

Dorota Chomiczewska

Marta Kieć-Świerczyńska

Beata Kręcis

KONTAKTOWE ZAPALENIE SKÓRY Z PODRAŻNIENIA. CZĘŚĆ III. NIEINWAZYJNE METODY OCENY WŁAŚCIWOŚCI BIOFIZYCZNYCH SKÓRY

IRRITANT CONTACT DERMATITIS.

PART III. NON-INVASIVE METHODS TO ASSESS BIOPHYSICAL PROPERTIES OF THE SKIN

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

Ośrodek Alergii Zawodowej i Zdrowia Środowiskowego, Pracownia Dermatologii



STRESZCZENIE

Zaburzenia właściwości biofizycznych skóry zachodzące w przebiegu reakcji z podrażnienia wywołanej ekspozycją na substancje chemiczne mogą być badane przy pomocy wielu nieinwazyjnych metod. Najczęściej dokonuje się oceny przeznaskórkowej utraty wody (TEWL), uwodnienia naskórka, pH, rumienia, pigmentacji oraz skórny przepływ krwi. Metody te stosowane są również do oceny indywidualnej podatności na działanie drażniące. W kosmetologii i dermatologii służą one do badania skuteczności i bezpieczeństwa kosmetyków, leków i środków do higieny skóry. Ponadto mogą stanowić użyteczne narzędzie do diagnostyki i monitorowania różnych dermatoz oraz oceny towarzyszących im zjawisk patologicznych. Med. Pr. 2010;61(4):457–466

Słowa kluczowe: kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia, przeznaskórkowa utrata wody, pH, skórny przepływ krwi, rumień, pigmentacja

ABSTRACT

Disturbances in biophysical properties of the skin during irritant reactions induced by exposure to chemicals may be assessed by several non-invasive methods. The most popular one involves determinations of transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin pH and evaluation of erythema, pigmentation and skin blood flow. Non-invasive techniques are also applied to assess individual skin susceptibility to irritants. In dermatology and cosmetology they provide information about efficacy and safety of medicines, cosmetics and hygiene products. Determinations of skin parameters may also be useful in diagnosing and monitoring of various dermatoses and in the observation of changes in skin properties caused by the disease. Med Pr 2010;61(4):457–466

Key words: irritant contact dermatitis, transepidermal water loss, pH, skin blood flow, erythema, pigmentation

Adres autorek: Pracownia Dermatologii, Ośrodek Alergii Zawodowej i Zdrowia Środowiskowego,

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź,

e-mail: chomicz@imp.lodz.pl, marswier@imp.lodz.pl, krecisz@imp.lodz.pl

Nadesłano: 30 listopada 2009

Zatwierdzono: 17 grudnia 2009

Ekspozycja skóry na czynniki drażniące powoduje zmiany jej właściwości biofizycznych, takich jak przeznaskórkowa utrata wody, uwodnienie, pH, przepływ krwi, barwa i elastyczność. Właściwości te mogą być badane przy pomocy różnych nieinwazyjnych metod. Ze względu na konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu i zapewnienia odpowiednich warunków otoczenia nie są one jednak stosowane rutynowo w praktyce klinicznej, ale raczej znajdują zastosowanie w badaniach naukowych. Są użyteczne do badania indywidualnej podatności na działanie drażniące, wykrywania zaburzeń o charakterze subklinicznym, oceny odchyleń od stanu prawidłowego w przebiegu zmian cho-

robowych skóry o różnej etiologii oraz po ekspozycji na czynniki chemiczne i fizyczne. Wykorzystuje się je na przykład do badania działania kosmetyków, leków i środków do higieny skóry celem wykazania ich potencjalnych właściwości drażniących lub ochronnych. Eksperymentalna ocena właściwości skóry w przebiegu reakcji z podrażnienia przyczyniła się znacząco do poznania patomechanizmu tej reakcji i sposobów działania czynników drażniących na skórę (1).

Doświadczalnym modelem działania drażniącego jest kontaktowe zapalenie skóry wywołane ekspozycją na laurylosiarczan sodowy (SLS, synonim: siarczan sodowy — SDS) (2,3). Metodyka indukcji zapalenia



polega na aplikacji SLS na skórę w wodnym roztworze o stężeniu od 0,01% do 20% (zwykle 0,5–5%) w komorze pod okluzją (test płatkowy) na 2–24 godziny, maksymalnie do 48 godzin (3–7). Niekiedy zamiast SLS stosuje się inne substancje chemiczne, na przykład chlorek benzalkonium, olej krotonowy lub kwas nonanowy (8,9), a także ekspozycję na czynniki fizyczne, takie jak promieniowanie ultrafioletowe i mechaniczne, w tym tape stripping (3,10). Ekspozycja na czynnik drażniący może mieć charakter jednorazowy (5,11) lub wielokrotny — powtarzany w określonych odstępach czasu (6,11).

Dla oszacowania wywołanej eksperymentalnie reakcji ocenia się właściwości skóry w stanie wyjściowym i po aplikacji środków drażniących. Poza oceną wizualną (visual scoring — VS) dokonywany jest przede wszystkim pomiar przeznaskórkowej utraty wody (transepidermal water loss — TEWL), która jest wykładnikiem barierowej funkcji naskórka (naskórek

o prawidłowej strukturze stanowi barierę zapobiegającą nadmiernemu parowaniu wody na zewnątrz organizmu oraz przenikaniu szkodliwych substancji i mikroorganizmów do wnętrza) (1,12). Do najczęściej poza TEWL wykorzystywanych metod należy badanie zawartości wody w naskórku na podstawie pomiaru jego pojemności elektrycznej, pehametria, badanie ultrasonograficzne, kolorymetryczna ocena zabarwienia skóry oraz spektrofotometria służąca ocenie rumienia i pigmentacji (10,12) (tab. 1).

OCENA WIZUALNA

W wizualnej ocenie reakcji z podrażnienia większość badaczy posługuje się skalą Froscha i Kligmana, opartą na stwierdzeniu obecności trzech rodzajów wykwitów: rumienia, złuszczenia i rozpadlin. Nasilenie rumienia ocenia się w skali od 1+ do 4+, a złuszczenie i rozpadliny — od 1+ do 3+ (tab. 2). Jeśli w wyniku eksperymen-

Tabela 1. Nieinwazyjne metody oceny właściwości biofizycznych skóry (12)
Table 1. Non-invasive methods to assess biophysical properties of the skin (12)

Cecha skóry Skin property	Znaczenie badania Significance of the method	Mierzony parametr Measured parameter	Przyrząd do pomiaru Measuring device
Funkcja barierowa warstwy rogowej / Stratum corneum barrier function	ocena ryzyka wyprysku; wykrywanie zmian subklinicznych; kontrola leczenia / evaluation of eczema risk; detection of subclinical lesions; control of treatment	TEWL	tewametr, ewaporimetr / / tewameter, evaporimeter
Uwodnienie warstwy rogowej naskórka (zawartość wody w naskórku) / Stratum corneum hydration	ocena ryzyka wyprysku; wykrywanie zmian subklinicznych; kontrola leczenia / evaluation of eczema risk; detection of subclinical lesions; control of treatment	pojemność elektryczna skóry / skin capacity	korneometr / / corneometer
Kwaśny płaszcz skóry (pH) / Skin acid mantle (pH)	pojemność buforowa wobec zasad; ocena ryzyka wyprysku; wykrywanie zmian subklinicznych; kontrola leczenia / skin buffer capacitance; evaluation of eczema risk; detection of subclinical lesions; control of treatment	pH powierzchni skóry / / skin surface pH	pehametr / pHmeter
Skórny przepływ krwi (mikrokrążenie) / Skin blood flow (microcirculation)	tolerancja temperatury; wykrywanie zmian subklinicznych / tolerance to temperature; detection of subclinical lesions	przepływ włócnikowy erytrocytów / / erythrocyte flow in capillaries	laserowy dopplerowski przepływomierz / laser Doppler velocimeter
Rumień i pigmentacja skóry / Skin erythema and pigmentation	obiektywna ocena rumienia i pigmentacji w przebiegu wyprysku / objective assessment of erythema and pigmentation in the course of eczema	barwa skóry zależna od zawartości hemoglobiny i melaniny w skórze / / skin color depending on content of hemoglobin and melanin in the skin	kolorymetr, spektrofotometr / / colorimeter, spectrophotometer

TEWL — przeznaskórkowa utrata wody / transepidermal water loss.



Tabela 2. Kliniczna ocena reakcji z podrażnienia oparta na skali Froscha i Kligmana (2)
Table 2. Visual scoring of skin irritation based on the scale of Frosch & Kligman (2)

Cecha Skin lesion	Skala Scale	Ocena Assessment
Rumień / Erythema	1+	łagodny rumień (w postaci pojedynczych ognisk lub rozlany) / slight erythema (spotty or diffuse)
	2+	umiarkowany i jednolity rumień / moderate and uniform erythema
	3+	intensywny rumień / intense erythema
	4+	„płomiennoczerwony” rumień / fiery erythema
Złuszczenie / Scaling	1+	niewielkie złuszczenie / fine scaling
	2+	umiarkowane złuszczenie / moderate scaling
	3+	nasilone złuszczenie z dużymi łuskami / severe scaling, with large flakes
Rozpadliny / Fissures	1+	niewielkie rozpadliny / fine cracks
	2+	pojedyncze lub liczne szersze rozpadliny / single or multiple broader fissures
	3+	szerokie rozpadliny z wysiękiem lub krwawieniem / wide cracks with hemorrhage or weeping

talnej ekspozycji na substancję chemiczną suma punktów w jednym polu testowym wynosi lub przekracza 5, badanie zostaje zakończone. W użyciu jest wiele modyfikacji tej metody. Niekiedy stosowana jest skala polegająca wyłącznie na ocenie rumienia, według Willis, w tym przypadku jednak odpowiednia klasyfikacja nasilenia reakcji rumieniowej może być utrudniona przez współistniejącą suchość, szorstkość i pęknięcia skóry (tab. 3) (2,9,13).

Tabela 3. Ocena reakcji z podrażnienia na podstawie rumienia według Willis (9)

Table 3. Assessment of erythema in irritant reaction, according to Willis (9)

Ocena Assessment	Nasilenie rumienia Intensity of erythema
–(0)	brak reakcji / no visible reaction
+/(–0,5)	lekki, nieostro odgraniczony rumień / faint, ill defined erythema
1+	lekki, dobrze odgraniczony rumień / faint, but well defined erythema
2+	umiarkowany rumień / moderate erythema
3+	nasilony rumień / intense erythema

POMIAR TEWL

Pomiar TEWL stanowi najpowszechniej stosowaną metodę oceny reakcji z podrażnienia. Jest to najważniejszy parametr do badania funkcji barierowej naskórka. Wartość TEWL zależy od przepuszczal-

ności warstwy rogowej, która jest głównym elementem ochronnym skóry odpowiedzialnym za pełnienie tej funkcji (1). Na utratę wody przez naskórek składa się parowanie wskutek biernej dyfuzji oraz wydzielanie przez gruczoły ekrynowe (potowe). Zgodnie z aktualnie przyjętymi założeniami pojęcie TEWL odnosi się do parowania wody przez skórę i jej przydatki na drodze wyłącznie biernej dyfuzji, przy zredukowanym do minimum procesie pocenia (14).

Ciągłe parowanie wody z powierzchni naskórka i związany z tym przepływ pary wodnej powoduje powstanie różnicy (gradientu) gęstości pary wodnej między powierzchnią skóry a powietrzem w odległości kilku centymetrów od skóry. W tej strefie granicznej umieszcza się dwie pary czujników temperatury i wilgotności (znajdują się one w głowicy urządzenia) oraz dokonuje wielokrotnych pomiarów tych parametrów. Zarejestrowana między czujnikami różnica gęstości pary wodnej umożliwia obliczenie wielkości TEWL, która jest wyrażana w gramach na metr kwadratowy na godzinę ($\text{g}/\text{m}^2/\text{godz.}$). Wyniki pomiarów po przetworzeniu mogą być przedstawione w postaci graficznej (krzywa pomiarowa, wykres) (14,15).

Badanie wykonywane jest przy pomocy urządzenia zwanego tewametrem lub ewaporymetrem. Dostępne aparaty wyposażone są w systemy pomiarowe w otwartej lub zamkniętej komorze (2,16). W tych pierwszych czujniki mierzą temperaturę i wilgotność podczas swobodnego przepływu pary wodnej przez otwartą komorę aparatu, w drugim typie pomiar dotyczy przyrostu wilgotności powietrza w zamkniętej komorze (18).



Produkowanych jest wiele rodzajów urządzeń różniących się szczegółowymi rozwiązaniami technicznymi. Odmianą aparatury z zamkniętą komorą jest typ „condenser chamber”, w którym para ulega skropleniu na powierzchni o ujemnej temperaturze. Wśród instrumentów dostępnych na rynku przeważają aktualnie aparaty typu „open chamber”, podkreśla się jednak mniejszą wrażliwość urządzeń typu „closed chamber” na ruch powietrza (17). Porównanie wyników uzyskiwanych przy pomocy różnych instrumentów wskazuje na ich dobrą korelację, jednak równocześnie potwierdza istnienie pewnych odmienności (19).

Wielkość TEWL jest osobniczo zróżnicowana — zależy od wieku, płci, okolicy ciała, temperatury skóry, potliwości i stanu emocjonalnego (15). Istotny wpływ na wynik badania mają warunki otoczenia — temperatura, wilgotność i przepływ powietrza, pewną rolę odgrywają też różnice między aparatami. Do uzyskania porównywalnych wyników niezbędne jest stworzenie takich warunków pomiaru, w których wpływ czynników osobniczych i środowiskowych byłby maksymalnie zredukowany. Z tego względu konieczne jest zapewnienie odpowiednio długiego odpoczynku (zwykle 20 minut) przed badaniem, wyłączenie z diety ostrych przypraw i w miarę możliwości wyeliminowanie stresu (14). Pomiary — szczególnie w przypadku stosowania metody otwartej komory — powinny być wykonywane w pomieszczeniu o stałej temperaturze i wilgotności powietrza. Za optymalne warunki uznaje się temperaturę 20–22°C i wilgotność powietrza 40% (15).

Nieuszkodzona skóra o prawidłowej funkcji charakteryzuje się niską przeznaskórkową utratą wody, o wartości mieszczącej się w przedziale od 5 do 25 g/m²/godz. (20,21). Czynniki drażniące zwykle powodują zwiększenie TEWL poprzez wpływ na integralność warstwy rogowej (1,6,22). Powtarzającej się ekspozycji towarzyszą charakterystyczne wahania tego parametru — początkowo wzrost, a w ciągu kolejnych tygodni stopniowe obniżenie, prawdopodobnie z powodu pogrubienia warstwy rogowej. Jest ona efektem hiperprolifracji keratynocytów związanej z przewlekłym stanem zapalnym. Zjawisko to, określane jako zahartowanie skóry (skin hardening), może odgrywać ważną rolę w indywidualnej podatności na przewlekłe działanie drażniące (22). Stwierdzono również korelację między podatnością na to działanie a wysoką wyjściową wartością TEWL (23).

Pomiar TEWL jest powszechnie stosowany do oceny wpływu kosmetyków, środków do higieny skóry oraz środków czystości na funkcję barierową na-

skórka. Zwykle dokonuje się porównania wyników pomiaru przed aplikacją i po niej. Przykładem badania jest ocena zdolności preparatów nawilżających do zatrzymania wody w naskórku w efekcie okluzji lub działania jako humektant. Zwykle równocześnie mierzona jest zawartość wody w naskórku (14). Kolejne zastosowanie to ocena efektów leczenia różnych dermatoz, charakteryzujących się wysoką TEWL w obrębie zmian skórnych, np. skuteczności terapii miejscowej w atopowym zapaleniu skóry, łuszczycy oraz wspomnianym wyżej kontaktowym zapaleniu skóry z podrażnienia (14,24).

Niektóre produkty kosmetyczne i lecznicze zawierają wodę, która po aplikacji preparatu na skórę stopniowo paruje. Ten proces parowania nakłada się na TEWL. Obydwa łącznie określane są mianem „utraty wilgoci z powierzchni skóry” (skin surface water loss — SSWL). Wartość SSWL może być mierzona przy użyciu tych samych urządzeń co TEWL (14).

POMIAR UWODNIENIA NASKÓRKA

Metoda pomiaru uwodnienia warstwy rogowej oparta jest na zależności między pojemnością elektryczną a zawartością wody w naskórku. Wzrost lub zmniejszenie uwodnienia warstwy rogowej, ze względu na stałą dielektryczną wody, powoduje proporcjonalne zmiany pojemności elektrycznej, mierzone przy użyciu urządzenia zwanego korneometrem. Pomiar dotyczy głębokości około 10–40 µm, przy czym grubość warstwy rogowej wynosi zwykle 10–20 µm (1,2,16,25,26). Wynik pomiaru wyrażany jest w dowolnych jednostkach, wyznaczonych przez producenta (24).

Prawidłowe uwodnienie naskórka jest uwarunkowane po pierwsze obecnością w korneocytach, czyli komórkach warstwy rogowej, tzw. naturalnego czynnika nawilżania (natural moisturizing factor — NMF), po drugie — prawidłową zawartością, składem i strukturą lipidów przestrzeni międzykomórkowych (27). Czynnikiem nawilżania stanowi mieszaninę różnych związków o niskiej masie cząsteczkowej, rozpuszczalnych w wodzie i o wysokich właściwościach higroskopijnych. W skład NMF wchodzi aminokwasy, pyrrolidonowy kwas karboksylowy, mocznik, mleczany, amoniak, kwas moczowy i inne związki. Wiele tych składników to produkty proteolizy filagryny, białka wchodzącego w skład zrogowaciejącej otoczki korneocytów (28,29).

Odpowiednia zawartość wody w warstwie rogowej jest niezbędna do prawidłowego procesu rogowacenia



i złuszczenia komórek. Wynosi ona od 15% do 30% (27). Jeśli ulega obniżeniu poniżej 10%, klinicznie obserwuje się suchość, szorstkość, złuszczenie i pęknięcia naskórka (27,30). Równocześnie niedostateczne uwodnienie powoduje upośledzenie funkcji barierowej oraz zwiększenie podatności skóry na podrażnienie. Istnieje odwrotna korelacja między TEWL a uwodnieniem warstwy rogowej. Wysoka wartość TEWL, odzwierciedlająca zaburzoną funkcję barierową, zwykle występuje łącznie z obniżoną zawartością wody w warstwie rogowej (24). Możliwości zastosowania tego ostatniego pomiaru w dermatologii i kosmetologii są podobne jak w przypadku TEWL.

Innym sposobem badania uwodnienia jest spektroskopia rezonansu magnetycznego (nuclear magnetic resonance — NMR). Obrazowanie NMR opiera się na zjawisku wzbudzenia jąder atomów wodoru w polu magnetycznym i pomiarze czasu relaksacji — natężenie sygnału jest odwzorowaniem gęstości protonów wodoru, która z kolei jest proporcjonalna do zawartości wolnej wody w tkance (16). Możliwe jest też zastosowanie metody spektroskopii świetlnej, wykorzystującej promieniowanie podczerwone (spektroskopia w podczerwieni) lub tzw. promieniowanie Ramana, czyli promieniowanie nieelastycznego rozpraszania fotonów (1).

POMIAR pH

„Kwaśny płaszcz”, czyli odpowiednie pH powierzchni skóry i warstwy rogowej odgrywa ważną rolę w mechanizmach odporności przeciwdrobnoustrojowej i utrzymaniu prawidłowej flory fizjologicznej skóry. Stanowi również optymalne środowisko dla aktywności enzymów uczestniczących w syntezie lipidów, procesu ich wydzielania do przestrzeni międzykomórkowych i formowania dwuwarstwowych struktur. Pośrednio przyczynia się więc do tworzenia prawidłowej bariery naskórkowej i odporności skóry na czynniki fizyczne i chemiczne.

Do oszacowania pH skóry zazwyczaj używa się pehametru z potencjometrycznym układem pomiarowym złożonym ze szklanej płaskiej elektrody, w której obrębie wyróżnia się elektrodę czynną i porównawczą (zwaną też elektrodą odniesienia). Oddzielone są one cienką szklaną membraną i zawierają różne roztwory elektrolitów. Wartość pH obliczana jest na podstawie różnicy potencjałów między elektrodami, zależnej od różnicy stężenia jonów wodorowych (H^+) między powierzchnią skóry a roztworem umieszczonym w elektrodzie odniesienia (zwykle $HgCl+KCl$) (31,32).

Należy pamiętać, że zgodnie z definicją fizykochemiczną pH stanowi ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych w roztworze. W przypadku skóry roztworem, w którym bada się stężenie jonów H^+ , jest mieszanina potu, łju i wody aplikowanej na powierzchnię naskórka wskutek zwilżenia elektrody. Do mieszaniny tej dysocjują jony uwalniane przez wolne kwasy tłuszczowe i inne kwasy obecne w naskórku. Przy wykonywaniu pomiaru ważne jest zwilżenie elektrody pehametru, ponieważ sama warstwa rogowa zawiera przede wszystkim hydrofobowe (ewentualnie amfoteryczne) lipidy oraz niewielką tylko ilość wody związanej wewnątrzkomórkowo (32).

Odczyn (pH) skóry właściwej wynosi około 7, natomiast na powierzchni naskórka obniża się do około 5. Zjawisko to związane jest ze wzrostem dysocjacji jonów wodorowych w wyniku aktywności hydrolaz naskórka. Dzięki tym enzymom powstają kwasy rozpuszczalne w wodzie, takie jak kwas mlekowy, kwas urokainowy, aminokwasy czy pyrrolidonowy kwas karboksylowy (30,33).

Do celów badawczych pomiary najczęściej dokonywane są na skórze przedramienia, niekiedy twarzy. Wyniki w niewielkim stopniu zależą od płci, wieku i okolicy anatomicznej. Zwykle zawierają się w przedziale od 4 do 7, a za prawidłowe i optymalne dla fizjologicznych funkcji uważa się pH powierzchni skóry około 5, a nawet poniżej tej wartości (30,34–37). Ponieważ podwyższona temperatura ciała sprzyja wydzielaniu większej objętości potu o mniej kwaśnym odczynie, sugeruje się wykonywanie badania pH w warunkach niesprzyjających aktywności gruczołów ekrynowych, czyli w temperaturze poniżej $23^{\circ}C$ i wilgotności powietrza poniżej 65% (38).

Odczyn (pH) skóry ulega podwyższeniu wskutek aplikacji substancji o odczynie zasadowym, takich jak kosmetyki i środki do higieny skóry, zwłaszcza mydła i detergenty (30,33). Alkaliczację powierzchni naskórka opisywano jako zjawisko towarzyszące różnym dermatozom (30). Według niektórych badaczy ocena pH może być wykorzystana do przewidywania ryzyka rozwoju kontaktowego zapalenia skóry z podrażnienia (33). Uważa się ponadto, że długotrwały wzrost pH skóry (np. wskutek powtarzającej się ekspozycji na substancje o odczynie zasadowym) może wiązać się z opornością na leczenie i gorszym rokowaniem w dermatozach pochodzenia zawodowego oraz z podwyższoną podatnością skóry na działanie drażniące (1,33).



POMIAR SKÓRNEGO PRZEPŁYWU KRWI

Pomiar skórnego krążenia krwi jest dokonywany przy użyciu laserowego dopplerowskiego przepływomierza. W obrazowaniu przepływu wykorzystuje się zjawisko Dopplera polegające na zmianie częstotliwości i długości fali światła laserowego odbitego od poruszających się krwinek, podczas gdy częstotliwość fali odbitej od elementów statycznych tkanki pozostaje niezmienną (39). Sygnał powstający po odbiciu wiązki światła laserowego jest rejestrowany przez detektor urządzenia, ulega zamianie w impuls elektryczny i po przetworzeniu przedstawiany jest jako kolorowy obraz przepływu krwi. Źródłem światła w urządzeniach do badania krążenia skórnego jest zwykle laser helowo-neonowy (40,41).

Do badania głębokiego przepływu w skórze i tkance podskórnej służy światło monochromatyczne o długości 633 nm (barwy czerwonej) lub 780 i 810 nm (promieniowanie podczerwone), natomiast do uwidocznienia krążenia powierzchownego wykorzystywane jest przede wszystkim światło zielone o długości fali 543 nm, odpowiadającej jednemu ze szczytów pochłaniania hemoglobiny (40).

Metoda laserowo-dopplerowskiego pomiaru przepływu (Laser Doppler Flowmetry — LDF) pozwala na uzyskanie obrazu krążenia pod głowicą aparatu, natomiast instrumenty typu LDPI (Laser Doppler Perfusion Imaging — obrazowanie perfuzji za pomocą badania laser-doppler) pozwalają na przestrzenny pomiar zmian ukrwienia poprzez skanowanie tkanki swobodnie poruszającą się wiązką laserową, bez konieczności kontaktu urządzenia ze skórą (40,42).

Naczynia skóry tworzą głęboki spłot naczyński na granicy skóry właściwej i tkanki podskórnej oraz powierzchowny spłot podbrodawkowy (43). Przepływ krwi podlega wahaniom w zależności do temperatury. Do uzyskania porównywalnych wyników rekomendowane są pomiary w pomieszczeniach o temperaturze powietrza wynoszącej 20–25°C. Ponadto na krążenie skórne mają wpływ takie czynniki, jak palenie papierosów, przyjmowanie leków, potrawy z ostrymi przyprawami, alkohol czy stres (40). Ostra faza reakcji z podrażnienia cechuje się występowaniem rumienia i wzmożonym przepływem krwi. Wykazano, że w ciągu tygodnia od eksperymentalnej ekspozycji krążenie wraca do prawidłowych wartości (44). Ocena mikrokrążenia może być wykorzystana do wykrycia reakcji z podrażnienia o charakterze subklinicznym, gdy zmiany skórne nie są uchwytne gołym okiem, ale przepływ krwi wzrasta nawet 3–4 razy (1,12).

OCENA ULTRASONOGRAFICZNA SKÓRY

Badanie przy pomocy ultrasonografów wyposażonych w systemy skanowania A lub B pozwala na ocenę grubości skóry i wizualizację jej elementów nawet do głębokości kilku centymetrów. Emitowane fale częściowo ulegają transmisji, a częściowo odbiciu na granicy sąsiadujących ze sobą struktur o odmiennej echogeniczności, położonych w różnej odległości od źródła fali, co pozwala na uzyskanie obrazu przekroju skóry w wielu odcieniach szarości (system skanowania B) (45).

W dermatologii ultrasonografię wykorzystuje się niekiedy do oceny guzów zlokalizowanych w skórze, np. do określenia głębokości ich naciekania. Inne zastosowanie to ocena zmian w przebiegu procesu starzenia, monitorowanie i kontrola efektów stosowania różnych preparatów leczniczych i kosmetycznych lub wykonywania zabiegów z zakresu medycyny estetycznej. W odniesieniu do reakcji z podrażnienia badanie ultrasonograficzne może być przydatne do stwierdzenia pogrubienia skóry spowodowanego procesem lichenizacji w przebiegu przewlekłego stanu zapalnego, może też uwidocznić obrzęk skóry towarzyszący zwykle ostrej fazie zapalenia (12,46).

Prawidłowa skóra właściwa ma grubość od 500 µm do 1 mm, a naskórek około 100 µm (30). Skóra może ulegać ścieczeniu w wyniku zmian zachodzących w procesie starzenia lub ekspozycji na kortykosteroidy do stosowania miejscowego, a pogrubieniu w związku na przykład z ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe (zjawisko fotostarzenia skóry) lub na różne czynniki chemiczne (45).

OCENA RUMIENIA I PIGMENTACJI

Kolor skóry postrzegany przez ludzkie oko zależy od pochłaniania, odbicia lub rozpraszania światła w naskórku i skórze właściwej. Za pochłanianie światła odpowiedzialne są chromofory skórne. Najważniejsze z nich to melanina, hemoglobina (Hb) i oksyhemoglobina (HbO₂), mniejszą rolę odgrywają np. karotenoidy i bilirubina.

Hemoglobina pochłania przede wszystkim światło zielone, a jej barwę postrzegamy jako czerwoną. Melanina posiada zdolność absorpcji światła widzialnego o różnej długości fali (od 400 do 700 nm), przy czym maksimum pochłaniania przypada na promieniowanie krótsze, a jej zabarwienie odbieramy jako mieszaninę szarości i żółci. Można powiedzieć, że kolor skóry rasy kaukaskiej zależy od absorpcji światła przez he-



moglobinę i melaninę oraz stanowi wypadkową zawartości w skórze tych dwóch składników (47).

Rumień powstaje wskutek poszerzenia naczyń skóry i wzmożonego przepływu krwi, a zatem wiąże się ze zwiększoną zawartością Hb i HbO₂, natomiast pigmentacja skóry zależy od rodzaju melaniny (eumelaniny są brązowe lub czarne, feomelaniny są czerwone lub żółte), sposobu jej gromadzenia w melanosomach i przekazywania do komórek naskórka (48).

Pomiar przy użyciu różnych nieinwazyjnych metod może odnosić się ogólnie do koloru skóry albo obecności rumienia lub pigmentacji. Do mierzenia tych parametrów służą urządzenia takie, jak kolorymetry, przy użyciu których oszacowane zostaje ogólnie zabarwienie skóry i spektrofotometry, zaprojektowane do oceny nasilenia rumienia zależnego od hemoglobiny i pigmentacji związanej z obecnością melaniny (47,49). Ogólnie zasada pomiaru opiera się na emisji przez urządzenie światła o określonej długości fali, a następnie — detekcji i analizie światła, które nie zostało pochłonięte przez skórę, lecz uległo rozproszeniu (tzw. odbiciu dyfuzyjnemu) (50).

Kolorymetry wyposażone są w źródło światła białego obejmujące całe widzialne spektrum, które ulega odbiciu od powierzchni skóry i jest rejestrowane przez światłoczułe komórki (dla światła czerwonego, niebieskiego i zielonego). Do opisu wyników pomiaru wykorzystuje się model klasyfikacji kolorymetrycznej, zgodnie z którym określone są trzy parametry barwy (50,51):

$$L^*a^*b \quad [1]$$

gdzie:

L — luminancja, czyli jasność lub jaskrawość,

a i b — chromatyczność barwy (a — od zieleni do czerwieni,

b — od barwy niebieskiej do żółtej).

Współrzędne L i a zależne są przede wszystkim od zawartości hemoglobiny i melaniny, jednak stwierdzono, że ten model pomiaru nie odzwierciedla idealnie niewielkich wahań ilościowych tych chromoforów (52). Z kolei spektrofotometr przy pomocy układu optycznego rejestruje odbicie światła emitowanego przez zestaw diod od badanej powierzchni i następnie z zastosowaniem elementów elektronicznych dokonuje analizy widma światła rozproszonego (1,50). Ocena zawartości melaniny oparta jest na analizie pochłaniania i odbicia światła o długości fali odpowiadającej barwie czerwonej i bliskiej promieniowania podczerwonego, a zawartość hemoglobiny mierzona jest z użyciem światła zie-

lonego i czerwonego (49). Wyniki pomiarów ostatecznie wyrażane są jako współczynniki rumienia i pigmentacji, mogą być również przedstawione według klasyfikacji L*a*b (51).

Opisane metody mogą służyć ocenie zmian zachodzących w skórze np. po ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (49), zmian związanych z procesem starzenia się skóry (53), efektów stosowania leków i kosmetyków, zabiegów z zakresu dermatologii estetycznej (54), a także do badania działania drażniącego różnych substancji (55). Dla kontaktowego zapalenia skóry z podrażnienia charakterystyczna jest obecność rumienia w ostrej i przewlekłej fazie reakcji, niekiedy obserwuje się pozapalne zmiany pigmentacji (przebarwienia).

MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Mikroskopia konfokalna jest techniką obrazowania tkanek *in vivo*, w której dzięki skupionej wiązce światła laserowego przechodzącej przez badany obiekt uzyskuje się jego tzw. przekroje optyczne (55–57). Metoda ta polega na detekcji wyemitowanego przez laser promieniowania, które w naskórku i skórze właściwej uległo częściowo odbiciu, pochłonięciu lub rozproszeniu. Zjawiska te zależą od optycznych właściwości skóry stanowiących wypadkową obecności chromoforów, takich jak melanina i hemoglobina, oraz organelli komórkowych (58). Struktury te zapewniają „endogenne kontrast”, dzięki czemu barwienie tkanek nie jest konieczne (57,58).

Światło odbite od obiektu lub emitowane w przypadku znacznika fluorescencyjnego przechodzi przez układ optyczny mikroskopu skupiający promienie w kierunku detektora. Dzięki systemowi przesłon umieszczonych za układem optycznym do detektora docierają tylko promienie pochodzące z jednej płaszczyzny przekroju przez obiekt, zwanej płaszczyzną ogniskowania (55). Mikroskop ten więc analizuje tylko światło pochodzące z jednej płaszczyzny preparatu, eliminując światło docierające z warstw położonych poniżej i powyżej (56). Zmieniając położenie przesłon uzyskuje się przesunięcie płaszczyzny ogniskowania i w efekcie powstaje szereg obrazów — „przekrojów” badanego obiektu na różnej głębokości (55).

W przeciwieństwie zatem do pionowych przekrojów uzyskiwanych w tradycyjnym badaniu histopatologicznym obrazy uzyskiwane metodą mikroskopii konfokalnej są „wirtualnymi przekrojami” równoległymi do powierzchni skóry, w różnych odcieniach szarości lub kolorowymi w przypadku zastosowania



znaczników fluorescencyjnych (57,58). Zestawienie takich warstwowych obrazów poprzez cyfrowe przetworzenie danych pozwala na uzyskanie trójwymiarowej wizualizacji badanego obiektu (58). Ze względu na sposób uzyskiwania obrazu wyróżnia się dwa rodzaje mikroskopów: laserowy skanujący mikroskop konfokalny (Laser Confocal Scanning Microscope — LCSM) i dwufotonowy mikroskop konfokalny (Two-Photon Confocal Microscope — TPCM). W obydwu urządzeniach ostateczne obrazy są efektem cyfrowego przetworzenia danych i charakteryzują się niespotykaną dotychczas rozdzielczością i kontrastem, zwłaszcza w przypadku zastosowania fluorochromów dla uwidocznienia różnych struktur (55).

Przy użyciu mikroskopu konfokalnego można *in vivo* obserwować architekturę naskórka i skóry właściwej do głębokości 300–350 mikronów, z rozdzielczością na poziomie 0,5–1 μm w płaszczyźnie poprzecznej i 4–5 μm w płaszczyźnie osiowej (56,58). Na podstawie uzyskanych obrazów możliwa jest ocena takich zmian, jak znamiona, rogowacenie słoneczne czy czerniak. Uważa się, że zastosowanie skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego może poprawiać trafność diagnozy w dermatologii onkologicznej. Przy pomocy tej techniki można śledzić również zmiany zachodzące w skórze po ekspozycji na alergen i substancje drażniące.

Stan gąbczasty naskórka, egzocytoza, poszerzone naczynia w brodawkach skóry i migracja leukocytów występują zarówno w przebiegu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, jak i zapalenia z podrażnienia. Za charakterystyczne dla reakcji z podrażnienia uważa się natomiast uszkodzenie warstwy rogowej, martwicę naskórka, parakeratozę i hiperproliferaację naskórka (1,58).

Warto podkreślić, że mikroskopia konfokalna pozwala na prześledzenie z osobna zmian zachodzących w poszczególnych warstwach naskórka i na różnej głębokości skóry ze względu na możliwość wyboru kolejno wielu płaszczyzn obrazowania. Możliwa jest również obserwacja ewolucji procesu zapalnego poprzez badania wykonywane w pewnych odstępach czasu, a także prawdopodobnie detekcja subklinicznych zmian zachodzących w tkankach. W przyszłości zatem mikroskopia konfokalna może stać się użytecznym narzędziem diagnozowania kontaktowego zapalenia skóry, różnicowania etiologii z podrażnienia i alergicznej (58). Ponadto ze względu na nieinwazyjność zapewne znajdzie ona również zastosowanie w badaniach z zakresu kosmetologii (57).

PODSUMOWANIE

Przegląd literatury medycznej wskazuje, że zainteresowanie nieinwazyjnymi metodami oceny skóry utrzymuje się na wysokim poziomie od wielu lat. Są one zarówno szeroko stosowane w badaniach naukowych, jak i wykorzystywane do diagnostyki i monitorowania stanu skóry w gabinetach dermatologicznych i kosmetycznych. Współcześnie obserwuje się szczególnie wzrost zainteresowania pomiarami instrumentalnymi do oceny działania produktów kosmetycznych i leczniczych na skórę, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnych właściwości drażniących.

Dziedzina nieinwazyjnych badań skóry rozwija się dynamicznie również dzięki postępowi technicznemu, opracowywaniu nowych urządzeń oraz wprowadzaniu modyfikacji już stosowanych metod. Udoskonalenia techniczne przyczyniają się do wzrostu precyzji wykonywanych badań, powtarzalności i porównywalności wyników. W tym celu również podkreśla się konieczność kalibracji urządzeń przed dokonywaniem pomiarów. Niezależnie od parametrów technicznych aparatury, wpływ warunków środowiska i czynników indywidualnych na wyniki pomiaru wciąż pozostaje nie do wyeliminowania. Niezbędne jest więc przestrzeganie zasad i standardów wykonywania badań oraz podążanie za wskazówkami opracowywanymi przez towarzystwa naukowe i grupy ekspertów.

PIŚMIENNICTWO

1. Fluhr J.W., Darlenski R., Angelova-Fischer I., Tsankov N., Basketter D.: Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. 1. Skin irritation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008;21:124–135
2. Kartono F., Maibach H.I.: Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response: an overview of tandem irritation studies. *Contact Dermatitis* 2006;54:303–312
3. Gebhard K.L., Effendy I., Löffler H.: Artificial disruption of skin barrier prior to irritant patch testing does not improve test design. *Br. J. Dermatol.* 2004;150:82–89
4. Spiekstra S.W., Toebak M.J., Sampat-Sardjoepersad S., van Beek P.J., Boorsma D.M., Stoof T.J. i wsp.: Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Contact Dermatitis* 2005;14:109–116
5. Smith H.R., Rowson M., Basketter D.A., McFadden J.P.: Intra-individual variation of irritant threshold and rela-



- tionship to transepidermal water loss measurement of skin irritation. *Contact Dermatitis* 2004;51:26–29
6. Branco R., Lee Y., Zhai H., Maibach H.I.: Long-term repetitive sodium lauryl sulfate-induced irritation of the skin: an *in vivo* study. *Contact Dermatitis* 2005;53:278–284
7. Farage M.A.: Enhancement of visual scoring of skin irritant reactions using cross-polarized light and parallel-polarized light. *Contact Dermatitis* 2008;58:147–155
8. Endo K., Suzuki N., Yoshida O., Sato H., Fujikura Y.: The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests. *Skin Res. Technol.* 2007;13:425–435
9. Willis C.M., Stephens C.J.M., Wilkinson J.D.: Assessment of erythema in irritant contact dermatitis. Comparison between visual scoring and laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis* 1988;18:138–142
10. Fluhr J.W., Kuss O., Diepgen T., Lazzerini S., Pelosi A., Gloor M. i wsp.: Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types. *Br. J. Dermatol.* 2001;145:696–703
11. De Jongh C.M., Lutter R., Verberk M.M., Kezic S.: Differential cytokine expression in skin after single and repeated irritation by sodium lauryl sulphate. *Exp. Dermatol.* 2007;16:1032–1040
12. Wigger-Alberti W., Elsner P.: Contact dermatitis due to irritation. W: Kanerva L., Elsner P., Wahlberg J.E., Maibach H.I. [red.]. *Handbook of occupational dermatology*. Springer Verlag, New York 2000, ss. 99–110
13. Spoo J., Wigger-Alberti W., Berndt U., Fischer T., Elsner P.: Skin cleansers: Three test protocols for the assessment of Irritancy Ranking. *Acta Derm. Venereol.* 2002;82:13–17
14. Treffel P., Gabard B.: Transepidermal water loss. W: Agache P., Humbert P. [red.]. *Measuring the skin: non-invasive investigations, physiology, normal constants*. Springer Verlag, Berlin — Heidelberg 2004, ss. 553–564
15. Pinnagoda J., Tupker R.A., Agner T., Serup J.: Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from The Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1990;22:164–178
16. Fischer T.W., Wigger-Alberti W., Elsner P.: Assessment of 'dry skin': Current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001;14:83–195
17. Cohen J.C., Hartman D.G., Garofalo M.J., Basehoar A., Raynor B., Ashbrenner E. i wsp.: Comparison of closed chamber and open chamber evaporimetry [streszczenie]. *Skin Res. Technol.* 2009;15(1):51–54
18. Mündlein M., Valentin B., Chabicovsky R., Nicolics J., Weremczuk J., Tarapata G. i wsp.: Comparison of transepidermal water loss (TEWL) measurements with two novel sensors based on different sensing principles. *Sens. Actu. A* 2008;142:67–72
19. Farahmand S., Tien L., Hui X., Maibach H.I.: Measuring transepidermal water loss: a comparative *in vivo* study of condenser-chamber, unventilated-chamber and open-chamber systems. *Skin Res. Technol.* 2009;15(4):392–398
20. Fluhr J.W., Feingold K.R., Elias P.M.: Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent *in vivo* and *ex vivo* models. *Exp. Dermatol.* 2006;15:483–492
21. Tarapata G., Weremczuk J., Jachowicz R.S.: Standaryzacja miary i system do pomiaru zdolności parowania skóry [cytowany 25 listopada 2009]. Adres: <http://home.agh.edu.pl/~km2007/misc/papers/233.pdf>
22. De Jongh C.M., Verberk M.M., Withagen C.E.T., Jacobs J.J.L., Rustemeyer T., Kezic S.: Stratum corneum cytokines and skin irritation response to sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis* 2006;54:325–333
23. Agner T.: Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate induced irritation in normal skin. *Contact Dermatitis* 1991;25:108–114
24. Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.M.: The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 2008;17:1063–1072
25. Batisse D., Giron F., Lévêque J.L.: Capacitance imaging of the skin surface. *Skin Res. Technol.* 2006;12(2):99–104
26. Wojas-Pelc A., Brudnik U.: Nieinwazyjne metody oceny starzenia się skóry. *Dermatol. Estet.* 2003;5(1):16–21
27. Verdier-Sévrain S., Bonté F.: Skin hydration. *J. Cosmet. Dermatol.* 2007;6:75–82
28. Rawlings A.V., Harding C.R.: Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* 2004;17(Supl. 19):43–48
29. Czarnecka-Operacz M.: Sucha skóra jako aktualny problem kliniczny. *Postępy Dermatol. Alergol.* 2006;2:49–56
30. Martini M.C.: Kosmetologia i farmakologia skóry. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007
31. Waller J.W., Maibach H.I.: Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res. Technol.* 2005;11:221–235
32. Agache P.: Measurement of skin surface acidity. W: Agache P., Humbert P. [red.]. *Measuring the skin: non-invasive investigations, physiology, normal constants*. Springer Verlag, Berlin — Heidelberg 2004, ss. 84–86
33. Rippke F., Schreiner V., Schwanitz H.J.: The acidic milieu of the horny layer. New findings of the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2002;3(4):261–272
34. Ehlers C., Ivens U.I., Møller M.L., Senderovitz T., Serup J.: Females have lower skin surface pH than man. A study on



- the influence of gender, forearm site variation, right/left difference and time of the day on the skin surface pH. *Skin Res. Technol.* 2001;7:90–94
35. Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H., Finkel P.: Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2006;28(5):359–370
 36. Kim M.-K., Patel R.A., Shinn A.H.: Evaluation of gender difference in skin type and pH. *J. Dermatol. Sci.* 2006;41:153–156
 37. Man M.Q., Xin S.J., Song S.P., Cho S.Y., Zhang X.J., Tu C.X. i wsp.: Variation of skin surface pH, sebum content and stratum corneum hydration with age and gender in a large Chinese population. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009;22(4):190–199
 38. Zlotogorski A., Dikstein S.: Measurement of skin surface pH. W: Serup J., Jemec G.B.E. [red.]. *Handbook of non-invasive methods and the skin.* CRC Press, Boca Raton (USA) 1995, ss. 223–225
 39. Przywara S., Wroński J., Terlecki P., Zubilewicz T., Kobusiewicz W., Żywicki W. i wsp.: Zastosowanie metody laserowej przepływometrii dopplerowskiej do monitorowania i oceny skuteczności zabiegu wideoskopowej sympatektomii lędźwiowej u pacjentów z pierwotnym fenomenem Raynauda i nadpotliwością. *Acta Angiol.* 2004;10(2):57–66
 40. Agache P.: Laser Doppler velocimetry. W: Agache P., Humbert P. [red.]. *Measuring the skin: non-invasive investigations, physiology, normal constants.* Springer Verlag, Berlin — Heidelberg 2004, ss. 343–347
 41. Goh C.L., Khoo L.: Laser doppler perfusion imaging (LDPI) and transepidermal water loss (TEWL) values in psoriatic lesions treated with narrow band UVB phototherapy. *Dermal vascularity may be useful indicator of psoriatic activity.* *Ann. Acad. Med. Singapore* 2004;33:75–79
 42. Proszek Ł.: Laserowo-dopplerowskie pomiary ukrwienia [cytowany 25 listopada 2009]. Adres: <http://informatyka.cm-uj.krakow.pl/flash/lukasz-proszek-LDF.swf>
 43. Jabłońska S., Majewski S.: *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006
 44. Barány E., Lindberg M., Lodén M.: Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermatitis* 1999;40:98–103
 45. Agache P.: Skin blood flow: histophysiology. W: Agache P., Humbert P. [red.]. *Measuring the skin: non-invasive investigations, physiology, normal constants.* Springer Verlag, Berlin — Heidelberg 2004, ss. 329–335
 46. Techpol Medical. *DermaScan C.* Cortex Technology [materiały informacyjne] [cytowany 25 listopada 2009]. Techpol Medical. Adres: <http://www.techpol.lublin.pl>
 47. Agache P.: Skin colour measurement. W: Agache P., Humbert P. [red.]. *Measuring the skin: non-invasive investigations, physiology, normal constants.* Springer Verlag, Berlin — Heidelberg 2004, ss. 33–38
 48. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Burgdorf W.H.C.: *Dermatologia.* T. 2. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004
 49. Lim S.H., Kim S.M., Lee Y.W., Ahn K.J., Choe Y.B.: Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation — induced photodamage in Koreans. *Skin Res. Technol.* 2008;14:93–102
 50. Jaglarz J.: Wrażenia barwne — jak je mierzyć? *Foton* 2005;89:34–42 [cytowany 25 listopada 2009]. Adres: <http://www.if.uj.edu.pl/Foton/89/pdf/07%20wrazenia%20barwne-jaglarz.pdf>
 51. Shriver M.D., Parra E.J.: Comparison of narrow-band reflectance spectroscopy and tristimulus colorimetry for measurements of skin and hair color in persons of different biological ancestry. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2000;112(1):17–27
 52. Takiwaki H., Miyaoka Y., Kohno H., Arase S.: Graphic analysis of the relationship between skin colour change and variations in the amounts of melanin and haemoglobin. *Skin Res. Technol.* 2002;8:78–83
 53. Li L., Mac-Mary S., Marsaut D., Sainthillier J.M., Nouveau S., Gharbi T. i wsp.: Age-related changes in skin topography and microcirculation. *Arch. Dermatol. Res.* 2006;297:412–416
 54. Berardesca E., Cameli N., Primavera G., Carrera M.: Clinical and instrumental evaluation of skin improvement after treatment with a new 50% pyruvic acid peel. *Dermatol. Surg.* 2006;32:526–531
 55. Clemmensen A., Andersen F., Petersen T.K., Kalden H., Melgaard A., Andersen K.E.: The irritant potential of *n*-propanol (nonanoic acid vehicle) in cumulative skin irritation: a validation study of two different human *in vivo* test models. *Skin Res. Technol.* 2008;14:277–286
 56. Piotrowska A.: Laserowy mikroskop konfokalny — OCT dermatologiczne. *CX-News* 1/23/2008 [cytowany 25 listopada 2009]. Adres: <http://www.cxnews.pl/laserowy-mikroskop-konfokalny-oct-dermatologiczne,101.html>
 57. González S., Gilaberte-Calzada Y.: *In vivo* reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2008;30:1–17
 58. Astner S., González S., Gonzalez A.: Noninvasive evaluation of allergic and irritant contact dermatitis by *in vivo* reflectance confocal microscopy. *Dermatitis* 2006;17:182–191
- Badania współfinansowane przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

