dermatologiji in kozmetični industriji, saj je vlaženje kože oz. rožene plasti z dermalno uporabo losjonov in krem najboljši način za izboljšanje hidratacije kože (27, 28).

#### 4.3.1 HIDRATACIJA KOŽE NA NOTRANJI STRANI PODLAKTI

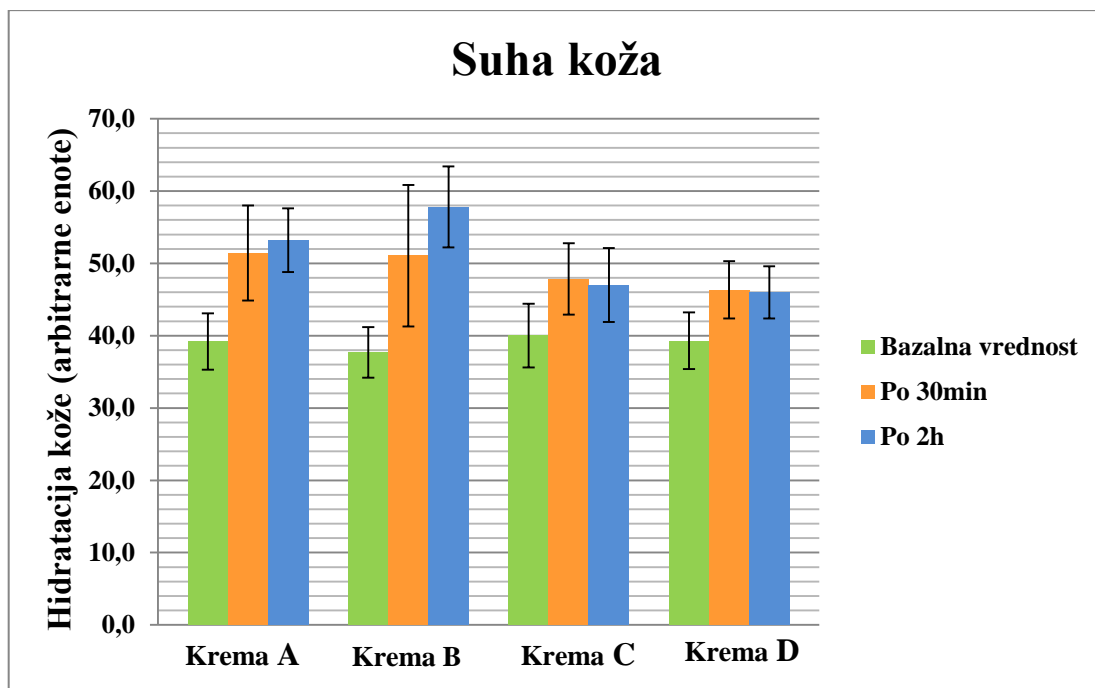
##### *Hidratacija kože na notranji strani podlakti 30 minut in 2 uri po nanosu krem*

Hidratacijo kože smo najprej izmerili na notranji strani podlakti. Na sliki 10 so prikazani rezultati hidratacije kože pri prostovoljkah z zelo suho kožo (AE <30), in sicer pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Iz slike 10 je razvidno, da se je hidratacija kože izboljšala po nanosu vseh štirih krem po določenem času (statistično značilno povečanje hidratacije kože napram bazalni vrednosti). Hidratacija kože se je v primeru zelo suhe kože najbolj povečala 2 uri po nanosu kreme B (za 77,3 %), nekoliko manj v primeru kreme A (za 67,9 %), sledi krema D (48,5 % povečanje) in krema C (38,9 % povečanje). Iz slike 10 je prav tako razvidno, da 30 minut in 2 uri po nanosu krem ni bistvenih sprememb v hidrataciji kože (statistično zanemarljive spremembe), torej lahko trdimo, da gre za takojšni učinek, ki se ohranja.



**Slika 10:** Hidracija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 5 prostovoljkah z zelo suho kožo.

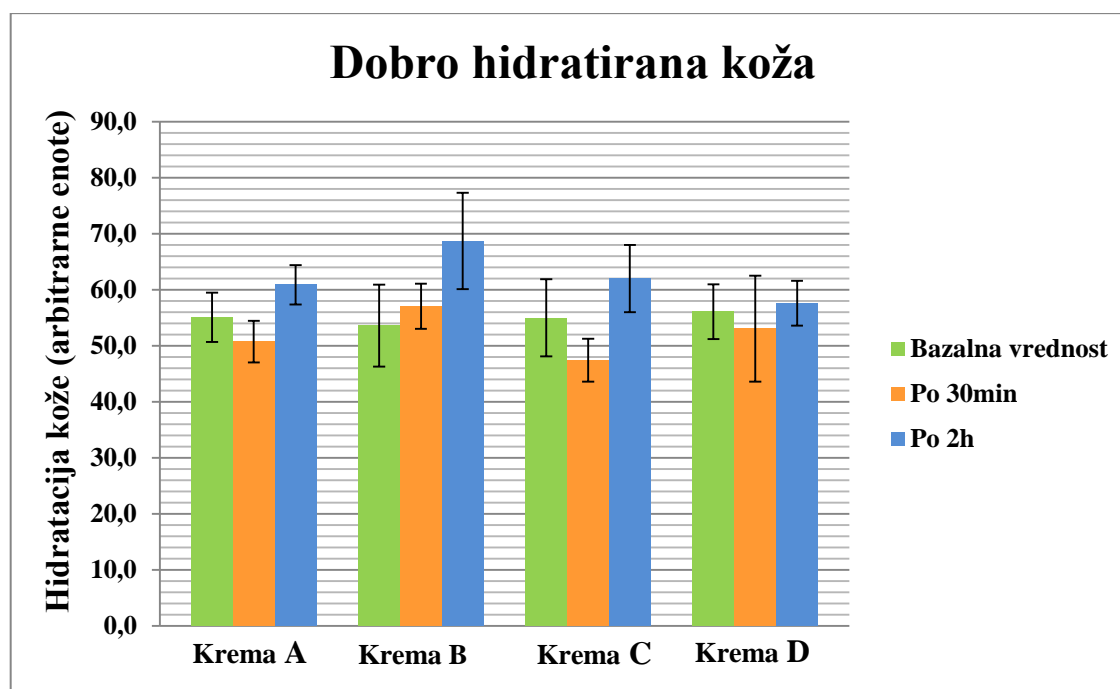
Na sliki 11 so prikazani rezultati hidracije kože pri prostovoljkah s suho kožo (AE 30-45), in sicer pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Tudi v primeru prostovoljk s suho kožo se je hidracija kože izboljšala po nanosu vseh štirih krem (statistično značilno povečanje hidracije kože). Najbolj se je povečala 2 uri po nanosu kreme B (za 53,5 %), nekoliko manj po uporabi kreme A (37,5 % povečanje), manj izrazito, vendar primerljivo povečanje je bilo v primeru kreme C (17,7 % povečanje) in D (17,0 % povečanje). Prav tako kot pri prostovoljkah z zelo suho kožo, tudi pri prostovoljkah s suho kožo ni bistvenih sprememb v hidraciji kože 30 minut po nanosu krem in 2 uri po nanosu (statistično zanemarljive spremembe), torej gre tudi v tem primeru za takojšnji učinek, ki se ohranja.



**Slika 11:** Hidratacija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 10 prostovoljkah s suho kožo.

Na sliki 12 so prikazani rezultati hidratacije kože pri prostovoljkah z dobro hidratirano kožo (AE >45), in sicer pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Tudi v primeru prostovoljk z dobro hidratirano kožo se je hidratacija kože izboljšala po nanosu vseh štirih krem po določenem času. Hidratacija kože se je značilno povečala 2 uri po nanosu kreme B (za 28,3 %), statistično zanemarljivo povečanje pa je bilo po uporabi kreme A (10,5 % povečanje), sledi krema C (12,7 % povečanje) in krema D (2,6 % povečanje). Pri prostovoljkah z dobro hidratirano kožo se je hidratacija nekoliko zmanjšala 30 minut po nanosu krem A, C in D, v primeru kreme B pa je 30 minut po nanosu prišlo do povečanja hidratacije kože.





**Slika 12:** Hidratacija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 5 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

Zaključimo lahko, da se je hidratacija kože na notranji strani podlakti izboljšala pri vseh treh tipih kože po nanosu vseh štirih testiranih krem, vendar je bil učinek različen tako glede na tip kože kot tudi v odvisnosti od strukture formulacij. V odvisnosti od tipa kože se je pričakovano hidratacija kože najbolj povečala pri zelo suhi koži, do nekoliko manjšega povečanja je prišlo pri suhi koži, do najmanjšega povečanja hidratacije kože pa je prišlo pri dobro hidratirani koži. Slednje je najverjetneje posledica tega, da se na zelo suhi koži in suhi koži učinek vlažilcev in emolientov v kremi bolj izraža kot pri dobro hidratirani koži. Pri dobro hidratirani koži je po nanosu kreme hidratacija kože najverjetneje dosegla svojo maksimalno vrednost in ne narašča več, saj hidratacija ne more naraščati neomejeno. Bazalne vrednosti dobro hidratirane kože so namreč že tako visoke, da kreme nimajo tako velikega vpliva kot pri zelo suhi in suhi koži. Povprečna bazalna vrednost hidratacije dobro hidratirane kože je znašala 55,0 AE. Kot je razvidno tudi iz slike 12, saj je hidratacija dobro hidratirane kože 30 minut po nanosu vseh štirih testiranih krem najprej povprečno zmanjšala na 52,1 AE, kar je 5,6 % zmanjšanje (statistično zanemarljivo zmanjšanje), šele 2 uri po nanosu pa je prišlo do manjšega povečanja hidratacije kože (statistično značilno povečanje hidratacije kože), in sicer se je hidratacija kože povprečno povečala le na 62,3 AE, kar je samo 13,3 % povečanje (slika 12). Povečanje hidratacije kože pri dobro hidratirani koži je torej v primerjavi z drugima dvema tipoma kože zelo majhno, kjer je

bilo povečanje v povprečju za 57,8 % (zelo suha koža), oziroma 30,6 % (suha koža) (slika 10 in slika 11). Z vidika barierne funkcije kože sta neustrezni tako premajhna kot prevelika hidratiranost (29). Če je koža preveč ali premalo hidratirana, potem snovi iz okolja lahko penetrirajo v kožo oz. snovi iz telesa lahko penetrirajo v okolje.

Vpliv krem na hidratacijo kože je bil odvisen tudi od njihove notranje strukture. Krema A in B imata klasično strukturo na osnovi emulzijskega gela, medtem ko kremi C in D vsebujeta lokalna področja lamelarnih tekočih kristalov. Če primerjamo kremi A in B, lahko vidimo, da se je hidratacija kože pri vseh treh tipih kože bolj povečala po uporabi kreme B. Predvidevamo, da je razlog v tem, da ima krema B večji odstotek hidrofilne faze. Krema B ima namreč kar 44 % hidrofilne faze, medtem ko je krema A le 31 %. Znano je, da se voda iz izdelka nemudoma absorbira v kožo in hidratira roženo plast (30). Razen različnega odstotka hidrofilne faze je sicer odstotek emolientov in vlažilcev v kremi A in B približno enak (krema A ima 6-18 % emolientov in 9-30 % vlažilcev, krema B pa ima 8-28 % emolientov in 6-21 % vlažilcev), vendar pa kremi vsebujeta različne emoliente (označeni z oranžno v preglednici I in II) in vlažilce (označeni s svetlo modro v preglednici I in II), zato lahko predvidevamo, da je tudi to razlog za različen vpliv na hidratacijo kože. Razlike med vplivom krem so sicer statistično zanemarljive, zato navedenega z zagotovostjo ne moremo trditi.

Ker sta kremi C in D vsebovali lamelarne tekoče kristale, ki postajajo pogosto uporabljeni v kozmetični in tudi farmacevtski industriji (15), nas je zanimalo, ali kreme, ki vsebujejo lamelarne tekoče kristale, res značilno izboljšajo hidratacijo kože. Znano je namreč, da so lamelarni tekoči kristali dobro funkcionalni v kremah za nego kože, saj so strukturno podobni medceličnim lipidom v roženi plasti, le-ti pa so najbolj učinkoviti pri vlaženju kože in ohranjanju zdrave kože. Zahvaljujoč takšni strukturi imajo kreme, ki vsebujejo lamelarne tekoče kristale, enake zaščitne lastnosti kot naravni medcelični lipidi (14). Z našimi rezultati smo dokazali, da sta kremi, ki sta vsebovali lamelarne tekoče kristale, res povečali hidratacijo kože (statistično značilno povečanje hidratacije kože) (slike 10, 11 in 12).

Predvidevali smo, da se bo hidratacija najbolj povečala po uporabi krem s tekočimi kristali, vendar je iz slik 10, 11 in 12 razvidno, da se je hidratacija kože bolj povečala po uporabi krem s klasičnim emulzijskim gelom. Razlog za to je najverjetneje v sestavi krem. Krema A in B vsebujeta več različnih emolientov in vlažilcev kot kremi C in D. Krema C in D

vsebujeta le emoliente, in sicer 14 do 43 % (preglednica III). Krema A vsebuje 6-18 % emolientov oz. 9-30 % vlažilcev (preglednica I), krema B pa vsebuje 8-28 % emolientov oz. 6-21 % vlažilcev (preglednica II). Znano je, da se hidratacija kože bolj poveča po uporabi krem, ki vsebujejo vlažilce, kot po uporabi krem, ki le-teh ne vsebujejo (30). Kremi A in B namreč vsebujeta kar veliko količino glicerola, ki je zelo učinkovit vlažilec. Preprečuje kristalizacijo lipidov rožene plasti in tako pripomore k višji vsebnosti vlage v koži. Prav tako tudi stimulira izboljšanje barierne funkcije in izboljša hidratacijo rožene plasti (28). Zaključimo lahko, da je za hidratacijo kože bolj pomembna sestava kreme, kot njena struktura.

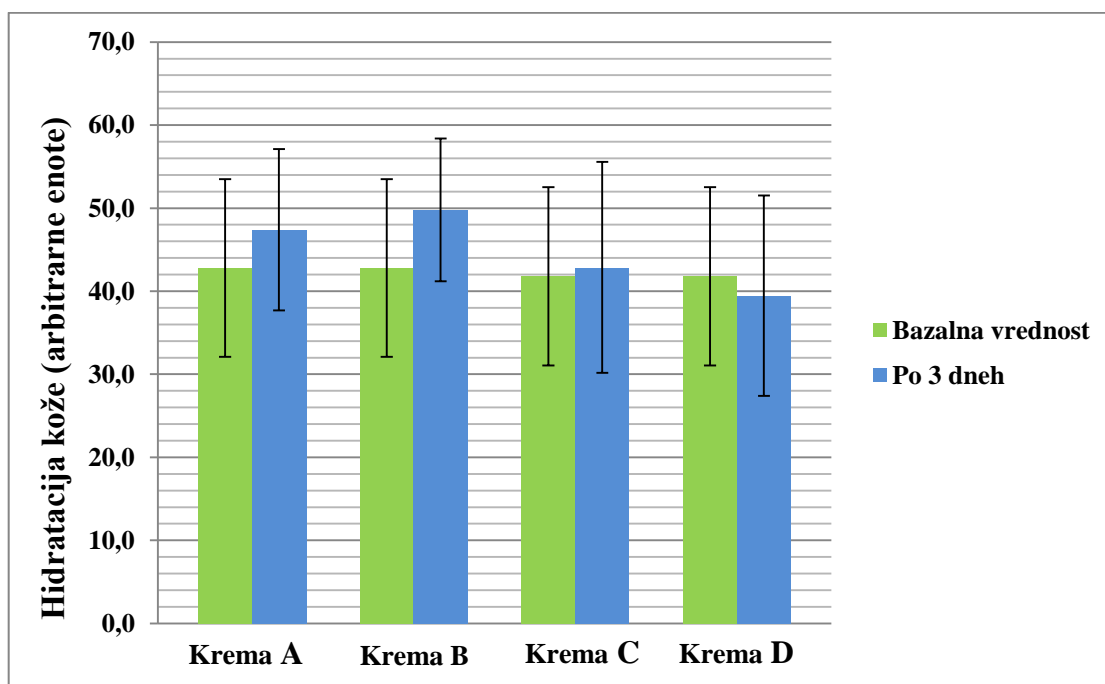
Do podobnega zaključka sta v svoji študiji prišla tudi Moldovan in Ciortea. Primerjala sta, kako na hidratacijo kože vplivajo tri kreme z različnimi sestavinami. Prva je vsebovala večinoma okluzivne lipofilne emoliente, druga krema je vsebovala vlažilce, tretja krema pa je vsebovala tako lipofilne emoliente kot tudi vlažilce. Zaključila sta, da je tretja krema, ki je vsebovala tako lipofilne emoliente kot vlažilce, najbolj hidratirala kožo (1).

#### *Hidratacija kože na notranji strani podlakti po 3 dnevni uporabi krem*

V nadaljevanju nas je zanimal vpliv krem na hidratacijo kože po dolgotrajni uporabi krem, zato smo hidratacijo kože izmerili še po 3 dnevni uporabi zjutraj in zvečer. Glede na to, da je 3 dni kreme uporabljalo samo 5 prostovoljk, rezultatov nismo dodatno razčlenili glede na tip kože. Na sliki 13 smo tako podali rezultate kot povprečje vseh petih prostovoljk, posledično je tudi standardna deviacija višja, saj imajo prostovoljke namreč različen tip kože (variabilnost bioloških sistemov). Za zanesljivejše podatke bi bilo potrebno meritve po 3 dneh uporabe krem izvesti na več testnih osebah.

Iz slike 13, na kateri so podane vrednosti hidratacije kože pred nanosom krem (bazalne vrednosti) in po 3 dnevni uporabi krem, je razvidno, da se tudi po 3 dnevni uporabi pojavi isti vzorec kot pri hidrataciji kože po 30 minutah in 2 urah (slike 10, 11 in 12). V skladu z našimi pričakovanji glede na rezultate meritev po 30 minutah in 2 urah se je hidratacija kože najbolj povečala po uporabi kreme A (10,6 % povečanje) in kreme B (16,4 % povečanje), pri kremah C in D pa je učinek povečanja hidratacije kože manj izrazit (statistično zanemarljivo povečanje hidratacije kože pri vseh štirih testiranih kremah). Po uporabi kreme C je prišlo do 2,6 % povečanja, pri kremi D pa celo do rahlega zmanjšanja hidratacije kože (za 5,9 %). Rezultate je možno razlagati enako, kot pri hidrataciji kože 30

minut in 2 uri po nanosu krem, in sicer je do različnega povečanja hidratacije kože prišlo zaradi različne sestave krem.



**Slika 13:** Hidratacija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost) in po 3 dneh uporabe krem na notranji strani podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 5 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

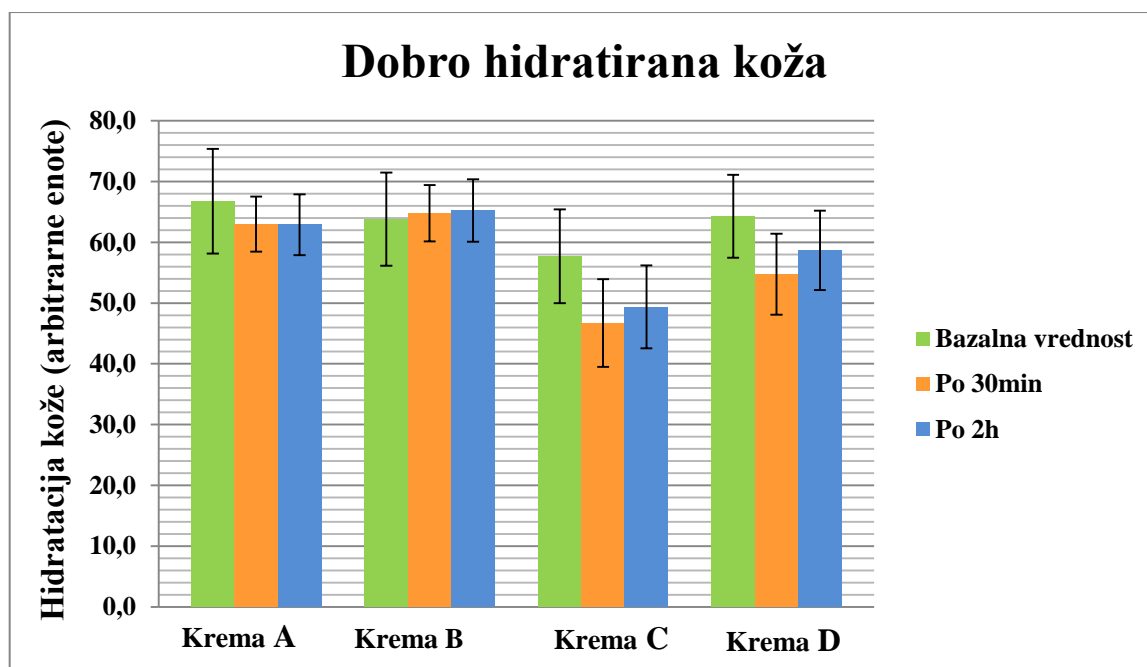
#### 4.3.2 HIDRATACIJA KOŽE NA ČELU

Ker so vse štiri kreme namenjene negi obraza, smo se odločili, da bomo določili tudi hidratacijo kože po uporabi vseh štirih krem na obrazu, in sicer na čelu. Pred nanosom krem je bila koža vseh prostovoljk na čelu dobro hidratirana (povprečna vrednost 63,2 AE), tako da rezultatov nismo posebej obravnavali glede na tip kože.

##### Hidratacija kože na čelu 30 minut in 2 uri po nanosu krem

Iz slike 14, na kateri so podane vrednosti hidratacije kože na čelu pred nanosom krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po nanosu krem, je razvidno, da se je hidratacija kože po nanosu vseh štirih testiranih krem zmanjšala po določenem času, kar je ravno nasprotno od rezultatov, dobljenih na notranji strani podlakti. Dobljeni rezultati so tudi v nasprotju z našimi pričakovanji. Kot je razvidno iz slike 14 se je hidratacija dobro hidratirane kože najbolj zmanjšala 2 uri po nanosu kreme C (za 16,9 %), sledita krema D (9,6 %) in krema A (za 6,2 %), pri kremi B pa opazimo rahlo povečanje hidratacije kože

(za 2,3 %). Pri kremi C in D je prišlo do statističnega zmanjšanja, medtem ko je pri kremi A in B prišlo do statistično zanemarljivega zmanjšanja/povečanja. Prav tako je iz slike 14 razvidno, da ni bistvenih sprememb v hidrataciji kože 30 minut po nanosu krem in 2 uri po nanosu (statistično zanemarljive spremembe v hidrataciji kože). Predvidevamo, da je razlog za dobljene rezultate v tem, da bazalne vrednosti po vsej verjetnosti niso bile dovolj relevantne. Meritve smo namreč izvajali poleti, ko je bilo zunaj vroče, zato obstaja velika verjetnost, da je bilo na čelu prisotnih več lipidov, ki so dali lažne rezultate. Koža na čelu je načeloma bolj mastna kot na notranji strani podlakti, saj je na obrazu več žlez lojnic (400-900 lojnic/cm<sup>2</sup>) kot na notranji strani podlakti (100 lojnic/cm<sup>2</sup> ali manj). Prav tako so na čelu žleze lojnice tudi večje (4). Poleg žlez lojnic je na obrazu tudi veliko ekrinih žlez, ki prav tako prispevajo k večji hidratiranosti kože (8). Korneometer je v bistvu izmeril hidratacijo hidro-lipidnega sloja namesto hidratacije kože, zaradi česar so bile bazalne vrednosti hidratacije kože višje, kot so bile v resnici. V postopku nanosa kreme na obraz smo se pri nanašanju krem verjetno znebili lipidnega sloja. Krema je po vsej verjetnosti dejansko povečala hidratacijo kože, vendar pa zaradi nezanesljivih bazalnih vrednosti rezultati kažejo, kot da kreme niso imele vpliva na hidratacijo kože oz. da so jo celo zmanjšale. Glede na navedene ugotovitve lahko zaključimo, da je notranja stran podlakti bolj primerno mesto za merjenje hidratacije kože kot čelo.

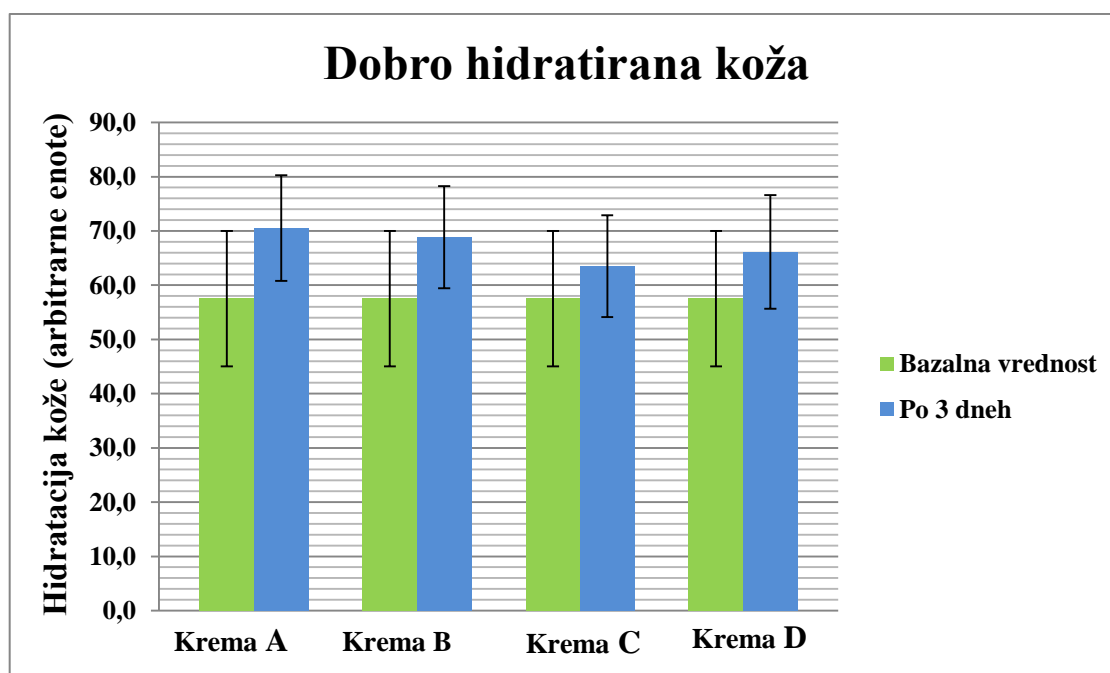


**Slika 14:** Hidratacija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na čelo v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost ± SD na 20 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

Hidratacija kože na čelu po 3 dnevni uporabi krem

Tudi rezultatov po 3 dneh uporabe krem na obrazu nismo obravnavali posebej za posamezne tipe kože, saj je bila koža vseh prostovoljk pred nanosom krem dobro hidratirana (povprečna vrednost 57,5 AE). Iz slike 15 je razvidno, da je standardna deviacija visoka, zato bi bilo za zanesljivejše podatke potrebno meritve po 3 dneh uporabe krem izvesti na več testnih osebah.

Na sliki 15 so prikazane vrednosti hidratacije kože na čelu pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) in po 3 dnevni uporabi krem. Za razliko od hidratacije kože 30 minut in 2 uri po nanosu krem na čelo, je iz slike 15 razvidno, da se je hidratacija, po 3 dnevni uporabi krem na čelu zjutraj in zvečer, povečala (statistično zanemarljivo povečanje hidratacije kože).



**Slika 15:** Hidratacija kože (podana v AE) pred nanosom kreme (bazalna vrednost) in po 3 dneh uporabe krem na čelu v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 5 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

Trendi povečanja hidratacije kože v odvisnosti od nanosa različnih testiranih krem so na čelu enaki kot na notranji strani podlakti, in sicer sta kremi C in D manj povečali hidratacijo kože (krema C 10,4 % povečanje in krema D 14,9 % povečanje) kot kremi A in B (krema A 22,7 % povečanje in krema B 19,7 % povečanje). Predvidevamo, da je

različna sestava krem razlog za različno povečanje hidratacije kože, rezultati pa so primerljivi kot pri uporabi krem na notranji strani podlakti.

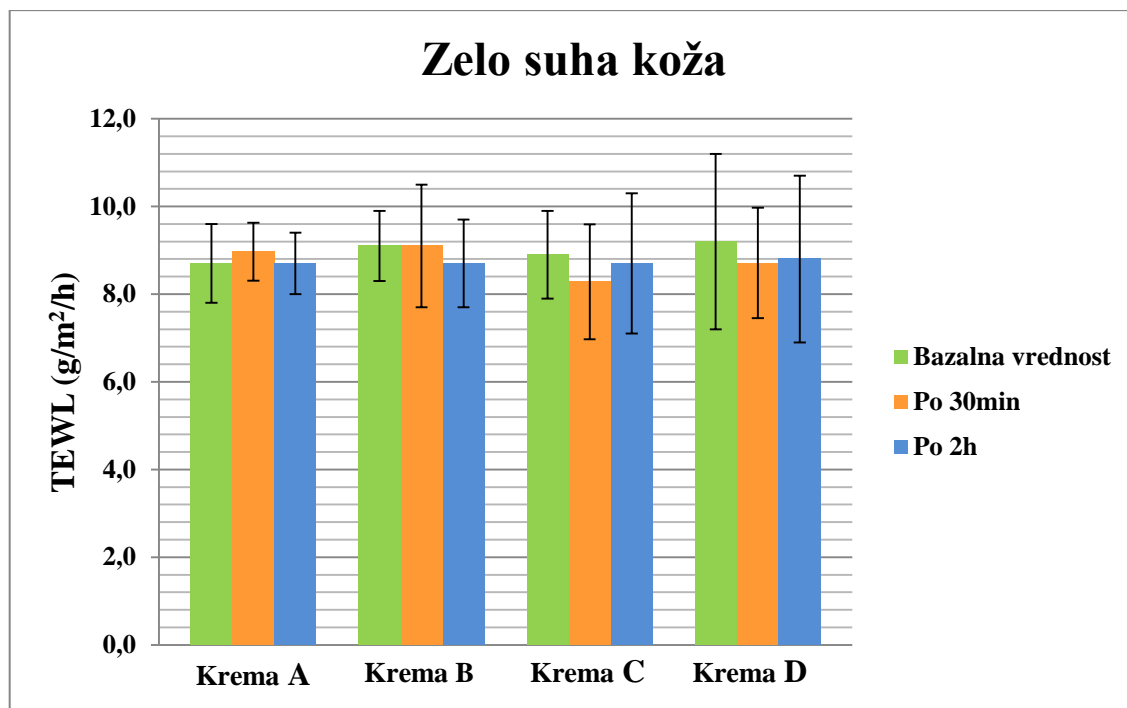
#### 4.4 REZULTATI MERITEV TEWL

Vrednost TEWL predstavlja izhlapevanje vode skozi roženo plast kože, merimo jo s Tewametrom<sup>®</sup> TM 300 in je izražena v enotah  $\text{g/m}^2/\text{h}$  (8, 10). TEWL je merilo za preučevanje barierne funkcije kože. Boljša kot je barierna funkcija kože, večja je vsebnost vode v koži in nižja je vrednost TEWL (31). Meritve vrednosti TEWL se uporabljajo v dermatologiji in kozmetologiji za *in vivo* preučevanje barierne funkcije kože po uporabi izdelkov za nego kože (11).

##### TEWL 30 minut in 2 uri po uporabi krem

Vpliv krem na vrednosti TEWL smo izmerili samo na notranji strani podlakti. Prav tako kot pri meritvah hidratacije kože, smo tudi pri vrednotenju TEWL obravnavali posebej različne tipe kože. Kožo smo razdelili glede na bazalne vrednosti hidratacije kože na zelo suho kožo (povprečna vrednost TEWL  $9,0 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ), suho kožo (povprečna vrednost TEWL  $10,3 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ) in dobro hidratirano kožo (povprečna vrednost TEWL  $11,0 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ). Povprečna bazalna vrednost prostovoljk je bila  $10,1 \text{ g/m}^2/\text{h}$ , kar je značilno za zdravo bariero.

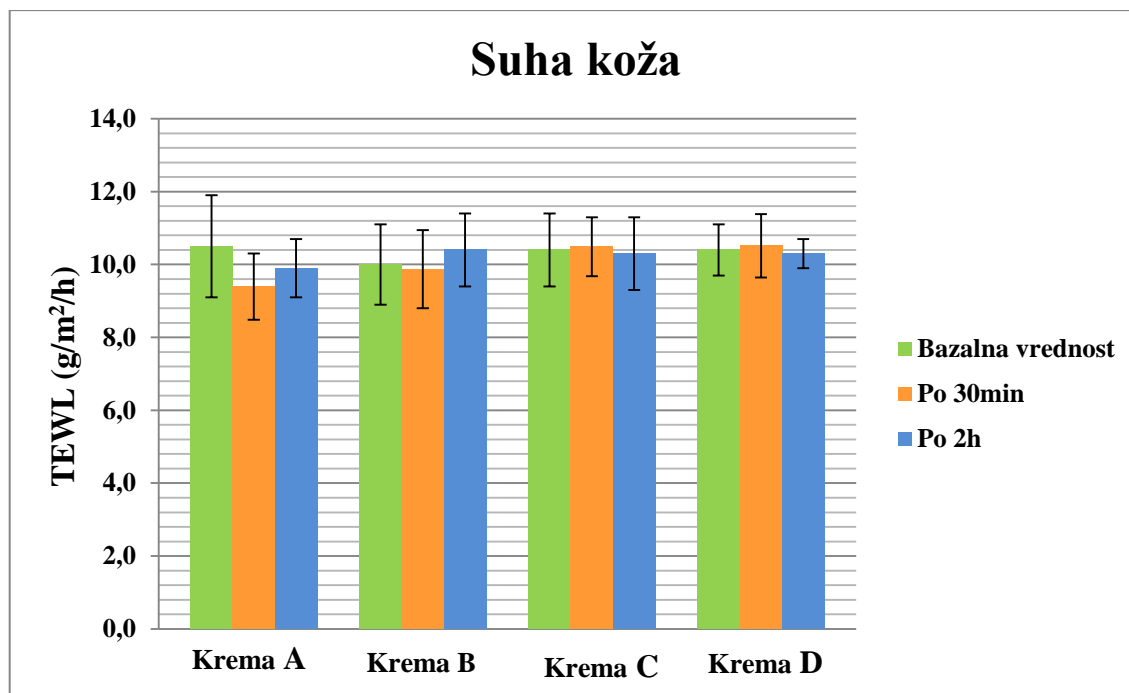
Na sliki 16 so prikazane vrednosti TEWL zelo suhe kože pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Iz slike 16 je razvidno, da se je vrednost TEWL zmanjšala po nanosu vseh štirih testiranih krem (statistično zanemarljivo zmanjšanje), in sicer se je TEWL v primeru zelo suhe kože najbolj zmanjšala 2 uri po nanosu kreme D (iz  $9,2 \text{ g/m}^2/\text{h}$  na  $8,8 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ), nekoliko manj v primeru kreme B (iz  $9,1 \text{ g/m}^2/\text{h}$  na  $8,7 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ), sledi krema C (iz  $8,9 \text{ g/m}^2/\text{h}$  na  $8,7 \text{ g/m}^2/\text{h}$ ), medtem ko pri kremi A pa ni prišlo do sprememb v vrednosti TEWL. Prav tako je iz slike 16 razvidno tudi, da ni bistvenih sprememb v vrednostih TEWL 30 minut po nanosu krem in 2 uri po nanosu (statistično zanemarljive spremembe).



**Slika 16:** TEWL (podana v g/m<sup>2</sup>/h) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost ± SD na 5 prostovoljkih z zelo suho kožo.

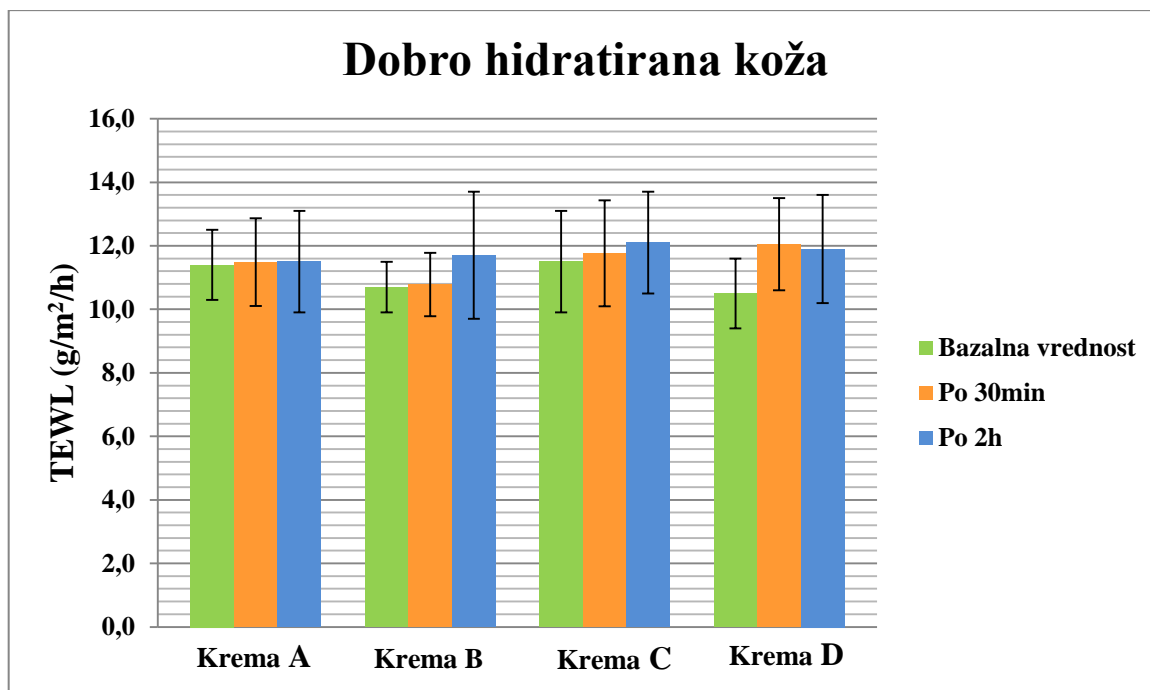
Na sliki 17 so prikazane vrednosti TEWL suhe kože pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Razvidno je, da se je vrednost TEWL zmanjšala po nanosu krem A, C in D, po nanosu kreme B pa je prišlo do rahlega povečanja (iz 10,0 g/m<sup>2</sup>/h na 10,4 g/m<sup>2</sup>/h po 2 urah) (statistično zanemarljivo zmanjšanje/povečanje). TEWL se je v primeru suhe kože najbolj zmanjšala 2 uri po nanosu kreme A (iz 10,5 g/m<sup>2</sup>/h na 9,9 g/m<sup>2</sup>/h), manj v primeru kreme C in D (iz 10,4 g/m<sup>2</sup>/h na 10,3 g/m<sup>2</sup>/h). Tudi pri prostovoljkih s suho kožo ni bistvenih sprememb v vrednostih 30 minut po nanosu krem in 2 uri po nanosu (statistično zanemarljive spremembe).





**Slika 17:** TEWL (podana v g/m<sup>2</sup>/h) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost ± SD na 10 prostovoljkah s suho kožo.

Na sliki 18 so prikazane vrednosti TEWL dobro hidratirane kože pred nanosom testiranih krem (bazalne vrednosti) ter 30 minut in 2 uri po njihovem nanosu. Iz slike 18 je razvidno, da se je vrednost TEWL povečala po nanosu vseh štirih testiranih krem (statistično zanemarljivo povečanje), in sicer se je TEWL v primeru dobro hidratirane kože najbolj povečala 2 uri po nanosu kreme D (iz 10,5 g/m<sup>2</sup>/h na 11,9 g/m<sup>2</sup>/h), nekoliko manj v primeru kreme B (iz 10,7 g/m<sup>2</sup>/h na 11,7 g/m<sup>2</sup>/h), sledi krema C (iz 11,5 g/m<sup>2</sup>/h na 12,1 g/m<sup>2</sup>/h), pri kremi A pa je prišlo do najmanjšega povečanja (iz 11,4 g/m<sup>2</sup>/h na 11,5 g/m<sup>2</sup>/h). Tudi pri dobro hidratirani koži smo opazili, da ni bistvenih sprememb v vrednostih TEWL za kremo A, C in D 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu, le pri kremi B je vrednost TEWL 30 minut po nanosu nekoliko nižja kot 2 uri po nanosu (statistično zanemarljive spremembe).



**Slika 18:** TEWL (podana v g/m<sup>2</sup>/h) pred nanosom kreme (bazalna vrednost), 30 minut po nanosu in 2 uri po nanosu na notranjo stran podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost ± SD na 5 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

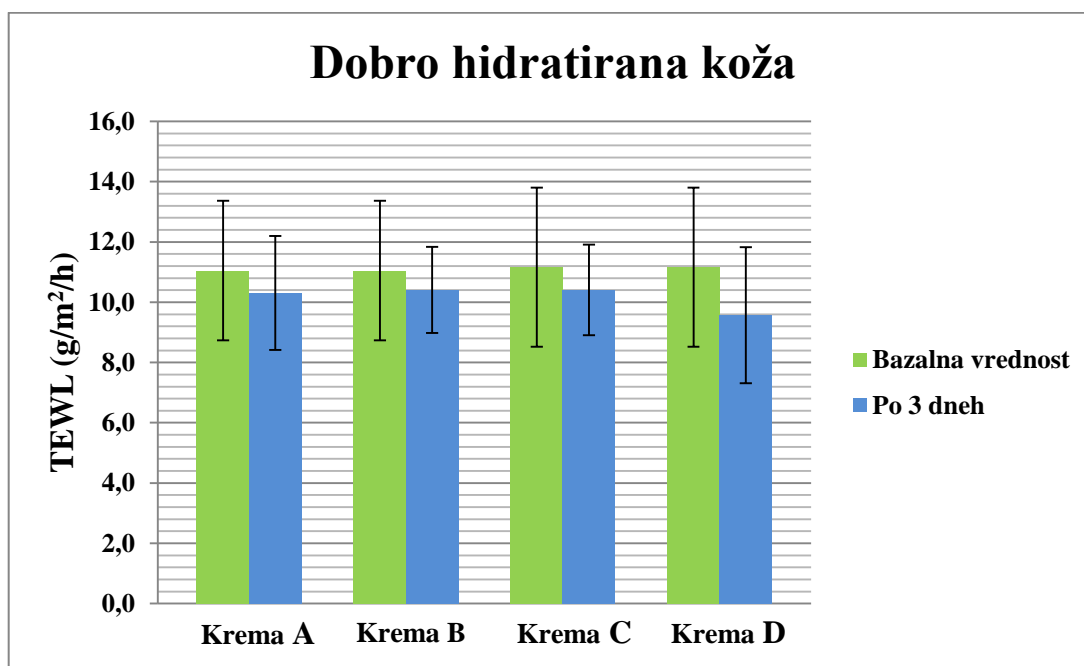
Nobena od štirih krem ni izrecno namenjena izboljšanju TEWL, kar se kaže kot zmanjšanje TEWL, iz tega razloga smo pričakovali, da ne bo velikih sprememb v vrednosti TEWL. Če bi se vrednosti močno povečale, potem bi to pomenilo, da so kreme porušile barierno funkcijo kože, kar pa seveda po nanosu kozmetičnega izdelka ni zaželeno. Prav tako ne sme priti do izrazitega zmanjšanja vrednosti TEWL, saj so vrednosti do 10 g/m<sup>2</sup>/h značilne in nujno potrebne za zdravo kožo in njeno normalno delovanje.

Do podobnih zaključkov sta v svoji študiji prišla tudi Moldovan in Ciortea, ki sta primerjala vpliv treh krem z različno sestavo na vrednost TEWL. Ugotovila sta, da tip formulacije ne vpliva na TEWL, saj ni prišlo do velikih razlik med preiskovanimi formulacijami. Prav tako sta ugotovila, da imajo kreme velik vpliv na TEWL takoj po nanosu, medtem ko po eni, dveh in treh urah ni bilo velikih sprememb v vrednosti TEWL (1). Takoj po nanosu so namreč vrednosti TEWL precej visoke, saj je naprava po vsej verjetnosti merila izhlapevanje vode iz kreme in ne iz kože.

#### TEWL po 3 dnevni uporabi krem

Iz slike 19, kjer so prikazane bazalne vrednosti TEWL dobro hidratirane kože ter vrednosti po 3 dnevni uporabi krem, je razvidno, da so rezultati TEWL drugačni kot 30 minut in 2

uri po nanosu (slike 16, 17 in 18). Po uporabi vseh štirih krem se je namreč vrednost TEWL po treh dneh zmanjšala (statistično zanemarljivo zmanjšanje). Povprečna bazalna vrednost TEWL dobro hidratirane kože je znašala  $11,2 \text{ g/m}^2/\text{h}$ . TEWL se je najbolj zmanjšala po uporabi kreme D in sicer na  $9,6 \text{ g/m}^2/\text{h}$  (16,6 % zmanjšanje), pri kremi A se je vrednost TEWL zmanjšala na  $10,3 \text{ g/m}^2/\text{h}$  (za 8,7 %), pri kremi B in C pa je prišlo po tridnevni uporabi krem do enakega zmanjšanja, in sicer na  $10,4 \text{ g/m}^2/\text{h}$  (7,20 % zmanjšanje). Ti rezultati pa se izključujejo z dejstvom, da večkratni nanos vlažilnih krem na normalno kožo ne vpliva na vrednost TEWL (29). Standardna deviacija je sicer precej visoka, kar pa je pričakovano glede na variabilnost med osebami in hkrati občutljivost TEWL. Za zanesljivejše podatke bi bilo potrebno meritve po 3 dnevni uporabi krem izvesti na več testnih osebah pod še bolj kontroliranimi pogoji.



**Slika 19:** TEWL (podana v  $\text{g/m}^2/\text{h}$ ) pred nanosom kreme (bazalna vrednost) in po 3 dneh uporabe krem na notranji strani podlakti v odvisnosti od uporabljene kreme. Rezultati so predstavljeni kot povprečna vrednost  $\pm$  SD na 5 prostovoljkah z dobro hidratirano kožo.

## 5 SKLEP

Izdelali smo štiri kreme, ki so se med seboj razlikovale glede na notranjo strukturo, in sicer sta bili kremi A in B na osnovi emulzijskega gela, medtem ko sta bili kremi C in D na osnovi lamelarnih tekočih kristalov. Vse štiri kreme so se sicer izkazale kot fizikalno stabilne z ustrežno pH vrednostjo za nanos na kožo in s primerno viskoznostjo.

S preliminarnim testiranjem hidratacije kože in vrednosti TEWL, ki sta merilo za oceno barierne funkcije kože, smo ugotovili, da:

- sta najboljši mesti za testiranje krem notranja stran podlakti in čelo;
- znaša optimalna količina kreme 5 mg na cm<sup>2</sup>;
- je optimalni čas merjenja hidratacije kože in TEWL 30 minut in 2 uri po nanosu krem v primeru ocene kratkotrajnega vpliva ter 3 dni po uporabi krem zjutraj in zvečer za oceno po daljšem časovnem obdobju.

V *in vivo* študiji na 20-ih prostovoljkah smo ugotovili, da:

- se je hidratacija kože na notranji strani podlakti povečala po nanosu vseh štirih krem, in sicer se je najbolj povečala pri zelo suhi koži (za 57,8 %), nekoliko manj pri suhi koži (za 30,6 %), najmanj pa pri dobro hidratirani koži (13,3 % povečanje);
- ni bistvenih sprememb v hidrataciji kože 30 minut po nanosu krem in 2 uri po nanosu krem;
- se je hidratacija kože bolj povečala po uporabi krem A in B, ki sta emulzijska gela kot po uporabi krem C in D, ki temeljita na tekočih kristalih. Razlika je najverjetneje posledica različne sestave krem, in sicer kremi A in B vsebujeta več emolientov in vlažilcev kot kremi C in D. Isti vzorec povečanja hidratacije kože se je pojavil tudi po 3 dnevni uporabi krem, ki smo jih na označena področja nanašali zjutraj in zvečer;
- smo s postopkom testiranja dokazali, da tudi kreme, ki vsebujejo lamelarne tekoče kristale, povečajo hidratacijo kože, vendar manj kot kreme na osnovi emulzijskega gela;
- se rezultati merjenja hidratacije na čelu razlikujejo od rezultatov na notranji strani podlakti, in sicer je na čelu prišlo do zmanjšanja hidratacije kože po nanosu vseh štirih krem. To pripisujemo dejstvu, da je na čelu prisotnih več lipidov in so

posledično izmerjene bazalne vrednosti višje, kot so v resnici. Po 3 dnevni uporabi krem na čelu pa so rezultati podobni rezultatom, pridobljenim na notranji strani podlakti, in sicer se je hidratacija kože povečala po uporabi vseh štirih krem;

- na hidratacijo kože bolj vpliva sestava krem kot njihova struktura.
- testirane kreme po enkratnem nanosu nimajo vpliva na TEWL (30 min in 2 uri po nanosu), po večkratni uporabi (po 3 dnevnem nanosu krem zjutraj in zvečer) pa so bile vrednosti TEWL nižje v primerjavi z bazalnimi vrednostmi. Vendar absolutne vrednosti TEWL niso precej nižje od bazalnih vrednosti, zato ne moremo zagotovo trditi, da se TEWL zmanjša po večkratni uporabi.

Pri izvajanju meritev smo se srečali s težavo zagotavljanja ustreznih pogojev, predvsem temperature okolja (velike razlike med zunanjo temperaturo in temperaturo v prostoru, kjer smo izvajali meritve). V prihodnje svetujemo preučevanje vpliva krem na TEWL v drugem letnem času (pomlad ali jesen), ko bodo vplivi zunanjih dejavnikov manjši.

Zaključimo lahko, da so vse štiri testirane kreme vplivale na barierno funkcijo kože, in sicer so vse štiri kreme izrazito povečale hidratacijo kože in ne vplivajo na vrednosti TEWL. Vse štiri testirane kreme so zato zelo primerne za vlažilno nego kože, najbolj pa hidratirajo zelo suho in suho kožo.

Za nadaljnje delo bi predlagali optimizacijo sestave krem C in D skupaj z uporabo natančnejše metode za vrednotenje notranje strukture tekočih kristalov.

## 6 LITERATURA

1. Moldovan M, Ciortea L: Efficacy evaluation of different cream formulations on healthy skin properties. *Farmacia* 2010; 58: 787-794.
2. Courage+Khazaka electronic GmbH: Information and operating instruction for the Corneometer CM825; 05/2010.
3. <http://www.eucerin.hr/o-kozi/osnovni-podaci-o-kozi/struktura-i-funkcija-koze> (dostop: 7.7.2016)
4. Freinkel RK, Woodley DT: *The biology of the skin*, The Parthenon Publishing group, New York, Carnforth Lancs., 2001: 87.
5. <http://www.nasa-lekarna.si/clanki/clanek/koza-in-zima/> (dostop: 7.7.2016)
6. Nolan K, Marmur E: Moisturizers: Reality and the skin benefits. *Dermatol Ther* 2012; 25: 229-233.
7. Verdier-Sévrain S: Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6: 75-82.
8. Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L: International guidelines for the *in vivo* assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Res Technol* 2013; 19: 265-278.
9. Mitsui T: *New cosmetic science*, Elsevier, Amsterdam, 1997: 25, 215.
10. Ferguson JS, Yeshanehe W, Matts P, Davey G, Mortimer P, Fuller C: Assessment of skin barrier function in pododermatitis: measurement of stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *Br J Dermatol* 2013; 168: 550-554.
11. Ramalho A, Silva CL, Pais AACC, Sousa JJS: *In vivo* friction study of human skin: Influence of moisturizers on different anatomical sites. *Wear* 2007; 263: 1044-1049.
12. Corcoran Flynn T, Petros J, Clark RE, E. Viehman G: Dry Skin and Moisturizers. *Clin Dermatol* 2001; 19: 387-392.
13. Fluhr JW, Cavallotti C, Berardesca E: Emollients, moisturizers, and keratolytic agents in psoriasis. *Clin Dermatol* 2008; 26: 380-386.
14. Iwai H, Fukasawa J, Suzuki T: A liquid crystal application in skin care cosmetics. *Int J Cosmet Sci* 1998; 20: 87-102.

15. Fehér A, Csányi E, Erös I: In situ forming lyotropic liquid crystalline systems containing metronidazole-benzoate. *J Drug Deliv Sci Technol* 2005; 15 (5): 343-346.
16. Gosenca M, Gašperlin M: Tekoči kristali v farmaciji: struktura in metode za fizikalno-kemijsko vrednotenje. *Farm Vestn* 2011; 62: 15-25.
17. Courage+Khazaka electronic GmbH: Information and operating instruction for the Tewameter TM 300; 07/2011.
18. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/139-tewameter#tm7> (dostop: 19.6.2016)
19. <http://www.zenitech.com/documents/Stability%20Testing.pdf> (dostop: 4.6.2016)
20. [http://www.makingcosmetics.com/Stability-Testing-of-Cosmetics\\_ep\\_59.html](http://www.makingcosmetics.com/Stability-Testing-of-Cosmetics_ep_59.html) (dostop: 4.6.2016)
21. Konrath M, Gorenflo J, Hübner N, Nirschl H: Application of magnetic bearing technology in high-speed centrifugation. *Chem Eng Sci* 2016; 147: 65-73.
22. <http://chemistscorner.com/the-importance-of-ph-in-cosmetic-formulation/> (dostop: 19.6.2016)
23. <http://skincarerx.com/article-ph> (dostop: 19.6.2016)
24. <http://chemistscorner.com/fluid-viscosity-for-the-formulation-chemist/> (dostop: 19.6.2016)
25. Pantelić I: Alkyl Polyglucosides: From Natural-Origin Surfactants to Prospective Delivery Systems, Elsevier Limited, Cambridge, Waltham, Kidlington, 2014: 21-52.
26. Tagami H: Electrical measurement of the hydration state of the skin surface *in vivo*. *Br J Dermatol* 2014; 171: 29-33.
27. Clarys P, Clijsen R, Taeymans J, Barel AO: Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825<sup>®</sup>) and the impedance method (Skincon-200EX<sup>®</sup>). *Skin Res Technol* 2011; 18: 316-323.
28. Barel AO (ed.), Paye M (ed.), Maibach HI (ed.): Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition, Informa Healthcare USA, New York, 2009: 91-101.

29. Sparr E, Milldcamps D, Isoir M, Burnier V, Larsson A, Cabane B: Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. *J R Soc Interface* 2013; 10: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0788>
30. Lodén M: Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 2012; 30: 286-296.
31. Mündlein M, Valentin B, Chabicovsky R, Nicolics J, Weremczuk J, Tarapata G, Jachowicz R: Comparison of transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. *Sens Actuators A Phys* 2008; 142: 67-72.