

Małgorzata Wilk – Jędrusik

KWAS HIALURONOWY
W DERMATOLOGII ESTETYCZNEJ I KOSMETOLOGII:
INTRADERMOTERAPIA, SUPLEMENTACJA DOUSTNA
ORAZ APLIKACJA ZEWNĘTRZNA.

ROZPRAWA DOKTORSKA

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: prof. dr hab. n. farm. Gerard Nowak

Promotor

prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski

Poznań 2013

Składam serdeczne podziękowania

promotorowi pracy

prof. dr hab. n. med. Zygmuntowi Adamskiemu

za pomoc, cierpliwość i cenne wskazówki, które pozwoliły mi na realizację niniejszej pracy,
a także za życzliwość okazywaną mi w trakcie kolejnych etapów mojej drogi zawodowej.

Pragnę również podziękować

kierownikowi Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

prof. dr hab. n. farm. Gerardowi Nowakowi

za umożliwienie realizacji pracy.

Szczególnie dziękuję moim Najbliższym za miłość i duchowe wsparcie.

Spis treści

1	Wstęp.....	6
2	Kwas hialuronowy.....	8
2.1	Występowanie kwasu hialuronowego	10
2.1.1	Kwas hialuronowy w skórze	11
2.1.2	Kwas hialuronowy we krwi.....	16
2.2	Biogeneza kwasu hialuronowego	24
2.2.1	Synteza kwasu hialuronowego	24
2.2.2	Degradacja kwasu hialuronowego.....	25
2.2.3	Białka wiążące kwas hialuronowy	27
2.3	Aktywność biologiczna kwasu hialuronowego	29
3	Zastosowanie kwasu hialuronowego w medycynie i kosmetologii.....	33
3.1	Zastosowanie kwasu hialuronowego w medycynie.....	33
3.2	Zastosowanie kwasu hialuronowego w dermatologii estetycznej	36
3.3	Zastosowanie kwasu hialuronowego w kosmetologii	37
4	Preparaty zawierające kwas hialuronowy stosowane w dermatologii estetycznej i kosmetologii	39
4.1	Pochodzenie egzogenego kwasu hialuronowego	39
4.2	Preparaty stosowane w iniekcjach.....	39
4.2.1	Stabilizacja i degradacja.....	43
4.2.2	Skuteczność	44
4.2.3	Bezpieczeństwo	47
4.2.4	Intradermoterapia	52
4.3	Preparaty stosowane doustnie.....	55
4.4	Preparaty stosowane zewnętrznie.....	59
5	Założenia i cel pracy.....	61
6	Materiał i metodyka.....	63
6.1	Materiał	63
6.1.1	Intradermoterapia kwasem hialuronowym	63
6.1.2	Suplementacja doustna kwasu hialuronowego	64
6.1.3	Aplikacja zewnętrzna kwasu hialuronowego	66
6.2	Metodyka badań	68
6.2.1	Badanie podmiotowe	68
6.2.2	Metodyka terapii kwasem hialuronowym	68
6.2.3	Badanie przedmiotowe	71

6.2.4	Ocena ankietowa skuteczności preparatów kwasu hialuronowego przez ochotników..	80
6.2.5	Metody analizy statystycznej wyników badań	80
7	Wyniki	82
7.1	Struktura grup terapeutycznych.....	82
7.1.1	Porównanie grup terapeutycznych względem wieku	82
7.1.2	Porównanie grup terapeutycznych względem palenia papierosów	83
7.1.3	Porównanie grup terapeutycznych względem ilości wypijanych płynów a dobę	83
7.2	Ocena nawilżenia skóry w grupach terapeutycznych.....	85
7.2.1	Pomiar corneometrem	85
7.2.2	Skala suchości skóry – ocena ochotników.	91
7.2.3	Skala suchości skóry – ocena badacza.	96
7.3	Ocena elastyczności skóry w grupach terapeutycznych.....	99
7.3.1	Pomiar reviscometrem.....	99
7.3.2	Skala elastyczności skóry – ocena ochotników	109
7.3.3	Skala elastyczności skóry – ocena badacza.....	110
7.4	Ocena korekty zmarszczek w grupach terapeutycznych	111
7.4.1	Korekta zmarszczek – ocena ochotników	111
7.4.2	Korekta zmarszczek - ocena badacza	112
7.5	Ocena poprawy estetycznego wyglądu skóry (GAIS) w grupach terapeutycznych.....	113
7.5.1	GAIS – ocena ochotników.....	113
7.5.2	GAIS – ocena badacza.....	114
7.6	Poziom kwasu hialuronowego we krwi w grupach terapeutycznych.....	116
7.6.1	Zależność poziomu kwasu hialuronowego we krwi od wieku	120
7.7	Czas zauważenia pierwszych efektów terapii kwasem hialuronowym w grupach terapeutycznych.....	122
7.8	Działania niepożądane w grupach terapeutycznych.....	124
8	Omówienie wyników i dyskusja	126
9	Wnioski	143
10	Streszczenie	144
11	Summary	146
12	Bibliografia.....	148
13	Załączniki	172

Indeks skrótów

ECM – macierz pozakomórkowa (extracellular matrix)

GAG – glikozaminoglikany

HA – kwas hialuronowy / hialuronian (hyaluronic acid / hyaluronan)

HABP – białko wiążące kwas hialuronowy (hyaluronic acid / hyaluronan binding protein)

HMWHA - wysokocząsteczkowy kwas hialuronowy (high molecular weight hyaluronic acid)

Hyal -1 – hialuronoglukozaminidaza 1 (hyaluronoglucosaminidase 1)

LMWHA – niskocząsteczkowy kwas hialuronowy (low molecular weight hyaluronic acid)

NASHA – stabilizowany kwas hialuronowy pochodzenia niezwierzęcego (Non – Animal – Stabilized – Hyaluronic – Acid)

NMF – naturalny czynnik nawilżający (natural moisturising factor)

PG – proteoglikany

1 Wstęp

Kwas hialuronowy od wielu lat jest przedmiotem zainteresowania naukowców. Został wyizolowany z pępowiny człowieka, jako składnik tzw. „galarety Whartona” (1). Po raz pierwszy opisali go w 1934 roku Meyer i Palmer (1-3). Opisali oni procedurę izolacji kwasu hialuronowego ze szklistki oka wołu (3). W roku 1964 zsyntetyzowano go *in vitro* (2). Można przypuszczać, że hialuronian stanowi najstarszą formę ewolucyjną glikozaminoglikanów. Znalezione go m. in. w niektórych bakteriach: *Aerobacter aerogenes* i *Streptococcus pyogenes* (1, 4).

Początkowo, w latach czterdziestych, kwas hialuronowy stosowano w weterynarii, w celu leczenia kontuzji u koni wyścigowych. W okulistyce po raz pierwszy zastosowano go w 1961 roku. Podczas operacji odklejającej się siatkówki stanowił on substytut ciała szklistego (5). W latach osiemdziesiątych zaczęto go stosować przy operacjach wszczepienia soczewki, w celu zapobiegania klejeniu się soczewki do podłoża. Kwas hialuronowy znajduje zastosowanie w wielu innych dziedzinach medycyny, m. in.: w dermatologii, reumatologii, stomatologii, laryngologii i chirurgii. Może być również wykorzystywany jako marker chorób reumatycznych, schorzeń wątroby oraz namnażania komórek nowotworowych. Poza tym stosowany jest w farmacji, gdzie przedłuża działanie leków o krótkim okresie półtrwania.

Badania funkcji kwasu hialuronowego prowadzono od wielu lat. Nabrały one jednak tempa dopiero w latach pięćdziesiątych XX wieku. Opisano wówczas enzymy syntetyzujące i degradujące kwas hialuronowy, a także liczne hialadheryny (6). Pozwoliło to na odkrycie wielu funkcji, jakie spełnia kwas hialuronowy w organizmie ludzkim .

W dermatologii estetycznej kwas hialuronowy zastosowano po raz pierwszy w roku 1992 (5). Już w 1966 roku firma Pharmacia Upjohn zaczęła propagować hialuronian w terapii zmarszczek. Cząsteczka kwasu jest jednak zbyt duża, aby przeniknąć z preparatu kosmetycznego do skóry. Stąd pojawiła się idea podawania kwasu hialuronowego śródskórnym. Jednak okres półtrwania, wynoszący zaledwie ok. 12 godzin, był zbyt krótki, aby stosować kwas hialuronowy w terapii zmarszczek. Dlatego poddano go stabilizacji, przedłużając jego czas półtrwania do kilku miesięcy. W tej postaci kwas hialuronowy wykorzystywany jest z powodzeniem w terapii zmarszczek, wypełnianiu ust czy rewitalizacji skóry. W celu rewitalizacji skóry szeroko stosuje się również preparaty nieusieciowane. Usieciowany kwas hialuronowy został zaaprobowany przez FDA w grudniu 2007 roku (7).

Ponadto istnieją rozmaite połączenia kwasu hialuronowego m. in. z akrylikiem hydrożelowym, dextranem i wodą destylowaną.

Procedury z użyciem kwasu hialuronowego stanowią wysoki odsetek wszystkich procedur znajdujących zastosowanie w dermatologii estetycznej. W Stanach Zjednoczonych na 12 milionów procedur kosmetycznych rocznie, 1 milion stanowią te z użyciem kwasu hialuronowego (8). Na rynku dermatologii estetycznej pojawiają się coraz to nowe preparaty, zawierające w swoim składzie kwas hialuronowy. Różnią się one między sobą m. in. stopniem usieciowania, stężeniem kwasu hialuronowego oraz substancjami z którymi są łączone w preparacie. Wiele z nich wprowadzanych jest do użycia, mimo braku wystarczających danych doświadczalnych i klinicznych potwierdzających ich skuteczność i bezpieczeństwo. Nasuwa to konieczność kontroli poszczególnych preparatów wykorzystywanych w dermatologii estetycznej.

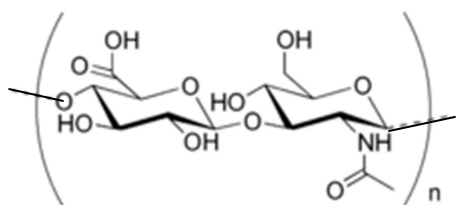
Dostępne są liczne publikacje na temat skuteczności i bezpieczeństwa niektórych preparatów kwasu hialuronowego, przede wszystkim usieciowanych. Najlepiej udokumentowana jest skuteczność Restylane'u. Skuteczność nowszych preparatów oraz preparatów nieusieciowanych, nie jest już tak szeroko opisywana w literaturze. Bezpieczeństwo preparatów kwasu hialuronowego oceniane jest jako wysokie. Podkreśla się głównie niewielkie właściwości alergizujące kwasu hialuronowego oraz możliwość usunięcia nieprawidłowo podanego preparatu za pomocą hialuronidazy.

Sporadycznie pojawiają się artykuły oceniające doustną suplementację kwasu hialuronowego w terapii suchej, starzejącej się skóry (261, 264).

Nie spotyka się jednak publikacji, porównujących skuteczność kwasu hialuronowego podawanego śródskórnym, doustnym oraz stosowanego zewnętrznym. Nie istnieją również badania oceniające przenikanie kwasu hialuronowego podanego śródskórnym oraz doustnym do krwioobiegu, a tym samym określające możliwość wywołania działań ogólnoustrojowych i ograniczające zastosowanie kwasu hialuronowego jako markera chorób.

2 Kwas hialuronowy

Hialuronian – polianion kwasu hialuronowego - jest naturalnym biopolimerem, którego struktura cząsteczkowa jest bardzo zbliżona międzygatunkowo (2). Makrocząsteczka kwasu hialuronowego jest liniowym polimerem złożonym z ok. 30 000 powtarzających się jednostek disacharydowych zawierających reszty kwasu heksuronowego (kwas D-glukuronowy) i reszty N – acetylowanej heksozoaminy (N-acetylo-D-glukozaminę) w stosunku 1:1 (1, 9). Połączone są one wiązaniami glikozydowymi, naprzemiennie 1-3 i 1-4 (1). Wzór cząsteczkowy kwasu hialuronowego: $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ (wzór strukturalny – ryc. 1). Wzór cząsteczkowy hialuronianu sodu: $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ (10).



Rycina 1. Wzór strukturalny kwasu hialuronowego. Źródło: opracowanie własne

Hialuronian należy do rodziny glikozaminoglikanów, naturalnie występujących we wszystkich tkankach zwierzęcych. Wg. Scotta kwas hialuronowy został zakwalifikowany do czwartej grupy glikozaminoglikanów (11). Glikozaminoglikany trzech pierwszych grup w połączeniu z białkiem tworzą proteoglikany. Hialuronian jest jedynym glikozaminoglikanem, który nie jest związany kowalencyjnie z białkiem (1,12). Mimo to w przestrzeni pozakomórkowej oddziałuje on niekowalencyjnie z wieloma różnymi cząsteczkami np. z albuminami lub białkami rdzeniowymi niektórych proteoglikanów (przede wszystkim z agrekanem – białkiem rdzeniowym proteoglikanów chrząstki, który zawdzięcza swoją nazwę zdolności do agregacji z kwasem hialuronowym) (1,13). Tym samym kwas hialuronowy nie tworzy, jak inne glikozaminoglikany proteoglikanów, natomiast uczestniczy w tworzeniu agregatów proteoglikanów (13). Łańcuchy HA są nierozgałęzione i nie podlegają żadnym modyfikacjom tj. siarczanowaniu i epimeryzacji (1,14). Jest to cecha charakterystyczna hialuronianu, ponieważ pozostałe GAG podlegają modyfikacjom i występują w dużej liczbie izomerów (15). Występujący w ustroju hialuronian może się więc różnić między sobą jedynie

długością łańcucha, która określa wielkość cząsteczki, a także stężeniem i miejscem występowania (15). Masa cząsteczkowa HA wynosi, w zależności od rodzaju tkanki, 10^5 – 10^7 Da (14). Może także osiągać znacznie niższe wartości (od 4 kDa), ponieważ w organizmie dochodzi do depolimeryzacji GAG do znacznie mniejszych fragmentów, z oligosacharydami włącznie (1,16). Depolimeryzacji dokonują m. in. reaktywne formy tlenu oraz białka enzymatyczne takie jak hialuronidazy, β -glukuronidazy i heksozaminidazy (17). Do procesu degradacji hialuronianu dochodzi m. in. w przebiegu destrukcji tkankowej, procesów zapalnych oraz onkogenezy.

Struktura przestrzenna hialuronianu ma postać spirali o przypadkowych skrętach. W roztworze wodnym hialuronian przyjmuje postać podwójnej, lewoskrętnej, sztywnej, stabilizowanej przez mostki wodorowe helisy (14). Helisa HA pod wpływem czynników zewnętrznych może zmieniać swoje właściwości fizykochemiczne (1). W obecności soli wapnia (Ca^{++}) tworzy pofałdowaną, potrójną helisę, stabilizowaną mostkami $\text{COO}\cdots\text{Ca}\cdots\text{COO}$ -. Z kolei w obecności jonów jednododatnich może tworzyć pofałdowaną, poczwórną helisę, a także stabilizowane białkami struktury włókienkowe o niewielkiej masie cząsteczkowej (18). Wzdłuż łańcucha polisacharydowego eksponowane są naprzemiennie hydrofobowe i hydrofilowe powierzchnie pierścieni piranozowych cukrów tworzących HA. Obecność ugrupowań hydrofobowych tworzy sprzyjające warunki do samoagregacji HA, czyli do tworzenia agregatów zbudowanych z dwóch lub większej ilości cząsteczek HA (1). W wyniku samoagregacji mogą powstawać uporządkowane struktury przestrzenne, przede wszystkim w ciele szklistym oka (1).

HA jest jedną z najbardziej higroskopijnych cząsteczek, występujących w naturze – ma zdolność wiązania wody w ilości do 1000 razy przekraczającej jej własną masę. Większość cząsteczek wody jest mechanicznie unieruchomiona wewnątrz helisy polisacharydowej, podczas gdy część cząsteczek wiąże się z glikanem za pomocą mostków wodorowych (19). Na uwodnienie HA ma wpływ jego forma przestrzenna, na co z kolei wpływ mają pH i rozmaite kationy (1). Cechy te sprawiają, że hialuronian posiada wielką objętość hydrodynamiczną. Cechuje się również bardzo dobrą osmotycznością. Lepkość HA przekracza lepkość wody 5000 razy. Przykładowo roztwór o stężeniu 1 mg HA/cm^3 buforu wykazuje względną lepkość 20 (18).

2.1 Występowanie kwasu hialuronowego

Kwas hialuronowy występuje we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych kręgowców. W organizmie dorosłego człowieka jest go ok. 15 g, z czego 5g jest zużywane w ciągu doby (12,20,21). Stanowi główny węglowodanowy komponent macierzy pozakomórkowej (ECM) (16,22,23). Zlokalizowany jest zarówno na powierzchni komórek, jak i wewnątrzkomórkowo (16,24). Do niedawna sądzono, że kwas hialuronowy, ze względu na ogromne rozmiary cząsteczek, polianionowe właściwości i heterodynamiczną strukturę, jest zlokalizowany wyłącznie pozakomórkowo (24). Odkryto jednak kwas hialuronowy również wewnątrz komórek, ale pochodzenie wewnątrzkomórkowego HA (16) jest wciąż nieznane. Bierze się pod uwagę m. in. receptorową endocytozę pozakomórkowego HA (za pomocą receptorów CD44), w przebiegu procesu jego tkankowej degradacji. Ponadto do internalizacji HA może dochodzić pozareceptorową, alternatywną drogą, niezwiązaną z katabolizmem HA, a z regulacją funkcji jądra, chromosomalną rearanżacją lub procesami komórkowej proliferacji i lokomocji (16).

HA jest najważniejszym składnikiem substancji międzykomórkowej tkanki łącznej, ścian naczyń włosowatych i desmosomów (10). Ponad połowa (56%) ustrojowych zasobów hialuronianu zlokalizowana jest w skórze. Jak podaje prof. T. Laurent w skórze jest ok. 400-600 mg/l kwasu hialuronowego (20). Ponadto kwas hialuronowy można znaleźć prawie we wszystkich organach, a także we krwi i w moczu. Duża jego ilość znajduje się w pępowinie, mięśniach (36%), mięśniu sercowym i zastawkach wsierdza (18), cieple szklistym oka, płynie okołostawowym, błonie śluzowej jamy ustnej oraz w układzie limfatycznym (10,12,20). Co ciekawe w zdrowej wątrobie HA jest niewiele, ale znacznie większa jego ilość jest w hodowlach hepatocytów i w wątrobie po częściowej hepatektomii (18). Występuje w znacznych ilościach w tkankach embrionalnych, gdzie w trakcie rozwoju embriomu jest zastępowany przez różne proteoglikany (18).

Hialuronian jest obecny także w otoczkach ścian komórkowych bakterii, należących do patogennych szczepów streptokoków hemolitycznych (*Streptococcus pyogenes*, *Aerobacter aerogenes*) oraz *Pasteurella* (16, 25). Może to sugerować, że kwas hialuronowy reprezentuje najstarszą formę ewolucyjną glikozaminoglikanów (1,4). Identyczny skład polisacharydu bakterii *Streptococcus* z polisacharydem kręgowców, z jednej strony uniemożliwia uruchomienie przez organizm gospodarza mechanizmów obronnych tj. fagocytozy czy aktywacji dopełniacza wobec wirulencji bakteryjnym hialuronianem (22,26),

z drugiej jednak strony umożliwia wykorzystanie bakteryjnego hialuronianu w medycynie, m.in. w zabiegach dermatologii estetycznej.

2.1.1 Kwas hialuronowy w skórze

Ponad połowa ustrojowych zasobów hialuronianu zlokalizowana jest w skórze (27). Oceniając procent mokrej masy, skóra składa się w 60 – 72 % z wody, kolagen w skórze stanowi 27 – 39 %, elastyna – 0,2 - 0,6%, a glikozaminoglikany (w tym kwas hialuronowy) – 0,03 – 0,3 % (21). Laurent and Fraser podają, że skóra zawiera 0,5 - 1 mg kwasu hialuronowego na g masy mokrej tkanki lub około 50% całkowitej zawartości kwasu hialuronowego w danym organizmie (28). Kwas hialuronowy syntetyzowany jest w skórze przez fibroblasty i keratynocyty, a jego szacunkowy czas półtrwania wynosi u ssaków ok. 12 godzin (29).

Analiza histochemiczna z użyciem biotynylowanej proteiny wiążącej kwas hialuronowy wykazała, że kwas hialuronowy jest zlokalizowany nie tylko w skórze właściwej, ale także w naskórku (30-32). Publikacje opisujące rozmieszczenie kwasu hialuronowego w naskórku różnią się jednak między sobą. W doniesieniach wyżej wymienionych autorów (28), kwas hialuronowy był obserwowany przede wszystkim w środkowej części warstwy kolczystej, ale nie w warstwie rogowej czy ziarnistej. Również Tammi i wsp. przekonywali, że w warstwie rogowej i ziarnistej kwasu hialuronowego nie obserwuje się, największą jego ilość można znaleźć w warstwie kolczystej naskórka, a w warstwie podstawnej naskórka kwasu hialuronowego jest najmniej (33). Cięciara i Wagner podają z kolei, że w błonie podstawnej naskórka odnotowuje się stężenie kwasu hialuronowego przekraczające 55% (10).

Generalnie, uznawano, że HA jest nieobecny w prawidłowej warstwie rogowej naskórka. Inne badania wykazywały jednak anormalną akumulację kwasu hialuronowego w międzykomórkowej przestrzeni korneocytów parakeratotycznej warstwy rogowej zmian łuszczykowych (34) i warstwy rogowej w hodowlach tkankowych skóry poddawanych terapii kwasem retinowym (35). Ponadto Sakai i wsp. (36) zbadali ekspresję mRNA genów syntaz hialuranianowych (Has1, Has2) w skórze myszy, używając in situ hybrydyzacji mRNA, i odkryli, że oba rodzaje mRNA są wyraźnie obecne w naskórku, ponadto wyraźną obecność obu rodzajów mRNA stwierdzili w warstwie ziarnistej (37). Te wyniki sugerują, że warstwa

ziarnista może dostarczać kwasu hialuronowego do warstwy rogowej naskórka. Sakai i wsp. w badaniach z 2000 roku (36) określili ponadto ilościową zawartość kwasu hialuronowego w warstwie rogowej zdrowego naskórka i zbadali przyłączanie [3H]-glukozaminy do kwasu hialuronowego hodowli komórkowej skóry mysiej. Przy wykorzystaniu wysokowydajnej chromatografii cieczonej, określili ilość kwasu hialuronowego zawartego w warstwie rogowej, naskórku (wyłączając warstwę rogową) i skórze właściwej myszy. Okazało się, że ciężar substancji suchej wyniósł odpowiednio $22,3 \pm 2,9$, $15,1 \pm 1,5$ i $738,6 \pm 31,6$ ug na g. Po trzecim pasażu komórek z hodowli komórkowej, naskórek syntezował podwójną ilość (wyrażoną w liczbie rozpadów promieniotwórczych na minutę - dpm - na miligram suchej masy) [3H] znakowanego kwasu hialuronowego, podczas gdy warstwa rogowa naskórka i skóra właściwa wykazywała niemal tę samą zawartość [3H] znakowanego kwasu hialuronowego. Masa cząsteczkowa [3H] znakowanego kwasu hialuronowego była najwyższa ($>1.0 \times 10^6$) w skórze właściwej i wyraźnie niższa ($<6.0 \times 10^4$) w warstwie rogowej naskórka. Bazując na tych wynikach, Sakai i wsp. (36) zaprzeczyli wielu analizom histochemicznym przy użyciu specyficznego białka wiążącego kwas hialuronowy HABP (HA binding protein) i potwierdzili, że kwas hialuronowy jest dostarczany do warstwy rogowej z leżących poniżej keratynocytów i występuje w zdrowej warstwie rogowej naskórka. Niezgodność z wcześniejszymi badaniami na temat zawartości kwasu hialuronowego w warstwie rogowej naskórka można wyjaśnić aktywnością wiążącą HABP do kwasu hialuronowego. Zależy ona od masy cząsteczkowej HA: Sakai i wsp. (36) potwierdzili, że aktywność wiążąca HABP do HA o niskiej masie cząsteczkowej ($4-6 \times 10^4$), stanowi 50% aktywności wiążącej, HA o wysokiej masie cząsteczkowej ($>10^6$). Kwas hialuronowy w warstwie rogowej naskórka występuje w swojej formie o małej masie cząsteczkowej, czyli takiej, której wcześniejsze badania histochemiczne mogły nie wykryć przez niskie wiązanie HABP do HA. Ponadto miejsca wiązania kwasu hialuronowego do HABP mogą być maskowane przez składowe warstwy rogowej naskórka. Można przypuszczać, że kwas hialuronowy występując w prawidłowej warstwie rogowej, jest czynnikiem biorącym udział w utrzymaniu jej nawilżenia, podobnie jak NMF i lipidy. Ponadto kwas hialuronowy może regulować właściwości mechaniczne warstwy rogowej naskórka, ze względu na to, że oddziałuje z fofolipidami ze struktur lamelarnych warstwy rogowej (38).

W skórze właściwej HA zlokalizowany jest w warstwie brodawkowatej, w mikrofibrylach kolagenu, między włóknami kolagenowymi i sprężystymi (12). Armstrong i wsp. (23) zakładają, że w skórze znajdują się dwie pule kwasu hialuronowego. Główna

frakcja kwasu hialuronowego, odpowiadająca puli matriksowej, miałaby dużą masę cząsteczkową. Mniejsza część w tkance (ruchoma pula) miałaby niższą masę cząsteczkową i rozkład wielkości podobny do tego występującego w limfie. Badacze przy użyciu kombinacji elektroforezy żelowej oraz oznaczeń radiometrycznych zmierzili wielkość hialuronianu w limfie i tkance królików, dzięki czemu wykazali, że masa cząsteczkowa hialuronianu w tkankach (w tym w skórze) jest znacznie większa niż masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego w limfie. Wzór elektroforetyczny dla skóry wykazywał szczyt dla kwasu hialuronowego o dużej masie cząsteczkowej rzędu $\sim 6 \times 10^6$. Frakcja hialuronianu o masie cząsteczkowej $> 4 \times 10^6$ stanowiła w skórze co najmniej 57%, podczas gdy w limfie zaledwie 7% (23). W limfie skóry znajdowała się z kolei duża ilość (31%) hialuronianu o masie cząsteczkowej $< 0,79 \times 10^6$ (23). Armstrong i wsp. (23) wymuszając rozciąganiem objętościowym tkanek, wzrost przepływu limfy, wykazali pięciokrotny wzrost przepływu w limfie kwasu hialuronowego o niskiej masie cząsteczkowej. Ponieważ chłonka pobierana była z naczyń limfatycznych przedwężłowych, low-molecular-weight hialuronian nie został wyprodukowany przez degradację w węzłach chłonnych. Chociaż pomiary tkankowe nie wykazały znacznej ilości HA o niskiej masie cząsteczkowej, być może ze względu na zbyt niską ilość do pomiaru tego hialuronianu w tkance, przepływ w limfie scharakteryzował ruchomą pulę tkankową. Nie wykazanie znacznych ilości kwasu hialuronowego o niskiej masie cząsteczkowej w tkankach, jest zgodne z wcześniejszymi badaniami na niezłośliwych zmianach tkankowych, które udowodniły brak aktywności hialuronidazy zewnątrzkomórkowej w fizjologicznym pH (39). Możliwe więc, że tkankowy kwas hialuronowy nie jest tak polidispersyjny, jak dotychczas sądzono (23)

Zawartość kwasu hialuronowego w skórze nie jest stała. Podwyższony jego poziom obserwuje się w przebiegu procesów zapalnych toczących się w skórze (20). Wzrasta on w trakcie gwałtownej proliferacji, regeneracji i w procesach naprawczych tkanek (12). Podwyższony poziom HA w tkance otaczającej ranę obserwuje się m. in. w procesie gojenia się ran.

Czas półtrwania kwasu hialuronowego w naskórku wynosi 24 godziny, co wykazali używając hodowli tkankowych, Tammi i wsp. (40). Mechanizmy degradacji HA w naskórku pozostają jednak niejasne. Do degradacji kwasu hialuronowego może dochodzić pod wpływem hialuronidazy keratynocytów (41) i/lub cząsteczki reaktywnych form tlenu (42). Okazało się, że sekrecja hialuronidazy z keratynocytów wzrasta w trakcie procesów

różnicowania. Z kolei immunohistologiczne sygnały CD44, głównego receptora HA w błonie komórkowej, zanikają w warstwie ziarnistej (43). Część HA produkowanego w naskórku może następnie być degradowana w trakcie procesu różnicowania i transportowana z lub bez udziału korneocytów do warstwy rogowej. Ewentualnie, komórki ziarniste mogą posiadać system zaopatrywania warstwy rogowej w kwas hialuronowy, jako że silne sygnały mRNA Has1 i Has2 były zauważane w warstwie ziarnistej (37).

Usuwanie kwasu hialuronowego ze skóry w ciągu 24 godzin udowodniono na podstawie oceny przepływu limfy i stężenia w niej kwasu hialuronowego (27). Reed i wsp. mierzyli ilość usuwanego wolnego kwasu hialuronowego ze skóry, oceniając eliminację znakowanego [3H] hialuronianu, podanego podskórnice królikom (44). Usunięcie radioaktywności określone było pomiarem 3H w osoczu. W ciągu pierwszych 24 h po wstrzyknięciu, 10-87% znacznika przeszło do krwi, mniej w przypadku wstrzykiwań o wysokim stężeniu kwasu hialuronowego. Okres półtrwania wynosił 0,5-1 dzień, gdy stężenie kwasu hialuronowego wynosiło 5 mg / ml lub mniej. Gdy stężenie hialuronianu wynosiło 10 mg / ml lub więcej, usunięcie następowało powoli przez około 24 godziny, a następnie stawało się podobne do tego w eksperymentach z niskim stężeniem kwasu hialuronowego. Wolny hialuronian w stężeniach fizjologicznych przechodzi więc z tą samą szybkością co albumina surowicy, podtrzymując koncepcję, że hialuronian usuwany jest głównie przez przepływ limfy i jest degradowany w węzłach chłonnych i wątrobie.

2.1.1.1 Kwas hialuronowy w skórze starzejącej się

W przebiegu procesu starzenia chronologicznego znacznie maleje ilość kwasu hialuronowego w skórze. W licznych badaniach stwierdzono stopniową, związaną z wiekiem redukcję całkowitej zawartości glikozaminoglikanów w skórze (45,46). Proces ten zaczyna się już w wieku 25 lat. Od 25 do 50 rż ilość HA zmniejsza się o 50%. Największy spadek zawartości kwasu hialuronowego notuje się w górnych partiach skóry, podczas gdy jego ilość wzrasta w warstwie podstawnej naskórka (31). Jednak w skórze starczej nie obserwuje się już kwasu hialuronowego w naskórku (47), a obecny jest wciąż w warstwie brodawkowatej skóry. Wg Mayera i Sterna zmiany te są zależne od wzrostu ilościowego form związanych i nie zależą ani od stężenia kwasu ani od wielkości jego polimeru (31). Obniżona ilość kwasu hialuronowego w skórze a w rezultacie mniejsze jej uwodnienie, może wyjaśniać

dezorganizację kolagenu i włókien elastycznych w starzejącej się skórze (48). Fleishmajer i wsp. podają, że związany z wiekiem spadek ilości HA w skórze, a więc zmniejszenie ilości związanej przez niego wody, prowadzi do kurczenia istoty podstawowej tkanki oraz zmniejszenia jej lepkości, co prowadzi do zmiany częstotliwości dyfuzji jonów i makromolekuł z krwi do tkanek oraz w kierunku przeciwnym (49). Procesy te są prawdopodobnie przyczyną wysuszenia i pomarszczenia starzejącej się skóry (8), zmniejszenia jej objętości oraz pogorszenia elastyczności (50,51).

Charakterystyczny dla procesu starzenia spadek ilości kwasu hialuronowego w tkankach, obserwuje się już w naczyniach tętninowych. Charakterystyczna dla rozwijających się tkanek jest akumulacja kwasu hialuronowego wzdłuż ścieżek migrujących komórek mezenchymatycznych. Podczas dalszego różnicowania następuje ich usuwanie i zastępowanie przez siarczany GAGów (52). W ścianie naczyń tętninowych kwas hialuronowy stanowi około 45% całkowitej ilości glikozaminoglikanów, podczas gdy w tętnicach i żyłach dorosłego człowieka zaledwie 9%. Odwrotnie wyglądają proporcje dla siarczanu chondroityny i siarczanu dermatanu. W naczyniach tętninowych stanowią one około 30% glikozaminoglikanów, podczas gdy w naczyniach człowieka dorosłego aż ponad 80% (52). Romanowicz i wsp. stwierdzili, że gestoza późna jest powiązana z przedwczesnym starzeniem się ścian tętninowych (52). W swoich badaniach wykazali, że w tętnicach tętninowych noworodków matek zdrowych, średnia zawartość kwasu hialuronowego przewyższała 40% całkowitej ilości GAG, podczas gdy w gestozie późnej ilość kwasu hialuronowego spadała do ok. 29% wszystkich GAG.

W fotostarzeniu skóry dochodzi do zwiększenia ilości GAG w skórze. We włóknach elastycznych wzrasta ilość wysokocząsteczkowego proteoglikanu siarczanu chondroityny (wersikanu), który jest zdolny do wiązania kwasu hialuronowego (12).

Związany z wiekiem spadek ilości kwasu hialuronowego w skórze, może być dodatkowo obniżony w wyniku zaburzeń hormonalnych, szkodliwych czynników atmosferycznych i palenia tytoniu (53). Wpływ hormonów na regulację metabolizmu glikozaminoglikanów jest niezaprzeczalny. Wpływają one na liczbę fibroblastów syntetyzujących elementy tkanki łącznej, a także na poszczególne etapy biosyntezy składników tej tkanki, w tym kwasu hialuronowego. Proliferację fibroblastów pobudza m. in. hormon wzrostu (GH) i czynnik wzrostowy fibroblastów (FGF) (54). Badania in vivo wykazują ponadto, że hormony gruczołu tarczowego wpływają na zawartość

glikozaminoglikanów w tkankach. Pod ich wpływem dochodzi do wzrostu poziomu GAG i wzmożenia ich obrotu (55). W innych badaniach zaobserwowano z kolei odkładanie GAG bez wzrostu ich obrotu (56).

Badacze próbują odpowiedzieć na pytanie, co jeszcze wpływa stymulująco, a co hamująco na produkcję kwasu hialuronowego w skórze. W tym celu do hodowli ludzkich keratynocytów lub fibroblastów dodają substancje, które mogłyby wpłynąć na syntezę i degradację kwasu hialuronowego. Akiyama i wsp. do hodowli ludzkich keratynocytów dodali chlorek wapnia, uzyskując wzrost zawartości kwasu hialuronowego w hodowli (57). Z kolei Tammi i wsp. dodali do podobnej hodowli kwas retinowy, zwiększając w ten sposób syntezę hialuronianu (58). Z badań tych wynika, że wprowadzając do naskórka wyżej wymienione substancje (chlorek wapnia i kwas retinowy) można pobudzić epidermalną produkcję kwasu hialuronowego.

Wykorzystując podobne założenia badano wpływ, aplikowanych do hodowli ludzkich fibroblastów substancji, na syntezę i degradację kwasu hialuronowego w skórze właściwej. Przyspieszenie syntezy glikozaminoglikanów w hodowlach fibroblastów pobudzają tyroksyna i duże ilości trójiodotyroniny (56,59). Z kolei Edward i wsp. uzyskali zmniejszenie syntezy kwasu hialuronowego w skórze po dodaniu do hodowli ludzkich fibroblastów askorbinianu (60). Saarni i wsp. identyczny efekt osiągnęli dodając do hodowli kortykosteroidy (61). Potwierdza to zresztą znany od lat negatywny wpływ kortykosteroidów na skórę człowieka.

2.1.2 Kwas hialuronowy we krwi

W osoczu krwi stwierdza się wysokie stężenie hialuronianu rzędu 10 - 100 ug/l (10,12). U osób w średnim wieku wynosi ono średnio 30 – 40 ug / l (62). Stężenie kwasu hialuronowego w osoczu zależy od stosunku wielkości napływu hialuronianu z tkanek poprzez naczynia limfatyczne do wielkości usuwania z krążenia przez komórki sinusoidalne wątroby (SEC) (62,63). Szacowany okres półtrwania w osoczu wynosi wg niektórych badaczy 2 – 5 min (28), wg innych 5 – 6 minut (64). Gdyby wstrzyknąć zaznaczony radioaktywnie HA, w kilka minut można jego obecność stwierdzić w wątrobie, śledzionie, nerkach i układzie limfatycznym (20).

Poziom kwasu hialuronowego w osoczu ulega zmianom w zależności od procesów toczących się w organizmie. Podwyższona ilość kwasu hialuronowego we krwi może wskazywać na przebieg procesu zapalnego lub chorobowego (20). Wzrasta ona w trakcie gwałtownej proliferacji, regeneracji i w procesach naprawczych tkanek (12,31). Znacznie zwiększone wydzielanie HA z tkanek do krwi i do moczu opisano w niezwykle rzadkim schorzeniu – Werner’s syndrom (choroba znacznie przyspieszająca proces starzenia się organizmu), a także w przebiegu procesu starzenia się (20).

Podwyższony poziom kwasu hialuronowego w surowicy krwi stwierdza się również w takich stanach chorobowych jak: marskość wątroby, reumatoidalne zapalenie stawów czy sklerodermia (12).

Wysokie stężenia kwasu hialuronowego notowane są w chorobach wątroby, które prowadzą do osłabienia klirensu wątrobowego poprzez uszkodzenie komórek sinusoidalnych wątroby (62). Ocena poziomu kwasu hialuronowego w osoczu może w nieinwazyjny sposób ocenić nasilenie zwłóknienia wątroby. Avila i wsp. porównywali poziom kwasu hialuronowego ze stopniem zwłóknienia wątroby widocznym w badaniu histopatologicznym u pacjentów z WZWC (65). Poziom kwasu hialuronowego był skorelowany z nasileniem zwłóknienia wątroby (w grupie dializowanej z WZWC wynosił 984,8 ng/mL, w grupie z WZWC 222.3 ng/mL). Podobne wyniki uzyskali Hutchison i wsp. badając poziom kwasu hialuronowego w surowicy pacjentów z WZWC i porównując go z bioptatem wątroby (66). U pacjentów z marskością wątroby stwierdzili znamienne wyższe stężenia HA w porównaniu ze stężeniami HA u pacjentów bez marskości (382 ± 31 vs 110 ± 9 ug/L). Z kolei wartości u pacjentów ze zwłóknieniem były istotnie wyższe w porównaniu z pacjentami bez zwłóknienia (179 ± 11 ug/l vs 62 ± 20 ug/L). Stężenie kwasu hialuronowego < 60 ug/L wyklucza obecność marskości lub znacznego zwłóknienia z wartością prognostyczną odpowiednio 99 i 93% (66). Parsian i wsp. u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby uzyskali z kolei średnie stężenie kwasu hialuronowego rzędu $113,4 \pm 59,2$ ng / ml) a w w grupie kontrolnej ($46,6 \pm 10,5$ i $46,1 \pm 10,1$ ng/ml , $p < 0,001$) (67). Punkt odcięcia dla kwasu hialuronowego wykluczający zwłóknienie wątroby wynosił 59,5 ng / ml, natomiast odróżniający łagodne zwłóknienie od ciężkiego 102.0 ng / ml. Ponadto badacze zaobserwowali stopniowy spadek stężenia HA po sześciu miesiącach leczenia, było ono jednak nadal wyższe niż w grupie kontrolnej.

Podwyższony poziom kwasu hialuronowego może być również predyktorem zwłóknienia wątroby u dzieci z niealkoholowym stłuszczeniem wątroby – najczęstszą przewlekłą chorobą

wątroby u dzieci i młodzieży (68). Potwierdzają to również badania innych naukowców (69-71). Zbadano również, że kwas hialuronowy odzwierciedla toksyczne uszkodzenie wątroby u szczurów (72). George i wsp. podawali szczurom przez 7 kolejnych dni silnie hepatotoksyczną dimetylonitrozoaminę (DMN), dzięki czemu uzyskiwali model toksycznego uszkodzenia wątroby (72). Poziom kwasu hialuronowego w surowicy wzrastał drugiego dnia, czwartego dnia osiągał maksimum i następnie sukcesywnie spadał do poziomu wyjściowego (choć w tkankach wątroby utrzymywał się przez 21 dni). Maksymalny poziom tradycyjnych wskaźników uszkodzenia wątroby - aminotransferaz wątrobowych pojawiał się później, bo dopiero w 7 dniu. W tym czasie pojawiały się też dopiero zmiany histopatologiczne wątroby. Kwas hialuronowy jest więc wczesnym markerem toksycznego uszkodzenia wątroby, jednak jego stężenie wzrasta tylko przejściowo. Gibson i wsp. udowodnili w swoich badaniach, że zmiany stężenia kwasu hialuronowego w surowicy odzwierciedlają krótkoterminowe polekowe zmiany w perfuzji sinusoidalnej u pacjentów z alkoholową chorobą wątroby i nadciśnieniem wrotnym (63). Seryjny pomiar stężenia hialuronianu może więc stanowić prostą metodę oceny efektów działania leków wazoaktywnych na perfuzję sinusoidalną.

Coraz większe znaczenie kwas hialuronowy zyskuje w diagnostyce żylaków przełyku, jednego z najczęstszych powikłań alkoholowego zapalenia wątroby, gdzie pomiarem stężenia kwasu hialuronowego próbuje się zastąpić inwazyjne badania endoskopowe (73).

Kwas hialuronowy może być również uzupełnieniem markerów biochemicznych u noworodków z przedłużającą się żółtaczką. Ukarapol i wsp. (74) zbadali, że stężenie kwasu hialuronowego u dzieci z atrezią dróg żółciowych wynosiło średnio 514 ng/ml, w porównaniu do 50 ng/ml u dzieci z zapaleniem wątroby noworodków. Stężenie kwasu hialuronowego było również znacznie wyższe u dzieci z torbielami dróg żółciowych.

Poziom kwasu hialuronowego w surowicy może być wykorzystywany zarówno do diagnostyki, jak i oceny nasilenia zmian zwyrodnieniowych w stawach kolanowych (75). W pracy Inoue i wsp. udowodniono znacząco wyższy poziom kwasu hialuronowego u pacjentów z umiarkowanymi i nasilonymi zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych, w porównaniu z grupą ze zmianami lekkimi (76). W badaniu tym poziom kwasu hialuronowego w surowicy skorelowany był ponadto z bólem odczuwanym przez pacjentów ze słabo i umiarkowanie nasilonym zwyrodnieniem stawów kolanowych. Zbadano również, że u chorych z wysokim wyjściowym stężeniem hialuronianu we krwi, cechy progresji choroby

pojawiają się szybciej (77). Stężenie kwasu hialuronowego w surowicy może być też potencjalnym markerem zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa (45). Duruöz i wsp. wykazali istotną różnicę pomiędzy poziomem kwasu hialuronowego w surowicy chorych na ZZSK a grupą kontrolną (wynosił on odpowiednio 40,4 (SD = 34,8) ng / ml i 24,9 (SD = 20,2)) (45). Współczynnik ten korelował u tych pacjentów z ograniczeniem mobilności rdzenia, stanem zapalnym stawów krzyżowo – biodrowych oraz wskaźnikami laboratoryjnymi stanu zapalnego.

W sklerodermii obserwuje się podwyższony poziom kwasu hialuronowego, który koreluje z ciężkością choroby. Choroba charakteryzuje się zaburzeniem odkładania składników macierzy zewnątrzkomórkowej, które odpowiada wczesnym etapom gojenia się ran, gdzie dochodzi do odkładania kwasu hialuronowego i kolagenu, w wyniku czego powstaje blizna. W badaniach Neudeckera i wsp. (78) poziom kwasu hialuronowego we wczesnym stadium twardziny był znacząco podwyższony, w porównaniu ze stadiami późniejszymi oraz grupą kontrolną. Natomiast poziom aktywności Hyal-1 był prawidłowy u pacjentów we wczesnym stadium choroby (podobny do aktywności w grupie kontrolnej), z kolei obniżał się w późniejszych etapach choroby, spadając nawet poniżej wartości w grupie kontrolnej. Spadek Hyal-1 odzwiercidla prawdopodobnie zmniejszenie obrotów kwasu hialuronowego. Yoshizaki i wsp. obserwowali nie tylko podwyższony poziom kwasu hialuronowego w surowicy pacjentów ze sklerodermią, ale również zwiększona ekspresję kwasu hialuronowego w skórze u tych pacjentów (79).

Poziom kwasu hialuronowego może również wzrastać w trakcie inwazji nowotworu i tworzenia przerzutów. Podwyższony poziom kwasu hialuronowego stwierdzono we krwi u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej (80). Xing i wsp. wykazali znacząco wyższy poziom kwasu hialuronowego w surowicy krwi pacjentów z rakiem jamy ustnej w porównaniu z pacjentami z guzami łagodnymi lub pacjentami zdrowymi (81). Wyższy poziom był również w stadium III i IV choroby w porównaniu do stadium I i II, z kolei poziom ten obniżał się po leczeniu. Zmiany te jednak nie były istotne, czyli przydatność kwasu hialuronowego jako markera w klinicznej ocenie zaawansowania choroby oraz monitorowaniu leczenia jest ograniczona. Podwyższone stężenie kwasu hialuronowego w surowicy obserwowano również w raku endometrium w porównaniu do grupy kontrolnej (82). Poziom ten wzrastał wraz ze zwiększaniem głębokości inwazji myometrium, stopniem histopatologicznym oraz zajęciem naczyń limfatycznych. Ponadto w badaniu sprawdzano immunohistochemicznie ekspresję syntaz hialuronianu. Stężenie hialuronianu było wyższe w

grupie HAS-1 dodatniej niż ujemnej, podczas gdy ekspresja HAS2 i HAS3 nie miała wpływu na stężenie kwasu hialuronowego. Takie nowotwory jak guz Wilmsa i międzybłoniak, produkują czynniki, które aktywują syntezę hialuronianu i zwiększają jego stężenie w surowicy (62).

W kolejnym badaniu udowodniono związek podwyższonego poziomu kwasu hialuronowego w osoczu, z możliwością tworzenia krążenia obocznego u pacjentów z chorobą wieńcową serca (83). Stężenie kwasu hialuronowego u pacjentów z prawidłową koronarografią, ponad 75% stenozą bez rozwiniętego krążenia obocznego oraz z taką samą stenozą i dobrze rozwiniętym krążeniem obocznym wynosiło odpowiednio $43,71 \pm 2,91$, $61,77 \pm 4,10$, a $131,97 \pm 11,76$ ng/ml. Rozwój krążenia obocznego przy podwyższonym poziomie kwasu hialuronowego w osoczu, może być związany z faktem, że HA może promować angiogenezę i arteriogenezę.

Poziom kwasu hialuronowego w osoczu jest podwyższony również u osób z idiopatycznym nadciśnieniem płucnym (84). W badaniach Aytakin i wsp. (84) osoczowe stężenie kwasu hialuronowego w tej chorobie wynosiło 325 ng / ml ± 80 , podczas gdy w grupie kontrolnej zaledwie 28 ng / ml ± 9 . Ponadto udowodnili oni, że komórki mięśni gładkich tętnicy płucnej pochodzącej z płuc z idiopatycznym nadciśnieniem płucnym produkują więcej kwasu hialuronowego w porównaniu z grupą kontrolną. Wiąże się to z wyższym tkankowym poziomem kwasu hialuronowego i zwiększeniem wiązania komórek zapalnych. Sugeruje to rolę kwasu hialuronowego w przebudowie i rozwoju stanu zapalnego w idiopatycznym nadciśnieniu płucnym. Koncepcję tą potwierdzono w kolejnych badaniach, w których udowodniono zwiększoną ekspresję genów syntazy hialuronianowej 1 przy zmniejszonej ekspresji genów hialuronoglikozaminidazy 1, a więc przesunięcie metabolizmu kwasu hialuronowego na korzyść akumulacji, co może regulować przebudowę naczyń w idiopatycznym nadciśnieniu płucnym (85).

Kwas hialuronowy może być również markerem angiopatii cukrzycowej (86). Nagromadzenie hialuronianu wokół komórek mięśni gładkich w zmianach miażdżycowych u chorych na cukrzycę, sugeruje, że białko to odgrywa ważną rolę w rozwoju angiopatii cukrzycowej. W badaniach Mine i wsp. (86) stężenia kwasu hialuronowego w surowicy u chorych na cukrzycę były istotnie wyższe w porównaniu ze stężeniami u osób zdrowych (odpowiednio $83,6 \pm 5,6$ ng/ml i $41,7 \pm 12$ ng/ml). Ponadto udowodnili, że stężenie kwasu hialuronowego w surowicy osób chorych na cukrzycę korelowało ze stężeniem glukozy na

czczo, hemoglobina glikolizowaną (HbA1c), albumina glikolizowaną (GA), trójglicerydami, a także z BMI, hs-CRP i białkiem będącym chemoatraktantem monocytów (MCP-1). Należy podkreślić, że stężenie kwasu hialuronowego było wyższe u pacjentów z cukrzycą powikłaną niż u osób bez takich powikłań.

W sepsie podwyższony poziom kwasu hialuronowego jest markerem złego rokowania (28).

Prowadzone są badania nad rolą kwasu hialuronowego w udarze niedokrwiennym mózgu. W jego ostrej fazie dochodzi do rozpadu kwasu hialuronowego na niskocząsteczkowy kwas hialuronowy (3–10 disacharydów) (87). Wzrost produkcji LMWHA wkrótce po udarze może być szkodliwy, ze względu na wzmocnienie reakcji zapalnej. Jednocześnie aktywacja szlaków sygnalizacyjnych w neuronach oraz stymulowanie angiogenezy i rewaskularyzacji przez HA i LMWHA, może mieć wpływ na remodeling tkanki objętej udarem. Tak więc znaczące zmiany w ekspresji enzymów odpowiedzialnych za syntezę i degradację kwasu hialuronowego oraz aktywacja receptorów kwasu hialuronowego odzwierciedla przebudowę tkanek po udarze.

Stężenie kwasu hialuronowego oznaczone metodą radiometryczną w surowicy chorych z fibromialgią, było wyraźnie wyższe w porównaniu z poziomem kwasu hialuronowego w surowicy osób zdrowych i chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (odpowiednio 420 ± 26 ; $41 \pm 8,7$; $113 \pm 15,9$) (88). Badacze stwierdzili, że poziom kwasu hialuronowego w surowicy może być laboratoryjnym markerem rozpoznania fibromialgii (88). Jednak inni naukowcy obalili tę teorię, nie stwierdzając korelacji pomiędzy poziomem kwasu hialuronowego w surowicy a nasileniem objawów fibromialgii (89-91).

Poziom kwasu hialuronowego obniża się z kolei podczas procesu różnicowania się komórek. Dochodzi wówczas do jego degradacji przez hialuronidazę i wydalenia kwasu z organizmu (31). Obniżony poziom kwasu hialuronowego w osoczu obserwowali również Neudecker i wsp. u pacjentów poddawanych laparoskopowej resekcji jelita grubego w stosunku do pacjentów u których zastosowano konwencjonalny zabieg operacyjny (wynosił on odpowiednio 28,6 oraz 17,9 IU/ml) (92). Przy laparoskopii interakcje pomiędzy hialuronianem a fibrynogenem mogą być słabsze, przez co dochodzi do zmniejszenia polimeryzacji fibryny. Zabiegi laparoskopowe mogą w ten sposób prowadzić do obniżenia ryzyka zakrzepicy żył głębokich.

W licznych publikacjach wykazano również, że poziom krążącego kwasu hialuronowego wzrasta po spożyciu posiłków zarówno u osób zdrowych (93), jak i u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby (94,95). W 2005 roku Fraser i wsp. badali wpływ różnych pokarmów i płynów na poziom kwasu hialuronowego w osoczu oraz starali się określić mechanizmy które nim kierują (96). Po spożyciu przez zdrowych ochotników posiłków testowych oraz roztworu glukozy o podobnej wartości energetycznej, ilość kwasu hialuronowego w osoczu wzrosła 1,7 – 13 razy w porównaniu do poziomu na czczo. Szczytowe wartości obserwowano u większości badanych 45 – 90 minut po spożyciu posiłku, a u ponad połowy badanych osiągnęły one poziom mogący sugerować zwłóknienie lub marskość wątroby. Poziom kwasu hialuronowego wrócił u większości badanych do wartości wyjściowych w przeciągu 2 godzin. Akt jedzenia, czyli połykanie i związana z nim praca mięśni nie miała wpływu na stężenie kwasu hialuronowego we krwi (poziom kwasu hialuronowego nie zmieniał się w trakcie pierwszych 15 minut). Nie zmieniał się również po stymulacji motoryki przewodu pokarmowego metoklopramidem.

Fizjologiczne skutki żywienia wynikają ze wzrostu przepływu krwi przez krążenie trzewne i wrotne (96), co mogłoby potencjalnie wpływać na obniżenie poziomu kwasu hialuronowego w osoczu. Już we wcześniejszych, niepublikowanych badaniach (Gibson P. R.) wykazano za pomocą pomiaru przepływów Dopplerowskich, że tłuszczowy posiłek doprowadza do zwiększenia przepływu krwi w krążeniu wrotnym o 140 – 200%. Mechanizm ten jednak pozostaje w cieniu mobilizacji kwasu hialuronowego ze ściany jelita, bowiem przemieszczenie hialuronianu z tkanek przewodu pokarmowego jest większe niż wzrost klirensu wynikający ze zwiększonego przepływu krwi wrotnej. Szybki wzrost poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po spożyciu posiłków wskazuje na pochodzenie HA z wczesnych źródeł, prawdopodobnie z przewodu pokarmowego, gdyż podśluzówkowe warstwy ściany żołądka i jelit są bogate w kwas hialuronowy (95). Ta niewielka pula, wyjątkowo mobilnego kwasu hialuronowego jest transportowana z tkanek do krwioobiegu za pośrednictwem limfy (97). Podwyższony strumień płynu tkankowego niezbędny do przemieszczenia hialuroninu tkankowego do naczyń chłonnych najlepiej wyjaśnić rozszerzeniem naczyń krwionośnych w odpowiedzi na spożycie składników odżywczych i następowy wzrost jelitowego przepływu limfy. Efekt rozszerzenia naczyń krwionośnych może być wzmocniony przez wzrost motoryki przewodu pokarmowego.

Wzrost poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po spożyciu posiłków jest podobny do wzrostu wynikającego z intensywnych ćwiczeń fizycznych (96) u osób zdrowych, gdzie

ilość kwasu hialuronowego po wysiłku podwaja się w stosunku do pomiarów w trakcie odpoczynku (98), z równoczesnym zmniejszeniem przepływu krwi trzewnej. Poziom HA w osoczu wzrasta po wysiłku (98), prawdopodobnie głównie ze względu na przesunięcie HA z tkanek obwodowych przez ruch kończyn i zwiększenie przepływu limfy (99). Oznacza to, że poziom we krwi nie powinien być mierzony po intensywnych ćwiczeniach.

Poziom kwasu hialuronowego w osoczu u pacjentów pozostających przez co najmniej 5 godzin na czczo i odpoczywających przez 30 minut przed pobraniem krwi, był znacznie poniżej średniej w porównaniu z identycznym testem u osób, u których próbki krwi pobrano w większości (100) lub wyłącznie przed południem (101). Zmienność wyników w kolejnych dniach pobierania krwi w identycznych warunkach była niewielka (96).

Criscione i wsp. (102) mierzyli poziom kwasu hialuronowego w surowicy pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych przed wstaniem z łóżka, po godzinie, 4 godzinach czynności porannych ze zjedzeniem śniadania włącznie oraz po dniu normalnej aktywności. Wzrost poziomu kwasu hialuronowego po aktywności fizycznej i po spożyciu posiłku u pacjentów z RZS udowodniono już wcześniej (102). Criscione i wsp. (102) podobne wyniki uzyskali u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych. Ponieważ stężenie kwasu hialuronowego wzrosło najbardziej w pierwszej godzinie po wstaniu z łóżka, a w późniejszych godzinach nie obserwowano żadnych istotnych zmian stężenia, autorzy sugerują, że próbki krwi do badań powinny być pobierane co najmniej godzinę po wstaniu z łóżka i wykonaniu czynności porannych (102).

2.1.2.1 Kwas hialuronowy we krwi osób starzejących się

Ilość kwasu hialuronowego we krwi wzrasta wraz z wiekiem. W badaniu Kuźnik-Trochy i wsp. wykazano, że w przebiegu procesu starzenia dochodzi do postępującego wzrostu stężenia kwasu hialuronowego w osoczu krwi (103). Wzrost ten jest nieznaczny i postępuje stopniowo od końca pierwszej dekady życia. Do największego wzrostu stężenia HA w osoczu krwi dochodzi w wieku 31 – 40 lat (dekada IV) oraz 51 – 60 lat (dekada VI). Potwierdzają to badania Lindqvist'a i Laurent'a, które wykazały istotny statystycznie wzrost stężenia kwasu hialuronowego we krwi związany z wiekiem, ale rozpoczynający się dopiero z końcem drugiej dekady życia (101). Możliwe, że szeroki zakres wartości referencyjnych (0,01 – 0,1 mg / l) odzwierciedla fizjologiczne, związane z procesem starzenia, zmiany stężenia

kwasy hialuronowe we krwi. Na wzrost poziomu kwasu hialuronowego we krwi wpływa związane z wiekiem zwiększenie jego degradacji na drodze zarówno enzymatycznej jak i nieenzymatycznej. Drobnocząsteczkowe produkty degradacji tkankowej, o różnych masach i formach związku, przenikają przez system naczyń limfatycznych do krwioobiegu, tworząc osoczną pulę tego związku (101,104). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na wzrost kumulacji drobnocząsteczkowego kwasu hialuronowego w osoczu krwi, może być postępujące wraz z wiekiem upośledzenie czynności wątroby (105), w której to w głównej mierze dochodzi do katabolizowania kwasu hialuronowego (w mniejszym stopniu także w nerkach i śledzionie).

2.2 Biogeneza kwasu hialuronowego

2.2.1 Synteza kwasu hialuronowego

Synteza kwasu hialuronowego została już niejednokrotnie opisana, jednak jej szczegóły wciąż nie zostały do końca odkryte (12). Biosynteza kwasu hialuronowego o dużej masie cząsteczkowej (23) zachodzi na wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej komórek bakteryjnych i eukariotycznych (26,106,107). Katalizują ją przezbłonowe białka enzymatyczne - syntazy hialuronianowe. Te glikozylotransferazy u ssaków stanowią grupę trzech enzymów: HAS-1, HAS-2 i HAS-3. Enzymy te zbudowane są z dwóch enzymatycznych składników. Pierwszy z nich katalizuje reakcję transglikozylacji kwasu D-glukuronowego (GlcA), z kolei drugi - N-acetylo - D-glukozyaminy (GlcNAc). Przyłączają one naprzemiennie, do redukującego końca wzrastającego łańcucha hialuronianu, podjednostki monosacharydowe z właściwych nukleotydowych prekursorów, tj. UDP-GlcA i UDP-GlcNAc (26,108). Łańcuch HA wzrasta po wewnętrznej (cytoplazmatycznej) stronie błony komórkowej. Nieredukujący koniec łańcucha ulega translokacji na zewnątrz błony komórkowej, a jego synteza jest w dalszym ciągu kontynuowana (109). Mechanizm ten umożliwia biosyntezę niezwykle długich polimerów hialuronianu. Ich masa cząsteczkowa bywa nawet rzędu 10^7 Da. Ponadto mechanizm ten doprowadza do wytworzenia przez HA okołokomórkowej otoczki, dzięki czemu może on spełniać funkcje antyoksydacyjne, tworząc ponadto okołokomórkowe środowisko o pożądanym stopniu uwodnienia (14,109,110).

Funkcje HAS nie są jeszcze dokładnie poznane i wciąż stanowią przedmiot licznych badań (106). Wiadomo, że od rodzaju izomeru HAS zależy długość polimeru HA (16,108). Izomery HAS-1 i HAS-3 katalizują biosyntezę polimerów HA o mniejszej długości łańcucha. Masa cząsteczkowa produktów HAS-1 i HAS-3 jest rzędu odpowiednio 2×10^5 i 2×10^6 Da. Z kolei masa cząsteczkowa produktów HAS-2 przekracza znacząco 2×10^6 Da (111). Ponadto wykazano, że poszczególne izoenzymy HAS z różną szybkością prowadzą do wydłużania powstającego biopolimeru HA. Najszybciej łańcuchy HA są syntetyzowane przez HAS-1, a najwolniej przez HAS-3 (106). Należy również wspomnieć, że cząsteczki hialuronianu o małej masie cząsteczkowej efektywniej aktywują procesy wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów (poprzez hialadheryny powierzchni komórek) w porównaniu z cząsteczkami o większej masie. Syntezy hialuronowe biorą więc pośredni udział w modulowaniu funkcjonowania komórki (16).

2.2.2 Degradacja kwasu hialuronowego

Syntezie kwasu hialuronowego towarzyszy ciągła jego degradacja. Katabolizm hialuronianu przebiega w poszczególnych tkankach organizmu z różną szybkością. Czas półtrwania HA we krwi wynosi zaledwie 2,5-5,5 min (12), a w skórze ok. 12 godzin. Dłuższe okresy półtrwania ma m. in. chrząstka (1-3 tyg) i ciało szkliste oka (70 dni) (16,110,111). Tammi i wsp. wykazali, że 1/3 hialuronianu jest każdego dnia usuwana z organizmu i zastępowana cząsteczkami nowosyntetyzowanymi (16). Część HA jest degradowana w tkance - miejscu jego syntezy i występowania, pozostała część jest transportowana limfą do węzłów chłonnych i tu ulega eliminacji.

Obecność kwasu hialuronowego w limfie potwierdza, że drenaż limfatyczny jest ważnym elementem szlaku katabolicznego (16,39). Usuwanie limfatyczne reprezentuje jednak jedynie <1% katabolicznej przemiany kwasu hialuronowego (23). Armstrong i wsp. (23) wykazali niskie dzienne usuwanie hialuronianu ze skóry przez chłonkę. Strumień limfatyczny ze skóry wynosił $0,6 \mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}$ suchej masy⁻¹, co odpowiada $14 \mu\text{g} \cdot 24 \text{h}^{-1} \cdot \text{g}$ suchej masy⁻¹. Wartość ta reprezentuje < 0,6% zawartości tkanki. Na podstawie pomiarów zawartości kwasu hialuronowego w chłonce skóry i tkankach oraz szybkiego usuwania podskórnego wstrzykniętego HA o niskiej masie cząsteczkowej, Reed i wsp. (112) zaproponowali, że w przestrzeni pozanaczyniowej zawarte są dwie odrębne pule hialuronianu.

Jedna pula reprezentuje ostatnio zsyntetyzowany kwas hialuronowy dołączony do macierzy, natomiast pozostała pula reprezentuje hialuronianu uwolniony z matrix i usuwany przez naczynia limfatyczne. Zwiększenie przepływu hialuronianu w limfie, zwiększy obroty wolnej puli bez wpływu na pulę związaną. Jednak w nowszym badaniu (113), poddali w wątpliwość znaczenie tego wniosku, ponieważ wskaźnik usuwania oznaczonego kwasu hialuronowego o wysokiej masie cząsteczkowej po wstrzyknięciu podskórnym nie zwiększył się podczas zwiększenia strumienia limfy.

Tkankowa degradacja kwasu hialuronowego zachodzi przede wszystkim wewnątrzkomórkowo w obrębie lizosomów, pod wpływem hialuronidazy oraz egzoglikozydaz, takich jak β -glukuronidaza czy heksozaminidaza (14,23). Endocytoza hialuronianu przez keratynocyty i fibroblasty realizowana jest za pośrednictwem receptorów CD44. Mediowaną receptorami endocytozę hialuronianu badano w różnych systemach hodowlanych (16,114). Tammi i wsp. (16,114) wykazali, że hodowlane keratynocyty zinternalizowały nowo zsyntetyzowany kwas hialuronowy, który prawdopodobnie był HA o wysokiej masie cząsteczkowej. Okazało się jednak, że większość wewnątrzkomórkowego hialuronianu znajdowała się we wczesnych endosomach i miała niską masę cząsteczkową, co sugeruje ich częściowy rozkład przed wejściem do lizosomów. Ponadto zbadano, że typ 2 hialuronidazy (Hyal 2), związany jest z powierzchnią błon komórkowych (115). Pomimo, że enzym ten wykazuje optymalną aktywność w niskim pH, zmiany podczas endocytozy mogą zwiększać jego aktywność, tworząc niewielką ilość pofragmentowanego kwasu hialuronowego. Wynika z tego, że wewnątrzkomórkowa degradacja hialuronianu poprzedzona jest degradacją pozakomórkową kwasu hialuronowego (na powierzchni komórki) do fragmentów różniących się między sobą długością i masą cząsteczkową (29). Fragmenty kwasu hialuronowego uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą reprezentować małą, mobilną pulę kwasu hialuronowego o niskiej masie cząsteczkowej, która pojawia się w chłonce. Degradacja pozakomórkowa katalizowana jest pozakomórkowymi hialuronidazami lub działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) (16). W organizmie człowieka występuje pięć typów hialuronidaz (HYAL) (6,16): HYAL 1, HYAL 2, HYAL 3, HYAL 4 i PH 20 (6). HYAL 1 – występuje głównie w lizosomach, a także w płynach ustrojowych. HYAL 2 - umiejscowiona jest głównie w lizosomach, wiąże się także poprzez glikozylofosfatydilinozytol (GPI) z powierzchnią komórek. HYAL 3 występuje głównie w jądrze i szpiku kostnym. HYAL 4 można znaleźć w łożysku i komórkach mięśni

szkieletowych. PH 20, związana jest poprzez GPI z powierzchnią plemników (przypisuje się jej rolę w procesie zapłodnienia).

Hialuronidazy wykazują największą aktywność w kwaśnym pH, jedynie izoenzym PH 20 wykazuje aktywność również w pH obojętnym (6).

Należy również wspomnieć o hialuronidazach pochodzenia bakteryjnego. Biorą one udział w rozprzestrzenianiu bakterii w obrębie macierzy pozakomórkowej (111). Nie wiadomo jednak, czy produkty degradacji HA pochodzenia bakteryjnego (disacharydy) są zdolne do odpowiedzi immunologicznej oraz aktywacji procesów sygnalizacyjnych, podobnie jak drobnocząsteczkowe fragmenty HA, powstałe pod wpływem hialuronidaz ssaków (heksa- i oktasacharydy) (111). Wiadomo jednak, że fragmenty mniejsze niż sześciocukrowe nie generują transdukcji sygnałów, z czego wynikałoby, że hialuronidazy bakteryjne są pozbawione wspomnianej wyżej aktywności (15,117).

W katabolizmie HA przebiegającego w węzłach chłonnych uczestniczą receptory LYVE i HARE (FEEL-2, stabilny 2). Receptor HARE występuje nie tylko na powierzchni komórek śródbłonka limfatycznego, ale również na powierzchni śródbłonkowych komórek naczyń zatokowych wątroby, śledziony oraz na powierzchni komórek mezenchymalnych zastawek serca i komórek nabłonkowych rogówki, soczewki, brodawek nerkowych, jajowodów (16).

Kwas hialuronowy, który nie uległ rozłożeniu w tkance / węzłach chłonnych dostaje się drogą limfatyczną do krążenia ogólnego (96,97) i jest usuwany przez komórki śródbłonkowe naczyń zatokowych wątroby (116). Komórki śródbłonka zatok wątroby pozbywają się HA, za pośrednictwem receptorowego wychwytu i katabolizmu, a klirens osoczowego HA jest bezpośrednio związany z wielkością przepływu osocza w wątrobie (96).

Ponadto niewielka ilość HA jest usuwana z ustroju przez nerki (16,104).

2.2.3 Białka wiążące kwas hialuronowy

Kwas hialuronowy wchodzi w interakcje ze swoistymi białkami wiążącymi tzw. hialadherynami (hialektanami, hialektynami). Hialadherynami tkankowymi są zarówno proteoglikany, tworzące kompleksy PG - HA, jak i stabilizujące te kompleksy białka wiążące (link proteins) (118,119).

Dobrze znane są następujące hialadheryny tkankowe: agrekan, wersikan, hialuronektyna, brewikan, neurokan oraz TSG-6. Agrekan występuje w tkance chrzęstnej. Agrekan i białko wiążące łączą się z HA za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych tworząc agregaty proteoglikanowe (PG) (16,108). Kompleksy te odgrywają ogromną rolę w tworzeniu i stabilizacji pozakomórkowej macierzy chrząstki, nadają jej właściwości wiskoelastyczne i umożliwiają przekazywanie znacznych obciążeń (120). Wersikan występuje w skórze, z kolei hialuronektyna, brewikan oraz neurokan występują w tkance nerwowej (110,118,120). TSG-6, będący białkowym produktem genu 6 stymulowanego TNF, wydzielany jest w odpowiedzi na bodźce zapalne. Uczestniczy on w regulacji migracji leukocytów oraz w procesach „remodelingu” macierzy (14).

Ponadto istnieje wiele hialadheryn powierzchni komórek, które są powierzchniowymi receptorami komórek macierzy pozakomórkowej. Ich obecność wskazuje na bezpośredni udział hialuronianu w regulacji mobilności komórek oraz procesów inwazji i proliferacji (16). Receptory te zazwyczaj wiążą zarówno wielko jak i drobnocząsteczkowe fragmenty HA. Jednakże fragmentacja HA nasila jego zdolność do aktywowania szlaków przekazywania sygnałów (16). Najczęściej opisywane są następujące hialadheryny powierzchni komórek: CD44, RHAMM, ICAM-1, LYVE-1, LEC, receptory typu „TOLL”. Najważniejszą hialadheryną powierzchni komórek jest transmembranowa glikoproteina CD44, występująca na powierzchni większości komórek (14). W zależności od izoformy tej hialadheryny spełnia ona rozmaite funkcje (120). Pośredniczy ona w pobudzaniu procesów migracji, agregacji, adhezji i proliferacji komórkowej, w angiogenezie, w przekazywaniu sygnałów na szlaku macierz – komórka i komórka – macierz, a także w internalizacji i degradacji HA (29,110,117). Kolejna hialadheryna powierzchni komórek – RHAMM - wiąże HA w dużo mniejszym stopniu. Występuje w wielu izoformach. Jeżeli umiejscowiona jest na powierzchni komórki określana jest mianem receptora CD168. Ponadto charakterystyczne dla niej jest umiejscowienie wewnątrzkomórkowe: w cytosolu, w obrębie cytoszkieletu, oraz w jądrze (110). Pośredniczy ona w migracji i proliferacji komórek prawidłowych oraz nowotworowych (29). Będąc receptorem wewnątrzkomórkowym - hialadheryna ICAM-1 (receptor CD54) - jest międzykomórkową cząsteczką adhezyjną, odpowiadającą za pośredniczenie w aktywacji procesów zapalnych (19,110). LYVE-1 jest hialadheryną, umiejscowioną wyłącznie na powierzchni komórek śródbłonna limfatycznego. Uczestniczy w procesach degradacji HA, w procesach transportu HA z tkanek do limfy i w prezentowaniu GAG receptorom CD44 leukocytów, z następowym nasilaniem transmigracji tych komórek do limfy (117)(120).

Hialadheryna LEC umiejscowiona jest na powierzchni śródbłonkowych komórek naczyń zatokowych wątroby (118) i odpowiada za klirens hialuronianu z krążenia. Na chwilę obecną opisano 10 izoform receptorów typu „TOLL”, które uczestniczą w pobudzaniu ekspresji interleukiny 8. Ponadto odgrywają one rolę w rozpoznawaniu bakteryjnych produktów, takich jak lipopolisacharyd czy flagellina, w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej drożdży, takich jak zymosan, w rozpoznawaniu wirusowego RNA oraz mają swoją rolę w patogenezie nowotworów (110,117). Izoforma TOLL4, oddziałując z kwasem hialuronowym, aktywuje fazę zapalną procesu gojenia, nasilając biosyntezę cytokin prozapalnych (121).

W ustroju występują również hialadheryny umiejscowione wewnątrzkomórkowo (122). Są to: wewnątrzkomórkowa izoforma receptora RHAMM, receptor CDC37, receptor P-32 (HABP-1) i receptor IHABP4. Receptor CDC37 uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego, a także w regulacji aktywności komórkowych kinaz. Receptorowi P-32 (HABP-1) przypisuje się rolę w transdukcji sygnału komórkowego i prawdopodobnie w interakcjach jądro - mitochondria. Z kolei receptor IHABP4 uczestniczy prawdopodobnie w wewnątrzkomórkowym przekazaniu sygnałów (24,122).

Ponadto makrocząsteczki kwasu hialuronowego mogą również oddziaływać z, obecnymi w macierzy pozakomórkowej tkanek zwierzęcych, glikoproteinami, takimi jak fibronektyna, laminina oraz z białkami włóknistymi – kolagenem i elastyną (120).

W interakcji hialuronianu z powierzchnią komórek biorą udział nie tylko hialadheryny (14). HA może być także „związany” z powierzchnią komórki poprzez transmembranową interakcję z syntazami hialuronianowymi (HAS).

2.3 Aktywność biologiczna kwasu hialuronowego

Aktywność biologiczna hialuronianu w organizmie zależy od długości jego łańcucha. Główną funkcją polianionu kwasu hialuronowego jest utrzymanie strukturalnej integralności przestrzeni pozakomórkowej tkanek. Naładowane ujemnie łańcuchy glikozaminoglikanów odpychają się, działając na kształt elastycznych sprężyn. Dodatkowo mają zdolność zatrzymywania wody i asocjacji z pozostałymi składnikami tkanki łącznej. Woda wiązana jest w polisacharydowej sieci, złożonej z kwasu hialuronowego i proteoglikanów, co powoduje

wysoką oporność tkankową na przepływ wody (1,28). Dzięki tym właściwościom kwas hialuronowy i pozostałe glikozaminoglikany odpowiadają za integralność substancji międzykomórkowej tkanki, nadają jej sprężystość i elastyczność (18). Polisacharydowa sieć wiąże również niskocząsteczkowe jony, spełniając funkcje buforu osmotycznego (1). Kwas hialuronowy ma również za zadanie utrzymywać homeostazę przestrzeni pozakomórkowej, ponadto stanowi zrab dla komórkowej migracji, różnicowania i proliferacji w tej przestrzeni (15,109,117). Procesy rozpoznania, proliferacji i lokomocji komórek zachodzą poprzez swoistą dla hialuronianu grupę receptorów CD44 (1,28). Ponadto uważa się, że HA występujący w bezpośrednim otoczeniu komórek, może prowadzić do modyfikacji syntezy innych GAG i wpływać na ich wydzielanie (18). HA tworzy też agregaty z niektórymi PG, przede wszystkim z PG chrząstki – agrekanami (1,9).

Ponadto kwas hialuronowy bierze udział w koagulacji: wiąże się z fibrynogenem, przyspiesza tworzenie fibryny, wzmacnia powstały włóknik, wiąże czynnik płytkowy 4 (1).

W skórze hialuronian, stanowiąc znaczną część przestrzeni pozakomórkowej, wpływa na wilgotność, strukturę i sprężystość skóry. Decyduje również o stanie wilgotności naskórka. Przestrzeń między komórkami naskórka bogate są w hialuronian, który wyciąga wodę ze skóry właściwej. Dzięki lipidom bariery wodnolipidowej woda ta pozostaje w naskórku i nie przecieka poza warstwę komórek ziarnistych naskórka (12). Ponadto hialuronian zapewnia transport jonów i składników odżywczych w skórze (123). Kwas hialuronowy kontroluje uwodnienie skóry również w okresie ontogenezy oraz w rozmaitych stanach patologicznych m. in. w procesach zapalnych. Co ważne, kwas hialuronowy podobnie jak inne glikozaminoglikany, bierze udział w procesach fibrylogenezy, głównie w stabilizacji włókien kolagenowych (54). Odgrywa więc prawdopodobnie rolę w formowaniu tkanek oraz orientacji przestrzennej komórek i wyżej wymienionych białek włóknistych(1)(28).

Makrocząsteczka hialuronianu tworzy roztwory o dużej lepkości i elastyczności, które stanowią fizjologiczny „smar” dla powierzchni stawowych i pochewek ścięgnistych (4,16,28,108). W nerkach spełniają one funkcję buforu osmotycznego (14). Sieć węglowodanowa wiąże wodę i niskocząsteczkowe jony (1,28).

Masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego jest polidispersyjna, czyli niejednorodna i zależy od liczby powtarzających się w łańcuchu jednostek dwusacharydowych (23). Funkcje biologiczne hialuronianu, zależą od długości jego fragmentów oraz ich masy cząsteczkowej.

Hialuronian o dużej masie cząsteczkowej (HMWHA - high – molecular – weight HA) i natywnych, nierozgałęzionych łańcuchach, posiada zdolność hamowania procesów proliferacji i migracji, wykazując działanie antyangiogenne, przeciwzapalne (1,23,28,29) i immunosupresyjne (124). Ponadto bierze udział w sekwestracji reaktywnych form tlenu, dzięki czemu zaliczany jest do związków zwanych wymiataczami wolnych rodników i związkami detoksykującymi (29,104,111,117). Odgrywa również rolę w pozanacyniowej dystrybucji białek osocza (104,111,117). Regulacja transportu białek osoczowych w tkankach, zależna jest od sieci polisacharydowej złożonej z HA i PG. Wspomniana sieć posiada zdolność sferycznego wykluczania różnych cząsteczek w zależności od ich rozmiarów. Właściwość ta ma również znaczenie w ochronie tkanek przed penetracją bakterii, grzybów i wirusów (1,28).

Krótsze, drobnocząsteczkowe fragmenty hialuronianu (low – molecular – weight HA czyli LMWHA) spełniają w organizmie następujące funkcje:

- indukują w komórkach śródbłonkowych, nabłonkowych, dendrytycznych, w fibroblastach i makrofagach, ekspresję genów zapalnych, z następową ekspresją chemokin, takich jak MIP-1 α , MIP-1 β , KC, RANTES, MCP-1, IL-8, białko 10 indukowane INF, oraz z następową ekspresją cytokin, takich jak IL-12 czy TNF- α (117,124); indukowanie i zwiększenie stanu zapalnego następuje przez Toll – like receptor 4 (TLR - 4) (125),
- zapoczątkowują biosyntezę enzymów degradujących macierz: metaloproteinaz,
- aktywują biosyntezę syntazy tlenku azotu (iNOS) oraz inhibitora 1 aktywatora (17),
- stymulują procesy komórkowej migracji, proliferacji i dojrzewania, wykazując również działanie proangiogenne (23,29,110) – powodują powstawanie rury z hodowli komórek śródbłonka poprzez wiązanie się do receptora CD44 (23).

Kwas hialuronowy o wielkości 1,3 kilodaltonów wykazuje działanie bakteriostatyczne (10). Dzięki dezaktywacji hialuronidaz, zwalcza stany zapalne wywołane przez bakterie produkujące te enzymy (10). Zapobiega infekcjom drobnoustrojów chorobotwórczych poprzez regulację przepuszczalności komórkowej i redukcję nadmiernej przepuszczalności naczyń włosowatych (10).

Kwas hialuronowy odgrywa znaczną rolę w procesie gojenia się rany (29). Po pierwsze tworzy on strukturę środowiska, w którym gojenie to się odbywa. Po drugie bierze

udział w każdym z jego etapów. We wczesnej fazie zapalnej, poprzez wiązanie się z receptorami CD44, inicjuje i reguluje wydzielanie cytokin pozapalnych oraz wzmaga naciekanie komórkowe. W fazie ziarninowania podwyższone stężenia kwasu hialuronowego w miejscu zranienia wywiera wpływ na proliferację i migrację komórek. Ponadto dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym hialuronian zapobiega uszkodzeniu świeżej ziarniny. Pobudza on również angiogenezę oraz reepitelializację uszkodzenia skóry (15). W tkankach płodu, utrzymujące się wyższe stężenie kwasu hialuronowego sprawia, że nagromadzenie kolagenu i bliznowacenie jest mniejsze u płodu niż u osoby dorosłej (126).

Kwas hialuronowy odgrywa istotną rolę w procesach immunologicznych. Reakcje immunologiczne pobudza poprzez łączenie się z receptorami limfocytów T i B (10). Dotychczas nie poznano jednak dokładnie tych mechanizmów (20).

3 Zastosowanie kwasu hialuronowego w medycynie i kosmetologii

3.1 Zastosowanie kwasu hialuronowego w medycynie

Kwas hialuronowy od lat znajduje zastosowanie w rozmaitych dziedzinach medycyny. Najwcześniej zaczęto go stosować w okulistyce. Pierwsze zabiegi z jego użyciem przeprowadzono już w 1961 roku. W latach 70. ubiegłego wieku Balans suplementował kwasem hialuronowym ciało szkliste oka zmienioną w trakcie operacji odwarstwienia siatkówki (3). Obecnie w skomplikowanych operacjach oka za niezbędne uważa się stosowanie wiskoelastyków. Wiele operacji przeprowadza się z zastosowaniem 0,2 – 0,6 ml Healonu (20). Stosuje się go m. in. w chirurgii zaćmy, rogówki, jaskry, tylnego odcinka oka, zeza i urazów (3). Dzięki swoim właściwościom fizycznym, chroni on tkanki przed uszkodzeniem i ułatwia ich separację. Ponadto utrzymuje głębię komory przedniej oka, a tym samym zapobiega ruchom ciała szklistego. Hialuronian nie tylko ułatwia wykonanie trudnych technicznie procedur. Wpływa on również na poprawę wyników operacyjnych. Kwas hialuronowy wykorzystywany jest także w leczeniu zachowawczym. W kroplach do oczu przedłuża pozostawanie substancji leczniczej na powierzchni rogówki. Jest również składnikiem preparatów stosowanych w terapii zespołu suchego oka, gdzie jest leczeniem nie tylko objawowym, ale również przyczynowym (3). Krople są skuteczne, jeżeli stężenie zawartego w nich hialuronianu wynosi 0,1-0,3% (127).

W dermatologii HA stosuje się m. in. w leczeniu oparzeń i blizn, jako matrycę do autologicznych przeszczepów skóry. Kwas hialuronowy i jego pochodne traktowane są również jako leki wspomagające leczenie owrzodzeń, powstających w wyniku cukrzycy lub niewydolności żylny podudzi (29). Ich skuteczność w leczeniu powierzchownych obrażeń, owrzodzeń skóry oraz uszkodzeń błony śluzowej potwierdzają liczne badania kliniczne (128,129). Udowodniono również, że hialuronian zmniejsza świąd towarzyszący bliznie przerostowej. Z kolei aplikacja preparatu po chirurgicznym usunięciu blizny lub koloidu hamuje ponowne powstawanie blizn przerostowych (130). Ponadto kwas hialuronowy może być stosowany z powodzeniem w celu uzupełniania ubytków tkanki podskórnej, które powstały na skutek terapii przeciwwirusowej u chorych na AIDS. Satysfakcjonujące wyniki uzyskuje się tu aż w 87 % przypadków (131). Można go również stosować u pacjentów ze sklerodermią, chorobą Romberg'a oraz w innych zanikach tkanek twarzy (21). Podjęto udane próby terapii wypełniaczem kwasu hialuronowego posteroïdowej atrofii skóry (132).

W radioterapii można wykorzystywać kremy zawierające kwas hialuronowy przed naświetlaniami raków głowy, szyi, piersi i narządów miednicy (5). Postępowanie takie pozwala zmniejszyć częstość reakcji zapalnych w skórze. U pacjentów, stosujących dwa razy dziennie 0,2% krem zawierający kwas hialuronowy zmiany skórne po radioterapii pojawiały się później i były mniej intensywne (133).

Kwas hialuronowy znajduje szerokie zastosowanie w reumatologii i ortopedii, gdzie łagodzi objawy choroby zwyrodnieniowej stawów i reumatoidalnego zapalenia stawów. Podawany dostawowo, zmniejsza ból i poprawia motorykę zajętych stawów (134,135). Efekt ten jest prawdopodobnie wynikiem zwiększenia syntezy proteoglikanów chrząstki szklistej z jednoczesnym hamowaniem ich degradacji przez hialuronidazy (136). Ponadto podawany dostawowo hialuronian działa przeciwzapalnie co wyraża się obniżeniem stężenia cząsteczek adhezyjnych ICAM – 1 i VCAM – 1 w płynie stawowym (137). Podobny efekt uzyskuje się w schorzeniach stawów skroniowo – żuchwowych (138). Kwas hialuronowy może być również wykorzystywany jako matryca do przeszczepów chrząstki (Hyalgan) (10). Istnieją również suplementy diety zawierające kwas hialuronowy, które mają na celu zwiększenie lepkości mazi stawowej, poprawę mechaniki stawów oraz wpływ na toczący się w stawie proces zapalny. Podaje się również preparaty zawierające siarczan glukozaminy, który ma stymulować biosyntezę kwasu hialuronowego i innych glikozaminoglikanów niezbędnych do odbudowy chrząstki. Substancje te tworzą proteoglikany i agregaty proteoglikanów, czyli najważniejsze, obok kolagenu typu II, makromolekuły substancji międzykomórkowej chrząstki (13).

W stomatologii HA wykorzystuje się w leczeniu chorób przyzębia. Zapalnie dziąseł i przyzębia jest najczęściej spowodowane infekcją drobnoustrojami chorobotwórczymi płytki nazębnej. Klasyczne gingivitis wywoływane jest przez bakterie *Porphyromonas gingivalis*, które produkują enzymy (proteinazę i hialuronidazę), niszczące struktury tkanki łącznej. Dochodzi do rozluźnienia tkanki i wzrostu wymiany płynu między tkanką i układem naczyniowym, co prowadzi do niewielkiego obrzęku, a bakterie i ich toksyny mogą infiltrować tkanki (10). Rodrigues i wsp. (139) potwierdzili skuteczność płynu zawierającego 0,025% kwas hialuronowy w zapobieganiu chorobom przyzębia, poprzez hamowanie narastanie kamienia nazębnego oraz znaczne zahamowanie wzrostu bakterii *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Prevotella intermedia*.

W laryngologii kwas hialuronowy stosowany jest do leczenia zewnętrznego pękniętej błony bębenkowej (140), a także w terapii paraliżu bocznego strun głosowych (21). Ponadto wypełnia się nim usta oraz podniebienie miękkie pacjentom z rozszczepem wargi (21).

Urologia dziecięca z powodzeniem wykorzystuje hialuronian w leczeniu refluksu pęcherzowo – moczowodowego. Iniekcja niewielkiej ilości kopolimeru kwasu hialuronowego i dekstranomeru w miejsce słabo funkcjonującej zastawki, skutecznie usuwa problem i jest alternatywą dla zabiegów chirurgicznych (5).

Z zalet kwasu hialuronowego korzysta również ginekologia. Wykorzystuje się go m.in. w leczeniu uszkodzeń po zabiegach chirurgicznych (29). Pellicano i wsp. (141) udowodnili, że zastosowanie żelu hialuronowego na obszary uszkodzone podczas laparoskopowej miomektomii u niepłodnych kobiet, zmniejszyło zrosty pooperacyjne, jednocześnie zwiększając odsetek kobiet, które po zabiegu zaszły w ciążę. Podobne rezultaty, udawadniające wpływ HA na zmniejszenie zrostów w jamie macicy po zabiegach histeroskopowych, uzyskali Guida i wsp. (142). Ponadto hialuronian stosowany jest w ginekologii jako podłoże leków ginekologicznych stosowanych powierzchniowo (126). Udowodniono skuteczność globulek zawierających sól sodową kwasu hialuronowego w leczeniu uszkodzeń szyjki macicy po zabiegach elektrochirurgicznych i radiochirurgicznych (143). Lokalne zastosowanie kwasu hialuronowego w pochwie po radioterapii raka szyjki macicy lub endometrium, korzystnie wpływa na gojenie się zmian w pochwie po napromienianiu oraz poprawia jakość życia (144). W badaniach Markowskiej i wsp. ponad 90% pacjentów odpowiedziało pozytywnie na zastosowanie kwasu hialuronowego w postaci kremu na dystroficzne zmiany sromu (144). Globulki z kwasem hialuronowym mogą być również stosowane po porodzie, a także w leczeniu suchości pochwy (29).

W chirurgii kwasem hialuronowym pokrywa się rany. Obserwacje kliniczne i histopatologiczne wskazują na lepsze wyniki leczenia owrzodzeń kwasem hialuronowym aplikowanym na ranę w porównaniu z metodami tradycyjnymi. Rany goją się szybciej a bliznowacenie jest bardziej kosmetyczne (12). Preparaty zawierające kwas hialuronowy stosuje się też w celu zapobiegania zrostom po operacjach jamy brzusznej. Są one bezpieczniejsze niż stosowane w tym celu preparaty przeciwzapalne, fibrynolityczne i zmniejszające krzepliwość krwi (145). Ponadto kwas hialuronowy używany jest w korekcji wrodzonych lub pourazowych defektów twarzy, zarówno jej elementów kostnych, jak i

tkanek miękkich (146). Wykorzystywany jest również terapii refleksu żołądkowo – przełykowego oraz u pacjentów z nietrzymaniem moczu lub kału (146).

Ponadto kwas hialuronowy znajduje szerokie zastosowanie w chirurgii plastycznej. Chirurdzy, podobnie jak lekarze dermatologii estetycznej wypełniają nim zmarszczki, powiększają biust, prącie, okolice kości jarzmowych lub inne okolice ciała wymagające tego typu ingerencji.

Kwas hialuronowy może być markerem niektórych chorób, takich jak schorzenia reumatyczne lub schorzenia wątroby.

W farmacji stosowany jest w celu przedłużania działania leków o krótkim okresie półtrwania.

3.2 Zastosowanie kwasu hialuronowego w dermatologii estetycznej

Dermatologia estetyczna przez wiele lat poszukiwała technik i materiałów umożliwiających bezpieczną poprawę wyglądu ludzkiej twarzy. Począwszy od XIX wieku eksperymentowano ze wstrzykiwaniem rozmaitych substancji celem uzyskania pożądanej korekty (147). Pierwsze wstrzykiwane preparaty okazały się mieć liczne działania niepożądane i zostały szybko wykluczone z grupy substancji stosowanych w zabiegach dermatologii estetycznej. Były to między innymi parafina, guma i oczyszczony lateks. Zanieczyszczona parafina była wstrzykiwana pacjentom, w celu poprawy wyglądu twarzy czy piersi, pomiędzy rokiem 1900 a 1935. Lata później, w miejscu depozytów parafiny, rozwijały się zmiany skórne (148). Kolejna generacja preparatów, takich jak silikon czy kolagen zwierzęcy, również nie spełniła pokładanych w niej oczekiwań. Płynny silikon zaczęto stosować ok. roku 1950. W 1991 roku FDA zakazało jego stosowania, mimo to w Europie wciąż go stosowano (148). Stosowany od 1981 roku kolagen bydlęcy wymaga wykonania przed zabiegiem próby uczuleniowej, która polega na podskórnym wstrzyknięciu kolagenu w nieekspozowane okolice (5). Poza tym kolagen utrzymuje się w skórze krócej niż kwas hialuronowy (149). Stosowane obecnie wypełniacze dzieli się na wchłaniane i trwałe. Lekarze starają się wykorzystywać produkty mniej antygenowe, które łatwo się wprowadza w skórę, a otrzymywane efekty są długofalowe. Idealna substancja wypełniająca powinna być (147): biokompatybilna, sterylna, nietoksyczna, nieteratogenna, niekarcynogenna, nie wywołująca

reakcji alergicznych, nienaturalnych odczuć pacjenta, w tym bólu oraz ziarniniaków, zmian zwyrodnieniowych i wapnienia, niepyrogenna, stabilna, bez tendencji do przemieszczania się, łatwa do przygotowania i wprowadzenia, zapewniająca długotrwały efekt, wymagająca zastosowania jak najmniejszej liczby zabiegów, niedroga. Większość z tych wymogów spełniają pochodne kwasu hialuronowego. Po raz pierwszy w dermatologii estetycznej zastosowano je w roku 1992 (5). W grudniu 2007 roku FDA zaaprobowało usieciowany kwas hialuronowy (7). Stosowany w dermatologii estetycznej kwas hialuronowy jest substancją ksenogeniczną, czyli pochodzącą od innych gatunków.

Najbardziej znanym i opisanym zastosowaniem kwasu hialuronowego w dermatologii estetycznej jest jego stosowanie w celu wypełniania zmarszczek. Korekcie poddawane są zarówno zmarszczki na twarzy, jak i poziome zmarszczki na szyi (150). Kwasem hialuronowym można wyrównywać blizny potrądzikowe (151) oraz podnosić opadające kąciki ust (5). Ponadto wykorzystywany on jest w preparatach powiększających usta (12) oraz inne okolice ciała, wymagające tego typu korekty. Jednym z nowszych zastosowań kwasu hialuronowego jest korekta piersi. Istnieje jednak niewielka ilość opublikowanych badań naukowych na ten temat (152). Należy odpowiednio dobrać stężenie kwasu hialuronowego do okolicy poddawanej terapii (153).

Coraz bardziej popularna staje się również intradermoterapia kwasem hialuronowym. W celu odmłodzenia skóry, ostrzykuje się przede wszystkim okolice twarzy, szyi, dekoltu oraz grzbietów rąk. Wykorzystuje się do tego celu preparaty kwasu hialuronowego nieusieciowanego, usieciowanego w niewielkim stopniu; same lub w połączeniu z innymi substancjami.

3.3 Zastosowanie kwasu hialuronowego w kosmetologii

Kwas hialuronowy jest dodawany do wielu kosmetyków aplikowanych na skórę. Jego cząsteczki są jednak zbyt duże żeby przeniknąć przez naskórek do skóry właściwej (20), a poprawa nawilżenia skóry następuje poprzez wytworzenie okluzji a tym samym zmniejszenie przeznaskórkowej utraty wody (TEWL). Ponadto kwas hialuronowy łącząc się z hydrofilowymi komponentami fosfolipidów, zwiększa nawodnienie przestrzeni hydrofilowej i doprowadza do wzrostu jej objętości. Dzięki temu maleje opór dyfuzyjny i zwiększa się

przepuszczalność warstw naskórka dla pozostałych składników kremu. Producenci dodają kwas hialuronowy do kosmetyków również w celu zatrzymania wilgoci w kosmetyku, czyli zapobiegania jego wysychaniu .

W kosmetologii szeroko promowane są suplementy diety, zawierające kwas hialuronowy. Mają one zwiększać stan nawodnienia skóry, hamować proces jej starzenia oraz spłycać zmarszczki. Jednak doniesienia naukowe potwierdzające ich skuteczność są nieliczne, a badania na temat działań niepożądanych nie istnieją. Wykazano natomiast, że suplementowanie doustnych antyoksydantów i składników macierzy, innych niż kwas hialuronowy, nie przynosi istotnych zmian w mierzonym corneometrem poziomie nawilżenia skóry (51). Doprowadza jednak do spłycenia zmarszczek.

4 Preparaty zawierające kwas hialuronowy stosowane w dermatologii estetycznej i kosmetologii

4.1 Pochodzenie egzogenego kwasu hialuronowego

Początkowo kwas hialuronowy stosowany w medycynie był pochodzenia allogenicznego. Kwas hialuronowy używany do pierwszych operacji okulistycznych izolowano z pępowiny płodu (3).

Obecnie w medycynie i kosmetologii wykorzystuje się kwas hialuronowy pochodzenia ksenogenicznego. Jak wiadomo najczęściej kwasu hialuronowego występuje w skórze, dlatego bardzo dobrym źródłem do pozyskiwania hialuronianu są grzebienie kogucie (154). Są one fałdem skóry, zawierającym niezwykle dużą ilość kwasu hialuronowego.

Drugim, obecnie preferowanym, sposobem pozyskiwania kwasu hialuronowego jest fermentacja cukru przez streptokoki (147,154).

4.2 Preparaty stosowane w iniekcjach

Preparaty kwasu hialuronowego stosowane w postaci iniekcji różnią się pochodzeniem: jedne powstają w wyniku fermentacji cukru przez streptokoki, inne pozyskiwane są z grzebieni kogucich.

Ponadto można je podzielić na dwie duże grupy: preparaty zawierające kwas hialuronowy nieusieciowany oraz usieciowany.

Preparaty nieusieciowanego kwasu hialuronowego mają posiadać właściwości biostymulacyjne i nie mogą służyć jako wypełniacz (53). Omówiono je w oddzielnym podrozdziale (rozdział 4.2.4 „Intradermoterapia”).

Usieciowane lub zmodyfikowane hialuroniany nazywane są hialanami (48) lub żelami kwasu hialuronowego. Mogą one być monofazowe lub dwufazowe. Preparaty monofazowe składają się wyłącznie z ustabilizowanego kwasu hialuronowego (np. Esthelis) – są spójne, mniej elastyczne i rozkładają się bardziej jednolicie. Preparaty dwufazowe (np. Restylane) zawierają cząsteczki stabilizowanego żelu kwasu hialuronowego w nieustabilizowanym lub

ustabilizowanym w niewielkim stopniu płynie kwasu hialuronowego, przez co rozkładają się niejednolicie, co może być przyczyną powstawania efektu „perełek”. W badaniu Nast.’a i wsp. (155) efekty iniekcji preparatu mono i dwufazowego w fałdy nosowo-wargowe były porównywalne, jednak większość pacjentów do ponownego wstrzyknięcia wybierała produkt monofazowy. Ponadto w zależności od procesu produkcji wypełniacze kwasu hialuronowego dzieli się na „jednoutwardzone” i „wieloutwardzone”. Większość dostępnych na rynku preparatów to preparaty „jednoutwardzone”. Ich sieciowanie przebiega w jednym etapie. Produkując preparaty „wieloutwardzone” (Esthelis) wykorzystuje się technikę wielokrotnie zagęszczonej matrycy– CPM (Cohesive Polydensified Matrix). Sieciowanie przebiega w dwóch etapach. Proces dynamicznego tworzenia wiązań poprzecznych prowadzi do otrzymania matrycy w kształcie akordeonu, o dwóch różnych gęstościach. Teoretycznie, części o większej gęstości zapewniają długotrwałe efekty, części o mniejszej gęstości ułatwiają iniekcję oraz są bardziej plastyczne. Firmy produkujące żele kwasu hialuronowego wykorzystują w procesie produkcji różne, opatentowane przez siebie technologie m. in.: NASHA - Non – Animal Stabilized Hialuronic Acid (Restylane), ACP - Auto Cross - Linked (Ial System) czy DGE – Dermal Gel Extra (Prevelle).

Trwałość stabilizowanych preparatów kwasu hialuronowego nie wynika jedynie z ich usieciowania, ale jest funkcją wielu czynników, przez co trudno ocenić wpływ jednego czynnika na wydajność kliniczną produktu. Na przykład, stężenie kwasu hialuronowego i stopień uwodnienia, twardość żelu i konsystencja również wpływają na efekty kliniczne produktu (Tab. 1) (156,157).

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne, które wpływają na wydajność kliniczną produktu (48,156).

Usieciowanie polimerów	Powolna degradacja enzymatyczna
Stopień usieciowania	Optymalny stopień zwiększa trwałość, nadmierny stopień może redukować biokompatybilność
Twardość / sztywność żelu	Wpływ na przechodzenie przez strzykawkę: twarde żele są trudniejsze do wstrzykiwania, można ułatwić wstrzykiwanie przez dodanie nieusieciowanego kwasu hialuronowego
Konsystencja żelu kwasu hialuronowego	Rozmiar, kształt, niejednorodność i liczba

	cząsteczek na jednostkę objętości determinuje konsystencję żelu
Wiskoelastyczność i siły ścinające	Charakteryzują łatwość iniekcji
Stężenie kwasu hialuronowego i stopień uwodnienia	Wpływ na ekspansję objętości i trwałość

W rozwoju wypełniaczy dąży się do znalezienia kompromisu pomiędzy tymi czynnikami, w celu zwiększenia wydajności wypełniaczy. Próbuje się klasyfikować żele kwasu hialuronowego na podstawie określania czynnika G0, zależnego m.in. od stopnia usieciowania i stężenia kwasu hialuronowego (156,158,159). G0 jest miarą sztywności żelu, która wzrasta wraz ze wzrostem stopnia usieciowania; szacuje odporność na odkształcanie, co z kolei wpływa na łatwość iniekcji i czas pozostawiania produktu w tkankach. Generalnie, twardsze żele trudniej się wstrzykuje, ale pozostają one dłużej w tkankach. Dodanie nieusieciowanego kwasu hialuronowego zmniejsza trudność iniekcji żelu o wysokim G0. Jednak może równocześnie zmniejszać trwałość implantu (156,160). Żele o wyższym G0 lepiej opierają się siłom dynamicznym podczas ruchów mięśni twarzy, co ułatwia wypełnienie i przedłuża czas pozostawienia wypełniacza w tkankach. Przydają się one w ostrzykiwaniu takich okolic jak: fałdy nosowo – wargowe i linie marionetki. Żele z niższym G0 nadają się do ostrzykiwania zmarszczek bardziej statycznych i powierzchownych.

To, że żele kwasu hialuronowego mogą być wprowadzane do skóry za pomocą strzykawki wynika z ich właściwości wiskoelastycznych. Ich lepkość bowiem maleje, gdy siły na nie działające rosną. Po usunięciu nacisku tłoka strzykawki, ich lepkość rośnie i mogą one przez długi czas pozostawać w miejscu podania (154,161). Ponadto żel przepływa łatwiej przez igłę w wyższej temperaturze. Aby zapobiec trudnościom w iniekcji, można ogrzać strzykawkę w ręce przed rozpoczęciem podawania preparatu (154). Jak już wspomniano, dodanie nieusieciowanego kwasu hialuronowego również zmniejsza trudność iniekcji żelu. Jednak duża ilość rozpuszczalnego (wolnego) HA może zmniejszyć skuteczność oraz długość utrzymywania się wypełniacza (162). Z kolei żele z mniejszą ilością wolnego – nieusieciowanego kwasu hialuronowego mogą mieć bardziej spójny charakter oraz lepszą zdolność do pozostawiania tam, gdzie są wstrzykiwane (163). Ponadto łatwiejsze do iniekcji żele można uzyskać w procesie homogenizacji (np. Juvederm) – są one gładkie i spójne, mimo niewielkiego odsetka nieusieciowanego kwasu hialuronowego (163,164). Preparaty

ziarniste (np. Restylane), produkowane przez dobór rozmiaru lub przesiewanie (156,164), takich cech nie posiadają.

Głębokość iniekcji dostosowana musi być do gęstości preparatu, jego ilości a także do okolicy skóry poddanej zabiegowi. Oczywiście niezbędna jest znajomość anatomii skóry, a przede wszystkim grubości jej poszczególnych warstw. Wynoszą one w przybliżeniu: naskórek – 0,07 – 0,12 mm, skóra właściwa – 1 – 4 mm, tkanka podskórna < 4 mm (165). Generalnie, wypełniacze podaje się tym głębiej im większą mają cząsteczkę (48). Restylane Perlane podaje się tuż pod skórę właściwą. Substancje o średniej wielkości cząsteczki takie jak: Restylane i Hylaform powinny być podawane w skórę właściwą. Substancje o najmniejszej cząsteczce - Restylane Fine Lines - mogą być używane bardziej powierzchownie. Każdy wypełniacz powinien być umieszczany tak powierzchownie jak to możliwe, we właściwą warstwę, w celu osiągnięcia maksymalnych korzyści. Podając preparat powierzchownie, w środkową warstwę skóry właściwej, wystarczy użyć niewielką jego ilość. Większą ilość preparatu należy użyć wstrzykując go w głęboką lub środkową warstwę skóry właściwej (153). Zabieg taki jest jednak łatwiejszy, a prawdopodobieństwo złego umiejscowienia substancji znacznie mniejsze.

Preparaty usieciowanego kwasu hialuronowego, w zależności od stężenia hialuronianu, a tym samym gęstości i płynności (153), mogą być wykorzystywane do leczenia rozmaitych typów zmarszczek. Preparaty o dużej płynności i niższym stężeniu hialuronianu, przeznaczone są do korekty płytkich zmarszczek („kurzych łapek” wokół oczu, zmarszczek „palacza” i „śmiechu” wokół ust). Implanty o większej gęstości wykorzystuje się do terapii głębszych zmarszczek, takich jak: głębokie zmarszczki u osób starszych i u mężczyzn, bruzdy nosowo – wargowe, zmarszczki międzybrowowe, linie „marionetek” oraz w celu korekty konturu czerwieni wargowej (153). Często, w celu wzmocnienia efektu, kwas hialuronowy łączy się w preparacie z innymi substancjami poprawiającymi strukturę skóry np. krzemionką, witaminą C, cynkiem (166), akrylikiem hydrożelowym, dekstranem lub wodą destylowaną. Najbardziej spójny i gęsty żel, o trójwymiarowej, siateczkowej strukturze wykorzystywany jest w preparatach przywracających objętość twarzy. Skierowany on jest do osób z widocznym zwiotczeniem skóry, utratą objętości tkanek, cechami lipotrofii jarzmowej oraz do osób chcących poprawić estetykę wyglądu twarzy.

Wiele z kosmetycznych zastosowań wypełniaczy nie jest swoiście zaaprobowanych przez FDA, ale mogą być one stosowane na podstawie poprawki z 1997 roku, która pozwala na stosowanie preparatów zaaprobowanych przez FDA na zasadzie „off – label use” (48).

4.2.1 Stabilizacja i degradacja

Egzogenny kwas hialuronowy jest szybko usuwany ze skóry i degradowany w wątrobie do dwutlenku węgla i wody (154). Okres półtrwania HA w skórze wynosi zaledwie ok. 12 godzin. Dlatego też różnorodne modyfikacje fizykochemiczne są konieczne w celu zwiększenia trwałości kwasu hialuronowego w tkankach.

Kwas hialuronowy poddaje się stabilizacji, przedłużając jego czas półtrwania do kilku miesięcy.

Obróbka kwasu hialuronowego polega na sieciowaniu jego łańcuchów. W tym celu do łańcuchów kwasu hialuronowego wprowadza się wiązania krzyżowe (167). Dostępne na rynku wypełniacze HA są typowo usieciowane eterem diglicydowym 1,4 - butanodiolu (BDDE) lub di - winylo sulfonem (DVS) (156).

Chemiczne sieciowanie kwasu hialuronowego prowadzi do powstania wiskoelastycznego polimeru (3,155). Wprowadzenie wiązań estrowych zwiększa lepkość i sztywność kwasu hialuronowego, zmniejsza rozpuszczalność w wodzie i doprowadza do nawet stukrotnego zwiększenia odporności na degradację enzymatyczną (5,147). Okres półtrwania po podaniu podskórnym wydłuża się do kilku, a nawet kilkunastu tygodni (5,154). Co ważne, antygenowość poddanego obróbce kwasu hialuronowego pozostaje niezmienną, a biokompatybilność jest zachowana.

W skórze cząsteczka stabilizowanego kwasu hialuronowego rozpada się w dwóch etapach. W pierwszym etapie, w wyniku hydrolizy (deestryfikacji) dochodzi do rozerwania wiązań krzyżowych i uwalnia się naturalny kwas hialuronowy. W drugim etapie zostaje on pocięty przez hialuronidazę na mniejsze fragmenty (53). Dalsze etapy degradacji odpowiadają degradacji endogennego kwasu hialuronowego.

Degradacja preparatów usieciowanego kwasu hialuronowego jest degradacją izowolemiczną (161). Gdy poszczególne cząsteczki kwasu hialuronowego ulegają degradacji,

pozostałe mogą związać większą ilość wody, dzięki czemu objętość żelu pozostaje niezmienną (161,168). Stężenie żelu maleje w procesie reabsorpcji, ale objętość pozostaje stała dopóki nie zostanie zdegradowana ostatnia cząsteczka kwasu hialuronowego. Klinicznie wyjaśnia to fakt, że implant utrzymuje ponad 95% swojej objętości aż materiał nie zostanie kompletnie zresorbowany (161).

4.2.2 Skuteczność

Skuteczność preparatów kwasu hialuronowego podawanego śródskórnym najłatwiej ocenia się analizując *in vivo* poprawę wyglądu skóry. W tym celu wykorzystuje się rozmaite skale oceny. Są to m.in.:

- GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale): 1 - znaczna poprawa wyglądu skóry, 2 - umiarkowana poprawa wyglądu skóry, 3 - niewielka poprawa wyglądu skóry, 4 - brak poprawy wyglądu skóry, 5 - pogorszenie (155),
- Skala oceny poprawy na podstawie % uzyskanej korekcji zmarszczek : 1 - brak poprawy, 2 - niewielka poprawa (1 - 33% korekcji), 3 - umiarkowana poprawa (34 - 66% korekcji), 4 - znacząca poprawa (67 - 100% korekcji), 5 - nadmierna korekta (154),
- WSRS (Wrinkle Severity Rating Scale): 1 - niewidoczny fałd nosowo - wargowy, 2 - płytki, ale widoczny podczas pracy mięśni twarzy fałd nosowo - wargowy, 3 - umiarkowanie głęboki fałd nosowo - wargowy, widoczny podczas pracy mięśni twarzy, 4 - głęboki i długi fałd nosowo - wargowy, osiagający głębokość 2 mm podczas pracy mięśni twarzy, 5 - wyjątkowo głęboki i długi fałd nosowo - wargowy, wpływający na wygląd twarzy w spoczynku, osiagający głębokość 2 - 4 mm podczas pracy mięśni twarzy (155),
- MLFS (Medicis Lip Fullness Scale): 1 - bardzo cienka warga, 2 - cienka, 3 - średnia, 4 - pełna, 5 - bardzo pełna,
- VAS (Visual Analogue Scale) - Wizualna Skala Analogowa: metoda służąca do oceny jakiejś zmiennej subiektywnej cechy lub postawy, która może przybierać wartości w sposób ciągły i nie daje się precyzyjnie zmierzyć dostępnymi urządzeniami, polega na zaznaczeniu przez badanego punktu na linii np. o długości 10

cm, gdzie wartości 0 przypisuje się całkowity brak danej cechy, a 10 największe jej nasilenie.

Przeprowadzono liczne badania z użyciem wyżej wymienionych skal. W dużym badaniu, na 158 pacjentach, Duranti i wsp. (154) oceniali poprawę po zastosowaniu Restylane'u. W swoim badaniu wykorzystywali skalę oceny poprawy na podstawie % uzyskanej korekty zmarszczek. Klinicznie, zarówno w ocenie lekarzy, jak i pacjentów uzyskano bardzo dobre wyniki, 78,5% i 73,4% pacjentów uzyskało odpowiednio średnią lub znaczącą poprawę po 8 miesiącach, zależnie od miejsca poddawanego terapii. Dokumentacja fotograficzna ujawniła nawet 80,4% umiarkowanej i znacznej poprawy po 8 miesiącach. W tym samym badaniu naukowcy za pomocą badania histopatologicznego oceniali czas utrzymywania się materiału w skórze i ewentualne interakcje. Implant Restylane'u utrzymywał swą wielkość między 12 a 24 tygodniem badania. W tygodniu 52 większość implantów była jeszcze wyraźnie widoczna pod skórą, a barwienie na kwas hialuronowy ujawniło obecność materiału, ale ze znacząco większą ilością wody niż we wcześniejszych biopsjach.

Najkorzystniejsze efekty wypełnienia zmarszczek kwasem hialuronowym obserwuje się 2 - 3 tygodnie po zabiegu. Efekt wypełnienia zmarszczek jest wówczas najwyraźniejszy, a skóra wyraźnie uwodniona. Klinicznie, długość utrzymywania się efektów stabilizowanego kwasu hialuronowego, ocenia się na 4 – 12 miesięcy (7,146,149,169). Trwałość produktu jest zwiększona przez zjawisko izowolumetrii (7,170,171). Trwałość efektu zabiegu jest jednak w dużej mierze sprawą indywidualną. Zależy między innymi od takich czynników jak: wiek, tryb życia i typ skóry (166). Najdłużej, ok. 9, a nawet 18 miesięcy, efekty utrzymują się u osób prowadzących ustabilizowany, higieniczny tryb życia (153). Zdarza się jednak, że preparaty usieciowanego kwasu hialuronowego ulegają przedwczesnemu rozpadowi i zanikaniu (147). Czas utrzymywania się efektów zabiegu mogą znacznie skrócić takie czynniki jak: palenie tytoniu, spożywanie alkoholu czy opalanie się. Również w przypadku zapaleń i zranień dochodzi do szybszej degradacji kwasu hialuronowego przez hialuronidazę (10).

Oprócz oceny stopnia poprawy wyglądu skóry oraz długości utrzymywania efektów, naukowcy próbują odpowiedzieć na pytanie dotyczące lokalizacji oraz postępującej dyfuzji wstrzykiwanego kwasu hialuronowego do tkanek skórnych. Gensanne i wsp. w badaniu z roku 2007 udowodnili możliwość wykorzystywania parametrycznych obrazów T2 zależnych MRI do wizualizacji *in vivo* środka wypełniającego, jakim jest kwas hialuronowy, oceny jego

dyfuzji, degradacji oraz do scharakteryzowania zmian zachodzących pod jego wpływem w tkankach (172). Wstrzyknięty kwas hialuronowy w klasycznym (morfologicznym) obrazie rezonansowym był słabo widoczny, jednak wyraźnie można było go zobaczyć podczas obrazowania parametrycznego T2 zależnego. Początkowo kwas hialuronowy miał tendencję do rozprzestrzeniania się na granicy skóry właściwej i tkanki podskórnej. Prezentował maksymalne rozprzestrzenienie po okresie około 4 miesięcy. Następnie jego objętość zmniejszała się. Rezultaty te ukazują, iż kwas hialuronowy rozprzestrzenia się początkowo na boki, a następnie jest stopniowo resorbowany i degradowany. Technika, wykorzystująca parametryczne obrazy T2 zależne MRI, może być również wykorzystywana w celu wykrywania ciał obcych w postaci ziarniniaka, zwłóknienia, a także w celu ilościowej oceny mikrounaczynienia substancji wypełniającej. Metoda ta jest skuteczna dla każdego środka wypełniającego, który charakteryzuje się odmiennym czasem relaksacji od badanej tkanki.

Ponadto naukowcy próbują odpowiedzieć czy i w jaki sposób iniekcja kwasu hialuronowego pobudza syntezę kolagenu w skórze. Wang i wsp. (8) w badaniu z 2007 roku obserwowali syntezę de novo kolagenu w skórze zniszczonej fotostarzeniem, poddanej iniekcjom usieciowanego kwasu hialuronowego. W tym celu stosowali analizę immunohistochemiczną, reakcję PCR i mikroskop elektronowy. W badaniu immunohistochemicznym zaobserwowali wzrost barwienia kolagenu typu I zarówno wewnątrz jak i zewnątrz komórek skóry ostrzykniętej NASHA w porównaniu z kontrolą. Kolagen typu I jest syntetyzowany wewnątrz fibroblastów, następnie następuje jego sekrecja do otaczającej macierzy zewnątrzkomórkowej. Barwienie wewnątrzkomórkowe pojawiało się przede wszystkim w komórkach otaczających wypełniacz. Nie obserwowano go wewnątrz przestrzeni zawierających NASHA. Podobny wzrost barwienia uzyskano barwiąc preparaty na hydroksylazę - 4 - proliową – enzym który katalizuje hydroksylację reszt proliny, prowadząc do powstania stabilnej struktury dojrzałego kolagenu typu I. Stosując technikę PCR zaobserwowano wzrost ekspresji genów (mRNA) dla I i III typu prokolagenu oraz czynników wzrostu tkanki łącznej i wszystkich 3 izoform czynnika transformacji β (TGF β). Ponadto w skórze ostrzykiwanej NASHA, zaobserwowano zwiększoną ekspresję tkankowych inhibitorów metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. W mikroskopie elektronowym oraz w hodowli fibroblastów zaobserwowano zmianę morfologii fibroblastów otaczających wypełniacz. Wiele rozciągniętych fibroblastów zawierało obfite szorstkie retikulum endoplazmatyczne, wskazujące na wysoki poziom syntezy protein. Nie identyfikowano komórek wewnątrz wypełniacza, co sugeruje, że fibroblasty nie mają preferencji do

wypełniania lub wiązania się z wypełniaczem. Na podstawie otrzymanych wyników badacze (8) wysnuli hipotezę, że efekt stymulowania produkcji kolagenu może być wynikiem mechanicznego rozciągania skóry, co z kolei prowadzi do rozciągania i aktywacji fibroblastów skóry. Byłoby to zgodne z obserwacjami innych naukowców (173-175). Fibroblasty reorganizują swój cytoszkielet aktynowy tak aby układać się wzdłuż linii napięcia, a po rozciągnięciu produkują zwiększoną ilość elementów tkanki łącznej takich jak I i III typ kolagenu. Odzwierciedla to dynamiczną odpowiedź komórek w celu przeciwdziałania zewnętrznie aplikowanemu napięciu (174). Wykazano, że mechaniczne rozciąganie stymuluje fibroblasty do produkcji czynników wzrostu i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz matriks zewnątrzkomórkowego, a hamuje ekspresję metaloproteinaz matriks (174), co może oznaczać że mechaniczne rozciąganie działa jako bodziec inicjujący produkcję kolagenu. Nie wiadomo, czy pojedyncza iniekcja NASHA stymuluje wystarczającą ilość kolagenu, żeby uzyskać zauważalne klinicznie zmiany. Można jednak przypuszczać, że kumulacja kolagenu w wyniku kilkukrotnych iniekcji NASHA w określonym czasie może przynieść trwałe efekty kosmetyczne.

Skuteczność preparatów zawierających kwas hialuronowy można też oceniać szacując stopień poprawy pierwszego wrażenia jakie wywiera twarz pacjenta po korekcie z zastosowaniem kwasu hialuronowego. Badanie takie przeprowadzili Dayan i wsp. (176). Wypełniali oni pacjentom bruzdy nosowo –wargowe wypełniaczem kwasu hialuronowego. Ochotnicy oceniali pierwsze wrażenie na zdjęciach sprzed i po korekcie. Poprawa pierwszego wrażenia była znaczna i to we wszystkich ocenianych kategoriach takich jak: pierwsze wrażenie, atrakcyjność, sukces finansowy czy relacje międzyludzkie (176).

4.2.3 Bezpieczeństwo

Preparaty kwasu hialuronowego są rejestrowane i zatwierdzane jako substancje wypełniające przez Jednostki Notyfikowane w Unii Europejskiej (Notified Bodies of the European Community) oraz Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FDA) w Stanach Zjednoczonych. Niestety w przeciwieństwie do FDA, Jednostki Notyfikowane w Unii Europejskiej nie wymagają do tego celu ani badań na zwierzętach ani badań klinicznych (146). CE – europejski znak jakości dopuszczający do sprzedaży na terenie Europy nadawany jest substancjom do iniekcji produkowanym w fabrykach korzystających z zestawu

standardów stosowanych w produkcji przemysłowej - GMP (Good Manufacturing Practice). W trakcie procesu certyfikacji oczywiście mogą być przeprowadzone kontrolowane badania kliniczne danego produktu, jednak efektywność i bezpieczeństwo wielu certyfikowanych znakiem CE wypełniaczy, jest oceniane jedynie na podstawie literatury (177). Nie gwarantuje to maksimum biologicznego bezpieczeństwa. Z tego powodu również w Europie powinno zostać założone centralne biuro odpowiadające FDA, w celu zgłaszania do niego wszelkich efektów ubocznych stosowanych substancji.

Część producentów ocenia efekty uboczne, jako procent od stosowanych preparatów – prawdopodobnie procent sprzedanych strzykawek (tak jest w przypadku Restylane, Hylaform, Dermalive). Inni z kolei producenci podają ilość efektów ubocznych, jako procent leczonych pacjentów (21). Większość z tych badań opiera się na pacjentach wracających do prywatnej praktyki lub dobrowolnych sprawozdaniach. Realna ilość działań niepożądanych jest więc prawdopodobnie większa (171,178,179). Tylko dokładna statystyczna analiza danych jest w stanie rzucić światło na prawdziwy zakres efektów ubocznych poszczególnych substancji wypełniających. Długotrwała obserwacja i centralna rejestracja działań niepożądanych wpłynęłaby na poprawę skuteczności i bezpieczeństwa substancji wprowadzanych do skóry.

Według obiegowej opinii oraz opinii części badaczy kwas hialuronowy jest preparatem bezpiecznym, pozbawionym działań niepożądanych. Jednak podczas, gdy część autorów sugeruje brak efektów ubocznych po zastosowaniu kwasu hialuronowego (154,180-182), inni opisują natychmiastowe i opóźnione reakcje związane z podaniem kwasu hialuronowego samego lub w połączeniu z innymi substancjami (149,154,171,183-194).

Generalnie preparaty kwasu hialuronowego uznawane są za nietoksyczne, niemutagenne i niezakrzepotwórcze (195). Jedną z ich największych zalet, jest znikoma możliwość wywołania odpowiedzi immunologicznej (humoralnej i komórkowej). Na podstawie danych zebranych w latach 1997 – 2001 ryzyko reakcji alergicznej kwasu hialuronowego pochodzenia bakteryjnego ocenia się na 0,8% (171). Zaleta ta wynika z tego, że kwas hialuronowy ma taki sam skład chemiczny i molekularny u wszystkich gatunków. Dobrą tolerancję preparatów kwasu hialuronowego potwierdzają liczne badania kliniczne. Kwas hialuronowy otrzymywany biosyntetycznie przez fermentację bakteryjną, teoretycznie nie stwarza ryzyka przenoszenia chorób pomiędzy gatunkami i wywoływania alergii u pacjentów, którzy są uczuleni na takie pokarmy jak: wołowina, drób czy jajka (154). U niewielkiej grupy pacjentów może się jednak pojawić reakcja alergiczna na białka i

zanieczyszczenia nie tylko grzebieni kogucich, ale również bakterii (21,186-189), z których biotechnologicznie pozyskuje się kwas hialuronowy. Są to zazwyczaj reakcje z nadwrażliwości: typu IV (reakcje ziarniniakowe), połączone niekiedy z dominującą reakcją typu I i III wg. klasyfikacji Gell'a i Coombs'a (196). Część autorów uważa jednak, że zanieczyszczenia (białko ptasie lub z fermentacji bakterii) zawarte w sieci cząsteczkowej HA nie wydają się ani toksyczne ani zdolne wywoływać odpowiedzi immunologicznej. Wg. Klein'a (197) w produktach drugiej generacji takie zagrożenia zostały wyeliminowane. Na przykład Restylane stał się bezpieczniejszym wypełniaczem, na skutek modyfikacji, która doprowadziła do zmniejszenia całkowitej zawartości białka w produkcie (196).

Praktycznie po iniekcji kwasu hialuronowego nie pojawiają się reakcje ze strony tkanki włóknistej ani ciężkie reakcje na ciało obce (154). Pojawienie się ziarniniaków obserwuje się znacznie rzadziej niż w przypadku wypełniaczy trwałych (179,188,189,191). Ocenę reakcji na ciało obce przeprowadzać można oceniając barwione na niebiesko toluidyną wycinki histopatologiczne na podstawie czterostopniowej skali opracowanej przez Duranti i wsp. (154). Stopień pierwszy charakteryzuje się niewielką reakcją z obecnością nielicznych komórek zapalnych. W stopniu drugim obserwuje się już wyraźną reakcję zapalną z obecnością jednej lub dwóch komórek olbrzymich. W stopniu trzecim pojawia się tkanka włóknista z komórkami zapalnymi, limfocytami i komórkami olbrzymimi. Ostatni, czwarty stopień charakteryzuje się obecnością ziarniniaka z otorbionym implantem oraz wyraźnej reakcji na ciało obce. W badaniu histopatologicznym Lemperle i wsp. wykazali niewielką reakcję na ciało obce po iniekcji 2% preparatu Restylane (21). Następową przy tym stopniową degradacją nagromadzonych komórek przez makrofagi. Część makrofagów i rzadziej komórek olbrzymich była widoczna w 3 miesiącu. Skupiska tych komórek można było wciąż odnaleźć po 6 miesiącach, jednakże po 9 miesiącach nie stwierdzano żadnych pozostałości. Przyczyna powstawania ziarniniaków u wybranych pacjentów wciąż nie jest znana, co powoduje, że nie można ustalić żadnych wskaźników prognostycznych (21). U części tych pacjentów obserwowano ciężkie uogólnione infekcje wirusowe i bakteryjne (198,199), szczepienie lub lokalny uraz kilka miesięcy przed pojawieniem się ziarniniaków. Podsumowując kwas hialuronowy podany śródskórnym jest wolno fagocytowany z minimalną reakcją histopatologiczną (21). W przypadku pojawienia się ziarniniaka, można go usunąć tradycyjnie przez nacięcie / drenaż lub wycięcie (200).

Bardzo rzadko obserwowane są reakcje uogólnione i odległe (178,179,199). Opisano uogólnione zaczerwienienie skóry, zespół suchości i rumień obrączkowy, reakcje

sarkoidozopodobne (201), zapalenie małych naczyń krwionośnych skóry (prawdopodobnie reakcja na powtarzającą się ekspozycję tego samego antygeny lub też związana z niektórymi chorobami autoimmunologicznymi) (196).

Najczęściej pojawiają się przemijające reakcje w miejscu wstrzyknięcia, o nasileniu łagodnym do umiarkowanego (160,202). Czasami, w ciągu pierwszych 72 godzin, zaobserwować można reakcje skórne w postaci rumienia, obrzęku czy świądu (5,168), niekiedy krwiaki, a także przeczulicę i dyskomfort (154). Zaczerwienienie jest widoczne w miejscach iniekcji i mija w przeciągu 1 dnia (154). Opisano przypadek utrzymywania się obrzęku, z przerwami, przez 8 miesięcy (188). Dłuższe utrzymywanie się rumienia i obrzęku, mogło wynikać z ćwiczeń fizycznych, ekspozycji na słońce, menstruacji, ewentualnie zanieczyszczeń powstałych w procesie fermentacji. Ponadto opisano 4 przypadki na świecie powstania ropni w miejscu iniekcji preparatu (5).

Poza dobrze poznanymi reakcjami alergicznymi i zapalnymi, rzadko opisywane są inne komplikacje po podaniu wypełniaczy skóry (21). Opisano jednak przypadki lokalnej lipodystrofii policzków, podobnej do tej obserwowanej w terapii przeciwvirusowej AIDS (21,203). Pojawiała się ona 2 – 3 miesiące po podaniu Restylan'u w fałdy nosowo – wargowe zdrowych pacjentów. W 9 miesiącu od podania preparatu wciąż obserwowano utrzymywanie się implantu, poprzeplatanego komórkami ołbrzymimi i tkanką ziarnistą. Pozostałości były otorbione i otoczone nekrozą tkanki tłuszczowej i wakuolami. Nie znaleziono wytłumaczenia dla tej reakcji, ani żadnych powiązań pomiędzy strukturą chemiczną Restylan'u a inhibitorami proteazy stosowanymi w terapii HIV (21). Ponadto terapia okolic unaczynionych (takich jak „serduszko” ust, glabella oraz dolina łez), powoduje wzrost ryzyka okluzji naczyń, w wyniku czego dochodzi do zablokowania zaopatrzenia w krew danej okolicy (165). W najgorszym wypadku, może dojść do nekrozy takiej okolicy (160), pozostawienia rany wymagającej leczenia oraz potencjalnej blizny.

Część działań niepożądanych wynika z braku doświadczenia lekarza, a ich ilość maleje wraz ze zdobywaną przez niego praktyką (202,204). Technika iniekcji może wywoływać komplikacje, jeśli materiał wypełniający zostanie przypadkowo podany na niewłaściwą głębokość skóry (zmiany skórne, wypukłe guzki), w nieprawidłowej lokalizacji (przemieszczenie wypełniacza), lub w nieprawidłowej ilości (wyczuwalne guzki, deformacja konturu) (48). Przy zbyt powierzchownej iniekcji produktu pojawić się może m. in. efekt Tyndalla – niebieskawy odcień widoczny przez skórę (165). Przy podaniu zbyt głębokim,

domięśniowym, czas utrzymywania się efektów może zmaleć w wyniku absorpcji produktu (48). Jeśli w wyniku nadkorekty pojawią się guzki, może pomóc delikatny masaż oraz gorące okłady (183,205). Zbyt intensywny masaż może spowodować pojawienie się siniaków (202). Pojawienie się siniaków może być również związane z faktem, że struktura hialuronianu jest zbliżona do struktury heparyny (48). Nadmierne zasinienie może prowadzić do skrócenia utrzymywania się produktu, poprzez przyciąganie mediatorów reakcji zapalnej i generowanie wolnych rodników. Baumann proponuje, aby w celu redukcji siniaków, stosować połączenie kwasu hialuronowego z kolagenem (206). Ponadto postuluje się dodawanie do kwasu hialuronowego lidokainy. Obniża ona aktywację eozynofili, które mogą stymulować pojawienie się siniaków (207). Zmniejszenie ilości i nasilenia siniaków na pewno jest też związane ze zmniejszeniem ilości wkluc, dlatego lepiej wybierać technikę liniową niż punktową. Wspomniane już ryzyko okluzji naczyń, można zmniejszyć, podając preparat podczas wycofywania igły (165). Najbardziej jednak należy zwrócić uwagę na szybkość podawania wypełniacza. Zmniejszenie szybkości iniekcji, realnie obniża ryzyko pojawienia się działań niepożądanych (160).

Co ważne, w celu usunięcia nadmiaru produktu lub zniwelowania komplikacji można stosować hialuronidazę (182,208). Hialuronidaza jest enzymem, który depolimeryzuje kwas hialuronowy poprzez rozrywanie wiązań glikozydowych. Rozkłada on również inne kwaśne mukopolisacharydy, znajdujące się w tkance łącznej (209). Chirurdzy dodają hialuronidazę do środków znieczulających miejscowo, co ułatwia rozwarstwienie skóry poprzez reakcję enzymatyczną endogenego kwasu hialuronowego znajdującego się w przestrzeni międzykomórkowej tkanki łącznej (210). Stosowanie hialuronidazy w celu usunięcia ze skóry wypełniaczy kwasu hialuronowego jest procedurą off – label (209). Nie jest ona pozbawiona działań niepożądanych. Pacjenci podczas wstrzykiwania hialuronidazy odczuwają pieczenie, a reakcje nadwrażliwości opisywano w licznych publikacjach (209,211-214). Reakcje alergiczne są prawdopodobnie związane z dawką hialuronidazy. W doświadczeniu klinicystów, używających na co dzień mniejszych dawek hialuronidazy, takie reakcje nie pojawiają się. Również w badaniu Nevarre'a i Tzarnas'a u pacjentów, którzy otrzymali śródskórną 0,5 ml 1% lidokainy i 7,5 U hialuronidazy nie obserwowano żadnych reakcji alergicznych (215). Możliwe, że hialuronidaza staje się bardziej immunogenna, ze względu na to że podaje się ją w miejsce wcześniejszego podania stabilizowanego kwasu hialuronowego. Na początek (ok. 2 tygodnie po iniekcji kwasu hialuronowego) powinny być wstrzykiwane małe dawki hialuronidazy, rzędu 5 – 10 U (0,1 – 0,2 mL preparatu zawierającego 50 U / mL),

co pozwala zmniejszyć ryzyko reakcji alergicznych. Następnie można powtarzać iniekcje co 2 tygodnie. W przypadku konieczności zastosowania większych dawek, bezpieczniej wykonać wcześniej testy skórne. Należy pamiętać, że hialuronidaza należy do kategorii leków C, co oznacza że nie może być stosowana u kobiet w ciąży i starających się o dziecko.

W celu zniwelowania komplikacji po podaniu wypełniaczy kwasu hialuronowego, próbowano stosować też, z ograniczonym sukcesem, miejscowe kortykosteroidy, iniekcje z kortykosteroidów oraz leki immunomodulacyjne (179,182,202).

Możliwe, że większe ryzyko reakcji niepożądanych na wstrzyknięcie wypełniacza, występuje u osób predysponowanych, osób u których powtarzano zabiegi wypełniające oraz stosowano różne rodzaje wypełniaczy.

W celu ograniczenia reakcji z nadwrażliwości na wypełniacze kwasu hialuronowego u osób uczulonych lub predysponowanych, część autorów sugeruje wprowadzenie testów skórnych przed zabiegiem intradermoterapii (196). Micheels (216) oraz Lowe i wsp. (179) opisali w swoich badaniach reakcje skóry, powstające w wyniku wykonania testów u osób poddawanych ostrzykiwaniu kwasem hialuronowym. Micheels (216) wykazał ponadto obecność w surowicy przeciwciał przeciwko Restylane i/lub Hylaform a także przeciwciał IgG i IgE skierowanych przeciwko kwasowi hialuronowemu. Wstrzyknięcie śródskórnym 0,1 mL wypełniacza w przedramię, może być łatwym testem poprzedzającym zabieg ostrzykiwania kwasem hialuronowym. Niestety czas utajenia przed pojawieniem się reakcji skóry wynosi zazwyczaj 5 – 8 tygodni (187,196,216).

Podsumowując, należy się zastanowić, czy bezpieczna jest ingerencja w ilość i jakość kwasu hialuronowego w skórze. Wiadomo, że kwas hialuronowy bierze udział w wielu procesach biochemicznych organizmu, jednak mechanizmy jego działania nie są do końca poznane. Kwestia roli hialuronianu w skórze także wciąż pozostaje otwarta. Podawanie preparatów kwasu hialuronowego do skóry stało się bardzo popularne, podczas gdy cele i mechanizmy działania hialuronianu w skórze poznane zostały tylko częściowo.

4.2.4 Intradermoterapia

Słowo mezoterapia (inaczej intradermoterapia) pochodzi ze zlepku dwóch słów: mezo – środek i therapiam – leczyć (217). Jest to metoda leczenia ograniczonej powierzchni skóry

przez liczne iniekcje pod i śródskórne niewielkiej ilości środka farmaceutycznego lub mieszaniny takich środków. Mezoterapia narodziła się we Francji ponad 60 lat temu, a za ojca tej metody, wykorzystywanej w dermatologii estetycznej, uznaje się francuskiego lekarza M. Pistora (218).

Zaletą intradermoterapii jest możliwość uzyskania odpowiedniego stężenia substancji w skórze danej okolicy, a tym samym osiągnięcie optymalnej skuteczności preparatu. Teoretycznie, metabolizm leków dostarczonych miejscowo nie obciąża wątroby i omija bariery przewodu pokarmowego (166), a więc wpływ na ustrój ograniczony jest do minimum. Jednak w dostępnym piśmiennictwie nie pojawiają się żadne dane na temat farmakokinetyki substancji stosowanych w mezoterapii (wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu, eliminacji i działań niepożądanych) (218), a badania kliniczne na temat skuteczności intradermoterapii kwasem hialuronowym są nieliczne i sprzeczne. Wynika z tego, że nie potwierdzono naukowo skuteczności intradermoterapii, a ryzyko dla pacjenta jest nieznane.

Mezoterapię w dermatologii estetycznej stosuje się przede wszystkim w celu biorewitalizacji skóry twarzy, szyi i dekoltu. Mianem biorewitalizacji określa się stymulację naturalnych procesów regeneracyjnych skóry. Polegać ma ona na pobudzaniu komórek macierzystych do podziału i zwiększenia aktywności metabolicznej, co prowadzi do odbudowy autogennych składników skóry (53). Dzięki temu poprawiać się mają właściwości fizjologiczne skóry oraz jej elastyczność, jędrność i napięcie. Zabieg mezoterapii służący biorewitalizacji skóry nosi nazwę meso liftu (218).

Kwas hialuronowy w intradermoterapii stosowany jest jako substancja redukująca zmarszczki oraz poprawiająca nawilżenie, jędrność i elastyczność skóry (166). Zabiegi te są odpowiednie nawet dla młodych, 30 letnich pacjentów, którzy zawczasu chcą zadbać o wygląd swojej skóry i zapobiec zmianom jej stanu (153). Mezoterapia najbardziej polecana jest pacjentom palącym papierosy, nadmiernie korzystającym z promieniowania UV (zarówno na słońcu jak i w solarium), ze zmęczoną i szarą skórą oraz pacjentom po zabiegach dermatologii estetycznej (peelingach i dermabrazji) (153). Kuracja może być również formą prewencji np. przed spodziewaną większą ekspozycją na szkodliwe czynniki atmosferyczne, w tym promieniowanie UV (53).

Zabiegi intradermoterapii kwasem hialuronowym, stosowane w celu biorewitalizacji skóry, bazują na dwóch mechanizmach. Pierwszy z nich to działanie wstrzykniętego kwasu hialuronowego (bodziec farmakologiczny), drugi – efekt ogniskowego gojenia się tkanki po

licznych iniekcjach (bodziec fizyczny) (47). Kwas hialuronowy w preparatach służących do biostymulacji skóry jest nieusieciowany lub usieciowany w niewielkim stopniu wiązaniami estrowymi. Nieusieciowany kwas hialuronowy ma posiadać właściwości biostymulacyjne i stwarzać optymalne warunki środowiska, zapewniając prawidłową aktywność komórek, stymulując wzrost liczby fibroblastów oraz neutralizując wolne rodniki (47). Działanie przeciwutleniające ma być związane ze strukturą chemiczną oraz ciężarem właściwym cząsteczki, z kolei efekt nawilżający ma wynikać z tego, że jedna cząsteczka kwasu hialuronowego jest w stanie związać 250 cząsteczek wody. Usieciowanie nadaje polimerowi większą trwałość. Dzięki temu preparat użyty do biorewitalizacji wchłania się wolniej, a jego działanie zostaje wydłużone. Degradacja kwasu hialuronowego w skórze odbywa się w dwóch etapach. W pierwszym etapie, w wyniku hydrolizy (deestryfikacji) dochodzi do rozerwania wiązań krzyżowych i uwalnia się naturalny kwas hialuronowy. W drugim etapie zostaje on pocięty przez hialuronidazę na mniejsze fragmenty (53). Drobne fragmenty kwasu hialuronowego mają mieć wybitne właściwości biostymulacyjne (53). Dzięki powolnemu aktywowaniu usieciowanego kwasu hialuronowego w skórze, nawilżanie skóry stale powinno rosnać a stymulacja receptorów fibroblastów (gł. CD44) i receptorów naczyniowych ICAM powinna zostać wydłużona w czasie (53). Stymulacja podjednostki CD 44 fibroblastów, ma pobudzać je do proliferacji i produkcji kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego.

Najskuteczniej usieciowany kwas hialuronowy ma działać, gdy zostanie podany do dobrze nawodnionych tkanek (53). Dlatego warto przed jego podaniem przeprowadzić dwa zabiegi mezoterapii kwasem hialuronowym nieusieciowanym. Można też wykonać iniekcje dwoma typami hialuronianu w trakcie jednego zabiegu tzw. metodą kanapkową.

Iniekcje preparatów do mezoterapii można wykonywać klasycznie manualnie strzykawką z igłą o rozmiarze 27G, 30G, 32 G i długości 4 – 10 mm, za pomocą multiiniektorów (linijnych lub kołowych) lub specjalnego pistoletu do mezoterapii (47). „Pistolet” wyposażony jest w igłę i strzykawkę jednorazowego użytku. Można ustawić częstotliwość iniekcji, jej głębokość i ilość podawanego środka.

Preparaty kwasu hialuronowego najczęściej są podawane przy użyciu dwóch popularnych technik manualnych. Metoda depozytów polega na wielokrotnych wstrzyknięciach hialuronianu w górną warstwę skóry właściwej, z pozostawieniem w niej niewielkich depozytów (grudki 0,1 – 0,2 ml). Ulegają one wchłonięciu w ciągu kilku – kilkunastu godzin, maksymalnie 2 – 3 dni (53). Druga technika, zwana pikotage’em, polega na

wykonywaniu licznych bardzo powierzchownych nakłuć, z jednoczesnym ciągłym naciskiem na dźwignię strzykawki. Po zabiegu wykonuje się masaż. Zaletą tej techniki jest niepozostawianie grudek depozytowych, wadą gorsze rezultaty – mniejsza poprawa napięcia i jędrności skóry (53) oraz utrata dużej części materiału. Można też zastosować technikę liniową (wstrzykując preparat powierzchniowo wzdłuż zmarszczek) lub liniowo – krzyżową (np. w obrębie policzków).

Intraedermoterapię powinno wykonywać się w serii zabiegów. Najpierw 2 – 4 krotnie zabiegi odbywają się średnio co 1 – 2 tygodnie (53,166). Następnie wykonuje się zabiegi podtrzymujące co 2 miesiące, raz na kwartał, dwa razy w roku (166).

Pacjent musi zostać należycie przygotowany do zabiegu. Należy zebrać dokładny wywiad, przeanalizować oczekiwania pacjenta, uwzględnić wskazania i przeciwwskazania do zabiegu.

Mezoterapia kwasem hialuronowym jest przeznaczona dla pacjentów cierpliwych. Muszą oni być świadomi tego, że regeneracja skóry wymaga czasu. Ponadto powinni stosować ochronę przeciwsłoneczną i właściwie pielęgnować skórę.

Należy jednak jeszcze raz podkreślić, że skuteczność i bezpieczeństwo intradermoterapii kwasem hialuronowym nie są dobrze udokumentowane w literaturze medycznej, a informacje na ten temat są niekiedy sprzeczne.

4.3 Preparaty stosowane doustnie

Doustne preparaty kwasu hialuronowego można podzielić na dwie główne grupy. Pierwsze stosowane są w celu poprawy jakości skóry. Drugie mają za zadanie wspomagać leczenie chorób zwyrodnieniowych stawów.

Doustne preparaty kwasu hialuronowego, które mają wpływać na jakość skóry dzieli się z kolei na preparaty drobno i wielkocząsteczkowe. Według producentów preparaty wielkocząsteczkowe mają większą zdolność wiązania wody, dzięki czemu dobrze nawilżają i wygładzają skórę odwodnioną (219).

Najnowsze doniesienia naukowe potwierdzają możliwość wchłaniania i docierania do skóry wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. W literaturze recenzowanej są jednak dopiero pionierskie doniesienia dotyczące tego zagadnienia. Pierwszego dowodu na wychwyty i rozkład w tkankach podanego doustnie wysokocząsteczkowego kwasu hialuronowego (HA) dostarczył Balogh i wsp. w badaniach z 2008 roku (220). Grupa badaczy podawała zwierzętom doustny kwas hialuronowy o masie cząsteczkowej ok. 1 MDa (nazwa handlowa preparatu – Nutrihyl) oraz o masie 1,1 – 1,5 MDa (nazwa handlowa preparatu – HyaMax). Kwas hialuronowy był specjalnie znakowany ^{99m}Tc.

Badacze określali wydalanie kwasu hialuronowego z kałem i z moczem oraz jego klirens we krwi i w moczu, wykorzystując radioaktywność znakowanego kwasu hialuronowego. Ponadto oznaczali rozkład tkankowy kwasu hialuronowego u szczurów. Dodatkowo wykonywali scyntygraficzne badanie zwierząt w określonych punktach czasowych po doustnym podaniu znakowanego kwasu hialuronowego, skany Nano / SPECT / CT oraz autoradiografię prób tkankowych.

Obie grupy zwierząt, które otrzymały znakowany ^{99m}Tc kwas hialuronowy, wykazywały wydalanie niemal całej radioaktywności w kale po 24 godzinach od podania, co odpowiadało czasowi przejścia kwasu hialuronowego przez jelita i było weryfikowane scyntygrafia całego ciała (wydalanie całkowite Nutrihyl ^{99m}Tc - HA w ciągu 72 godzin wyniosło $92,3 \pm 1,7\%$ połkniętej dawki w kale i $3,2 \pm 0,42\%$ połkniętej dawki w moczu, z kolei wydalanie całkowite HyaMax ^{99m}Tc - HA w ciągu okresu 72 godzin wyniosło $84,6 \pm 7,8\%$ połkniętej dawki w kale i $2,0 \pm 0,63\%$ połkniętej dawki w moczu).

Większość z doustnie podanego ^{99m}Tc - HA pozostawała w przewodzie żołądkowo-jelitowym, czego dowodem jest lokalizacja radioaktywności najpierw w żołądku, następnie w segmentach jelita cienkiego, a następnie w segmentach jelita grubego zgodnie z normalnymi czasami przechodzenia przez jelito dla szczura. Radioaktywność po podaniu ^{99m}Tc - HA wykazywała akumulację w skórze, a także we krwi, w kościach, stawach kolanowych i w mięśniach, lecz nie pojawiała się w innych narządach. Tkanki te wykazywały wychwyty radioaktywności po podaniu ^{99m}Tc - HA od godziny 2, zwykle z akumulacją w późniejszych punktach czasowych (24-72 h). Co ciekawe, dawał się zaobserwować bardzo szybki wychwyty radioaktywności w kościach, mięśniach i tkankach jelita cienkiego i grubego po 5 i 15 minutach, mimo że jednorazowa dawka ^{99m}Tc - HA na pewno jeszcze nie była w segmentach jelita (co pokazują dane scyntygraficzne). Po 72 godzinach 10% połkniętej

radioaktywności (HyaMax) pozostawało w tkankach, odpowiadając wielkości 13,3% nieodzyskanej w drodze wydalania radioaktywności. Scyntygraficzny schemat rozkładu tkankowego radioaktywności dla ^{99m}Tc - HA, odzwierciedlał i potwierdzał schemat obserwowany w bezpośrednim badaniu tkanek. Kontaktowa autoradiografia *ex vivo* próbek tkanki łącznej szczurów wykazała znaczny wychwyty radioaktywności w próbkach skóry szczurów po podaniu ^{99m}Tc - HA.

Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanych wyników jest to, że radioaktywność tkankowa wynikała z wychwyty wysokocząsteczkowego HA. Wyniki sugerują, że mała ilość doustnie podanego HA została zaabsorbowana do układu krążenia i wychwycona przez tkanki łączne. Obserwowane wyniki można było wyjaśnić wchodzeniem i transportem ^{99m}Tc - HA z chłonką, ponieważ czas wychwyty tkankowego (po 6 godz) i zdolność naczyń limfatycznych do penetrowania tkanki łącznej współgra w czasie ze zjawianiem się i akumulacją radioaktywności.

Ponadto w danych literaturowych można znaleźć dowody wspierające dane dotyczące wychwyty doustnie podanego HA przez tkanki łączne. W licznych badaniach wykazano przechodzenie do krążenia i tkanek innych wysokocząsteczkowych glikozaminoglikanów (10 - 40 kDa) po karmieniu ludzi i innych ssaków chondroityną, dermatanem, heparanem i/lub niefrakcjonowanymi siarczanami heparyny (221-224). Istnieją też doniesienia nie potwierdzające absorpcji siarczanów chondroityny, jednak w każdym z tych badań można się doszukać powodów braku zdolności wykazania absorpcji (225,226). Należy zwrócić uwagę na fakt, że procent połączony dawki innych glikozaminoglikanów wchodzących do krążenia (między 5 a 20%), był podobny do ilości kwasu hialuronowego opisanego w pracy Balogh'a i wsp. (220-224). Wskazuje to na istnienie częściowego wychwyty dużych glikozaminoglikanów po ich podaniu doustnym.

Istnieją również doniesienia o efektach biologicznych podanego doustnie wysokocząsteczkowego HA. Efekt ten jest zgodny ze znanymi cechami HA (227,228). W skórze może stymulować prekursor, które syntetyzują HA *in vivo*. Poprzez zwiększenie stężenia endogennego HA, zarówno w skórze właściwej jak i w naskórku, może on wpływać na opóźnianie starzenia się skóry (229). Badania na zwierzętach wykazały istotną poprawę kulawości u koni, naprawę utraty kości u owariotomizowanych myszy, zmniejszenie wysięków stawowych u koni, łącznie z podwyższeniem poziomu HA w płynie maziowym (220). Badania ludzi z zastosowaniem samego HA (230) lub HA w kombinacji z innymi

czynnikami odżywczymi, przy czym obecność HA była podstawową zmienną (231) wykazały poprawę bólu i funkcji stawu u osobników z osteoarthritis. Co istotne, badania nad podawaniem doustnym wysokocząsteczkowego HA nie wykazały efektów prozapalnych, czego można się było spodziewać, jeśli HA ulegałby konwersji lub metabolizmowi do drobnych oligosacharydów. Chociaż efekty biologiczne po doustnym podaniu kwasu hialuronowego nie są bezpośrednim dowodem na jego absorpcję, można jednak przypuszczać, że prawdopodobny powód tych skutków związany jest z wychwytem tego czynnika do krążenia układowego i tkanek.

Przechodzenie doustnie podanego HA do krążenia układowego i przechodzenie do tkanek łącznych wydają się być normalnymi zjawiskami fizjologicznymi. Opisywano transport wysokocząsteczkowego kwasu hialuronowego do przestrzeni maziówkowych drogą naczyń limfatycznych (28,232), a także obserwowano jego obecność we krwi i innych płynach (28). Nieznakowany siarczan chondroityny wykrywano w ludzkim płynie maziowym kolana i osoczu po podaniu doustnym, wykazując że spożyte glikozaminoglikany mogą niezmiennie przedostać się do płynu maziowego (233).

Fakt, że naczynia limfatyczne mają zdolność wychwytu i transportu wysokocząsteczkowego HA, udowodnili w swoich badaniach Bręborowicz i wsp. (234) Podawali oni szczurom płyn do dializy otrzewnowej zawierający 10 mg/dl wysokocząsteczkowego HA (1,2 - 2,4 MDa). 25% HA ulegało absorpcji w ciągu 8 godzin, z mierzalnym podwyższeniem zawartości HA w śródmiąższu otrzewnej i krwi. Wyniki te sugerują, że wysokocząsteczkowy HA może przechodzić przez błonę otrzewnej i wnikać do krążenia. Wykazano, że dootrzewnowo podany HA może wnikać do krążenia drogą wyspecjalizowanych końcowych otworów limfatycznych (stomata) normalnie obecnych w podprzeponowej otrzewnej i także drogą wychwytu przez trzewne naczynia limfatyczne (234), co wprowadzałoby HA do układu limfatycznego.

W badaniach Balogh'a i wsp. (220) pojawienie się radioaktywności w tkankach wyprzedzało jej pojawienie się we krwi. Sugeruje to, że wychwyty i transport limfatyczny ^{99m}Tc - HA do tkanek obwodowych mogły zachodzić wstępnie, przed przedostaniem się do strumienia krwi czy to przewodem piersiowym, czy bezpośrednio. Wiadomo także, że HA w osoczu jest szybko wychwytywany i metabolizowany w wątrobie (28). Jednak poziomy radioaktywności tkanki wątrobowej były znikome lub brak ich było w obu grupach HA. To, łącznie z pojawianiem się radioaktywności w tkankach zanim pojawiła się we krwi sugeruje,

że HA dochodził do tkanek nie drogą transportu z krwią. Wychwyty i transport limfatyczny wyjaśnia te wyniki. Podobnie, naturalnie występujący w organizmie kwas hialuronowy jest transportowany przez osocze z jednej tkanki do drugiej. Nie obserwowanie zwiększonej ilości kwasu hialuronowego w wątrobie po jego doustnym podaniu jest korzystne dla skóry.

Z powyższych badań wynika, że istnieje racjonalna podstawa dla suplementacji kwasu hialuronowego w celu poprawy jakości skóry i stawów.

4.4 Preparaty stosowane zewnętrznie

Nawilżające kosmetyki pielęgnacyjne zawierają substancje przeciwdziałające utracie wody poprzez wiązanie jej w skórze lub ograniczenie jej utraty. Podstawowymi substancjami charakteryzującymi się zdolnością absorbowania wody są humektanty. Są to związki higroskopijne prowadzące do zwiększenia stopnia uwodnienia warstwy rogowej naskórka.

Jednym z najlepszych środków nawilżających i chroniących naskórek przed wysuszeniem jest kwas hialuronowy. Ma on zdolność wiązania dużej ilości wody. W kosmetologii stosowany jest zarówno w postaci wolnej, jak i w postaci soli sodowej (235). Jednak właściwości kwasu hialuronowego zależą w dużej mierze od jego masy cząsteczkowej. Masa cząsteczkowa przekraczająca 100 kDa uniemożliwia penetrację kwasu hialuronowego przez nieuszkodzony naskórek (235). Ponadto transportowi hydrofilowych cząsteczek kwasu hialuronowego przez bogatą w lipidy warstwę rogową naskórka nie sprzyja niewielka ilość wody w tej warstwie (ok. 20%) oraz brak powinowactwa HA do lipidów. W związku z powyższym kwas hialuronowy nie dociera do jego faktycznych miejsc działania w skórze właściwej i w naskórku. Zastosowanie go w kosmetykach pielęgnacyjnych nie doprowadza więc do organicznej naprawy nawilżenia skóry, a jego działanie polega głównie na tworzeniu warstwy okluzyjnej obniżającej przez naskórkową utratę wody. Ponadto kosmetyki z kwasem hialuronowym zwiększają odporność skóry na działanie czynników zewnętrznych, przez co chronią przed podrażnieniem a nawet alergizacją skóry. Mają również zdolność przekształcania substancji toksycznych takich jak metale ciężkie czy zanieczyszczenia przemysłowe, w łatwe do usunięcia, rozpuszczalne w wodzie połączenia. W kosmetologii kwas hialuronowy stosowany jest często jako swoisty promotor wchłaniania,

który ułatwia wprowadzanie innych składników kosmetyków w głąb skóry (235) oraz jako substancja zapobiegająca wysychaniu kosmetyków.

Mimo, że kwas hialuronowy jest nieimmunogeny, jego dopuszczalne stężenie w kosmetykach nie powinno przekraczać 2% (236). W praktyce w preparatach kosmetycznych najczęściej występuje 1% roztwór kwasu hialuronowego w ilości 1 – 5% (235). Niekiedy zamykany jest on w liposomach, które ułatwiają jego przenikanie w głąb naskórka (235).

5 Założenia i cel pracy

Wobec faktu, iż brak jest badań porównujących skuteczność preparatów kwasu hialuronowego stosowanych śródskórnie, zewnętrznie i doustnie, założeniem niniejszej pracy stała się ocena i porównanie wybranych preparatów kwasu hialuronowego. Nie istnieją również publikacje na temat możliwości przenikania do krwioobiegu kwasu hialuronowego podawanego śródskórnie i doustnie. Postanowiono więc przeanalizować ten problem, licząc na to że wyniki będą mogły być wykorzystane zarówno przez lekarzy zajmujących się dermatologią estetyczną, jak i diagnostyką chorób, w których kwas hialuronowy jest wykorzystywany jako ich marker.

Do przeprowadzenia badań wybrano trzy, działające za pomocą różnych mechanizmów, preparaty kwasu hialuronowego, przeznaczone do rewitalizacji skóry twarzy. Pierwszym preparatem był Ialest®. Jest to nieusieciowany preparat wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego do podawania śródskórnego. Drugim preparatem był suplement diety zawierający wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy o nazwie Hialu – Femin®. Trzeci preparat to krem z kwasem hialuronowym – Frei Hyaluron Aktiv® - do stosowania zewnętrznego na skórę twarzy. Preparaty wybrane do badania charakteryzowały się dużą cząsteczką kwasu hialuronowego, co czyniło je porównywalnymi.

Każdy z wykorzystanych preparatów, według producentów, ma zapewnić poprawę stanu skóry, zwiększyć jej napięcie, spłycić zmarszczki i poprawić nawilżenie. W pracy zadano sobie pytanie, która z dróg wprowadzenia kwasu hialuronowego do skóry jest najbardziej optymalna. W tym celu zaplanowano porównanie wpływu poszczególnych preparatów na nawilżenie i elastyczność skóry.

Ponadto analizowano możliwość przenikania do krwioobiegu preparatów kwasu hialuronowego podanych śródskórnie i doustnie. Jako kontrolę traktowano grupę stosującą krem z kwasem hialuronowym. Ustalenie czy, i w jakiej ilości kwas hialuronowy przechodzi do krwioobiegu jest potrzebne, ze względu na fakt iż substancje penetrujące do krwi mogą wywoływać działania ogólnoustrojowe. Kwas hialuronowy wytwarzany syntetycznie w teorii jest identyczny jak ten wytwarzany w organizmie, jednak mimo wszystko nie jest to substancja pochodzenia ludzkiego. Nie wiadomo też czy ingerencja w ilość kwasu hialuronowego w organizmie jest bez znaczenia dla jego funkcjonowania. Wiedza na temat przenikania kwasu hialuronowego do krwioobiegu jest ważna w przypadku m. in. pacjentek w

cięży. W chwili obecnej cięża jest przeciwwskazaniem do śródskórnego podawania kwasu hialuronowego, a w przypadku preparatów doustnych decyzja o ich suplementacji należy do lekarza.

Zbadanie możliwości przenikania kwasu hialuronowego do krwioobiegu jest szczególnie ważne od kiedy próbuje się wykorzystywać HA jako marker niektórych chorób stawów, wątroby oraz rozrostów nowotworowych. Starano się ustalić czy kwas hialuronowy podany śródskórnem lub doustnie może zaburzyć odczyt wyników poziomu tego kwasu jako markera. Należy bowiem mieć pewność, że intradermoterapia i suplementacja doustna kwasu hialuronowego nie zaburzają tego typu diagnostyki.

W badaniu analizowano też działania niepożądane zastosowanych terapii kwasem hialuronowym. Szeroko opisuje się zalety kwasu hialuronowego stosowanego w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikowanego zewnętrznie. W literaturze medycznej nie istnieją jednak żadne dobrze udokumentowane dane na temat bezpieczeństwa tych terapii.

Podsumowując, celem niniejszej pracy było:

1. Zbadanie stopnia poprawy nawilżenia, elastyczności i wyglądu ludzkiej skóry po zastosowaniu kwasu hialuronowego śródskórnem, doustnie i zewnętrznie.
2. Ocena stopnia przenikania do krwioobiegu kwasu hialuronowego stosowanego śródskórnem, doustnie i zewnętrznie.
3. Ocena działań niepożądanych kwasu hialuronowego stosowanego śródskórnem, doustnie i zewnętrznie

6 Materiał i metodyka

6.1 Materiał

Badania zostały przeprowadzone ogółem u 55 kobiet w wieku 26 – 68 lat. Średni wiek ochotników wynosił 44,5333. Badania przeprowadzono w Katedrze Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych oraz w Katedrze Farmakologii na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, a także na Oddziale Chorób Skóry Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu. Badania przeprowadzono w latach 2011 - 2013. Ochotnicy zostali podzieleni na trzy grupy: dwie dwudziestoosobowe i jedną piętnastoosobową. W każdej z grup preparaty kwasu hialuronowego wprowadzane były do organizmu odmiennymi drogami. W grupie pierwszej zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym, w grupie drugiej suplementację doustną kwasu hialuronowego, a w grupie trzeciej kwas hialuronowy aplikowano zewnętrznie na skórę. Jedynymi kryteriami włączenia do badania były: płeć żeńska oraz chęć poprawy nawilżenia swojej skóry przez ochotników. Probandzi zostali przydzieleni do poszczególnych grup na zasadzie randomizacji. Z badań wyłączono osoby niepełnoletnie oraz osoby spełniające kryteria wykluczenia z badania w poszczególnych grupach. Wszyscy ochotnicy zostali poinformowani o wskazaniach, przeciwwskazaniach oraz ewentualnych działaniach niepożądanych zastosowanych u nich terapii i podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu (załącznik 2 - 4). Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 7 stycznia 2010 wyraziła zgodę na przeprowadzenie wymienionych badań dla celów niniejszej pracy doktorskiej (załącznik 5).

6.1.1 Intradermoterapia kwasem hialuronowym

Intradermoterapię kwasem hialuronowym przeprowadzono w grupie 15 kobiet w wieku 30 – 66 lat. Średni wiek ochotników wynosił 43,6. Z badań wyłączono osoby niepełnoletnie oraz osoby spełniające kryteria wykluczenia z badania.

Kryteria wykluczenia z badania:

- nadwrażliwość na składniki preparatu (218),
- zaburzenia krzepnięcia (154),

- stosowanie antykoagulantów (bez możliwości odstawienia),
- przeciwwskazania do zastosowania środków znieczulających miejscowo (EMLA),
- alergia na chrom, nikiel (igły),
- ciąża i laktacja (8) (154),
- menstruacja,
- miejscowe procesy zapalne (218),
- miejscowa infekcja skóry (wirusowa, bakteryjna) (8) (218),
- leki immunosupresyjne (8),
- stosowanie miejscowego lub ogólnego leczenia w przebiegu ostatniego miesiąca (237),
- pacjenci stosujący w przebiegu 12 miesięcy przed badaniem tretinoinę/izotretinoinę, dermabrazję, laser (51),
- choroby tkanki łącznej w wywiadzie (8),
- cukrzyca (218),
- epilepsja (218),
- choroby wątroby, stawów oraz choroby nowotworowe,
- pacjenci nie wyrażający chęci powrotu w celu kontroli (154).

Preparat kwasu hialuronowego przeznaczony do intradermoterapii o nazwie Ialest® otrzymano od firmy Fenice sp. z o. o. Preparat jest bezbarwnym, apirogennym i wiskoelastycznym roztworem nieusieciowanego kwasu hialuronowego, przeznaczonym do infiltracji śródskórnych. W jego skład wchodzi: hialuronian sodu oraz chlorek sodu, dwunastowodny dwuwodorofosforan sodu, dwuwodny wodorofosforan sodu, woda do wstrzykiwań. Masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego wynosi 1000 kDa, a jego stężenie w preparacie 20 mg/ml. pH 7,2. Ialest® jest wyrobem medycznym klasy III i posiada certyfikat CE 0373. Preparat nie wymaga przechowywania w lodówce.

6.1.2 Suplementacja doustna kwasu hialuronowego

Suplementację doustną kwasem hialuronowym zastosowano w grupie 20 kobiet w wieku 31 – 52 lat. Średni wiek ochotników wynosił 42,05. Z badań wyłączone osoby niepełnoletnie oraz osoby spełniające kryteria wykluczenia z badania.

Kryteria wykluczenia z badania:

- nadwrażliwość na składniki preparatu,
- ciąża i laktacja,
- stosowanie miejscowego lub ogólnego leczenia w przeciągu ostatniego miesiąca (237),
- choroby tkanki łącznej w wywiadzie,
- pacjenci stosujący w przeciągu 12 miesięcy przed badaniem tretinoinę/izotretinoinę, dermabrazję, laser (51),
- choroby wątroby, stawów oraz choroby nowotworowe,
- pacjenci nie wyrażający chęci powrotu w celu kontroli.

Preparat kwasu hialuronowego przeznaczony do suplementacji doustnej o nazwie Hialu-Femin® otrzymano od firmy Holbex sp. z o. o. Jest to preparat wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego o masie cząsteczkowej przekraczającej 500 000 Da (500 kDa). Kwas hialuronowy otrzymywany jest metodą fermentacji mikrobiologicznej, co teoretycznie zapewnia wysokie bezpieczeństwo preparatu. Oprócz kwasu hialuronowego, w preparacie znajdują się: witamina C, proszek ryżowy (substancja wypełniająca), dwutlenek krzemu (nośnik), stearynian magnezu (substancja przeciwzbrylająca) oraz żelatyna. Szczegółową zawartość kwasu hialuronowego i witaminy C w 1 kapsułce preparatu przedstawiono w załączniku 6.

Hialu – Femin® jest preparatem w kapsułkach zawierających 50 mg wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Jest to największa ilość kwasu hialuronowego w kapsułkach dostępna na rynku. Jest ona ponad trzykrotnie większa w porównaniu z innymi preparatami (219).

Zalecane dzienne spożycie kwasu hialuronowego nie zostało ustalone. Producent zaleca stosowanie jednej kapsułki 1 – 3 razy dziennie. Efekty wg. producenta można zauważyć u niektórych osób już po niecałym miesiącu stosowania, a u wszystkich po 2 miesiącach stosowania (219).

Jak podaje producent, kapsułki Hialu – Femin® mają zdolność wiązania wody, przez co zatrzymują ją w skórze. Właśnie efekt nawilżający ma być podstawowym działaniem tych kapsułek. Poza tym mają one zwiększać elastyczność i jędrność skóry oraz spłycać drobne zmarszczki. Ponadto preparat powinien wspomagać regenerację skóry (odnawiać warstwę

rogową naskórką) oraz chronić przed działaniem wolnych rodników i promieniowaniem słonecznym (219). Według producenta jedynym przeciwwskazaniem do stosowania kapsułek kwasu hialuronowego jest nadwrażliwość na którykolwiek ze składników preparatu.

6.1.3 Aplikacja zewnętrzna kwasu hialuronowego

Zewnętrznie, stosowano kwas hialuronowy w grupie 20 kobiet w wieku 26 – 68 lat. Średni wiek ochotników wynosił 47,95. Z badań wyłączono osoby niepełnoletnie oraz osoby spełniające kryteria wykluczenia z badania.

Kryteria wykluczenia z badania:

- nadwrażliwość na składniki preparatu (237),
- ciąża i laktacja,
- choroby skóry twarzy (237),
- choroby tkanki łącznej w wywiadzie,
- stosowanie miejscowego lub ogólnego leczenia w przebiegu ostatniego miesiąca (237),
- pacjenci stosujący w przebiegu 12 miesięcy przed badaniem tretinoinę/izotretinoinę, dermabrazję, laser (237) (51),
- pacjenci nie wyrażający chęci powrotu w celu kontroli.

Preparat kwasu hialuronowego przeznaczony do aplikacji zewnętrznej o nazwie Frei Hyaluron Aktiv® otrzymano od firmy Miralex sp. z o. o. Krem bazuje na soli sodowej kwasu hialuronowego – hialuronianie sodu. Ponadto w swoim składzie zawiera: Glyceryl Stearate SE, Glycerin, Caprylic, Tocopheryl Acetate, Urea, Cetearyl Alkohol, Sodium Stearyl Glutamate, Niacinamide, Pantenol, Borago Officinalis Oil, Simmondsia Chinensis Oil, Sodium Hyaluronate, Phenoxythanol, Methylisothiazolinone, Carbomer, Alphaisomethylionone, Butylphenyl Methylpropional, Benzyl Salicylate, Citra, Citronellol, Geraniol, Hydroxyisohexyl-3-Cyclohexene Carboxaldehyde, Limonene, Linalool, Parfum, BHT. Szczegółowy skład kremu wraz z funkcjami jego poszczególnych składników przedstawiono w załączniku 7.

Według producenta aktywny kwas hialuronowy ma za zadanie „wypełniać” i spłycać zmarszczki. Pozostałe aktywne składniki mają chronić skórę przed zanieczyszczeniami środowiska (witamina E), uaktywniać metabolizm (witamina B3) oraz stabilizować barierę skóry (tłuszcze).

Producent zaleca stosowanie kremu raz lub kilkakrotnie w ciągu dnia, a podczas aplikacji sugeruje stosować delikatny masaż.

6.2 Metodyka badań

6.2.1 Badanie podmiotowe

U wszystkich 55 ochotników w pierwszym dniu badania przeprowadzono szczegółowe badanie podmiotowe. Obejmowało ono wywiad dotyczący ogólnego stanu zdrowia, chorób przewlekłych oraz stosowanych leków, kosmetyków, a także zabiegów wykonywanych w gabinetach kosmetologicznych i dermatologii estetycznej. Najwyższą uwagę przykładano do kryteriów wykluczenia z badania. W grupie zakwalifikowanej do serii zabiegów intradermoterapii kwasem hialuronowym oraz do stosowania kremu z kwasem hialuronowym miejscowe i ogólne infekcje oraz mikrourazy skóry były wskazaniem do przełożenia terminu rozpoczęcia badania. Szczególnie dokładnie zbierano wywiad w kierunku chorób wątroby, stawów i nowotworowych (w chorobach tych występuje podwyższony poziom kwasu hialuronowego w osoczu).

6.2.2 Metodyka terapii kwasem hialuronowym

6.2.2.1 *Intradermoterapia kwasem hialuronowym*

Intradermoterapię, preparatem kwasu hialuronowego o nazwie Ialest®, przeprowadzono u każdego z 15 ochotników trzykrotnie w przeciągu 5 tygodni trwania badania.

Przed każdym zabiegiem intradermoterapii, w celu przygotowania ochotników do zabiegu, postępowano według następującej procedury:

- nałożenie preparatu znieczulającego (krem EMLA – lidokaina + prylokaina) na skórę twarzy,
- nałożenie folii w celu wytworzenia okluzji i spotęgowania działania preparatu znieczulającego (60 minut),
- usunięcie folii i nadmiaru preparatu znieczulającego,
- dokładny demakijaż,

- odkażenie skóry twarzy preparatem antyseptycznym Octenisept (octenidyna, etanol),
- przemycie skóry twarzy solą fizjologiczną, w celu zapobiegania podrażnieniom przez preparat antyseptyczny.

Zabieg intradermoterapii wykonywano strzykawką napełnioną przez producenta roztworem kwasu hialuronowego. Podczas każdego z trzech zabiegów wstrzykiwano ochotnikowi 1 ml preparatu. Do iniekcji stosowano igły 30G, długości 13 mm. Podczas zabiegu zmieniano kilkakrotnie igłę, w celu zachowania jej ostrości i zniwelowania dolegliwości bólowych.

Kwas hialuronowy wprowadzono do skóry właściwej wykorzystując technikę depozytów, zwaną metodą grudkową lub techniką IDS (intradermalis superficialis – śródskórną powierzchowną). W tym celu wykonano liczne iniekcje śródskórne co ok. 0,5 cm, wprowadzając igłę pod kątem 30⁰ do powierzchni skóry (osiągając głębokość ok. 1 - 2 mm) i powodując powstanie niewielkich grudek, które pokryły całą powierzchnię zabiegową.

Ból podczas zabiegu był niewielki lub zupełnie nie występował (w zależności od progu bólowego ochotnika i ostrzykiwanej okolicy twarzy). Krwawienie było minimalne.

Po zabiegu twarz przemywano 0,9% NaCl. Na twarzy przez kilka godzin - dni utrzymywały się grudki, a przez kilka pierwszych godzin po zabiegu występował również niewielki rumień (Ryc. 2).



Rycina 2. Intradermoterapia kwasem hialuronowym skóry czoła.

6.2.2.2 *Suplementacja doustna kwasu hialuronowego*

Dwudziestu ochotników stosowało suplement diety zawierający kwas hialuronowy przez okres 6 tygodni. Przyjmowali go doustnie dwukrotnie w ciągu dnia (rano i wieczorem).

6.2.2.3 *Aplikacja zewnętrzna kwasu hialuronowego*

Dwudziestu ochotników stosowało krem z kwasem hialuronowym przez 6 tygodni trwania badania. Aplikowali oni krem Frei Hyaluron Aktiv® na skórę twarzy dwukrotnie w ciągu dnia (rano i wieczorem).

6.2.3 **Badanie przedmiotowe**

6.2.3.1 *Ocena kliniczna stanu skóry*

Ocena kliniczna stanu skóry twarzy przeprowadzana była w pierwszym i ostatnim dniu badania we wszystkich trzech grupach ochotników. Oceniano nawilżenie / suchość i elastyczność skóry twarzy oraz stopień korekty występujących na niej zmarszczek. Ponadto w ostatnim dniu badania analizowano poprawę estetycznego wyglądu skóry.

Nawilżenie skóry twarzy oceniane było niezależnie przez badacza i ochotnika według czterostopniowej zmodyfikowanej skali nawilżenia / suchości skóry (tabela 2) (238).

Tabela 2. Skala oceny nawilżenia / suchości skóry (238).

Skala oceny nawilżenia / suchości skóry	
Stopień	Charakterystyka
0	Brak suchości
1	Niewielka suchość bez złuszczenia
2	Znaczna suchość bez złuszczenia
3	Znaczna suchość ze złuszczeniem

W następnym etapie badania badacz i ochotnicy niezależnie oceniali elastyczność skóry twarzy. Do tego celu wykorzystywali trzystopniową skalę elastyczności skóry (tabela 3).

Tabela 3. Skala oceny elastyczności skóry. (239)

Skala oceny elastyczności skóry	
Stopień	Charakterystyka - czas odprężenia fałdu skóry poniżej zewnętrznego kąta oka
1	Bardzo dobra elastyczność – natychmiastowe odprężenie skóry
2	Średnia elastyczność – odprężenie < 10s (badacz wpisuje przybliżoną ilość sekund)
3	Brak elastyczności -odprężenie > 10s (badacz wpisuje przybliżoną ilość sekund)

Stopień korekty występujących na twarzy zmarszczek oceniano w ostatnim dniu badania na podstawie zmodyfikowanej czterostopniowej skali wykorzystanej w badaniu Duranti’ego i wsp. (tabela 4) (154). Oceny dokonywał niezależnie badacz i ochotnicy.

Tabela 4. Skala oceny poprawy na podstawie % uzyskanej korekcji zmarszczek (154).

Skala oceny poprawy na podstawie % uzyskanej korekcji zmarszczek	
Stopień	% uzyskanej korekcji
1	Brak poprawy
2	Niewielka poprawa (1-33% korekcji)
3	Umiarkowana poprawa (34-66% korekcji)
4	Znacząca poprawa (67-100% korekcji)

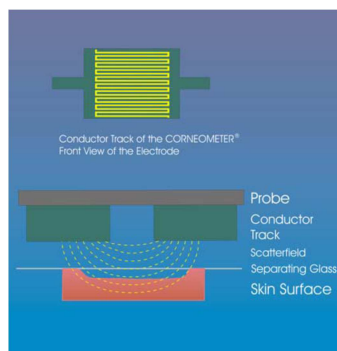
Ponadto w ostatnim dniu badania badacz i ochotnicy oceniali niezależnie efektywność (skuteczność) badania na podstawie pięciostopniowej subiektywnej skali GAIS (The Global Aesthetic Improvement Scale) (155) (tabela 5).

Tabela 5. Skala poprawy estetycznego wyglądu skóry GAIS (155).

Skala poprawy estetycznego wyglądu skóry GAIS	
Stopień	Charakterystyka – ocena stopnia poprawy
1	Znaczna poprawa
2	Umiarkowana poprawa
3	Niewielka poprawa
4	Brak zmian
5	Pogorszenie

6.2.3.2 Badanie nawilżenia skóry - corneometr

Nawilżenie skóry mierzone było za pomocą Corneometr'u® MPA5 (Courage – Khazaka Electronics MD). Corneometr określa poziom wilgotności naskórka poprzez pomiar pojemności elektrycznej. Zasadniczym elementem aparatu jest sonda, w której znajdują się 2 ścieżki metaliczne (Ryc. 3). Jedna ze ścieżek kumuluje nadwyżkę elektronów (ładunek ujemny), a druga ich brak (ładunek dodatni). Ścieżki oddzielone są od powierzchni skóry szklaną płytką. W chwili kontaktu głowicy z powierzchnią skóry przez górne warstwy naskórka przepływa zmienne pole elektryczne, którego wartość zależy od zawartości wody. Pozwala to na ocenę stanu nawilżenia skóry.



Rycina 3. Zasada działania Corneometru® MPA5.

Źródło: materiały informacyjne firmy Courage & Khazaka.

Stopień pojemności elektrycznej skóry podawany jest w specyficznym dla oprogramowania systemie jednostek. Pomiar przedstawia zawartość wody w warstwie rogowej naskórka na głębokości 20 nm (240).

Pomiary wykonywano u wszystkich ochotników przed rozpoczęciem terapii (intradermoterapii, suplementacji doustnej lub aplikacji zewnętrznej kwasu hialuronowego).

Kolejnego pomiaru dokonywano po zakończeniu podawania kwasu hialuronowego:

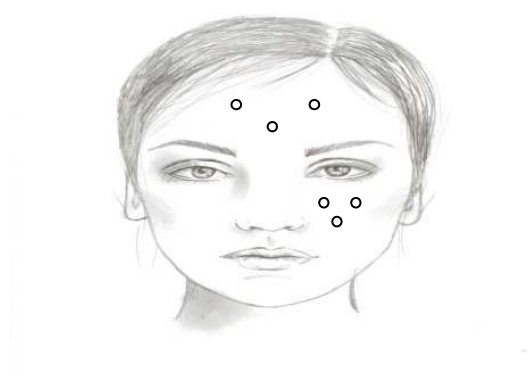
- 7 dni po trzecim zabiegu intradermoterapii kwasem hialuronowym (tj. po 6 tygodniach trwania badania),
- po 6 tygodniach suplementacji doustnej kwasu hialuronowego,
- po 6 tygodniach aplikacji zewnętrznej kwasu hialuronowego.

W celu uzyskania porównywalnych wyników, pomiarów dokonywano zawsze w tych samych warunkach:

- temperatura pomieszczenia: 20 - 22 °C,
- wilgotność względna: 40 – 60%,
- pomiar zawsze ze zbliżoną siłą nacisku i pionowym ustawieniem sondy,
- nie wykonywanie pomiarów w bezpośrednim świetle słonecznym lub świetle lampy.

Ochotnikom zalecono rezygnację z makijażu w dniu pomiaru oraz nie stosowanie kremów oraz preparatów myjących na 2 godziny przed badaniem. Badanie przeprowadzano między godziną 11.00 a 13.00, w celu wykluczenia dobowych wahań.

Pomiaru dokonywano po 10 minutowej aklimatyzacji. Sondę przykładano do skóry przez 1 sekundę pod ciśnieniem 1,1-1,5 N (240). Każdorazowo wykonywano 6 pomiarów: 3 na policzku lewym oraz 3 na czole, zgodnie z załączonym schematem (Ryc. 4). Wyniki podano w postaci wartości średnich obliczonych na podstawie pięciu kolejnych pomiarów. Zrezygnowano z pomiaru nawilżenia skóry dokonywanego poniżej kości jarzmowej. Brak podparcia kostnego dla sondy powodował, że uzyskiwane wyniki nie były powtarzalne. Ze względu na fakt, że mogły one zaburzyć wyniki badania, nie brano ich pod uwagę.

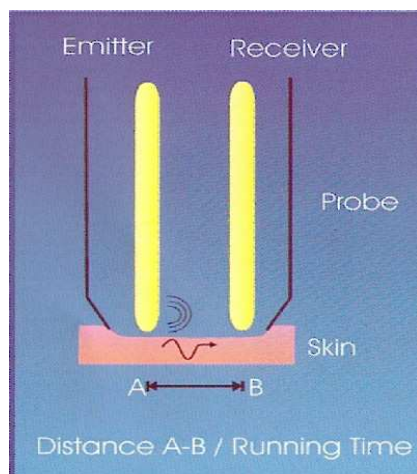


Rycina 4. Schemat przykładania sondy - corneometru.

Źródło: opracowanie własne

6.2.3.3 Badanie elastyczności skóry - reviscometr

Elastyczność skóry mierzono za pomocą Reviscometr'u MPA5 (Courage – Khazaka Electronics MD). Reviscometr określa elastyczność skóry poprzez pomiar czasu przebiegu rezonansu (RRT). Zasadniczym elementem aparatu jest sonda z dwoma igłowymi czujnikami, umieszczanymi na skórze (Ryc. 5). Jeden z czujników przekazuje akustyczną falę uderzeniową, drugi jest odbiornikiem. Aparat mierzy czas przejścia fali od nadajnika do odbiornika. Czas, w jakim puls akustyczny przechodzi z przetwornika do odbiornika określa się jako czas przebiegu rezonansu (RRT – Resonance Running Time) (241).



Rycina 5. Zasada działania Reviscometru® MPA5.

Źródło: materiały informacyjne firmy Courage & Khazaka.

Odległość między czujnikami i częstotliwość fali akustycznej określają głębokość penetracji. Reviscometer bada tkankę na głębokości kilkudziesięciu mikrometrów, umożliwiając pomiary mechanicznych parametrów naskórka i warstwy brodawkowatej skóry właściwej (241). Zastosowana częstość pulsów jest zakresu słyszalnego (4,5 kHz) (241). Szybkość dźwięku w materiale zależy od jego gęstości i napięcia. Mechaniczne wibracje przenoszą się szybciej w kierunku wyższego napięcia. Wartość RRT jest odwrotnie proporcjonalna do elastyczności skóry (242). Im dłuższy jest czas rozprzestrzeniania się fal w materiale, tym wyższa jest wartość pomiaru i tym mniej elastyczny jest materiał. Fale akustyczne wykazują zmienną prędkość biegnąc wzdłuż lub w poprzek włókien skóry.

Pomiary wykonywano u wszystkich ochotników przed rozpoczęciem terapii (intradermoterapii, suplementacji doustnej lub aplikacji zewnętrznej kwasu hialuronowego).

Kolejnego pomiaru dokonywano po zakończeniu podawania kwasu hialuronowego:

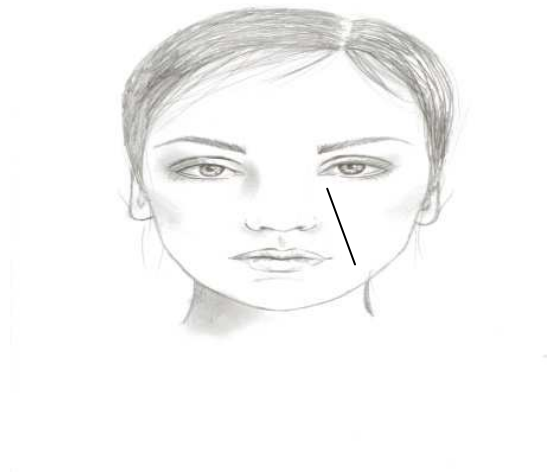
- 7 dni po trzecim zabiegu intradermoterapii kwasem hialuronowym (tj. po 6 tygodniach trwania badania),
- po 6 tygodniach suplementacji doustnej kwasu hialuronowego,
- po 6 tygodniach aplikacji zewnętrznej kwasu hialuronowego.

W celu uzyskania porównywalnych wyników, pomiarów dokonywano zawsze w tych samych warunkach:

- temperatura pomieszczenia: 20 - 22 °C,
- wilgotność względna: 40 – 60%,
- pomiar zawsze ze zbliżoną siłą nacisku i pionowym ustawieniem sondy,
- nie wykonywanie pomiarów w bezpośrednim świetle słonecznym lub świetle lampy.

Ochotnikom zalecono rezygnację z makijażu w dniu pomiaru oraz nie stosowanie kremów oraz preparatów myjących na 2 godziny przed badaniem. Badanie przeprowadzano między godziną 11.00 a 13.00, w celu wykluczenia dobowych wahań.

Pomiaru dokonywano po 10 minutowej aklimatyzacji. Pacjenci musieli przyjąć leżącą zrelaksowaną pozycję, co miało na celu ujednolicenie prędkości rozchodzenia się fal (wzrasta ona w zrelaksowanej pozycji ciała) (243). Sondę umieszczano na skórze policzka lewego i fiksowano za pomocą dwustronnego pierścienia samoprzylepnego, umieszczonego pomiędzy sondą a skórą (Ryc. 6). Wykonywano pomiary pod kątem 0/180°, 45/225°, 90/270° i 135/315°. Do oceny jędrności skóry używano wartości średniej (237). Ponadto oddzielnie analizowano wyniki dla pomiaru w ustawieniach Reviscometru 0° i 90° (244).



Rycina 6. Schemat przykładania sondy – reviscometru (ustawienie zgodne z liniami Langer'a).

Źródło: opracowanie własne

6.2.3.4 Ocena ilości kwasu hialuronowego w osoczu – test ELISA

Poziom kwas hialuronowy w osoczu oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA - Hyaluronic Acid Test Kit - firmy Corgenix.

Test ten oparty jest na technice jednoetapowej reakcji immunologicznej. Studzienki mikropłytek opłaszczane są wysoce specyficznymi białkami pochodzącymi z chrząstek bydlęcych, wiążącymi kwas hialuronowy (HABP) oraz HABP skoniugowanymi (wyznakowanymi) z odpowiednim enzymem w celu wykrywania kwasu hialuronowego w próbkach osocza ochotników. W celu obliczania wyników w ng/ml używane są roztwory referencyjne przygotowywane z kwasu hialuronowego pozyskiwanego z grzebieni kogucich.

Rozcieńczone (1/10) próbki i roztwory wzorcowe kwasu hialuronowego nakładano na mikropłytkę opłaszczoną HABP, co pozwalało na przyłączenia kwasu hialuronowego z próbek osocza lub wzorców do unieruchomionego HABP. Następnie studzienki przemywano w celu usunięcia cząsteczek niezwiązanego osocza, a do studzienek dodawano HABP związane z peroksydazą chrzanową, tzw. HRP - enzym stosowany w celu znakowania przeciwciał. Prowadziło to do powstania kompleksów ze związanym kwasem hialuronowym. Po kolejnym przemyciu, dodawano chromogeny substrat (TMB/H₂O₂), w celu otrzymania reakcji barwnej. Następnie do studzienek dodawano czynnik blokujący, tzw. STOP-REAGENT w celu przerywania reakcji i powstania ostatecznego wybarwienia kompleksów. Intensywność uzyskanego koloru mierzono w jednostkach gęstości optycznej (optical density units) za pomocą spektrofotometru przy długości fali 450 nm i fali referencyjnej 650 nm. Na podstawie próbek wzorcowych dostarczonych przez producenta (50, 100, 200, 500 i 800 ng/mL) wyznaczano krzywą wzorcową. Poziom kwas hialuronowy w próbkach obliczano poprzez porównanie absorbancji próbek względem wielopunktowej krzywej wzorcowej.

Charakterystykę Hyaluronic Acid Test Kit przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Charakterystyka Hyaluronic Acid Test Kit.

Zakres testu	10 – 800 ng / ml
Granica wykrywalności	10 ng / ml
Precyzja:	
Śródtestowa	4,2%
Międzytestowa	6,3%

Próg odcięcia dla kwasu hialuronowego, podawany przez firmę Corgenix, wynosi 75 ng/ml, z kolei średnie stężenie kwasu hialuronowego w populacji 28,5 ng/ml ze standardowym odchyleniem 24. Należy podkreślić, że test wykrywa wyłącznie cząsteczki kwasu hialuronowego składające się z minimum 20 powtarzających się jednostek (lub dimerów) kwasu (1, 4) glukuronowego i (1, 3) N – acetyloglukozaminy.

Poziom kwasu hialuronowego w osoczu określono we wszystkich trzech grupach ochotników (grupie poddanej intradermoterapii kwasem hialuronowym, otrzymującej suplementację doustną kwasu hialuronowego oraz stosującej kwas hialuronowy zewnętrznie). Grupę trzecią, czyli ochotników stosujących kwas hialuronowy zewnętrznie, traktowano jako kontrolę. Duża cząsteczka kwasu hialuronowego w kremie nie jest w stanie penetrować przez naskórek, a tym samym dostać się do krwioobiegu. Pierwszego pomiaru dokonano przed włączeniem wyżej wymienionych terapii, natomiast drugiego pomiaru:

- 24 godziny po trzecim zabiegu intradermoterapii kwasem hialuronowym (tj. po 5 tygodniach trwania badania),
- po 6 tygodniach suplementacji doustnej kwasu hialuronowego, w ostatni dzień przyjmowania preparatu,
- po 6 tygodniach stosowania kremu z kwasem hialuronowym, w ostatni dzień aplikacji kremu.

W celu uzyskania porównywalnych wyników, pomiarów dokonywano zawsze w tych samych warunkach:

- próbki krwi pobierano zawsze w tych samych godzinach: pomiędzy godziną 11.00 a 13.00,

- ochotników poproszono o unikanie wysiłku fizycznego w dniu badania,
- ostatni posiłek ochotnicy mogli spożyć na 2 godziny przed pobraniem krwi.

W celu wykonania pomiaru poziomu kwasu hialuronowego w osoczu, od ochotników pobierano krew do probówek z heparyną. W kolejnym etapie odwirowywano osocze w wirówce nastawianej na 400 obrotów na minutę. Osocze rozdzielano do dwóch probówek Eppendorfa w celu pozyskania zapasowego materiału do testu immunoenzymatycznego. Następnie odpowiednio oznakowane probówki Eppendorfa mrożono w temperaturze -70°C . Po zebraniu materiału od wszystkich ochotników materiał przekazano do Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, gdzie dokonano pomiarów zawartości kwasu hialuronowego w osoczu ochotników za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA firmy Corgenix (Hyaluronic Acid Test Kit).

6.2.4 Ocena ankietowa skuteczności preparatów kwasu hialuronowego przez ochotników

W ostatnim dniu badania ochotnicy zostali poproszeni o wypełnienie ankiety oceniającej zastosowaną u nich terapię kwasem hialuronowym (załącznik 8 – 10). Pytania w ankietach, oceniających wszystkie trzy drogi wprowadzania kwasu hialuronowego do organizmu, były identyczne lub bardzo podobne, w celu możliwości porównania odpowiedzi pomiędzy ochotnikami poszczególnych grup. Pytano o czas zauważenia pierwszych efektów zastosowanej terapii, palenie papierosów, ilość przyjmowanych płynów oraz działania niepożądane.

6.2.5 Metody analizy statystycznej wyników badań

Analizowane dane pochodziły z dwóch skal pomiarowych – interwałowej i nominalnej.

Porównania zmiennych powiązanych w skali interwałowej wykonano przy pomocy testu t-Studenta dla zmiennych powiązanych. W przypadku porównywania więcej niż dwóch grup jednocześnie zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W przypadku wykazania istotnych różnic, zastosowano testy post-hoc Tukey'a w celu wyznaczenia grup jednorodnych. Przed zastosowaniem powyższych analiz sprawdzono, czy analizowane dane

spełniają wymagane założenia tj. zgodność danych z rozkładem normalnym – test Shapiro-Wilka oraz jednorodność wariancji. Jednorodność wariancji w przypadku porównywania dwóch grup sprawdzano za pomocą testu Fishera-Snedecora, a w przypadku porównywania więcej niż dwóch grup jednocześnie zastosowano test Levene'a. W przypadku gdy wymagane założenia nie były spełnione, zastosowano test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Dunna.

Dane pochodzące ze skali nominalnej analizowano przy pomocy testu niezależności Chi-kwadrat lub w przypadku małych licznosci obserwowanych dokładnego testu Fishera-Freemana-Haltona. Dane jakościowe zostały przedstawione za pomocą procentów.

Badanie zależności pomiędzy analizowanymi zmiennymi ilościowymi dokonano przy pomocy współczynnika korelacji Pearsona. Istotność współczynników analizowano przy pomocy testu t-Studenta.

Analizy statystycznej dokonano przy pomocy pakietu statystycznego Statistica 8.0 (StatSoft) oraz pakietu StatXact v3.0(Cytel Software)

Wszystkie testy były analizowane na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

7 Wyniki

7.1 Struktura grup terapeutycznych

Ochotników biorących udział w badaniu przydzielono losowo do jednej z trzech grup terapeutycznych. W grupie pierwszej znalazło się 15 osób, którym wykonano serię zabiegów intradermoterapii nieusieciowanym, wielkocząsteczkowym kwasem hialuronowym. Grupa druga i trzecia liczyła po 20 osób. Ochotnicy z grupy drugiej przyjmowali doustnie preparat wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Ochotnicy z grupy trzeciej aplikowali na skórę krem z kwasem hialuronowym.

7.1.1 Porównanie grup terapeutycznych względem wieku

W badaniu wzięło udział 55 osób w wieku 26 – 68 lat. Średni wiek ochotników wynosił 44,53. Probandów przydzielono losowo do trzech grup badanych. Średni wiek w grupie 15 ochotników u których wykonano zabieg intradermoterapii nieusieciowanym kwasem hialuronowym wynosił 43.60. W grupach stosujących doustny preparat kwasu hialuronowego oraz krem z kwasem hialuronowym znajdowało się po 20 ochotników, a ich średni wiek wynosił odpowiednio 42.05 i 47,95 (Tab. 7).

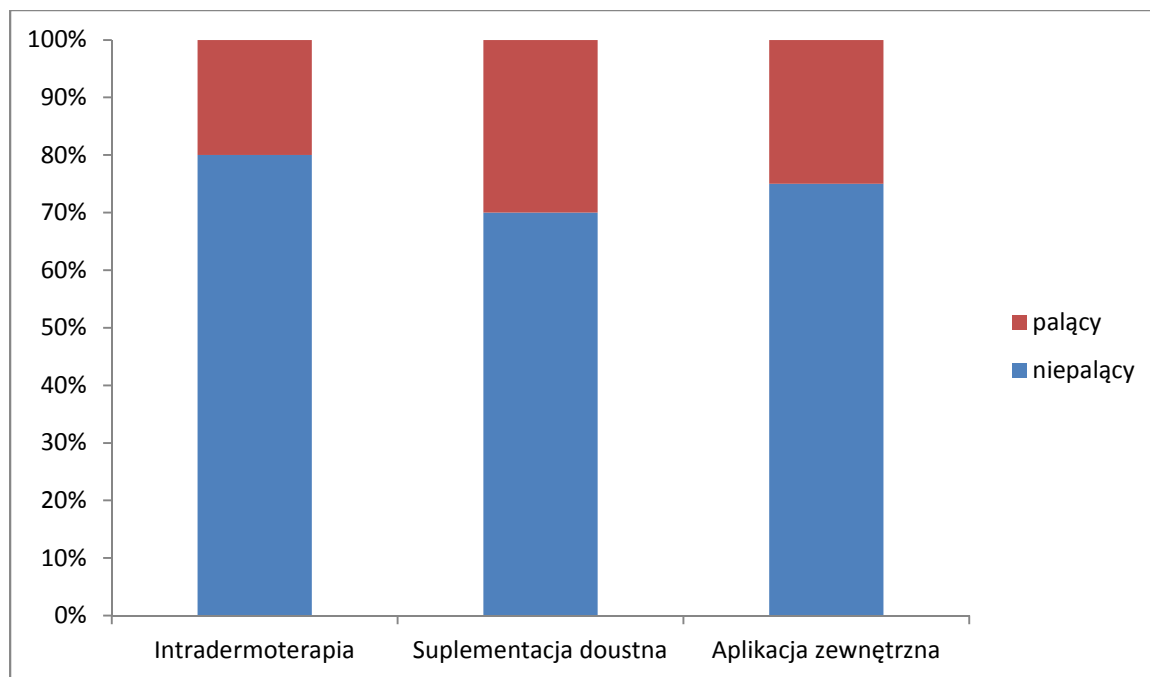
W teście nieparametrycznym Kruskala-Wallisa nie stwierdzono różnic pomiędzy poszczególnymi grupami.

Tabela 7. Porównanie grup terapeutycznych względem wieku.

Zmienna	L.ochotników (n)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Grupa - intradermoterapia						
wiek	15	43.60	39.00	30.00	66.00	11.93
Grupa – suplementacja doustna						
wiek	20	42.05	41.50	31.00	52.00	6.66
Grupa – aplikacja zewnętrzna						
wiek	20	47.95	54.50	26.00	68.00	13.23

7.1.2 Porównanie grup terapeutycznych względem palenia papierosów

Zdecydowana większość badanych nie paliła papierosów (załącznik 8 – 10, pytanie 6). W grupie w której zastosowano intradermoterapię papierosy paliło 20% ochotników, w grupie przyjmującej doustny preparat kwasu hialuronowego 30%, a w grupie stosującej krem 25% probantów (Ryc. 7).



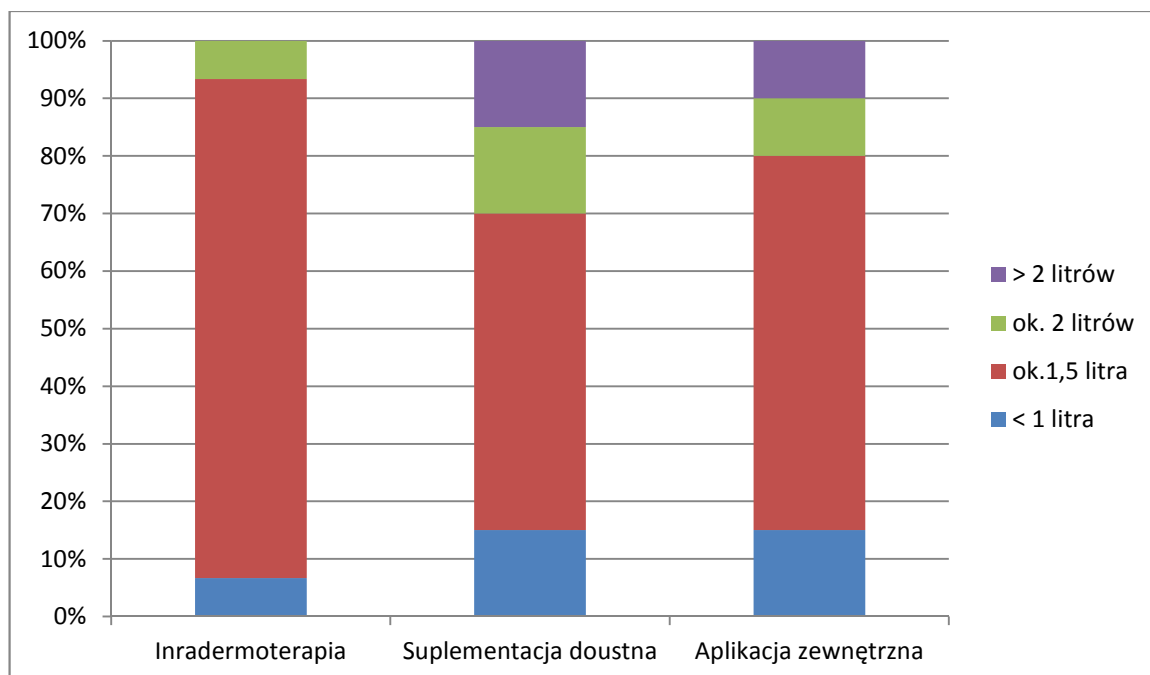
Rycina 7. Porównanie grup terapeutycznych względem palenia papierosów.

Ilość osób palących nie różniła się statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami terapeutycznymi (Chi2 Pearsona $p=0,80$).

7.1.3 Porównanie grup terapeutycznych względem ilości wypijanych płynów a dobę

Osoby badane w siódmym pytaniu ankiety (załącznik 8 - 10) podawały ilość wypijanych w ciągu doby płynów. W każdej badanej grupie większość badanych osób wypijała ok. 1,5 litra płynów na dobę. W grupie, w której zastosowano intradermoterapię 1,5 litra lub więcej płynów na dobę wypijało 93,33% probantów, w grupie przyjmującej doustny

preparat kwasu hialuronowego oraz w grupie stosującej krem równo po 85% probantów (Ryc. 8).



Rycina 8. Porównanie grup terapeutycznych względem ilości wypijanych płynów na dobę.

Ilość wypijanych płynów na dobę przez ochotników biorących udział w badaniu nie różniła się statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami terapeutycznymi (Chi2 Pearsona $p=0,59$).

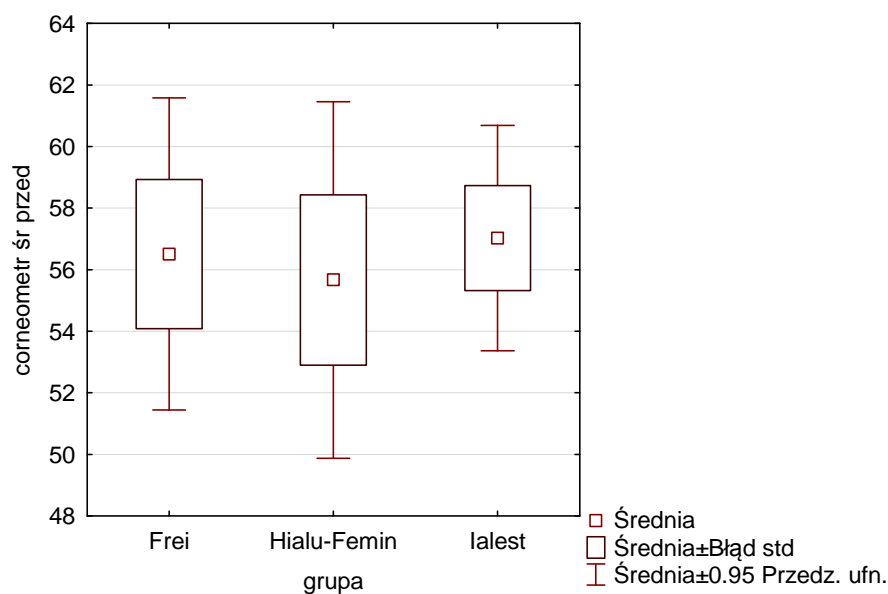
7.2 Ocena nawilżenia skóry w grupach terapeutycznych

Nawilżenie skóry twarzy ochotników określone było za pomocą corneometru. Ponadto zarówno probanci, jak i badacz określali nawilżenie skóry według czterostopniowej skali suchości skóry.

7.2.1 Pomiar corneometrem

Przy użyciu analizy wariancji sprawdzano, czy początkowy poziom nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych był zbliżony. Homogeniczność wariancji w poszczególnych grupach była podobna (test Levene'a, $p = 0.15$).

Średni początkowy poziom nawilżenia w grupie, w której zastosowano intradermoterapię wynosił 57.02 ± 6.61 , w grupie przyjmującej preparat doustny 55.66 ± 12.37 , a w grupie stosującej krem 56.51 ± 10.84 (Ryc. 9). Wartości wyjściowego poziomu nawilżenia skóry w testach post hoc nie różniły się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami.



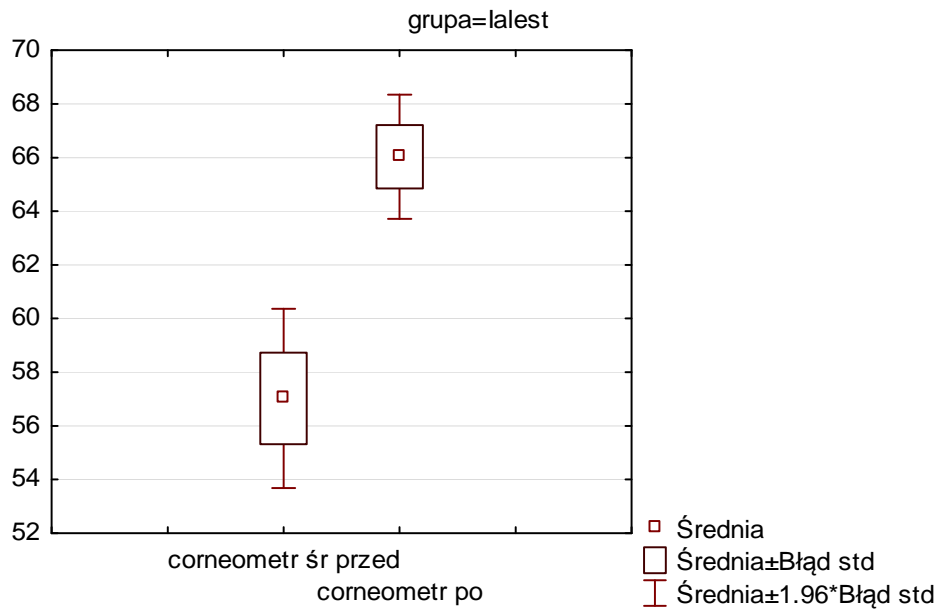
Rycina 9. Początkowy poziom nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych (corneometr).

Następnie przy pomocy testu t-studenta dla zmiennych powiązanych analizowano zmiany poziomu nawilżenia w poszczególnych grupach terapeutycznych.

Tabela 8. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

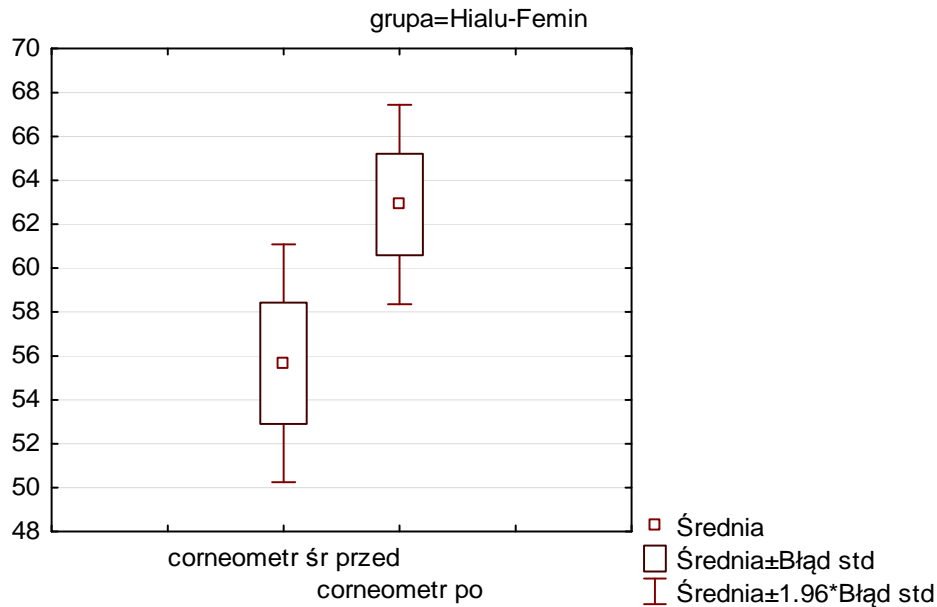
Corneometr	Liczba ochotników (n)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Intradermoterapia						
Początkowy poziom nawilżenia	15	57.02	55.47	46.37	70.25	6.61
Nawilżenie po 6 tygodniach	15	66.04	64.07	59.41	75.40	4.58
Suplementacja doustana						
Początkowy poziom nawilżenia	20	55.66	55.31	35.41	81.56	12.37
Nawilżenie po 6 tygodniach	20	62.90	61.88	47.11	79.36	10.36
Aplikacja zewnętrzna						
Początkowy poziom nawilżenia	20	56.51	55.94	28.88	76.20	10.84
Nawilżenie po 6 tygodniach	20	57.11	60.20	34.76	77.98	11.39

Nawilżenie skóry ochotników, u których zastosowano serię zabiegów intradermoterapii nieusieciowanym kwasem hialuronowym wzrosło z 57.02 ± 6.61 (na początku badania) do 66.04 ± 4.58 (na końcu badania), co jest różnicą statystycznie istotną (test t-studenta dla zmiennych powiązanych, $p = 0.00$) (Ryc. 10; Tab. 8).



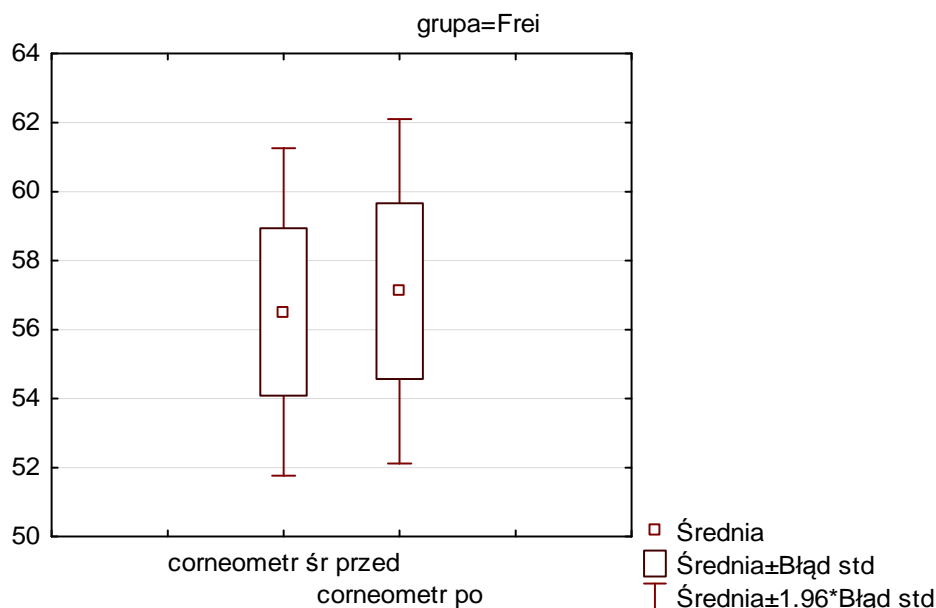
Rycina 10. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników, u których zastosowano intradermoterapię nieusieciowanym kwasem hialuronowym. Badanie corneometrem.

Nawilżenie skóry ochotników, którzy przyjmowali doustnie preparat wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego wzrosło z 55.66 ± 12.37 (na początku badania) do 62.90 ± 10.36 (na końcu badania), co jest różnicą statystycznie istotną (test t-studenta dla zmiennych powiązanych, $p = 0.00$) (Ryc. 11; Tab. 8).



Rycina 11. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników po zastosowaniu suplementacji doustnej wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Badanie corneometrem.

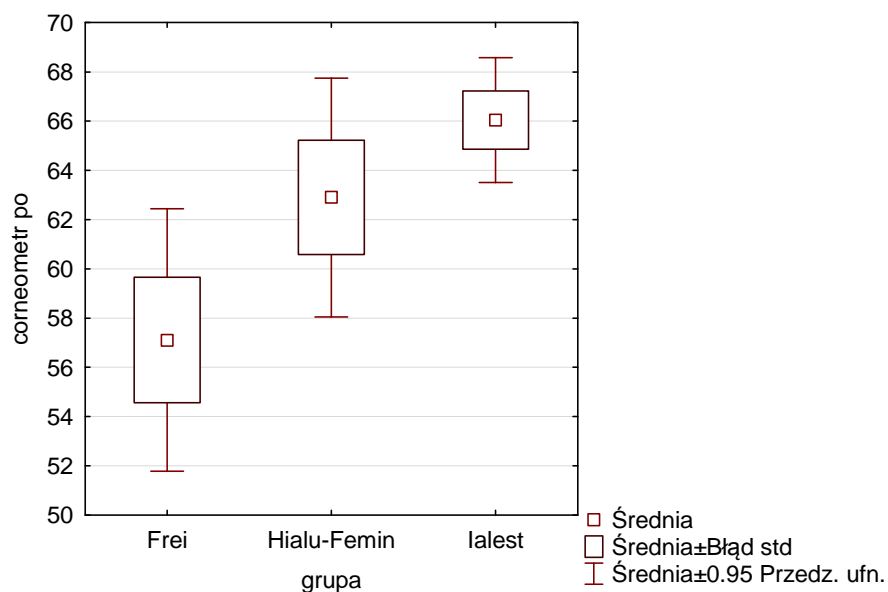
Nawilżenie skóry ochotników, którzy stosowali krem z kwasem hialuronowym wzrosło z 56.51 ± 10.84 (na początku badania) do 57.11 ± 11.39 (na końcu badania) (Ryc. 12; Tab. 8). Różnica ta nie była istotna statystycznie (test t-studenta dla zmiennych powiązanych, $p = 0.78$).



Rycina 12. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym. Badanie corneometrem.

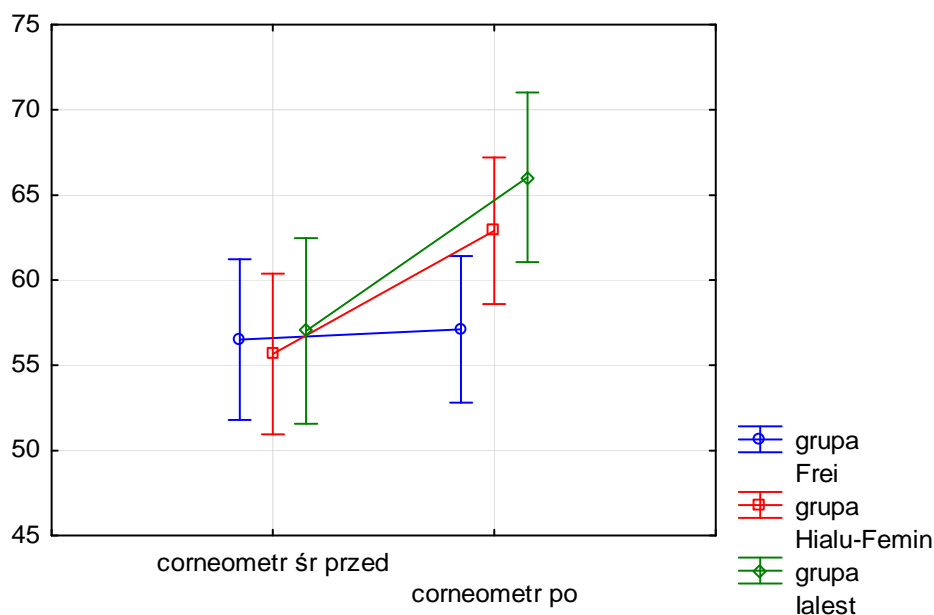
W ostatnim dniu badania analizowano różnice pomiędzy poziomem nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych. Wykorzystano do tego celu analizę wariancji oraz testy-post-hoc Tukey'a.

Średni końcowy poziom nawilżenia w grupie, w której zastosowano intradermoterapię wynosił w ostatnim dniu badania 66.04 ± 4.58 , w grupie przyjmującej preparat doustny 62.90 ± 10.36 , a w grupie stosującej krem 57.11 ± 11.39 (Ryc. 13). Wykazano istotną różnicę w poziomie nawilżenia pomiędzy poszczególnymi grupami (Anova, $p = 0,00$). Testy post-hoc wyłoniły dwie grupy jednorodne (grupa stosująca krem i preparat doustny) oraz (preparat doustny i intradermoterapię), zatem istotna różnica w końcowym poziomie nawilżenia wystąpiła pomiędzy osobami stosującymi krem a osobami, u których zastosowano intradermoterapię.



Rycina 13. Końcowy poziom nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

Po 6 tygodniach trwania badania zanotowano wzrost nawilżenia skóry twarzy w grupie poddanej intradermoterapii (o 9,01) oraz w grupie stosującej suplementację doustną (o 7,24). W grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym poziom nawilżenia nie uległ istotnej zmianie (wzrost o 0,60). Zmiany te przedstawiono na rycinie 14.



Rycina 14. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

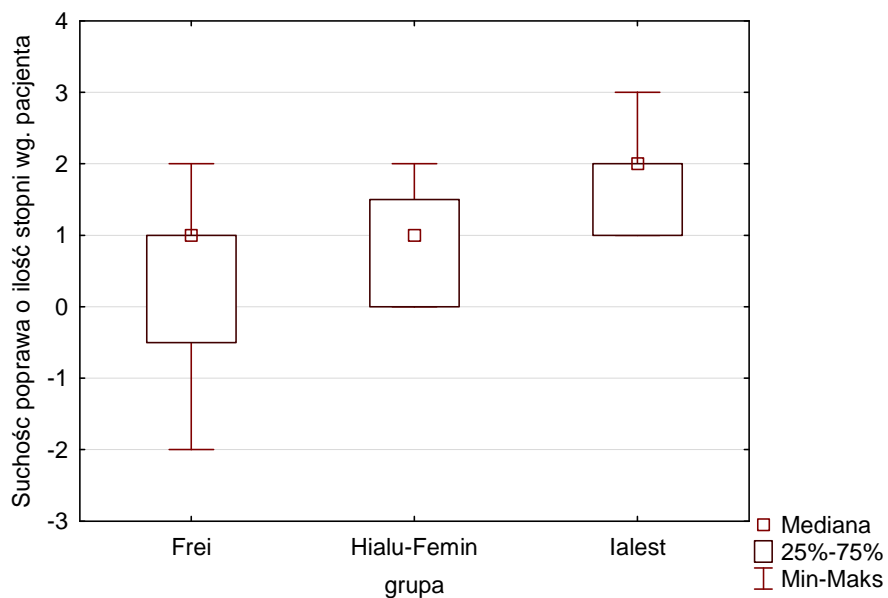
7.2.2 Skala suchości skóry – ocena ochotników.

Narzędziem za pomocą którego ochotnicy oceniali nawilżenie / suchość swojej skóry była czterostopniowa skala suchości skóry. Składała się ona z następujących odpowiedzi:

- 0 – brak suchości,
- 1 – niewielka suchość bez złuszczenia,
- 2 – znaczna suchość bez złuszczenia,
- 3 – znaczna suchość ze złuszczeniem

Do zbadania różnicy statystycznej pomiędzy stopniem poprawy nawilżenia / suchości skóry w poszczególnych grupach terapeutycznych wykorzystano Anovę Kruskala-Wallisa oraz testy post- hoc Dunna. Analiza wykazała istotne różnice w poziomie nawilżenia / suchości. Największą poprawę nawilżenia / suchości skóry twarzy zauważyli u siebie ochotnicy z grupy, w której zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym. Nawilżenie w ocenie ochotników poprawiło się istotnie w grupie poddanej intradermoterapii

kwasem hialuronowym w porównaniu zarówno do suplementacji doustnej ($p=0.04$), jaki i w porównaniu do grupy stosującej krem z kwasem hialuronowym ($p=0.00$) (Ryc. 15).



Rycina 15. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

Tabela 9. Nawilżenie / suchość skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na początku badania. Ocena ochotników według skali suchości.

Nawilżenie / suchość skóry, ocena ochotników na początku badania	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
0 (brak suchości)	-	-	3	15%	5	25%
1 (niewielka suchość bez złuszczenia)	4	26.67%	7	35%	9	45%
2 (znaczna suchość bez złuszczenia)	10	66.67%	7	35%	2	10%
3 (znaczna suchość ze złuszczeniem)	1	6.67%	3	15%	4	20%

Tabela 10. Nawilżenie / suchość skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na końcu badania. Ocena ochotników według skali suchości.

Nawilżenie / suchość skóry, ocena ochotników na końcu badania	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
0 (brak suchości)	14	93.33%	10	50%	7	35%
1 (niewielka suchość bez złuszczenia)	1	6.67%	9	45%	8	40%
2 (znaczna suchość bez złuszczenia)	-	-	1	5%	5	25%
3 (znaczna suchość ze złuszczeniem)	-	-	-	-	-	-

Tabela 11. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

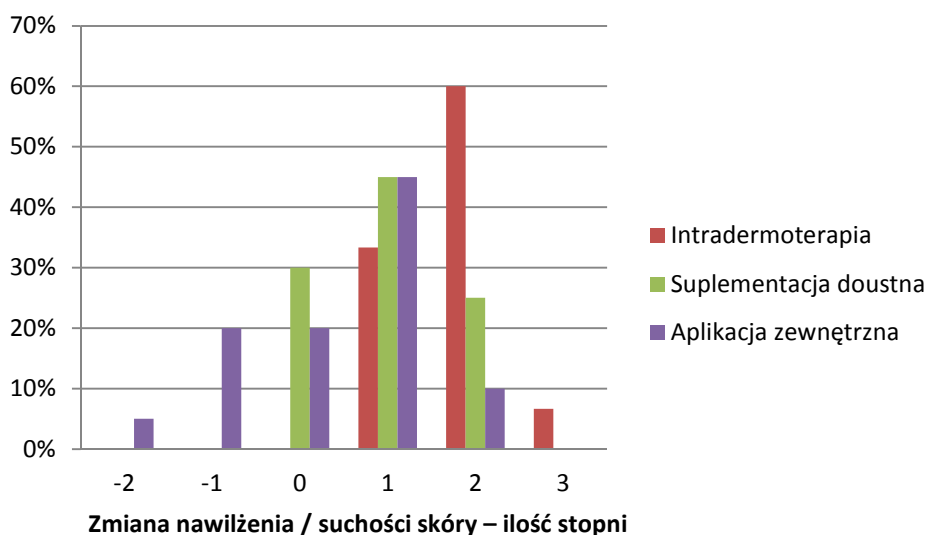
Zmiana nawilżenia / suchości skóry – ilość stopni	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
- 2					1	5%
- 1					4	20%
0			6	30%	4	20%
1	5	33.33%	9	45%	9	45%
2	9	60%	5	25%	2	10%
3	1	6.67%				

Wszyscy ochotnicy w grupie poddanej intraedrmoterapii zauważyli znaczną poprawę nawilżenia / suchości skóry twarzy. Większość z probantów zaznaczyła poprawę o 2 punkty (60%), a 33.33% o 1 punkt. Jeden ochotnik (6.67%) zauważył u siebie poprawę o 3 punkty.

Poprawę nawilżenia / suchości skóry twarzy zauważyła też większość ochotników przyjmujących kwas hialuronowy doustnie. Stopień poprawy był jednak niższy niż w poprzedniej grupie. Większość z probantów stosujących suplementację doustną zaznaczyła poprawę o 1 punkt (45%), a 25% zauważyło poprawę o 2 punkty. Dla 30% ochotników nawilżenie skóry nie uległo zmianie. Żaden z ochotników nie zauważył pogorszenia nawilżenia skóry.

W przeciwieństwie do dwóch poprzednich grup, część ochotników stosujących krem z kwasem hialuronowym zauważyło pogorszenie nawilżenia / suchości skóry twarzy o 1 stopień (20%). Drugie 20% ochotników zaznaczyło w ankiecie brak poprawy. Wśród ochotników, którzy zauważyli poprawę nawilżenia skóry, większość zaznaczyła poprawę o 1 punkt (45% wszystkich probantów stosujących krem z HA).

Zmiany poziomu nawilżenia / suchości skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych przedstawiono na rycinie 16 oraz w tabelach 9 - 11.

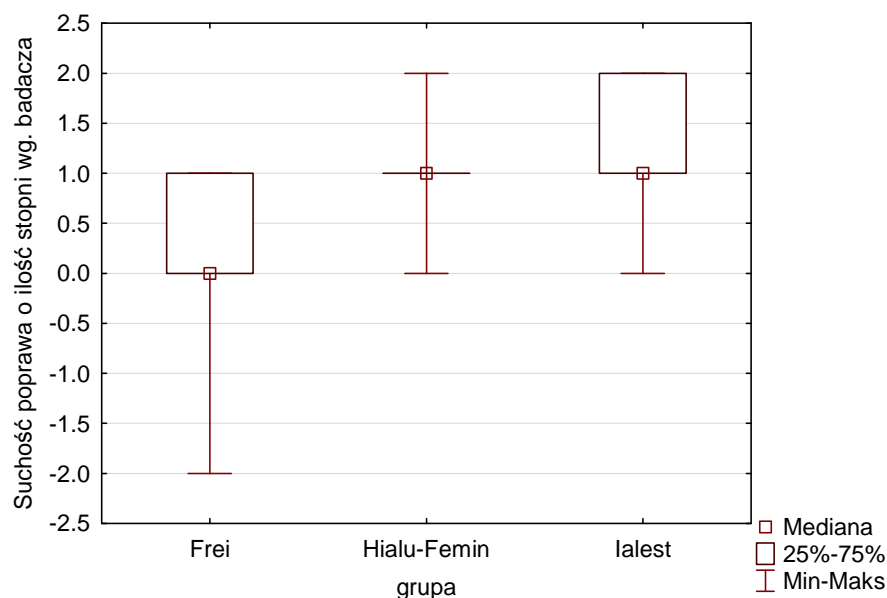


Rycina 16. Porównanie zmiany nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

7.2.3 Skala suchości skóry – ocena badacza.

Narzędziem za pomocą którego badacz oceniał nawilżenie / suchość skóry twarzy ochotników była, podobnie jak w przypadku oceny przez ochotników, czterostopniowa skala suchości skóry.

Nawilżenie w ocenie badacza poprawiło się istotnie w grupie w której zastosowano intradermoterapię w porównaniu do grupy stosującej krem z HA ($p = 0.00$). Równie dobre rezultaty uzyskano w grupie stosującej suplementację doustną w porównaniu do grupy stosującej krem ($p = 0.02$). Nie wykazano istotnej różnicy w poziomie nawilżenia między intradermoterapią a suplementacją doustną. Zmiany te przedstawiono na rycinie 17.



Rycina 17. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

Tabela 12. Nawilżenie / suchość skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na początku badania. Ocena badacza według skali suchości.

Nawilżenie / suchość skóry, ocena badacza na początku badania	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
0 (brak suchości)	1	6.67%	4	20%	4	20%
1 (niewielka suchość bez złuszczenia)	8	53.33%	10	50%	9	45%
2 (znaczna suchość bez złuszczenia)	5	33.33%	5	25%	6	30%
3 (znaczna suchość ze złuszczeniem)	1	6.67%	1	5%	1	5%

Tabela 13. Nawilżenie / suchość skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na końcu badania. Ocena badacza według skali suchości.

Nawilżenie / suchość skóry, ocena badacza na końcu badania	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
0 (brak suchości)	14	93.33%	16	80%	6	30%
1 (niewielka suchość bez złuszczenia)	1	6.67%	4	20%	7	35%
2 (znaczna suchość bez złuszczenia)	-	-	-	-	6	30%
3 (znaczna suchość ze złuszczeniem)	-	-	-	-	1	5%

Tabela 14. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

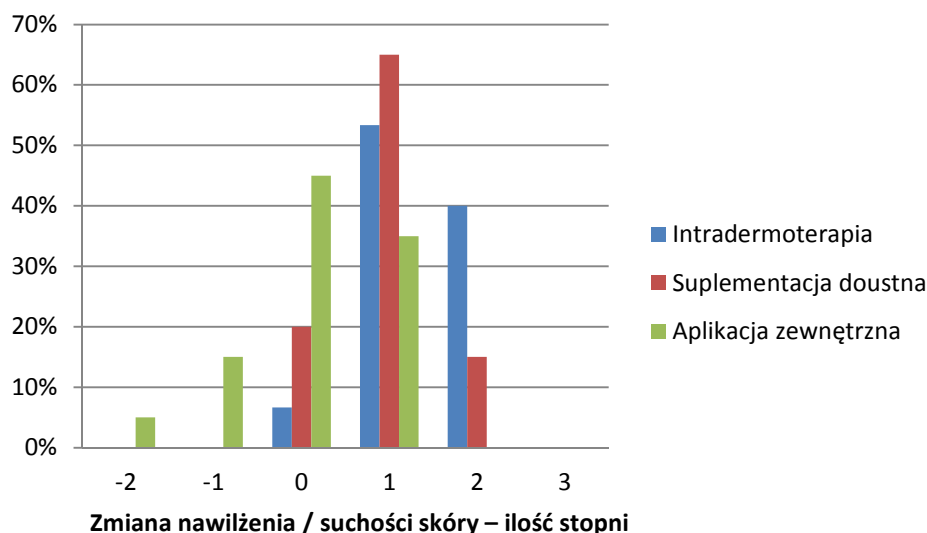
Zmiana nawilżenia / suchości skóry – ilość stopni	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
- 2	-	-	-	-	1	5%
- 1	-	-	-	-	3	15%
0	1	6.67%	4	20%	9	45%
1	8	53.33%	13	65%	7	35%
2	6	40%	3	15%	-	-
3	-	-	-	-	-	-

Według badacza największa poprawa nawilżenia / suchości skóry twarzy nastąpiła u ochotników, u których wykonano intradermoterapię nieusieciowanym kwasem hialuronowym. Poprawa o 1 punkt nastąpiła u 53.33% probantów, a u 40% nastąpiła poprawa o 2 punkty. U jednego ochotnika (6.67%) badacz nie zauważył żadnej poprawy.

Również w grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie, badacz u większości ochotników stwierdził poprawę nawilżenia / suchości skóry twarzy. Poprawa była jednak niższa, a u 20% ochotników badacz nie zauważył żadnej poprawy. Poprawa o 1 punkt nastąpiła u 65% probantów, a u 15% nastąpiła poprawa o 2 punkty.

W przeciwieństwie do dwóch poprzednich grup, badacz zauważył pogorzenie u 20% ochotników stosujących krem z kwasem hialuronowym, a u 45% ochotników nie zauważył żadnej poprawy. Poprawę o 1 punkt nastąpiła według badacza u 35% probantów stosujących krem z kwasem hialuronowym.

Zmiany poziomu nawilżenia / suchości skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych przedstawiono na rycinie 18 oraz w tabelach 12 - 14.



Rycina 18. Porównanie zmiany nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

7.3 Ocena elastyczności skóry w grupach terapeutycznych

Elastyczność skóry twarzy ochotników mierzona była za pomocą reviscometru. Ponadto zarówno probanci, jak i badacz określali elastyczność skóry według trzystopniowej skali elastyczności skóry.

7.3.1 Pomiar reviscometrem

Elastyczność skóry twarzy ochotników określana była za pomocą reviscometru. Mierzy on wartość RRT (Resonance Running Time) – czyli czas przebiegu rezonansu. Zależność elastyczności skóry od RRT jest odwrotnie proporcjonalna. Tym większa elastyczność skóry, im mniejsza wartość RRT. W badaniu brano pod uwagę trzy pomiary: dla 0° , 90° oraz wartość średnią.

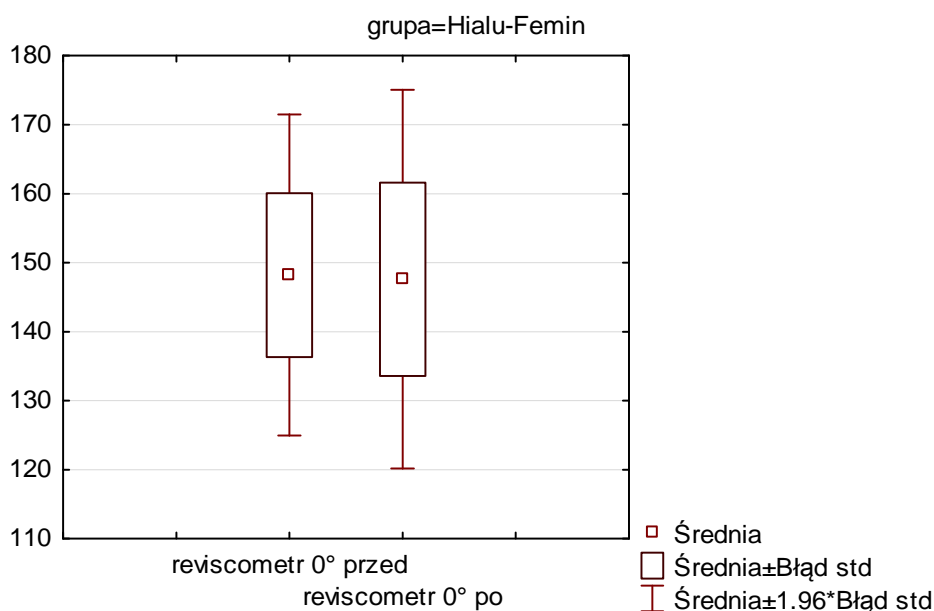
Przy pomocy testu t-studenta dla zmiennych powiązanych analizowano zmiany elastyczności skóry twarzy w wyniku zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych.

Tabela 15. Zmiana wartości RRT pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie reviscometrem.

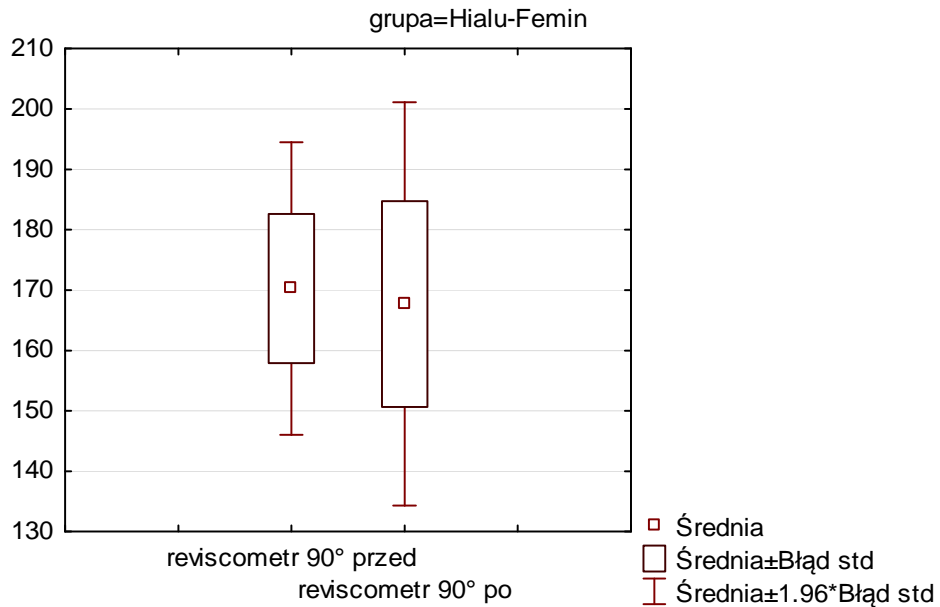
Reviscometr	Liczba ochotników (n)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Intradermoterapia						
0° początkowy poziom	- 15	138.93	130.00	86.00	215.00	37.04
0° - poziom po 6 tygodniach	15	177.80	151.00	91.00	339.00	76.45
90° początkowy poziom	- 15	170.53	162.00	98.00	251.00	51.59
90° - poziom po 6 tygodniach	15	194.53	196.00	108.00	298.00	57.25
Średnia początkowy poziom	- 15	183.60	160.00	98.75	369.75	72.51
Średnia poziom po 6 tygodniach	- 15	192.52	164.75	99.00	403.50	87.51

Suplementacja doustna							
0⁰	-	20	148.20	130.50	67.00	253.00	53.09
początkowy							
poziom							
0⁰ - poziom po		20	147.60	134.00	91.00	316.00	62.63
6 tygodniach							
90⁰	-	20	170.25	169.00	88.00	270.00	55.25
początkowy							
poziom							
90⁰ - poziom		20	167.70	159.00	97.00	431.00	76.24
po		6					
tygodniach							
Średnia	-	20	174.45	181.25	79.25	281.50	60.13
początkowy							
poziom							
Średnia	-	20	165.36	157.25	97.25	290.50	57.82
poziom po		6					
tygodniach							
Aplikacja zewnętrzna							
0⁰	-	20	232.35	224.00	117.00	532.00	110.12
początkowy							
poziom							
0⁰ - poziom po		20	228.85	198.00	120.00	497.00	109.39
6 tygodniach							
90⁰	-	20	351.05	368.50	98.00	537.00	137.37
początkowy							
poziom							
90⁰ - poziom		20	324.60	307.50	163.00	573.00	121.17
po		6					
tygodniach							
Średnia	-	20	305.42	310.87	120.75	532.25	103.64
początkowy							
poziom							
Średnia	-	20	286.37	271.00	160.00	456.75	81.93
poziom po		6					
tygodniach							

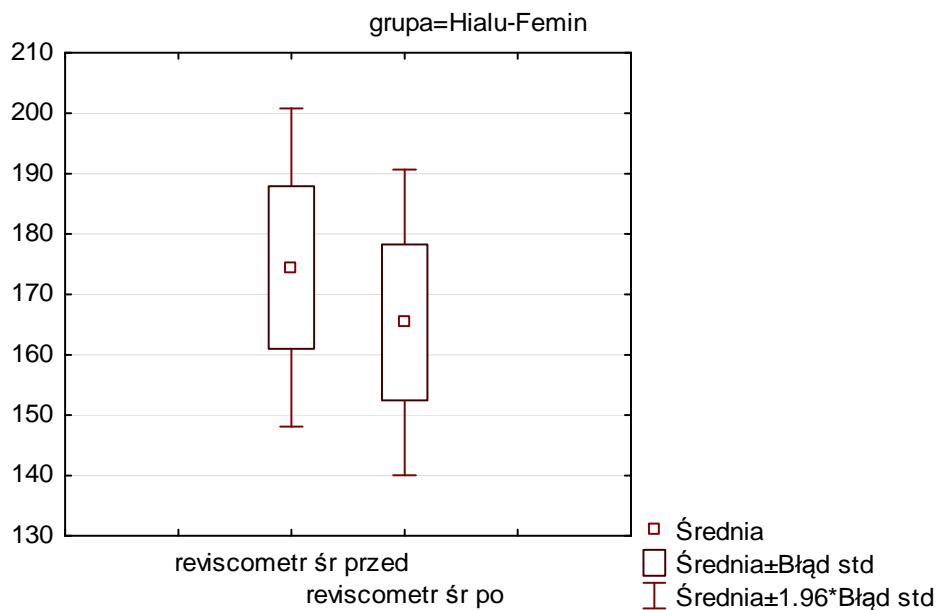
Zmiany poziomu wartości mierzonych rewisometrem dla 0^0 , 90^0 oraz wartości średnich były statystycznie nieistotne zarówno dla grupy stosującej suplementację doustną (p wynosiło odpowiednio $p=0.82$, $p=0.90$ i $p=0.56$), jak i dla grupy stosującej krem z kwasem hialuronowym ($p = 0.97$, $p=0.26$ i $p=0.16$). Zmiany wartości RRT w grupie stosującej suplementację doustną kwasem hialuronowym przedstawiono na rycinach 19 – 21 oraz w tabeli 15. Z kolei na rycinach 22 – 24, a także w tabeli 15 przedstawiono zmiany wartości RRT w grupie stosującej krem.



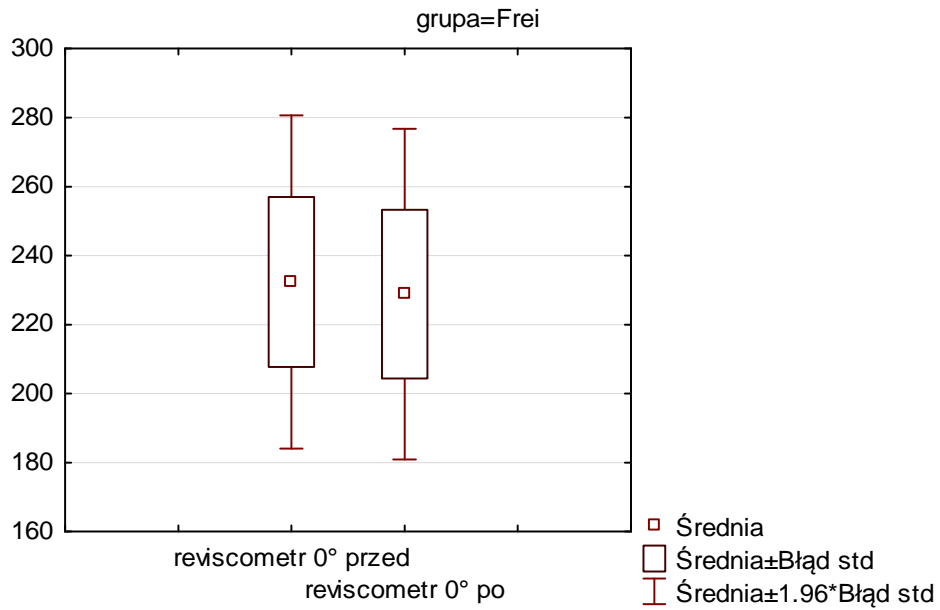
Rycina 19. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych rewisometrem dla 0^0 po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.



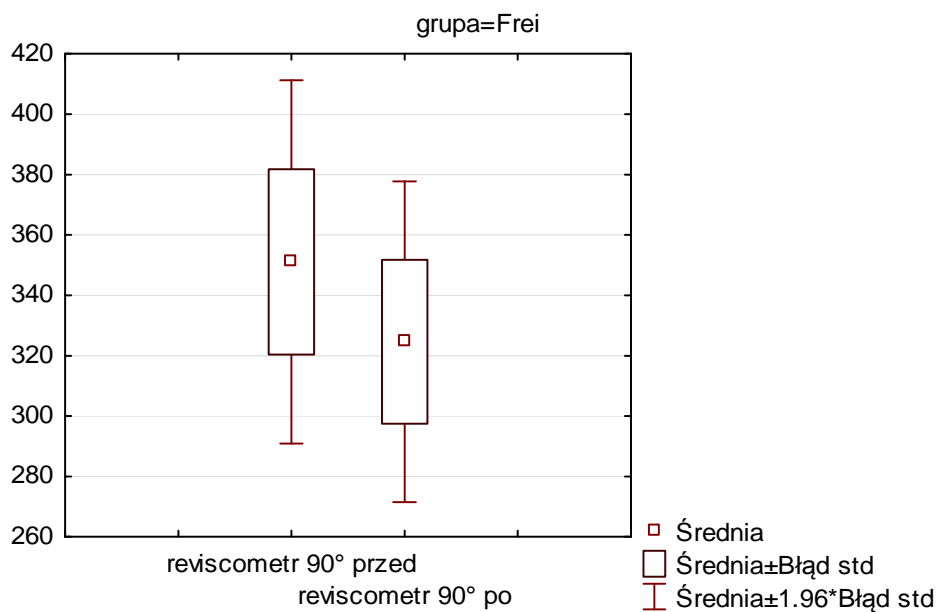
Rycina 20. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90° po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.



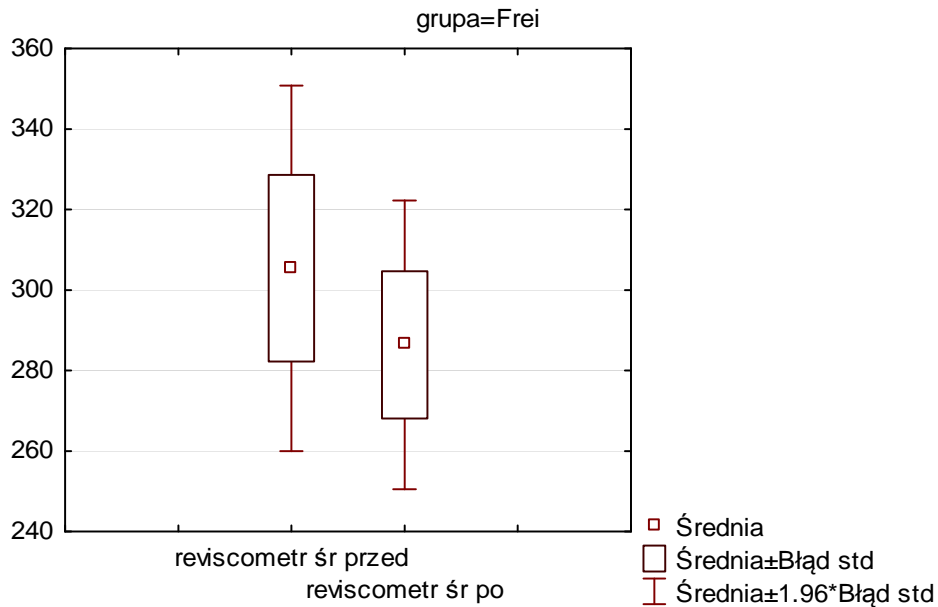
Rycina 21. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.



Rycina 22. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0° po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

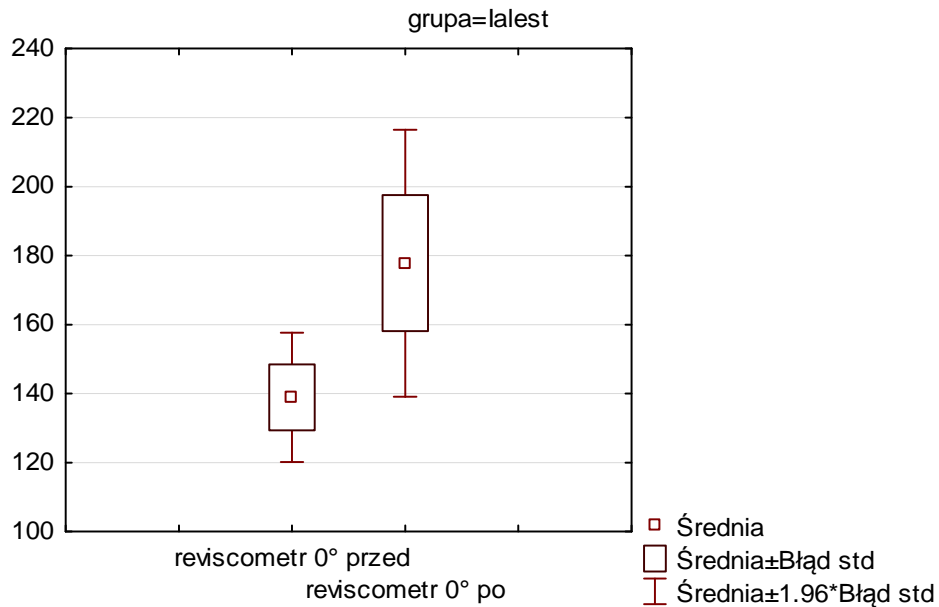


Rycina 23. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90° po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

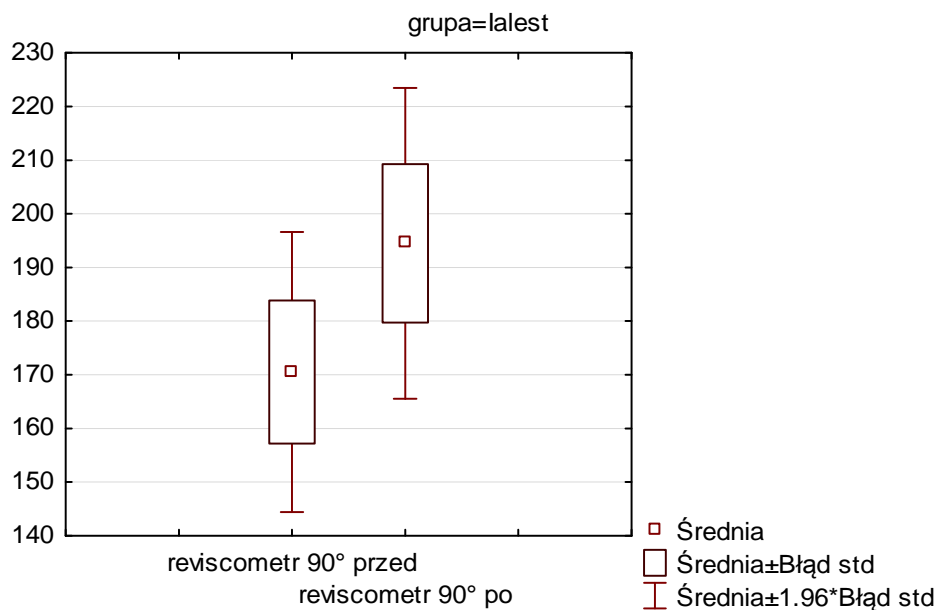


Rycina 24. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

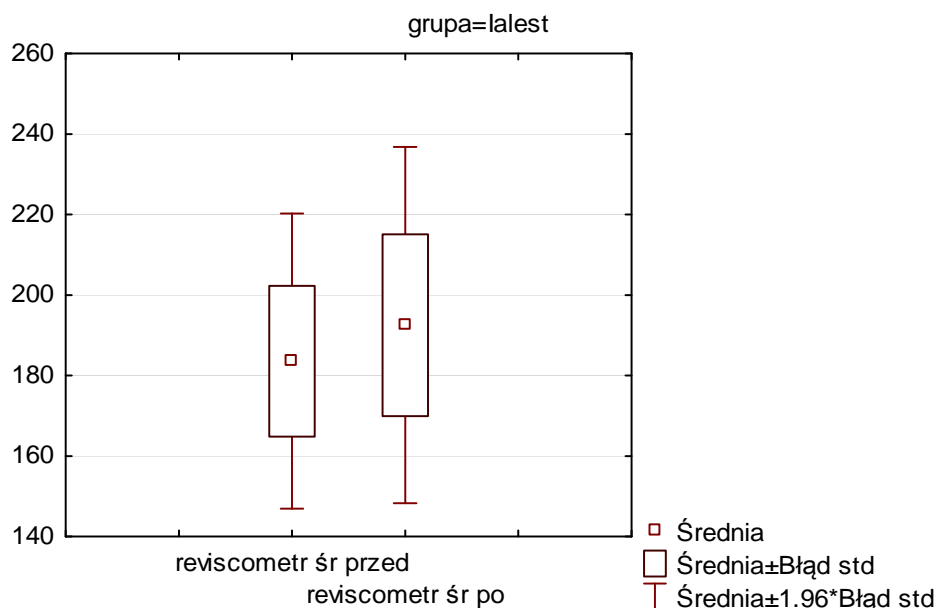
W grupie poddanej intradermoterapii kwasem hialuronowym, zmiany poziomu wartości mierzonych reviscometrem były statystycznie istotne jedynie dla 0^0 ($p = 0.03$) (Ryc. 25). Dla pozostałych pomiarów zmiany wartości nie były znaczące: dla 90^0 $p = 0.06$ (Ryc. 26), a dla wartości średniej $p = 0.41$ (Ryc. 27). Wartości RRT przedstawiono w tabeli 15.



Rycina 25. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0° po serii zabiegów intradermoterapii kwasem hialuronowym.



Rycina 26. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90° po serii zabiegów intradermoterapii kwasem hialuronowym.

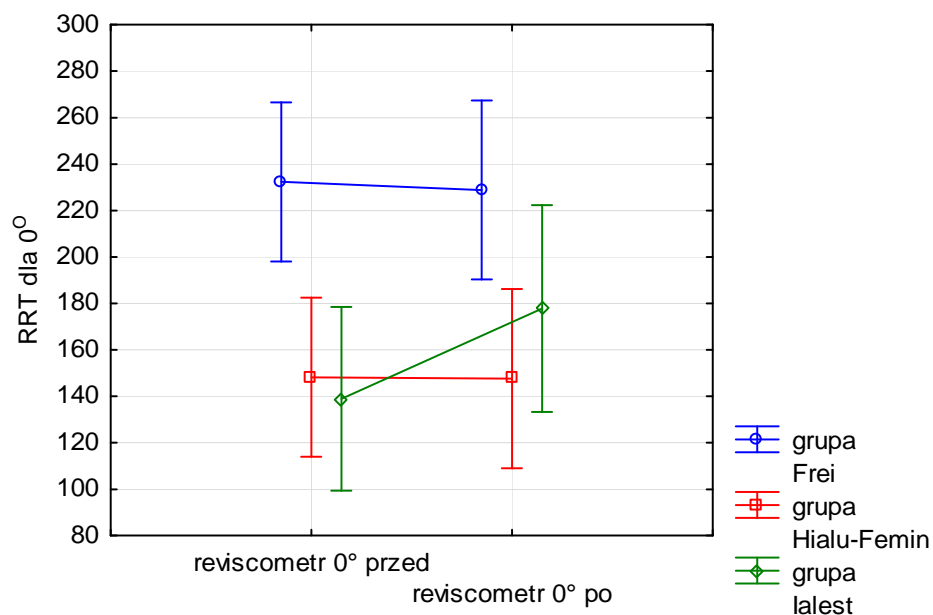


Rycina 27. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po serii zabiegów intradermoterapii kwasem hialuronowym.

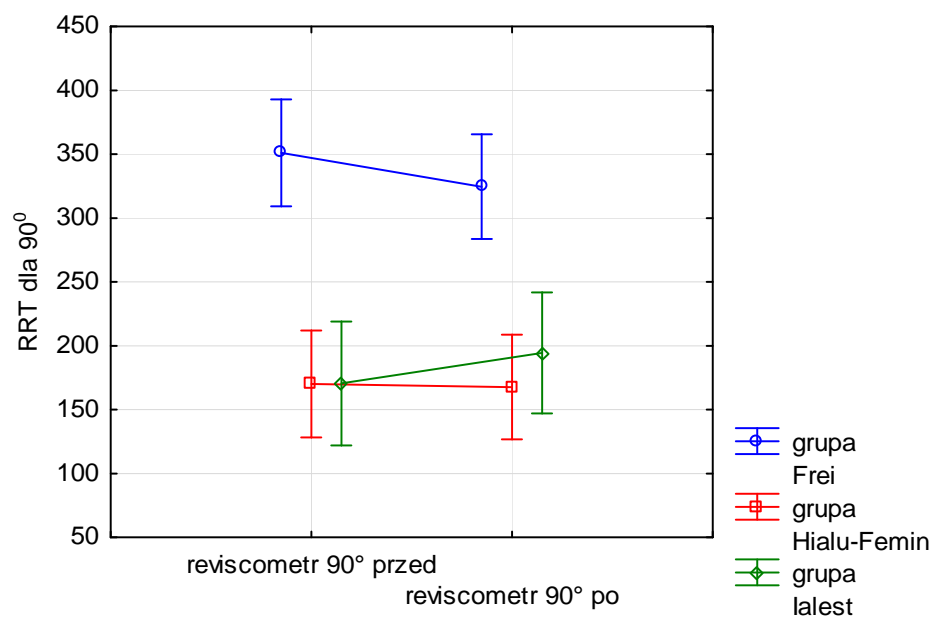
Po 6 tygodniach trwania badania zanotowano statystycznie istotną zmianę RRT tylko dla 0^0 w grupie poddanej intradermoterapii (wzrost o 38,87). W grupie przyjmującej suplementację doustną oraz w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym zanotowano dla 0^0 nieistotny spadek RRT, odpowiednio o 0,6 i 3,5 (Ryc. 28).

Dla 90^0 nie zanotowano istotnych zmian w żadnej z badanych grup. W grupie poddanej intradermoterapii, RRT wzrosło o 24, z kolei w grupach stosujących suplementację i krem zmalały odpowiednio o 2,55 i 26,45 (Ryc. 29).

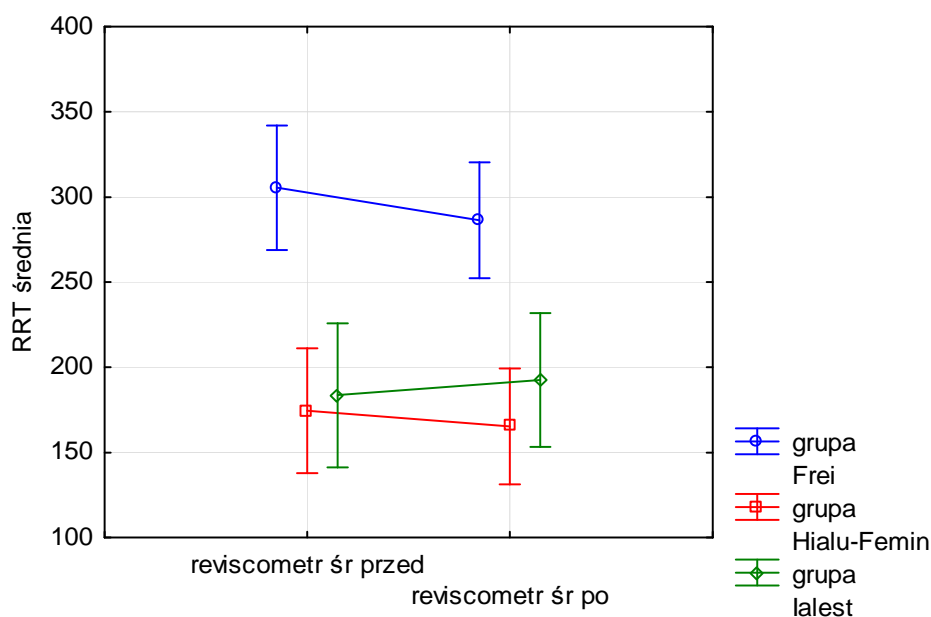
Również wartości średnie RRT nie zmieniły się istotnie w żadnej z grup. W grupie poddanej intradermoterapii RRT wzrosło o 8,92. W pozostałych grupach terapeutycznych RRT zmalało: w grupie stosującej suplementację doustną o 9,09, a w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym o 19,05 (Ryc. 30).



Rycina 28. Porównanie zmian poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0° pomiędzy grupami terapeutycznymi.



Rycina 29. Porównanie zmian poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90° pomiędzy grupami terapeutycznymi.



Rycina 30. Porównanie zmian poziomu wartości średniej RRT pomiędzy grupami terapeutycznymi.

7.3.2 Skala elastyczności skóry – ocena ochotników

Narzędziem za pomocą którego ochotnicy oceniali elastyczność swojej skóry była trzystopniowa skala elastyczności skóry. Składała się ona z następujących odpowiedzi:

- 0 – bardzo dobra elastyczność,
- 1 – średnia elastyczność,
- 2 – brak elastyczności.

Analizując wszystkie grupy terapeutyczne, stwierdzono że w ocenie ochotników największą poprawę elastyczności skóry twarzy zauważyli u siebie ochotnicy z grupy, w której zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym (test Fishera – Freemana – Haltona $p < 0,00$). Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 16.

Większość ochotników w grupie poddanej intradermoterapii zauważyło poprawę elastyczności skóry o 1 punkt (73.33%), a 26.67% probantów nie zauważyło zmian w elastyczności swojej skóry.

W dwóch pozostałych grupach terapeutycznych ochotnicy nie widzieli praktycznie żadnej poprawy elastyczności skóry twarzy. W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie, poprawę elastyczności skóry o 1 punkt zauważyła u siebie tylko jedna osoba (5%), natomiast w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym 100% ochotników nie widziało u siebie żadnego pozytywnego wpływu zastosowanej terapii na elastyczność skóry.

Tabela 16. Zmiana elastyczności skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali elastyczności.

Zmiana elastyczności skóry – ilość stopni	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
0	4	26.67%	19	95%	20	100%
1	11	73.33%	1	5%	-	-

7.3.3 Skala elastyczności skóry – ocena badacza.

Narzędziem za pomocą którego badacz oceniał elastyczność skóry twarzy ochotników była, podobnie jak w przypadku oceny przez ochotników, trzystopniowa skala elastyczności skóry.

Analizując wszystkie grupy terapeutyczne, stwierdzono że badacz największą poprawę elastyczności skóry twarzy zauważył w grupie, w której zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym (test Fishera – Freemana – Haltona , $p=0.00$). Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 17.

U 40% ochotników z tej grupy badacz zanotował poprawę o 1 punkt. W pozostałych grupach terapeutycznych badacz nie zanotował praktycznie żadnej poprawy elastyczności skóry. W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie, badacz zauważył poprawę tylko u jednej osoby (5%). Z kolei w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym badacz nie widział poprawy elastyczności skóry u żadnego z ochotników.

Tabela 17. Zmiana elastyczności skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali elastyczności.

Zmiana elastyczności skóry – ilość stopni	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
	0	9	60%	19	95%	20
1	6	40%	1	5%		

7.4 Ocena korekty zmarszczek w grupach terapeutycznych

7.4.1 Korekta zmarszczek – ocena ochotników

Wszyscy ochotnicy oceniali % korekty zmarszczek za pomocą 4 – stopniowej skali składającej się z następujących odpowiedzi:

- 1 - brak poprawy,
- 2 - niewielka poprawa (1-33% korekcji),
- 3 - umiarkowana poprawa (34-66% korekcji),
- 4 - znacząca poprawa (67-100% korekcji).

Analizując wszystkie grupy terapeutyczne, stwierdzono że największy % korekcji zmarszczek zauważyli u siebie ochotnicy z grupy, w której zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym (test Fishera – Freemana – Haltona, $p = 0.00$). Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 18.

Umiarkowaną i niewielką poprawę w grupie poddanej intradermoterapii kwasem hialuronowym zauważyło odpowiednio 40% i 46,67% ochotników, podczas gdy brak poprawy jedynie 13,33%. W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie ponad połowa ochotników (60%) zauważyło niewielką poprawę, 15% umiarkowaną, jednak 25% nie zauważyło żadnej poprawy. Większość probantów (75%) stosujących krem z kwasem hialuronowym nie zauważyło u siebie korekcji zmarszczek. Pozostałe 25% zaobserwowało jedynie niewielką poprawę

Tabela 18. Procent uzyskanej korekcji zmarszczek skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena ochotników.

% uzyskanej korekcji ocena ochotników	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
Brak poprawy	2	13,33%	5	25%	15	75%
Niewielka poprawa (1-33% korekcji)	7	46,67%	12	60%	5	25%
Umiarkowana poprawa (34-66% korekcji)	6	40%	3	15%	-	-

7.4.2 Korekta zmarszczek - ocena badacza

Procent korekcji zmarszczek, w wyniku poszczególnych terapii kwasem hialuronowym, badacz oceniał analogicznie do ochotników, według 4 – stopniowej skali oceny poprawy.

Analizując wszystkie grupy terapeutyczne, stwierdzono że największy % korekcji zmarszczek badacz zauważył u ochotników z grupy, w której zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym (test chi-kwadrat, $p = 0.00$).

U większości ochotników (86,67%) poddanych intradermoterapii kwasem hialuronowym, badacz zauważył niewielką poprawę korekcji zmarszczek, podczas gdy brak poprawy stwierdził u 13,33% probantów. W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie badacz zauważył niewielką poprawę u połowy ochotników (50%). U drugiej połowy probantów nie zanotował jakiegokolwiek korekcji zmarszczek. U większości probantów (85%) stosujących krem z kwasem hialuronowym, badacz nie zauważył żadnej korekcji zmarszczek. U pozostałych 15% zaobserwował jedynie niewielką poprawę. Dane w tabeli 19.

Tabela 19. Procent uzyskanej korekcji zmarszczek skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena badacza.

% uzyskanej korekcji ocena badacza	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
Brak poprawy	2	13,33%	10	50%	17	85%
Niewielka poprawa (1-33% korekcji)	13	86,67%	10	50%	3	15%

7.5 Ocena poprawy estetycznego wyglądu skóry (GAIS) w grupach terapeutycznych

7.5.1 GAIS – ocena ochotników

Narzędziem, za pomocą którego ochotnicy oceniali skuteczność poszczególnych terapii kwasem hialuronowym, była 5 – stopniowa skala GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale). Składała się ona z następujących odpowiedzi:

- 1- znaczna poprawa,
- 2 - umiarkowana poprawa,
- 3 - niewielka poprawa,
- 4 - brak zmian,
- 5 - pogorszenie.

Do zbadania zależności statystycznej, stopnia zadowolenia ochotników z rezultatów stosowania preparatów kwasu hialuronowego, pomiędzy poszczególnymi grupami

terapeutycznymi wykorzystano test Fishera – Freemana – Haltona. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę w zadowoleniu probantów w zależności od zastosowanej terapii ($p = 0.00$). Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 20.

Wszyscy ochotnicy z grupy w której zastosowano intradermoterapię oraz z grupy przyjmującej kwas hialuronowy doustnie zauważyli poprawę stanu skóry. W grupie poddanej intradermoterapii znaczną poprawę zauważyło ponad 50%, podczas gdy w grupie stosującej suplementację doustną 30%. Umiarkowaną poprawę zauważyło w tych grupach odpowiednio 33,33% i 50%, a niewielką 33,33% i 20%. W grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym odpowiedzi były bardziej zróżnicowane: poprawę zauważyło łącznie 65% ochotników, brak poprawy 10%, a pogorszenie 25%.

Udzielane przez ochotników odpowiedzi po raz kolejny potwierdziły wyniki, które otrzymano podczas pomiarów nawilżenia skóry twarzy za pomocą corneometru. Ocena poprawy skóry według skali GAIS nie korelowała jednak z wynikami uzyskanymi w pomiarze reviscometrem.

Tabela 20. GAIS w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników.

Skala GAIS ocena ochotników	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
1	8	53,33%	6	30%	1	5%
2	5	33,33%	10	50%	6	30%
3	2	13,33%	4	20%	6	30%
4	0	0%	0	0%	2	10%
5	0	0%	0	0%	5	25%

7.5.2 GAIS – ocena badacza

Skuteczność poszczególnych terapii kwasem hialuronowym, badacz ocenił analogicznie do ochotników, według 5 – stopniowej skali GAIS (Global Aesthetic Improvement Scale).

Do zbadania zależności statystycznej, stopnia zadowolenia badacza z rezultatów stosowania preparatów kwasu hialuronowego, pomiędzy poszczególnymi grupami terapeutycznymi wykorzystano test Fishera – Freemana – Haltona. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę w zadowoleniu badacza z terapii kwasem hialuronowym w zależności od zastosowanej terapii ($p = 0.00$). Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 21.

Poprawę stanu skóry badacz zauważył u wszystkich ochotników, u których zastosowano intradermoterapię kwasem hialuronowym, przy czym znaczna poprawa dotyczyła 26,67%, umiarkowana 33,33%, a niewielka 40% probantów. W grupie stosującej suplementację doustną badacz zanotował poprawę u 85% ochotników, u 45% niewielką a u 40% umiarkowaną. U żadnego z ochotników z tej grupy nie zauważył znacznej poprawy, a u 15% stwierdził brak zmian w stanie skóry. W grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym, badacz niewielką poprawę stwierdził u 35% probantów, a u 10% umiarkowaną. Jednocześnie u 40% ochotników z tej grupy nie zauważył żadnych zmian w stanie skóry twarzy, a u 15% z nich stwierdził pogorszenie.

Punktacja skali GAIS przyznawana przez badacza ochotnikom po raz kolejny potwierdziła wyniki, które otrzymano podczas pomiarów nawilżenia skóry twarzy za pomocą corneometru. Ocena poprawy skóry według skali GAIS nie korelowała jednak z wynikami uzyskanymi w pomiarze reviscometrem.

Tabela 21. GAIS w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza.

Skala GAIS ocena badacza	Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent	Liczba ochotników	Procent
1	4	26,67%	0	0%	0	0%
2	5	33,33%	8	40%	2	10%
3	6	40%	9	45%	7	35%
4	0	0%	3	15%	8	40%
5	0	0%	0	0%	3	15%

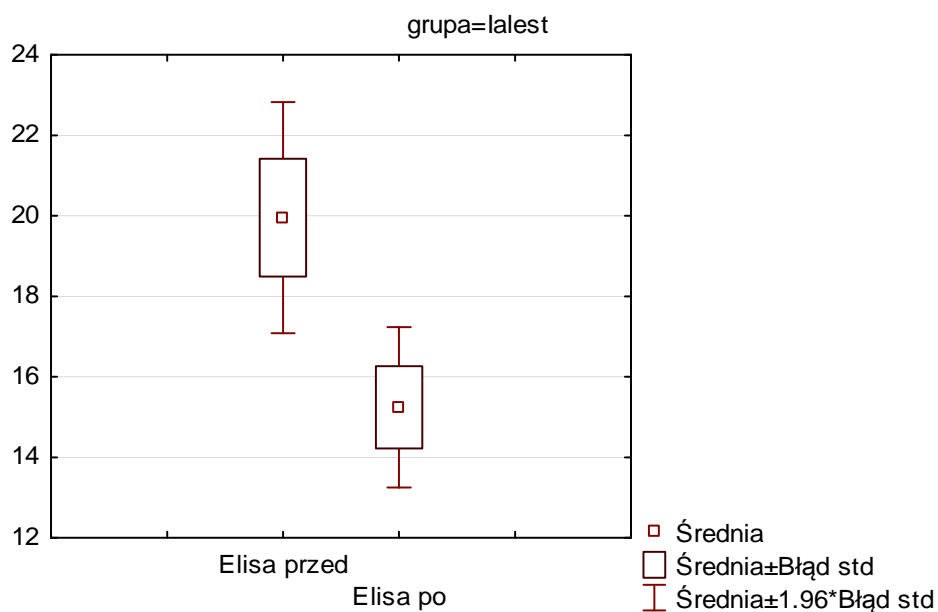
7.6 Poziom kwasu hialuronowego we krwi w grupach terapeutycznych

Na początku i na końcu badania określano poziom kwasu hialuronowego w osoczu krwi ochotników poszczególnych grup. W celu oceny, czy poziom ten zmienił się istotnie podczas trwania badania, wykorzystano test T dla prób zależnych.

Tabela 22. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu ochotników pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych.

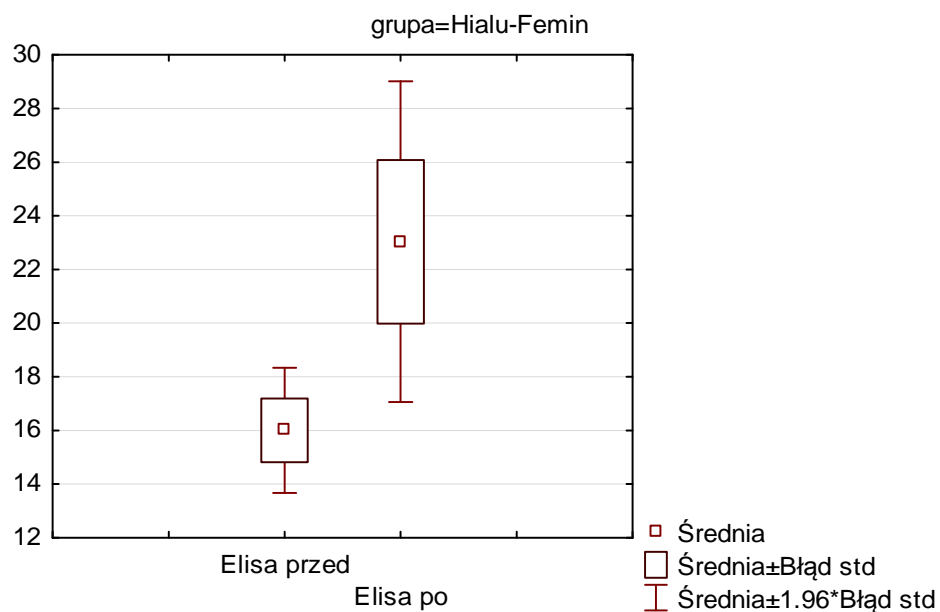
ELISA	Liczba ochotników (n)	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Intradermoterapia						
Początkowy poziom HA	15	19.95	19.36	8.23	32.02	5.67
Poziom HA po 6 tygodniach	15	15.24	15.26	8.77	25.64	3.94
Suplementacja doustna						
Początkowy poziom HA	20	16.00	14.51	8.29	26.46	5.32
Poziom HA po 6 tygodniach	20	23.04	20.35	9.88	75.34	13.64
Aplikacja zewnętrzna						
Początkowy poziom HA	20	20.00	20.99	7.62	33.41	6.81
Poziom HA po 6 tygodniach	20	22.49	21.17	8.43	40.69	9.16

W grupie poddanej intradermoterapii początkowy poziom kwasu hialuronowego wynosił 19.95 ± 5.67 , a na końcu badania obniżył się do poziomu 15.24 ± 3.94 , co było różnicą statystycznie istotną ($p = 0.01$) (Ryc. 31; Tab. 22).



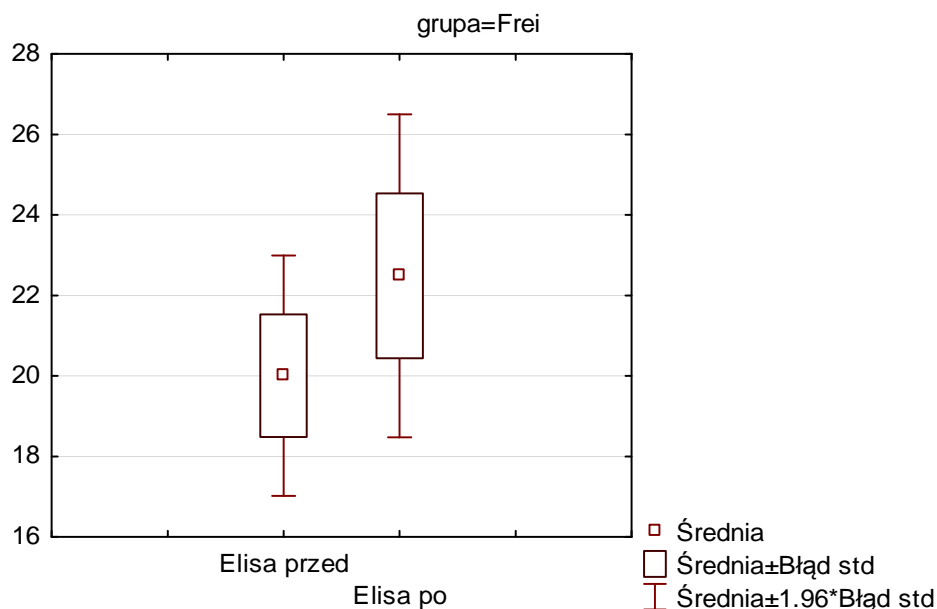
Rycina 31. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po serii zabiegów intraedermoterapii kwasem hialuronowym.

W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie, ilość HA w osoczu, trakcie w trwania badania, wzrosła z poziomu 16.00 ± 5.32 do 23.04 ± 13.64 , co było różnicą statystycznie istotną ($p = 0.02$) (Ryc. 32; Tab. 22).



Rycina 32. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po stosowaniu doustnego preparatu kwasu hialuronowego.

W grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym poziom HA na początku i na końcu badania był zbliżony. Wynosił odpowiednio 20.01 ± 6.81 i 22.49 ± 9.16 , co nie było różnicą statystycznie istotną ($p = 0.17$) (Ryc. 33; Tab. 22).

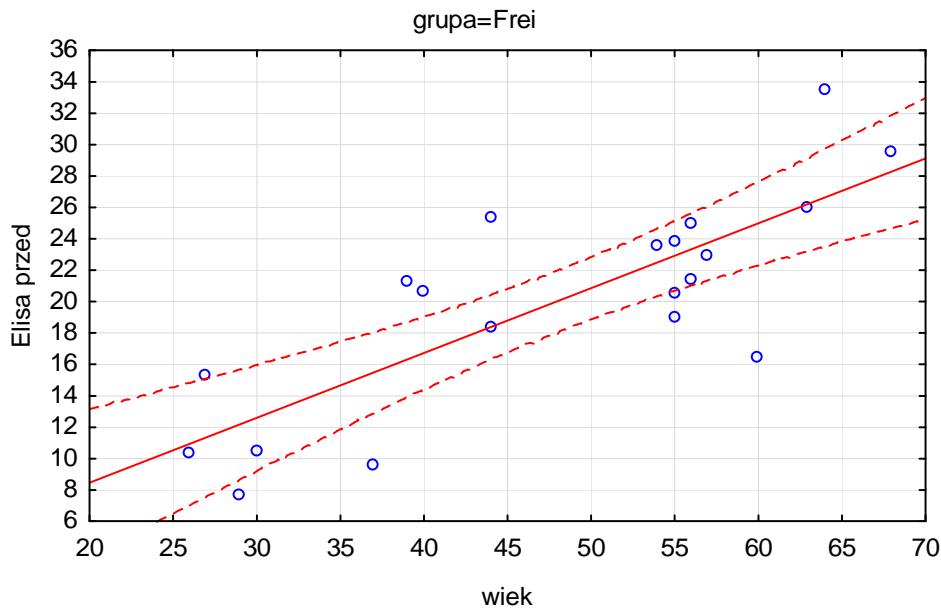


Rycina 33. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

Po 6 tygodniach trwania badania zanotowano wzrost poziomu kwasu hialuronowego w osoczu ochotników stosujących suplementację doustną (o 7,03). W grupie poddanej intradermoterapii zanotowano spadek poziomu kwasu hialuronowego w osoczu o 4,71. Natomiast w osoczu osób stosujących krem z kwasem hialuronowym nie wystąpiła istotna zmian poziomu kwasu hialuronowego (wzrost o 2,48).

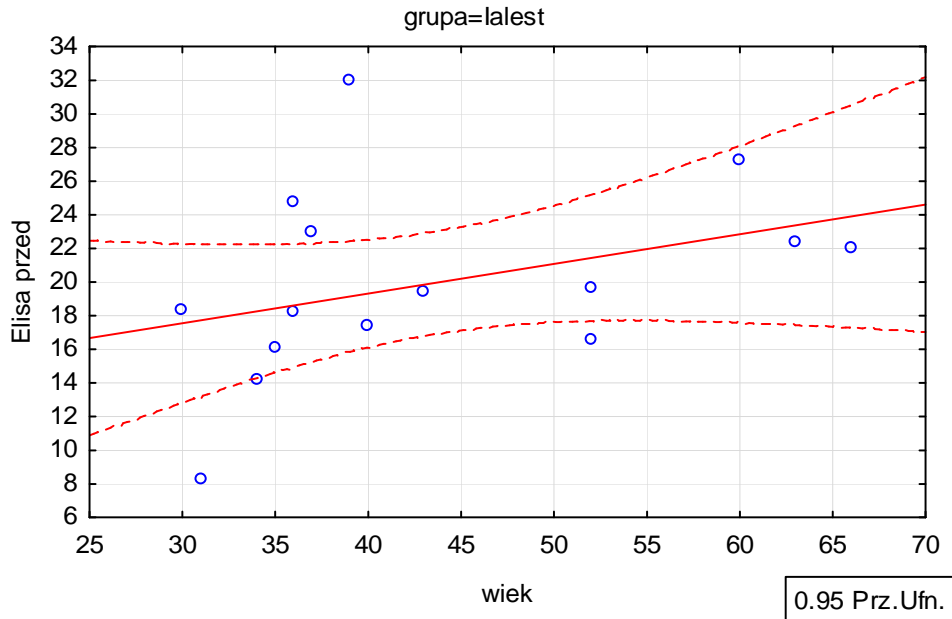
7.6.1 Zależność poziomu kwasu hialuronowego we krwi od wieku

Wykazano, że z wiekiem wzrasta poziom kwasu hialuronowego we krwi. Istotna korelacja była jednak jedynie w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym przed włączeniem terapii ($r = 0.80$, $p = 0.00$) (Ryc. 34). W pozostałych grupach korelacje nie były istotne statystycznie.

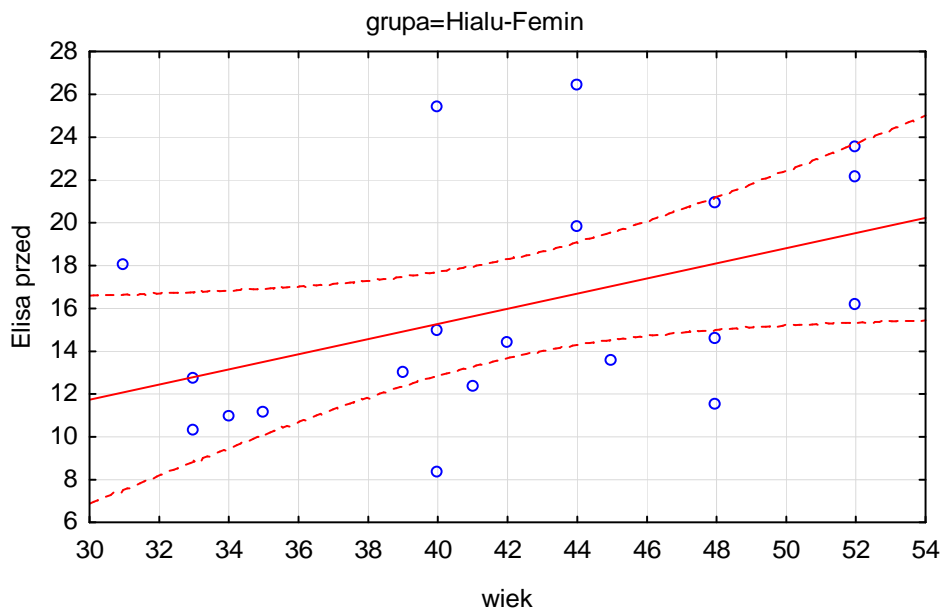


Rycina 34. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym (poziom na początku badania).

W pozostałych grupach p było wyższe niż 0.05. W grupie poddanej intradermoterapii p było równe 0.17 (w pierwszym dniu badania – ryc. 35) i 0.24 (w ostatnim dniu badania). W grupie stosującej kwas hialuronowy doustnie 0.05 (w pierwszym dniu badania – ryc. 36) i 0.75 (w ostatnim dniu badania). Po 6 tygodniach stosowania kremu z kwasem hialuronowym, p wynosiło 0.12.



Rycina 35. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie poddanej intradermoterapii kwasem hialuronowym (poziom na początku badania).



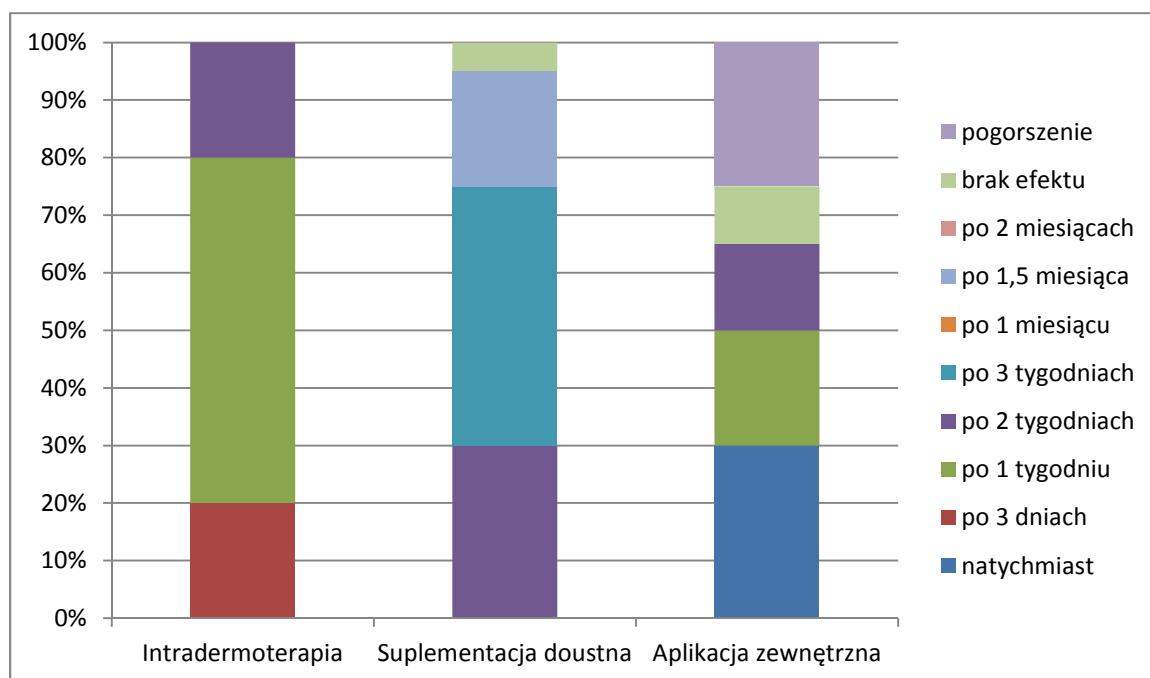
Rycina 36. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie (poziom na początku badania).

7.7 Czas zauważenia pierwszych efektów terapii kwasem hialuronowym w grupach terapeutycznych.

Każda z badanych osób podawała w pierwszym pytaniu ankiety (załącznik nr 8 - 10) po jakim czasie od rozpoczęcia terapii kwasem hialuronowym, zauważyła u siebie pierwsze pozytywne efekty zastosowanej kuracji. Dopuszczalne były też odpowiedzi: nie zauważyłam żadnych efektów i cera uległa pogorszeniu. Dane przedstawiono na rycinie 37.

Wśród ochotników, u których zastosowano intradermoterapię nieusieciowanym kwasem hialuronowym przeważała odpowiedź, że pierwsze pozytywne efekty mezoterapii zauważyli po 1 tygodniu od pierwszego zabiegu (60% ochotników). Z kolei większość osób przyjmujących kwas hialuronowy doustnie, pierwsze pozytywne efekty zauważyło po 1 miesiącu suplementacji kwasu hialuronowego (45% ochotników). Żaden z probantów należących do tych dwóch grup nie zaznaczył, że cera uległa pogorszeniu. Jedna osoba stosująca kwas hialuronowy doustnie nie zauważyła żadnych efektów (5% ochotników).

Bardziej zróżnicowane odpowiedzi co do czasu zauważenia pierwszych pozytywnych efektów terapii, pojawiły się w grupie ochotników stosujących kwas hialuronowy zewnętrznie w postaci kremu. 30% z nich zaznaczyło, że pozytywne efekty po zastosowaniu kremu z kwasem hialuronowym widzieli natychmiast, ale efekt ten był krótkotrwały. 10% probantów nie zauważyło żadnego efektu, a aż 25% ochotników zaznaczyło, że cera uległa pogorszeniu. Pozostali efekt widzieli po 1 lub 2 tygodniach stosowania kremu (odpowiednio 20% i 15% ochotników).



Rycina 37. Czas od włączenia poszczególnych terapii kwasem hialuronowym, po którym ochotnicy zauważyli pierwsze efekty.

Czas po którym ochotnicy zauważyli pierwsze efekty zastosowanych terapii kwasem hialuronowym różnił się istotnie pomiędzy poszczególnymi grupami (χ^2 $p=0,02$).

7.8 Działania niepożądane w grupach terapeutycznych

Po 6 tygodniach testowania terapii preparatami kwasu hialuronowego, ochotnicy w poszczególnych grupach zostali poproszeni o wypełnienie ankiety (załączniki 8 - 10). Pytanie numer 5 dotyczyło działań niepożądanych przeprowadzonej terapii. Jeżeli probant zaznaczył, że działania niepożądane u niego wystąpiły, proszony był o ich opisanie.

W grupie poddanej intradermoterapii, działania niepożądane zgłosiła jedna osoba. Był to krwiak pod okiem lewym, powstały na skutek wkłucia igły w naczynie krwionośne. Żaden z ochotników nie traktował grudek, powstałych na skutek zdeponowania kwasu hialuronowego w skórze, jako działania niepożądanego intradermoterapii. Również rumień, który wystąpił u części probantów, nie był traktowany jako efekt uboczny mezoterapii kwasem hialuronowym (Ryc. 38).

W grupie stosującej kwas hialuronowy doustnie, działania niepożądane zgłosiły 3 osoby. Jedna z probantek zauważyła zwiększenie ilości wykwitów skórnych na twarzy. Kolejne dwie nieprzyjemny zapach skóry i obrzęki kończyn dolnych.

W grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym działania niepożądane zgłosiło 8 osób. Sześciu ochotników nie było zadowolonych z wchłaniania kremu, uskarżali się na efekt maski i ściąganie skóry po jego zastosowaniu. Jedna z probantek zauważyła u siebie łuszczenie skóry na czole, kolejna pieczenie oczu po aplikacji kremu.

Tabela 23. Działania niepożądane zgłoszone przez ochotników poszczególnych grup terapeutycznych.

Działania niepożądane zgłoszone przez ochotników					
Intradermoterapia		Suplementacja doustna		Aplikacja zewnętrzna	
Ilość	Procent	Ilość	Procent	Ilość	Procent
1	6,67%	3	15%	8	40%

W celu porównania istotności różnic w ilości działań niepożądanych zastosowano test wskaźnika struktury. Istotna różnica wystąpiła między grupą stosującą intradermoterapię i aplikację zewnętrzną ($p=0.02$). W grupie stosującej intradermoterapię był najmniejszy

odsetek działań niepożądanych - 6.67% natomiast w grupie stosującej aplikację zewnętrzną najwyższy - 40%. Dane statystyczne przedstawiono w tabeli 23.



Rycina 38. Niewielki rumień po zabiegu intradermoterapii kwasem hialuronowym.

8 Omówienie wyników i dyskusja

Kwas hialuronowy od wielu lat jest przedmiotem zainteresowania naukowców. Szczególnie interesuje się nim przemysł kosmetyczny. Pomimo szerokiego zastosowania kwasu hialuronowego w dermatologii estetycznej i kosmetologii, brak jest potwierdzonych naukowo dowodów na skuteczność działania kwasu hialuronowego stosowanego w intradermoterapii czy suplementacji doustnej. Pojedyncze prace na ten temat, niekiedy zaprzeczają sobie nawzajem, a ilość ochotników w badaniu jest niewielka (średnio kilkanaście osób).

Ilość kwasu hialuronowego w naskórku i skórze właściwej zmienia się z wiekiem. Według najnowszych badań *in vivo* (245) zmiany te przebiegają inaczej w skórze chronionej przed słońcem, a inaczej w skórze ekspozowanej na promieniowanie UV. Ponadto Oh i wsp. zaobserwowali zależne od płci różnice w zawartości kwasu hialuronowego w naskórku i w skórze właściwej (245). W starzeniu chronologicznym (w skórze pośladka – chronionej przed słońcem) ilość kwasu hialuronowego w naskórku była niższa niż w skórze właściwej, a w miarę procesu starzenia jego ilość w naskórku jeszcze malała. Związany z wiekiem spadek ilości kwasu hialuronowego w naskórku był wyraźniejszy u kobiet niż u mężczyzn, tak więc poziom HA u starszych kobiet był wyraźnie niższy niż u starszych mężczyzn. Zawartość wody tkankowej w naskórku była mniejsza zarówno u młodych jak i u starszych kobiet, w porównaniu z mężczyznami. Takie różnice mogą wskazywać na wpływ hormonów na gospodarkę glikozaminoglikanami u kobiet, zwłaszcza w okresie pomenopauzalnym. W skórze właściwej starzenie wewnątrzpochodne nie wywoływało zmian w poziomie HA i wody tkankowej. We wcześniejszych badaniach obserwowano jednak spadek zawartości hialuronianu również w skórze właściwej (31).

W fotostarzeniu (w skórze przedramienia ekspozowanej na słońce) poziom kwasu hialuronowego w naskórku mężczyzn nie ulegał zmianie, podczas gdy ilość wody malała. U kobiet obserwowano nieistotny statystycznie wzrost ilości HA i wody w naskórku. Z kolei w skórze właściwej obserwowano u obu płci wzrost poziomu HA i wody tkankowej, przy czym wzrost poziomu wody tkankowej był większy u kobiet. W badaniach Bernsteina i wsp. (246) skóra zniszczona fotostarzeniem wykazywała wzrost ilości GAG w porównaniu ze skórą młodszą lub ze starzeniem fizjologicznym, głównie na skutek wzrostu poziomu siarczanu chondroityny (246). Mikroskopia konfokalna pozwoliła na ustalenie, że GAG nie są

normalnie rozmieszczone w obrębie materiału elastycznego w porównaniu z rozsianym rozmieszczeniem w skórze młodej. Według autorów cytowanego badania aberracja lokalizacji może ingerować w normalną zdolność wiązania wody przez GAG, w tym kwas hialuronowy, mimo wzrostu ich poziomu.

Rozbieżności w wynikach badań oceniających rozmieszczenie kwasu hialuronowego w skórze starzejącej się związane są prawdopodobnie z zastosowaniem przez badaczy różnych metod badawczych. Mimo tych różnic, zauważalna jest korelacja pomiędzy poziomem kwasu hialuronowego i zawartością wody w tkankach. Potwierdza to *in vivo* zdolność HA do wiązania wody i wydawać się może, że nadaje sens dostarczaniu egzogenego HA do skóry właściwej i naskórka w celu poprawy ich nawilżenia i turgoru. Należy jednak pamiętać, że na ilość wody w naskórku mają również wpływ glikozaminoglikany siarczanowane.

W poniższym badaniu porównywano preparaty kwasu hialuronowego stosowane śródskórnym, doustnym i zewnętrznym. Preparaty stosowane w intradermoterapii i suplementacji doustnej zawierały kwas hialuronowy wielkocząsteczkowy, o masie cząsteczkowej odpowiednio 1000 kDa i 500 kDa. Kwas hialuronowy w preparacie do stosowania zewnętrznego charakteryzował się masą cząsteczkową powyżej 100 kDa, co oznacza że pozostawał on na powierzchni skóry, bez możliwości penetracji do naskórka. Grupy terapeutyczne były jednorodne pod względem wieku, ilości ochotników palących papierosy oraz ilości wypijanych przez probantów płynów na dobę.

W kolejnych etapach badania, analizowano wpływ powyższych preparatów na nawilżenie, elastyczność i zmarszczki skóry twarzy, a także oceniano zmianę poziomu kwasu hialuronowego w osoczu krwi, zachodzące w wyniku zastosowanych terapii.

Pierwszym preparatem analizowanym w części badawczej poniższej pracy, był nieusieciowany, wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy zastosowany w intradermoterapii metodą depot. Próbowano odpowiedzieć na pytanie czy preparaty nieusieciowanego kwasu hialuronowego stosowane w mezoterapii faktycznie wpływają na nawilżenie, elastyczność i zmarszczki skóry twarzy. Dotychczas nie opisano jednoznacznie w literaturze recenzowanej ani skuteczności ani profilu bezpieczeństwa intradermoterapii nieusieciowanym kwasem

hialuronowym (247,248). Procesy molekularne i komórkowe leżące u podstaw mezoterapii nadal nie zostały jednoznacznie określone. Dane, którymi dysponują lekarze zajmujący się dermatologią estetyczną pochodzą jedynie od producentów wprowadzających na rynek preparaty nieusieciowanego HA. Mimo to komisja ekspercka, która zebrała się w Wiedniu w ramach 16 Kongresu Europejskiej Akademii Dermatologii i Wenerologii (EADV) w 2007 roku, uznała leczenie fotostarzenia skóry za pomocą intradermoterapii kwasem hialuronowym za użyteczną opcję terapeutyczną (249). Jednak jedyne badanie kliniczne, które przytoczyła dotyczyło kwasu hialuronowego usieciowanego, a nie stosowanego typowo w mezoterapii i omawianego w niniejszej pracy HA nieusieciowanego (250). Należy dodać, że niektóre z preparatów nieusieciowanego kwasu hialuronowego są nagradzane przez stosujących je lekarzy i tak np. Stowarzyszenie Lekarzy Dermatologów Estetycznych regularnie nagradza nagrodą „Perła Dermatologii Estetycznej” preparaty kwasu hialuronowego przeznaczone do mezoterapii (m.in. w w 2009 roku - NCTF HA i Jalupro, a w 2011 - Cytocare® 532). Wskazywać to może na fakt, iż zarówno pacjenci jak i lekarze zauważają znakomite efekty zabiegów intradermoterapii nieusieciowanym kwasem hialuronowym.

W niniejszej pracy mierzono nawilżenie i elastyczność oraz oceniano zmarszczki skóry twarzy po zastosowaniu serii zabiegów intradermoterapii (metodą depot) nieusieciowanym wielkocząsteczkowym kwasem hialuronowym (Ialest®). Nawilżenie skóry mierzone tydzień po zastosowaniu 3 zabiegów mezoterapii nieusieciowanym kwasem hialuronowym wzrosło istotnie (o 9,01) u wszystkich badanych ochotników ($p = 0.00$). Wzrost nawilżenia skóry zauważalny był również w ocenie klinicznej badacza (poprawa u 93,33% probantów) oraz w samoocenie ochotników. Wszystkie osoby poddane intradermoterapii zauważyły u siebie spadek suchości, a tym samym wzrost nawilżenia skóry. Znajdowało to odzwierciedlenie w ocenie estetycznego wyglądu skóry przez lekarza i probantów. Zarówno badacz, jak i ochotnicy zanotowali różnego stopnia poprawę estetycznego wyglądu skóry twarzy u wszystkich badanych osób. Wzrost nawilżenia skóry twarzy wynikał zapewne ze związania dużej ilości wody przez kwas hialuronowy, zgodnie z jego higroskopijną naturą. Cząsteczki kwasu hialuronowego wprowadzane były bezpośrednio w górne warstwy skóry właściwej, co prowadziło do wzrostu nawilżenia skóry właściwej, a pośrednio również do wzrostu nawilżenia naskórka.

Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach Taieb i wsp. (251), którzy przeprowadzili wielośrodkowe badanie oceniające wpływ intradermoterapii preparatem nieusieciowanego kwasu hialuronowego i mannitolu (Juvéderm® HYDRATE) na

nawodnienie i elastyczność skóry oraz satysfakcję z leczenia ocenianą przez pacjenta i lekarza po 60 dniach terapii. Autorzy cytowanego badania wstrzykiwali 1,0 ml preparatu w okolice twarzy wymagające korekty podczas trzech kolejnych wizyt. U części pacjentów stosowali technikę depot, u pozostałych picotage. Oceny stanu skóry dokonywali aparatem Skin Evidence for IOMA™ za pomocą sond Visio Probe (precyzyjny obraz skóry) i Physio Probe (podstawowe parametry skóry). Statystycznie istotny wzrost nawilżenia skóry uzyskano wyłącznie w grupie pacjentów poddanych mezoterapii metodą depot, co znalazło również odzwierciedlenie w satysfakcji pacjentów z leczenia. Działanie nawilżające preparatu HA i mannitolu było oceniane dopiero po 30 dniach od ostatniego zabiegu mezoterapii. W niniejszej rozprawie doktorskiej, oceny corneometrycznej dokonywano już po tygodniu od ostatniego zabiegu. Należy się jednak spodziewać, że efekt nawilżający po zastosowaniu nieusieciowanego kwasu hialuronowego połączonego z mannitolem będzie się utrzymywał dłużej niż samego nieusieciowanego HA, gdyż mannitol wykazuje w badaniach *in vitro* ochronę przed degradacją wolnorodnikową HA i przedłuża jego okres półtrwania (251).

W części badawczej niniejszej rozprawy nie zaobserwowano poprawy elastyczności skóry w badaniu reviscometrem po zastosowaniu serii zabiegów mezoterapii wielkocząsteczkowym kwasem hialuronowym. RRT wzrosło nieznacznie we wszystkich pomiarach, a dla 0^o wzrost ten był istotny statystycznie ($p = 0.03$). Wzrost RRT, oznacza spadek elastyczności skóry. Oznacza to, że wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy nie wywarł żadnego pozytywnego wpływu na biologię fibroblastów. Do podobnych wniosków doszedł w swoim badaniu Surowiak (247). Dodawał on kwas hialuronowy (10% NCTF HA, 10% Jalupro) oraz osocze bogatopłytkowe (10% PRP) do hodowli ludzkich fibroblastów, pobranych ze skóry brzucha 43 letniego mężczyzny. Przeprowadzone badanie wykazało nasilenie ekspresji Ki67 i prokolagenu typu I jedynie w fibroblastach hodowanych z domieszką 10% PRP. Nie wykazano natomiast reakcji w komórkach hodowanych z domieszką 10% NCTF HA i Jalupro, czyli preparatów zawierających kwas hialuronowy. Różnica pomiędzy badanymi preparatami była istotna statystycznie.

W innym badaniu *in vitro* na hodowli ludzkich fibroblastów, Croce i wsp. (252) zaobserwowali spadek łącznej ilości syntetyzowanego białka, a zwłaszcza kolagenu po dodaniu do hodowli kwasu hialuronowego w stężeniu 0,5 – 1 μM . Nie zaobserwowali natomiast wpływu egzogenego kwasu hialuronowego na syntezę HA. Dane te wyraźnie pokazują, że stosunkowo duże stężenie HA w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, takie jak w rozwoju oraz w pierwszych fazach naprawy tkanek, może częściowo ograniczyć odkładanie

macierzy, a w szczególności kolagenu. Brak wpływu lub wręcz inhibicja kultur fibroblastów przez egzogenny kwas hialuronowy świadczyć może o tym, że mezoterapia nieusieciowanym kwasem hialuronowym nie wpływa korzystnie na poprawę elastyczności skóry.

Również w badaniu *in vivo*, Amin i wsp. (248) doszli do wniosku, że mezoterapia kwasem hialuronowym w połączeniu z kompleksem multiwitaminowym (Hopewell Pharmacy, Hopewell, NJ) nie przynosi żadnych istotnych korzyści. Stan skóry 10 pacjentów, poddanych czterem sesjom mezoterapii igłowej, oceniali za pomocą biopsji skóry, mikroskopii elektronowej oraz fotografii po 6 miesiącach trwania badania. Ponadto analizowali ocenę terapii przez pacjenta i ewentualne działania niepożądane. Badanie histologiczne nie wykazało żadnych istotnych zmian, podobnie jak analiza fotografii. Z kolei w mikroskopii elektronowej wykazano zmniejszenie średnicy włókien kolagenowych po leczeniu z 59 do 48 nm. Mniejszej średnicy włókna kolagenowe mogą być związane z syntezą nowego kolagenu i obecnością zarówno prokolagenu, jak i kolagenu typu III. Efekt ten może być jednak skutkiem pobudzania kolagenu w wyniku wystąpienie strefy naprawy po uszkodzeniu skóry i wywołaniu stanu zapalnego przez igłę (253).

Z drugiej jednak strony badania Lacarrubba (254) i wsp. sugerują, że mezoterapia nieusieciowanym kwasem hialuronowym może być skuteczna w leczeniu fotostarzenia skóry. Wykazali oni w badaniu ultrasonograficznym skóry 15 z 19 pacjentów, poddanych serii zabiegów mezoterapii wielkocząsteczkowym kwasem hialuronowym (Viscoderm® 1000 kDa) w stężeniach 16 mg/ml i 20 mg/ml, istotne dla obu stężeń HA zwiększenie echogeniczności SLEB. SLEB (subepidermal low echo genicity band) to podnaskórkowe pasma o niskiej echogeniczności, których powstanie wiąże się z przewlekłym narażeniem na promieniowanie UV, czyli z fotostarzeniem. Według autorów cytowanej pracy wzrost echogeniczności SLEB świadczyć mógł o aktywacji fibroblastów i zwiększeniu gęstości włókien kolagenowych skóry u pacjentów, którzy zareagowali na mezoterapię. Należy się jednak zastanowić, czy wzrost echogeniczności SLEB wynikać może jedynie ze zwiększonej gęstości kolagenu. Wiadomo, że za obniżenie echogeniczności i formację SLEB w górnej części skóry odpowiadają: elastoza, zasadochłonna degradacja kolagenu oraz akumulacja glikozaminoglikanów i wody w warstwie brodawkowatej skóry właściwej (255). Wprowadzenie do skóry cząsteczek kwasu hialuronowego i związanie przez niego dużej ilości wody, nawet bez stymulacji fibroblastów, być może skutkuje zmianą echogeniczności skóry. USG skóry nie mówi bezpośrednio o reakcji fibroblastów na egzogenny kwas hialuronowy i przydatność tego badania powinna być nadal sprawdzana przez naukowców.

Korzystne efekty wprowadzania do skóry preparatów do mezoterapii zawierających kwas hialuronowy (NCTF® i NCTF HA®), zauważyli jednak również Jäger'a i wsp. (256). Przeprowadzili oni badanie *in vitro* na hodowli ludzkich fibroblastów. Fibroblasty zachowały wydłużony kształt wrzeciona i szybkość proliferacji zbliżoną do hodowli kontrolnej, ale wzrosła ekspresja kolagenu typu 1, metaloproteinazy 1 (MMP-1) i inhibitora metaloproteinazy-1 (TIMP-1). Należy się w takim razie zastanowić, czy mezoterapia tymi preparatami przyniesie korzystne efekty *in vivo*, skoro w hodowli tkankowej zaobserwowano zarówno wzrost ekspresji kolagenu typu 1 i inhibitora metaloproteinazy-1, jak działającej niekorzystnie metaloproteinazy-1.

Mimo, że najnowsze doniesienia raczej zaprzeczają stymulacyjnemu efektowi egzogenne nieusieciowanego kwasu hialuronowego na fibroblasty, w starszych badaniach (*in vitro*) taki efekt został wykazany (257,258). Badania *in vitro* mogą jednak nie mieć bezpośredniego przełożenia na mezoterapię *in vivo*, co powinno zostać przeanalizowane w przyszłości.

Rozbieżności w ocenie intradermoterapii kwasem hialuronowym mogą wynikać z różnych rozmiarów HA używanego do poszczególnych doświadczeń, z różnych metod badawczych oraz warunków środowiskowych. Podejście takie potwierdza badanie z 2010 roku, w którym udowodniono, że krótsze łańcuchy kwasu hialuronowego stymulują neowaskularyzację uszkodzonych tkanek, pobudzają powstawanie ziarniny a także zwiększają odkładanie kolagenu i proliferację fibroblastów w badaniu *in vivo* na myszach (259).

Wyniki reviscometryczne otrzymane w niniejszej rozprawie w połączeniu z danymi z piśmiennictwa wskazują, że wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy zastosowany w intradermoterapii nie wpływa na poprawę kolagenowej struktury skóry.

Mimo tego, że reviscometr nie wykazał żadnej statystycznej poprawy elastyczności skóry twarzy po zastosowaniu mezoterapii, zarówno w ocenie klinicznej badacza jak i ochotników elastyczność / napięcie skóry uległo niewielkiej poprawie (odpowiednio u 40% i 73.33% probantów). Niewielkiemu spłyceniu uległy też zmarszczki na skórze twarzy (u 86,67% ochotników w ocenie zarówno badacza, jak i probantów). Mogło to wynikać z przejściowego obrzęku po mechanicznym urazie skóry, powstającym na skutek wielokrotnego wkłuwania igły. Innym wyjaśnieniem jest poprawa turgoru tkanki w wyniku wzrostu jej nawilżenia. Również w badaniu Amina i wsp. (248) 40% pacjentów

zaobserwowało taki efekt. Utrzymywał się on jednak jedynie przez okres jednego tygodnia po każdej sesji mezoterapii.

Intradermoterapia kwasem hialuronowym jest bardzo dobrze tolerowana i praktycznie nie wywołuje poważnych działań niepożądanych. Wszyscy eksperci z komisji zajmującej się mezoterapią, w ramach 16 Kongresu Europejskiej Akademii Dermatologii i Wenerologii (EADV), byli zdania, że najlepszą techniką mezoterapii jest technika depot, ewentualne skutki uboczne intradermoterapii są jedynie łagodne i przemijające, a tworzenie się „grudki” traktowane powinno być jako przejaw właściwej iniekcji śródskórnej (249). W dostępnej literaturze istnieją pojedyncze doniesienia na temat działań niepożądanych mezoterapii (260-262).

W niniejszym badaniu wykonano u ochotników łącznie 45 zabiegów intradermoterapii. U wszystkich probantów obserwowano wytworzenie grudki. Jej wielkość różniła się pomiędzy ochotnikami, mimo zbliżonej ilości wstrzykiwanego kwasu hialuronowego, co zależało od jakości skóry poszczególnych ochotników. Żaden z ochotników nie potraktował grudki jako działania niepożądanego zabiegu. Zapewne dokładne poinformowanie probanta o przebiegu mezoterapii sprawiło, że ochotnicy spodziewali się takiego efektu i nie wywoływał on u nich niepokoju. Kolejnym objawem, który pojawił się u wszystkich ochotników, było punktowe krwawienie, co również zarówno probanci jak i badacz uznali za normę, w związku z tym że igła wkłuwana była w górną warstwę skóry właściwej. Niewielki rumień, który pojawił się przejściowo u części ochotników również nie wzbudzał ich niepokoju. Jedynym zgłoszonym przez probantów objawem niepożądanym był krwiak (6,67%). Pojawił się on pod okiem jednego z ochotników podczas pierwszego zabiegu intradermoterapii i utrzymywał się przez blisko 3 tygodnie. Wszystkie objawy niepożądane były przejściowe i z wyjątkiem krwiaka, krótkotrwałe. Grudki utrzymywały się od kilku godzin do 2 dni. Należy podkreślić, że wszystkie skutki uboczne były związane z techniką wstrzykiwania, a nie ze specyfiką wstrzykiwanego kwasu hialuronowego.

Podobne działania niepożądane zaobserwowali w swoim badaniu Amin i wsp. (248). W ciągu 40 sesji leczenia, prawie wszyscy pacjenci doświadczyli tymczasowego rumienia, punktowego krwawienia i bólu o niewielkim nasileniu pomimo zastosowania miejscowego znieczulenia. Co ciekawe u jednego z pacjentów po dwóch sesjach terapeutycznych wystąpiła pokrzywka wargi górnej. Dwóch kolejnych pacjentów skarżyło się w trzech przypadkach na silny ból. Wszystkie objawy ustępowały samoistnie.

Również Taieb i wsp. (251) w trakcie 104 sesji mezoterapii zaobserwowali jedynie przejściowe, związane z techniką podawania preparatu, działania niepożądane. Były to wybroczyny (6,7%), grudki (6,7%), krwiak (4,8%) oraz zadrapania (2,9%) i rumień (1%).

Zabiegi intradermoterapii nieusieciowanym kwasem hialuronowym wydają się być bezpieczne, nie wywołują żadnych poważnych następstw, a działania niepożądane są jedynie przejściowe. Największym problemem dla pacjentów może być czas utrzymywania się grudki po wstrzyknięciu preparatu kwasu hialuronowego. Ze względu na fakt, że grudka może się utrzymywać nawet dzień lub dwa po zabiegu, aktywni zawodowo ochotnicy niniejszego badania sesje mezoterapii wykonywane mieli w piątki.

Kolejnym preparatem analizowanym w części badawczej poniższej pracy był wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy przeznaczony do suplementacji doustnej.

W sprzedaży dostępne są liczne suplementy diety zawierające w swoim składzie kwas hialuronowy. Część z nich zawiera dodatkowo inne składniki np. proteiny takie jak kolagen, mukopolisacharydy inne niż HA takie jak siarczan chondroityny, a także witaminy itp. Dostępne są również suplementy diety zawierające wyłącznie kwas hialuronowy w formie drobnocząsteczkowej lub wielkocząsteczkowej. Obiegowa opinia głosi, że dostarczanie skórze kwasu hialuronowego pozwala utrzymać ją w dobrej kondycji. Ponadto sugeruje się, że suplementacja doustna kwasu hialuronowego może dać lepsze efekty niż stosowanie HA w produktach kosmetycznych. Do tej pory nie przeprowadzono jednak żadnych badań porównawczych.

W niniejszym badaniu, dwudziestu ochotników przyjmowało wielkocząsteczkowy kwas hialuronowy (Hialu – Femin®) w dawce 50 mg 2 x dziennie przez okres 6 tygodni. Badanie skóry po 6 tygodniach suplementacji HA wykazało istotny wzrost nawilżenia skóry (o 7,24) w badaniu corneometrem ($p = 0.00$). Wzrost nawilżenia / spadek suchości skóry twarzy ochotników obserwował też klinicznie badacz. Według niego wzrost nawilżenia skóry nastąpił u 80% ochotników, jednak był niższy niż w grupie poddanej intradermoterapii. Podobnie wyniki kształtowały się w samoocenie probantów (wzrost nawilżenia u 70% ochotników, niższy niż w grupie poddanej intradermoterapii). Wzrost nawilżenia skóry skutkował też poprawą estetycznego wyglądu skóry w ocenie zarówno badacza jak i probanta. Niewielką i umiarkowaną poprawę wyglądu skóry twarzy, badacz zanotował u 85%

ochotników, a u 15% nie zauważył żadnej poprawy stanu skóry. Wśród ochotników, wszyscy zauważyli poprawę estetycznego wyglądu swojej skóry, w tym 30% znaczną. Należy jednak podkreślić, że mimo tego iż doustny kwas hialuronowy słabiej od intradermoterapii poprawił nawilżenie skóry, to zakres jego działania był szerszy – poprawił nawilżenie całej skóry, a nie tylko skóry twarzy.

Również w badaniu Kajimoto i wsp. (263) wykazano istotny statystycznie wzrost nawilżenia skóry oceniany za pomocą corneometru, po doustnej suplementacji 240 mg kwasu hialuronowego na dobę, przez okres 6 tygodni. Badanie to przeprowadzono na 22 ochotnikach z suchością skóry (nawilżenie < 50%), z zastosowaniem grupy kontrolnej otrzymującej placebo. Pomiarów corneometrycznych dokonywano pod okiem lewym. Poprawę nawilżenia skóry obserwowano już po 3 tygodniach suplementacji HA. Wyniki corneometryczne w dniu rozpoczęcia badania, po 3 i 6 tygodniach suplementacji wynosiły odpowiednio: $45,6 \pm 7,5$, $51,9 \pm 11,2$ i $51,9 \pm 9,5$. Ponadto w cytowanym badaniu zaobserwowano poprawę gładkości skóry, mierzonej aparatem Visioscan C&K na kończynie górnej i szyi. Pomiar sebumetrem i pHmetrem nie wykazał żadnych istotnych zmian w wyniku suplementacji doustnej kwasu hialuronowego. W cytowanym badaniu (263) lekarze potwierdzili badaniem klinicznym wyniki corneometryczne: zaobserwowali zmniejszenie suchości skóry, a ponadto poprawę takich parametrów jak świąd, zaczerwienienie oraz uszkodzenia powstałe w wyniku działania kosmetyków, w tym w wyniku eksfoliacji. Statystycznie istotna różnica między grupą przyjmującą kwas hialuronowy, a grupą stosującą placebo dotyczyła wyłącznie suchości skóry twarzy oraz świądu i suchości całego ciała.

Podobnie, Sato i wsp. (264) wykazali istotny wzrost nawilżenia skóry po czterotygodniowej suplementacji doustnej kwasu hialuronowego w dawce 120 mg/d. Badanie to przeprowadzone zostało na grupie 35 ochotników z suchością skóry (nawilżenie < 50%) z zastosowaniem grupy kontrolnej otrzymującej placebo. Istotną różnicę pomiędzy nawilżeniem skóry ochotników przyjmujących HA i placebo obserwowano w 2 tygodniu przyjmowania HA. Wyniki corneometryczne skóry pod okiem lewym w dniu rozpoczęcia badania, po 2 i 4 tygodniach suplementacji wynosiły odpowiednio: $49,1 \pm 7,3$, $46,8 \pm 5,4$ i $52,0 \pm 7,7$. Trzy tygodnie po zakończeniu badania wyniki wróciły do poziomu sprzed włączenia suplementacji HA. Ponadto w cytowanym badaniu wykazano poprawę gładkości skóry, ocenianej aparatem Visioscan C&K. pH skóry nie uległo zmianie.

W części badawczej niniejszej rozprawy nie uzyskano poprawy elastyczności skóry (oceniaanej za pomocą reviscometru) po suplementacji doustnej hialuronianu. Mimo zapewnień producentów doustnych preparatów kwasu hialuronowego o ich pozytywnym wpływie na elastyczność skóry, nie istnieją żadne badania, które ten fakt by potwierdzały. W pracach Kajimoto i Sato (263,264) wykazano jednak na podstawie badania Visioscan'em spłylenie zmarszczek. Również w niniejszej rozprawie 75% ochotników zauważyło u siebie niewielkie lub umiarkowane spłylenie zmarszczek. Również badacz zanotował spłylenie zmarszczek u 50% probantów, było ono jednak niewielkie. Wydaje się jednak, że do poprawy wyglądu skóry, w tym do spłylenia zmarszczek nie doszło tu w wyniku poprawy utkania skóry właściwej, tylko na skutek wzrostu zawartości wody w naskórku. W innym badaniu (51) opisywano spłylenie zmarszczek przy braku poprawy nawilżenia naskórka, ale doustny preparat w wyniku suplementacji którego doszło do takich zmian miał zupełnie inny skład (glikozaminy, aminokwasy, sole mineralne i związki o działaniu antyoksydacyjnym). Według cytowanego badania suplementacja doustna antyoksydantów i podstawowych składników skóry właściwej doprowadziła do poprawy nawilżenia skóry właściwej (stąd spłylenie zmarszczek). Nie obserwowano jednak wzrostu nawilżenia naskórka, być może na skutek niedoborów elementów decydujących o utrzymywaniu w nim wody (ceramidów i NMFu). Bardzo możliwe, że ochotnicy stosujący doustny preparat kwasu hialuronowego w niniejszej pracy badawczej takich niedoborów nie mieli. Poza tym, nawilżenie skóry ochotników wzrosło dzięki związaniu dużych ilości wody przez suplementowany kwas hialuronowy, a preparat omawiany w cytowanym powyżej badaniu kwasu hialuronowego nie zawierał.

Badanie aparaturowe w niniejszej pracy, pozwoliło na obiektywną ocenę stanu skóry. Poprawa suchości skóry obserwowana była nie tylko w badaniach aparaturowych, ale także w badaniu fizykalnym skóry przeprowadzonym przez lekarza. Również ochotnicy zauważyli poprawę stanu nawilżenia swojej skóry.

W opublikowanych dotychczas pracach (263,264) nie obserwowano żadnych skutków ubocznych suplementacji doustnej kwasu hialuronowego. Jednak w przeprowadzonym w niniejszej rozprawie badaniu 3 ochotników zgłosiło następujące działania niepożądane preparatu doustnego HA: zwiększenie ilości wykwitów skórnych na twarzy, nieprzyjemny zapach skóry i obrzęki kończyn dolnych. Oczywiście większa ilość wody związanej w skórze właściwej i naskórku mogłaby prowadzić do wyżej wymienionych objawów. Jednak należałoby przeprowadzić dalsze badania dla potwierdzenia bezpośredniego związku

między suplementacją doustną kwasu hialuronowego a pojawieniem się opisanych skutków ubocznych.

Ostatnim preparatem analizowanym w części badawczej poniższej pracy, był krem z kwasem hialuronowym o nazwie Frei Hyaluron Aktiv®. Ochotnicy aplikowali go na skórę twarzy dwukrotnie w ciągu dnia przez okres 6 tygodni.

W ostatnim dniu badania nie wykazano statystycznie istotnej zmiany nawilżenia (w pomiarze corneometrem) oraz elastyczności skóry (w pomiarze reviscometrem). Ocena kliniczna badacza oraz samoocena skóry twarzy przez ochotników potwierdziła dane aparaturowe. W badaniu corneometrem, nawilżenie wzrosło średnio o 0,60. Należy jednak podkreślić, że u blisko połowy ochotników (8 osób), mierzone corneometrem nawilżenie skóry zmalało.

Według Arcta i Pytkowskiej najefektywniejszą metodą poprawiającą nawilżenie skóry jest wzmocnienie barier hamujących utratę wody (265). Najlepiej hamują TEWL emolienty, tworzące na skórze warstwę lipofilową, która jest kompatybilna z naturalnym płaszczem pokrywającym naskórek. Krem badany w niniejszej pracy zawierał liczne emolienty (stearnian glicerolu, trójgliceryd kaprylowo – kaprynowy, alkohol cetearylowy, wosk jojoba), które chroniły naskórek przed utratą wody. Stąd zapewne poprawa nawilżenia skóry u części ochotników.

U blisko połowy probantów, nawilżenie skóry po 6 tygodniach badania było jednak gorsze lub zbliżone do poziomu hydratacji skóry przed badaniem. Wynikać to może z tego, że dodanie do kremu higroskopijnego kwasu hialuronowego doprowadza do spadku lepkości preparatu i wytworzenia na skórze warstwy hydrofilowej, która chroni naskórek przed utratą wody znacznie słabiej niż warstwa lipidowa. Ponadto należy podkreślić, że ochotnicy stosowali krem z kwasem hialuronowym 2 razy dziennie - rano i wieczorem, a badanie skóry u wszystkich uczestników badania przeprowadzano zawsze pomiędzy godziną 11 a 13. Otrzymane wyniki mogą wskazywać na fakt, że po kilku godzinach krem przestaje działać.

Jest to zgodne z nieopublikowanymi badaniami autora, z których wynika że krem ten w przeciągu 5 godzin od zastosowania wpływa na nawilżenie skóry w następujący sposób: po 15 minutach – wzrost nawilżenia o 48,89%, po 1 godzinie – wzrost nawilżenia o 48,17%, po 2 godzinach – wzrost nawilżenia o 36,41%, po 3 godzinach – wzrost nawilżenia o 22,39%, po

4 godzinach – wzrost nawilżenia o 7,1%, a po 5 godzinach – wzrost nawilżenia o 6,66%. Jak widać, nawilżenie skóry po zastosowaniu badanego kremu stopniowo wracało do wartości wyjściowych, a efekt nawilżający był najlepszy krótko po aplikacji kremu z kwasem hialuronowym. Ten natychmiastowy efekt wynikał z higroskopijnych właściwości HA, który zapewne związał wodę zarówno z podłoża kremu jak i z otoczenia, a następnie dostarczył ją na powierzchnię warstwy rogowej naskórka.

Podobnie, stopniowe obniżanie pierwotnego wzrostu nawilżenia skóry po aplikacji kremu z 1% kwasem hialuronowym, uzyskali w swoim badaniu Krynicka i wsp. (266). W przeciągu godziny wzrost nawilżenia skóry dla cery mieszanej wyglądał następująco: po 15 minutach – wzrost o 166,49%, po 30 minutach – wzrost o 121,52%, po 45 minutach – wzrost o 131,22% i po 60 minutach – wzrost o 101,76%. Znacznie większy wzrost nawilżenia skóry w badaniu Krynickiej i wsp. w porównaniu do nieopublikowanych danych autora, może wynikać z zastosowania innej aparatury pomiarowej. Zastosowany w badaniu Krynickiej i wsp. aparat Skintest plus nie jest przeznaczony do badań naukowych, stąd wyniki mogą nie być tak wiarygodne jak te uzyskane w badaniu autora. Ponadto, wzrost ten był pokazany tylko dla cery mieszanej, dla cery tłustej zaobserwowano jedynie minimalny wzrost nawilżenia skóry. Krynicka i wsp. sugerowali, że krem z kwasem hialuronowym w stężeniu do 1% wykazuje działanie przede wszystkim zmiękczające, a nie nawilżające.

Również w badaniach Mazzarello i wsp. (267), uzyskano przede wszystkim natychmiastowy wzrost nawilżenia warg po zastosowaniu pomadki z kwasem hialuronowym. W badaniu korneometrycznym 20 kobiet najwyższy wzrost nawilżenia, o 22,2%, uzyskano po 15 i 30 minutach od aplikacji pomadki.

Należy podkreślić, że preparaty kwasu hialuronowego do stosowania zewnętrznego mają działać poprzez tworzenie na naskórku filmotwórczej warstwy hydrofilowej, zmniejszającej gradient stężeń wody w skórze, a tym samym ograniczającej przetranskórkową utratę wody (TEWL). Ponieważ cząsteczka kwasu hialuronowego jest zbyt duża aby przeniknąć przez warstwę rogową naskórka i wbudować się w struktury cementu międzykomórkowego, zewnętrzne stosowanie kremu z kwasem hialuronowym powinno zmniejszać TEWL, a tym samym zwiększać nawilżenie naskórka jedynie w momencie pozostawiania kremu z HA na skórze. Wynika z tego, że nie jest możliwe zaobserwowanie stopniowego zmniejszania się TEWL i wzrostu nawilżenia skóry podczas stosowania kremu z kwasem hialuronowym przez dłuższy okres czasu. Wzrost nawilżenia skóry następuje tylko w

momencie okluzji skóry egzogennym kwasem hialuronowym, który nie jest w stanie uzupełnić niedoborów kwasu hialuronowego wewnątrz warstwy rogowej. Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi w poniższej pracy, gdzie nawilżenie skóry, badane po kilku tygodniach aplikacji kremu z kwasem hialuronowym utrzymywało się u części ochotników na podobnym poziomie, jak przed rozpoczęciem badania.

Brak trwałej poprawy po zastosowaniu miejscowego preparatu z kwasem hialuronowym zaobserwowali również w swoim badaniu Krzyżostan i wsp. (268). Największy spadek TEWL obserwowali oni po 25 minutach od nałożenia preparatu z kwasem hialuronowym (ok. 15%) i co ciekawe był on mniejszy w porównaniu z zastosowaniem emulsji o tym samym składzie ale bez kwasu hialuronowego (20%). Po tygodniu spadek TEWL utrzymywał się na tym samym poziomie, co jest zgodne z wynikami badań autora niniejszej rozprawy, gdzie nawilżenie skóry podczas stosowania kremu z kwasem hialuronowym u części ochotników uległo poprawie (jeśli badanie wykonane było w czasie gdy na skórze pozostawała jeszcze warstwa okluzyjna kremu), a u części było zbliżone do stanu sprzed badania (u ochotników u których krem po paru godzinach przestawał już spełniać swoje funkcje). Na podkreślenie zasługuje fakt, że w poniższej pracy określono kiedy ochotnicy stosowali krem (rano i wieczorem) oraz czas przeprowadzenia badania po 6 tygodniach stosowania kremu (między godziną 11 a 13). Stąd można wysnuć wnioski na temat uzyskania różnorodnych wyników nawilżenia skóry po 6 tygodniach stosowania kremu. W innych opublikowanych pracach, autorzy nie podają po ilu godzinach od nałożenia kremu, skóra jest oceniana w ostatnim dniu trwania badań. Stąd może znakomite wyniki w badaniach komercyjnych kremów. Prawdopodobnie w tych badaniach skórę oceniano w ostatnim dniu badania krótko po zastosowaniu badanego kremu lub nawilżenie skóry w ostatnim dniu badania oceniano jedynie w badaniu ankietowym. Sytuacja taka miała miejsce w badaniu kremu High Resolution Refill-3X™ Lancôme Paris (269). W badaniu korneometrycznym przeprowadzonym po 4 godzinach od aplikacji kosmetyku na przedramiona 24 pacjentek, nawilżenie skóry wzrosło o 26%. Po 4 tygodniach 51 kobiet stosujących oceniany krem, wypełniło ankietę, w której nawilżenie oceniane było według pięciopunktowej skali. 94% respondentek odpowiedziało, że „całkowicie się zgadza” lub „zgadza się” ze stwierdzeniem, że skóra pod wpływem kremu jest nawilżona. Niekiedy bardzo dobra poprawa nawilżenia skóry w badaniach kosmetyków z kwasem hialuronowym, wynika z zastosowania w nich dodatkowych składników, które lepiej niż HA wpływają na poprawę hydratacji naskórka. Tak może być w przypadku kremu Pure Radiance firmy Lumene (270). W badaniu

corneometrycznym 20 kobiet uzyskano poprawę nawilżenia skóry utrzymującą się na poziomie 30,5% po 8 godzinach od zastosowania kremu. Tak długi efekt może być wynikiem dodania do kremu trawy azjatyckiej (*Imperata cylindrica*) i oleju makadamia (*Macadamia oil*).

Powyższy tok rozumowania nie wyjaśnia jednak dlaczego w niniejszym badaniu, u części ochotników stosujących krem z kwasem hialuronowym, doszło do spadku nawilżenia skóry. Bardzo możliwe, że przyczyniła się do tego duża liczba i różnorodność składników kremu (załącznik 7). U osób z uszkodzoną barierą hydrolipidową bądź wrażliwych na któryś ze składników kremu, mogło dojść do zwiększenia przepuszczalności warstw naskórka, zwiększenia utraty wody przez naskórek i spadku jego nawilżenia. Wynikać to może między innymi z obecności w kremie związków będących promotorami wchłaniania (gliceryna). Przyczyniają się one z jednej strony do szybszego i głębszego wnikania innych składników kremu do naskórka, a z drugiej ułatwiają parowanie wody ze skóry. Również olejki eteryczne (m.in.: linalol, geraniol, cytronellol, limonen) powodują rozluźnienie połączeń międzykomórkowych dzięki pęcznieniu cementu łączącego komórki.

Ponadto do naruszenia płaszcza wodno-lipidowego może dochodzić pod wpływem substancji powierzchniowo czynnych, będących emulgatorami (np. stearynian glicerolu, sól sodowa glutamianu stearylowego, alkohol cetearylowy) oraz pod wpływem konserwantów (np. parabenów). Wszystkie te substancje mogły naruszyć barierę naskórkową, zwiększając przeznaskórkową utratę wody, a tym samym zmniejszając nawilżenie skóry w pomiarach corneometrycznych. Ze względu na to, że stężenia tych substancji pozostają nieznane, trudno dokładnie określić która z nich mogła wyrządzić największą szkodę. Tak więc kosmetyki z kwasem hialuronowym mogą wywoływać rozmaite efekty w zależności od kompletnego składu kosmetyku, a także jego formy fizykochemicznej.

Podobne wyniki, świadczące o pogorszeniu stanu nawilżenia skóry, po zastosowaniu komercyjnego kremu z kwasem hialuronowym uzyskali w swoich badaniach Krzyżostan i wsp. (268). Wartość TEWL mimo, że po 25 minutach obniżyła się o 3%, a po tygodniu zaobserwowano nieznaczny spadek TEWL, to w kolejnych 2 tygodniach wzrosła o 8% po 2 tyg i 6% po 3 tyg. Wzrost przeznaskórkowej utraty wody wiązać się powinien ze spadkiem nawilżenia skóry (choć w cytowanym badaniu takiego bezpośredniego przełożenia nie zaobserwowano).

W niniejszym badaniu nie zaobserwowano wzrostu elastyczności skóry i spłylenia zmarszczek po zastosowaniu kremu z kwasem hialuronowym. Podobnie Schweikert i wsp. (271) w dwutygodniowym badaniu na 5 ochotnikach, porównującym działanie kremu z kwasem hialuronowym oraz kremu z wyciągiem z nasion tamaryndy, nie wykazali wpływu HA na szerokość zmarszczek a szorstkość powierzchni skóry po aplikacji kremu z HA wzrosła. Autorzy cytowanego badania, wzrost szorstkości skóry tłumaczyli pozostawianiem na jej powierzchni wiskoelastycznego filmu z kwasu hialuronowego. Z kolei brak spłylenia zmarszczek według autorów wynikał ze zbyt dużej cząsteczki kwasu hialuronowego, która w przeciwieństwie do nasion tamaryndy nie miała szans na penetrację w warstwę rogową i stabilne połączenie się z białkiem korneocytów.

Jednak w badaniu Pavicic i wsp. (272) uzyskano pod wpływem stosowania przez 60 dni preparatów z kwasem hialuronowym o różnej masie cząsteczkowej (50, 130, 300, 800 i 2000 kDa), nie tylko wzrost nawilżenia skóry (z wyjątkiem m. cz. 50 kDa), ale również poprawę jej elastyczności (dla wszystkich mas cząsteczkowych HA) i spłylenie zmarszczek oceniane w profilometrii (dla LMWHA). Autorzy cytowanego artykułu sugerują, że nowe cząsteczki kwasu hialuronowego są w stanie penetrować do skóry po aplikacji zewnętrznej i opóźniać procesy fotostarzenia. Dotychczasowe publikacje zaprzeczały takiemu podejściu, argumentując że cząsteczka kwasu hialuronowego pozyskiwana drogą inżynierii genetycznej w procesie fermentacji streptokoków jest zbyt duża aby penetrować do naskórka. Pavicic i wsp. (272) twierdzą jednak, że ich cząsteczki kwasu hialuronowego są w stanie penetrować do naskórka, dzięki temu że pochodzą z nowego źródła – fermentacji bakterii *Bacillus subtilis* i są identyczne strukturalnie z naturalnym HA. Według nieopublikowanych danych autorów cytowanego artykułu, w badaniu *in vitro*, najlepszą zdolność penetracji i działanie przeciwzapalne ma kwas hialuronowy o m. cz. 50 kDa. Jednak ich badanie *in vivo* nie wykazało ścisłej korelacji pomiędzy masą cząsteczkową a obserwowanymi parametrami. Mimo to wydaje się, że masa cząsteczkowa kwasu hialuronowego, faktycznie może mieć wpływ na jego zdolność przenikania do naskórka.

Stosowanie kremu hialuronowego zewnętrznie wydaje się być pozbawione poważnych działań niepożądanych. Mimo stosunkowo dużej ilości skutków ubocznych, zgłaszanych przez ochotników niniejszego badania (40%), wszystkie one były łagodne i przemijające. Większość zgłaszanych działań niepożądanych kremu z kwasem hialuronowym dotyczyła uczucia „maski” na skórze po jego zastosowaniu, jedna osoba uskarżała się na łuszczenie skóry czoła. „Efekt maski” mógł być związany z dużą zawartością w kremie substancji

będących emolientami, a także z niedopasowaniem kremu do rodzaju cery. Krem z kwasem hialuronowym w teorii może być przeznaczony do każdego typu skóry. Wydaje się jednak, że wieloskładnikowe preparaty powinny być przypisane konkretnym rodzajom cery. Ponadto jeden z ochotników zgłosił łzawienie oczu po aplikacji kremu, co mogło wynikać z nadwrażliwości na któryś ze składników bogatej receptury preparatu.

Ostatnim etapem badania był pomiar poziomu kwasu hialuronowego w osoczu krwi ochotników na początku i na końcu poszczególnych terapii hialuronianem. Sprawdzono również zależność poziomu kwasu hialuronowego we krwi od wieku probantów.

Wykazano, że z wiekiem poziom kwasu hialuronowego we krwi rośnie. Istotna korelacja była jednak jedynie przed włączeniem terapii w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym ($p = 0.00$). Brak korelacji w pozostałych grupach, wynikać mógł ze zbyt małej ich liczebności oraz ze zbyt małej rozpiętości wieku ochotników. Wynik ten jest jednak zgodny z innymi badaniami, w których również wykazano postępujący wzrost poziomu kwasu hialuronowego w przebiegu procesu starzenia (101,103). Wzrost poziomu kwasu hialuronowego we krwi wynika z jego zwiększonej degradacji w tkankach oraz zmniejszonego katabolizmu w wątrobie.

Ponadto w niniejszym badaniu wykazano statystycznie istotny wzrost poziomu kwasu hialuronowego we krwi po jego suplementacji doustnej ($p = 0.02$). Ilość hialuronianu we krwi wzrosła z poziomu 16.00 ± 5.32 , do 23.04 ± 13.64 . Wynik ten potwierdza możliwość absorbowania do krążenia ogólnego doustnie podanego HA. Możliwość absorpcji do krwi i wychwytu przez tkanki łączne niewielkiej ilości doustnie podanego kwasu hialuronowego została też potwierdzona w badaniach Balogh'a i wsp. (220). Również w badaniu Sato i wsp. (264) zanotowano wzrost poziomu HA w surowicy po doustnej suplementacji kwasu hialuronowego. Wzrost był wyższy niż w poniższym badaniu (z poziomu $14,1 \pm 5,8$ do $27,4 \pm 14,2$), co mogło wynikać z nieco większej dawki przyjmowanego doustnie kwasu hialuronowego (120 mg/d). Co ciekawe w cytowanym badaniu, autorzy wykazali również istotny wzrost poziomu kwasu hialuronowego we krwi ochotników przyjmujących placebo (z poziomu $33,9 \pm 46,6$, po $49,9 \pm 49,1$). W niniejszej rozprawie doktorskiej jako kontrolę traktowano grupę stosującą krem z kwasem hialuronowym. Poziom kwasu hialuronowego

wzrósł w tej grupie nieistotnie (z poziomu 20.01 ± 6.81 do 22.49 ± 9.16). Mimo, że udowodniono stopniowy wzrost ilości kwasu hialuronowego we krwi z wiekiem, w przeciągu kilku tygodni badania nie mógł on jednak zwiększyć się tak wyraźnie, jak w cytowanym badaniu Sato i wsp. (264). Bardziej prawdopodobny wydaje się być wynik uzyskany w poniższej pracy.

Zaskakujący wynik uzyskano natomiast w grupie poddanej intradermoterapii. Poziom kwasu hialuronowego we krwi obniżył się w tej grupie z wysokości 19.95 ± 5.67 do 15.24 ± 3.94 , co było różnicą statystycznie istotną ($p = 0.01$). Obniżenie poziomu kwasu hialuronowego we krwi po zastosowaniu intradermoterapii, może świadczyć o zmniejszeniu degradacji kwasu hialuronowego w tkankach, po bezpośrednim wprowadzeniu do tkanek egzogenego hialuronianu o dużej cząsteczce. Dla potwierdzenia tej hipotezy, należałoby przeprowadzić dalsze szczegółowe badania. Ponadto należy wziąć po uwagę niewielką ilość ochotników w grupie badawczej (15 osób).

Zastosowane terapie kwasem hialuronowym przyczyniły się w różnym stopniu do poprawy nawilżenia skóry twarzy. Najszybciej efekt był widoczny po zastosowaniu kremu, ale utrzymywał się krótkotrwale. Najpóźniej (po miesiącu) poprawa była zauważalna w przypadku suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.

Niniejsze badanie, mimo że nie zostało przeprowadzone z kontrolą placebo, dostarczyło przydatnych informacji na temat wpływu na skórę oraz przenikania do krwioobiegu preparatów kwasu hialuronowego w zależności od drogi ich wprowadzenia do skóry. Zrodziło jednak wiele pytań, co jest częste w przypadku nowych substancji i technik. Należałoby rozszerzyć badania i włączyć do nich również preparaty kwasu hialuronowego drobnocząsteczkowego. Ponadto badanie to wskazuje, że na producentów powinien zostać nałożony obowiązek podawania wielkości cząsteczki kwasu hialuronowego, wykorzystywanego w przemyśle medycznym i kosmetycznym.

9 Wnioski

1. Preparaty kwasu hialuronowego stosowane w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikowane zewnętrznie skutecznie wpływają na poprawę nawilżenia skóry. Największy wzrost nawilżenia skóry następuje w wyniku intradermoterapii (o 9,01) oraz suplementacji doustnej (o 7,24). Wzrost nawilżenia skóry po aplikacji kremu z kwasem hialuronowym jest krótkotrwały. Po kilku godzinach od aplikacji, nie notuje się już istotnego wzrostu nawilżenia skóry.
2. Preparaty wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego stosowane w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikowane zewnętrznie nie wpływają na poprawę elastyczności skóry. Należałoby w rozszerzonych badaniach porównać właściwości preparatów wielko i drobnocząsteczkowych.
3. Największa kliniczna poprawa stanu skóry następuje po zastosowaniu intradermoterapii kwasem hialuronowym.
4. Działania niepożądane wynikające ze stosowania preparatów kwasu hialuronowego w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikowanych zewnętrznie są nieliczne i przemijające.
5. Poziom kwasu hialuronowego w osoczu krwi wzrasta istotnie wyłącznie po stosowaniu suplementacji doustnej hialuronianu, jednak żadna z terapii kwasem hialuronowym nie wpływa na wartość kwasu hialuronowego jako markera chorób stawów, wątroby i rozrostów nowotworowych. W grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie, poziom hialuronianu wzrósł o 7,03, zmalał natomiast pod wpływem intradermoterapii (o 4,71). Odchylenia poziomu kwasu hialuronowego w osoczu pod wpływem zastosowanych terapii, nie spowodowały jednak przekroczenia zakresu norm.
6. Suplementacja doustna kwasu hialuronowego, okresowe zabiegi intradermoterapii kwasem hialuronowym oraz zmniejszenie przelnaskórkowej utraty wody za pomocą okluzji skóry odpowiednimi preparatami (niekoniecznie zawierającymi w swoim składzie kwas hialuronowy) wydają się być optymalnymi metodami zwiększającymi nawilżenie skóry.

10 Streszczenie

Popularność kwasu hialuronowego na przestrzeni ostatnich lat ciągle rośnie. Początkowo wykorzystywany w różnych dziedzinach medycyny klasycznej, obecnie stał się topowym produktem dermatologii estetycznej i kosmetologii.

Wpływ produktów kwasu hialuronowego na skórę nie został jednak dotychczas jednoznacznie opisany. Doniesienia naukowe są nierzadko sprzeczne, metody badawcze niewystandaryzowane, a wielkość cząsteczki kwasu hialuronowego użytego w badaniach zupełnie nie brana pod uwagę.

Celem niniejszej pracy była próba oceny wpływu na skórę oraz przenikania do krwioobiegu wybranych produktów kwasu hialuronowego. W tym celu, zastosowano trzy preparaty nieusieciowanego kwasu hialuronowego, charakteryzujące się dużą masą cząsteczkową: przeznaczony do intradermoterapii Ialest®, suplement diety Hialu – Femin® oraz krem przeciwzmarszczkowy Frei Hyaluron Aktiv®.

Badaniami objęto 55 kobiet w przedziale wiekowym 26 – 68 lat. Przydzielono je losowo do jednej z trzech grup terapeutycznych. Struktura poszczególnych grup była zbliżona, zarówno pod względem wieku, jak i palenia tytoniu oraz ilości wypijanych płynów na dobę. Kryteriami włączenia do badania były: płeć żeńska oraz chęć poprawy nawilżenia swojej skóry przez ochotników. Z badań wyłączono osoby niepełnoletnie oraz osoby spełniające kryteria wykluczenia z badania w poszczególnych grupach.

W grupie pierwszej, 15 ochotników miało wykonane trzy zabiegi intradermoterapii (metodą depot) nieusieciowanym, wielkocząsteczkowym kwasem hialuronowym. W grupie drugiej 20 ochotników przyjmowało doustnie preparat wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Grupa trzecia, składająca się z 20 probantów, aplikowała na skórę krem z kwasem hialuronowym. Skórę oceniali badacz i ochotnicy za pomocą wybranych skal. Do oceny nawilżenia wykorzystano corneometr, elastyczność określono reviscometrem. Poziom kwasu hialuronowego we krwi oznaczano w teście immunoenzymatycznym Elisa.

Po 6 tygodniach badania stwierdzono wyraźny wzrost nawilżenia skóry po zastosowaniu intradermoterapii (o 9,01) oraz nieco niższy w wyniku suplementacji doustnej (o 7,24). Po kilku godzinach od aplikacji kremu z kwasem hialuronowym, nie notowano już istotnego wzrostu nawilżenia skóry. Żaden z zastosowanych preparatów

wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego nie wpłynął na poprawę elastyczności skóry. Poprawa kliniczna była najwyższa po zabiegach intradermoterapii, prawdopodobnie na skutek obrzęku i naprawy skóry po licznych iniekcjach. Zarówno intradermoterapia, jak i suplementacja doustna kwasu hialuronowego zmieniała poziom kwasu hialuronowego we krwi. Pozostawał on jednak nadal w zakresie normy, a więc nie obniżał użyteczności kwasu hialuronowego jako markera chorób wątroby, stawów oraz rozrostów nowotworowych. Działania niepożądane były nieliczne i przemijające. Najdłużej utrzymywał się krwiatek powstały w wyniku intradermoterapii kwasem hialuronowym, a najwięcej działań niepożądanych zgłaszali pacjenci stosujący krem.

Część badawcza niniejszej pracy wskazała na sens suplementacji doustnej wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego, zwłaszcza że poprawia on nawilżenie nie tylko skóry twarzy ale całego ciała. Wykazała również, że do uzyskania poprawy klinicznej, najlepiej przyczynia się intradermoterapia.

Konieczne są jednak dalsze badania *in vivo*, badające wpływ kwasu hialuronowego na skórę. Należałoby w nich porównać preparaty kwasu hialuronowego wielko i drobnocząsteczkowego.

11 Summary

The popularity of hyaluronic acid over the last years has been constantly on the increase. Originally used in different fields of classical medicine, nowadays it has turned into a top product in aesthetic dermatology and cosmetology.

However, the influence of hyaluronic acid products on skin has not been straightforwardly described yet. Academic reports are often contradictory, research methods are not standardized, and the size of a molecule of hyaluronic acid used in studies is not taken under consideration at all.

The aim of this paper was to endeavour to assess the influence of given hyaluronic acid products on skin and their permeation in the bloodstream. In order to do this, three products of non-crossed-linked hyaluronic acid were used, characterized by large molecule mass: Ialest® used for intradermotherapy, dietary supplement Hialu – Femin ®and anti-wrinkle cream Frei Hyaluron Aktiv®.

The studies involved 55 women between the ages of 26 and 68. They were randomly assigned to one of the three therapeutic groups. The structure of particular groups was similar, both when it comes to age, smoking and the amount of liquids per day. The criteria of inclusion into the group were the following: female sex and the willingness to improve moisturity of skin of the volunteers. People aged under 18 and persons that fulfilled the criteria of exclusion in particular groups were excluded from studies.

In the first group, 15 volunteers underwent three procedures of intradermotherapy (depot method) with non crossed-linked, high-molecular hyaluronic acid. In the second group, 20 volunteers took orally a preparation of hyaluronic acid. The third group consisted of 20 volunteers and had a cream with hyaluronic acid applied on their skin. The skin was then assessed by the researcher and volunteers by given scales. In order to assess moisturity, a corneometer was used, and elasticity was assessed by reviscometer. The level of hyaluronic acid in the blood was determined by immunoenzymatic test Elisa.

Six weeks after the research a significant increase of the moisturity of the skin was observed after intradermotherapy procedures (by 9,01), and a bit lower increase was noted as a result of oral supplementation (by 7,24). Few hours after the application of cream with hyaluronic acid no significant increase of skin moisturity was observed. None of the applied

preparations of high-molecular hyaluronic acid influenced the improvement of skin elasticity. The clinical improvement was highest after intradermotherapy, probably as a result of swelling and the process of skin repair after numerous injections. Both intradermotherapy and oral supplementation of hyaluronic acid changed the level of hyaluronic acid in blood. However, it was still normal, therefore it did not lower utility of hyaluronic acid as a marker of liver and joint diseases and cancerous hyperplasias. Adverse reactions were few and passing. A haematoma as a result of intradermotherapy with hyaluronic acid was the one that lasted the longest, and the largest amount of adverse reactions was reported by patients using the cream.

The research part of this work showed grounds for using oral supplementation of high-molecular hyaluronic acid, especially because it improves the moisturity not only of the skin on the face but also of the whole body. It also showed that intradermotherapy contributes mostly to clinical improvement.

However, further *in vivo* studies are necessary, which would examine the influence of hyaluronic acid on skin. They would compare the preparations of high- and low-molecular hyaluronic acid.

12 Bibliografia

1. **Głowacki A., Koźma E., Olczyk K. i wsp.:** Glikozaminoglikany – struktura i funkcja. *Post. biochem.* 1995; 42 (2): 139 -148.
2. **Price R. D., Berry M. G., Nasavaria H.A.:** Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2007; 60 (10): 1110-1119.
3. **Stankiewicz A., Wójcik E.:** Zastosowanie pochodnych kwasu hialuronowego w okulistyce. *Ordynator leków.* 2006; 6, 1 (51): 3-7.
4. **Skop B., Drózdź M., Żak I.:** Proteoglycans: their structure and function in the connective tissue. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1989; 2-4 (43): 329-347.
5. **Galus R., Antyszko M., Włodarski P.:** Zastosowanie kwasu hialuronowego w medycynie klinicznej. *Pol. Merk. Lek.* 2006; XX (119): 606-608.
6. **Heldin P.:** Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36: 967-973.
7. **Matarasso S. L., Carruthers J. D., Jewell M. L.:** Consensus Recommendations for Soft-Tissue Augmentation with Nonanimal Stabilized Hyaluronic Acid (Restylane). Restylane Consensus Group. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006; 117: 3S-34S.
8. **Wang F., Garza L. A., Kang S. i wsp.:** In Vivo Stimulation of De Novo Collagen Production Caused by Cross – linked Hyaluronic Acid Dermal Filler Injections in Photodamaged Human Skin. *Arch. Dermatol.* 2007; 143: 155-163.
9. **Jackson R. L., Busch S. J., Cardin A. D.:** Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 1991; 71 (2): 481-539.
10. **Cięciara M., Wagner L.:** Kwas hialuronowy. *Stomatologia współczesna.* 2003; supl. 2: 47-50.
11. **Scott J. E.:** Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.* 1988; 252: 313-323 .
12. **Raszeja-Kotelba B., Neumann E., Bowszyc J.:** Kwas hialuronowy i skóra. *Polish Journal Of Cosmetology.* 2002; 1: 21-25.
13. **Wisłowska M.:** Choroba zwyrodnieniowa stawów-glikozaminoglikany. *Świat medycyny i farmacji.* 2006; 36-41.
14. **Olczyk P., Komosińska-Vassev K., Winsz-Szczotka K. i wsp.:** Hialuronian – struktura, metabolizm, funkcje i rola w procesach gojenia ran. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2008; 62: 651-659.
15. **Taylor K. R., Trowbridge J.M., Rudisill J.A. i wsp.:** Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 17079-17084.

16. **Tammi M. I., Day A. J., Turley E. A.:** Hyaluronan and homeostasis, a balancing act. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 4581–4584.
17. **Scheibner K. A., Lutz M.A., Boodoo S. i wsp.:** Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* 2006; 177: 1272–1281.
18. **Kula B., Jurczak T, Przeniosło L. i wsp.:** Glikozaminoglikany (GAG)-właściwości, występowanie i funkcja. *Ann. Acad. Med. Siles.* 1995; 29: 273-281.
19. **Scott J. E.:** Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J.* 1992; 6: 2639-2645.
20. **Past E.:** Historia kwasu hialuronowego. Od leczenia do kosmetyki. *Gabinet prywatny.* 1998; 4: 24-27.
21. **Lemperle G., Morhenn V., Charrier U.:** Human Histology and Persistence of Various Injectable filler Substances for Soft Tissue Augmentation. *Aesth. Plast. Surg.* 2003; 27: 354-366.
22. **Brown M. B., Jones S. A.:** Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2005; 19: 308–318.
23. **Armstrong S. E., Bell D. R.:** Relationship between lymph and tissue hyaluronan in skin and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 283 (6): H2485-94.
24. **Hascall V. C., Majors A.K., De La Motte C.A. i wsp.:** Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1673: 3–12.
25. **De Angelis P. L.:** Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *Anat. Rec.* 2002; 268: 317–326.
26. **Bodevin-Authelet S., Kusche-Gullberg M., Pummil P.E. i wsp.:** Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 8813–8818.
27. **Reed R. K., Lilja K., Laurent T. C.:** Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol. Scand.* 1988; 134 (3): 405-411.
28. **Laurent T .C., Fraser J. R.:** Hyaluronan. *Faseb J.* 1992; 6: 2397–2404.
29. **Rechberger T., Monist M.:** Zastosowanie terapeutyczne kwasu hialuronowego w ginekologii. *Ordynator leków.* 2005; 5 (11-12) (49-50): 22-25.
30. **Wang C., Tammi M., Tammi R.:** Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages. *Histochemistry.* 1992; 98: 105–112.
31. **Meyer L. J., Stern R.:** Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 102: 385–389.

32. **Agren U. M., Tammi M., Ryyänen M. i wsp.:** Developmentally programmed expression of hyaluronan in human skin and its appendages. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 109: 219–224.
33. **Tammi R., Ripellino J. A., Magrolis R. U. i wsp.:** Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Dermatol.* 1988; 90: 412-414.
34. **Wells A. F., Lundin Å., Michaësson G.:** Histochemical localization of hyaluronan in psoriasis, allergic contact dermatitis and normal skin. *Acta Derm. Venereol.* 1991; 71: 232–238.
35. **Tammi R., Ripellino J. A., Margolis R. U. i wsp.:** Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 92: 326–332.
36. **Sakai S., Yasuda R., Sayo T. i wsp.:** Hyaluronan Exist in the Normal Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 114 (6): 1184-7.
37. **Sugiyama Y., Shimada A., Sayo T. i wsp.:** Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 110: 116–121.
38. **Ghosh P., Hutadilok N., Adam N. i wsp.:** Interactions of hyaluronan (hyaluronic acid) with phospholipids as determined by gel permeat chromatography, multi-angle laser-light-scattering photometry and 1H-NMR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 1994; 16: 237-44.
39. **McCourt P.:** How does the hyaluronan scrap-yard operate? *Matrix Biol.* 1999; 18: 427–432.
40. **Tammi R., Säämänen A.M., Maibach H.I. i wsp.:** Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 97: 126–130.
41. **Frost G. I., Stern R.:** A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. *Anal. Biochem.* 1997; 251: 263–269.
42. **Agren U. M., Tammi R. H., Tammi M. I.:** Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 996–1001.
43. **Tuhkanen A. L., Tammi M., Pelttari A. i wsp.:** Ultrastructural analysis of human epidermal CD44 reveals preferential distribution on plasma membrane domains facing the hyaluronan-rich matrix pouches. *J. Histochem. Cytochem.* 1998; 46: 241–248.
44. **Reed R. K., Laurent UB, Fraser JR i wsp.:** Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: H532-5.

45. **Duruöz M. T., Turan Y, Cerrahoglu L i wsp.:** Serum hyaluronic acid levels in patients with ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol.* 2008; 27 (5): 621-6.
46. **Cechowska – Pasko M., Pałka J.:** Age – depended changes in glycosaminoglycans content in the skin of fasted rats. A possible mechanism. *Exp. Toxic. Pathol.* 2000; 52: 127 – 131.
47. **Galęba A.:** Mezoterapia jako jedna z metod bioreitalizacji skóry. *Derm. Estet.* 2010; 12 (1): 34-40.
48. **Johl S. S., Burgett R. A.:** Dermal filler agents: a practical review. *Current Opinion in ophthalmology.* 2006; 17: 471 – 479.
49. **Fleishmajer R., Perlish J. S., Bashey R. I.:** Aging of human dermis. W: Robert C. L. *Frontiers of matrix biology*, Karger, Basel, 1973.
50. **Hadshiew I. M., Eller M. S., Gilchrest B. A.:** Skin aging and photoaging, the role of DNA damage and repair. *American Journal of Contact Dermatitis.* 2000; 11: 19-25.
51. **Murad H., Tabibian M. P.:** The effect of an oral supplement containing glucosamine, amino acids, minerals, and antioxidants on cutaneous aging: a preliminary study. *J. Dermatolog. Treat.* 2001; 12 (1): 47-51.
52. **Romanowicz L., Bańkowski E., Jaworski S.:** Elektrophoretic and chromatographic patterns of glycosaminoglycans of the umbilical cord vessels and their alteration In EPH – gestosis. *Acta Biochimica Polonica.* 1998; 45 (3): 805-809.
53. **Podgórska E.:** Biorewitalizacja skóry twarzy i szyi – wybrane substancje i techniki. *Dermatologia estetyczna.* 2007; 9 (7): 69-70.
54. **Dąbrowski R.:** Hormonalna regulacja rozwoju tkanki łącznej ze szczególnym uwzględnieniem hormonów gruczołu tarczowego. *Endokrynol. Pol.* 1997; 48 (2): 289-302.
55. **Smith T. J.:** The effect of thyroid hormone on glycosaminoglycan accumulation in human skin fibroblasts. *Endocrinology.* 1981; 108: 2397-4201.
56. **Smith T. J., Murata Y., Horwitz A.L. i wsp.:** Regulation of glycosaminoglycan synthesis by thyroid hormones in vitro. *J. Clin. Invest.* 1982; 70 (5): 1066-1069.
57. **Akiyama H., Saito M., Qiu G. i wsp.:** Analytical studies on hyaluronic acid synthesis by normal human epidermal keratinocytes cultured in a serum-free medium. *Biol. Pharm. Bull.* 1994; 17: 361-364.
58. **Tammi R., Jansen C.T., Tammi M.:** Effects of retinoic acid on adult human epidermis in whole skin organ culture. *Arch. Dermatol. Res.* 1985; 277: 276-283.
59. **Shisiba Y.:** Thyroid hormone excess stimulates the synthesis of proteoglycan in human skin fibroblasts in culture. *Acta Endocrinol. Copenh.* 1990; 123: 541-546.

60. **Edward M., Oliver R. F.:** Changes in synthesis, distribution and sulphation of glycosaminoglycans of cultured human skin fibroblast upon ascorbate feeding. *J. Cell Sci.* 1983; 64: 245-254.
61. **Saarni H., Hopsu-Havu V. K.:** The decrease of hyaluronate synthesis by anti-inflammatory steroids in vitro. *Br. J. Dermatol.* 1978; 98: 445-449.
62. **Laurent T. C, Laurent U. B., Fraser J. R.:** Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann. Med.* 1996; 28 (3): 241-253.
63. **Gibson P. R., Fraser J. R., Colman J. C. i wsp.:** Change in serum hyaluronan: a simple index of short-term drug-induced changes in hepatic sinusoidal perfusion. *Gastroenterology.* 1993; 105 (2): 470-474.
64. **Corgenix Medical Corporation.** *Hyaluronic Acid (HA) Test Kit.* 2003 .
65. **Avila R. E., Carmo R. A., Farah Kde P. i wsp.:** Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis in patients with hepatitis C on haemodialysis. *Braz. J. Infect. Dis.* 2010; 14 (4): 335-341.
66. **McHutchison J. G., Blatt L. M., de Medina M. i wsp.:** Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15 (8): 945-951.
67. **Parsian H., Rahimipour A., Nouri M. i wsp.:** Serum hyaluronic acid and laminin as biomarkers in liver fibrosis. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 2010; 19 (2): 169-74.
68. **Nobili V., Alisi A., Torre G. i wsp.:** Hyaluronic acid predicts hepatic fibrosis in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Transl. Res.* 2010; 156 (4): 229-34.
69. **Kaneda H., Hashimoto E., Yatsuji S. i wsp.:** Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 21 (9): 1459-1465.
70. **Valenti L., Dongiovanni P.:** Serum hyaluronic acid for the screening of progressive nonalcoholic steatohepatitis in children: a promising approach. *Transl. Res.* 2010; 156 (4): 226-228.
71. **Suzuki A., Angulo P, Lymp J. i wsp.:** Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2005; 25 (4): 779-786.
72. **George J., Stern R.:** Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 348 (1-2): 189-197.
73. **Suzuki A., Mendes F., Lindor K.:** Diagnostic model of esophageal varices in alcoholic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; 17: 307 – 309.

74. **Ukarapol N., Wongsawasdi L, Ong-Chai S. i wsp.:** Hyaluronic acid: additional biochemical marker in the diagnosis of biliary atresia. *Pediatr Int.* 2007; 49 (5): 608-611.
75. **Turan Y., Bal S., Gurgan A. i wsp.:** Serum hyaluronan levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.* 2007; 26 (8): 1293-1298.
76. **Inoue R., Ishibashi Y., Tsuda E. i wsp.:** Knee osteoarthritis, knee joint pain and aging in relation to increasing serum hyaluronan level in the Japanese population. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19 (1): 51-57.
77. **Pavelka K., Forejtova S., Olejarova M. i wsp.:** Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12: 277-283.
78. **Neudecker B. A., Stern R., Connolly M. K.:** Aberrant serum hyaluronan and hyaluronidase levels in scleroderma. *Br. J. Dermatol.* 2004; 150 (3): 469-476.
79. **Yoshizaki A., Iwata Y., Komura K. i wsp.:** Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J. Rheumatol.* 2008; 35 (9): 1825-1829.
80. **Xing R. D., Chang S. M., Duan Y. Q. i wsp.:** Examination of serum hyaluronic acid level in patients with oral and maxillofacial malignancy. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2004; 22 (4): 309-311.
81. **Xing R. D., Chang S. M., Li J. H. i wsp.:** Serum hyaluronan levels in oral cancer patients. *Chin. Med. J. (Engl).* 2008; 121 (4): 327-330.
82. **Yabushita H., Kishida T., Fusano K. i wsp.:** Role of hyaluronan and hyaluronan synthase in endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 2005; 13 (6): 1101-1105.
83. **Xi W., Zhou Y., Lv S. i wsp.:** Plasma hyaluronan and collateral development in patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* 2010; 21 (4): 228-232.
84. **Aytekin M., Comhair S. A., de la Motte C. i wsp.:** High levels of hyaluronan in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 295 (5): L789-799.
85. **Papakonstantinou E., Kouri F. M., Karakiulakis G. i wsp.:** Increased hyaluronic acid content in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (6): 1504-1512.
86. **Mine S., Okada Y., Kawahara C. i wsp.:** Serum hyaluronan concentration as a marker of angiopathy in patients with diabetes mellitus. *Endocr. J.* 2006; 53 (6): 761-766.
87. **Al'Qteishat A., Gaffney J., Krupinski J. i wsp.:** Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. *Brain.* 2006; 129 (8): 2158-2176.

88. **Yaron I., Buskila D., Shirazi I. i wsp.:** Elevated levels of hyaluronic acid in the sera of women with fibromyalgia. *J. Rheumatol.* 1997; 24 (11): 2221-2224.
89. **Kim J. S., Lee S. S., Kim T. J. i wsp.:** Serum hyaluronic acid levels do not explain morning stiffness in patients with fibromyalgia. *Clin. Rheumatol.* 2010; 29 (5): 535-539.
90. **Werle E., Jäkel H. P., Müller A. i wsp.:** Serum hyaluronic acid levels are elevated in arthritis patients, but normal and not associated with clinical data in patients with fibromyalgia syndrome. *Clin. Lab.* 2005; 51 (1-2): 11-9.
91. **Bliddal H., Møller H. J., Schaadt M. i wsp.:** Patients with fibromyalgia have normal serum levels of hyaluronic acid. *J. Rheumatol.* 2000; 27 (11): 2658-2659.
92. **Neudecker J., Neudecker B. A., Raue W. i wsp.:** Hyaluronan levels during laparoscopic versus open colonic resections. *Surg. Endosc.* 2008; 22 (3): 660-663.
93. **Rössler A., László Z., Kvas E. i wsp.:** Plasma hyaluronan concentration: no circadian rhythm but large effect of food intake in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1998; 78: 573-577.
94. **Wong C. S. M., Gibson P. R.:** The effects of eating on plasma hyaluronic acid in patients with cirrhosis, its mechanism and influence on clinical interpretation. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998; 13: 1218-1224.
95. **Idobe Y., Murawaki Y., Ikutaq Y. i wsp.:** Post-prandial serum hyaluronan concentration in patients with chronic liver disease. *Intern. Med.* 1998; 37: 1568-1575.
96. **Fraser J. R., Gibson P. R.:** Mechanisms by which food intake elevates circulating levels of hyaluronan in humans. *J. Intern. Med.* 2005; 258 (5): 460-466.
97. **Laurent U. B. G., Laurent T. C.:** On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem. Int.* 1981; 2: 195-199.
98. **Piehl-Aulin K., Laurent C., Engström-Laurent A. i wsp.:** Hyaluronan in human skeletal muscle of lower extremity: concentration, distribution, and effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 1991; 71: 2493-2498.
99. **Reed R. K., Laurent T. C., Taylor A. E.:** Hyaluronan in prenodal lymph from skin changes with lymph flow. *Am. J. Physiol.* 1990; 259: H1097-100.
100. **Engström-Laurent A., Laurent U. B. G., Lilja K. i wsp.:** Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1985; 45: 497-504.
101. **Lindqvist U., Laurent T. C.:** Serum hyaluronan and amino terminal propeptide of type III procollagen: variation with age. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1992; 52: 613 - 621.
102. **Criscione L. G., Elliott A. L., Stabler T. i wsp.:** Variation of serum hyaluronan with activity in individuals with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005; 13 (9): 837-840.

103. **Kuźnik-Trocha K., Olczyk K., Winsz-Szczotka K. i wsp.:** Zmiany stężenia kwasu hialuronowego osocza krwi w przebiegu procesu starzenia. *Diagn. Lab.* 2005; 41 (3): 245–253.
104. **Fraser J. R., Laurent T. C., Laurent U. B.:** Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 1997; 242: 27 – 33.
105. **Zeeh J., Platt D.:** The aging liver: structural and functional changes and their consequences for drug treatment in old age. *Gerontology.* 2002; 48: 121 – 127.
106. **Jameson J. M., Cauvi G., Sharp L.L. i wsp.:** T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 1269–1279.
107. **Kakizaki I., Kojima K., Takagaki K. i wsp.:** A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 33281–33289 .
108. **Rees S. G., Curtis C.L., Dent C.M. i wsp.:** Catabolism of aggrecan proteoglycan aggregate components in short-term explant cultures of tendon. *Matrix Biol.* 2005; 24: 219–231.
109. **Toole B. P.:** Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer.* 2004; 4: 528–539.
110. **Weindl G., Schaller M., Schäfer-Korting M. i wsp.:** Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular, biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2004; 17: 207–213.
111. **Taylor K. R., Gallo R. L.:** Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006; 20: 9–22.
112. **Reed R. K., Townsley M. I., Zhao Z. i wsp.:** Lymphatic hyaluronan flux from skin increases during increased lymph flow induced by intravenous saline loading. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1994; 14: 56–61.
113. **Reed R. K., Laurent U. B. G., King S. i wsp.:** Effect of increased interstitial fluid flux on fractional catabolic rate of high molecular weight [3H]hyaluronan injected in rabbit skin. *Acta Physiol. Scand.* 1996; 156: 93–98.
114. **Tammi R., Rilla K., Pienimäki J. P. i wsp.:** Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route catabolism. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 35111–35122.
115. **Lepperdinger G., Mullegger J., Kreil G.:** Hyal2–less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 2001; 20: 509–514.
116. **Powell J. D., Horton M. R.:** Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol. Res.* 2005; 31: 207–218.

117. **Fraser J. R. E., Laurent T. C., Pertoft H. i wsp.:** Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* 1981; 200: 415–424.
118. **Knudson C. B., Knudson W.:** Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 1993; 7: 1233–1241.
119. **Girish K. S., Kemparaju K.:** The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007; 80: 1921–1943.
120. **Turino G. M., Cantor J. O.:** Hyaluronan in respiratory injury and repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 1169–1175.
121. **Dechert T. A., Ducale A. E., Ward S. I. i wsp.:** Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.* 2006; 14: 252–258.
122. **Day A. J., Prestwich G. D.:** Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 4585–4588.
123. **Waller J. M., Maibach H. I.:** Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res. Technol.* 2006; 12: 145–154.
124. **Slevin M., Kumar S., Gaffney J.:** Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 41046–41059.
125. **Asari A., Kanemitsu T., Kurihara H.:** Oral administration of high molecular weight hyaluronan (900 kDa) controls immune system via Toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* 2010; 285 (32): 24751–24758.
126. **Weigel P. H., Hascall V. C., Tammi M.:** Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (22): 13997–14000.
127. **Aragona P., Papa V., Micali A. i wsp.:** Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br. J. Ophthalmol.* 2002; 86 (2): 181–184.
128. **Colletta V., Dioguardi D., Di Lonardo A. i wsp.:** A trial to assess the efficacy and tolerability of Hyalofill-F in nonhealing venous leg ulcers. *J. Wound Care.* 2003; 12 (9): 357–360.
129. **Koller J.:** Topical treatment of partial thickness burns by silver sulfadiazine plus hyaluronic acid compared to silver sulfadiazine alone: a double-blind, clinical study. *Drug Exp. Clin. Res.* 2004; 30 (5-6): 183–190.
130. **Reinmuller J. R.:** Hyaluronic acid. *Aesthetic Surg. J.* 2003; 23: 309–311.

131. **Tsaparas Y., Denton A.:** Hyaluronic acid for the correction of HIV-associated facial lipodystrophy. *Otolaryngology. Head and neck surgery.* 2004; 131: 80-81.
132. **Elliott L., Rashid R. M., Colome M.:** Hyaluronic acid filler for steroid atrophy. *J. Cosmet. Dermatol.* 2010; 9 (3): 253-255.
133. **Liguori V., Guillemain C., Pesce G. F. i wsp.:** Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 1997; 42: 155-161.
134. **Miltne O., Schneider U., Siebert C. H. i wsp.:** Efficacy of intraarticular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis-a prospective clinical trial. *Osteoarthritis cartilage.* 2002; 10: 680-686.
135. **Curran M. P.:** Hyaluronic acid (Supartz®): a review of its use in osteoarthritis of the knee. *Drugs Aging.* 2010; 27 (11): 925-941.
136. **Kobayashi K., Matsuzaka S., Yoshida Y. i wsp.:** The effects of intraarticularly injected sodium hyluronate on levels of intact aggrecan and nitric oxide in the joint fluid of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12: 536-542.
137. **Karatay S., Kizitunc A., Yildirim K. i wsp.:** Effects of different hyaluronic acid products on synovial fluid levels of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in knee osteoarthritis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2004; 34: 330-335.
138. **Manfredini D., Piccotti F., Guarda-Nardini L.:** Hyaluronic acid in the treatment of TMJ disorders: a systematic review of the literature. *Cranio.* 2010; 28 (3): 166-176.
139. **Rodrigues S. V.:** Hyaluronan-containing mouthwash as an adjunctive plaque-control agent. *Oral Health Prev. Dent.* 2010; 8 (4): 389-394.
140. **Hellstrom S., Laurent C.:** Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 1987; 442: 54-61.
141. **Pellicano M., Guida M., Bramante S. i wsp.:** Reproductive outcome after autocrosslinked hyaluronic acid gel application in infertile patients who underwent laparoscopic myomectomy. *Fertil. Steril.* 2005; 83 (2): 498-500.
142. **Guida M., Acunzo G., Di Spiezio Sardo A. i wsp.:** Effectiveness of autocrosslinked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic surgery: a prospective, randomized, controlled study. *Hum. Reprod.* 2004; 19 (6): 1461-1464.
143. **Boselli F., Vezzani C., Chiossi G.:** Terapia powierzchniowa kwasem hialuronowym po zabiegu elektrochirurgicznym szyjki macicy. *Materiał informacyjny Miralex.*
144. **Markowska J., Madry R., Markowska A.:** The effect of hyaluronic acid (Cicatridine) on healing and regeneration of the uterine cervix and vagina and vulvar dystrophy therapy. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* . 2011; 32 (1): 65-68.

145. **Belluco C., Meggiolaro F., Pressato D. i wsp.:** Prevention of postsurgical adhesions with an autocrosslinked hyaluronian derivative gel. *J. Surg. Res.* 2001; 100: 217-221.
146. **Lemperle G., Morhenn V., Charrier U.:** Human Histology and Persistence of Various Injectable filler Substances for Soft Tissue Augmentation. *Aesthetic Plastic Surgery.* 2003; 27: 354-366.
147. **Stefanaki C., Katsambas A.:** Wypełniacze skóry. Co nowego? *Derm. Estet.* . 2002; 4: 6.
148. **Naoum C. N., Dasiou – Plakida D.:** Dermal filler materials and botulin toxin. *International Journal of Dermatology.* 2001; 40: 609 – 621.
149. **Narins R. S., Brandt F., Leyden J. i wsp.:** A randomized, double-blind multicenter comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zyplast for the correction of nasolabial folds. *Dermatol. Surg.* 2003; 29 (6): 588-595.
150. **Han T. Y., Lee J. W., Lee J. H. i wsp.:** Subdermal Minimal Surgery with Hyaluronic Acid as an Effective Treatment for Neck Wrinkles. *Dermatol. Surg.* 2011; 37 (9): 1291-1296.
151. **Kinney B. M., Hughes III C. E.:** Soft tissue fillers: an overview. *Aesth. Surg. J.* 2001; 21: 469-471.
152. **McCleave M. J.:** Is breast augmentation using hyaluronic acid safe? *Aesthetic Plast. Surg.* 2010; 34 (1): 65-70.
153. **Pawelczyk-Pala K.:** Uwagi na temat wykorzystania kwasu hialuronowego: wskazania i techniki zabiegowe. *Dermatologia Estetyczna.* 2006; 8 (4).
154. **Duranti F., Salti G., Bovani B. i wsp.:** Injectable Hyaluronic Acid Gel for Soft Tissue Augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol. Surg.* . 1998; 24: 1317 – 1325 .
155. **Nast A., Reytan N., Hartmann V. i wsp.:** Efficacy and Durability of Two Hyaluronic Acid-Based Fillers in the Correction of Nasolabial Folds: Results of a Prospective, Randomized, Double-Blind, Actively Controlled Clinical Pilot Study. *Dermatol. Surg.* 2011; 37 (6): 768 -775.
156. **Tezel A., Fredrickson G. H.:** The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2008; 10: 35–42.
157. **Monheit G. D., Coleman K. M.:** Hyaluronic acid fillers. *Dermatol. Ther.* 2006; 19: 141–150.
158. **Kablik J., Monheit G. D., Yu L. i wsp.:** Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol. Surg.* 2009; 35: 302–312.
159. **Monheit G. D., Baumann L. S., Gold M. H. i wsp.:** Novel hyaluronic acid dermal filler: dermal gel extra physical properties and clinical outcomes. *Dermatol. Surg.* 2010; 36 (3), 1833-1841.

160. **Gold M.:** The science and art of hyaluronic acid dermal filler use in esthetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2009; 8: 301–307.
161. **Narins R. S., Bowman P. H.:** Injectable skin fillers. *Clin. Plast. Surg.* 2005; 32: 151-162.
162. **Clark C. P.:** Animal-based hyaluronic acid fillers: scientific and technical considerations. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 120 (6): 27S–32S.
163. **Smith K. C.:** Practical use of Juvéderm: early experience. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 120 (6): 67S–73S.
164. **Gold M. H.:** Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clin. Interv. Aging*. 2007; 2: 369–376.
165. **Jones J. K.:** Patient Safety Considerations Regarding Dermal Filler Injections. *Plastic Surgical Nursing*. 2006; 26 (3): 156-163.
166. **Berny-Moreno J., Barancewicz-Łosek, Nowicka i wsp.:** rocedures in cosmetic dermatology. *Family Medicine & Primary Care Review*. 2005; 7 (2): 360-366.
167. **Wall S. J., Adamson P. A.:** Augmentation, enhancement and implantation procedures for the lip. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 2002; 35 (1): 87-102.
168. **Ellis D. A., Makdessian A. S., Brown D. J.:** Survey of future injectables. *Facial. Plast. Surg. Clin. North. Am.* 2001; 9: 405-411.
169. **Yoon E. S., Han S. K., Kim W. K.:** Advantages of the presence of living dermal fibroblasts within Restylane for soft tissue augmentation. *Ann. Plast. Surg.* 2003; 51: 587-592.
170. **Biesman B.:** Soft tissue augmentation using Restylane. *Facial Plast. Surg.* 2004; 20: 171-177.
171. **Andre P.:** Evaluation of the safety of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA-Q-Medical , Sweden) in European countries: a retrospective study from 1997 to 2001. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2004; 18: 422-425.
172. **Gensanne D., Josse G., Schmitt A. M. i wsp.:** In vivo visualization of hyaluronic acid injection by high spatial resolution T2 parametric magnetic resonane images. *Skin Research and Technology*. 2007; 13: 385 – 389.
173. **Lambert C. A., Colige A. C., Lapiere C. M. i wsp.:** Coordinated regulation of procollagens I and III and their post-translational enzymes by dissipation of mechanical tension in human dermal fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 2001; 80: 479-485.
174. **Kessler D., Dethlefsen S., Haase I. i wsp.:** Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36575-36585.

175. **Lambert C. A., Colige A. C., Munaut C. i wsp.:** Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.* 2001; 20: 397-408.
176. **Dayan S. H., Arkins J. P., Gal T. J.:** Blinded evaluation of the effects of hyaluronic acid filler injections on first impressions. *Dermatol. Surg.* 2010; 36 (3): 1866-1873.
177. **Zielke H., Wölber L., Wiest L. i wsp.:** Risk profiles of Different Injectable Fillers: Result from the Injectable Filler Safety Study. *Dermatol. Surg.* 2008; 34: 326 – 335.
178. **Friedman P. M., Mafong E. A., Kauvar A. i wsp.:** Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol. Surg.* 2002; 28, 401-404.
179. **Lowe N. J., Maxwell C. A., Lowe P. i wsp.:** Hyaluronic acid skin fillers: adverse reactions and skin testing. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2001; 45: 930-933.
180. **Piacquadio D., Jarcho M., Goltz R.:** Evaluation of hylan b gel as a soft - tissue augmentation implant material. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997; 36: 544-549.
181. **Bosniak S., Cantisano-Zilkha M., Glavas I. P.:** Nonanimal stabilized hyaluronic acid for lip augmentation and facial rhytid ablation. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2004; 6: 379-383.
182. **Brody H. J.:** Use of hyaluronidase in the treatment of granulomatous hyaluronic acid reactions or unwanted hyaluronic acid misplacement. *Dermatol. Surg.* 2005; 31: 893-897.
183. **De Boule K.:** Management of complications after implantation of fillers. *J. Cosmet. Dermatol.* 2004; 3: 2-15.
184. **Andre P., Lowe N. J., Parc A. i wsp.:** Adverse reactions to the dermal fillers: a review of european experiences. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2005; 7: 171-176.
185. **Duffy D. M.:** Complications of fillers: overview. *Dermatol. Surg.* 2005; 31: 1626-1633.
186. **Steenkiste E., Marien K., Van den Oord J.:** Dermalive granuloma: a lesion with distinctive histological features. *Internet J. Dermatol.* 2005; 3: 1-9.
187. **Lowe N. J., Maxwell C. A., Patnaik R.:** Adverse reactions to dermal fillers: review. *Dermatol. Surg.* 2005; 31: 1616-1625.
188. **Lupton J. R., Alster T. S.:** Cutaneous hypersensitivity reaction to injectable hyaluronic acid gel. *Dermatol. Surg.* 2000; 26: 135-137.
189. **Shafir R., Amir A., Gur E.:** Long-term complications of facial injections with Restylane. *Plast. Reconstr. Surg.* 2000; 106: 1215-1216.
190. **Macedo O. R., Recio A. L.:** Complications after hyaluronic acid gel injections: case reports. *J. Eur. Dermatol. Venereol.* 2001; 15: 147.

191. **Fiedman P. M., Mafong E. A., Kauvar A. N. B. i wsp.:** Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol. Surg.* 2002; 28: 491-494.
192. **Soparkar C. W., Patrinely J. R.:** Managing inflammatory reaction to Restylane. *Ophthal .Plast. Reconstr. Surg.* 2005; 21: 151-153.
193. **Kavouni A., Stanec J. J.:** Human antihyaluronic acid antibodies. *Dermatol. Surg.* 2002; 28: 359-360.
194. **Bussamara M. V., Bagatin E., Hassun K. M. i wsp.:** Adverse effect of soft tissue augmentation with hyaluronic acid. *J. Cosmet. Dermatol.* 2005; 4: 184-186.
195. **Frank P., Gendler E.:** Hyaluronic acid for soft- tissue augmentation. *Clin. Plast. Surg.* 2001; 28: 121-126.
196. **Alijotas–Reig J., Garcia–Gimenez V.:** Delayed immune – mediatel adverse effects related to hyaluronic acid and acrylic hydrogel dermal fillers: clinical findings, long – term follow – up and review of the literature. *Journal European Academy of Dermatology and Venereology.* 2008; 22: 150-161.
197. **Klein A. W.:** Collagen and other injectables of the skin. *Derm. Clin.* 2001; 19: 491-506.
198. **Lemperle G., Romano J. J., Busso M.:** Soft tissue augmentation with Artecoll: 10-year history, indications, technique and complications. *Dermatol. Surg.* 2003; 29 (6): 573-587.
199. **Manna F., Dentini M., Desideri P. i wsp.:** Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (Hylaform from rooster combs and Restylane from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 1999; 13:183-192.
200. **Honig J. F., Brink U., Korabiowski M:** Severe granulomatous allergic tissue reaction after hyaluronic acid injection in the treatmentof facial lines and its surgical correction. *J. Craniofac. Surg.* 2003; 14: 197-200.
201. **Del Sacco D., Cozzani E., Parodi A. i wsp.:** Scar sarcoidosis after hyaluronic acid injection. *Int. J. Dermatol.* 2005; 44(5): 411-412.
202. **Lupo M. P.:** Hyaluronic acid fillers in facial rejuvenation. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2006; 25: 122–126.
203. **Saint-Marc T., Partisani M., Poizot-Martin I. i wsp.:** A syndrome of peripheral fat wasting (lipodystrophy) in patients receiving long-term nucleoside analogue therapy. *AIDS.* 1999; 13: 1659 - 1667.
204. **Glogau R. G., Kane M. C.:** Effect of injection techniques on the rate of local adverse events in patients implanted with nonanimal hyaluronic acid gel dermal fillers. *Dermatol. Surg.* 2008; 34: S105–S109.

205. **Cohen J. L.:** Understanding, avoiding, and managing dermal filler complications. *Dermatol. Surg.* 2008; 34(Suppl. 1): S92–S99.
206. **Baumann L.:** Cosmoderm/Cosmoplast (human bioengineered collagen) for the aging face. *Facial Plast. Surg.* 2004; 20: 125–128.
207. **Okada S., Hagan J.B., Kato M. i wsp.:** Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J. Immunol.* 1998; 160: 4010–4017.
208. **Hirsch R. J., Brody H. J., Carruthers J. D. A.:** Hyaluronidase in the office: a necessity for every dermasurgeon that injects hyaluronic acid. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2007; 9: 182–185.
209. **Vartanian A. J., Frankel A. S., Rubin M. G.:** Injected Hyaluronidase Reduces Restylane – Mediated Cutaneous Augmentation. *Arch. Facial. Plast. Surg.* 2005; 7: 231 – 237.
210. **Clark L. E., Mellette J. R. Jr.:** The use of hyaluronidase as an adjunct to surgical procedures. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1994; 20: 842-844.
211. **Kirby B., Butt A., Morrison A. M. i wsp.:** Type I allergic reaction to hyaluronidase during ophthalmic surgery. *Contact Dermatitis.* 2001; 44: 52.
212. **Eberhart A. H., Weiler C. R., Erie J. C.:** Angioedema related to the use of hyaluronidase in cataract surgery. *Am. J. Ophthalmol.* 2004; 138: 142-143.
213. **Ahluwalia H. S., Lukaris A., Lane C. M.:** Delayed allergic reaction to hyaluronidase: a rare sequel to cataract surgery. *Eye.* 2003; 17: 263 - 266.
214. **Quhill F., Bowling B., Packard R. B.:** Hyaluronidase allergy after peribulbar anesthesia with orbital inflammation. *J. Cataract. Refract. Surg.* 2004; 30: 916-917.
215. **Nevarre D. R., Tzarnas C. D.:** The effects of hyaluronidase on the efficacy and on the pain administration of 1% lidocaine. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998; 101: 365-369.
216. **Micheels P.:** Human anti-hyaluronic acid antibodies. Is it possible? *Dermatol. Surg.* 2001; 27: 185-191.
217. **Rohrich R. J.:** Mesotherapy: what is it? Does it work? *Plast. Reconstr. Surg.* 2005; 115(5): 1425.
218. **Miękoś – Zydek B., Czyż P., Ograczyk A.:** Mezoterapia w dermatologii i dermatologii estetycznej; W: Kaszuba A., Adamski Z.: Dermatologia dla kosmetologów. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2008.
219. www.femin.pl
220. **Balogh L., Polyak A., Mathe D. i wsp.:** Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56 (22): 10582-10593.

221. **Arbit E. i wsp.:** Oral heparin: status review. *Thromb. J.* 2006; 4: 6.
222. **Pineo G., Hull R., Marder V.:** Oral delivery of heparin: SNAC and related formulations. *Clin. Haematol.* 2004; 17: 153-160.
223. **Lamari F. N. i wsp.:** Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed. Chromatogr.* 2006; 20: 539-550.
224. **Du J., White N., Eddington N. D.:** The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse. *Drug Dispos.* 2004; 25: 109-116.
225. **Baici A. i wsp.:** Analysis of glycosaminoglycans in human serum after oral administration of chondroitin sulfate. *Rheumatol. Int.* 1992; 12: 81-88.
226. **Andermann G., Dietz M.:** The influence of the route of administration on the bioavailability of an endogenous macromolecule: chondroitin sulphate (CSA). *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 1982; 7: 11-16.
227. **Martinez-Puig D. i wsp.:** Oral hyaluronic acid administration improves osteochondrosis clinical symptoms and slightly increases intra-articular concentration of hyaluronic acid in a horse model: a pilot survey. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15: C62–C63 .
228. **Stancikova M. i wsp.:** The effects of hyaluronan on bone resorption and bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Int. J. Tissue React.* 2004; 6: 9-16.
229. **Si-Ling Huang, Pei-Xue Ling, Tian-Min Zhang:** Oral absorption of hyaluronic acid and phospholipids complexes in rats. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13 (6): 945-949.
230. **Kalman D. S. i wsp.:** Effect of a natural extract of chickencombs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint®) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized double-blind placebo-controlled trial. *Nutr. J.* 2008; 7 (3): 1-9.
231. **Bucci L. R. i wsp.:** Comparison between glucosamine with chondroitin sulfate and glucosamine with chondroitin sulfate and hyaluronate for symptoms of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005; 13: S99.
232. **Liu N.:** Trafficking of hyaluronan in the interstitium and its possible implications. *Lymphology.* 2004; 37 (1): 6-14.
233. **Ronca F. i wsp.:** Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998; 6: 14-21.
234. **Breborowicz A. i wsp.:** Effects of hyaluronan used as a supplement in peritoneal dialysis solutions.; W: Kennedy J. F. i wsp.: *In Hyaluronan. Volume 2. Biomedical, Medical and Clinical Aspects.* Woodhead Publishing Unlimited: Cambridge, England, 2002.

235. **Gajos A.:** Nawilżające humektanty. *Świat Farm.* 2009; 9: 33-35.
236. **Becker L. C., Bergfeld W. F., Belsito D. V. i wsp.;** **Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, Andersen F. A.:** Final report of the safety assessment of hyaluronic acid, potassium hyaluronate, and sodium hyaluronate. *Int. J. Toxicol.* 2009; 28 (4): 5 - 67.
237. **Sommerfeld B.:** Randomised, placebo-controlled, double-blind, split-face study on the clinical efficacy of Tricutan on skin firmness. *Phytomedicine.* 2007; 14: 711-715.
238. **Leveque J. L., Goubanova E.:** Influence of Age on the Lips and Perioral Skin. *Dermatology.* 2004; 208: 307-313.
239. **Jaroszewska B.:** Kosmetologia. Wydawnictwo Atena, Warszawa, 2004.
240. **Tadini K. A.:** Acetil hexapeptide-3 in a cosmetic formulation acts on skin anisotropy – clinical study. ISBS International Symposium, Besançon. From Surface to Deepness, 2009; 1: 152-152.
241. **Ruvolo E. C., Stamatias G. N., Kollias N.:** Skin Viscoelasticity Displays Site-and Age-Dependent Angular Anisotropy. *Skin. Pharmacol. Physiol.* 2007; 20: 313-321.
242. **Davoudi S. M., Sadr B., Hayatbakhsh M. R. i wsp.:** Comparative study of skin sebum and elasticity level in patients with sulfur mustard-induced dermatitis and healthy controls. *Skin Res. Technol.* 2010; 16 (2): 237-242.
243. **Nizet J. L., Pierard – Franchimont C., Pierard G. E.:** Influence of body posture and gravitational forces on shear wave propagation in the skin. *Dermatology;* 2001; 202: 177-180.
244. **Paye M., Mac - Mary S., Elkhyat A. i wsp.:** Use of the Reviscometr for measuring cosmetics-induced skin surface effects. *Skin research and Technology.* 2007; 13: 343-349.
245. **Oh J. H., Kim Y. K., Jung J. Y. i wsp.:** Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 2011; 62 (3): 192-201.
246. **Bernstein E. F., Underhill C. B., Hahn B. J. i wsp.:** Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br. J. Dermatol.* 1996; 135: 155-162.
247. **Surowiak P.:** Mezoterapia versus osocze bogato płytkowe. *Acad. Aesthet. Anti-Aging Med.* 2011; 2: 7-10.
248. **Amin S. P., Phelps R. G., Goldberg D. J.:** Mesotherapy for facial skin rejuvenation: a clinical, histologic, and electron microscopic evaluation. *Dermatol. Surg.* 2006; 32 (12): 1467-1472.
249. **Wiest L., Kerscher M.:** Native hyaluronic acid in dermatology – results of an expert meeting. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2008; 6: 176–180.

250. **Di Pietro A., Di Sante G.:** Recovery of skin slasticity and turgor by intradermal injections of hyaluronic Acid (Ial-System™) by the cross-linked technique. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 2001; 136: 187–194.
251. **Taieb M., Gay C., Sebban S. i wsp.:** Hyaluronic acid plus mannitol treatment for improved skin hydration and elasticity. *J. Cosmet. Dermatol.* 2012; 11 (2): 87-92.
252. **Croce M. A., Dyne K., Boraldi F. i wsp.:** Hyaluronan affects protein and collagen synthesis by in vitro human skin fibroblasts. 2001; 33 (4): 326-331.
253. **Schmults C. D., Phelps R., Goldberg D. J.:** Nonablative facial remodeling erythema reduction and histologic evidence of new collagen formation using a 300 microsecond 1064-nm Nd: YAG laser. *Arch. Dermatol.* 2004; 140: 1373–6.
254. **Lacarrubba F., Tadeschi A., Nardone B. i wsp.:** Mesotherapy for skin rejuvenation: assessment of the low-echogenic band by ultrasound evaluation with cross-sectional B-mode scanning. *Dermatol. Ther.* 2008; 21 (3): S1-S5.
255. **Gniadecka M., Jemec G. B. E.:** Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. *Br. J. Dermatol.* 1998; 139: 815–821.
256. **Jäger C., Brenner C., Habicht J. i wsp.:** Bioactive reagents used in mesotherapy for skin rejuvenation in vivo induce diverse physiological processes in human skin fibroblasts in vitro- a pilot study. *Exp. Dermatol.* 2012; 21 (1): 72-75.
257. **Mast B. A., Diegelmann R. F., Krummel T. M. i wsp.:** Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix.* 1993; 13: 441-446.
258. **Luke H. J., Prehm P.:** Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. *Biochem. J.* 1999; 343: 71-75.
259. **Gao F., Liu Y., He Y. i wsp.:** Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biol.* 2010; 29: 107-116.
260. **Nagore E., Ramos P., Botella - Estrada R. i wsp.:** Cutaneous infection with *Mycobacterium fortuitum* after localized microinjections (mesotherapy) treated successfully with a triple drug regimen. *Acta Derm. Venereol.* 2001; 81: 291-293.
261. **Bessis D., Guilhou J. J., Guillot B.:** Localized urticaria pigmentosa triggered by mesotherapy. *Dermatology.* 2004; 209: 343-344.
262. **Lee D. P., Chang S. E.:** Subcutaneous nodules showing fat necrosis owing to mesotherapy. *Dermatol. Surg.* 2005; 31: 250-251.
263. **Kajimoto O., Odanaka W., Sakamoto W. i wsp.:** Clinical effects of dietary hyaluronic acid on dry skin. *Journal of New Remedies & Clinics.* 2001; 50 (5): 90 (548)-102 (560).

264. **Sato T., Sakamoto W., Odanaka W. i wsp.:** Clinical effects of dietary hyaluronic acid on dry, rough skin. *Aesthetic Dermatology*. 2002; 12: 109-120.
265. **Arct J., Pytkowska K.:** Nawilżanie i surowce nawilżające. *Wiadomości PTK*. 2003; 6 (1): 1-8.
266. **Krynicka I., Żebrowska-Szulc A., Sieradzki E.:** Wpływ bazy samoemulgującej się i czynników nawilżających w kremach do twarzy na poziom nawilżenia skóry. *Farm. Pol.* 2011; 67 (1): 3-8.
267. **Mazzarello V., Bandiera P., Ena P. i wsp.:** Lip Plumper: non invasive in vitro study of moisturizing and volumizing effect. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 2010; 115 (1/2) (Supplement): 109.
268. **Krzyżostan M., Olejnik A., Gościańska J. i wsp.:** Badanie skuteczności działania kwasu hialuronowego na skórę – testy in vivo. *Dermatol. Estet.* 2012; 14 (2): 96-107.
269. **Ugurlayan A. M.:** NAD's Review of Cosmetic Cases. Anti-Ageing Skin Care Conference. June 2-3, 2010, www.nadreview.org .
270. www.lumene.com
271. **Schweikert K., Kahlhöfer V., Gabard B.:** A Better Way to get the Properties of Hyaluronic Acid on Dry Skin. *State International Journal for Applied Science*. 2005; 131: 1-8.
272. **Pavicic T., Gauglitz G. G., Lersch P. i wsp.:** Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment. *J. Drugs Dermatol.* 2011; 10 (9): 990-1000.

SPIS RYCIN

Rycina 1. Wzór strukturalny kwasu hialuronowego.

Rycina 2. Intradermoterapia kwasem hialuronowym skóry czoła.

Rycina 3. Zasada działania Corneometru® MPA5.

Rycina 4. Schemat przykładania sondy - Corneometru.

Rycina 5. Zasada działania Reviscometru® MPA5.

Rycina 6. Schemat przykładania sondy – Reviscometru.

Rycina 7. Porównanie grup terapeutycznych względem palenia papierosów.

Rycina 8. Porównanie grup terapeutycznych względem ilości wypijanych płynów na dobę.

Rycina 9. Początkowy poziom nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych (corneometr).

Rycina 10. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników, u których zastosowano intradermoterapię nieusieciowanym kwasem hialuronowym. Badanie corneometrem.

Rycina 11. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników po zastosowaniu suplementacji doustnej wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Badanie corneometrem.

Rycina 12. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym. Badanie corneometrem.

Rycina 13. Końcowy poziom nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

Rycina 14. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

Rycina 15. Zmiana nawilżenia skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

Rycina 16. Porównanie zmiany nawilżenia skóry twarzy ochotników w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

Rycina 17. Zmiana nawilżenia skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

Rycina 18. Porównanie zmiany nawilżenia skóry twarzy ochotników w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

Rycina 19. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0^0 po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.

Rycina 20. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90^0 po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.

Rycina 21. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po zastosowaniu suplementacji doustnej kwasu hialuronowego.

Rycina 22. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0^0 po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

Rycina 23. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90^0 po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

Rycina 24. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

Rycina 25. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0^0 po serii zabiegów intraedermoterapii kwasem hialuronowym.

Rycina 26. Zmiana poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90^0 po serii zabiegów intraedermoterapii kwasem hialuronowym.

Rycina 27. Zmiana poziomu wartości średniej RRT po serii zabiegów intraedermoterapii kwasem hialuronowym.

Rycina 28. Porównanie zmian poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 0^0 pomiędzy grupami terapeutycznymi.

Rycina 29. Porównanie zmian poziomu wartości RRT mierzonych reviscometrem dla 90^0 pomiędzy grupami terapeutycznymi.

Rycina 30. Porównanie zmian poziomu wartości średniej RRT pomiędzy grupami terapeutycznymi.

Rycina 31. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po serii zabiegów intraedermoterapii kwasem hialuronowym.

Rycina 32. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po stosowaniu doustnego preparatu kwasu hialuronowego.

Rycina 33. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu po stosowaniu kremu z kwasem hialuronowym.

Rycina 34. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie stosującej krem z kwasem hialuronowym (poziom na początku badania).

Rycina 35. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie poddanej intradermoterapii kwasem hialuronowym (poziom na początku badania).

Rycina 36. Zależność poziomu kwasu hialuronowego w osoczu od wieku ochotników w grupie przyjmującej kwas hialuronowy doustnie (poziom na początku badania).

Rycina 37. Czas od włączenia poszczególnych terapii kwasem hialuronowym, po którym ochotnicy zauważyli pierwsze efekty.

Rycina 38. Niewielki rumień po zabiegu intradermoterapii kwasem hialuronowym.

SPIS TABEL

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne, które wpływają na wydajność kliniczną produktu(156).

Tabela 2. Skala oceny nawilżenia / suchości skóry.

Tabela 3. Skala oceny elastyczności skóry.

Tabela 4. Skala oceny poprawy na podstawie % uzyskanej korekcji zmarszczek.

Tabela 5. Skala poprawy estetycznego wyglądu skóry GAIL.

Tabela 6. Charakterystyka Hyaluronic Acid Test Kit®.

Tabela 7. Porównanie grup terapeutycznych względem wieku.

Tabela 8. Zmiana poziomu nawilżenia skóry twarzy ochotników pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie corneometrem.

Tabela 9. Nawilżenie skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na początku badania. Ocena ochotników według skali suchości.

Tabela 10. Nawilżenie skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na końcu badania. Ocena ochotników według skali suchości.

Tabela 11. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali suchości.

Tabela 12. Nawilżenie skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na początku badania. Ocena badacza według skali suchości.

Tabela 13. Nawilżenie skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych na końcu badania. Ocena badacza według skali suchości.

Tabela 14. Zmiana nawilżenia / suchości skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali suchości.

Tabela 15. Zmiana wartości RRT pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych. Badanie reviscometrem.

Tabela 16. Zmiana elastyczności skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników według skali elastyczności.

Tabela 17. Zmiana elastyczności skóry twarzy ochotników na skutek zastosowanych terapii kwasem hialuronowym w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza według skali elastyczności.

Tabela 18. Procent uzyskanej korekcji zmarszczek skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena ochotników.

Tabela 19. Procent uzyskanej korekcji zmarszczek skóry twarzy ochotników poszczególnych grup terapeutycznych. Ocena badacza.

Tabela 20. GAIS w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena ochotników.

Tabela 21. GAIS w poszczególnych grupach terapeutycznych. Ocena badacza.

Tabela 22. Zmiana poziomu kwasu hialuronowego w osoczu ochotników pod wpływem terapii kwasem hialuronowym zastosowanych w poszczególnych grupach terapeutycznych.

Tabela 23. Działania niepożądane zgłoszone przez ochotników poszczególnych grup terapeutycznych.

13 Załączniki

ZAŁĄCZNIK NR 1

Wzór ogłoszenia o naborze do badań.

W Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UMiKM w Poznaniu prowadzone są badania sprawdzające skuteczność kwasu hialuronowego w dermatologii i kosmetologii. W ramach prowadzonego badania, u ochotników zostanie zastosowany kwas hialuronowy powszechnie dostępny w aptekach i gabinetach dermatologii estetycznej. U części ochotników wykonana zostanie mezoterapia nieusieciowanym kwasem hialuronowym, pozostali ochotnicy stosować będą suplementację doustną lub krem z kwasem hialuronowym. Wszystkie preparaty i zabiegi będą bezpłatnie.

U osób poddanych badaniu wykonane zostanie badanie skóry za pomocą sondy „dotykowej” oraz zostanie pobrana krew. Wyniki poddane zostaną analizie statystycznej. Chętnych prosimy o kontakt na adres: m.lupus@wp.pl

ZAŁĄCZNIK NR 2

Imię i nazwisko osoby badanej:.....

Data urodzenia:.....

Telefon kontaktowy:.....

Nazwa ośrodka badawczego:

Katedra i Zakład Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych

Temat badania:

Ocena efektów działania kwasu hialuronowego w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikacji zewnętrznej

Promotor badania :

prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski, specjalista II stopnia dermatologii i wenerologii

Nazwisko badacza:

lek. med. Małgorzata Wilk - Jędrusik / dr n. med. Sebastian Kuczyński / mgr Iwona Micek

Informacja dla ochotników poddanych intradermoterapii kwasem hialuronowym o nazwie Ialest®.

Intradermoterapia (mezoterapia) skóry kwasem hialuronowym jest powszechnie stosowaną metodą biorewitalizacji starzejącej się skóry twarzy. Dzięki zabiegowi dochodzi do zwiększenia uwodnienia skóry, poprawy jej elastyczności oraz spłycenia drobnych zmarszczek. Zabieg przeprowadzany jest w miejscowym znieczuleniu skóry preparatem EMLA. Przez kilka dni po zabiegu utrzymywać się mogą zmiany rumieniowo-obrzękowe, niekiedy guzki lub guzy na podłożu rumieniowym w miejscu wstrzyknięcia. Reakcje uczuleniowe praktycznie nie występują, opisuje się je u 0,8% osób.

U ochotników poddanych badaniu wykonana zostanie seria zabiegów mezoterapii skóry twarzy kwasem hialuronowym o nazwie Ialest®, zgodnie z procedurą podawaną przez producenta.

U osób poddanych badaniu wykonane zostanie badanie skóry za pomocą sondy „dotykowej” oraz kontrola poziomu kwasu hialuronowego we krwi. Wyniki poddane zostaną analizie statystycznej.

Świadoma zgoda dla ochotników poddanych mezoterapii kwasem hialuronowym oraz potwierdzenie przekazania i otrzymania informacji:

Oświadczam, że uzyskałam od lekarza wykonującego zabieg dokładne informacje na temat intradermoterapii skóry twarzy kwasem hialuronowym. Poinformowano mnie zarówno o pozytywnych efektach zabiegu, jak i o jego działaniach niepożądanych. Miałam możliwość zadania pytań lekarzowi nadzorującemu badanie i otrzymałam wyczerpujące odpowiedzi na te pytania. Zapoznałam się z przedłożoną mi informacją dla ochotnika i zrozumiałam jej treść. Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniu lub cofnąć ją w każdej chwili.

Wyrażam zgodę na przeprowadzenie u mnie serii zabiegów intradermoterapii skóry twarzy kwasem hialuronowym, zbadanie skóry twarzy za pomocą sondy „dotykowej”, pobranie krwi oraz przetwarzanie moich danych osobowych.

Lekarz nadzorujący badanie:	Data:	Podpis:
Osoba badana:	Data:	Podpis:

ZAŁĄCZNIK NR 3

Imię i nazwisko osoby badanej:.....

Data urodzenia:.....

Telefon kontaktowy:.....

Nazwa ośrodka badawczego:

Katedra i Zakład Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych

Temat badania:

Ocena efektów działania kwasu hialuronowego w intradermoterapii, suplementacji doustnej oraz aplikacji zewnętrznej

Promotor badania :

prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski, specjalista II stopnia dermatologii i wenerologii

Nazwisko badacza:

lek. med. Małgorzata Wilk - Jędrusik / dr n. med. Sebastian Kuczyński / mgr Iwona Micek

Informacja dla ochotników przyjmujących doustny preparat kwasu hialuronowego.

Hialu – Femin® jest preparatem w kapsułkach zawierających 50 mg wielkocząsteczkowego kwasu hialuronowego. Jest to największa ilość kwasu hialuronowego w kapsułkach dostępna na rynku. Preparat jest dopuszczony w Polsce do obrotu i ogólnodostępny w aptekach.

Kapsułki Hialu – Femin® według producenta mają zdolność wiązania wody, przez co zatrzymują ją w skórze. Właśnie efekt nawilżający jest podstawowym działaniem tych kapsułek. Poza tym mają one zwiększać elastyczność i jędrność skóry oraz spłycać drobne zmarszczki. Ponadto wspomagają regenerację skóry (odnawiają warstwę rogową naskórka) oraz chronią przed działaniem wolnych rodników i promieniowaniem słonecznym.

W badaniu ochotnicy będą przyjmować preparat 2 x dziennie przez okres 6 tygodni.

U osób poddanych badaniu wykonane zostanie badanie skóry za pomocą sondy „dotykowej” oraz kontrola poziomu kwasu hialuronowego we krwi. Wyniki poddane zostaną analizie statystycznej.

Świadoma zgoda dla ochotników przyjmujących doustnie preparat kwasu hialuronowego o nazwie Hialu - Femin®.

Oświadczam, że uzyskałam od lekarza szczegółowe informacje na temat kapsułek z kwasem hialuronowym Hialu – Femin®. Poinformowano mnie zarówno o pozytywnych efektach suplementacji, jak i o jej działaniach niepożądanych. Miałam możliwość zadania pytań lekarzowi i otrzymałam wyczerpujące odpowiedzi na te pytania. Zapoznałam się z przedłożoną mi informacją dla ochotnika i zrozumiałam jej treść. Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniu lub cofnąć ją w każdej chwili.

Wyrażam zgodę na doustne przyjmowanie przez 6 tygodni kapsułek kwasu hialuronowego Hialu - Femin®, zbadanie skóry twarzy za pomocą sondy „dotykowej”, pobranie krwi oraz przetwarzanie moich danych osobowych.

Lekarz nadzorujący badanie:	Data:	Podpis:
Osoba badana:	Data:	Podpis:

ZAŁĄCZNIK NR 4

Imię i nazwisko osoby badanej:.....

Data urodzenia:.....

Telefon kontaktowy:.....

Nazwa ośrodka badawczego:

Katedra i Zakład Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych

Temat badania:

Ocena efektów działania kwasu hialuronowego w intradermoterapii.

Promotor badania :

prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski, specjalista II stopnia dermatologii i wenerologii

Nazwisko badacza:

lek. med. Małgorzata Wilk / dr n. med. Sebastian Kuczyński / mgr Iwona Micek

Informacja dla ochotników stosujących krem zawierający kwas hialuronowy o nazwie Frei Hyaluron Aktiv®.

Aktywny krem z kwasem hialuronowym według producenta zapewnia nawilżenie skóry przez cały dzień, spłyca zmarszczki i zapewnia poprawę wyglądu skóry. Ponadto zawarta w kremie witamina E działa antywołnrodnikowo, a cenne tłuszcze stabilizują barierę naskórkową.

Krem, znanej niemieckiej marki, zdobył już uznanie na polskim rynku. Dostępny jest w sprzedaży aptecznej.

Ochotnicy poddani badaniu stosować będą krem dwa razy dziennie aż do zużycia opakowania (ok. 6 tygodni).

U osób poddanych badaniu wykonane zostanie badanie skóry za pomocą sondy „dotykowej” oraz kontrola poziomu kwasu hialuronowego we krwi. Wyniki poddane zostaną analizie statystycznej.

Świadoma zgoda dla ochotników stosujących krem zawierający kwas hialuronowy.

Oświadczam, że uzyskałam od lekarza prowadzącego badanie dokładne informacje na temat stosowania aktywnego kremu z kwasem hialuronowym. Miałam możliwość zadania pytań lekarzowi nadzorującemu badanie i otrzymałam wyczerpujące odpowiedzi na te pytania. Zapoznałam się z przedłożoną mi informacją dla ochotnika i zrozumiałam jej treść. Wiem, że mogę odmówić zgody na udział w badaniu lub cofnąć ją w każdej chwili.

Wyrażam zgodę na stosowanie aktywnego kremu z kwasem hialuronowym, zbadanie skóry twarzy za pomocą sondy „dotykowej”, pobranie krwi oraz przetwarzanie moich danych osobowych.

Lekarz nadzorujący badanie:	Data:	Podpis:
Osoba badana:	Data;	Podpis:

ZAŁĄCZNIK NR 5

Zgoda komisji bioetycznej



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 11/10

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 07 stycznia 2010 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych
UM w Poznaniu**

Główny badacz: lek. med. Małgorzata Wilk

**Członkowie zespołu
badawczego:**

**dr n. med. Sebastian Kuczyński
prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski
prof. UM dr hab. n. farm. Gerard Nowak
mgr Iwona Micek**

Temat badań:

**"Ocena efektów działania kwasu hialuronowego w
intradermonoterapii" (na podstawie wniosku z dnia 03.12.2009).**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

ZAŁĄCZNIK NR 6

Skład kapsułek Hialu – Femin®.

SKŁAD 1 KAPSUŁKI HIALU – FEMIN®		
Substancja	Ilość	% dziennego zapotrzebowania
Kwas hialuronowy	50 mg	zalecane dzienne spożycie nie zostało ustalone
Witamina C	60 mg	100%

ZAŁĄCZNIK NR 7

Skład kremu Frei Hyaluron Aktiv®.

Nazwa INCI	Opis
Glyceryl Stearate (stearynian glicerolu)	emolient, może być komedogenny, emulgator W/O, składnik konsystencjotwórczy
Glycerin (gliceryna)	hydrofilowa substancja nawilżająca (humektant), promotor wchłaniania, przeciwdziała wysychaniu kosmetyków, wspomaga działanie konserwujące
Caprylic (trójgliceryd kaprylowo – kaprynowy)	emolient, może być komedogenny, penetruje w głąb cementu międzykomórkowego warstwy rogowej naskórka, ogranicza TEWL, odporny na utlenianie, kondycjonuje włosy, daje silne tłuszczenie, składnik konsystencjotwórczy kosmetyku
Tocopheryl Acetate (octan tokoferolu)	Pochodna witaminy E antyoksydant, posiada zdolność wbudowywania się w struktury lipidowe błon komórkowych i cementu międzykomórkowego warstwy rogowej (hamowanie TEWL, zapobieganie wnikaniu substancji obcych i podrażnieniom), przyspiesza regenerację skóry, wzmacnia

	<p>ściany naczyń krwionośnych i poprawia ukrwienie skóry, ogranicza szybkość utleniania składników tłuszczowych kosmetyków, zwiększa trwałość kosmetyków w warunkach silnej ekspozycji na promieniowanie UV</p>
<p>Urea (mocznik)</p>	<p>hydrofilowa substancja nawilżająca (humektant), mająca zdolność przenikania przez warstwę rogową naskórka, w zależności od stężenia wykazuje działanie keratoplastyczne (niskie stężenia) bądź keratolityczne (wyższe stężenia), przeciwdziała wysychaniu kosmetyków, nie jest higroskopijny, zwiększa wiązanie wody w strukturach keratynowych oraz w strukturach cementu międzykomórkowego, promotor transportu przez naskórek</p>
<p>Cetearyl Alkohol (alkohol cetearylowy)</p>	<p>Mieszanka alkoholu cetylowego i stearynowego, emolient, może być komedogenny, składnik konsystencji twórczy kosmetyków, stabilizator emulsji, substancja zmętniająca</p>
<p>Sodium Stearyl Glutamate (sól sodowa glutaminianu stearylowego)</p>	<p>łagodny surfaktant, emulgator</p>
<p>Niacinamide (witamina PP)</p>	<p>antyoksydant, działa przeciwzapalnie, nawilża i wygładza skórę, zwiększa odporność skóry na działanie czynników</p>

	szkodliwych tj. siarczanu sodowo-laurylowego (SLS), powoduje poprawę ukrwienia skóry głowy, działa regulująco na aktywność gruczołów łojowych
Panthenol (pantenol)	prowitamina B5, hydrofilowa substancja nawilżająca (humektant), wykazuje działanie przeciwzapalne, przyspiesza procesy regeneracji naskórka, zapobiega wysychaniu kosmetyków
Borago Officinalis Oil (olej z nasion ogórecznika)	emolient
Simmondsia Chinensis Oil (wosk jojoba)	niekomedogenny emolient
Sodium Hyaluronate (hialuronian sodu)	hydrofilowa substancja nawilżająca (humektant), zapobiega wysychaniu kosmetyków
Phenoxythanol (fenoksyetanol)	substancja konserwująca
Methylisothiazolinone (metyloizotiazolinon)	substancja konserwująca
Carbomer (karbomer)	składnik konsystencjotwórczy
Alphaisomethylionone (α -izometylojonon)	substancja zapachowa

Butylphenyl Methylpropional (butylofenylo-metylopropional)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Benzyl Salicylate (salicylan benzylu)	składnik kompozycji zapachowych, promotor wchłaniania, potencjalny alergen
Citral (cytral)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Citronellol (cytronellol)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Geraniol (geraniol)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Hydroxyisohexyl-3-Cyclohexene Carboxaldehyde (hydroksyizoheksyl-3-cykloheksan karboksyaldehyd)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Limonene (limonen)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Linalool (linalol)	składnik kompozycji zapachowych, potencjalny alergen
Parfum	Kompozycja zapachowa (jest to mieszanina naturalnych i syntetycznych substancji zapachowych wraz ze substancjami utrwalającymi zapach, posiadająca specyficzny zapach)

BHT (butylohydroksytoluen)	przeciwutleniacz (antyoksydant) - konserwant, ogranicza szybkość utleniania składników tłuszczowych kosmetyków, alergen
-------------------------------	--

ZAŁĄCZNIK NR 8

Ankieta – intradermoterapia kwasem hialuronowym

Numer	Pytanie	Możliwe odpowiedzi
1	Po jakim czasie zauważyła Pani pierwsze pozytywne efekty po zabiegu intradermoterapii?	a) po 3 dniach od pierwszego zabiegu b) po 1 tygodniu od pierwszego zabiegu c) po 2 tygodniach od pierwszego zabiegu d) nie zauważyłam żadnych efektów e) cera uległa pogorszeniu
2	Czy wystąpiły u Pani jakiegokolwiek objawy niepożądane podczas i po zabiegu intradermoterapii?	a) tak b) nie Jeśli wystąpiły działania niepożądane, proszę podać jakie:.....
3	Czy paliła Pani papierosy w okresie okołozabiegowym? Ile na dobę?	a) tak.....ile..... b) nie
4	Jaką ilość płynów przyjmowała Pani w ciągu doby, w okresie okołozabiegowym?	a) < 1 litra b) ok. 1,5 litra c) ok. 2 litrów d) > 2 litrów

ZAŁĄCZNIK NR. 9**Ankieta – suplementacja doustna kwasu hialuronowego**

Numer	Pytanie	Możliwe odpowiedzi
1	Po jakim czasie zauważyła Pani pierwsze pozytywne efekty stosowania preparatu Hialu – Femin®.	a) po 2 tygodniach b) po 1 miesiącu c) po 1,5 miesiąca d) po 2 miesiącach e) nie zauważyłam żadnych efektów f) cera uległa pogorszeniu
2	Czy wystąpiły u Pani jakiegolwiek objawy niepożądane w trakcie stosowania preparatu Hialu – Femin®?	a) tak b) nie Jeśli wystąpiły działania niepożądane, proszę podać jakie:.....
3	Czy paliła Pani papierosy w trakcie kuracji? Ile na dobę?	a) tak.....ile..... b) nie
4	Jaką ilość płynów przyjmowała Pani w ciągu doby, w trakcie kuracji preparatem Hialu – Femin®?	a) < 1 litra b) ok. 1,5 litra c) ok. 2 litrów d) > 2 litrów

ZAŁĄCZNIK NR 10

Ankieta – aplikacja zewnętrzna kwasu hialuronowego

Numer	Pytanie	Możliwe odpowiedzi
1	Po jakim czasie zauważyła Pani pierwsze pozytywne efekty stosowania kremu Frei Hyaluron Aktiv®?	a) natychmiast, ale efekt był krótkotrwały b) po 1 tygodniu c) po 2 tygodniach d) po 3 tygodniach e) po 1 miesiącu f) nie zauważyłam żadnych efektów g) cera uległa pogorszeniu
2	Czy wystąpiły u Pani jakiegokolwiek objawy niepożądane w trakcie stosowania kremu Frei Hyaluron Aktiv®?	a) tak b) nie Jeśli wystąpiły działania niepożądane, proszę podać jakie:.....
3	Czy paliła Pani papierosy w trakcie stosowania kremu Frei Hyaluron Aktiv®? Ile na dobę?	a) tak.....ile..... b) nie
4	Jaką ilość płynów przyjmowała Pani w ciągu doby, w trakcie stosowania kremu Frei Hyaluron Aktiv®?	a) < 1 litra b) ok. 1,5 litra c) ok. 2 litrów d) > 2 litrów

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy **doktorskiej** p.t.:

„KWAS HIALURONOWY W DERMATOLOGII ESTETYCZNEJ I KOSMETOLOGII: INTRADERMOTERAPIA, SUPLEMENTACJA DOUSTNA I APLIKACJA ZEWNĘTRZNA”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **naukowego: doktor nauk medycznych**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko

Data, podpis

OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia.....

.....

(podpis)