

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**KLARA KRAVOS**

**VPLIV HIALURONSKE KISLINE NA HIDRATACIJO KOŽE IN  
TRANSEPIDERMALNO IZGUBO VODE**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**KLARA KRAVOS**

**VPLIV HIALURONSKE KISLINE NA HIDRATACIJO KOŽE IN  
TRANSEPIDERMALNO IZGUBO VODE**

**EFFECT OF HYALURONIC ACID ON SKIN HYDRATION AND  
TRANSEPIDERMAL WATER LOSS**

UN KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag.farm.

Za pomoč pri pisanju bi se rada iskreno zahvalila prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm., ki me je spodbujala, usmerjala in mi pomagala pri celotni izdelavi diplomskega dela. Za podporo bi se rada zahvalila tudi družini, ki me je ves čas podpirala in mi dajala nove ideje. Prav tako bi se rada zahvalila vsem prostovoljkam: Olgi Jerkovič, Špeli Pišek, Anamariji Kravos in Klementini Kozoderc, ki so si vzele čas za klinično študijo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag.farm.

## VSEBINA

1	UVOD .....	1
1.1	ODKRITJE HIALURONSKE KISLINE .....	1
1.2	STRUKTURA HIALURONSKE KISLINE .....	2
1.2.1	KEMIJSKA STRUKTURA .....	2
1.2.2	STRUKTURA V RAZTOPINI .....	3
1.3	METABOLIZEM HIALURONSKE KISLINE .....	4
1.3.1	SINTEZA V KOŽI .....	4
1.3.2	KATABOLIZEM V KOŽI .....	5
1.4	RAZLIČNE METODE PRIDOBIVANJA HIALURONSKE KISLINE .....	5
1.4.1	EKSTRAKCIJA IZ ŽIVALSKIH TKIV .....	5
1.4.2	PROIZVAJANJE HA Z BAKTERIJAMI .....	6
1.4.3	<i>IN VITRO</i> ENCIMSKA PROIZVODNJA HA .....	7
1.5	HIALURONSKA KISLINA V KOŽI .....	8
1.5.1	ZUNAJCELIČNA IN ZNOTRAJCELIČNA HIALURONSKA KISLINA TER NJENI RECEPTORJI .....	8
1.5.2	EPIDERMALNA HA .....	9
1.5.3	DERMALNA HA .....	9
1.6	STARANJE KOŽE IN HIALURONAN .....	10
1.6.1	NOTRANJI DEJAVNIKI STARANJA .....	11
1.6.2	ZUNANJI DEJAVNIKI STARANJA .....	11
1.7	HIALURONSKA KISLINA KOT AKTIVNA UČINKOVINA .....	12
1.7.1	VLAŽILNE LASTNOSTI .....	13
1.7.2	DERMALNO POLNILO .....	14
2	NAMEN DELA .....	15
3	MATERIALI IN METODE .....	15
3.1	Materiali .....	15
3.2	Priprava raztopin z različnimi koncentracijami HA .....	16

3.3	Metode in pogoji meritev.....	17
3.3.1	REOLOŠKE MERITVE .....	17
3.3.2	KLINIČNA ŠTUDIJA NA PROSTOVOLJCIH.....	19
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	23
4.1	REZULTATI REOLOŠKIH MERITEV .....	23
4.2	REZULTATI KLINIČNE ŠTUDIJE.....	33
5	SKLEP.....	40
	LITERATURA.....	41

## KAZALO SLIK

Slika 1: Ponavljajoča se disaharidna enota iz D-glukuronske kisline in D-N-acetilglukozamina, ki sestavlja primarno strukturo polimerne molekule hialuronske kisline (5) .....	3
Slika 2: Sinteza HA v bakteriji <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (8) .....	7
Slika 3: Shematski prikaz merilnega sistema stožec-ploščica.....	17
Slika 4: Shematski prikaz grafa pri amplitudnem testu, iz katerega je razvidno linearno viskoelastično območje .....	18
Slika 5: Shematski prikaz rezultatov frekvenčnega testa, kjer opazujemo modula $G'$ in $G''$ ...	19
Slika 6: Prikaz označevanja leve podlahti. ....	20
Slika 7: Princip delovanja Corneometra, ki na podlagi spremembe kapacitance v odvisnosti od dielektrične konstante kože, poda informacijo o vlažnosti kože .....	21
Slika 8: Prikaz merjenja hidratacije s sondo, ki je med merjenjem postavljena pravokotno na površino kože (19) .....	22
Slika 9 : Odprta celica s senzorjema za temperature in relativno vlažnost, ki merita gostoto toka vodnih hlapov (20) (levo) .....	23
Slika 10: Merjenje izgube vode s Tewametrom (desno) .....	23
Slika 11: Spreminjanje viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti in koncentracije HA v vzorcu .....	24
Slika 12: Spreminjanje strižne napetosti v odvisnosti od strižne hitrosti (reogram) .....	25
Slika 13: Struktura polimerne molekule v raztopini (polimerni klobčič), ki smo jo obremenili s strižno hitrostjo (iztegnjene polimerne verige).....	26
Slika 14: Viskoznost različnih koncentracij HA pri konstantni strižni hitrosti 53,1 1/s .....	26
Slika 15: Viskoznost vzorcev s koncentracijo nad 0,3% z linearno regresijsko premico .....	27
Slika 16: Ampitudni test pri oscilacijskih meritvah iz katerega je razvidna maksimalna amplitudna obremenitve vzorcev z 0,8% in 0,9% HA .....	28
Slika 17: Spreminjanje elastičnega modula $G'$ in viskoznega modula $G''$ v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri svežih vzorcih (koncentracije od 0,1 do 0,5%) .....	29
Slika 18: Spreminjanje elastičnega modula $G'$ in viskoznega modula $G''$ v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri svežih vzorcih (koncentracije od 0,5 do 1%) .....	30
Slika 19: Spreminjanje elastičnega modula $G'$ in viskoznega modula $G''$ v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri staranih vzorcih (koncentracije od 0,1 do 0,5%).....	31

Slika 20: Spreminjanje elastičnega modula $G'$ in viskoznega modula $G''$ v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri staranih vzorcih (koncentracije od 0,5 do 1%).....	32
Slika 21: Primerjava normalne hidratacije kože z hidratacijo kjer je bila nanešena 1% HA na levi in desni roki vseh petih prostovoljk (P1-P5) .....	36
Slika 22: Spreminjanje hidratacije na desni roki pri treh prostovoljkah v odvisnosti od viskoznosti sistema pri strižni hitrosti 53,1 1/s pri koncentracijah od 0,1% do 1% (z leve proti desni) .....	37
Slika 23: Primerjava transepidermalne izgube vode na desni roki, kjer ni bilo nanešenega vzorca in kjer je bil nanešen vzorec s koncentracijo 1% pri vseh petih prostovoljkah (P1-P5)	39

## **KAZALO TABEL**

Tabela I: Vpliv notranjega in zunanjega (fotostaranja) staranja na izgled, različne biološke funkcije in plasti kože (10) .....	10
Tabela II: Postopek priprave različnih koncentracij HA za uporabo pri reoloških meritvah in klinični študiji.....	16
Tabela III: Primer razlage arbitrarnih enot pri merjenju hidratacije s Corneometrom.....	21
Tabela IV: Interpretacija TEWL vrednosti, izmerjenih s Tewametrom.....	22
Tabela V: Rezultati merjenja hidratacije s Corneometrom v arbitrarnih enotah CM pri 5 prostovoljkah .....	34
Tabela VI: Povprečne vrednosti meritev izgube vode na levi in desni roki pri različnih koncentracijah.....	38

## POVZETEK

Hialuronska kislina je molekula, ki se čedalje več uporablja v negovalnih kozmetičnih izdelkih kot aktivna učinkovina. V izdelkih ima različno vlogo, njena primarna funkcija pa je dobro vlaženje kože in upočasnjevanje oziroma prikrivanje znakov staranja. Ravno zaradi omenjenih lastnosti je povpraševanje po negovalnih kozmetičnih izdelkih, ki vsebujejo hialuronsko kislino vedno večje. V okviru diplomskega dela smo raziskovali reološke lastnosti vodnih raztopin hialuronske kisline, vlažilne lastnosti in zmožnosti zadrževanja vode v koži.

Za reometrijo smo pripravili vzorce z masno koncentracijo od 0,1% do 1% hialuronske kisline v vodi in nato na reometru izmerili viskoznost ter viskoelastične lastnosti. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da koncentracija vpliva na viskoznost, in sicer se je s povečevanjem koncentracije zvišala. Iz reograma sem razbrala tudi, da gre za psevdoplastičen sistem. Z rezultati meritev rotacije pa sem ugotovila, da sistem neodvisno od koncentracije, izkazuje bolj viskozne kot elastične lastnosti. Iz tega lahko sklepamo, da višja koncentracija hialuronske kisline v izdelku, daje le temu večjo viskoznost. Prav tako bodo nastale raztopine oziroma izdelki izkazovali bolj viskozne kot elastične lastnosti.

V drugem delu pa smo na skupini petih prostovoljcev s Corneometrom ugotavljali kakšne vlažilne sposobnosti ima hialuronska kislina, v odvisnosti od koncentracije in kakšne so njene sposobnosti zadrževanja vode v koži s Tewametrom. Pri tem moram poudariti, da je bilo merjenje z omenjenima napravama zelo zahtevno, saj napravi potrebujeta kontrolirano statično okolje (konstanta temperatura in vlažnost). Pri opravljanju meritev smo sicer poskusili te pogoje čimbolj kontrolirati, vendar ti niso bili konstanti, zato so pridobljeni rezultati med seboj malo varirali. Kljub temu smo iz njih lahko razbrali določene povezave. Ugotovili smo, da je bila v primerjavi s kontrolo, po nanosu raztopin s hialuronsko kislino vlažnost kože višja. Prav tako se je zmanjšala transepidermalna izguba vode, predvsem pri višjih koncentracijah, kjer je hialuronska kislina na koži tvorila tanek film. Iz tega lahko sklepamo, da hialuronska kislina v višjih koncentracijah izkazuje boljše vlažilne lastnosti na koži.

**Ključne besede:** hialuronska kislina, reološke lastnosti, vlaženje, kozmetični izdelki za zaviranje staranja



## SEZNAM OKRAJŠAV

HA	hialuronska kislina (angl.: hyaluronic acid)
ECM	zunajcelični matriks (angl.: extracellular matrix)
GAG	glikozaminoglikan
HAS	hialuronan sintaza (angl.: hyaluronan synthase)
GlcUA	glukuronska kislina (angl.: glucuronic acid)
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin (angl.: <i>N</i> -acetylglucosamine)
UDP	uridin difosfat (angl.: uridine diphosphate)
UDP-GlcUA	uridin difosfat glukuronska kislina (angl.: uridine diphosphoglucuronic acid)
UDP-GlcNAc	uridin difosfat <i>N</i> -acetilglukozamin (angl.: uridine diphosphate <i>N</i> -acetylglucosamine)
$M_w$	molekulska masa (angl.: molecular weight)
HYAL	hialuronidaza (angl.: hyaluronidase)
CD44	transmembranski receptor za hialuronan na večini sesalskih celic (angl.: cluster of differentiation)
RHAMM	znotrajcelični, redko zunajcelični, receptor za hialuronan (angl.: hyaluronan-mediated motility receptor)
UV	ultravijolično
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl.: reactive oxygen species)
m/V	koncentracija izražena kot masni delež v %
LVR	linearno viskoelastično območje (angl.: linear viscoelastic region)
RH	relativna vlažnost v % (angl.: relative humidity)
TEWL	transepidermalna izguba vode (angl.: transepidermal water loss)

## **1 UVOD**

Koža je velik in kompleksen organ, ki preko različnih funkcij, tudi zaščitnih, komunicira z okoljem (1). Celotno življenje je izpostavljena različnim zunanjim dejavnikom kot so ultravijolično sevanje, izpušni plini, spremembe temperature okolja, obrazna mimika, zato se njen izgled in funkcionalnost s časom spreminjata, spremembe pa odražajo tudi splošno zdravstveno stanje posameznika (2).

Želja večine ljudi je ohranjanje mladostnega videza oziroma ohranjanje mlade, čvrste, gladke in mehke kože (2). V koži imamo mnogo dejavnikov, ki na različne načine zagotavljajo koži dovolj vlage in to ohranjajo čvrsto in napeto. Med te uvršamo tudi hialuronsko kislino (HA), ki je del naravnega vlažilnega faktorja kože, posredno pa vpliva tudi na mehanizme, ki koži omogočajo čvrst in gladek izgled. S poznavanjem njenega kemizma, metabolizma, sinteze, vloge v koži in interakcij z drugimi komponentami (3) je HA molekula, ki se lahko uporablja v kozmetičnih izdelkih z namenom ohranjanja hidratirane in napete kože. Poleg kozmetične uporabe se njene lastnosti izkoriščajo tudi v estetski kirurgiji kot dermalno polnilo in na različnih področjih medicine (4).

### **1.1 ODKRITJE HIALURONSKE KISLINE**

Leta 1841 je nemški anatom Henle ugotovil, da se med celicami nahaja amorfná snov in to poimenoval kot temeljna/osnovna substanca. Raziskovanje osnovne substance se je intenzivneje začelo po letu 1928 in kmalu so raziskovalci ugotovili, da je ta sestavljena iz polisaharidov. Te so po predlogu Karla Mayerja poimenovali mukopolisaharidi, kar se nanaša na proste in na proteine vezane sladkorne polimere, ki sestavljajo osnovno substanco (4). Danes le to poznamo pod imenom zunajcelični matriks (ECM), ki je visoko organizirana struktura, sestavljena iz glikozaminoglikanov (mukopolisaharidov), proteoglikanov, glikoproteinov, peptidnih rastnih dejavnikov in strukturnih proteinov, kot sta naprimer kolagen in elastin (1). Leta 1934 sta Karl Mayer in njegov sodelavec John Palmer iz ECM, ki se nahaja v steklovini očesa, izolirala do takrat nepoznano substanco in jo poimenovala hialuronska kislina. Ime prihaja iz uronske kisline in besede hyalos, ki je grškega izvora in pomeni steklo (3). Prva uporaba HA v medicinske namene sega v leto 1950, ko so jo uporabili za nadomeščanje steklovine očesa. Popolna kemijska zgradba HA je bila odkrita 20 let po

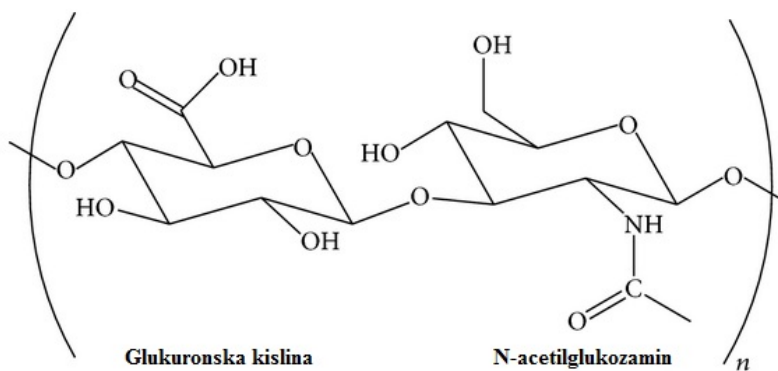
izolaciji. Sestavljena je iz ponavljajočih se disaharidnih enot, ki tvorijo polimerno molekulo, katere celokupna molekulska masa ( $M_w$ ) lahko znaša več milijonov Daltonov (4). Kmalu za tem je sledilo spoznanje, da se HA nahaja po celem telesu pri skoraj vseh vretenčarjih (1). Ker se HA v telesu nahaja tako v obliki soli kot kisline, so leta 1986 uvedli mednarodno ime hialuronan, ki zajema vse oblike, ki jih HA lahko zavzame. Z vstopom v moderno dobo in razvojem novih tehnologij je HA, do tedaj znana kot pasivna komponenta ECM postala substanca, ki ima mnoge biološke funkcije v telesu. Raziskovalci so ugotovili, da je vpletena v embriogenezo, maligne procese, celjenje ran, angiogenezo, vnetja in da sodeluje pri celičnem gibanju ter signaliziranju. Z razvojem molekularne genetike je bil znan tudi metabolizem HA. Sintezo omogoča encim hialuroan sintaza, hialuronidaze pa so encimi, ki sodelujejo pri njenem katabolizmu (3).

## 1.2 STRUKTURA HIALURONSKE KISLINE

HA je anionski polisaharid z visoko molekulkso maso, ki ima kljub svoji monotoni zgradbi mnogo različnih in pomembnih fizioloških funkcij. V odvisnosti od velikosti molekule, koncentracije, pH okolja in prisotnosti kationov v okolici, lahko v telesu zavzema različne oblike in konfiguracije, največkrat pa se nahaja v obliki soli – hialuronata (1).

### 1.2.1 KEMIJSKA STRUKTURA

Disaharid, ki sestavlja HA, je zgrajen iz dveh enot: D-glukuronske kisline (GlcUA) in D-N-acetilglukozamina (GlcNAc). Te so med seboj povezane z alternirajočimi  $\beta$ -1,4 in  $\beta$ -1,3 vezmi, kar prikazuje slika 1. Prostorska urejenost sladkorjev, ki sestavljajo HA, je zelo podobna glukozi, pri kateri so manjše skupine, npr. vodikovi atomi, na sterično manj ugodnih aksialnih pozicijah, večje skupine, npr. hidroksilne in ostanki karboksilnih skupin, pa na sterično bolj ugodnih ekvatorialnih položajih. Takšna struktura omogoča HA dobro sterično in energetsko stabilnost (3).



**Slika 1:** Ponavljajoča se disaharidna enota iz D-glukuronske kisline in D-N-acetilglukozamina, ki sestavlja primarno strukturo polimerne molekule hialuronske kisline (5)

HA, ki je pod elektronskim mikroskopom viden kot dolg linearen polimer, je najenostavnejši glikozaminoglikan (GAG), ki ni vezan na proteinsko jedro, ni sintetiziran s pomočjo Golgijevega aparata in je edini nesulfatiran GAG. GAG ali mukopolisaharidi so linearni polisaharidi, sestavljeni iz ponavljajočih se disaharidnih enot, proteoglikani pa so mukopolisaharidi, vezani na jedrni protein. Zaradi tega je HA edini GAG, ki ga ne moremo uvrstiti tudi med proteoglikane (1).

Primarno sktrukturo HA torej predstavljajo ponavljajoči se disaharidi, ki jih lahko posamezna molekula HA vsebuje 10 000 ali več. Povprečna dolžina molekule je 1 nm; če pa ta vsebuje več tisoč disaharidnih enot, pa doseže dolžino tudi do nekaj  $\mu\text{m}$ . Sekundarno strukturo stabilizirajo vodikove vezi in hidrofobne interakcije, ki so pomembne tudi za trdno terciarno strukturo. Supramolekularno strukturo pa predstavljajo posamezne paralelno urejene molekule HA, ki tvorijo ploščate ali tubularne strukture, ki se medseboj prepletejo v kompleksno organizirano mrežo (1).

### 1.2.2 STRUKTURA V RAZTOPINI

V fiziološki raztopini na strukturo vplivajo interakcije s topilom. Aksialno vezani vodikovi atomi tvorijo nepolarno, hidrofobno območje verige, ekvatorialno postavljene različne stranske skupine pa polarno, hidrofilno območje. HA se pri fiziološkem pH uredi v zvito, prepleteno strukturo, kar daje raztopinam posebne reološke lastnosti. Že pri nizkih koncentracijah pride do opaznega povečanja viskoznosti; takšna raztopina spominja na želatino, kljub temu pa ob obremenitvi z lahkoto steče. Zaradi posebnih reoloških lastnosti, ki

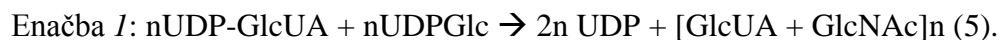
jih HA daje raztopinam, so te zelo dobri lubrikanti. Kot omenjeno, tvori HA zgoščeno helikalno strukturo, kar omogoča, da se v verigo HA vključijo velike količine vode (4). Omenjeni lastnosti sta ključni za mnoge biološke funkcije hialuronana, ki se v visokih koncentracijah nahaja v mehkih vezivnih tkivih, predvsem v koži, kjer je eden izmed najpomembnejših naravnih vlažilcev (1).

### 1.3 METABOLIZEM HIALURONSKE KISLINE

HA je molekula, ki jo najdemo pri skoraj vseh vretenčarjih po celotnem telesu. Ocenjeno je bilo, da 70 kilogramski človek vsebuje 15 g HA, od katere se je dnevno katabolizira in na novo sintetizira tretjina. Sama sinteza poteka na plazemski membrani tako evkariontskih kot prokariontskih celic. Sintetizirana se nato prenese v ECM, v redkih primerih pa obstaja tudi intracelularno (5). HA je metabolno zelo aktivna molekula z razpolovno dobo 3-5 min v krvi in manj kot en dan v koži, za sam katabolizem pa so v večini primerov odgovorni encimi hialuronidaze (HYAL), lahko pa pride do ne-encimske razgradnje z radikali (1).

#### 1.3.1 SINTEZA V KOŽI

V živih organizmih se HA tvori z encimi, ki jih imenujemo hialuronan sintaze (HAS). Ti encimi katalizirajo sintezo z izmeničnim dodajanjem GlcUA in GlcNAc na nastajajočo verigo, pri čemer kot substrate uporabljajo nukleotidne sladkorje: uridin difostat (UDP)-glukuronsko kislino (UDP-GlcUA) in UDP-N-acetilglukozamin (UDPGlc), kar prikazuje enačba 1. Kot že omenjeno, je število (n) disaharidnih enot v molekuli HA lahko različno, od česar je odvisna molekulska masa HA in njene lastnosti. HA z visoko  $M_w$  ( $M_w > 5 \times 10^5$  Da) deluje antiangiogeno, imunosupresivno in zapolnjuje prostor med celicami. HA s srednje dolgo verigo je vpletena v ovulacijo, embriogenezo in celjenje ran. Manjše molekule in oligomeri HA pa delujejo vnetno, imunostimulatorno, angiogeno in anti-apoptotično.



Pri sesalcih so bili do zdaj odkriti trije geni, ki kodirajo različne hialuronan sintaze: HAS-1, -2 in -3. Encimi se med seboj razlikujejo glede na to, kako dolgo verigo sintetizirajo, kakšna je porazdelitev velikosti molekul in kaj povzroči njihovo izražanje. V koži, v epidermisu in dermisu, izražanje genov za HAS-1 in -2 uravnava transformirajoči rastni dejavnik  $\beta 1$  (TGF-

$\beta$ 1). V dermisu se v večini izraža gen za encim HAS-2. Izražanje HAS-2 in HAS-3 lahko stimulira tudi kerationocitni rastni dejavik, HAS-2 pa še interlevkinom-1 $\beta$  in tumor nekrotizirajoči faktor  $\alpha$  (6).

### 1.3.2 KATABOLIZEM V KOŽI

Kot že omenjeno, je HA metabolno zelo aktivna molekula. V krvnem obtoku je razpolovni čas HA 3-5 min, v koži pa manj kot en dan. Razgradnja v telesu lahko poteka encimsko ali neencimsko (6). Encimsko razgradnjo omogočajo encimi HYAL,  $\beta$ -D-glukuronidaze in  $\beta$ -N-acetil-heksozaminidaze. HYAL razgradijo HA na krajše fragmente s hidrolizo  $\beta$  vezi med sladkornimi enotami, ostala omenjena encima pa fragmente razgradita do oligosaharidnih ostankov, tako da odstranjujeta sladkorje na nereducirajočem koncu verige (4). Zaradi težavne identifikacije, izolacije in nestabilnosti hialuronidaz so raziskovalci šele pred kratkim odkrili, da obstajajo različne oblike teh encimov; do sedaj je poznanih 6: HYAL-1, -2, -3, -4, PH-20 in HYALP1. Neencimsko pa pride do razgradnje HA z radikali ob prisotnosti reducirajočih snovi, kot so npr. askorbinska kislina, tioli, železovi ali bakrovi ioni. Zaenkrat še ni znano, kateri izmed omenjenih encimov razgrajujejo HA v dermisu in epidermisu, bi pa to lahko bil dober pristop za ohranjanje ustrezne integritete in vlažnosti kože (6).

## 1.4 RAZLIČNE METODE PRIDOBIVANJA HIALURONSKE KISLINE

Glede na to kateri mikroorganizmi ali živali so zmožne sinteze HA oz. le to vsebujejo, imamo več možnosti pridobivanja: ekstrakcija iz živalskih tkiv, proizvodjanje HA z bakterijami in *in vitro* proizvodnja HA z encimi (5).

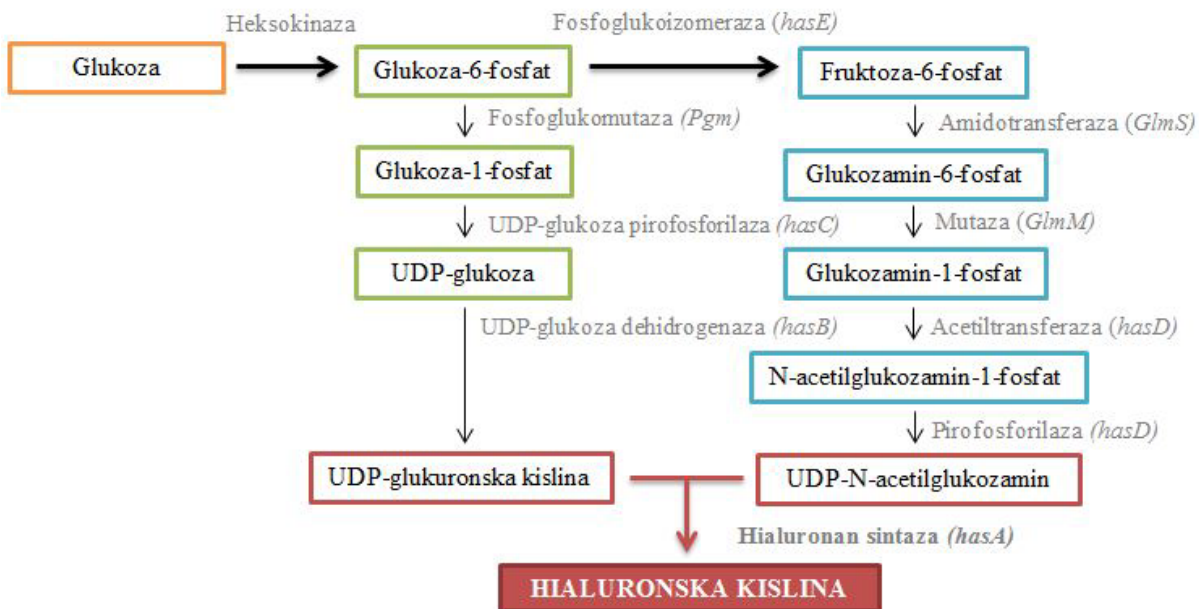
### 1.4.1 EKSTRAKCIJA IZ ŽIVALSKIH TKIV

Prva metoda, ki so jo uporabljali za proizvodjanje na industrijskem nivoju in se uporablja še danes, je ekstrakcija iz živalskih tkiv. HA, izolirana iz različnih tkiv, je navadno polidisperzna, z visoko molekulsko maso in je uporabna za kozmetične in medicinske namene. V preteklosti se jo izolirali iz steklovine očesa, popkovine, prašičje kože, perikardne tekočine zajcev, hrustančnega tkiva morskih psov, idr. Danes glavne vire, ki omogočajo pridobivanje velikih količin HA, predstavljajo človeška popkovina, petelinji grebeni, živalska steklovina očesa in goveja sinovijska tekočina. Metoda ima številne prednosti, vendar je sam postopek ekstrakcije

HA iz tkiv zahteven, zato ker se v telesu velikokrat nahaja v kompleksu z drugimi biopolimeri. To danes ne predstavlja več prevelike ovire, saj se za sprostitev iz kompleksov uporabljajo proteolitični encimi (npr. papain, pepsin, tripsin in drugi), obarjanje z organskimi topili ali cetilpiridinijevim kloridom, detergenti in druge metode. Za odstranjevanje drugih nečistot se uporabljajo ultrafiltracija in kromatografske metode, membranska filtracija pa se uporablja za odstranitev mikroorganizmov. Slabost je tudi variabilnost produkta, kontaminacija s proteini, nukleinskimi kislinami in virusi ter dolgotrajnost postopka. Prednosti metode so: velik izbor izhodnega materiala in dobro vzpostavljena tehnologija pridobivanja ter da je produkt, ki ga dobimo, popolnoma naraven (5).

#### 1.4.2 PROIZVAJANJE HA Z BAKTERIJAMI

Metoda, ki se je prvič pojavila okoli leta 1960 in je danes vodilna za pridobivanje visokomolekularne HA, je proizvodnja z bakterijsko fermentacijo. Bakterije proizvajajo hialuronan v kapsuli in ga uporabijo za enkapsuliranje svojih celic, s čemer se izognejo imunskemu odzivu gostitelja, ki ga okužijo. Imunski sistem gostitelja, npr. človeka, se ne odziva na takšen mikroorganizem, saj je HA, ki obdaja bakterijsko celico, identična človeški, kar omogoča uporabo tako pridobljene HA na področju kozmetologije in medicine (5). HA so v veliki meri zmožne sintetizirati gram-pozitivne bakterije rodu *Streptococcus* razreda A in C; gre za  $\beta$  hemolitične mikroorganizme, ki so lahko patogeni za človeka. Med patogene mikroorganizme uvrščamo še gram-negativno bakterijo *Pasturella multocida* (7). Iz varnostnih razlogov se več uporabljajo za človeka ne-patogeni genetsko modificirani mikroorganizmi: *Escherichia coli*, rod *Agrobacterium*, *Lactococcus lactis* in *Bacillus subtilis*. Zdaleč največ pa se uporablja *Streptococcus zooepidemicus*, ki pod kontroliranimi pogoji omogoča pridobivanje HA v visokih koncentracijah, 6-7 g/l (5). Kot sem že omenila, je sinteza zelo kompleksen proces, ki pri vretenčarjih še ni popolnoma odkrit. Nedavno pa so raziskovalci pojasnili sintezno pot v bakteriji *Streptococcus zooepidemicus*, kar prikazuje slika 2 (8).



**Slika 2:** Sinteza HA v bakteriji *Streptococcus zooepidemicus* (8)

Slabost te sinteze predstavlja omejenost uporabe mikroorganizmov - patogeni so lahko nevarni, a proizvajajo velike količine HA, genetsko modificirani pa so varni, a proizvajajo manjše količine HA. Pri tej metodi vedno obstaja nevarnost za kontaminacijo produktov z bakterijskimi endotoksini ali drugimi kontaminanti. Količina proizvedene HA je v primerjavi z ekstrakcijo iz živalskih tkiv večja, kar predstavlja prednost, poleg tega sta metoda in proces pridobivanja enostavna in dobro kontrolirana, kar pomeni da je tehnologija zelo primerna za proizvodnjo HA tudi na industrijskem nivoju (5).

#### 1.4.3 *IN VITRO* ENCIMSKA PROIZVODNJA HA

V zadnjem desetletju se je pojavila nova metoda, encimska proizvodnja HA. Gre sitntezo HA z izoliranimi HAS, ki katalizirajo polimerizacijo prekursorjev hialuronana *in vitro* pri točno določenih pogojih. Encimi HAS so izolirani iz bakterij *Streptococcus pyogenes* in *Pasturella multocida*, za ekspresijski organizem pa se največkrat uporablja rekombinantna *E.coli*. Takšen način sinteze nam omogoča podaljševanje že obstoječih verig hialuronana ali pa sinteze *de novo*. Omenjena metoda je dokaj nova in v fazi razvoja, zato še ni uporabna na industrijskem nivoju, ima pa nekaj pomembnih prednosti pred prej omenjenima metodama. Omogoča kontrolirano sintezo monodisperznega hialuronana z nizko ali visoko molekulso maso,



možnost kontaminacije je minimalna, dobljeni produkt pa je vedno enak, omogočena je torej konstantna kakovost (5).

## 1.5 HUALURONSKA KISLINA V KOŽI

Da bi razumeli, kaj se dogaja s HA v telesu, predvsem v koži, je pomembno, da vemo, kje se le ta nahaja, kakšna je njena vloga in kako komunicira z okoljem (1).

### 1.5.1 ZUNAJCELIČNA IN ZNOTRAJCELIČNA HIALURONSKA KISLINA TER NJENI RECEPTORJI

Celice v našem telesu obdaja ECM, ki je sestavljen pretežno iz strukturnih proteinov, kot sta kolagen in elastin, vsebuje pa tudi glikoproteine, proteoglikane in glikozaminoglikane, med slednje uvrščamo tudi HA. HA ima v ECM mnogo funkcij, deluje kot organizator ECM, predstavlja ogrodje, okoli katerega se razporejajo druge makromolekule ECM in kar je glavno, z vezavo na rastne dejavnike sodeluje pri proliferaciji celic, njihovem gibanju ter le te ohranja v nediferenciranem, pluripotentnem stanju. Koža vsebuje več kot 50% celotnega hialuronana v telesu, kjer je njena glavna vloga, da veže vodo in s tem ohranja kožo hidratirano in napeto (1). Nedavno so raziskovalci ugotovili, da se HA ne nahaja samo med celicami, ampak tudi v citoplazmi ali jedru celic. Funkcija znotra celičnega hialuronana je uravnavanje celičnega cikla in transkripcije genov. Čeprav je omenjena funkcija pomembna, je znotrajcelične HA v primerjavi z zunajcelično mnogo manj (3).

Omenila sem že, da so lastnosti in biološke funkcije HA v telesu odvisne od njene velikosti, pomembne pa so tudi interakcije z drugimi molekulami. HA se v telesu nahaja v različnih stanjih, v ECM je reverzibilno povezana s proteoglikani in proteinskimi molekulami, lahko je pripeta na celice preko receptorjev ali pa se nahaja v prosti obliki. HA je velikokrat preko elektrostatskih ali kovalentnih vezi povezana s proteini, ki jih imenujemo hialadherini (6). Znanih je mnogo proteinov, ki vežejo HA, npr. rastni dejavniki in kolagen, in se nahajajo na različnih mestih po celem telesu, tako zunajcelično kot znotrajcelično, ali pa so pripeti na celično površino. Med hialadherine uvrščamo tudi proteine, ki vežejo HA na celično površino, med temi sta najbolj pomembna transmembranski receptor 44 (CD44) in znotrajcelični receptor za hialuronsko kislino (RHAMM). CD44 je glikoprotein, ki ga kodira samo en gen, najdemo pa ga lahko v najrazličnejših oblikah, nahaja se na skoraj vseh celicah v telesu, razen

eritrocitih. Katere oblike omenjenega receptorja se nahajo v koži, še ni bilo opisano, histološko pa je bilo ugotovljeno, da se nahajajo tako v epidermisu kot v dermisu. Interakcije med CD44 in HA imajo pomembno vlogo pri adheziji celic, njihovi migraciji skozi ECM, aktivaciji in metastaziranju. Drug receptor je RHAMM receptor, ki se prav tako v različnih oblikah nahaja na celicah v telesu, tudi v koži. Interakcije med RHAMM in HA so odgovorne predvsem za premikanje celic in njihovo rast (3).

### 1.5.2 EPIDERMALNA HA

Do nedavnega je bilo mnenje znanstvenikov, da se HA nahaja le v dermisu, kjer naj bi jo proizvajale le celice mezenhimskega izvora, kot so na primer fibroblasti. Pred nedavnim so s pomočjo naprednih tehnik ugotovili, da se ta nahaja tudi v epidermisu (3). Epidermis je sestavljen iz več plasti, prvo plast sestavljajo žive celice, ki jih imenujemo keratinociti, plast pa se imenuje bazalna plast (9). V tej plasti se HA nahaja znotrajcelično. Keratinociti iz bazalne plasti dozorevajo in potujejo proti vrhnjim plastem kože, pri čemer se določena količina HA izloči med celice. V višjih plasteh se torej HA nahaja zunajcelično. V bazalni plasti naj bi bil znotrajcelični hialuronan odgovoren za celični cikel keratinocitov, medtem ko naj bi bil zunajcelični hialuronan v višjih plasteh vpleten v proces luščenja celic na površini kože in ohranjanja ustrezne hidratiranosti. V procesu diferenciacije keratinocitov celice dozorevajo, za kar so pomembni mnogi dejavniki, med drugim tudi lamelarna telesca, ki vsebujejo različne snovi. Lamelarna telesca se nahajajo v granulozni plasti v keratinocitih in izločajo lipide v višje plasti kože (3). Zadnja plast kože je rožena plast, ki je sestavljena iz dozorelih celic, korneocitov in lipidov, takšna struktura predstavlja bariero za snovi, da bi prehajale iz kože ali v njo (9). Izločanje lipidov v granulozni plasti je torej zelo pomemben faktor, ki preprečuje izgube vode, vezane na HA iz globljih plasti kože in jo s tem ohranja dobro hidratirano in vitalno (3).

### 1.5.3 DERMALNA HA

Večje količine HA se nahajajo v dermisu. Dermis sestavlja zgornja papilarna plast, ki vsebuje več HA kot spodnja retikularna plast. Epidermalna HA je v stiku le s celicami, med katerimi se nahaja, v dermisu pa se poleg celic nahajajo že žilni in živčni pleteži ter limfni sistem. Dermalna HA je torej v stalnem kontaktu z žilnim in limfnim sistemom. V tej plasti kože so za

sintezo odgovorni fibroblasti. Eksogena HA se v dermisu hitro razgradi in odstrani iz njega, ravno zaradi povezave s krvnim in limfnim sistemom, zato bi bil za povečevanje hidratacije kože bolj primeren dermalni pristop stimulacija fibroblastov, da proizvajajo večje količine HA (3).

## 1.6 STARANJE KOŽE IN HIALURONAN

Koža je največji človeški organ in predstavlja približno šestino telesne teže človeka. Pod vplivom zunanjih in notranjih dejavnikov, ki kožo preko različnih mehanizmov postopno starajo, se njen izgled in funkcionalnost spreminjata. Glavne spremembe med staranjem so povzete v tabeli I. HA predstavlja molekulo, ki vpliva na nekatere biološke funkcije kože, ki so povezane s staranjem, predvsem na pojavnost suhe kože in manjših gub. Mehanizem, s katerim HA preprečuje omenjena pojava je, da v prosti obliki veže velike količine vode, s tem zapolnjuje prostore med celicami in kožo napne, posledično se zgladijo plitve gube, z vezavo vode pa ohranja tudi ustrezno hidratiranost. Pomembno je torej, da vemo, kaj se dogaja s HA in kožo pod vplivom zunanjih in notranjih dejavnikov, saj lahko na podlagi teh nekatere znake in proces staranja upočasnimo (10).

**Tabela I:** Vpliv notranjega in zunanega staranja na izgled, različne biološke funkcije in plasti kože (10)

	Notranje staranje	Fotostaranje
<b>Splošno</b>		
metabolni procesi	upočasnjeni	znatno pospešeni
klinična slika	gladka, nepoškodovana koža s prisotnimi finimi gubami	globoke gube in brazde, usnjata na dotik, marogasta
barva kože	zmanjšana količina pigmenta, bledica	neenakomerna pigmentacija
začetek	navadno po 50-60 letu	najstinska leta
<b>Epidermis</b>		
debelina	se zmanjšuje s staranjem	zadebelitev kože
proliferacija celic	upočasnjena	pospešena
vsebnost vitamina A	povečane količine	minimalna
<b>Dermis</b>		
elastin	elastoza	elastogeneza in degeneracija
elastinski matriks	minimalno povečanje elastičnih vlaken in njihove debeline	povečana količina elastičnih vlaken, ki nadomešča kolagenski dermalni matriks
kolagen	normalne količine	zmanjšane količine

vnetni procesi  
mikrocirkulacija

ni vnetnih procesov  
zmanjšano število manjših žil

mnogi vnetni procesi z vnetnimi infiltrati  
razširjene žile, mikroteleangiektazije

---

### 1.6.1 NOTRANJI DEJAVNIKI STARANJA

Staranju, ki je posledica notranjih dejavnikov (primarno staranje), se ne moremo izogniti in nanj bistveno vplivati, saj gre za normalen proces, ki se pojavi s staranjem telesa in je genetsko pogojen. Primarno starana koža se razlikuje med posamezniki zaradi različne vsebnosti melanina, katerega nastajanje je odvisno od količine UV-sevanja, ki pa se spreminja glede na geografsko lego. Koža se različno stara na različnih anatomskih mestih telesa, staranje pa je odvisno tudi od hormonalnih sprememb v telesu (10). Pomanjkanje estrogenov in androgenih hormonov privede do povečane razgradnje kolagena in elastina, epidermalne atrofije, izgube vode in nastanka gub. Poleg tega celice niso več zmožne proizvajati tolikšnih količin HA, s čemer se zmanjša vsebnost le te v dermisu in epidermisu. Poleg tega se s staranjem afiniteta molekul HA do proteinov in drugih tkivnih struktur povečuje, kar pomeni, da je HA bolj trdno vezana in posledično je zmanjšana njena sposobnost vezave vode. Pojav je povezan tudi s povečanim premreženjem kolagena s starostjo, kar povzroči rahlo atrofijo in zmanjšano elastičnost kože. Posledice omenjenih procesov so suha koža, pojav gub in zmanjšana elastičnost kože (6).

### 1.6.2 ZUNANJI DEJAVNIKI STARANJA

Na staranje, povzročeno z zunanjimi dejavniki, pa lahko posameznik vpliva, saj gre za dejavnike, katerim se lahko izognemo. Med te uvrščamo UV sevanje, onesnaženo okolje, cigaretni dim, mimiko oz. ponavljajoče mišične gibe, položaj spanja, dieto in splošno zdravstveno stanje. Kar 80% sprememb, povezanih s staranjem na obrazu, je posledica prekomernega izpostavljanja UV svetlobi, zato se velikokrat uporablja tudi izraz fotostaranje (6). Radikali, ki jih uvrščamo med reaktivne kisikove spojine (ROS), nastajajo v telesu kot posledica normalnega metabolizma, na njihov nastanek pa v veliki meri vpliva tudi UV sevanje, ki smo mu ves čas izpostavljeni. Čeprav so ROS nujno potrebne za delovanje organizma, v preveliki količini telesu škodijo. Povzročajo oksidacijo, premreževanje in prelom verig različnih molekul, tudi DNA, vplivajo na proteine in lipide ter na komponente ECM,

tudi na HA. Prekomerno izpostavljanje UV svetlobi povzroči spremembe v strukturi HA in nastanek krajših fragmentov HA, za katere pa vemo, da so angiogeni in lahko povzročajo vnetne reakcije (1).

Telo je tekom evolucije razvilo obrambne mehanizme, ki organizem ščitijo pred radikali. Te razvrščamo v tri vrste: primarni, sekundarni in terciarni. Primarni preprečujejo nastajanje radikalov, sekundarni nevtralizirajo njihovo delovanje, terciarni pa poskrbijo za popravilo poškodb, ki nastanejo kot posledica oksidativnega stresa, povzročenega z radikali. Glavni predstavnik obrambnih mehanizmov so antioksidanti, ki jih glede na kemijsko strukturo razdelimo na encimske in ne-encimske. Med ne-encimske uvrščamo: glutation, sečno kislino, bilirubin, melanin, vitamina E in C, ubikvinon. Med encimske antioksidante pa spadajo: superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza, glutation-S-transferaza, glutation reduktaza in katalaza. Antioksidanti upočasnijo ali preprečijo oksidacijo celičnih sestavin, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo reakcije, ki jih povzročajo. Antioksidanti preprečujejo negativne učinke radikalov, ki v telesu nastajajo pod vplivom primarnega staranja, niso pa zmožni preprečiti učinkov radikalov, ki nastajajo v telesu pod vplivom UV sevanja, ker je njihova količina prevelika oziroma so kapacitete endogenega antioksidativnega obrambnega sistema izčrpane (12). UV sevanje lahko prodira tudi skozi epidermis ali celo dermis in s tem poškoduje strukture in molekule, ki se nahajajo v teh plasteh: zmanjšajo se količine vitamina C in E, ubikvinona in glutationa. Posledica je okrnjena obramba telesa pred oksidativnim stresom. UV sevanje povzroči nastanek akutnih (opekline, eritemi...) ali kroničnih kožnih bolezni (ekstrinzično staranje, karcinomi, diskromija, avtoimunske bolezni...) (11). Ker lahko na dejavnike vplivamo in se jim izognemo – se zaščitimo pred UV sevanjem, lahko s tem upočasnimo proces ekstrinzičnega staranja, katerega klinični znaki so: suha in luskasta koža, pordelost, srbečica, vnetje, spremembe pigmentacije, pojav globokih gub in brazd, zadebelitev kože in usnjat izgled (10).

## **1.7 HIALURONSKA KISLINA KOT AKTIVNA UČINKOVINA**

Na tržišču je danes mnogo izdelkov, ki kot glavno učinkovino vsebujejo HA. Zaradi dobrih viskoelastičnih lastnosti in biokompatibilnosti se uporablja v različnih kozmetičnih in dermatoloških izdelkih (13).

### 1.7.1 VLAŽILNE LASTNOSTI

Za ustrezno hidracijo kože je pomembnih več dejavnikov, ki sem jih tekom prejšnjih poglavij že opisala. Hidratiranost kože se razlikuje tudi med plastmi kože, največja količina vode je v dermisu, približno 70%, najmanj pa je hidratirana rožena plast epidermisa, ki vsebuje približno 13% vode. Hidratiranost se spreminja s časom zaradi notranjih dejavnikov, kot so stres in hormonske spremembe in zunanjih dejavnikov npr. klimatskih sprememb in vsebnosti vlage v okolju. Voda v koži je lahko prisotna v dveh oblikah, v prosti obliki ali pa vezana na različne molekule, kot je HA. Prosta voda v koži kroži in navadno potuje iz dermisa oz. globljih plasti kože proti površini in s tem hidratira tudi višje plasti kože. Pri prehajanju vode skozi plasti kože so zelo pomembni akvaporini, proteini, ki se nahajajo na membrani celic, tudi keratinocitov. Ustrezna vsebnost vode v koži je pomembna za normalno delovanje organizma, vpliva pa tudi na izgled kože, hidratirana koža je namreč bolj elastična, mehkejša in gladka na otip. Zaradi omenjenih razlogov je povpraševanje po kozmetičnih izdelkih, ki zagotavljajo koži ustrezno vlažnost, veliko in med pomembne aktivne sestavine, ki vplivajo na hidracijo kože, prištevamo tudi hialuronsko kislino (14).

Na trgu so dostopne različne oblike HA: linearna, premrežena in njeni derivati (7). Dobro vlažilno delovanje imajo linearne molekule, ker so sposobne vezave velikih količin vode v svojo strukturo (15). Ker je HA makromolekula, je njeno prehajanje v kožo vprašljivo. Kljub temu dermalno nanesena HA v obliki raztopine na površini tvori tanek film, ki veže vodo iz okolice in s tem hidratira kožo (7). Največjo omejitev pri uporabi torej predstavlja velikost molekule HA in s tem povezano prehajanje v globlje plasti kože. V nekaterih študijah so s Franzovimi difuzijskimi celicami na kožnih modelih dokazali, da molekule, manjše od 300 kDa, penetrirajo skozi kožo. S tem je omogočeno dobro vlažilno delovanje tudi v globljih plasteh kože, poleg tega se lahko zmanjša tudi hrapavost in manjše gubice, saj s tem, ko nase veže veliko vode, zapolni prostor med celicami in posledično kožo napne. Čeprav večje molekule HA ne prehajajo skozi kožo, pa lahko ostanejo na površini le te in iz okolice vežejo vodo, s čemer omogočajo hidracijo površinskih plasti kože. Zaradi omenjenih lastnosti vezave vode v svojo strukturo, se HA množično uporablja v kozmetičnih izdelkih kot aktivna učinkovina, ki kožo hidratira in posledično izboljša tudi videz hrapavosti in zgubanosti (16).

## 1.7.2 DERMALNO POLNILO

Poleg že omenjenih vlažilnih lastnosti, ki jih izkazuje HA v kozmetičnih pripravkih, pa je v zadnjih desetletjih postala tudi ena izmed glavnih učinkovin, ki se uporabljajo v dermatologiji in estetski kirurgiji za polnjenje gub, ki so posledica staranja. Pojav linij in gub na starani koži je tesno povezan z zmanjševanjem volumna kože, predvsem dermisa, ki je posledica staranja. Pod vplivom notranjega in fotostaranja pride do dermalne atrofije, zmanjšane števila elastičnih in kolagenskih vlaken in zmanjšane hidratacije kože, vsi ti pojavi so povezani z nastankom vse globljih in s staranjem vedno bolj opaznih gub na površini kože. Z odkritjem hialuronske kisline in spoznanjem, da je to neimunogena in biokompatibilna substanca, je raziskovalec Balazs leta 1989 HA prvič uporabil kot dermalno polnilo (17). Danes je na trgu mnogo različnih dermalnih polnil, ki vsebujejo kot aktivno učinkovino hialuronan. Navadno gre za transparentne oziroma brezbarvne viskozne gele, polnjene v brizgo, s katero se nato pripravek injicira v kožo (7). V polnilih se največ uporablja premrežena hialuronska kislina, lahko pa se uporabljajo tudi linearne oblike HA (18). Polnila s hialuronsko kislino se vbrizgajo v papilarni dermis mehkih tkiv in s tem povečajo volumen kože. Če se volumen kože poveča, se s tem koža napne in gube, ki so posledica staranja, izginejo. Dermalna polnila se med seboj razlikujejo v koncentraciji HA, velikosti in obliki molekule in po tem, katero premreževalno sredstvo se uporabi za stabiliziranje produkta. Velikokrat se polnilom dodaja tudi anestetik, ki omili bolečino pri vvodu z injekcijo (17). V prvih produktih se je uporabljala HA živalskega izvora (18), danes pa se zaradi manjšega alergenege potenciala večinoma uporablja bakterijsko pridobljena HA. Ker polnila vsebujejo različne oblike HA, se tudi učinek le teh razlikuje. Polnila z nizkimi koncentracijami HA imajo kratkotrajen učinek, medtem ko polnila, ki vsebujejo večje koncentracije HA (do 30 mg/g), učinkujejo tudi do dveh let. Tudi velikost HA je pomembna, večje molekule se namreč uporabljajo za bolj globoko injiciranje polnila in s tem omogočajo zapolnitev tudi večjih in bolj globokih gub. Poleg HA se za dermalna polnila uporablja tudi kolagen, vendar se uporaba le tega zmanjšuje zaradi prednosti HA, med katerimi so najpomembnejša biokompatibilnost in neimunogenost ter izredno dobre viskoelastične lastnosti HA (17).

## 2 NAMEN DELA

Pri kozmetičnih izdelkih je pomembno, da učinkovina v izdelku resnično deluje in da ima izdelek ustrezne reološke lastnosti, kar pomeni, da se ustrezno razmaže po koži in na njej pusti dober občutek. Problem, na katerega se bomo osredotočili v prvem delu diplomske naloge, so reološke lastnosti hialuronske kisline, ki jih bomo izmerili z reometrom. Z meritvami rotacije bomo vzorcem z različnimi koncentracijami HA v vodi izmerili viskoznost, pri čemer bo cilj ugotoviti vpliv koncentracije na tokovno obnašanje raztopin. Z meritvami oscilacije pa bomo ugotavljali, kako se v odvisnosti od koncentracije spreminjajo viskoelastične lastnosti sistema – elastični in viskozni modul. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo lahko sklepali o reoloških lastnostih končnih sistemov, v našem primeru kozmetičnih izdelkov (npr. krem, gelov, serumov), ki kot aktivno sestavino vsebujejo hialuronsko kislino v različnih koncentracijah.

V drugem delu pa bomo izvedli kratko klinično študijo na petih prostovoljcih. S Corneometerom bomo izmerili hidratacijo kože podlahti pred in po nanosu raztopin z različno koncentracijo HA. Na podlagi rezultatov bomo lahko ovrednotili vlažilne lastnosti raztopin HA. Cilj bo dokazati, da hialuronska kislina vpliva na hidratacijo v odvisnosti od koncentracije. V okviru klinične študije bomo izmerili tudi intaktnost kožne bariere posameznikov s Tewametrom, s katerim merimo transepidermalno izgubo vode skozi kožo. Cilj tega dela bo ugotoviti, ali imajo posamezniki zdravo bariero in ali HA pripomore k zadrževanju vode v koži oziroma zmanjša njeno transepidermalno izgubo.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

Za reološke meritve in klinično študijo smo najprej izdelali vodne raztopine HA z različnimi koncentracijami, pri tem sem uporabila naslednje materiale:

- natrijev hialuronat – HA (Stanford Chemicals, Irvine, Fairbanks): čistost  $\geq 99\%$ ,  $M_w = 10 - 1000$  kDa (nizkomolekularna)
- prečiščena, prekuhana voda



### 3.2 Priprava raztopin z različnimi koncentracijami HA

Tako pri reoloških meritvah kot pri klinični študiji smo najprej pripravili raztopine, ki so vsebovale različno koncentracijo HA. Kot topilo smo uporabili prečiščeno, prekuhano vodo, ki smo jo smo segrevali do vrenja, jo ohladili na sobno temperaturo in šele nato uporabili za pripravo raztopin. Tako za reološke meritve kot za klinično študijo smo pripravili raztopine s koncentracijo od 0,1% do 1% HA, natančnejše natehte so prikazane v tabeli III.

**Tabela II:** Postopek priprave različnih koncentracij HA za uporabo pri reoloških meritvah in klinični študiji

Koncentracija <sup>mV</sup>	0,1% (VZ1)	0,2% (VZ2)	0,3% (VZ3)	0,4% (VZ4)	0,5% (VZ5)
REOLOGIJA	0,05 g/50 mL	0,10 g/50 mL	0,15 g/50 mL	0,20 g/50 mL	0,25 g/50 mL
KLINIČNA ŠTUDIJA	0,02 g/20 mL	0,04 g/20 mL	0,06 g/20 mL	0,08 g/20 mL	0,1 g/20 mL
Koncentracija <sup>mV</sup>	0,6% (VZ6)	0,7% (VZ7)	0,8% (VZ8)	0,9% (VZ9)	1% (VZ10)
REOLOGIJA	0,30 g/50 mL	0,35 g/50 mL	0,40 g/50 mL	0,45 g/50 mL	0,5 g/50 mL
KLINIČNA ŠTUDIJA	0,12 g/20 mL	0,14 g/20 mL	0,16 g/20 mL	0,18 g/20 mL	0,20 g/20 mL

<sup>mV</sup> = masna koncentracija izražena v %, VZ = vzorec.

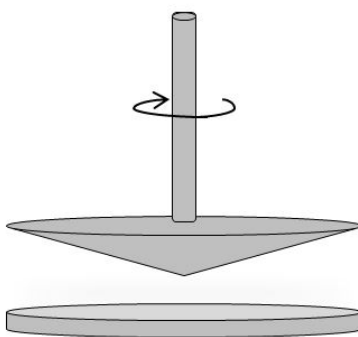
Vzorci smo pripravili tako, da smo na tehtnici (AJ-2200(C)E, ViBra.) v čašo natehtali ustrezno količino HA, dodali magnetno mešalno palčko in ohlajeno vodo do ustreznega volumna (50 mL ali 20 mL). Čaše smo na vrhu prekrili z adhezivnim lepilnim trakom (Parafilm M, Bemis Company, Inc.) zato, da ne bi voda, ki se ob mešanju rahlo segreje, izhlapevala. Priprava je potekala na sobni temperaturi, čas, ki ga je posamezen vzorec potreboval, da je bil homogen, pa je bil odvisen od koncentracije. 1% HA je potrebovala približno dve uri, 0,5% uro in pol in 0,1% pa 20 minut. Vzorci smo po končanem mešanju prelili v 100 mL centrifugirke, jih trdno zaprli in na pokrovčku označili koncentracijo in datum priprave. Te smo nato zavili v aluminijasto folijo, da smo raztopine zaščitili pred UV svetlobo, ki bi pospešila staranje vzorcev in s tem skrajšala njihov rok uporabnosti. Vzorci smo isti ali naslednji dan uporabili za reološke meritve in meritve na prostovoljcih, zanimalo pa nas je tudi ali se bodo v roku tedna dni vzorčki in njihove lastnosti spremenili, zato smo vzorci hranili teden dni in nato izvedli le reološke meritve in jih nato zavrgli. Če v omenjenih rokih nismo uspeli izvesti vseh željenih testov, smo za nadaljne izvajanje pripravili sveže vzorci.

### 3.3 Metode in pogoji meritev

#### 3.3.1 REOLOŠKE MERITVE

S pomočjo reoloških lastnosti, pri čemer lahko določamo različne parametre (npr. viskoznost, elastičnost, viskoelastičnost, psevdoplastičnost...), razjasnimo notranjo strukturo sistemov, spremljamo njihovo fizikalno stabilnost, obnašanje snovi pod vplivom temperature... Vsi pridobljeni podatki nam omogočajo ustrezno izbiro primarnih vhodnih surovin in kakovostno izdelavo končnega izdelka.

Reološke meritve smo izvajali v reološkem laboratoriju v pritličju Fakultete za Farmacijo. Uporabljali smo reometer (Physica MCR 301, Anton Paar) z merilnim sistemom stožec-ploščica (CP50-2, Anton Paar), s premerom 49,691 mm in kotom  $2,001^\circ$  (slika 3). Vse meritve smo izvajali pri temperaturi  $23^\circ\text{C}$  in pri vseh vzorcih smo meritve ponovili trikrat in za rezultat vzeli povprečno vrednost.



**Slika 3:** Shematski prikaz merilnega sistema stožec-ploščica

##### a) MERITVE ROTACIJE

Pri meritvah rotacije smo spremljali obnašanje vzorcev - dinamično viskoznost ( $\eta$ ) v odvisnosti od strižne hitrosti ( $D$  ali  $\dot{\gamma}$ ), ki se je spreminjala od  $1 - 100 \text{ s}^{-1}$  in od  $100 - 1 \text{ s}^{-1}$  linearno. Pri vsaki meritvi vzorca smo imeli 20 merilnih točk, ki so trajale po 10 s. Na ploščico merilnega sistema smo nanесли toliko vzorca, da je bila celotna ploščica prekrita. S programom smo merilno telo spustili na položaj za merjenje, tako da je bil razmik med ploščico in stožcem  $0,209 \text{ mm}$ . Natančno smo obrisali odvečni vzorec, ker bi kakršni koli zaostanki na

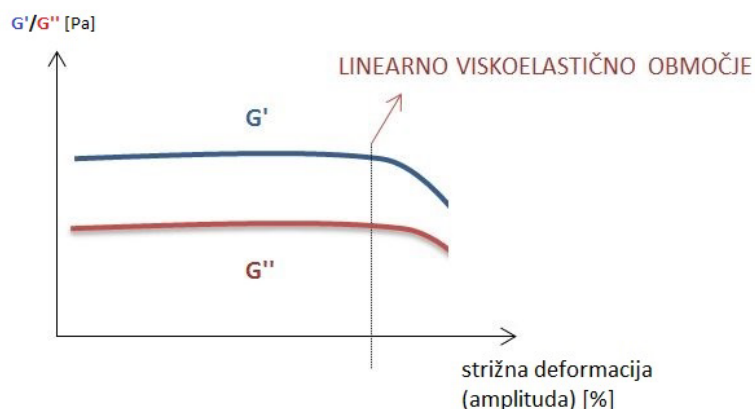
merilnemu sistemu povzročili napake pri meritvah. Ko smo izmerili vse vzorce, smo podatke zbrali v tabele in izrisali različne reograme.

## b) MERITVE OSCILACIJE

Pri meritvah rotacije merilni sistem kroži in s tem vzorec obremeni z določeno strižno hitrostjo. Aparatura na podlagi spreminjanja strižne hitrosti izmeri dinamično viskoznost in strižno napetost sistema, iz česar lahko sklepamo o tokovnem obnašanju sistema. Glede na to ali je odziv na apliciran stres linearen ali ne, lahko te razdelimo na idealne tekočine – Newtonsko tokovno obnašanje (linearen odziv) ali ne-Newtonske tekočine (nelinearen odziv).

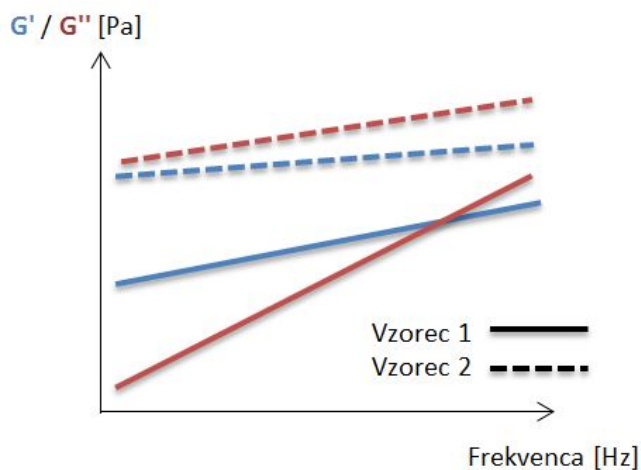
Z meritvami oscilacije pa smo želeli določiti, kakšne viskoelastične lastnosti imajo raztopine HA v odvisnosti od koncentracije. Test sestoji iz dveh delov in sicer iz amplitudnega testa, kjer določimo linearno viskoelastično območje, kar pomeni, da določimo maksimalno amplitudo, s katero bomo izvedli frekvenčni test tako, da ne porušimo strukture vzorca.

Amplitudni test smo izvajali pri konstantni frekvenci, v našem primeru 0,5 Hz, vzorce pa pri tem obremenili z amplitudo od 0,1% do 100%. Pri tem smo spremljali spreminjanje elastičnega  $G'$  in viskoznega/plastičnega modula  $G''$ . Dokler je krivulja modulov  $G'$  in  $G''$  linearna, je vzorec obstojen na apliciran stres (amplitudno obremenitev). Območje imenujemo linearno viskoelastično območje (LVE), kar prikazuje slika 4. Ko opazimo, da začne krivulja padati ali naraščati, to pomeni, da smo dosegli maksimalni stres, ki ga vzorec lahko prenese. Po tej točki se struktura vzorca poruši.



**Slika 4:** Shematski prikaz grafa pri amplitudnem testu, iz katerega je razvidno linearno viskoelastično območje

Maksimalna amplituda je bila v našem primeru 1%, kar pomeni, da je notranja struktura pripravljenih vzorcev odporna na strižno deformacijo do 0,01. V tem območju se nato izvaja drug del oscilacijskega testa, ki ga imenujemo frekvenčni test. Ta del testa se razlikuje od amplitudnega v tem, da je konstantni parameter deformacija znotraj viskoelastičnega območja, ki jo apliciramo na vzorec, spreminjamo pa frekvenco od 100 do 0,1 Hz. Pri tem opazujemo, kako se spreminjata  $G'$  in  $G''$ , kar prikazuje slika 5. Glede na ta dva modula določimo viskoelastične lastnosti sistema oz. ugotovimo, ali se neka snov obnaša bolj elastično ali bolj plastično.



**Slika 5:** Shematski prikaz rezultatov frekvenčnega testa, kjer opazujemo modula  $G'$  in  $G''$

### 3.3.2 KLINIČNA ŠTUDIJA NA PROSTOVOLJCIH

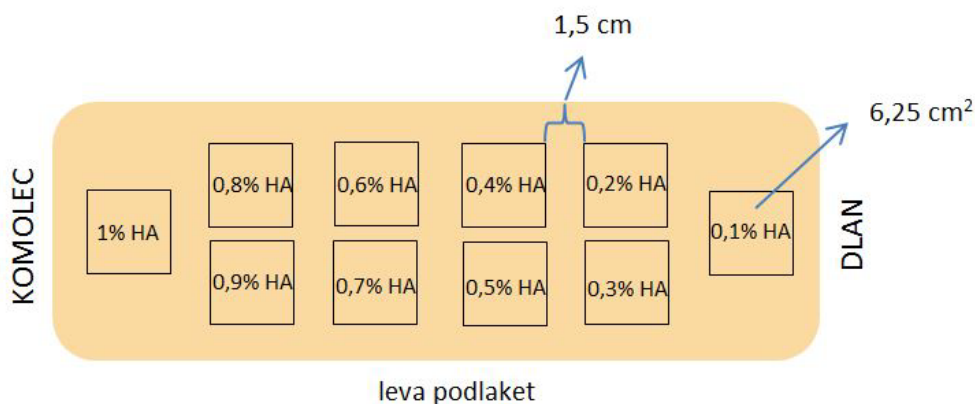
V drugem delu testiranj smo izvedli kratko klinično študijo. Pri tem smo spremljali dva parametra:

- vlažnost kože s Corneometrom (CM 825, Courage – Khazaka) in
- transepidermalno izgubo vode skozi kožo s Tewametrom (TM 300, Courage – Khazaka).

Meritve smo izvajali na petih prostovoljkah, ki so bile stare od 18-21 let, v laboratoriju, ki je bil opremljen s klimo. Pri teh meritvah je zelo pomembno, da so pogoji (temperatura in relativna vlažnost) v prostoru čim bolj konstantni. V našem primeru je bila najnižja temperatura 22,6°C, najvišja pa 24,4°C. Bolj je nihala relativna vlažnost (RH), najnižja je bila 44,9%,

najvišja pa 58%. Pri kliničnih študijah je pomembna tudi aklimatizacija prostovoljcev. Vsaj 3 dni pred meritvami si prostovoljci niso smeli na notranjem delu podlahti, kjer smo izvajali meritve, nanašati kakršnega koli negovalnega vlažilnega izdelka, ki bi lahko vplival na hidratacijo ali izgubo vode skozi kožo. Na dan testiranja pa vsaj pol ure pred meritvami niso smeli imeti prevelikih fizičnih naporov ali zaužiti vročih tekočin. S tem smo preprečili povečano potenje, ki bi vplivalo na rezultate merjenja. Prav tako so pol ure pred merjenjem mirno sedeli v prostoru, kjer je potekalo testiranje, da se je telo privadilo na temperaturo in vlažnost prostora, morali pa so imeti zavihane tudi rokave, tako da na mestu merjenja ni prihajalo do okluzije. Vsak dan smo test izvedli na enem prostovoljcu, kar je trajalo približno 4 – 5 h. Najprej smo izmerili hidratacijo in nato TEWL.

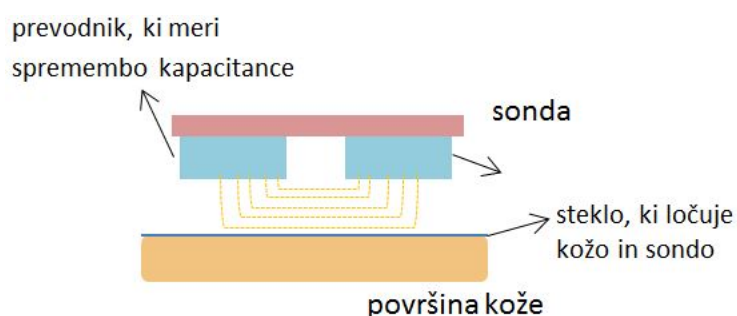
Test je bil zasnovan tako, da smo meritve izvajali na levi in desni roki, na notranji strani podlahti. Na vsaki roki smo posameznemu prostovoljcu narisali 10 kvadratkov s površino  $6,25 \text{ cm}^2$  ( $2,5 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$ ), s katerimi smo določili območje nanosa vzorca. Med vsakim kvadratom je bil razmik vsaj 1 cm, ponavadi 1,5 cm. Sode koncentracije so bile vedno na levi strani tako leve kot desne podlahti, lihe koncentracije pa na desni strani, kar prikazuje slika 6. Na označena območja smo nanесли po 0,1 mL vsakega vzorca z 2 mL brizgami in počakali vsaj 20 min oz. toliko časa, da koža na mestu nanosa ni bila več vlažna, ker se je vzorec bodisi vpil bodisi deloma izhlapel. Pred nanosom vzorcev smo na podlahti izvedli kontrolne meritve. Te nam dajo informacijo o bazični hidrataciji in transepidermalni izgubi vode (TEWL), ki je odvisna od vsakega posameznika.



**Slika 6:** Prikaz označevanja leve podlahti.

### a) MERJENJE HIDRATACIJE

Hidracijo smo merili s Corneometrom. Princip delovanja aparature temelji na merjenju kapacitance, ta pa je odvisna od dielektričnih lastnosti kože. Do spremembe dielektrične konstante pride zaradi površinske vlažnosti kože, kar spremeni kapacitanco, aparatura to zazna in poda rezultat v nekaj sekundah, kar prikazuje slika 7.



**Slika 7:** Princip delovanja Corneometra, ki na podlagi spremembe kapacitance v odvisnosti od dielektrične konstante kože poda informacijo o vlažnosti kože

Rezultat je številka, izražena v arbitrarnih enotah, ki so odvisne od proizvajalca aparature; v našem primeru je arbitrarna enota CM (14). Preglednica IV prikazuje primer arbitrarne vrednosti za normalno, premalo in preveč hidratirano kožo.

**Tabela III:** Primer razlage arbitrarnih enot pri merjenju hidracije s Corneometrom

<b>zelo suha koža</b>	< 30 CM
<b>suha koža</b>	30 – 40 CM
<b>normalno hidratirana koža</b>	> 40 CM

CM=arbitrarna enota hidracije kože

Pri meritvah hidracije je pomembno, da sondo držimo pravokotno in jo na kožo rahlo pritisnemo, kar prikazuje slika 8. Sonda je potrebno pred vsako meritvijo obrisati, saj se s tem izognemo prenosu vzorcev iz enega mesta na drugega in posledično zmanjšamo napako pri meritvah. Prav tako ni priporočljivo, da se meritev izvaja vedno na isti točki, zato pri meritvi enega vzorca sondo premikamo v območju zarisanega kvadratka in tako izvedemo deset meritev. Končni rezultat je povprečna vrednost desetih meritev enega vzorca, ki jo sprti računa aparatura. Kontrolno meritev, ki nam daje informacijo o hidratiranosti kože

posameznika, smo pri merjenju hidratacije naredili na dveh različnih mestih, tudi to smo pomerili desetkrat. Rezultate meritev smo na koncu zbrali v tabelo in oblikovali različne grafe: odvisnost hidratacije od koncentracije hialuronske kisline in primerjavo hidratacije na mestih, kjer je bil vzorec nanešen in kjer ne.



**Slika 8:** Prikaz merjenja hidratacije s sondo, ki je med merjenjem postavljena pravokotno na površino kože (19)

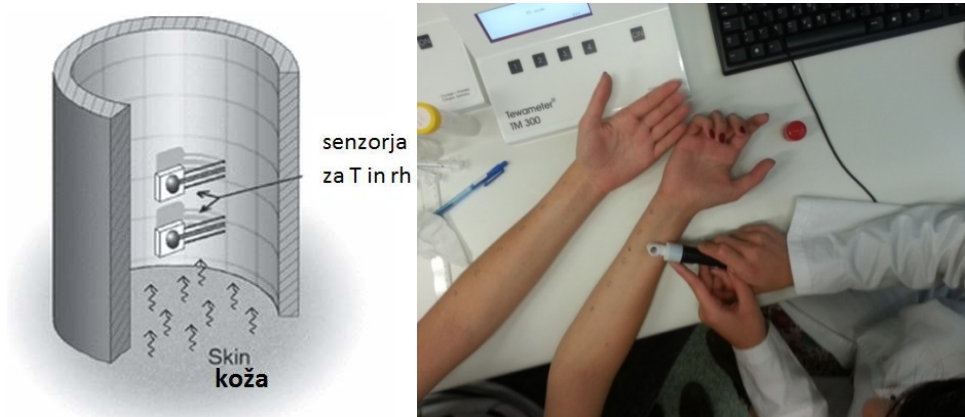
#### b) MERJENJE TRANSEPIDERMALNE IZGUBE VODE

Ko govorimo o transepidermalni izgubi vode (TEWL), ne mislimo na potenje, ampak na pasivno izgubo vode skozi intaktno roženo plast epidermisa. Meritev s Tewametrom je zelo precizna, izmerjeni TEWL pa odvisen od relativne vlažnosti in temperature okolja, letnega časa ter normalne hidratacije kože. Če je kožna bariera nepoškodovana, je TEWL odvisen od omenjenih parametrov, če pa je kožna bariera poškodovana (opekline, rane,...) se TEWL poveča in preko kože izgubljam večje količine vode. TEWL se z omenjeno aparaturo meri posredno tako, da s senzorji zaznava gostoto toka vodnih hlapov ( $J_v$ ), na podlagi tega nam aparatura poda informacijo o izgubi vode. Tabela IV prikazuje, kako na podlagi izmerjene vrednosti TEWL sklepamo o tem, ali je bariera zdrava ali ne.

**Tabela IV:** Interpretacija TEWL vrednosti, izmerjenih s Tewametrom

TEWL ( $\text{g/h/m}^2$ )	INTERPRETACIJA
<b>0-10</b>	zelo zdrava bariera
<b>10-15</b>	zdrava bariera
<b>15-25</b>	normalna bariera
<b>25-30</b>	omejena bariera
<b>nad 30</b>	kritično stanje bariere

Senzorji, ki zaznavajo  $J_v$ , so nameščeni v celici, ki je bila v našem primeru odprta. Takšna celica je zelo občutljiva na pogoje v okolju, saj je zgornji del celice odprt, kot prikazuje slika 9, zato je pomembno, da so pogoji (temperatura, RH, gibanje zraka) v prostoru merjenja čim bolj konstantni (15). Med meritvami je pomembno, da se testirana oseba in tisti, ki meritev izvaja, ne premikata, saj aparatura zazna vsak manjši tresljaj, kar se kaže v končnem rezultatu. Pomembno je tudi, da je sonda nameščena pravokotno na kožo in da se je ne pritiska premočno na kožo.



**Slika 9** : Odprta celica s senzorjema za temperaturo in relativno vlažnost, ki merita gostoto toka vodnih hlapov (20) (levo)

**Slika 10**: Merjenje izgube vode s Tewametrom (desno)

Tudi ta meritev je odvisna od lastnosti kože vsakega posameznika, zato smo pred nanosom vzorcev naredili tri kontrolne meritve na vsaki roki in nato pomerili vseh deset vzorcev. Ena meritev traja minuto in pol, vsak vzorec pa smo izmerili trikrat in kot rezultat vzeli povprečno vrednost. Slika 10 prikazuje, kako je potekala meritev s Tewametrom.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI REOLOŠKIH MERITEV

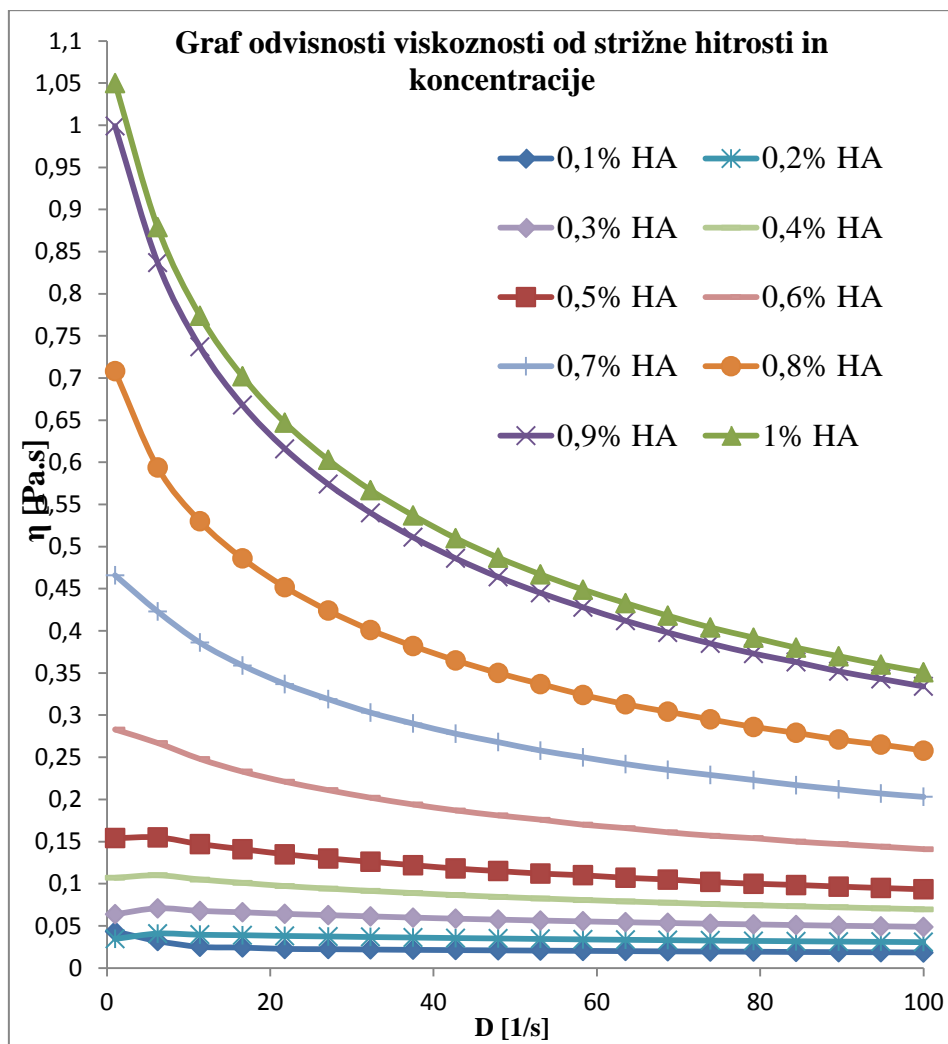
- REZULTATI ROTACIJSKIH MERITEV

Z meritvami rotacije smo spremljali tokovno obnašanje vzorcev - dinamično viskoznost in strižno napetost ( $\tau$ ), v odvisnosti od strižne hitrosti. Na podlagi meritev bomo lahko sistem



opredelili kot Newtonski ali ne-Newtonski in ugotovili, kako na viskoznost vpliva koncentracija HA.

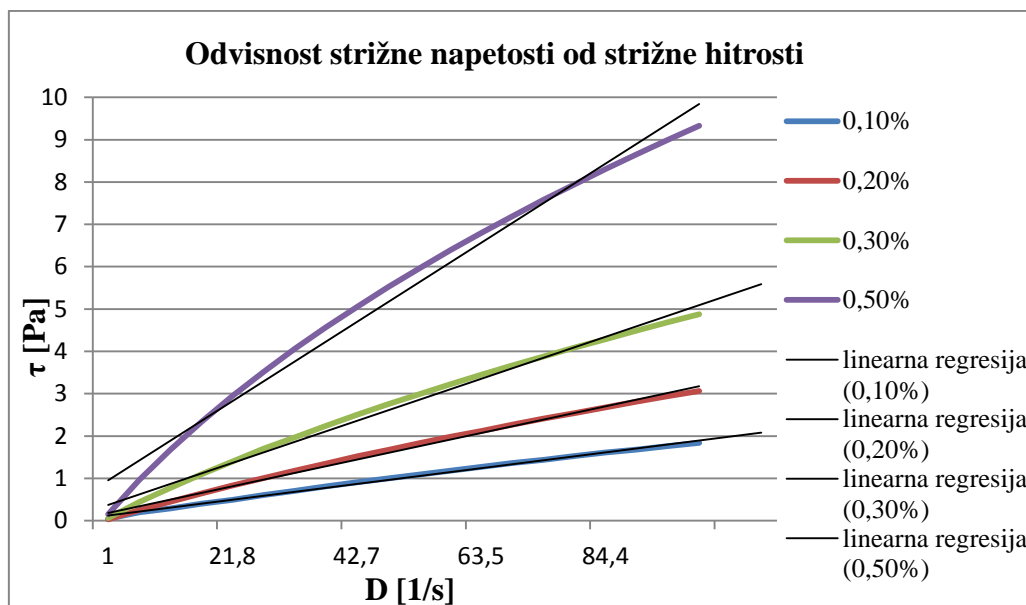
Slika 11 prikazuje viskoznostne krivulje, kjer smo opazovali kako se spreminja viskoznost vzorcev v odvisnosti od koncentracije hialuronske kisline in aplicirane strižne hitrosti.



**Slika 11:** Spreminjanje viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti in koncentracije HA v vzorcu

Iz slike 11 lahko razberemo, da se pri vzorcih s koncentracijami od 0,1 – 0,3% viskoznost praktično nič ne spreminja; je torej neodvisna od aplicirane strižne hitrosti. Pri koncentracijah 0,4 in 0,5% je že opazen rahel padec viskoznosti s povečevanjem strižne hitrosti, najbolj pa je to opazno pri vzorcih s koncentracijami nad 0,6%. Tudi organoleptično je bila opazna razlika med vzorci z nižjimi in višjimi koncentracijami. Vzorci s koncentracijami do 0,5% so bili

skoraj popolnoma tekoči, nad 0,6% pa je že bilo opazno, da so bolj viskozni, vendar ne dovolj, da bi lahko govorili o nastanku poltrdnega sistema (gela). Za nastanek tega bi bilo potrebno pripraviti vzorce s koncentracijo nad 1%. Na podlagi spreminjanja viskoznosti že lahko okvirno sklepamo, ali gre za Newtonske sisteme ali ne, bolj podrobno pa lahko tokovno obnašanje opredelimo glede na sliko 12, ki prikazuje spreminjanje strižne napetosti vzorcev v odvisnosti od strižne hitrosti.



**Slika 12:** Spreminjanje strižne napetosti v odvisnosti od strižne hitrosti (reogram)

Na sliki 12 so prikazani le vzorci s koncentracijo 0,1% do 0,3% in vzorec 0,5% za primerjavo. Če pogledamo spreminjanje strižne napetosti pri vzorcih od 0,1% do 0,3% HA vidimo, da se ta skoraj popolnoma linearno povečuje s strižno hitrostjo. Tako lahko na podlagi slike 11 in 12 sklepamo, da gre pri teh treh vzorcih za idealne Newtonske sisteme, kljub temu, da je v vzorcih prisotna HA. Pri vzorcu z 0,5% HA je iz slike 12 razvidno, da odziv ni več linearen. Tako obnašanje je značilno za ne-Newtonske sisteme, med katere uvrščamo realne kapljevine, poltrdne in trdne sisteme.

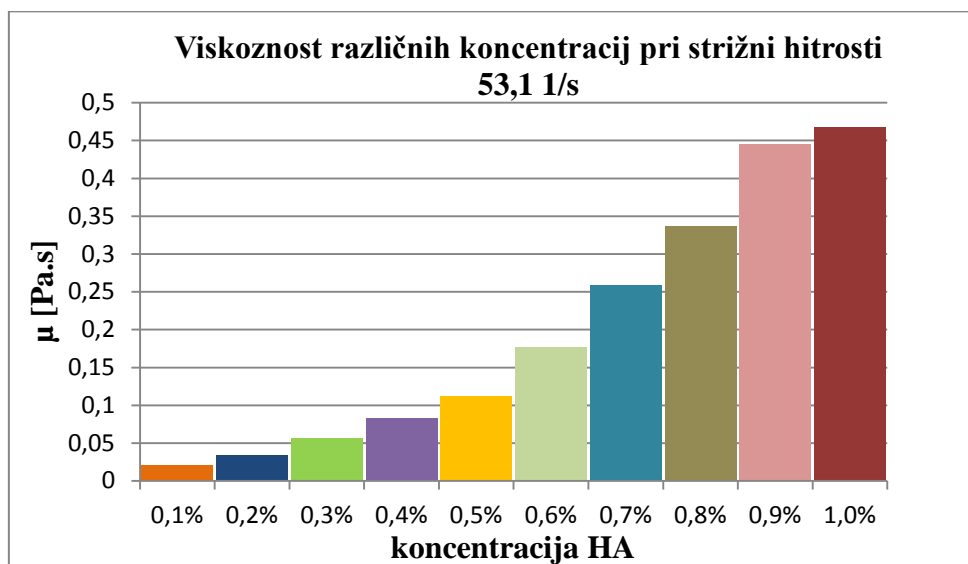
Vzorcem s koncentracijo več kot 0,5% viskoznost s povečevanjem strižne hitrosti pada, kar je posledica obremenitve vzorca, pod vplivom katere pride do urejanja strukturnih elementov. V našem primeru se polimerni klobčič HA raztegne, kar prikazuje slika 13. Če bi apliciran stres močno povečali, pa bi prišlo do pretrganja verig in posledično bi se struktura vzorcev porušila,

kar pa je nezaželjeno. Pri testih rotacije pride do porušjenja strukture, zato se dodatno za ugotavljanje lastnosti vzorcev izvajajo testi oscilacije, pri katerih se določi maksimalni stres, do katerega je struktura polimera obstojna, šele zatem se izvajajo meritve elastičnih in viskoznih lastnosti.



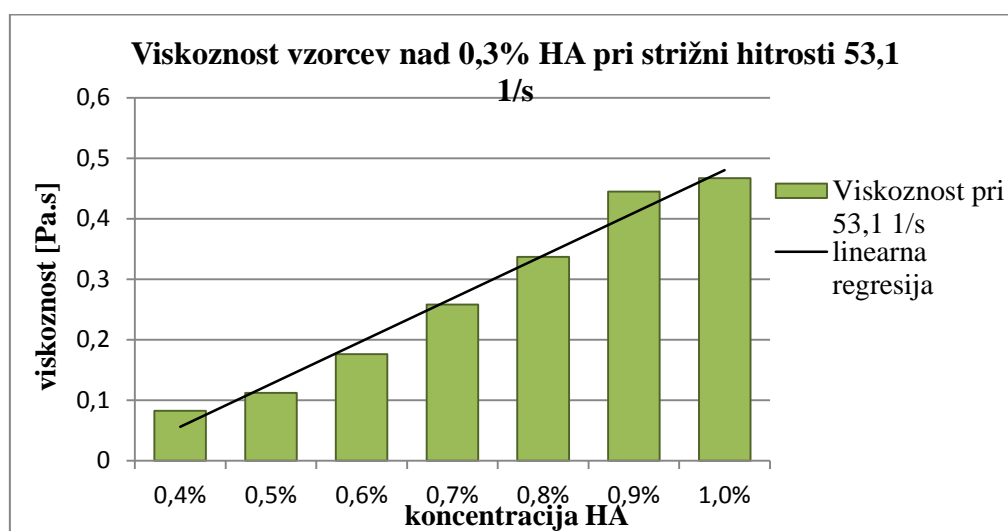
**Slika 13:** Struktura polimerne mlekule v raztopini (polimerni klobčič), ki smo jo obremenili s strižno hitrostjo (iztegnjene polimerne verige)

Ugotovili smo, da nizka koncentracija HA v vodnih raztopinah tvori idealne Newtonske sisteme, v višjih pa ne-Newtonske. Nismo pa povedali kako se spreminja viskoznost v odvisnosti od koncentracije HA. Bolj nazorno to prikazuje slika 14, kjer je strižna hitrost konstantna, izbrali smo vrednost približno na sredini intervala - 53,1 1/s. Meritve nakazujejo, da se s povečevanjem koncentracije povečuje tudi viskoznost sistema.



**Slika 14:** Viskoznost različnih koncentracij HA pri konstantni strižni hitrosti 53,1 1/s

Natančneje odnos med koncentracijo in viskoznostjo prikazuje slika 14, iz katere lahko razberemo, da je odvisnost med koncentracijo in viskoznostjo skoraj popolnoma linearna. Ker se koncentracije od 0,1% do 0,3% bistveno ne razlikujejo, so na sliki 15 zajete le koncentracije nad 0,3%, kjer je pojav bolj opazen. Izmerjene vrednosti nam povejo, da nižje koncentracije HA povzročijo nastanek sistema z nizko viskoznostjo, če pa koncentracijo povečamo, se poveča tudi viskoznost sistema. Do povečanja viskoznosti pride zaradi supramolekularne strukture HA - v nižjih koncentracijah so polimerne verige iztegnjene in se ne prepletajo, pri višjih koncentracijah pa prihaja do prepletanja verig in posledično do povečanja viskoznosti sistema.

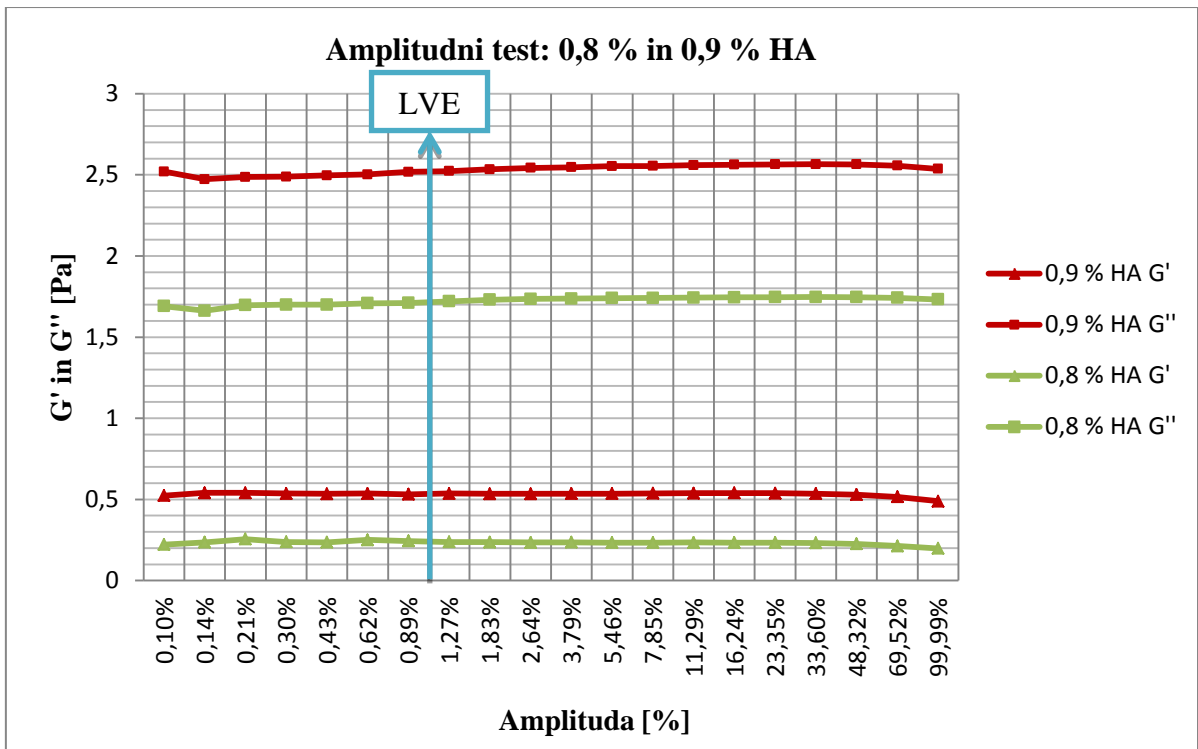


**Slika 15:** Viskoznost vzorcev s koncentracijo nad 0,3% z linearno regresijsko premico

Podatki o viskoznosti so zelo koristni za izdelavo kozmetičnih izdelkov z željenimi reološkimi lastnostmi. Če želimo, da je končni izdelek bolj viskozen, bomo uporabili višjo koncentracijo HA, to pride v poštev pri izdelavi gelov, krem in serumov. Če pa želimo izdelati kozmetične izdelke, ki imajo nižjo viskoznost npr. tonik, pa bomo uporabili HA v nižji koncentraciji. Glede na naše rezultate, kjer so bili vsi preiskovani vzorci tekoči, bi za izdelavo tekočih izdelkov torej potrebovali koncentracije HA do 1%, za izdelavo bolj viskoznih izdelkov in gelov pa koncentracije nad 1%. Poleg tega je viskoznost pomembna za nanos izdelka na kožo; če bo viskoznost prenizka, bo izdelek stekel s kože, ta pojav je bil opazen pri klinični študiji pri raztopinah s koncentracijo do 0,6%, višje koncentracije pa so se enostavno nanesle na kožo in na mestu aplikacije tudi ostale, ravno zaradi večje viskoznosti sistema.

- REZULTATI OSCILACIJSKIH MERITEV

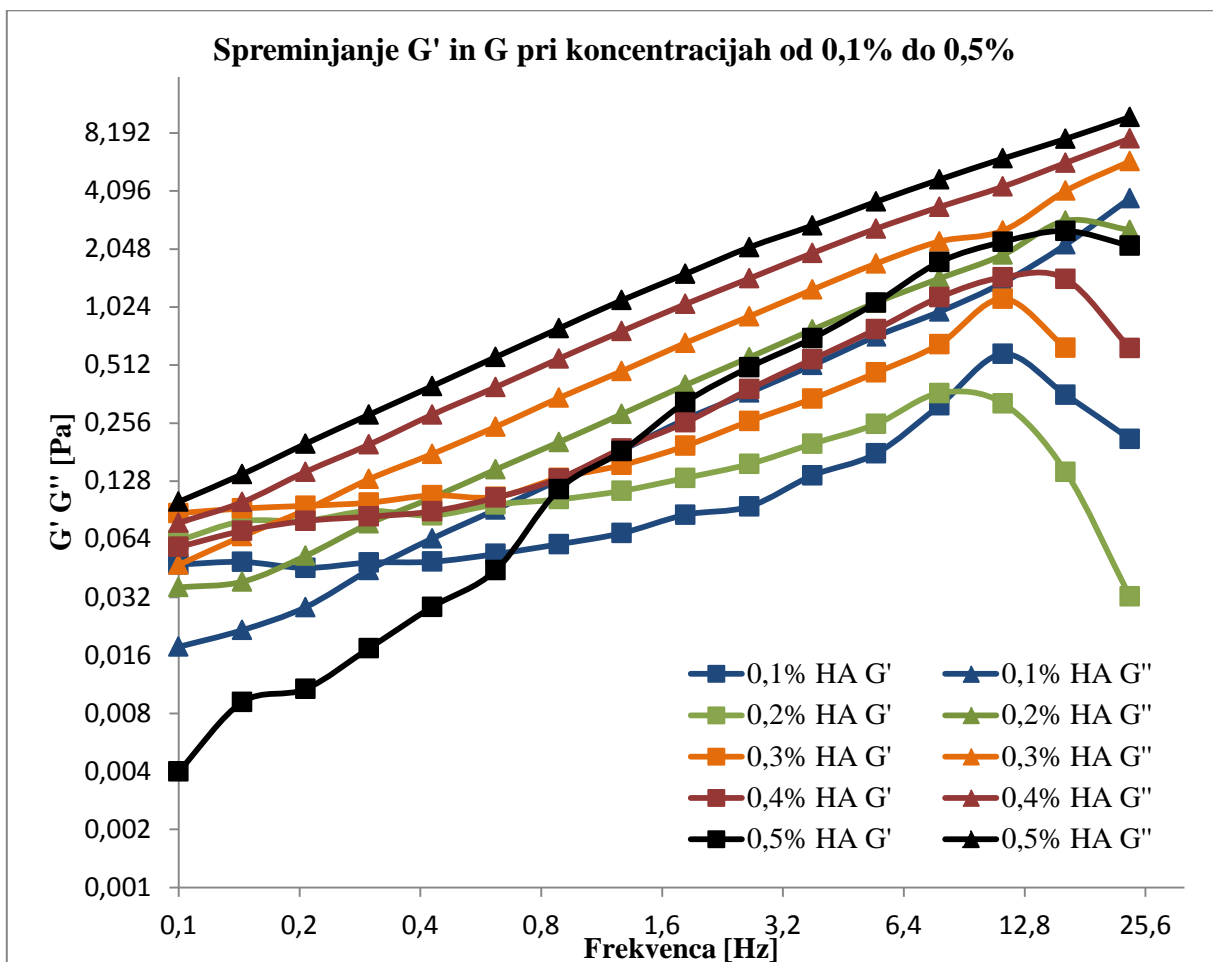
Pri meritvah rotacije pridobimo informacijo o viskoznosti in strižni napetosti sistema, iz česar lahko sklepamo o njegovem tokovnem obnašanju. Meritve rotacije so hitre, a se pri tem poruši struktura vzorca, zato se izvajajo še meritve oscilacije, kjer se najprej izvede amplitudni test, kjer se določi maksimalna obremenitev (LVE), do katere je struktura vzorca še obstojna. Frekvenčni test se nato izvaja v območju LVE, pri čemer pridobimo informacije o viskoelastičnih lastnostih; določita se elastični  $G'$  in viskozni/plastični  $G''$  modul.



**Slika 16:** Amplitudni test pri oscilacijskih meritvah iz katerega je razvidna maksimalna amplituda obremenitve vzorcev z 0,8% in 0,9% HA

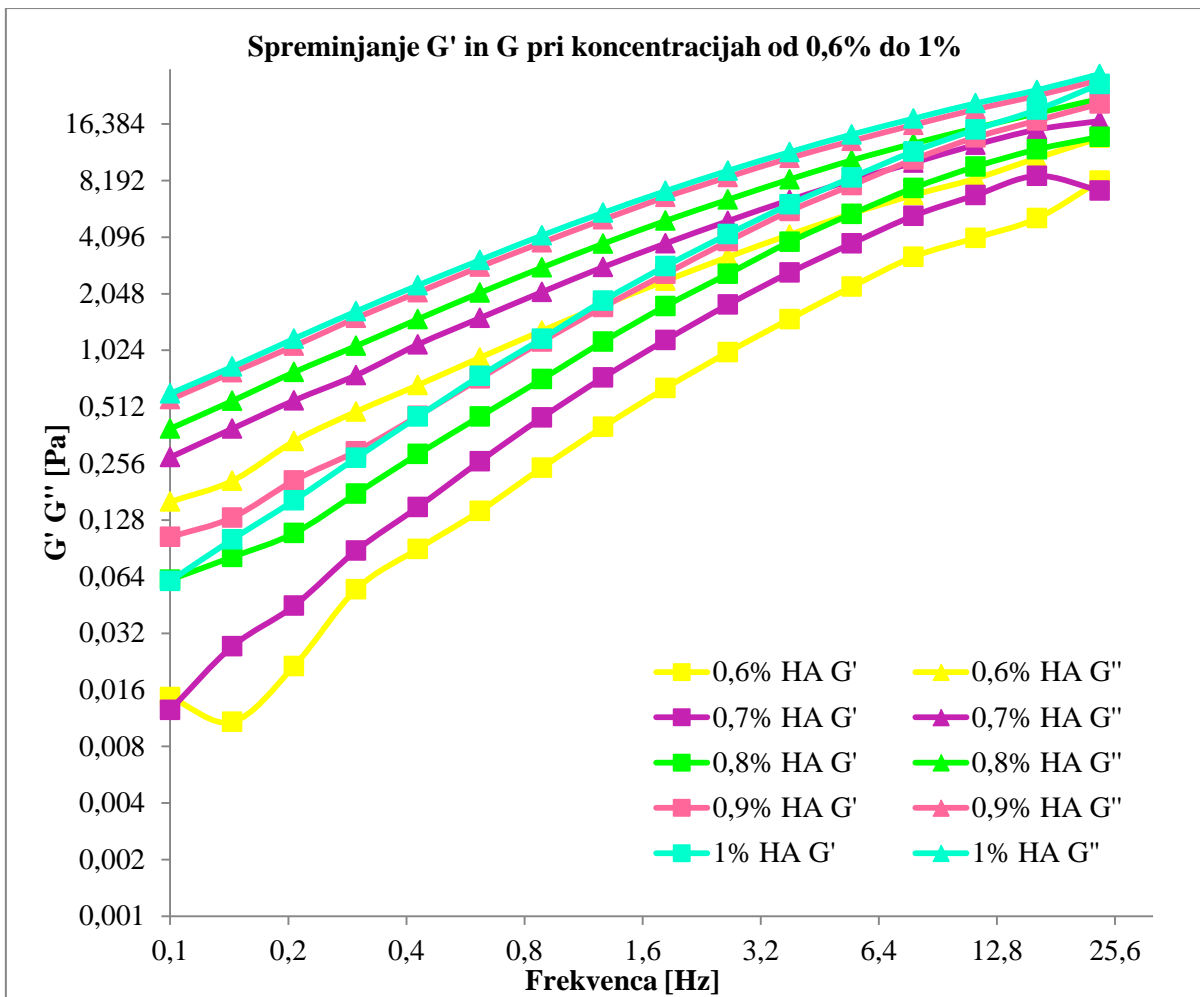
Zaradi nizkih koncentracij je bila izvedba amplitudnega testa zelo zahtevna, meritve smo morali večkrat ponoviti za vse vzorce, da smo sploh dobili rezultate, saj je aparatura konstantno javljala napako. Slika 16 prikazuje rezultate za 0,8% in 0,9% HA. Vidimo, da se modula  $G'$  in  $G''$  ne spreminjata bistveno, vseeno pa lahko opazimo rahel porast viskoznega modula nad amplitudo 1%, zato smo se odločili, da bomo frekvenčni test izvajali pri amplitudi 1%.

Ko smo imeli določeno maksimalno amplitudo, pa smo izvedli frekvenčni test, katerega rezultati so prikazani na sliki 17 in 18. S tem testom smo spremljali obnašanje  $G'$  in  $G''$  v odvisnosti od koncentracije, da bi določili kako ta vpliva na viskoelastične lastnosti vzorcev.



**Slika 17:** Spreminjanje elastičnega modula  $G'$  in viskoznega modula  $G''$  v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri svežih vzorcih (koncentracije od 0,1 do 0,5%)

Izrisali smo dva diagrama, slika 17 prikazuje koncentracije HA do 0,5%, slika 18 pa nad 0,5%, zgolj zaradi boljše preglednosti. Iz slike 17 je razvidno, da je pri koncentracijah do 0,3%, na začetku bolj izražen elastični modul  $G'$  (na grafu črta s kvadrati), pri frekvenci 0,4 Hz pa se krivulji  $G'$  in  $G''$  križata in prevladuje viskozni modul  $G''$  (na grafu črta s trikotniki). Pri koncentracijah višjih od 0,3% (slikai 17 in 18), pa viskozni modul  $G''$  ves čas prevladuje nad elastičnim  $G'$ , kar pomeni, da te raztopine izkazujejo bolj viskozno kot elastično obnašanje.

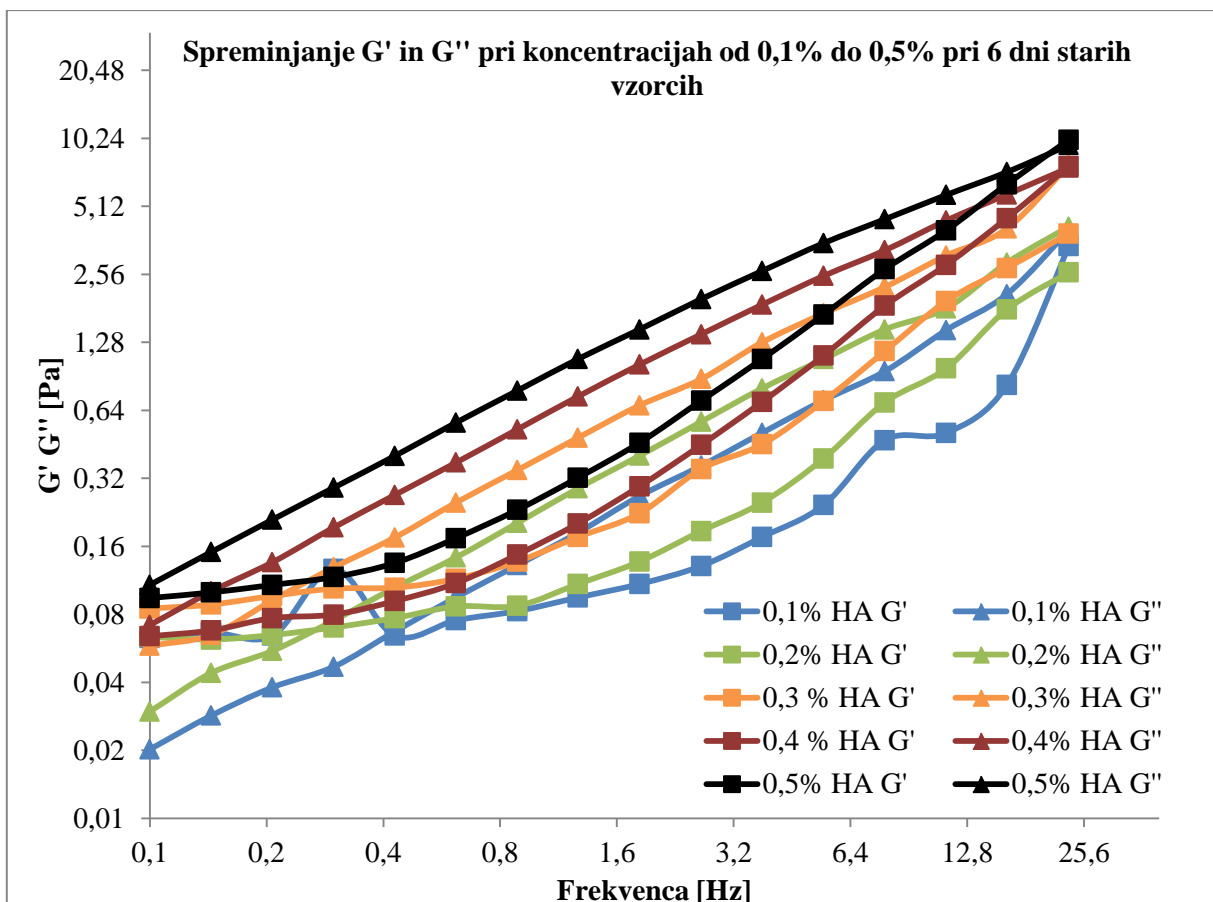


**Slika 18:** Spreminjanje elastičnega modula  $G'$  in viskoznega modula  $G''$  v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri svežih vzorcih (koncentracije od 0,5 do 1%)

Če viskozni modul prevladuje nad elastičnim, to pomeni, da ima sistem bolj izražene lastnosti tekočine kot trdnine ali poltrdnega sistema. Pri meritvah viskoznosti smo že omenili, da bi za nastanek poltrdnega sistema (gela) potrebovali koncentracije, višje od 1%. To dejstvo dodatno potrjujejo oscilatorni testi, kjer smo ugotovili, da pri skoraj vseh vzorcih prevladuje viskozni modul nad elastičnim, torej so vsi naši vzorci izkazovali bolj tekoče obnašanje kot trdno.

Dodatno smo pri testih oscilacije vrednotili viskoelastične lastnosti vzorcev, ki so bili starani 6 dni na sobni temperaturi, zaščiteni pred direktnim soncem in nepredušno zaprti. Slika 19 prikazuje spreminjanje modulov  $G'$  in  $G''$  pri vzorcih od 0,1% do 0,5% HA, slika 20 pa nad 0,5% HA. Situacija je podobna kot pri svežih vzorcih, vzorci s koncentracijo nad 0,3% imajo bolj izražen viskozni modul  $G''$ , vzorci s koncentracijo 0,3% ali manj pa imajo samo pri nizkih

vrednostih frekvenčne obremenitve bolj izražen elastični modul  $G'$ , pri višji frekvenci pa se obnašajo kot vzorci višjih koncentracij.

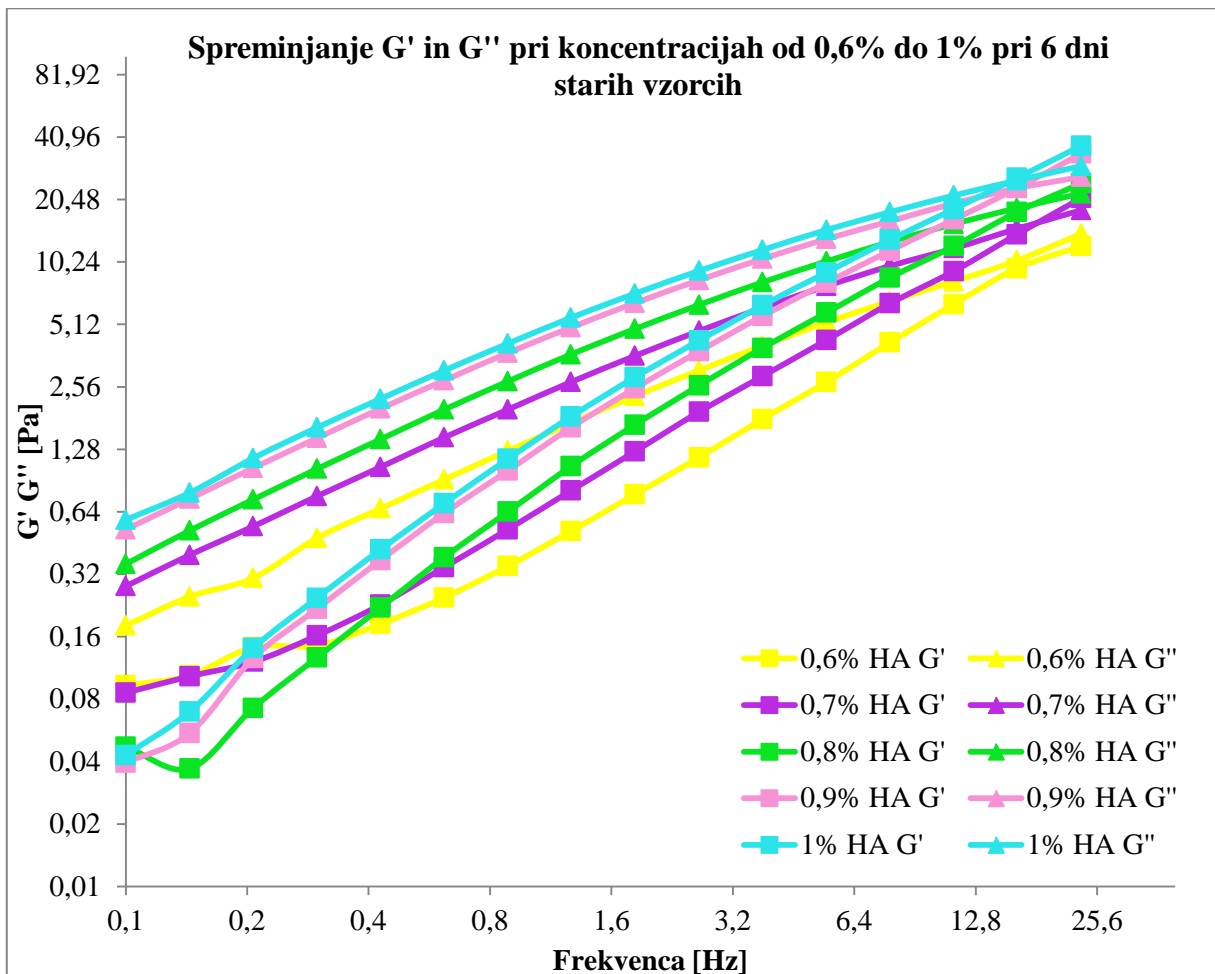


**Slika 19:** Spreminjanje elastičnega modula  $G'$  in viskoznega modula  $G''$  v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri starih vzorcih (koncentracije od 0,1 do 0,5%)

V vrednosti modulov je opazna minimalna razlika. Pri starih vzorcih so bile nekatere začetne vrednosti modulov  $G'$  in  $G''$  malo nižje, nekatere končne pa malo višje. Zanimiv pojav, ki ga lahko opazimo pri starih vzorcih, pri koncentracijah višjih od 0,7% (slika 20), je hiter porast vrednosti elastičnega modula  $G'$ . Kljub temu da je vrednost  $G'$  na začetku zelo nizka v primerjavi z  $G''$ , se  $G'$  hitro povečuje, pri frekvencah višjih od 16 Hz pa lahko opazimo, da celo preseže vrednost viskoznega modula. Po definiciji to pomeni, da je pri višjih koncentracijah sistem že rahlo prehajal iz tekočega v poltrdnega, za potrditev tega bi seveda potrebovali dodatne reološke meritve. Iz rezultatov 6 dni starih vzorcev lahko sklepamo, da se viskoelastične lastnosti s staranjem minimalno spreminjajo. Najbolj presenetljiv pojav je, da se



vrednost elastičnega modula pri koncentracijah večjih od 0,7% starih vzorcev razlikuje od svežih vzorcev in celo pri višjih frekvencah te raztopine izkazujejo bolj elastične kot viskozne lastnosti.



**Slika 20:** Spreminjanje elastičnega modula  $G'$  in viskoznega modula  $G''$  v frekvenčnem območju od 0,1 – 25 Hz pri starih vzorcih (koncentracije od 0,5 do 1%)

Izvajanje oscilacijskih meritev je bilo zahtevno zaradi nizke viskoznosti raztopin HA, nekatere meritve smo morali izvesti večkrat, da smo sploh dobili rezultate. Sploh pri koncentracijah, manjših od 0,6% je bilo merjenje težavno, saj je aparatura javljala napako in posledično meritve ni izvedla do konca. Ravno zaradi omenjenega problema so na slikah od 17 do 20 prikazane vrednosti  $G'$  in  $G''$  le do frekvence 25,6 Hz in ne do 100 Hz, kot smo dejansko meritve izvajali. Iz rezultatov lahko vseeno sklepamo, da imajo raztopine hialuronske kisline izražene viskoelastične lastnosti, le da prevladuje viskozni delež. Prav tako vzorci, ki so

starani 6 dni ali manj še izkazujejo podobne lastnosti kot sveži vzorci, torej se v roku 6 dni bistveno ne spremenijo, lahko rečemo da se ne postarajo. Visoke koncentracije staranih vzorcev imajo le malo bolj izražene elastične lastnosti pri večjih obremenitvah kot sveži vzorci.

## 4.2 REZULTATI KLINIČNE ŠTUDIJE

### • HIDRATACIJA KOŽE

Ker je hialuronska kislina molekula, ki lahko zaradi svoje kemijske strukture nase veže velike količine vode, smo izvedli klinično študijo, katere namen je bil preveriti, ali lahko z nanosom različnih koncentracij HA vplivamo na hidratacijo kože. S Corneometrom smo določali vlažnost kože pred in po nanosu različnih koncentracij HA, z merjenjem transepidermalne izgube vode (TEWL) pa smo preverili tudi, ali je bila kožna bariera posameznikov zdrava in kako na to vpliva HA. Glede na lastnosti HA pričakujemo, da bo pri višjih koncentracijah povečana tudi hidratacija kože. V literaturnih podatkih nismo nikjer zasledili standardov, ki bi določali, na kateri roki se izvajajo meritve hidratacije in TEWL, zato smo meritve izvajali na obeh. Pri tem nismo opazili kakšnega posebnega vzorca ali visokega odstopanja med hidratacijo leve in desne roke (tabela V), da bi lahko sklepali o razlikah med merjenjem hidratacije na levi oz. desni roki.

Na kožo smo nanесли vzorce s koncentracijami HA od 0,1% - 1% in počakali da so se ti vpili oz., da koža na mestu ni bila več vlažna od nanosa vzorca (vsaj 20 min). Pri tem smo opazili zanimiv pojav, vzorci do koncentracije 0,8% so se vpili oz. deloma izhlapeli, vzorci nad 0,8% pa so na koži pustili še tanek film. Ker je bila viskoznost vzorcev nad 0,8% bistveno višja od vzorcev z nižjo koncentracijo, lahko sklepamo, da je prišlo do nastanka gela in posledično tvorbe polimernega filma na koži. Tak pojav je zaželen pri nekaterih kozmetičnih izdelkih, saj film deluje emolientno in s tem zmanjša transepidermalno izgubo vode, kar še dodatno pripomore k hidrataciji kože. Vendar pa pojav pri merjenju hidratacije in TEWL-a ni zaželen, saj bi aparatúra pri tem merila hidratacijo nastalega filma in ne hidratacije kože, kar nas zanima, zato smo tik pred merjenjem film odstranili s kože.

S Corneometerom smo vsak vzorec izmerili desetkrat in podali povprečno vrednost meritev, prav tako smo izvedli dve kontrolni meritvi na obeh rokah, kjer vzorec ni bil nanešen, povprečne vrednosti so podane v tabeli V.

**Tabela V:** Rezultati merjenja hidracije s Corneometerom v arbitrarnih enotah CM pri 5 prostovoljkih

c [%]	P1		P2		P3		P4		P5	
	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$
0,10	41,07	35,17	39,57	40,27	19,54	19,59	34,12	31,07	36,63	37,24
0,20	41,14	37,56	38,60	40,99	21,21	20,00	33,10	31,34	36,50	37,94
0,30	41,22	39,70	39,54	40,27	22,07	21,01	35,54	33,80	37,70	38,11
0,40	38,94	41,63	39,54	40,25	24,32	22,25	36,99	34,94	38,42	38,67
0,50	43,31	42,20	39,91	40,19	22,35	22,49	39,12	36,61	39,56	38,15
0,60	39,91	42,20	39,13	40,40	22,81	23,21	42,66	37,18	37,25	39,43
0,70	39,88	42,58	39,56	39,77	23,19	23,76	42,48	38,77	40,19	40,12
0,80	37,23	42,54	43,15	39,93	22,76	21,68	44,28	39,97	40,43	41,26
0,90	44,55	44,06	45,67	46,62	28,02	21,17	44,25	40,42	42,94	43,93
1	44,80	48,54	49,47	45,87	27,71	26,70	46,27	45,14	45,41	46,83
kontrola - $\bar{x}$	41,31	40,69	38,13	37,84	21,27	18,70	33,19	33,26	32,70	35,18

P=prostovoljka; c=konzentracija vzorca; L=leva roka, D=desna roka,  $\bar{x}$ =povprečna vrednost meritev

S kontrolnimi meritvami opišemo normalno hidracijo kože vsake posameznice in jo opredelimo glede na arbitrarne vrednosti. Prostovoljki P1 in P2 sta imeli normalno hidratirano kožo ( $\approx 40$  CM), P4 in P5 rahlo suho kožo (30 - 40 CM) in P3 zelo suho kožo ( $< 30$  CM), kar je bilo opazno tudi s prostim očesom kot rahlo luskasta koža, ki se lušči. Iz tabele V. lahko razberemo tudi razlike med hidracijo kože na levi in desni roki. Že pri kontrolnih meritvah opazimo, da prihaja do razlik v hidraciji leve in desne roke. Pri prostovoljkih P1, P2, P3 je normalna hidracija višja na levi roki, pri prostovoljkih P4 in P5 pa na desni roki. Tudi po nanosu različnih koncentracij HA so opazne nihajoče vrednosti tako med koncentracijami kot med rokama. Pri nekaterih koncentracijah HA je bila hidracija leve roke višja, pri nekaterih pa nižja. Pri nobeni prostovoljki ni opazno, da bi bila hidracija ene roke konstantno višja od druge, zato ne moremo sklepati, da merjenje na eni ali drugi roki bistveno vpliva na rezultate merjenja.

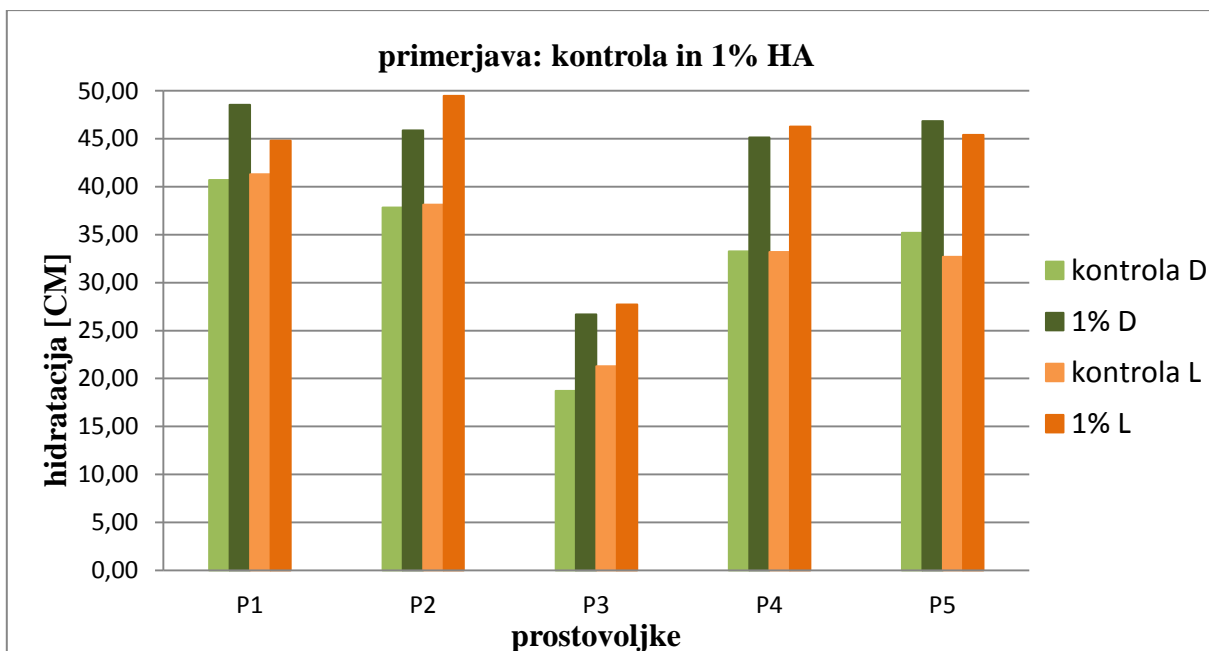
Pričakovali bi, da se s povečevanjem koncentracije HA sorazmerno povečuje tudi hidratacija kože, vendar je iz tabele V razvidno, da vrednosti ne naraščajo linearno. Če pridobljene rezultate primerjamo s kontrolnimi vrednostmi, lahko rečemo, da je hidratacija pri koncentracijah nad 0,5% višja od normalne hidratacije kože, pri koncentracijah pod 0,5% pa vrednosti precej nihajo, ponekod je bila hidratacija povišana, ponekod pa ne. Nihanje izmerjenih vrednosti je lahko posledica različnih dejavnikov:

- nihanje temperature telesa – zaradi spreminjajočih se pogojev v okolici se spreminja temperatura telesa in posledično TEWL in znojenje, kar vpliva na hidratacijo kože
- pogoji v okolici – temperatura in vlažnost v prostoru, kjer smo izvajali meritve nista bili konstantni, kar vpliva na fiziološke procese v telesu (potenje, TEWL) in na aparaturo
- čas – prostovoljci so izdelek uporabili le na dan meritve, za natančnejše podatke o hidrataciji bi morali izdelek uporabljati več tednov, da bi lahko sklepali o učinkovitosti HA na hidratacijo kože
- občutljivost metode - aparaturo je občutljiva na pogoje v okolici, zato lahko pride pri nekontroliranih pogojih do napak pri merjenju
- premajhna populacija prostovoljcev – za natančnejše sklepe o spremembi hidratacije v odvisnosti od koncentracije bi potrebovali večje število prostovoljcev z različnimi tipi kože

Nihanje rezultatov hidratacije lahko povežemo tudi z molekularno maso HA. Za pripravo vzorcev smo uporabili nizkomolekularno HA, katere  $M_w$  niha od 10 do 1000 kDa, ki pa je še vedno previsoka za prehajanje skozi kožo. Za prehajanje skozi kožo in učinkovitejšo hidratacijo je potrebna HA z  $M_w$  pod 300 kDa, kot so v *in Vivo* študiji dokazali M. Farwick s sodelavci (13), zato lahko nihanje rezultatov pripišemo tudi temu, da je ponekod HA prešla skozi kožo in jo na tem mestu bolj hidratirala, ponekod pa je ta ostala na površini kože in zato hidratacija ni bila tako učinkovita.

Slika 21 nazorneje prikazuje razliko med normalno hidratacijo kože prostovoljk in hidratacijo kože po nanosu 1% HA. Za takšno primerjavo smo se odločili, ker so spremembe hidratacije razvidnejše pri višjih koncentracijah. Opazimo lahko, da se neodvisno od merjene roke

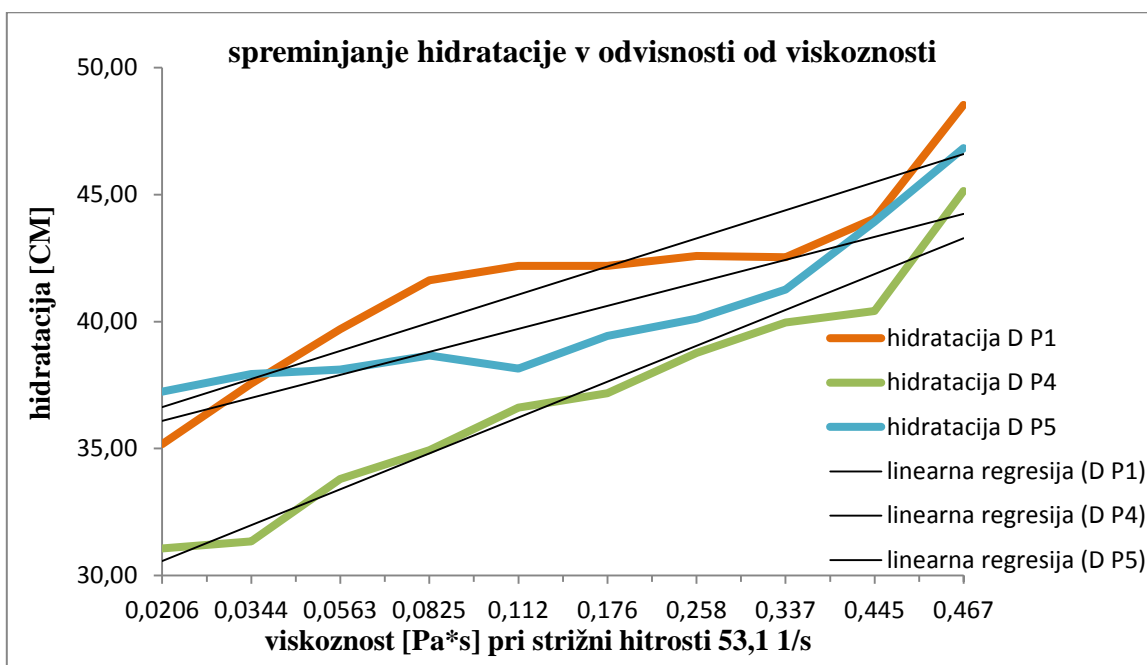
hidratacija z nanosom 1% HA pri vseh prostovoljkah poveča glede na kontrolo. Prav tako so imele po nanosu 1% HA vse prostovoljke razen P3 kožo ustrezno hidratirano (>40 CM).



**Slika 21:** Primerjava normalne hidratacije kože s hidratacijo kjer je bila nanešena 1% HA na levi in desni roki vseh petih prostovoljk (P1-P5)

Številčno izraženo se je hidratacija v primerjavi z normalno hidratacijo kože pri vseh prostovoljkah povečala za minimalno 3 enote in maksimalno 13 enot pri 1% HA. Večji preskok v hidrataciji lahko opazimo predvsem pri koncentracijah, višjih od 0,7%, kar je razvidno iz tabele VI. Iz tega lahko sklepamo, da hialuronska kislina poveča vlažnost kože, za koliko se poveča pa je odvisno od kože posameznika, količine nanosa, koncentracije HA in njene molekulske mase. Da bi z gotovostjo določili, kako učinkovita je hialuronska kislina, bi bile potrebne daljše študije. Takšno so izvedli Schweikert K. in sodelavci (21), kjer so s Corneomerom testirali vlažilni učinek HA takoj in po 15 dnevih. V študiji so ugotovili, da lahko hialuronska kislina poveča vlažnost kože tudi do 15%, kar je skladno z ugotovitvami naše študije, kjer smo dokazali, da se vrednosti hidratacije na mestu, kjer je bila HA aplicirana, zvišajo. Maksimalni opažen porast je bil pri prostovoljki P4, kar za 13 enot, kar predstavlja približno 28%.

Glede na rezultate v tabeli V se hidratacija kože prostovoljk sicer ne spreminja linearno s koncentracijo, je pa opazen porast v hidrataciji pri višjih koncentracijah HA, kar je prikazano tudi na sliki 21. Iz tega lahko sklepamo, da koncentracija HA v vzorcih vpliva na hidratacijo kože, pri reoloških meritvah pa smo ugotovili, da ta vpliva tudi na viskoznost sistema. Slika 22 prikazuje povezavo med viskoznostjo in hidratacijo vzorcev s koncentracijo od 0,1% do 1%. Kot parameter za viskoznost smo v analizo vzeli vrednosti pri strižni hitrosti 53,1 1/s. Na drugi strani smo pri klinični študiji izbrali desno roko in prostovoljke P1, P2, P3 zato, ker so vrednosti hidratacije pri njih postopno naraščale s koncentracijo.



**Slika 22:** Spreminjanje hidratacije na desni roki pri treh prostovoljkah v odvisnosti od viskoznosti sistema pri strižni hitrosti 53,1 1/s pri koncentracijah od 0,1% do 1% (z leve proti desni)

Iz slike 22 je razvidno, da hidratacija ne narašča linearno z viskoznostjo, je pa razvidno tudi, da se z naraščajočo viskoznostjo povečuje tudi učinek vlaženja. Povezava je smiselna predvsem iz vidika izdelave kozmetičnih izdelkov, kjer se srečamo s problemom, da želimo v nek kozmetični izdelek vgraditi določeno koncentracijo aktivne sestavine, če želimo da ta izdelek učinkuje, pri tem pa dobimo izdelek z neželjenimi reološkimi lastnostmi. Če problem konkretiziram: izdelati želimo zelo hidratantni tonik s hialuronsko kislino, zato potrebujemo visoko koncentracijo le te, ker pa hialuornska kislina vpliva na viskoznost sistema, bi visoka koncentracija povzročila nastanek zelo viskozne raztopine oz. nastanek gela, česar pa ne

želimo. Zato je pomembno, da poznamo tako učinke aktivnih sestavin, kot njihov vpliv na reološke lastnosti sistemov, v katere jih vgradimo, saj nam to olajša izdelavo kozmetičnih izdelkov z željenimi lastnostmi.

- TRANSEPIDERMALNA IZGUBA VODE SKOZI KOŽO (TEWL)

Če smo v prvem delu klinične študije ugotovljali, kakšen vpliv imajo različne koncentracije HA na hidratacijo kože, bomo v tem delu preverili, ali ima HA vpliv tudi na TEWL. Hidratacija kože nam daje informacijo o vsebnosti vode v koži, iz česar lahko sklepamo ali je ta suha oz. dovolj hidratirana, TEWL pa je merilo za ugotavljanje intaktnosti kožne bariere. Voda se normalno skozi kožo lahko izgublja s potenjem ali pa s TEWL-om. Problem se pojavi pri poškodbah bariere, pri čemer se poveča transepidermalna izguba voda in posledično zmanjša hidratacija kože. S Tewametrom smo izmerili TEWL na treh mestih, kjer vzroci niso bili nanešeni (kontrolna meritev) in na mestih kjer so bili. V tabeli VI so podane povprečne vrednosti meritev vzrocev in kontrol.

**Tabela VI:** Povprečne vrednosti meritev izgube vode na levi in desni roki pri različnih koncentracijah

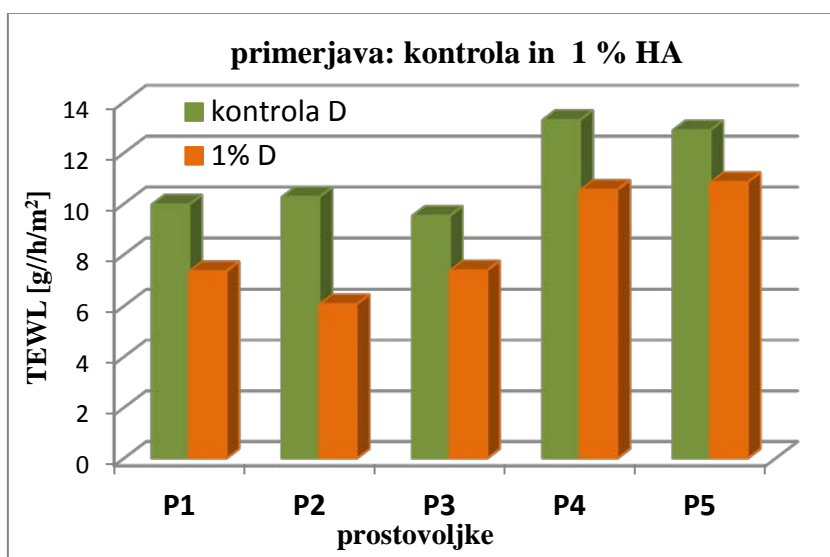
	P1		P2		P3		P4		P1	
c [%]	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$	L - $\bar{x}$	D - $\bar{x}$
0,1	7,65	7,73	9,83	6,60	5,45	7,23	9,18	13,18	8,58	4,00
0,2	9,30	7,15	9,78	7,20	6,13	6,58	11,83	10,90	8,70	9,23
0,3	6,78	8,20	8,58	7,83	6,78	5,75	10,68	10,55	9,70	9,00
0,4	8,33	8,35	9,15	8,13	7,20	6,88	8,88	9,93	7,43	9,18
0,5	6,63	9,28	6,70	9,28	7,00	7,33	8,78	7,33	8,25	10,53
0,6	6,33	6,65	8,48	9,33	7,20	7,48	5,78	11,13	7,68	7,63
0,7	7,13	6,60	9,10	8,75	7,23	7,33	10,25	11,15	9,05	8,00
0,8	8,05	6,65	7,93	8,53	6,68	5,80	8,70	10,45	8,30	10,70
0,9	9,35	6,48	8,43	5,68	6,28	8,23	10,65	11,38	7,48	8,55
1	9,40	7,35	7,03	6,08	8,65	7,38	7,83	10,55	9,15	10,85
kontrola - $\bar{x}$	8,37	9,97	9,80	10,27	7,93	9,53	9,43	13,30	13,33	12,90

P=prostovoljka; c=koncentracija vzorca; L=leva roka, D=desna roka,  $\bar{x}$ =povprečna vrednost meritev

Iz tabele VI lahko vidimo, da se vrednosti TEWL med seboj zelo razlikujejo, kar je posledica spreminjanja pogojev v prostoru, kjer smo izvajali meritve: nihanje temperature in relativne vlažnosti, poleg tega je bila na stropu nameščena klima, kar je povzročalo gibanje zraka in

posledično tudi vplivalo na meritve. Meritve so bile tukaj še zahtevnejše, ker je Tewameter bistveno bolj občutljiv na pogoje v okolju kot Corneometer. Vseeno lahko iz pridobljenih meritev vidimo, da niti ena kontrolna vrednost ne preseže vrednosti  $15 \text{ g/h/m}^2$ , kar pomeni, da so vse prostovoljke imele že pred nanosom vzorcev zdravo bariero. Glede na to, da so vzorci s koncentracijo nad 0,8% na koži pustili film, bi pričakovali, da bi se na teh mestih TEWL še zmanjšal, vendar iz vrednosti v tabeli vidimo, da so rezultati povsem naključni, neodvisni od nanešene koncentracije HA. Morda, bi pojav opazili, če bi pustili film na koži in tako izmerili TEWL, vendar bi pri tem merili izgubo vode iz nastalega filma in ne s površine kože, zato lahko le sklepamo, da nastanek filma na koži zmanjša TEWL.

Slika 23 prikazuje, kako se je TEWL zmanjšal po nanosu vzroca z 1% HA na desni roki, omenjene vrednosti smo izbrali, ker je bil tukaj pojav najbolj očiten. Razvidno je, da se TEWL po nanosu 1% HA še dodatno zmanjša, to je lahko posledica nastanka filma ali pa gre zgolj za naključje.



**Slika 23:** Primerjava transepidermalne izgube vode na desni roki, kjer ni bilo nanešenega vzorca in kjer je bil nanešen vzorec s koncentracijo 1% pri vseh petih prostovoljkah (P1-P5)

Če povežemo rezultate hidratacije pri 1% HA z TEWL-om lahko sklepamo, da tvorba filma poveča hidratacijo zaradi emolientnega delovanja, posledično pa se zmanjša tudi transepidermalna izguba vode. Za potrditev slednjega sklepa bi potrebovali še dodatne meritve pri bolj kontroliranih pogojih, na več prostovoljcih in v daljšem časovnem obdobju.



## 5 SKLEP

Hialuronska kislina je molekula, ki se čedalje več pojavlja v različnih kozmetičnih izdelkih, zato je zelo pomembno poznavanje njenih lastnosti. Z meritvami rotacije smo ugotovili, da se viskoznost raztopin povečuje linearno s koncentracijo raztopljenega HA, kar pomeni, da bodo višje koncentracije tvorile bolj viskozne sisteme. Prav tako smo ugotovili, da se pri vzorcih s koncentracijo do 0,5% HA viskoznost ne spreminja s povečevanjem strižne obremenitve, se pa linearno spreminja strižna napetost. V teh koncentracijah tvori HA idealne Newtonske tekočine. Pri koncentracijah nad 0,5% pa s povečevanjem strižne obremenitve viskoznost pada, strižna napetost pa se ne spreminja več linearno, kar je značilno za neidealne sisteme. Rotacijski testi so bili nezahtevni in pridobljeni rezultati so se skladali z našimi pričakovanji. Na več težav smo naleteli pri testih oscilacije, saj je meritev primerna za viskoznejše sisteme, naši vzorci pa so vsebovali nizke koncentracije HA, zato so bili ti bolj tekoči. Kljub temu smo uspeli dobiti nekaj reprezentativnih rezultatov, iz katerih lahko sklepamo, da raztopine z višjo koncentracijo HA izkazujejo bolj viskozno kot elastično obnašanje, medtem ko je bil pri raztopinah z nižjimi koncentracijami HA, bolj izražen elastični modul. Izmerili smo tudi teden dni stare vzorce in ugotovili, da se vrednosti viskoznega in elastičnega modula bistveno ne spremenijo, kar pomeni, da se vzorci, kljub temu, da ni bilo dodanih konzervansov ali stabilizatorjev, v roku tedna dni ne postarajo.

Glavna vloga HA v izdelkih ni uravnavanje viskoznosti, ampak dober vlažilni učinek. S klinično študijo smo ugotovili, da višje koncentracije HA povečajo hidratacijo kože, ne glede na merjeno roko (levo ali desno). Merjenje s Corneometrom je bilo dokaj nezahtevno in pridobljeni rezultati so bili v skladu z literaturnimi viri. Merjenje transepidermalne izgube vode s Tewametrom pa je bilo bistveno zahtevnejše, saj je sama aparatura zelo precizna, zato so tudi pridobljeni rezultati nihali. Na podlagi meritev in vizualnega opazovanja smo ocenili, da višje koncentracije HA na koži tvorijo film in s tem delujejo okluzivno, posledično pa se zmanjša TEWL. Če bi želeli, da bi bili rezultati klinične študije bolj reprezentativni, bi morali študijo izvesti na večjem številu prostovoljcev, v daljšem časovnem obdobju in pri bolj kontroliranih pogojih.

## LITERATURA

- (1) Neudecker et. al., Hyaluronans v Antiageing: Physiology to Formulation. Allured Publishing Corporation, 2006; 221-245
- (2) Gary J.F., James V., John J.V. Looking older: Fibroblast Collapse and Therapeutic Implications. Arch Dermatol., 2008; 144(5): 666-672
- (3) Robert S., Howard I.M. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. Clinics in Dermatology, 2008; 26(2): 106-122
- (4) Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterinari Medicina, 2008; 53(8): 397-411
- (5) Carmen G. B., Jan S., Floor K.K., Lambertus A.M. van den Broek, Gerrit E. Production Methods for Hyaluronan. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 2013; 2013: 14 strani
- (6) Eleni P., Michael R., Gorge K. Hyaluronic acid A key molecule in skin aging. Dermato-Endocrinology, 2012; 4(3): 253-258
- (7) Chiara S., Annalisa La G., Mario De R. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. V: Magdy Elnashar. Biopolymers, Sciyo, Rijeka, 2010: 387-412
- (8) Long L., Yanfeng L., Jianghua L., Guocheng D., Jian C. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. Microbial Cell Factories, 2011; 10:99.
- (9) Miranda A.F., Kenneth W.M., Peter E., Howard I.M. Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. Cutaneous and Ocular Toxicology, 2007; 26: 343-357
- (10) Farange M.A., Miller K.W., Elsner P., Maibach H.I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. International Journal of Cosmetic Science, 2008; 30(2): 87-95
- (11) B. Žgavec. Vpliv ultravijoličnega sevanja na kožo: morfološko-klinično-praktični vidiki. V: Koža in sonce: kozmetično aktivne sestavine, izdelki za zaščito in aktivno nego kože, 2012; 8-15
- (12) Joško O. Oksidativni stres. Zdravniški vestnik, 2012; 81: 393-406
- (13) Brown M.B., Jones S.A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for localized delivery of drugs to the skin. JEADV, 2005; 19(3): 308-318
- (14) Lenaers C., Barruche V., Bon G., Chauprade C., Closs B. A New Approach of Dry Skins: Use of a Regulator of the Epidermal Circulating Hydration Process. SÖFW-Journal, 2006; 132(11): 30-37

- (15) David J. G. *Dermatology: An Illustrated Colour Text*. Churchill Livingstone, 2002; 80-110
- (16) Farwick M., Lersch P., Strutz G. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid: Its Effects on Epidermal Gene Expression and Skin Aging. *SÖFW-Journal*, 2008; 134(11): 17-22
- (17) Michael H.G. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clinical Interventions in Aging*, 2007; 2(3): 369-376
- (18) Allemann I.B., Bauman L. Hyaluronic acid gel (Juvéderm) preparations in the treatment of facial wrinkles and folds. *Clinical Interventions in Aging*, 2008; 3(4): 629-634
- (19) Courage – Khazaka. Scientific Devices, Corneometer CM 825. <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/55-corneometer>. Dostopano: 25-11-2014
- (20) Imhof R.E., De Jesus M.E.P., Xiao P., Ciorrea L.I., Berg E.P. Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *International Journal of Cosmetic Science*, 2009; 31: 97-118
- (21) Schweikert K. Kahlhöfer V., Gabard B. A Better Way to get the Properties of Hyaluronic Acid on Dry Skin State. *SÖFW-Journal* 2005; 131(3): 22-30