

Utjecaj topikalne primjene vitamina C na proces starenja kože

Džidić, Marija

Professional thesis / Završni specijalistički

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:931139>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Džidić

**UTJECAJ TOPIKALNE PRIMJENE VITAMINA C NA PROCES
STARENJA KOŽE**

Specijalistički rad

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Marija Džidić

**UTJECAJ TOPIKALNE PRIMJENE VITAMINA C NA PROCES
STARENJA KOŽE**

Specijalistički rad

Zagreb, 2022.

Poslijediplomski specijalistički studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor rada: Red. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić

Specijalistički rad obranjen je dana 8. rujna 2022. na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Marijana Zovko Končić
2. prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić
3. dr. sc. Maja Lusina Kregar

Rad ima 76 listova.

PREDGOVOR

Specijalistički rad je izrađen na Zavodu za farmakognoziju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u okviru Poslijediplomskog specijalističkog studija Dermatofarmacija i kozmetologija uz stručno vodstvo prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Rad je proveden u sklopu projekta Ekstrakcija bioaktivnih biljnih sastavnica pomoću zelenih otapala – korak prema zelenim kozmeceuticima (IP-2018-01-6504) Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na stručnom vodstvu, beskrajnom strpljenju i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog specijalističkog rada.

Zahvaljujem svojem suprugu na bezuvjetnoj podršci tijekom studija.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Na tržištu se nalazi veliki broj različitih lokalnih pripravaka s različitim oblicima i dozama vitamina C koji se koriste za usporavanje procesa starenja kože lica. Cilj specijalističkog rada je pregled znanstvenih studija u kojima je ispitivano topikalno djelovanje vitamina C na proces starenja kože lica kako bi se napravila sistematizacija rezultata provedenih istraživanja.

Materijal / Ispitanici i metode

Za potrebe pisanja ovog specijalističkog rada je pretražena elektronička baza podataka PubMed. Pretraživanjem su obuhvaćene znanstvene studije koje su ispitivale topikalno djelovanje vitamina C na proces starenja kože. Uključene su i studije koje su ispitivale različite kombinacije vitamina C s brojnim sintetskim, ali i prirodnim djelatnim tvarima. Odabir znanstvenih studija je bio ograničen na kliničke studije objavljene na engleskom jeziku. Pregledane su sve one koje imaju dostupne cjelovite tekstove ili iznimno samo sažetke.

Rezultati

Obradene su ukupno 23 studije koje su ispitivale učinkovitost topikalnog vitamina C na proces starenja kože. Pretražene studije su dokazale djelotvoran učinak vitamina C u biosintezi kolagena, povećanju gustoće kožnih papila, povećanju elastičnosti i kao antioksidansa. Nekoliko studija je pokazalo dobru podnošljivost tretmana. Inovativne formulacije vitamina C s različitim sustavima dostave pokazale su se dobre u rješavanju problema stabilnosti. Kombinacije vitamina C s drugim tvarima doprinijele su postizanju bolje učinkovitosti.

Zaključak

Topikalni pripravci s vitaminom C su pokazali značajno djelovanje u procesu starenja kože. Dodatak drugih aktivnih tvari kao i inovativni farmaceutski oblici mogu osigurati stabilnost vitamina C uz očuvanje učinkovitosti. Unatoč tomu, potrebna su dodatna ispitivanja uz dugoročno praćenje pacijenata i nakon prestanka upotrebe terapije, što će pridonijeti boljem uvidu u učinkovitost i sigurnost topikalne primjene vitamina C.

SUMMARY

Objectives

There is a large number of different topical preparations on the market with different forms and doses of vitamin C that are used to slow down the aging process of facial skin. The aim of the specialist work is to review scientific studies in which the topical effect of vitamin C on the aging process of facial skin was examined in order to systematize the results of research.

Material/Patients and Methods

For the purpose of writing this specialist paper, the electronic database PubMed was searched. The search included scientific studies that examined the topical effects of vitamin C on the aging process of the skin. The studies that have examined different combinations of vitamin C with a number of synthetic as well as natural active ingredients were also included. The selection of scientific studies was limited to clinical studies published in English. All of those studies that had full texts available or exceptionally only abstracts were reviewed.

Results

A total of 23 studies examining the effectiveness of topical vitamin C on the skin aging process were examined. These studies have proven the effective effect of vitamin C in collagen biosynthesis, increasing the density of skin papillae, as an antioxidant and increasing elasticity. Several studies have shown a good tolerability of treatment. Innovative vitamin C formulations with different delivery systems have proven to be good at solving stability problems. Combinations of vitamin C with other substances have contributed to achieving better efficacy.

Conclusion

Topical preparations with vitamin C have shown significant effects in the aging process of the skin. The addition of other active substances as well as innovative pharmaceutical forms can ensure the stability of vitamin C while maintaining efficacy. Nevertheless, additional studies are needed in addition to long-term monitoring of patients after discontinuation of therapy, which will contribute to better insight into the efficacy and safety of topical vitamin C administration.

Sadržaj

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1.	Građa i funkcija kože	1
1.1.1.	Epidermis	2
1.1.2.	Dermis.....	4
1.1.2.1.	Fibroblasti.....	5
1.1.2.2.	Kolagen	6
1.1.2.3.	Elastična vlakna.....	10
1.2.	Proces starenja kože	12
1.2.1.	Unutarnje starenje	13
1.2.2.	Vanjsko starenje.....	14
1.2.3.	Fitzpatrickova ljestvica	15
1.2.4.	Molekularni mehanizmi starenja kože	16
1.2.4.1.	Oksidacijski stres.....	17
1.2.4.2.	DNA oštećenja	19
1.2.4.3.	Skraćivanje telomera.....	19
1.2.4.4.	Kronična upala	19
1.3.	Vitamin C.....	20
1.3.1.	Vitamin C u koži.....	26
1.3.2.	Topikalni oblici vitamina C	28
1.3.3.	Stabilnost i perkutana isporuka.....	29
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	30
3.	MATERIJALI I METODE	31
3.1.	Pregled baze podataka.....	31
3.2.	Učinak vitamina C u različitim formulacijama.....	32
3.3.	Učinak tetra-izo-palmitoil askorbata.....	39
3.4.	Inovativne formulacije vitamina C s različitim sustavima dostave	40
3.5.	Usporedba učinkovitosti natrijevog askorbil fosfata i vitamina C.....	43
3.6.	Djelovanje vitamina C i njegovih derivata u kombinaciji s drugim tvarima	44

4. RASPRAVA	53
5. ZAKLJUČAK	59
6. LITERATURA	60
7. ŽIVOTOPIS	Error! Bookmark not defined.

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

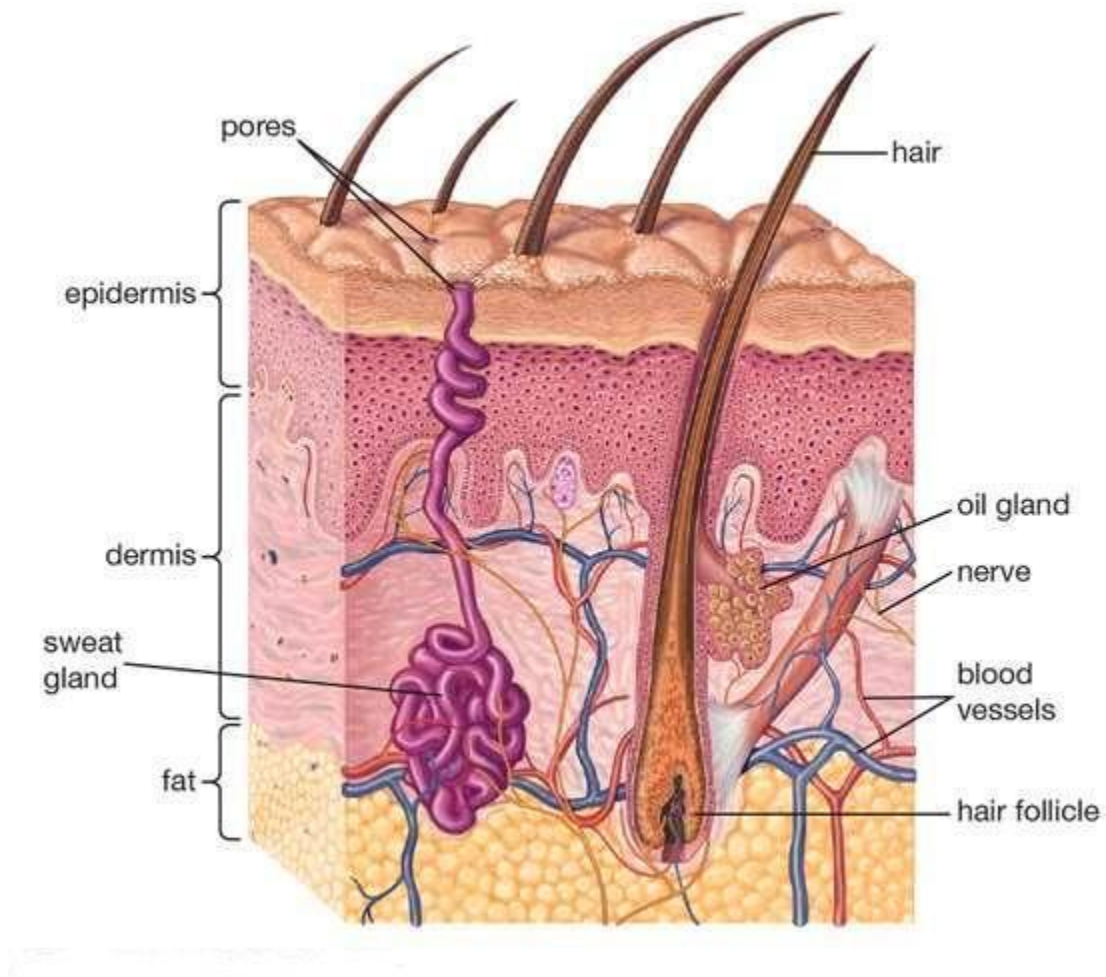
1.1. Građa i funkcija kože

Koža je površinom najveći organ ljudskog tijela. Površina kože je oko 2m² i čini oko 15% ukupne tjelesne mase. Štiti cijeli organizam od štetnih utjecaja iz okoline obavljajući brojne funkcije. Struktura kože predstavlja barijeru tijela koja je štiti od kemijskih i mehaničkih podražaja, patogenih mikroorganizama, dehidracije i UV zračenja. Koža je prvo mjesto imunološke obrane i sudjeluje u stvaranju vitamina D. Regulira tjelesnu temperaturu i gubitak vode čime održava homeostazu tijela. U njoj se nalaze osjetila za dodir, bol, toplinu i hladnoću (1, 2).

Pored svih dobro poznatih funkcija kože, glavna funkcija kože lica je da odražava naš identitet i raspoloženje. Naša lica objavljuju svijetu tko smo i što osjećamo zbog jedinstvenih osobina našeg lica. Dakle, koža je organ koji definira i čuva pojedinca (3).

Koža se sastoji od tri sloja: epidermisa, dermisa i hipodermisa. Svaki sloj kože se sastoji od različitih vrsta stanica koje imaju različite uloge. Koža sadrži i adneks: dlake, žlijezde i nokte (Slika 1). Uloga kože se pretežno odražava kroz građu epidermisa i dermisa.

Hipodermis ili subkutis je potkožno masno tkivo. Nalazi se ispod dermisa. Hipodermis povezuje kožu s podlogom. Debljina ovog sloja ovisi od mjesta na tijelu na kojem se nalazi, spolu, dobi, metaboličkim i genetskim faktorima (4).



Slika 1. Građa kože

Izvor: <https://www.britannica.com/science/human-skin#/media/1/547591/2027>

1.1.1. Epidermis

Epidermis je vanjski ili površinski sloj kože. To je keratinizirani slojeviti epitel. Glavne vrste stanica su keratinociti koji čine 95% epidermalnih stanica. Njegova funkcija je zaštita tijela od štetnih utjecaja iz okoline i sprečavanje gubitka vode (5).

Epidermis je građen od pet slojeva stanica keratinocita, od najdubljeg do gornjeg površinskog sloja:

- bazalni sloj (*stratum basale*)
- trnasti sloj (*stratum spinosum*)
- zrnati sloj (*stratum granulosum*)
- svijetli sloj (*stratum lucidum*)
- rožnati sloj (*stratum corneum*).

Bazalni sloj (*stratum basale*) je najniži i temeljni sloj. Sadrži jedan red cilindričnih stanica koje se kontinuirano dijele. Stanice su povezane međusobno, ali su povezane i sa stanicama iz trnastog sloja međustaničnim vezama koje se nazivaju dezmosomi. Hemidezmosomi su veze stanica s bazalnom membranom. Dijeljenjem ovih stanica nastaju ostali slojevi koji se nalaze iznad ovog sloja. Upravo zbog mogućnosti stvaranja novih stanica, sloj se naziva i germinativnim slojem.

Trnasti sloj (*stratum spinosum*) se sastoji od više redova pločastih stanica koje su međusobno povezane dezmosomima. Stanice imaju bogatu citoplazmu i okruglastu jezgru.

Zrnati sloj (*stratum granulosum*) sadrži od dva do četiri reda sploštenih stanica. Za ove stanice je specifično da citoplazma ima vidljive keratohijalne granule koje su važne za proces keratinizacije.

Svijetli sloj (*stratum lucidum*) se nalazi samo na mjestima gdje je epidermis najdeblji, a to su dlanovi i tabani.

Rožnati sloj (*stratum corneum*) je najgornji sloj epidermisa. Čini ga više redova plosnatih stanica bez jezgre. Stanice su u potpunosti ispunjene keratinom. Površinski dio rožnatog sloja se stalno ljušti i zamjenjuje novim stanicama koje putuju iz bazalnog sloja.

U epidermisu se osim keratinocita nalaze druge vrste stanica. Iznad bazalnog sloja su Langerhansove stanice koje su bitne za imunološku obranu. Melanociti proizvode melanin čija količina je presudna za boju kože i boju dlaka. Merkelove stanice djeluju kao mehanoreceptori (4).

Bazalna membrana povezuje epidermis s dermisom pomoću veza koje se nalaze u njoj. Ona doprinosi barijernoj funkciji i omogućuje prolazak različitim molekulama u i iz dermisa. Sastoji se od *lamina lucida* i *lamina densa* (4). Sadrži dodatne potporne strukture koje omogućuju čvrsto prijanjanje epidermisa do dermisa. Ova zona je poznata pod nazivom dermo-epidermalni sloj. To je složena struktura gdje su bazalni keratinociti povezani hemidezmosomima s bazalnom membranom (6).

1.1.2. Dermis

Dermis se nalazi ispod epidermisa. To je sloj koji podupire i povezuje epidermis s hipodermisom (3). Građen je od gustog vezivnog tkiva koje je većinom sastavljeno od kolagenih i elastičnih vlakana. Sadrži proteoglikane i glukozaminoglikane koji čine izvanstanični matriks (4). Glavna vrsta stanica u dermisu su fibroblasti. Dermis ima funkciju termoregulacije. Održava vaskularnu mrežu preko koje opskrbljuje epidermis hranjivim tvarima (5).

Debljina dermisa ovisi o dijelu tijela. Najdeblji je na dlanovima i tabanima, a najtanji na vjeđama. U dermisu su smješteni kožni adneksi: žlijezde (znojnice i lojnice), dlake i nokti. Tamo se nalaze i krvne i limfne žile te živci (4).

Dermis se sastoji od dva strukturno različita sloja: gornji papilarni (*stratum papillare*) i donji retikularni sloj (*stratum reticulare*). Papilarni sloj je tanki sloj dermisa i smješten je odmah ispod epidermisa. Veživo tkivo čini više vrsta kolagena, ali pretežno tip III. Sadrži elastična vlakna, krvne kapilare, živčane završetke i Meissnerova tjelešca (osjetna tjelešca za dodir). Retikularni sloj je mješavina gustog veživnog tkiva koje sadrži snopove kolagenih vlakana uglavnom tipa I upletenih u mrežu elastičnih vlakna. Sadrži krvne i limfne žile, živce, žlijezde lojnice (3).

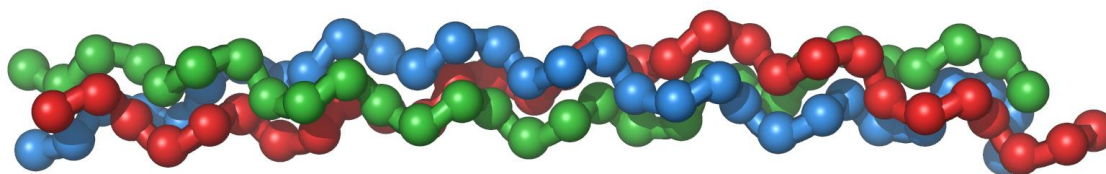
1.1.2.1. Fibroblasti

Glavne vrste stanica u dermisu su fibroblasti. Imaju presudnu ulogu u regulaciji fiziologije kože i održavanju strukturne cjelovitosti dermisa. Fibroblasti su stanice koje proizvode i talože sve komponente dermisa u izvanstanični matriks dajući koži elastičnost, čvrstoću i sposobnost odupiranja vanjskim utjecajima. Tu ubrajamo: kolagen, proteoglikane, glikozaminoglikane, elastin, fibronektin i druge proteine izvanstaničnog matriksa (7). Fibroblasti također imaju ulogu u raznim patološkim stanjima koja uključuju: proces starenja kože, zacijeljivanje rana, fibrozu, sklerodermiju, rak i dr (8). Kolagen tipa I je glavni kolagen u dermisu te sposobnost njegove sinteze je glavno obilježje fibroblasta. Oko 70% suhe mase dermisa je kolagen (7). Postoji skup markera koji karakterizira različite podskupine fibroblasta. Fibroblasti dermisa su heterogena populacija stanica ovisno o njihovom položaju u slojevima dermisa. Razlikujemo fibroblaste papilarnog sloja i fibroblaste retikularnog sloja. Fibroblasti papilarnog

sloja proizvode više proteoglikana, ali manje kolagena u odnosu na fibroblaste retikularnog sloja. Fibroblasti retikularnog sloja su jako rašireni po podlozi i odgovorni su za mobilnost i kontrakciju stanica (9).

1.1.2.2. Kolagen

Kolagen je najzastupljeniji protein u organizmu i čini 30% ukupne mase svih proteina. Bitan je za strukturu, ustroj i oblik tkiva. Sudjeluje u komunikaciji sa stanicama te regulira njihovu proliferaciju, migraciju i diferencijaciju.



Slika 2. Kolagenska trostruka uzvojnica

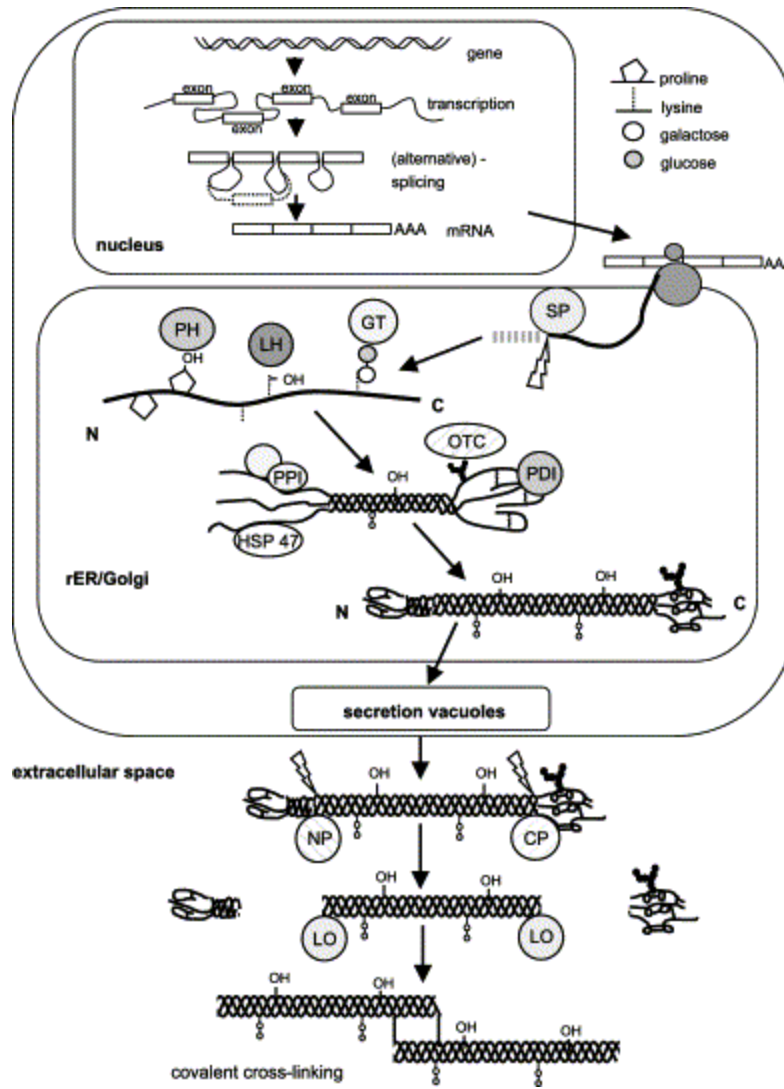
Izvor: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Collagentriplehelix.png>

Kolagen je trostruka uzvojnica građena od tri polipeptidna lanca (Slika 2). Postoji 28 tipova kolagena koji sadrže najmanje jednu trostruku uzvojnica. Označavaju se rimskim brojevima. Svaki kolagen se sastoji od tri polipeptidna lanca koji se zovu α lanci i označeni su arapskim brojevima (10). Lanci imaju ponavljajući triplet Gly-X-Y gdje se glicin nalazi na svakom trećem položaju polipeptidnog lanca. Prolin i hidroksiprolin su često na položaju X i Y (11). Raznolikost tipova kolagena se događa zbog postojanja nekoliko α lanaca, nekoliko molekularnih izoformi za isti tip kolagena i korištenjem različitih načina povezivanja (10). Najzastupljenija i najbrojnija

skupina kolagena su kolageni koji oblikuju vlakna. To su kolageni tipa I, II, III, V, XI, XXIV i XXVII. Nalaze se u koštanim, hrskavičnim, vlaknastim i cjevastim strukturama. Imaju neprekidnu trostruku uzvojnici duljine oko 300 nm i globularne domene (propeptide) na kraju svakog α lanca (11). Jako su bitni: kolagen tipa I koji je najvažniji strukturni kolagen, tipa III koji je prisutan u krvnim žilama i u koži, tipa IV koji je glavna sastavnica bazalne membrane, tipa VII koji gradi usidrena vlakna i tipa VIII koji izgrađuje hemidezmosome (4).

Biosinteza kolagena

Biosinteza kolagena je složen proces koji se odvija u više faza. Većina znanja i proučavanja o mehanizmima biosinteze se temelji na kolagenima koji oblikuju vlakna tako da je detaljno proučena biosinteza kolagena tipa I (Slika 3). Vjerojatno je da su osnovni mehanizmi formiranja i obrade trostruke uzvojnice primjenjivi i za druge vrste kolagena (12).



Slika 3. Biosinteza kolagena tipa I (preuzeto iz (12))

Početna faza biosinteze kolagena počinje transkripcijom gena u staničnoj jezgri. Regulacija transkripcijskih djelatnosti ovisi o tipu stanice, ali može biti i pod kontrolom brojnih čimbenika rasta i citokina. U mnogo slučajeva postoje različite vrste glasničke RNA uzrokovane višestrukom transkripcijom. Zrela mRNA se transportira u citoplazmu. Slijedi proces translacije mRNA u molekule preprokolagena na grubom endoplazmatskom retikulumu (12).

Iz molekule preprokolagena nastaje prokolagen nakon uklanjanja signalnog peptida. Molekule prokolagena prolaze kroz više koraka post-translacijskih modifikacija. Hidroksilaciju ostataka lizina i prolina kataliziraju tri enzima: prolil 3-hidroksilaza, prolil 4-hidroksilaza i lizil hidroksilaza. Svim ovim enzimima su potrebni kofaktori, a to su: ioni željeza, 2-oksoglutarat, molekularni kisik i vitamin C. Kod kolagena koji oblikuju vlakna oko 50% ostataka prolina sadrži hidroksilnu skupinu na položaju 4, a udio prolil-hidroksilacije ovisi o vrsti kolagena. Prisutnost 4-hidroksiprolina je potrebna za intermolekularne vodikove veze što pridonosi toplinskoj stabilnosti trostruke spiralne domene. Funkcija 3-hidroksiprolina nije poznata. Opseg hidroksilacije lizina je različit ovisno o vrsti tkiva i kolagena. Ostaci hidroksilizina mogu stvoriti stabilne intermolekulske unakrsne veze molekula kolagena u vlaknima. Također sadrže i mjesta za pričvršćivanje ugljikohidrata. Enzimi galaktozil-transferaza i glukozil-transferaza kataliziraju premještanje ostataka glukoze i galaktoze u hidroksilne skupine hidroksilizina. C-propeptidi imaju bitnu funkciju spajanja tri α -lanca u trimeričke monomere kolagena. Strukturu C-propeptida stabiliziraju unutarlančane disulfidne veze. Stvaranje trostruke uzvojnice napreduje prema N-kraju, a prije toga se odvija poravnavanje C-terminalnih domena tri α -lanca. Učinkovito stvaranje i savijanje prokolagenskih lanaca ovisno je o enzimu peptidil-prolil cis-trans-izomerazi (PPI) i kolagen specifičnim šaperonima kao HSP47 (12).

Nakon obrade i sastavljanja prokolagena, molekule trostruke uzvojnice su pakirane u Golgijevom odjeljku i izlučuju se u izvanstanični prostor. Slijedi obrada prokolagena ovisno o tipu kolagena. C-propeptidi i N-propeptidi se odvajaju pomoću dvije proteaze: prokolagen N-proteaze i prokolagen C-proteaze (12).

U izvanstaničnom prostoru nastaju kolagenska vlakna. Sastavljanje kolagenskih vlakana je složen proces. Kolageni koji oblikuju vlakna I, II, III, V i XI se spontano skupljaju u uređene vlaknaste strukture in vitro. Sposobnost “samo okupljanja” je kodirana u strukturi kolagena. Zahvaljujući hidrofobnim i elektrostatskim interakcijama stvaraju se vlakna. Stvorena vlakna se mogu različito rasporediti u različitim vrstama tkiva. U koži stvaraju složenu mrežu isprepletenih vlakana. Stvaranje vlakana je i pod utjecajem propeptida molekula prokolagena. Važan korak za stvaranje vlakana kolagena tipa I je cijepanje C-propeptida. Molekularni raspored u vlaknima je dodatno stabiliziran stvaranjem kovalentnih unakrsnih veza koje doprinose mehaničkoj elastičnosti kolagenih vlakana. Hidroksilacija ostataka lizina u telopeptidama je ključna u definiranju unakrsnih veza kolagena. Enzim lizil-oksidaza ovisna o bakru katalizira stvaranje aldehida iz lizinskih i hidroksilizinskih ostataka u telopeptidama. Unakrsne veze se zatim stvaraju spontanijim reakcijama. One su preduvjet za fizička i mehanička svojstva kolagenskih vlakana i stvaranje stabilne mreže (12).

1.1.2.3. Elastična vlakna

Elastična vlakna su važna za elastičnost i savitljivost kože te čine 2-4% suhe tvari dermisa. Orijentirana su paralelno i okomito s površinom kože stvarajući mrežu. Razlike u sastavu elastičnih vlakana očituju se u različitoj rastezljivosti (13). Nužna su za normalnu funkciju tkiva i imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze tkiva kože. Nalaze se u svim elastičnim tkivima sisavaca kao što su koža, pluća, krvne žile i hrskavica. U njima su kombinirani s fibrilarnim kolagenom što omogućuje veću snagu rastezljivosti kolagena. Tkiva koja su bogata elastičnim vlaknima sposobna su pohranjivati energiju pod normalnim fiziološkim opterećenjima i koristiti je za vraćanje u stanje mirovanja. Glavne sastavnice elastičnih vlakana su elastin i

fibrilin. Za njihovu ispravnu funkciju su potrebni i drugi matriksni proteini (14). Proces u kojem nastaju elastična vlakna naziva se elastogeneza. Taj proces ovisi o dostupnosti i umrežavanju tropoelastina (13).

Najzastupljeniji među elastičnim vlaknima je elastin koji je netopljiv, a stvara se od topljivog prekursora tropoelastina. Tropoelastin se izlučuje iz različitih stanica kao što su fibroblasti i stanice glatkih mišića. Elastin se sastoji od jedinica njegovog prekursora tropoelastina koji je umrežen na lizinskim ostacima te tako stvara snažan i netopljiv bioplimer. Struktura tropoelastina je bogata hidrofobnim aminokiselinama: glicin, alanin, valin i prolin. Tropoelastin se sastoji od visoko hidrofobnih i hidrofilnih regija koje sadrže lizin. Hidrofobne regije su odgovorne za samoagregaciju i rastezljivost elastina, a hidrofilne za unakrsno povezivanje. Elastin je netopljiv i vrlo otporan na proteolitičku razgradnju zbog svoje hidrofobnosti i umrežene strukture (15).

Druga bitna sastavnica je fibrilin koji se spaja u mikrofibrile. Fibrilini su veliki izvanstanični glikoproteini i vitalne komponente izvanstaničnog matriksa. Važni su u razvoju tkiva, homeostazi i popravku kroz njihove interakcije s drugim komponentama izvanstaničnog matriksa. Spajanjem fibrilina nastaju veliki sklopovi koji se zovu mikrofibrile. Fibrilini su vrlo homologni. Fibrilin se pojavljuje u tri strukturno homologna izotipa: fibrilin-1, -2 i -3. Najzastupljeniji izotip fibrilina je fibrilin-1. Postoje bitne razlike među njima iako imaju zajedničku strukturnu homologiju. N-terminalna regija fibrilina-1 sadrži najviše prolina, dok fibrilin-2 sadrži regiju bogatu glicinom, a fibrilin-3 obiluje prolinom. Svi izotipovi su glikolizirani s različitim mjestima glikozilacije (14, 15).

Fragmentacija i stanjivanje elastičnih struktura u koži dovodi do procesa starenja elastičnih vlakana. Rezultat je smanjena aktivnost elastičnog tkiva. Uslijed bolesti, oštećenju slobodnim radikalima, izlaganju suncu, upali i drugim stanjima nastaju elastolički enzimi zvani elastaze koji razgrađuju elastinska vlakna. Poremećaji u mreži elastičnih vlakana vidljivi su i bez prisutnosti sunca kod prirodno ostarjele kože (15).

1.2. Proces starenja kože

Koža kao najveći i najvidljiviji organ ljudskog tijela je anatomski i funkcionalno podložna utjecaju starenja. Koža je glavni pokazatelj starosti. Starenje kože je složen proces koji dovodi do bioloških oštećenja na staničnoj razini što se odražava na mnoge načine. Proces starenja se predstavlja kroz višestruke kliničke manifestacije i probleme. Funkcionalne promjene kože s vremenom mogu stvarati probleme. Međutim, fizičke promjene kože imaju važan psihološki utjecaj. Utječu na međuljudsku interakciju, stvaranje slike osobe, ali posebno na stvaranje cjelovite slike zdravlja osobe (16).

Sve promjene povezane sa starenjem su na koži vrlo brzo vidljive. Starenje kože progresivno dovodi do propadanje strukturnog integriteta kože i pogoršanja kožnih funkcija (17).

Kod mlade kože u dermisu su kolagenska vlakna nedirnuta i organizirana, a bogata je vaskularna mreža čime se održava termoregulacija i opskrba hranjivim tvarima. Bitne značajke ostarjele kože su izravnavanje dermo-epidermalnog sloja te neorganiziranost i propadanje kolagenskih vlakana što posljedično dovodi do stvaranja bora. Poremećena je i vaskularizacija kože jer dolazi do smanjenja vaskularnog tkiva (18).

Starenje kože dijelimo u dva osnovna procesa: unutarne i vanjsko starenje.

1.2.1. Unutarne starenje

Unutarne (prirodno) starenje je nepovratan fiziološki proces. Naziva se još i kronološko starenje jer se odvija s prolaznošću vremena i utjecajem nasljednih gena. To je kontinuiran proces koji počinje sredinom dvadesetih godina, ali znakovi ovog starenja nisu vidljivi desetljećima. Ovaj oblik starenja je neizbježan i ne može se na njega puno utjecati u promjenama ljudskog ponašanja. Obilježeno je atrofijom kože, gubitkom elastičnosti i usporenjem metaboličkih aktivnosti. Znakovi su tanka koža, sitne bore, suhoća kože, gubitak potkožnog masnog tkiva i koštane strukture lica (19, 20). Kao posljedica starenja sve funkcije kože se pogoršavaju kao što je objašnjeno u tablici (Tablica 1).

Tablica 1. Morfološke i funkcionalne promjene kod prirodno ostarjele kože (preuzeto i prilagođeno iz (21))

Morfološke promjene	Funkcionalne promjene
Stanjivanje epidermisa od 10% do 50%	Povećana krhkost i ranjivost
Atrofija trnastog sloja	Povećana krhkost i ranjivost
Povećana heterogenost veličine bazalnih stanica	Povećana krhkost i ranjivost
Smanjena mitotička aktivnost, produljeno trajanje staničnog ciklusa i vrijeme migracije	Smanjena deskvamacija, odgođeno zacijeljivanje rana
Spora zamjena lipida	Poremećena funkcija barijere

Ravnanje dermo-epidermalnog sloja	Smanjivanje dodirne površine, povećana opasnost od odvajanja
Smanjenje broja i heterogenost melanocita	Ispadanje kose
Smanjenje broja Langerhansovih stanica	Oslabljena imunološka funkcija
Stanjivanje dermisa, smanjivanje broja fibroblasta	Oslabljena čvrstoća i otpornost
Atrofija izvanstaničnog matriksa	Oslabljena čvrstoća i otpornost
Smanjenje i propadanje kolagenih i elastičnih vlakana	Osjetljivost na deformacijske sile, stvaranje sitnih bora
Smanjenje mikrovaskularizacije kože	Poremećena termoregulacija i opskrba hranjivim tvarima
Smanjenje kožnih dodataka i njihove funkcije	Smanjena proizvodnja lipida i znoja, poremećena reepitelizacija dubokih kožnih rana
Stanjivanje potkožnog masnog tkiva	Smanjeno stvaranje energije
Smanjenje broja živčanih završetaka	Poremećena senzorna funkcija

1.2.2. Vanjsko starenje

Vanjsko starenje je uzrokovano utjecajem vanjskih čimbenika. Tu ubrajamo UV-zračenje, klimatske faktore, onečišćenje zraka, prečesto pranje kože, prehranu, pušenje i san. Za razliku od unutarnjeg starenja, na ovaj oblik starenja možemo utjecati svojim ponašanjem izbjegavajući navedene čimbenike. Time sprječavamo prerano starenje. Najbitniji čimbenik je izlaganje

ultraljubičastom zračenju koji uzrokuje fotostarenje. Vjeruje se da je 80% starenja lica posljedica kroničnog izlaganja suncu. Učinci fotooštećenja su često vidljivi puno ranije nego se pokažu znakovi unutarnjeg starenja. Rezultat toga je hipertrofija kože s zadebljanjem epidermisa i pojačanom melanogenezom. U dermisu se događaju još bitnije promjene: degeneracija kolagena, oštećenje vezivnog tkiva kože, taloženje abnormalnih elastičnih vlakana i poremećaj mikrovaskularizacije. Znakovi su bore, suhoća, gubitak elastičnosti, teleangiektazije i pojava pigmentacijskih promjena (19, 20). Morfološke promjene ostarjele kože pod utjecajem vanjskih faktora su:

- Nakupljanje abnormalnih elastičnih vlakana u dermisu
- Rijetka raspodjela kolagenih vlakana, pojačana razgradnja kolagena
- Smanjenje biosintetičke aktivnosti fibroblasta
- Povećana razina nefunkcionalnih glikozaminoglikana i proteoglikana
- Povećan broj mastocita i neutrofila
- Ravnanje dermo-epidermalnog sloja
- Zadebljanje vaskularnih stjenki kapilara, arterija i vena
- Izražena regresija i neorganizacija malih krvnih žila
- Oslabljena proliferacija, diferencijacija, deskvamacija i apoptoza keratinocita
- Zadebljanje epidermisa (21).

1.2.3. Fitzpatrickova ljestvica

Zlatni standard u klasifikaciji tipova kože je Fitzpatrickova ljestvica. Fitzpatrickova klasifikacija fototipova kože svrstava tip kože prema pigmentu koji koža ima i reakciji kože na izloženost suncu. Ova ljestvica je razvijena 1975. godine i imala je četiri tipa kože. 1988. godine

je izmijenjena i ima šest tipova kože (I, II, III, IV, V i VI). U tablici je Fitzpatrickova ljestvica s tipovima kože (Tablica 2) (22, 23).

Tablica 2. Fitzpatrickova ljestvica (preuzeto i prilagođeno iz (22))

Tip kože	Boja kože	Značajke prilikom izlaganja UV zračenju
I	Bijela koža	Uvijek gori, nikad ne potamni
II	Bijela koža	Uvijek gori, minimalno potamni
III	Bijela koža	Minimalno izgori, umjereno potamni
IV	Svijetlosmeđa koža	Minimalno izgori, dobro potamni
V	Smeđa koža	Rijetko izgori, odlično potamni
VI	Tamnosmeđa/crna koža	Nikad ne izgori, odlično potamni

1.2.4. Molekularni mehanizmi starenja kože

Posljednjih godina su provedena brojna istraživanja kako bi se objasnio molekularni mehanizam starenja kože. U procesu starenja kože se događaju mnoge kliničke promjene koje su rezultat kombinacije molekularnih i staničnih čimbenika uključujući unutarnje i vanjske čimbenike. U novije vrijeme vrlo brz razvoj genomike, proteomike, metabolomike i bioinformatike omogućio je opsežnu i detaljnu procjenu starenja kože na temeljnim razinama ekspresije gena i proteina kao i njihovih metaboličkih putova. Sve je to pomoglo prepoznati bitne biomarkere starenja kože (21). Postoji nekoliko predloženih teorija u koje ubrajamo: teoriju staničnog starenja, oksidacijski stres, smanjenje sposobnosti popravljavanja stanične DNA i gubitak telomera, točkaste mutacije mitohondrijske DNA, povećanu učestalost kromosomskih

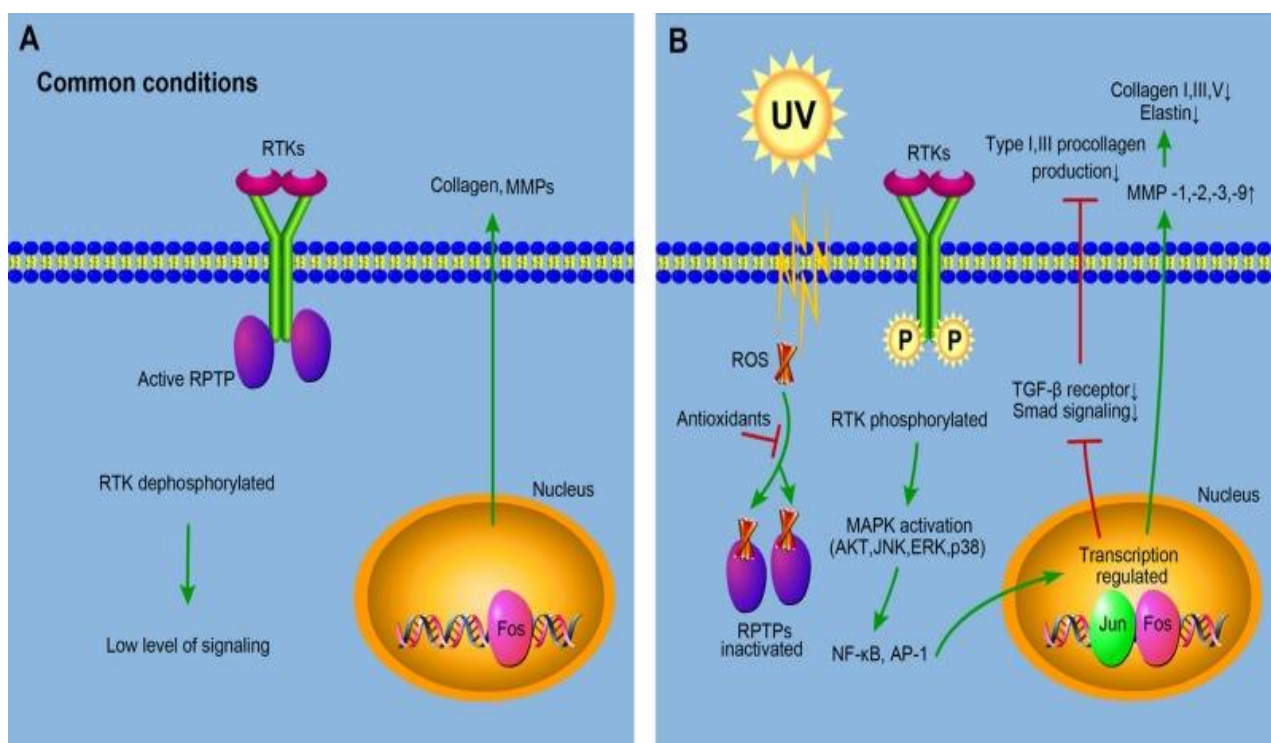
abnormalnosti, pojedinačne mutacije gena, kroničnu upala i dr. U daljnjem tekstu bit će navedene najvažnije teorije odnosno uzroci starenja kože.

1.2.4.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje uzrokovano neravnotežom između stvaranja i nakupljanja reaktivnih kisikovih metabolita (ROS) u stanicama i tkivima. Dolazi do oštećenja stanica. ROS se normalno stvaraju u organizmu kao nusprodukti metabolizma kisika i sudjeluju u fiziološkim procesima (npr. stanična signalizacija). Međutim, pod utjecajem čimbenika iz okoliša (zračenja, onečišćenja, teški metali, ksenobiotici) dolazi do povećanog stvaranja ROS što dovodi do oksidacijskog stresa. ROS je zajednički naziv za grupu reaktivnih kisikovih metabolita: superoksidni radikal ($O_2^{\cdot -}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) i singletni kisik (1O_2). Pravilno stvaranje i prisutnost ROS u stanicama treba održavati na niskoj razini. Stanice imaju svoj antioksidativni obrambeni mehanizam koji čine enzimi (superoksid-dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza). Tim mehanizmom se bore da uklone prekomjernu količinu ROS. Oksidacijski stres je nepoželjno stanje koje štetno djeluje na stanične strukture što posljedično može dovesti do težih oboljenja (kroničnih i degenerativnih) kao i ubrzanja procesa starenja tijela (24).

ROS su ključni u dermalnim izmjenama izvanstaničnog matriksa unutarnjeg starenja i fotostarenja (Slika 4). U uobičajenim uvjetima bez liganada na staničnoj površini aktivnost receptorskih tirozin kinaza (RTK) inhibirana je receptorskim tirozin fosfatazama (RPTP). RPTP defosforiliraju RTK. Održavaju nisku razinu signalizacije stvarajući normalnu količinu kolagena i matriksnih metaloproteinaza (MMP). Pod utjecajem UV-zračenja stvaraju se ROS koji inhibiraju

aktivnost RPTP-a vezajući se na katalitička mjesta RTK-a. Podižu razinu fosforiliranih RTK i pokreću nizvodne signalne putove koji uključuju aktivaciju protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK), a zatim i aktivaciju nuklearnog faktora-kB (NF-kB) i aktivacijskog proteina-1 (AP-1). NF-Kb i AP-1 povećavaju transkripciju MMP. AP-1 smanjuje ekspresiju transformirajućeg faktora rasta- β (TGF- β) receptora tipa II što pridonosi smanjenjoj fosforilaciji transformirajućeg faktora rasta. Posljedično dolazi do suzbijanja proizvodnje kolagena i ukupni sadržaj kolagena se smanjuje u fotoostarjeloj koži. Antioksidansi mogu neutralizirati ROS tako da spriječe njihovo vezanje za RPTP i vrate signalizaciju na normalnu razinu (25).



Slika 4. Molekularni mehanizam reaktivnih metabolita kisika (ROS) u procesu starenja kože

(preuzeto iz (25))

1.2.4.2. DNA oštećenja

Stalno izlaganje UV-zračenju uzrokuje oštećenja i mutacije DNA. Do oštećenja DNA dolazi kada DNA apsorbira fotone iz UV-B zračenja. To rezultira strukturnim preslagivanjem nukleotida što dovodi do oštećenja u lancu DNA. Rezultat toga je prerano starenje.

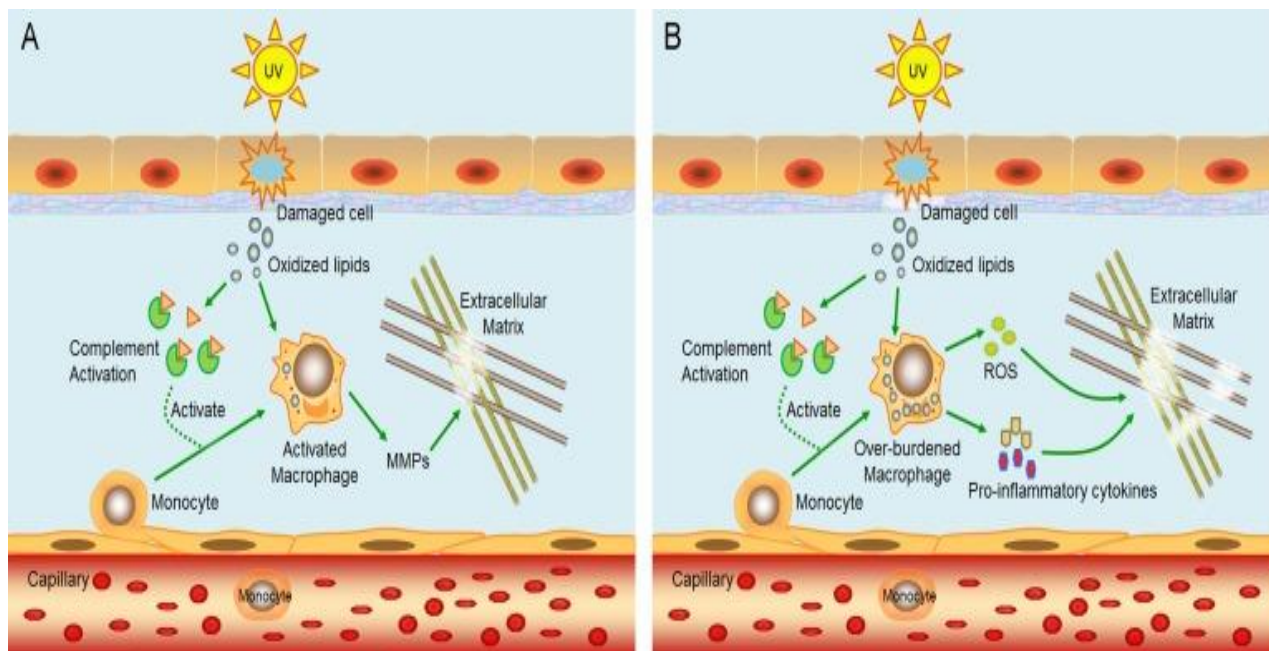
1.2.4.3. Skraćivanje telomera

Telomere su ponovljeni nizovi nukleotida koje štite krajeve kromosoma od razgradnje i abnormalne rekombinacije. Svakim dijeljenjem stanica telomere se skraćuju. Progresivno skraćivanje telomera dovodi do staničnog starenja. Telomerase su enzimi koji održavaju duljinu telomera. UV zračenje dovodi do prekomjernog stvaranja ROS što rezultira mutacijama telomera te odumiranjem stanica ili starenjem.

1.2.4.4. Kronična upala

(A) UV zračenje uzrokuje oksidacijski stres u epidermalnim stanicama što rezultira oštećenjem stanica i oksidacijom lipida. Oksidirani lipidi aktiviraju sustave komplemenata i uzrokuju upalu. Dolazi do aktivacije makrofaga koji oslobađaju MMP kako bi razgradili izvanstanični matriks.

(B) Ponovljeno UV zračenje dodatno aktivira sustave komplemenata uzrokujući oštećenje dermo-epidermalnog sloja. Makrofagi su preopterećeni oksidiranim lipidima te oslobađaju proinflamatorne citokine i ROS. Proinflamatorni citoki uzrokuju kroničnu upalu i dugotrajno oštećenje dermisa, a ROS oštećenje dermalnog izvanstaničnog matriksa uzrokovanog oksidacijskim stresom (Slika 5) (25).



Slika 5. Mehanizam upale kože (preuzeto iz (25))

1.3. Vitamin C

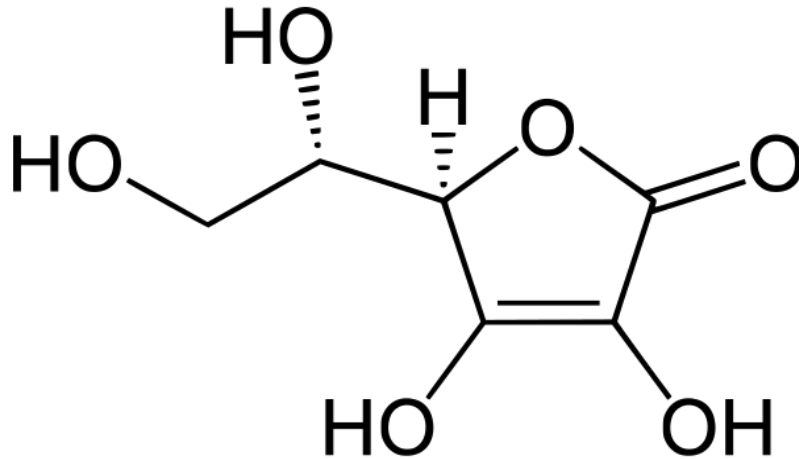
Vitamin C je najzastupljeniji antioksidans u ljudskoj koži. Većina biljaka i životinja ga može proizvoditi *in vivo* iz glukoze, ali ga ljudi i neki drugi kralježnjaci ne mogu sintetizirati zbog nedostatka potrebnog enzima L-glukonolakton-oksidadze te ga unose putem hrane. Nalazimo ga u brojnom voću i povrću poput limuna, naranče, šipka, paprike, zelenog lisnatog povrća, brokule i dr (26).

Vitamin C je prvi izolirao mađarski znanstvenik Albert Szent-Györgyi iz crvene paprike u Cambridgeu 1928. godine. Pokušavao je izolirati spoj za koji se znalo da se nalazi u visokoj koncentraciji u kori nadbubrežne žlijezde i djeluje kao snažno redukcijsko sredstvo. Szent-Györgyi je prepoznao njegovu ulogu u liječenju skorbuta, bolesti uzokovane nedostatkom vitamina C koja je prije bila smrtonosna. Karakterizira je krhost tkiva, sporo zacijeljivanje rana i

krvarenje desni. Danas je to rijetka bolest koja se prevenira pravilnom prehranom. Szent-Györgyi je 1937. godine za svoje otkriće dobio i Nobelovu nagradu (26, 27).

Vitamin C ima višestruke uloge u ljudskom organizmu. Snažan je antioksidans te povećava apsorpciju željeza, kalcija i folne kiseline. Nužan je za sintezu imunoglobulina. Bitan je u proizvodnji interferona kao i za suzbijanje stvaranja interleukina-18 koji je regulacijski čimbenik u malignim tumorima. Sudjeluje u biosintezi kolagena i hormona. Važan je i u prevenciji raznih neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, multipla skleroza i dr. kao i psihijatrijskih poremećaja uključujući depresiju, anksioznost i šizofreniju (28).

Vitamin C ili askorbinska kiselina je vitamin topljiv u vodi. U svom enolnom obliku L-askorbinska kiselina ima strukturu α -ketolaktone (Slika 6) sa šest atoma ugljika, slično strukturi glukoze. Struktura laktone i dvije enolne hidroksilne skupine te primarna i sekundarna alkoholna skupina određuju kemijska svojstva. Primjerice, endiolna struktura je zaslužna za antioksidativna svojstva vitamina C (29). Vitamin C nalazimo u organizmu u dva oblika: reducirani (L-askorbinska kiselina (AscH_2 , AA)) i oksidirani (dehidroaskorbinska kiselina (DHA)). To su izomerne molekule koje pri odgovarajućim uvjetima mogu lako prelaziti jedna u drugu (28). AA je kemijski aktivni oblik vitamina C koji se koristi u medicinskoj praksi. To je slaba organska kiselina koja se lako razgrađuje pod utjecajem sunčeve svjetlosti, visokih temperatura, pri aerobnim uvjetima te u prisutnosti lužina, bakra i teških metala (30).

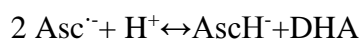


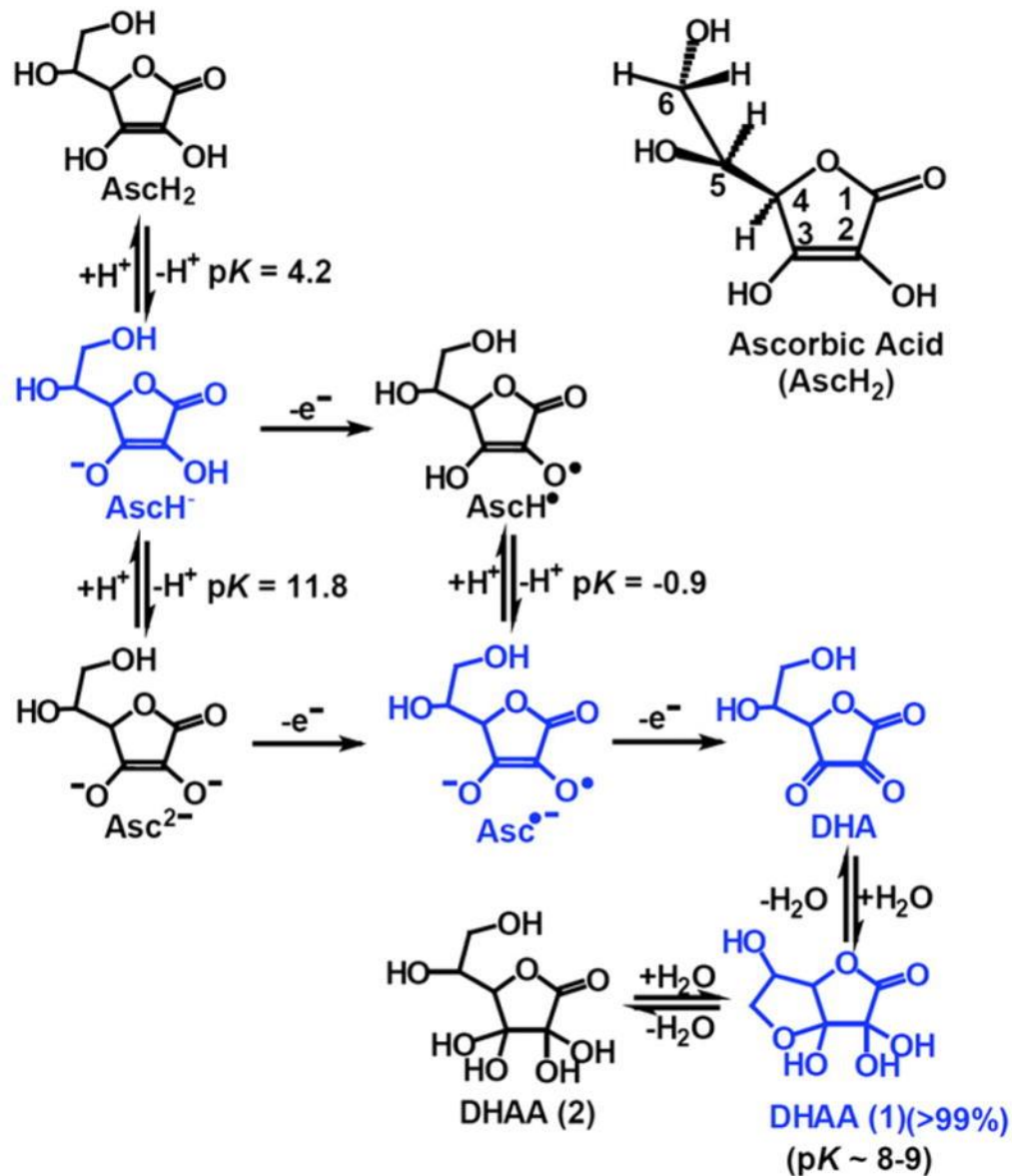
Slika 6. Struktura L-askorbinske kiseline (AsC_2H_2)

Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e7/L-Ascorbic_acid.svg

Vitamin C predstavlja redoks sustav koji sadrži AsC_2H_2 i DHA. AsC_2H_2 je aktivni stabilni oblik koji ima ulogu elektron donora. AsC_2H_2 sudjeluje u mnogim procesima kao kofaktor ili antioksidans pri čemu se oksidira u nestabilniji oblik DHA. DHA se lako prevede u stabilniji oblik pomoću enzimskih sustava poput glutation ovisnih sustava ili reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) ovisnih sustava. Vitamin C u organizmu djeluje kao kofaktor enzima u brojnim procesima hidroksilacije. Održava metalne ione u enzimima u reduciranom stanju što je bitno za aktivnost enzima. U biosintezi kolagena hidroksilaciju ostataka lizina i prolina kataliziraju tri enzima: prolil 3-hidroksilaza, prolil 4-hidroksilaza i lizil hidroksilaza. U tim enzimima vitamin C održava ion željeza u reduciranom stanju. Vitamin C sudjeluje i u sintezi karnitina i tirozina. Odgovoran je za sintezu određenih neurotransmitera i hormona uključujući noradrenalin, oksitocin, kalcitonin, vazopresin,olecistokinin i peptid koji oslobađa gastrin gdje djeluje kao redukcijsko sredstvo prevodeći ione željeza ili bakra u reducirani oblik (31).

L-askorbinska kiselina sudjeluje u mnogim oksidacijsko-redukcijskim procesima zbog mogućnosti reverzibilne oksidacije. Reducirani oblik askorbinske kiseline (AscH_2) je snažan antioksidans koja se pojavljuje u različitim oblicima ovisno o pH mediju i oksidacijskim stanjima (Slika7). Ima dvije pK: $\text{pK}_1 = 4,2$ i $\text{pK}_2 = 11,6$. Askorbat ili askorbil anion (AscH^-) je dominantan pri fiziološkom pH. Askorbat je odlično redukcijsko sredstvo i kao takvo može proći dvije uzastopne jednoelektronske oksidacije. AscH_2 se prvo oksidira do askorbil aniona ili askorbata (AscH^-), a zatim do askorbil radikala ($\text{Asc}^{\cdot-}$) pa do DHA. Askorbil radikal i DHA se mogu opet reducirati do askorbata (AscH^-) bilo enzimatskim ili neenzimatskim putem.



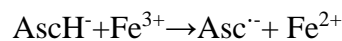


Slika 7. L-askorbinska kiselina (Asch₂) i njezina oksidacija (preuzeto iz (32))

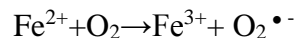
(Asch⁻ - askorbil anion ili askorbat, Asc²⁻ - askorbil dianion, AscH[•] - askorbil radikal, Asc^{•-} - askorbil radikal anion, DHA - dehidroaskorbinska kiselina). *Plavo označene strukture su one koje prevladavaju u biokemiji vitamina C.

Ova svojstva čine askorbat jako djelotvornim antioksidansom. Askorbat se lako oksidira. Brzina oksidacije osim što ovisi o pH, ubrzava se i katalitičkim metalima. Bez njihovog prisustva, AscH[•] se puno sporije oksidira pri pH 7,0. Oksidacija bez prisutnosti katalitičkih metala se događa preko Asc²⁻.

U prisutnosti katalitičkih metala askorbat ima prooksidativno djelovanje. Odlično je sredstvo koje reducira trovalentno željezo (Fe³⁺) u dvovalentno željezo (Fe²⁺), a pritom se oksidira u askorbil radikal (Asc^{•-}).



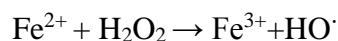
Fe²⁺ može reagirati s O₂ reducirajući ga u superoksidni radikal (O₂^{•-}), a Fe²⁺ se ponovo oksidira u Fe³⁺.



U reakciji s protonima superoksidni radikal prelazi u vodikov peroksid (H₂O₂) i kisik.



Ioni Fe²⁺ mogu reagirati s vodikovim peroksidom pri čemu se oksidira u Fe³⁺ i nastaje hidroksilni radikal (HO[•]).



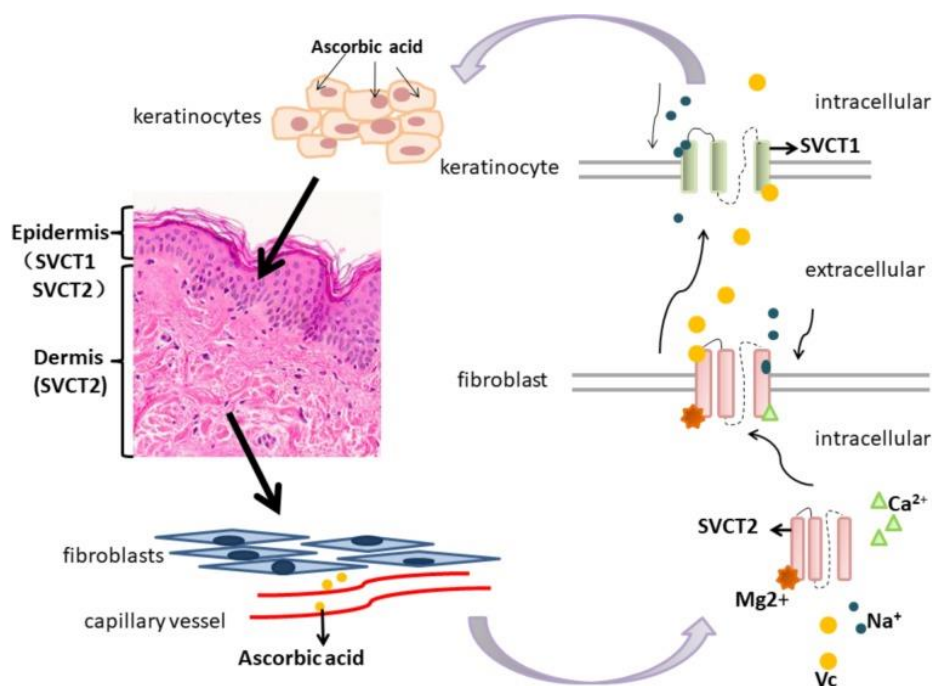
Nastali radikali mogu uzrokovati oksidacijski stres i lipidnu peroksidaciju. Ovisno o koncentraciji, askorbat može imati antioksidativan ili prooksidativan učinak na lipidnu peroksidaciju (35). Djeluje sinergistički s vitaminom E koji je antioksidans topljiv u lipidima. Bitan je za sprečavanje oksidativnog oštećenja u membranama lipidnih stanica. Dakle, askorbat je važan za održavanje vitamina E i inhibiciju lipidne peroksidacije (33).

1.3.1. Vitamin C u koži

Vitamin C je snažan antioksidans koji neutralizira slobodne radikale i sprječava stvaranje novih. Time se sprječava oksidacijski stres koji uzrokuje oštećenje stanica i starenje kože. Nužan je za biosintezu te očuvanje kolagena. Vitamin C je u dermisu potreban za stvaranje hidroksiprolilnih ostataka da bi se stvorila stabilna kolagenska trostruka uzvojnica. Neovisno o hidroksilaciji on utječe na biosintezu kolagena tako što stabilizira m-RNA i povećava stvaranje prokolagena (33). Vitamin C može povećati i gustoću kožnih papila te dovesti do korekcije regresivnih strukturnih promjena povezanih s procesom starenja kože (34). Djeluje protuupalno, poboljšava elastičnost kože, smanjuje vidljivost bora, posvjetljuje ten, prevenira razvoj hiperpigmentacija i pomaže u izbjeljivanju postojećih (33). Vitamin C štiti kožu od oksidacijskog stresa uzastopnim doniranjem elektrona za neutralizaciju ROS koji nastaju kad je koža izložena UV zračenju. Nastali oksidirani oblici vitamina C se mogu opet reducirati. Izloženost UV zračenju značajno smanjuje razinu vitamina C u koži (26).

Normalna koža sadrži visoke koncentracije vitamina C što ukazuje da se aktivno nakuplja iz cirkulacije. Većina vitamina C se nalazi u unutarstaničnim odjeljcima. Vaskularna mreža dermalnog sloja prenosi ga u stanice. Koncentracija vitamina C je značajno veća u epidermisu nego u dermisu. Mnoge studije su pokazale razlike o objavljenim razinama vitamina C u koži. Razlog tome su vjerojatno poteškoće u rukovanju s kožnim tkivom, a može biti i posljedica mjesta uzimanja uzorka kože i starosti ispitivane osobe (35). Razina vitamina C u koži ovisi i o izloženosti UV-zračenju i zagađivačima okoliša. Čak minimalna izloženost njima značajno smanjuje razinu vitamina C. Starenjem se smanjuje njegova razina u koži, a posebno u epidermisu (36).

Postoje dva transportna mehanizma vitamina C u koži koji ovise o natrij-askorbatnom kotransporteru-1 (SVCT-1) i natrij-askorbatnom kotransporteru-2 (SVCT-2). Natrij-askorbat kotransporteri (SVCT) su specifični prijenosnici vitamina C koji ovise o natriju. Nalaze se u raznim tkivima i organima za unos i prijenos vitamina C. SVCT-1 je ponajprije odgovoran za prijenos vitamina C kroz epidermis, a dok je SVCT-2 za intradermalni transport (Slika 8). U fibroblastima dermisa SVCT-2 pomaže prijenos vitamina C iz plazme u epidermis, a SVCT-1 ga isporučuje keratinocitima. Ako je SVCT-2 unutar stanica fibroblasta, može se vezati za Mg^{2+} , ali je tad u stanju niskog afiniteta. Kada se SVCT-2 nalazi na površini membrane fibroblasta, može se vezati za Mg^{2+} i Ca^{2+} u visokim koncentracijama otopine natrija pri čemu nastaje stanje visokog afiniteta za vitamin C (37).



Slika 8. Prijenosnici vitamina C u koži (SVCT1 i SVCT2) i njihovi transportni mehanizmi u koži

(preuzeto iz (37))

1.3.2. Topikalni oblici vitamina C

Vitamin C se nalazi u brojnim aktivnim oblicima. Iako je AA biološki najaktivniji i najproučavaniji oblik, on nije najpoželjniji oblik za topikalnu primjenu jer je to hidrofilna, nabijena i nestabilna molekula koja slabo prolazi kroz rožnati sloj epidermisa koji je hidrofobnog karaktera (38). Njezina stabilnost se poboljšava održavanjem pH nižim od 3,5 što doprinosi i uklanjanju ionskog naboja molekule. Time je omogućen prolazak kroz rožnati sloj kože (26).

Na tržištu postoje brojni različiti topikalni pripravci s vitaminom C. Ali, nisu svi pripravci fiziološki učinkoviti što ovisi o obliku i koncentraciji vitamina C, mogućnosti prodiranja kroz kožu. Neki oblici vitamina C se ne isporučuju u dermis u odgovarajućoj količini dok se drugi ne pretvaraju u biološki aktivne oblike u koži (26). Stoga optimalna koncentracija vitamina C u pripravku ovisi o tome koji oblik vitamina C se koristi. Kemijskom modifikacijom AA se nastoje postići značajno stabilniji oblici. Neki od derivata vitamina C koji se koriste u topikalnim pripravcima su:

- askorbinska kiselina ili L-askorbinska kiselina (AA)
- natrijev askorobil fosfat (SAP)
- magnezijev askorobil fosfat (MAP)
- askorobil-6-palmitat (AP)
- dinatrijev izostearil 2-0 L-askorobil fosfat (VPC-IS-Na)
- askorobil-2-glukozid (AA-2G)
- askorobil fosfat palmitat (APPS)
- 3-0-etil askorbat (EAC)
- sulfat askorbinske kiseline

- tetra-izo-palmitoil askorbat (ATIP)
- tetraheksidecil askorbat (THDA) (38, 39)

1.3.3. Stabilnost i perkutana isporuka

AA je vrlo nestabilna molekula što predstavlja glavni izazov u razvijanju njezine formulacije. Ionizacijom u vodenoj otopini nastupa oksidacija. Na brzinu razgradnje AA utječu i drugi čimbenici: visoki pH, povišena temperatura, prisutnost otopljenog kisika i metalnih iona. Razgradnju AA možemo zamijetiti promjenom boje u žućkastu koja se može brzo nastaviti širiti ovisno o obliku formulacije, pakiranju i uvjetima skladištenja (35).

Jedan od najproučavanijih lipofilnih estera je AP. Lakše prodire kroz kožu o odnosu na AA, ali je još uvijek relativno nestabilan oblik. SAP i MAP su hidrofilni derivati askorbinske kiseline. Zbog njihove kemijske strukture su visoko stabilni. Uvođenje fosfatne skupine sprječava molekulu od oksidacije. Razgradnjom u koži se ovi oblici prevode u slobodnu askorbinsku kiselinu čime se postiže antioksidativno djelovanje. Razvijeni su različiti sustavi dostave kako bi se poboljšala topljivost, propusnost i stabilnost vitamina C poput: nanoemulzija, mikroemulzija, nanosuspenzija, liposoma, krutih lipidnih nanočestica (SLN) i nanostrukturiranih nosača lipida (NLC) (38).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Zdravlje i ljepota kože nikad nisu imali veću važnost nego danas, a potražnja za kozmetikom i tretmanima za prevenciju i sprečavanje procesa starenja kože je u stalnom porastu. Starenje kože ne možemo zaustaviti, ali ga možemo usporiti tako da na potencijalno štetne čimbenike utječemo prevencijom što uključuje promjene u životnom stilu te uporabu pripravaka koji usporavaju proces starenja kože. Na tržištu se nalazi veliki broj različitih lokalnih pripravaka s različitim oblicima i dozama vitamina C za tu namjenu. Cilj specijalističkog rada je pregled znanstvenih studija u kojima je ispitivano djelovanje topikalno primijenjenog vitamina C na proces starenja kože lica kako bi se napravila sistematizacija rezultata provedenih istraživanja te procijenila učinkovitost i sigurnost primjene vitamina C u pripravcima namijenjenim usporavanju procesa starenja kože.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pregled baze podataka

Cilj pretraživanja literature bio je pronaći kliničke studije koje su ispitivale učinkovitost lokalne upotrebe vitamina C u procesu usporavanja starenja kože. Za potrebe izrade specijalističkog rada pretražena je elektronička baza podataka Medline, sučelje PubMed. Pretraživanjem su obuhvaćene znanstvene studije koje su ispitivale topikalno djelovanje vitamina C na proces starenja kože.

U prvom pretraživanju baze podataka PubMed uključen je filter za kliničke studije. Korištene su dvije pretrage baze podataka sa dva dodatna filtera kako bi se pronašle studije koje se odnose na lokalnu upotrebu vitamina C s ispitanicima starije životne dobi s izraženim borama na licu izazvanim unutarnjim ili vanjskim starenjem. Upisani su sljedeći pojmovi: ((“vitamin C”) or (“ascorbic acid”) or (“ascorbyl”) or (“ascorbate”) and ((“topical formulation”) or (“topical treatment”))). Dobiveno je 75 studija od kojih je odabrano 15 koje se odnose na temu rada. U drugom pretraživanju su upisani sljedeći pojmovi: ((“vitamin C”) or (“ascorbic acid”) or (“ascorbyl”) or (“ascorbate”) and ((“skin aging”) or (“skin wrinkle”))). Filtriranjem je dobiveno 47 kliničkih studija od kojih se 21 odnosi na temu rada. S prethodnim pretraživanjem se preklapilo 13 studija te ih je uvršteno 8. Ovakvim načinom pretraživanja obuhvaćen je vitamin C i svi njegovi derivati isključivo u topikalnoj primjeni u anti-age njezi ostarjele kože.

Nisu obuhvaćene studije s hiperpigmentacijama kod osoba mlađe dobi. Uključene su i studije koje su ispitivale različite kombinacije vitamina C s brojnim sintetskim, ali i prirodnim djelatnim

tvarima izoliranim iz biljaka u utvrđivanju djelovanja na bore i fotoostarjelu kožu Uključene su i studije koje su ispitivale mehanizme djelovanja, stabilnost, apsorpciju, doze i prikladne oblike vitamina C. Nisu obuhvaćene studije s dvostrukim ili višestrukim režimom proizvoda i tehnika pomlađivanja te kombinirane studije s oralnim oblicima vitamina C. Odabir znanstvenih radova je ograničen na one koji su objavljeni na engleskom jeziku neovisno o datumu njihove objave. Pregledane su sve one koje imaju dostupne cjelovite tekstove ili iznimno samo sažetke. U rad su uvrštene ukupno 23 kliničke studije.

Većina studija bile su randomizirana kontrolirana klinička ispitivanja. Među njima su najčešća: dvostruko slijepa randomizirana kontrolirana klinička ispitivanja, ali bilo je i jednostruko slijepih randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja te otvorenih randomizirano kontroliranih kliničkih ispitivanja.

3.2. Učinak vitamina C u različitim formulacijama

Najviše studija proučavalo je anti-age djelovanje AA bilo u obliku kreme (emulzija voda u ulju (V/U) ili ulje u vodi (U/V)), seruma ili otopine. Pronađeno je sedam studija koje su istraživale djelovanje same AA bez dodatka drugih aktivnih tvari. Studije su ispitivale djelovanje 3% AA, 5% AA te AA nepoznate koncentracije.

Prva studija je ispitivala djelovanje kreme s 3% vitaminom C na gustoću dermalnih papila. Napravljene su tri podstudije. U prvoj podstudiji uspoređene su tri skupine ženskih dobrovoljaca različite dobi (18-25 god., 40-50 god., 65-80 god.) mjereći gustoću dermalnih papila i papilarni indeks na podlaktici. Istraživanje je pokazalo bitno smanjenje papilarnog indeksa u ovisnosti o

dobi. U drugoj podstudiji je provedena dvostruko slijepa studija u kojoj je testirano lokalno djelovanje kreme s 3% vitaminom C usporedno sa samim nosačem. Učinak kreme je uspoređen s nosačem i netretiranim kontrolnim područjem. Sudjelovale su 33 volonterke (prosjek 55,3 god.) s fototipom kože II i III koje su tokom 4mj. koristile kremu dva puta dnevno na podlaktici. Za procjenu rezultata je korišten konfokalni laserski skenirajući mikroskop Vivascope 1000 koji omogućava neinvazivno ispitivanje ljudske kože *in vivo*. Procjene su zabilježene na samom početku ispitivanja i svakog mjeseca tijekom 4 mj. ispitivanja te nakon mjesec i dva mjeseca od prestanka upotrebe kreme. Područja tretirana vitaminom C su pokazala značajno veću gustoću dermalnih papila u odnosu na sami nosač i netretirano područje. Lokalna upotreba vitamina C je već nakon 4 tjedna pokazala povećanje gustoće dermalnih papila u odnosu na područja s nosačem i područja bez primjene. U trećoj podstudiji provedeno je istraživanje u trajanju od 2 mjeseca s malo drukčijim nosačem kako bi se utvrdila reproducibilnost rezultata. Djelovanje vitamina C je opet pokazalo utjecaj na povećanje gustoće dermalnih papila (34).

Druga studija je ispitivala djelovanje topikalnog pripravka koji sadrži 3% AA u emulziji ulje u vodi (U/V). Ova studija je ispitivala antioksidacijski učinak, povećanje broja dermalnih papila i smanjenje bora ispitivanog pripravka. Studija o određivanju broja dermalnih papila je provedena pomoću konofokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa Vivascope 1000. U studiji je sudjelovalo 25 ženskih volontera koje su koristile kremu s 3% AA i placebo kremu na podlaktice dva puta dnevno tokom jednog mjeseca. Papilarni indeks je mjeren prije početka i mjesec dana nakon upotrebe tretmana. Studija je pokazala značajno povećanje papilarnog indeksa u prosjeku za 60%. U studiji o određivanju djelovanja na bore sudjelovala su 23 ženska volontera (prosjek godina 48,9). Ispitivanje je trajalo 12 tjedana tako da su ispitanici dva puta dnevno koristili

kremu s 3% vitaminom C i placebo kremu. Jednu su nanosili na jednu polovicu lica, a drugu na drugu polovicu lica. Rq (srednja kvadratna hrapavost) vrijednosti su zabilježene prije početka korištenja te nakon 4, 8 i 12 tjedana. Otisci područja oko očiju su izmjereni pomoću PRIMOS-a (optički uređaj za trodimenzionalno mjerenje površine kože *in vivo*). U svakoj točki mjerenja (4, 8 i 12 tjedana) dokazan je statistički značajan učinak kreme s vitaminom C na bore u usporedbi s placebo. Ova studija je provedena i kliničkim ocijenjivanjem koje je pokazalo značajno poboljšanje u pojavi i izgledu finih bora. Antioksidativni učinak AA ispitivan je na 27 ženskih volontera koje su tijekom sedam dana dva puta dnevno koristile kremu s AA i placebo na podlakticama. Neposredno prije i sedam dana nakon određen je UPE (slaba emisija fotona tijekom oksidacijskog procesa izazvanog UVA-zračenjem). Krema s 3% AA je pokazala bitno smanjenje UPE signala u usporedbi s placebo. Krema s 3% AA je pokazala puno snažniji antioksidacijski potencijal u odnosu na kremu koja sadrži 3% SAP (bez AA) u istoj emulziji. To pokazuje superiorniji učinak čiste AA na ljudskoj koži (40).

U trećoj studiji se istraživalo djelovanje topikalnog vitamina C na fotoostarjelu kožu. Provedena je randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana studija kako bi se procijenili klinički učinci i promjene na reljefu kože tijekom 6 mj. korištenja kreme s 5% vitaminom C. Uspoređivano je djelovanje kreme s vitaminom C nasuprot placebo na fotoostarjeloj koži. Sudjelovalo je 19 zdravih ženskih volontera (51-59 god.). Ispitanici su imali znakove fotostarenja na tom području. Nanosili su jednom dnevno kremu s 5% vitaminom C ili placebo. Kliničke procjene su napravljene prije početka te nakon 3 i 6 mj. Obavljali su ih istraživački dermatolozi pa su uspoređene sa samoprocjenom volontera. Klinička procjena dermatologa predstavljala je ukupnu ocijenu : hidratacija, hrapavost, labavost, gipkost, fine i grube bore. Volonteri su trebali

ocijeniti stanje i promjene parametara kože : hidratacija, fine i grube bore, čvrstoća, sjaj, tonus, gipkost, istrošenost, pigmentirane mrlje, hrapavost, ugodnost, glatkoća, nesavršenosti, zaglađivanje, suhoća i eritem. Mjerenje reljefa kože je praćeno pomoću napravljenih silikonskih gumenih replika reljefa kože koji je ispitivan. To je omogućilo klasifikaciju kožnih brazda. Biopsiju kože je pristalo uraditi 10 od 19 ispitanika. Biopsije kože istraživane su svjetlosnom ili elektronskom mikroskopijom. Klinički pregled dermatologa kao i samoprocjena volontera, pokazali su značajno poboljšanje ukupne ocijene u grupi koja je koristila vitamin C u odnosu na kontrolnu placebo grupu. Posebno je došlo do smanjenja malih i grubih bora. Analiza replika reljefa kože u usporedbi s placebo pokazala je bitno povećanje gustoće kožnog mikroreljefa i smanjenje dubokih brazda. Primjećen je porast broja elastičnih vlakana u dermisu (41).

Četvrta studija je proučavala utjecaj topikalne primjene vitamina C na biosintezu kolagena. Provedena je dvostruko slijepa studija u kojoj je sudjelovalo 10 ženskih ispitanica dobi od 50 do 60 godina. Primjenjivale su 5% AA u emulziji tipa voda u ulju (V/U) na vanjsku stranu jedne ruke, a placebo na vanjsku stranu druge ruke svaki dan tijekom 6 mjeseci. Nakon završetka studije napravljena je biopsija kože na mjestu primjene ispitivane emulzije. Učinak vitamina C na dermis je praćen mjerenjem ravnotežne razine m-RNA za molekule kolagena (I i III), njihova tri post-translacijska enzima (prokolagen N-proteaza, prokolagen C-proteaza i lizil-oksidaza) te markeri aktivnosti dermalnih i epidermalnih stanica. Studija je pokazala da su ravnotežne razine m-RNA različite. Usporedna analiza učinka vitamina C i placeba na dvije strane tijela istog ispitanika pokazala je da je razina m-RNA za kolagene $\alpha 1$ (I) i $\alpha 1$ (III) povećana na strani gdje je korišten vitamin C u usporedbi s placebo. Ravnotežna razina post-translacijskih enzima je povećana na strani tretiranoj s vitaminom C u odnosu na placebo. Također je povećana i

ravnotežna razina markera aktivnosti dermalnih i epidermalnih stanica na strani s vitaminom C u usporedbi s placebo. Razina matriksnih metaloproteinaza nije bitno promijenjena upotrebom vitamina C. Zaključak studije je da topikalna primjena vitamina C potiče aktivnost dermalnih i epidermalnih stanica te da vitamin C povećava zaštitu od slobodnih radikala (42).

U petoj studiji je ispitivan učinak 5% kreme s vitaminom C (emulzija voda u ulju (V/U)). U dvostruko slijepom ispitivanju sudjelovalo je 20 ženskih ispitanika (55-60 god.) s fotoostarjelom kožom koji su tijekom šest mjeseci svakodnevno na području vrata koristili ispitivanu kremu i placebo. Ukupnu ocijenu su predstavljali izmjereni klinički parametri: hidratacija, hrapavost, labavost, površinski i duboki reljef kože, crvenilo i mrlje. Uspoređivane su replike reljefa kože na početku te nakon 3 i 6 mj. upotrebe ispitivane kreme i placeba. Reljefi replika su mjereni trodimenzionalnim laserskim mikroskopom koji omogućuje razlučivost od 1 μm . Dobivene 3D slike su analizirane korištenjem površinske morfologije kože koja je omogućila klasifikaciju brazda kože prema njihovoj dubini, širini i orijentaciji. Prema tome podjela reljefa je u 3 kategorije: mikroreljef (dubina 0-10 μm), srednje (10-20 μm) i duboke brazde (> 20 μm). Rezultati su pokazali značajno povećanje gustoće mikroreljefa i smanjenje dubokih brazda na području kože tretirano kremom s vitaminom C u usporedbi s placebo. Povećanje gustoće mikroreljefa kože se objašnjava reorganizacijom kolagenskih vlakana i povećanjem elastičnosti za vrijeme tretmana. Klinički pregled dermatologa i samoprocjena ispitanika potvrdili su poboljšanje reljefa kože (posebno grube bore ($p < 0.001$)). Studija je pokazala učinkovitost vitamina C u usporavanju procesa starenja kože. Korištena formulacija se pokazala uspješnom jer je vitamin C ostao u slobodnom obliku i zadržao stabilnost (43).

Šesta studija je istraživala topikalni učinak otopine s 5% AA na dermalne stanice. U studiji je sudjelovalo 10 ispitanica u postmenopauzi životne dobi od 50 do 60 godina. Većina ispitanica je primala zamjensku hormonsku terapiju, osim ispitanice br. 10 koja je koristila samo progesteron. Tijekom istraživanja nisu smijele koristiti dodatno vitamine. Studija je provedena između prosinca i lipnja. Randomiziranom, dvostruko slijepom studijom su ispitanice nanosile ispitivanu kremu na stražnju stranu gornje podlaktice s jedne strane, a placebo s druge. Pripravci su se koristili noću svakodnevno tokom 6 mj. Nakon 3 i 6 mj. provedeno je testiranje ispitanica zbog kliničkog promatranja i otkrivanja potencijalnih nuspojava. Biopsije su se uzimale na obje strane. Razina m-RNA kolagena tipa I i III je povećana kod upotrebe aktivnog pripravka kao i razina post-translacijskih enzima. Razina m-RNA dekorina je također povećana, ali količina elastina i fibrilina-1 i -2 se nisu promijenile. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 1, 2 i 9 nije se bitno promijenila, ali se povećala razina tkivnog inhibitora matriksne metaloproteinaze 1 bez promjene tkivnog inhibitora matriksne metaloproteinaze 2. Na kraju studije je procijenjen prehrambeni unos vitamina C na temelju konzumacije voća i povrća. Ispitanici koji su imali najnižu ocijenu unosa vitamina C putem prehrane su imali najbolju stimulaciju ravnotežne razine m-RNA i njihovih enzima za preradu. Rezultati pokazuju da funkcionalna aktivnost dermalnih stanica žena u postmenopauzi nije maksimalna te da se može povećati (44).

Sedma studija ispitivala je djelotvornost topikalnog vitamina C i njegove učinke na fotoostarjelu kožu. Randomizirana, dvostruko slijepa kontrolirana studija je trajala 3 mj. Sudjelovalo je 19 dobrovoljaca (3 muškarca, 16 žena) u dobi između 36 i 72 godine. Nasumično dodijeljeni pripravci su se nanosili na lijevu i desnu stranu lica svakog ispitanika: serum s AA (Cellex-C high-potency serum; Cellex-C International, Toronto, Ontario) i sam nosač u serumu (Cellex-C

International). Tri kapi (0,5 mL) svakog pripravaka su korištene svaki dan tokom 3 mj. Procijenjivani su klinički parametri: fine bore, grube bore, hrapavost, teleangiektazije, opuštenost/tonus, pigmentacije, keratoze i nezdrav/žut izgled kože. Referentne fotografije su snimljene na početku i na kraju studije te su korištene za standardizaciju kriterija ocijenjivanja. Ukupni rezultati na kraju istraživanja su uspoređeni s početnim i ocijenjivani kao: znatno poboljšani, poboljšani, blago poboljšani, bez promjene ili još gore. Upitnicima za samoprocjenu volonteri su ocijenili stupanj poboljšanja (znatno poboljšani, poboljšani, blago poboljšani, bez promjene ili još gore) te prijavili neželjene učinke (peckanje, osjećaj bockanja, crvenilo, ljuštenje, suhoća, promjena boje, svrbež i osip). Optička profilometrijska analiza je provedena uspoređujući uzorke silikonskih gumenih replika površine kože s početka i s kraja studije. Rezultirajuće slike površine kože su digitalno analizirane. Dodijeljene su brojčane vrijednosti koje odražavaju površinske značajke. Dobiveni parametri (Rz, Ra i sjene) su proporcionalni stupnju naboranosti, hrapavosti i drugim površinskim nepravilnostima. Ra predstavlja aritmetičku srednju vrijednost hrapavosti, Rz je parametar za srednju vrijednost hrapavosti iz pet uzoraka duljina, a sjene su područja tamnih sjena koje se vide profilometrijskom analizom. Usporedba parametara s početka i kraja studije je pokazala promjene u teksturi kože. Neželjeni učinci su bili blagi i tokom prva 2 mj. terapije su se povukli. Primjećeni su: osjećaj bockanja 11 (55%), eritem 5 (24%) i suha koža 1 (0,05%). Svi neželjeni učinci su se tretirali vlaženjem. Optička profilometrijska analiza je pokazala značajno poboljšanje u vrijednostima Ra i sjena na sjeverno južnoj osi na strani lica tretiranoj aktivnim pripravkom (73,7%) u odnosu na nosač. Strana s aktivnim pripravkom je pokazala bolji napredak (68,4%) u Rz na sjevernoj južnoj osi lica u odnosu na kontrolu. Ukupna klinička ocijena je pokazala znatno veće poboljšanje (84,2%) kod aktivnog tretmana nego kod kontrole. Rezultati upitnika koje su ispunjavali ispitanici su pokazali bitno poboljšanje (84,2%)

kod aktivnog u odnosu na kontrolni tretman. Rezultati fotografske procjene su isto pokazali znatno poboljšanje (57,9%) u tretmanu s AA u odnosu na kontrolu. Topikalni tretman s AA je pokazao subjektivno i objektivno poboljšanje fotoostarjele kože (45).

3.3. Učinak tetra-izo-palmitoil askorbata

Provedena je jedna studija u kojoj se ispitivala učinkovitost i stabilnost ATIP-a u kozmetičkim formulacijama. U studiji je sudjelovalo 20 dobrovoljaca (25-55 god.) s tipovima kože II-IV (Fitzpatrick ljestvica). Tijekom 15 dana na lice i podlakticu svaki volonter je nanosio formulaciju s 1% ATIP ili placebo. Mjerenja su napravljena prije nanošenja tretmana, nakon 3 sata (trenutni učinak) i nakon 15 dana (dugotrajni učinak). Klinička učinkovitost formulacija određena je biofizičkim tehnikama i analizama slika kože prema parametrima: sadržaj vode u rožnatom sloju, transepidermalni gubitak vode (TEWL), svojstva viskoelastičnosti i mikroreljef kože. Hidratacija na površini kože (rožnati sloj) određena je pomoću uređaja Corneometer CM 825. TEWL je mjereno s uređajem Tewameter TM 210 čime se ispitala epidermalna barijerna funkcija. Viskoelastična svojstva su ispitana pomoću uređaja Cutometer SEM 575. Parametri mikroreljefa su određeni pomoću UV-A svjetlosne video kamere Visio Scan VC 98. Slike pokazuju strukturu kože i razinu suhoće što se koristi za procjenu parametara hrapavosti kože: hrapavost (Rt), glatkoća (SEsm-proporcionalna širini i obliku bora) te broj i širina bora (SEw). Rezultati studije su pokazali poboljšanje mikroreljefa kože povezanog s glatkoćom kože (SEsm) kod volontera koji su koristili formulaciju s 1% ATIP za razliku od placeba. Primjećeno je značajno povećanje hidratacije rožnatog sloja. Rezultati ove studije potvrđuju zapažanja drugih autora koja pokazuju učinkovitost formulacija koje sadrže antioksidanse protiv starenja (46).

3.4. Inovativne formulacije vitamina C s različitim sustavima dostave

Pronađeno je pet studija AA s inovativnim formulacijama u cilju očuvanja stabilnosti kao i postizanja što bolje učinkovitosti među kojima su i studije koje su koristile suvremene sustave dostave lijekova.

Provedena je studija u kojoj se ispitivalo djelovanje AA u mezoterapiji s mikro iglom i bez igle u procesu starenje kože. U randomiziranoj kontrolnoj studiji je sudjelovalo 17 zdravih ispitanica (dobi 45-70 god.) s znakovima starenja. Koristile su serum 20% AA s hidrosolom jagode. Provedene su 4 serije tretmana mezoterapije s iglom i 4 serije tretmana mezoterapije bez igle koje su se izvodile svako 10 dana. Na lijevoj strani lica se koristila mezoterapija bez igle, a na desnoj strani mezoterapija s iglom. U oba tretmana se koristilo 2,5 mL ispitivanog seruma (pH 3,5). Parametri kože su mjereni na početku i kraju studije. Provedena je procjena biomehaničkih karakteristika kože. Analizirani parametri su R0 (čvrstoća) i R2 (elastičnost). Mjerene su hidratacija, fleksibilnost i ton kože. Analiza melanina i eritema na područjima koja pokazuju promjene u pigmentacijama pokazala je učinkovitost obje metode. Nema statistički značajne razlike u postotku promjena parametara: hidratacija, hiperpigmentacija i eritem u odnosu na početak obje vrste tretmana. Obje metode su imale povećanu hidrataciju i poboljšan tonus kože. Ipak, bolji rezultati su zabilježeni s tretmanom mezoterapije s iglama (47).

Provedene su dvije studije u kojima se ispitivalo djelovanje novih flastera s mikroiglicama u cilju poboljšanja sigurnosti i djelotvornosti AA. U prvoj studiji se ispitivao anti-age učinak flastera s mikroiglicama s otopljenom AA putem dvostruko slijepe, placebo kontrolirane studije. Za procjenu učinka protiv bora odabrana su 23 ispitanika prosječne dobi $49.0 \pm 4,5$ godina koji su

imali bore oko očiju. Ispitanici su bili podijeljeni u dvije grupe. Prva grupa je koristila ispitivani pripravak na području oko očiju na lijevoj strani lica, a druga grupa je koristila placebo na području oko očiju na desnoj strani lica svaka četiri dana. Pregled fotooštećenja i analiza replika kože su provedeni vizualno pomoću uređaja Skin Visiometer SV 600 koji mjeri hrapavost kože. Procjena iritacije i senzibilizacije kože je provedena na 51 ispitaniku. Procijenjivan je cjelokupni potencijal iritacije i senzibilizacije kože upotrebom aktivnog uzorka i kontrolnog uzorka. Koža tretirana s aktivnim uzorkom je pokazala statistički značajno poboljšanje u ukupnoj ocijeni fotooštećenja i vrijednostima Visiometra u odnosu na kontrolni uzorak. R2 (maksimalna hrapavost) je pokazala znatan napredak. Procjena iritacije i senzibilizacije pokazala je da flasteri s mikroiglicama s otopljenom AA nisu uzrokovali iritaciju ili senzibilizaciju kože (48). Druga studija je ispitivala anti-age djelovanje kozmetičkih flastera s mikroiglicama napunjenih otopinom AA ili retinil retinoata. Provedena je randomizirana dvostruko slijepa kontrolirana studija. U 12-tjednom kliničkom ispitivanju sudjelovale su 24 žene iz Koreje dobi 40-54 godina s izraženim borama na području oko očiju. Ispitanice su bile podijeljene u dvije skupine. Ispitanice iz skupine A su koristile flastere s mikroiglicama napunjene s AA na području oko očiju s lijeve strane lica, a iz skupine B flastere s retinil retinoatom na područje oko očiju s desne strane lica. Tretman su radile dva puta dnevno tijekom 12 tjedana. Procjena poboljšanja bora je određena aparatom za kožu Skin Visiometer SV 600. Parametri koji su mjereni su: R1-hrapavost kože, R2-maksimalna hrapavost, R3-prosječna hrapavost, R4-dubina glatkoće i R5-aritmetička prosječna hrapavost. Flasteri su pokazali sigurnost i djelotvornost u poboljšanju bora kod obje skupine te su izmjerena statistički značajna poboljšanja u svim R vrijednostima ($P < 0,05$). Posebno velike razlike su bile u R1 i R5 vrijednostima ($P < 0,001$). Ispitivanje nije pokazalo nikakve nuspojave korištenih tretmana. Ova studija je pokazala uspješnost upotrebe retinil retionata i askorbinske

kiseline u mikroiglicama za proizvodnju novih kozmetičkih flastera (49). Stoga se može smatrati da flasteri s mikroiglicama i otopljenom AA je pokazuju značajan učinak protiv bora bez iritacija i senzibilizacije kože (48, 49).

Provedena je studija u kojoj je ispitivan učinak novog inovativnog DNA aptamera “Aptamina C” u prevenciji oksidacijskog stresa i postizanju maksimalnog učinka vitamina C kao antioksidansa kako bi se spriječila oksidacija vitamina C na zraku, pod utjecajem visokih temperatura, pH i sunčeve svjetlosti. Aptamin C je DNA aptamer koji se specifično veže na vitamin C i inhibira njegovu oksidaciju. Pomoću ITC analize je određeno vezanje Aptamina C s vitaminom C. Pomoću izvornog programa za ITC uvršteni su podaci u izotermu vezanja na jednom mjestu. Provedena su *in vitro* i klinička ispitivanja kako bi se istražio učinak kompleksa Aptamina C i vitamina C na kožu. U kliničkom ispitivanju su sudjelovale 22 ispitanice prosječne dobi $50,05 \pm 2,94$ godina. Bore na području oko očiju su ocijenjene 3D sustavom za analizu slika, hidratacija kože kapacitivnom metodom i TEWL metodom difuzije vode, a elastičnost kože metodom usisavanja. Navedeni parametri su mjereni na početku te 4 i 8 tjedana nakon tretmana. Svi dobiveni podaci statistički su analizirani softverom SPSS. Pomoću PRIMOS-a su vrednovani parametri bora oko očiju. Primjećen je bitan učinak u poboljšanju bora, izbjeljivanju mrlja i povećanju hidratacije. Kliničko ispitivanje je pokazalo smanjenje iritacije i svrbeža kože. Ispitivanje nije pokazalo nikakvu nuspojavu. Studija je pokazala da Aptamin C, odnosno DNA aptameri, potencijalno produljuju rok trajanja i povećavaju moć proizvoda s vitaminom C odgađajući njegovu oksidaciju u otopini. Razlog tomu je visok afinitet vezanja Aptamina C za vitamin C (50).

Provedena je randomizirana kontrolirana studija koja je ispitivala učinkovitost formulacije AA kao nano vezikularnog spanlastika. Cilj studije je bio suzbijanje problema stabilnosti i postizanja najboljih kliničkih rezultata. Spanlastici su elastične i deformabilne nanovezikule na bazi surfaktanata u kojima je vodena otopina otopljene tvari zatvorena. Ispitivana je propusnost kože pomoću tehnike skidanja trake. Spanlastici napunjeni AA pripremljeni su metodom ubrizgavanja etanola. Dobivena formulacija je uspoređena s otopinom AA za topikalnu primjenu (10%). Topikalna otopina AA je pripremljena otapanjem 10 g AA u 100 mL deionizirane vode. Istraživanje je provedeno na šest ispitanica koje su nasumično rapoređene u dvije grupe. Svaka ispitanica je koristila ispitivane formulacije na četiri različita mjesta podlaktice u različito vrijeme (0,25, 0,5, 1 i 2 sata). 250 mL svake formulacije je jednom nanošeno na svako mjesto. Pomoću pamuka je uklonjen višak formulacije koji se nije apsorbirao. Za određivanje prodiranja ispitivanih tvari u rožnati sloj korištene su trake. Pamuk sa svakog mjesta kao i trake su ultrazvučno obrađene kako bi se osigurala potpuna ekstrakcija ispitivane tvari. Zatim su analizirani spektrofotometrijski da bi se odredila AA. Nakon primjene spanlastika postotak zadržane ispitivane tvari je bio $29,44 \pm 2,67$ % nakon 0,25 h. Nakon 0,5 h je dosegao svoj maksimum od $92,03 \pm 5,32$ %. Otopina AA je pokazala vrlo malu propusnost od $7,51 \pm 3,16$ % nakon 2 h. Spanlastik napunjen AA je pokazao značajno veće prodiranje kroz rožnati sloj kože zbog poboljšane elastičnosti i sposobnosti prodiranja kroz kožu (51).

3.5. Usporedba učinkovitosti natrijevog askorbil fosfata i vitamina C

Provedena je studija čiji je cilj bila usporedna procjena učinkovitosti dva različita oblika vitamina C. Studija je ispitivala fizikalno-kemijsku stabilnost i klinički učinak transdermalnih emulgel pripravaka koji sadrže 5% SAP ili AA na bore oko očiju. Studija je bila dvostruko

slijepa i placebo kontrolirana, provedena je na 12 ispitanica u dobi od 40 do 50 godina, a trajala je 2 mjeseca. Svaka ispitanica je dobila različitu formulaciju. SAP su nanosili na područje oko desnog oka, a AA na područje oko lijevog oka dva puta dnevno. Procjene su napravljene na početku te svaka dva tjedna do dva mjeseca. Procjena elastičnosti i digitalne slike su napravljene za svakog ispitanika posebno. Dermatoskopom su snimljene digitalne slike te analizirane ImageJ softverom. Statistička istraživanja su provedena pomoću SPSS softvera. Pregledi obrade dobivenih slika su pokazali povećanu elastičnost kod primjene ispitivanih formulacija. Usporedba vrijedosti prije i nakon tretmana pokazala je statistički značajna ($P < 0.05$) poboljšanja. Obje formulacije su uzrokovale smanjenje dubine bora, ali nije uočena statistički značajna razlika u djelotvornosti formulacija. Ispitivanja stabilnosti pokazala su da je u obje formulacije potrebno dodati antioksidativno sredstvo za stabilizaciju kako bi se postigla željena stabilnost (52).

3.6. Djelovanje vitamina C i njegovih derivata u kombinaciji s drugim tvarima

Pronađeno je devet studija koje su istraživale anti-age djelovanje vitamina C u kombinaciji s drugim aktivnim tvarima bilo sintetskog ili prirodnog podrijetla. Osim AA u ovim studijama je istraživano djelovanje i drugih derivata vitamina C: AA-2G, ATIP i THDA. Uključene su kombinacije vitamina C s jednom ili više aktivnih tvari.

U prvoj studiji je proučavan anti-age učinak i sigurnost kreme koja sadrži 4-heksil-1, 3-fenilendiol koji je inhibitor nuklearnog faktora-kB (NF-kB) i AA-2G. Randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana studija je trajala 12 tjedana i uključivala ispitanice u dobi od 45 do 70 godina. Uspoređivano je djelovanje kreme u odnosu na placebo. Tijekom 12 tjedana ispitanice

su svaki dan dva puta nanosile kremu ili placebo na istu stranu lica. Boja kože je analizirana kolorimetrijskim mjerenjima, a procijenjena su i biomehanička svojstva kože. Kliničku procjenu je proveo dermatolog, a i ispitanice su napravile samoprocjenu. Klinička procjena je pokazala znatan napredak većine parametara bora već nakon 8 tjedana upotrebe u odnosu na početak tretmana i placebo. Smeđe mrlje i fotooštećenja su se također poboljšali nakon 8 i 12 tjedana usporedno s početkom i placebo. Samoprocjena ispitanica nije pokazala poboljšanja upotrebom aktivnog tretmana u odnosu na placebo, osim promjene u čvrstoći kože nakon 8 i 12 tjedana. Zabilježena je velika razlika u svim kolormetrijskim parametrima kod aktivnog tretmana u odnosu na placebo nakon 8 tjedana, a nakon 12 tjedana promjene u mrljama na koži. Između tretmana nije zapažena bitna promjena u elastičnosti kože. Podnošljivost aktivnog tretmana je bila dobra. Krema koja sadrži 4-heksil-1,3-fenilendiol i AA-2G poboljšava klinički izgled ostarjele kože. Upotreba inhibitora NF-kB predstavlja učinkovitu metodu lokalnog anti-aginga (53).

Druga studija je ispitivala topikalno djelovanje kreme koja sadrži transformirajući faktor rasta- β (TGF- β (1)), AA i ekstrakt cimicifuge (*Cimicifuga racemosa* L. Ranunculaceae) s fitoestrogenskim svojstvima. Provedena je randomizirana, usporedna slijepa studija u kojoj je ispitivan učinak kreme s TGF- β (1), AA i ekstraktom cimicifuge u silikonskoj bazi (CRS) u odnosu na identičnu kremu bez TGF- β (Vit C) te nasuprot seruma koji sadrži različite faktore rasta bez AA (TNS). Za prvi dio studije je nasumično odabrano 12 zdravih ženskih osoba s borama na licu raspona dobi od 42 do 74 godine. Svaka ispitanica je koristila CRS na lijevoj ili desnoj strani lica, a Vit C na suprotnoj strani lica. Za drugi dio studije je odabrano 20 zdravih ženskih osoba s borama na licu raspona dobi od 29 do 74 godine. Koristile su CRS na lijevoj ili

desnoj strani lica, a na suprotnoj TNS. Na temelju ovog nasumičnog odabira ispitanice su koristile kreme na svakoj strani lica dva puta dnevno uzastopno tokom tri mjeseca. Napravljene su kvalitetne digitalne fotografije svake ispitanice na početku i poslije tretmana. Dobivene fotografije su proučavala 4 neovisna dermatologa ocijenjujući rezultate bora na licu. Ispitanice su napravile samoprocjenu na početku i kraju tretmana. Prvi dio studije je završilo svih 12 ispitanica, dok je u drugom dijelu otpala jedna ispitanica od njih 20. Kod 27 od 31 ispitanice dermatolozi su ocijenili uspješnim rezultate smanjenja bora na strani lica tretiranoj CRS-om. Ispitanici su pokazali poboljšanje u smanjenju bora za 21,7%. Prosječno poboljšanje grupe od 31 ispitanice je bilo 12%. 18 od 31 ispitanice je izvijestilo o poboljšanju strane lica tretirane CRS-om. U prvom dijelu studije dermatolozi su ocijenili uspješnim rezultate bora kod 7 od 12 ispitanica na strani lica tretiranoj Vit C što je 6,2% prosječno poboljšanje bora. 4 od 12 ispitanica je primjetilo subjektivno poboljšanje. U drugom dijelu studije dermatolozi su ocijenili uspješnim rezultate bora kod 14 od 19 ispitanika na strani lica tretiranoj TNS-om. Prosječno poboljšanje je 6,9%. 9 od 19 ispitanica je također primjetilo subjektivno poboljšanje. CRS i TNS su pokazali značajno poboljšanje u smanjenju bora u odnosu na tretman s Vit C. Obje kreme sadrže faktor rasta koji se pokazao bitnim za uspjeh. Iako Vit C koji ne sadrži faktor rasta nije uspio pokazati značajno statističko poboljšanje u smanjenju bora, pretpostavka je da bi AA u kombinaciji s faktorom rasta trebala imati sinergistički učinak. AA je bitan kofaktor u biosintezi kolagena, a faktori rasta stimuliraju biosintezu kolagena (54).

U trećoj studiji je ispitivana lokalna upotrebe askorbinske kiseline i madekasosida na fotoostarjeloj koži. Madekasosid je aktivna tvar iz biljke Gotu kola (*Centella asiatica* L. Apiaceae) za koju je dokazano da potiče proizvodnju kolagena te može spriječiti proces starenja

kože. Randomizirana, dvostruko slijepa kontrolirana studija je provedena na 20 zdravih ženskih volonterki u dobi od 45 do 60 godina da se ispituju učinci na klinička, biometrijska i strukturna svojstva kože. Kontrolna krema je obična hidratantna krema bezaktivnih sastojaka. Ispitivana krema sadrži 5% stabilizirani vitamin C i 0,1% madekasosid. Krema se nanosila dva puta dnevno tijekom 6 mjeseci na lice, polovicu vrata, gornji dio prsa i jednu ruku ispitanice. Na drugu polovicu vrata i drugu ruku je nanošena kontrolna krema. Od 20 ispitanica 14 ih je prihvatilo uraditi biopsiju kože na obje ruke na početku i nakon 6 mj. tretmana. Klinički pregled, samoprocjena volontera i neinvazivne procjene kože su napravljene prije početka tretmana te nakon 1, 2, 3, 4, 5 i 6 mj. Ukupna klinička ocijena je predstavljala zbroj ocijena ispitivanih parametara kože: hidratacija, hrapavost, mlitavost, gipkost, fine i grube bore, sjaj, smeđe mrlje i homogenost kože. Osim toga, svaki put je ocijenjena i ukupna osjetljivost kože na tretman. Nakon 6 mjeseci klinički i biometrijski nalazi su pokazali izrazito poboljšanje svojstava kože. Samoprocjena volontera je pokazala statistički značajno poboljšanje većine kliničkih parametara. Kod brojnih ispitanica oslabljeli papilarni dermis je postao kompaktniji zbog stvaranja novih kolagenskih vlakana. Primjećen je porast u elastičnosti kože. Testirana krema je izazvala pojavu novih finih elastičnih vlakana stvarajući ponovo normalnu strukturiranu mrežu elastičnih vlakana. Rezultati sudije su pokazali da lokalna primjena kreme s vitaminom C i madekosasidom djeluje na funkcionalno i strukturno preoblikovanje fotoostarjele kože. U ovoj studiji se pokazala povezanost obje aktivne tvari, ali ostaje nerazjašnjeno jel imaju sinergistički ili aditivan učinak (55).

Provedene su dvije studije koje su ispitivale učinkovitost i sigurnost 3 u 1 noćnog seruma (NFS) za lice koji sadrži melatonin, bakuchiol i ATIP. U prvoj studiji je izvedeno pet kliničkih studija

koje su ukupno uključile 103 ispitanika tretiranih od 28 do 84 dana. Kliničkim bodovanjem i instrumentalnim procjenama pod nadzorom dermatologa vrednovane su učinkovitost i sigurnost pripravka protiv starenja kože. Provedene su: studija učinkovitosti i podnošljivosti, dvije studije koje su ispitivale hidrataciju i dvije studije na masnoj koži: studija učinkovitosti i studija komedogenosti. Nakon 12 tjedana klinička procjena je pokazala statistički bitno smanjenje bora, povećanje čvrstoće kože, smanjenje crvenila i ukupno poboljšanje kvalitete kože i tena. Razina hidratacije je porasla od 30 minuta do 12 sati nakon nanošenja pripravka. Ispitanici su povoljno ocijenili učinkovitost, kozmetička svojstva seruma i dobru podnošljivost na svim tipovima kože uključujući masnu kožu (56). Na temelju prethodne studije je provedena nova studija kako bi se detaljnije ispitali klinički učinci potaknuti NFS-om s pretpostavkom u poboljšanjima kliničkih parametara starenja kože. U studiju su bila uključena 24 ispitanika koja su koristile NFS svaku večer 12 tjedana, a 12 ispitanika je nastavilo koristiti serum do 24 tjedna. Nanosili su 4-5 kapi NFS na lice, vrat i dio ispod vrata. Dermatolozi su napravili kliničku procjenu kože. Biopsija kože je urađena u 12. tjednu zbog procjene histoloških parametara. Došlo je do ukupnog estetskog poboljšanja tijekom trajanja studije. Dermalna i epidermalna debljina se povećala, ali bez postizanja statističke značajnosti. Rezultati su pokazali veliko poboljšanje: teksture kože, tonusa, tena, linija i bora, pigmentacije i eritema. Jako su se smanjile bore, hiperpigmentacije i fotooštećenja. NFS je pokazao klinički i statistički značajne učinke na znakove starenja kože nakon 12 tjedana, ali su bili izraženiji nakon 24 tjedna. NFS je pokazao značajne učinke protiv znakova starenja kože te predstavlja učinkovit i dobro podnošljiv tretman za one koji žele noćni anti-age tretman (57).

Šesta studija je bila randomizirana, dvostruko slijepa studija u kojoj je ispitivan anti-age i posvjetljujući učinak topikalnog pripravka koji sadrži vitamin C, vitamin E i ekstrakt kulture lišća maline (*Rubus idaeus* L. Rosaceae). U studiji je sudjelovalo 50 ispitanica s Fitzpatrickovim tipom kože III i IV, prosječne dobi 47 godina. Ispitivani pripravak je bio serum u kapsulama koji sadrži 20% AA, 1% tokoferil acetat i ekstrakt kulture lišća maline. Tijekom osam tjedana ispitanice su koristile svaku večer jednu kapsulu seruma na jednoj strani lica. Druga strana lica je bila kontrolna i nije tretirana. Dermatolozi su procijenjivali parametre kože ispitivane i kontrolne strane lica nakon 4 i 8 tjedana. Raznim metodama su mjerene: boja kože, elastičnost, sjaj, vlaga, transdermalni gubitak vode, glatkoća, hrapavost, ljuskavost, bore i vizualni učinak liftinga. Procijenjivani su neželjeni učinci i zadovoljstvo. Nakon završenog tretmana koža je bila svjetlije boje, veće elastičnosti i većeg sjaja u odnosu na kontrolnu stranu. Glatkoća, ljuskavost i bore su pokazali bitno poboljšanje. Serum se dobro podnosio nakon primjene. Primjećene su blaga nepropusnost i peckanje. Studija je pokazala djelotvornost seruma u anti-age i posvjetljujućem djelovanju (58).

Sedma studija je ispitala može li topikalni primjena vitamina C poboljšati izgled fotooštećenja na koži rezultirajući klinički vidljivim promjenama. U dvostruko slijepoj studiji koja je trajala 12 tjedana sudjelovalo je 10 ispitanika s fotooštećenjima na licu. Na jednoj strani lica su koristili novooblikovan vitamin C kompleks koji sadrži 10% AA i 7% THDA u bezvodnoj polisilikonskoj gel bazi, a na suprotnoj strani lica neaktivnu polisilikonsku gel bazu. Klinička procjena bora, pigmentacije, upale i hidratacije je provedena prije početka studije, u 4., 8. i 12. tjednu, a u 12. tjednu su urađene biopsije kod 4 ispitanika. Svi ispitanici su ispunili i upitnike. Strana lica tretirana kompleksom vitamina C je pokazala statistički bitno poboljšanje: smanjeni znakovi

fotostarenja na obrazima ($P=0,006$) i području oko usta ($P=0,01$). Područje oko očiju se poboljšalo na obje strane lica što je vjerojatno posljedica poboljšane hidratacije na obje strane lica. Ukupno poboljšanje strane lica tretirane kompleksom vitamina C je bilo statistički značajno ($P=0,01$). Biopsije su pokazale povećanu količinu kolagena u papilarnom dermisu i pojačano obojenje za mRNA za kolagen tipa I. Nijedan ispitanik nije imao znakove upale. Četiri ispitanika su smatrala da im se poboljšala samo strana lica tretirana vitaminom C. Nijedan ispitanik nije primjetio da je placebo strana pokazala poboljšanje. Ova studija je pokazala klinički vidljivo i statistički značajno poboljšanje bora na licu korištenjem kompleksa vitamina C. Ovi rezultati su povezani s dokazima biopsije o stvaranju novog kolagena (59).

Osma studija je ispitivala sigurnost, podnošljivost i učinkovitost novog seruma s vitaminom C i E i polifenolima iz zelenog čaja (CE-GTP) na fotoostarjeloj koži. U studiji je sudjelovala 31 ispitanica u dobi od 43 do 65 godina. Ispitivanje je trajalo 12 tjedana. Ispitanice su nanosile CE-GTP serum dva puta dnevno. Provedena je klinička ocjena parametara: sigurnosti, učinkovitosti i podnošljivosti, ultrazvučna mjerenja te upitnici za samoprocijenu. Primjećena su statistički značajna poboljšanja u svim klinički ocijenjenim parametrima učinkovitosti CE-GTP. Smanjene su tanke bore na području oko očiju i bore na licu. Koža je vidno glatkija i sjajnija. Provedena ultrazvučna mjerenja su pokazala bitno povećanje gustoće kože u 12. tjednu u usporedbi s početkom studije. Upitnici za samoprocijenu su pokazali napredak u smanjenju bora i poboljšanje u boji i teksturi kože. Smanjene su i tamne mrlje na koži i povećana elastičnost kože. Novi CE-GTP serum se pokazao sigurnim i učinkovitim (60).

U devetoj studiji je ispitivana učinkovitost anti-age hidratatne kreme u poboljšanju izgleda kože. Ispitivana krema sadrži ekstrakt korijena astragalusa (*Astragalus membranaceus* L. Fabaceae), mješavinu peptida uljučujući palmitoil tripeptid-38, standardizirani ekstrakt lista ružmarina (ursolna kiselina), THD i ubikinon u hidratantnoj bazi emulzije (U/V). Studija je provedena na 37 ispitanica u dobi 35 do 60 godina. One imaju blage do umjerene bore na licu i neujednačen ton kože. Ispitanice su nanosile kremu dva puta dnevno, ujutro i navečer. Kliničke procjene su napravljene na početku i nakon 4, 8 i 12 tjedana upotrebe. Klinička procjena je uključivala parametre: tanke bore i bore, prozračnost/svjetlinu, vizualnu hrapavost, opipljivu hrapavost, crvenilo, hiperpigmentaciju i cijelokupni izgled kože. Upitnici za samoprocjenu su provedeni u 4. , 8. i 12. tjednu. Uključivao je upite o učinkovitosti proizvoda i estetske upite proizvoda. Digitalna fotografija je napravljena na početku, u 8. i 12. tjednu. Svaka ispitanica je imala ukupno 3 slike cijelog lica snimljene pod vidljivim i unakrsno polariziranim svjetlom. Korištena je VISIA CR foto stanica s Canon 5D digitalnim SLR fotoaparatom. Nakon 8 tjedana upotrebe ispitivane kreme došlo je do značajnog poboljšanja u ocijenama svih kliničkih parametara u usporedbi s početkom. Nakon 12 tjedana uočeno je veće statistički značajno poboljšanje. 100% ispitanica je pokazalo poboljšanje tankih bora s prosječnim poboljšanjem od 25,1%. 97% ih je pokazalo poboljšanje bora od 16,9%. 97% ispitanica je pokazalo poboljšanje prozračnosti/svjetline od 22,6%. Svi su pokazali poboljšanje vizualne hrapavosti od 26,4%, a 97% ih je pokazalo poboljšanje opipljive hrapavosti od 32,5%. Poboljšanje crvenila kože od 79,1% je pokazalo 89% ispitanica. Svi ispitanici su pokazali poboljšanje hiperpigmentacije od 19%, te poboljšanje ukupnog izgleda kože od 19,8%. Nakon 12 tjedana upitnici za samoprocijenu su pokazali veći postotak povoljnih u odnosu na nepovoljne rezultate. Digitalne fotografije potvrdile su rezultate

kliničke procjene i upitnika o samoprocjeni. Ispitivana krema je ocijenjena kao blaga i dobro podnošljiva (61).

4. RASPRAVA

Starenje kože je složen biološki proces koji dovodi do mnogih oštećenja na staničnoj razini. Koža je vidljivi pokazatelj utjecaja starenja (16). Najvažnija morfološka promjena ostarjele kože je smanjenje i propadanje kolagenih i elastičnih vlakana (21). Provode se brojna istraživanja s mogućnostima primjene u procesu usporavanja starenja kože. Posljednih godina se posebno intenzivno istražuje djelotvornost vitamina C. Na tržištu postoje brojni pripravci s vitaminom C (26). Velika većina provedenih kliničkih studija pokazala je djelotvornost vitamina C u procesu usporavanja starenja kože. Kroz studije dokazano je djelovanje vitamina C bilo kao antioksidansa, ulogom u biosintezi kolagena, povećanju gustoće kožnih papila ili povećanju elastičnosti. Poboljšanja su utvrđena i prilikom samoprocjene i utvrđivanjem različitih parametara kože pomoću instrumentalnih metoda (33, 34).

Biosinteza kolagena je najvažniji proces u održavanju mlade kože. Smanjenje biosinteze kolagena dovodi do starenja kože. Bitnu ulogu u biosintezi kolagena ima vitamin C. Sudjeluje kao kofaktor tri post-translacijska enzima u reakcijama hidroksilacije ostataka lizina i prolina. Tu održava ion željeza u reduciranom stanju što je bitno za aktivnost enzima (12). Najviše studija je ispitivalo topikalno djelovanje AA protiv starenja kože. Te studije su i pokazale da AA djeluje na usporavanje procesa starenja kože utječući na biosintezu kolagena i na povećanje gustoće dermalnih papila u odnosu na placebo (34, 40, 41, 42, 43, 44, 45). Primjerice, primjena 5% AA u emulziji (V/U) je pokazala utjecaj na biosintezu kolagena. Aktivnost vitamina C u biosintezi kolagena je praćena mjerenjem ravnotežne razine m-RNA za molekule kolagena (I i III), njihova tri post-translacijska enzima i markera aktivnosti dermalnih i epidermalnih stanica. Razina m-

RNA za molekule kolagena i razina post-translacijskih enzima je bila povećana na strani gdje je korišten vitamin C u odnosu na placebo. Povećana je bila i razina markera aktivnosti dermalnih i epidermalnih stanica (42). Otopina s 5% AA je također pokazala utjecaj na biosintezu kolagena (44). Učinkovitost vitamina C u smanjenju bora potvrđena je mjerenjem kliničkih parametara kože i usporedbom replika reljefa kože. Rezultati su pokazali značajno povećanje gustoće mikroreljefa i smanjenje dubokih brazda (41, 43, 45). Također i studija s ATIP-om je pokazala bitno poboljšanje mikroreljefa (46).

Vitamin C je snažan antioksidans koji sprječava oksidacijski stres koji uzrokuje oštećenja stanica i starenje kože (33). Krema s 3% AA je pokazala puno snažniji antioksidacijski potencijal u odnosu na kremu koja sadrži 3% SAP (bez AA) u istoj emulziji. To pokazuje superiorniji učinak čiste AA na ljudskoj koži (40).

Elastična vlakna su bitna za elastičnost i savitljivost kože (13). Degradacija i stanjivanje elastičnih vlakana dovodi do njihovog starenja. Rezultat je smanjena elastičnost kože (15). Osam studija je dokazalo da vitamin C poboljšava elastičnost kože odnosno da uzrokuje porast broja novih elastičnih vlakana (41, 43, 51, 55, 58, 50, 52, 60). Jedna studija nije zapazila bitne promjene u elastičnosti kože (53). Studije su ispitivale i podnošljivost pripravaka s vitaminom C. Studija koja je istraživala topikalni učinak otopine s 5% AA je pokazala izvrsnu toleranciju (44). Dobru podnošljivost je pokazalo nekoliko studija (53, 56, 57). Više studija nije pokazalo nikakve nuspojave (48, 49, 50). Serum s AA je pokazao blage neželjene učinke koji su se povukli tijekom prva dva mjeseca tretmana. Primjećeni su: osjećaj bockanja, eritem i suha koža (45).

Najvažniji nedostatak vitamina C je nestabilnost čime je upitna i sama učinkovitost pripravaka. AA se lako razgrađuje pod utjecajem visokog pH, visoke temperature, sunčeve svjetlosti, aerobnim uvjetima i prisutnosti metalnih iona. Očuvanje stabilnosti AA je danas u fokusu razvijanja formulacija (30). Kemijskim modifikacijama AA kao i različitim sustavima dostave se nastoji poboljšati stabilnost (26). Nekoliko studija su ispitivale inovativne metode primjene AA u svrhu poboljšanja sigurnosti i stabilnosti primjene AA. Korišteni su novi sustavi dostave AA i njezinih derivata. Studije koje su ispitivale djelovanje flastera s mikroiglicama i otopinom AA su pokazale učinkovitost ispitivanih proizvoda na bore na licu, a prilikom primjene nisu nikakve nuspojave. Stoga kozmetički flasteri vjerojatno predstavljaju budućnost primjene AA kao jedne od sigurnijih opcija u cilju poboljšanja sigurnosti i djelotvornosti AA (48, 49). Studija djelovanja AA u mezoterapiji s mikro iglom i bez igle pokazala je bolju učinkovitost AA u kombinaciji s tretmanom mezoterapije s iglom. Ovu metodu primjene AA treba još dodatno istražiti da bi se ispitala sigurnost i stabilnost AA (47). Stalno se istražuju nove metode primjene AA kojima bi se očuvala njezina stabilnost i spriječila oksidacija te postigao maksimalan učinak AA kao antioksidansa. Provedena je studija koja je ispitivala učinak inovativnog DNA aptamera "Aptamina C" koji se specifično veže na vitamin C i inhibira njegovu oksidaciju. Pokazalo se da DNA aptameri potencijalno produljuju rok trajanja i povećavaju učinkovitost takvih proizvoda odgađajući oksidaciju AA što bi moglo biti korisno kod razvoja novih proizvoda s AA (50). Provedena je jedna studija koja je ispitivala učinkovitost ATIP-a u kozmetičkim formulacijama. Rezultati studije su pokazali poboljšanje mikroreljefa kože povezanog s glatkoćom kože kod volontera koji su koristili formulaciju s 1% ATIP za razliku od placeba (46). Studija AA kao nano vezikularnog spanlastika pokazala je značajnu sposobnost prodiranja kroz kožu i povećanje elastičnosti kože (51). U većini studija AA se pokazala najboljim izborom za topikalnu primjenu

unatoč svojoj nestabilnosti te se čini da bi AA trebala biti u slobodnom obliku i biti stabilna da bi bila biološki aktivna (43). Za razvoj kozmetičkih proizvoda važne su usporedne studije učinka i stabilnosti AA s drugim oblicima vitamina C koje se provode s ciljem pronalaska najučinkovitijeg i najsigurnijeg oblika primjene vitamina C. Provedena je studija koja je napravila usporednu procjenu učinkovitosti različitih formulacija vitamina C. Usporedba formulacije koje sadrži 5% SAP i formulacije s AA pokazala je skoro podjednako poboljšanje u elastičnosti i izgledu bora na koži. Nije uočena statistički značajna razlika u djelotvornosti formulacije. Ova studija je pokazala važnost dodatka natrijevog metabisulfata (SBM) kao antioksidansa i konzervansa u svrhu još bolje stabilnosti pripravka (52).

Na tržištu postoje brojni različiti topikalni pripravci s vitaminom C. U postizanju bolje učinkovitosti kombiniraju se s drugim aktivnim tvarima sintetskog ili prirodnog porijekla. Optimalna koncentracija ovisi o tome koji se oblik vitamina C koristi (33). Pronađeno je devet studija koje su istraživale anti-age djelovanje vitamina C u kombinaciji s drugim aktivnim tvarima bilo sintetskog ili prirodnog podrijetla. Osim AA u ovim studijama je istraživano djelovanje i drugih oblika vitamina C: AA-2G, ATIP i THDA. Uključene su kombinacije vitamina C s jednom ili više aktivnih tvari. Pronađeno je da uporaba kombinacije AA-2G s 4-heksil-1,3-fenilendiolum, koji je inhibitor NF-kB, predstavlja učinkovitu i sigurnu metodu lokalnog anti-aginga (53). Osim toga, studija koja je ispitivala djelovanje kreme koja sadrži TGF- β (1), AA i ekstrakt cimicifuge je pokazala značajno poboljšanje u smanjenju bora. Pretpostavka je da AA u kombinaciji s faktorom rasta ima sinergistički učinak jer je AA kofaktor u biosintezi kolagena, a faktori rasta stimuliraju biosintezu kolagena (54). Lokalna primjena kreme s vitaminom C i madekosamidom dovela je do funkcionalnog i strukturnog preoblikovanja

fotoostarjele kože. U ovoj studiji se pokazala povezanost obje aktivne tvari, ali ostaje nerazjašnjeno jel imaju sinergistički ili aditivan učinak (55). U studijama koje su ispitivale učinkovitost i sigurnost NFS-a za lice s melatoninom, bakuchiolom i ATIP povoljno su ocijenjeni učinkovitost, kozmetička svojstva seruma i dobra podnošljivost na svim tipovima kože uključujući masnu kožu. NFS je pokazao dobre učinke protiv starenja kože i dobru podnošljivost (56). Rezultati su pokazali i veliko poboljšanje: teksture kože, tonusa, tena, linija i bora, pigmentacije i eritema. Jako su se smanjile bore, hiperpigmentacije i fotooštećenja. NFS je pokazao klinički i statistički značajne učinke na znakove starenja kože nakon 12 tjedana, ali su bili izraženiji nakon 24 tjedna (57). Ispitivanje učinka kombinacije vitamina C, vitamina E i ekstrakta kulture lišća maline pokazalo je da nakon završenog tretmana koža je svjetlije boje, sjajnija i veće elastičnosti u odnosu na kontrolnu stranu. Glatkoća, ljuskavost i bore su pokazali bitno poboljšanje, a pripravak je bio dobre podnošljivosti uz minimalne nuspojave (58). Studija pripravka s 10% AA i 7% THDA u bezvodnoj polislikonskoj gel bazi pokazala je da navedena kombinacija povećava količinu kolagena u papilarnom dermisu te dovodi do smanjenja bora (59). Serum CE-GTP (sadrži vitamin C, E i polifenole iz zelenog čaja) pokazao se sigurnim i učinkovitim. Kombinacija sastojaka je pokazala sinergističko djelovanje na parametre starenja kože (60). I anti-age hidratantna krema koja je sadržavala ekstrakt korijena astragalusa, peptide, ursolnu kiselinu, THDA i ubikinon pokazala je jako dobru učinkovitost i podnošljivost (61).

Navedene studije otvaraju nove mogućnosti poboljšanja upotrebe vitamina C. Kombinacijom s drugim aktivnim tvarima bilo sintetskog ili prirodnog podrijetla može se postići značajniji učinak vitamina C u procesu starenja kože. Pri tome se ne misli samo na poboljšanje same djelotvornosti

vitamina C već i poboljšanje njegove stabilnosti i sigurnosti primjene. Potrebne su još mnoge dobro kreirane studije u tu svrhu.

5. ZAKLJUČAK

Vitamin C je pokazao bitan učinak u procesu starenja kože. Dostupne kliničke studije su pokazale djelotvornost topikalne primjene vitamina C u smanjenju vidljivih promjena na koži lica koje su rezultat starenja kože. Većina studija je pokazala ulogu vitamina C u biosintezi kolagena, djelovanju kao antioksidansa, njegov utjecaj u povećanju gustoće kožnih papila i poboljšanju elastičnosti kože. Studije su pokazale i vidne promjene u povećanju gustoće kožnog mikroreljefa i smanjenju dubokih brazda. Dokazano je smanjenje vidljivosti bora, svjetliji i ujednačeniji ten lica, glatkoća kože i povećanje hidratacije. Studije u kojima se kemijskom modifikacijom vitamina C nastojala postići povećana stabilnost ukazuju na to da je nemodificirana AA najbolji oblik zbog veće učinkovitosti. Studije su pokazale da dodatak drugih aktivnih tvari bilo sintetskog ili prirodnog porijekla kao i inovativni farmaceutski oblici mogu osigurati stabilnost AA uz očuvanje učinkovitosti. Potrebne su dodatne studije da bi se istražila najbolja inovativna rješenja topikalne primjene vitamina C u cilju postizanja što bolje učinkovitosti, sigurnosti primjene i stabilnosti.

6. LITERATURA

1. Dabrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol.* 2018 May; 24 (2):165-174.
2. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. PMID: 29262154.
3. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* Jan-Feb 2014; 32 (1):3-13.
4. Marinović B. U: Basta-Juzbašić A. *Dermatovenerologija.* Zagreb, Medicinska naklada, 2014, 6-10.
5. Makrantonaki E, Zouboulis CC. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN - 2). *Exp Gerontol.* 2007; 42:879-886.
6. Has C, Nyström A. Epidermal Basement Membrane in Health and Disease. *Curr Top Membr.* 2015; 76:117-70.
7. Woodley DT. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol Clin.* 2017; 35 (1):95-100.
8. Magnus D Lynch, Fiona M Watt. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest* 2018; 128 (1):26-35.
9. Alexandra L. Rippa, Ekaterina P. Kalabusheva, Ekaterina A. Vorotelyak. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involve. *Cells.* 2019; 8 (6):607.

10. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jan 1; 3 (1) Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011; 3(1).
11. Kadler KE. Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol.* 2017; 98 (1):4-16.
12. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; 55 (12):1531-1546.
13. Leslie Baumann, Eric F Bernstein, Anthony S Weiss i sur. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet Surg J Open Forum.* 2021 Sep; 3(3).
14. Mukti Singh, Mark Becker, Alan R. F. Godwin, Clair Baldock. Structural studies of elastic fibre and microfibrillar proteins. *Matrix Biol Plus.* 2021 Dec; 12: 100078.
15. Andrea Heinz. Elastic fibers during aging and disease. *Ageing Res Rev.* 2021 Mar; 66:101255.
16. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage.* 2006; 52 (9): 25-35.
17. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci.* 2008; 30 (2):87-95.
18. Hilary Bonifant , Samantha Holloway. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *Br J Community Nurs* 2019; 24 (Sup3):S28-S33.
19. Baumann L. Skin ageing and its treatment, *J Pathol.* 2007 Jan, 211 (2) 241-51.
20. Sjerobabski-Masnec I, Šitum M. Skin aging. *Acta Clin Croat.* 2010 Dec, 49(4):515-8.
21. Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol.* 2011; 29 (1):3-14.

22. Wendy E Roberts. Skin type classification systems old and new. *Dermatol Clin*. 2009 Oct; 27 (4):529-33.
23. T B Fitzpatrick. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun; 124 (6):869-71.
24. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M i sur. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:8416763. doi:10. 1155/2017/8416763.
25. Shoubing Zhang, Enkui Duan. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. 2018 May; 27 (5): 729–738.
26. Pumori Saokar Telang. Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatol Online J*. 2013; 4 (2): 143–146.
27. Carpenter, K. J. The Discovery of Vitamin C. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012; 61 (3), 259–264.
28. Amanda Costa Caritá, Bruno Fonseca-Santos, Jemima Daniela Shultz, Bozena Michniak-Kohn, Marlus Chorilli, Gislaïne Ricci Leonardi. Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine* 2020; 24:102117.
29. Barrita J. L. S, Sanchez M. S. S. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants, Morales-Gonzales J. A. (Ed.), in *Tech*; 2013, DOI: 10. 5772/52181.
30. Soledad Ravetti, Camila Clemente, Sofia Brignone, Lisandro Hergert , Daniel Allemandi, Santiago Palma. Ascorbic Acid in Skin Health. *Cosmetics* 2019; 6 (4), 58.
31. Amanda K. Schlueter, Carol S. Johnston. Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2011; 16 (1) 49-57.

32. Juan Du, Joseph J. Cullen, and Garry R. Buettner. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826 (2): 443–457.
33. Farris PK. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions, *Dermatolog Surg*. 2005 Jul; 31 (7 Pt 2) 814-7.
34. Sauermann K, Jaspers S, Koop U, Wenck H. Topically applied vitamin C increases the density of dermal papillae in aged human skin. *BMC Dermatol*. 2004 Sep 29, 4 (1) 13.
35. Juliet M. Pullar, Anitra C. Carr, Margreet C. M. Vissers. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*. 2017 Aug; 9 (8): 866.
36. Gašperlin M. ,Gosenca M. Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011 Jul 8 (7), 905–919.
37. Kaiqin Wang, Hui Jiang, Wenshuang Li, Mingyue Qiang, Tianxiang Dong, Hongbin Li. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front Physiol*. 2018; 9: 819.
38. Firas Al-Niaimi, Nicole Yi Zhen Chiang. Topical Vitamin C and the Skin: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2017 Jul; 10 (7): 14–17.
39. Stamford NP. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives, *J Cosmet Dermatol*. 2012 Dec 11 (4) 310-7.
40. Raschke T, Koop U, Düsing HJ, Filbry A, Sauermann K, Jaspers S, Wenck H, Wittern KP. Topical activity of ascorbic acid: from in vitro optimization to in vivo efficacy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004 Jul-Aug 17 (4) 200-6.
41. Humbert PG, Haftek M, Creidi P, Lapière C, Nusgens B, Richard A, Schmitt D, Rougier A, Zahouani H. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo, *Exp Dermatol*. 2003 Jun 12 (3) 237-44.

42. B V Nusgens, P Humbert, A Rougier, A Richard, C M Lapière. Stimulation of collagen biosynthesis by topically applied vitamin C. *Eur J Dermatol.* Jul-Aug 2002; 12 (4):XXXII-XXXIV.
43. H Zahouani , A Rougier, P Creidi, A Richard, P Humbert. Interest of a 5% vitamin C w/o emulsion in the treatment of skin aging: effects on skin relief. *Eur J Dermatol.* Jul-Aug 2002; 12 (4):XXIII-XXVI.
44. B V Nusgens , P Humbert, A Rougier, A C Colige, M Haftek, C A Lambert, A Richard, P Creidi, C M Lapière. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol.* 2001 Jun; 116 (6):853-9.
45. S S Traikovich. Use of topical ascorbic acid and its effects on photodamaged skin topography. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Oct; 125 (10):1091-8.
46. Patrícia M B G Maia Campos , Mirela D Gianeti, Flávio B Camargo Jr, Lorena R Gaspar. Application of tetra-isopalmitoyl ascorbic acid in cosmetic formulations: stability studies and in vivo efficacy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 Nov; 82 (3):580-6.
47. Malwina Zasada , Agata Markiewicz , Zuzanna Drożdż , Paula Mosińska , Anna Erkiert-Polguj , Elżbieta Budzisz . Preliminary randomized controlled trial of antiaging effects of l-ascorbic acid applied in combination with no-needle and microneedle mesotherapy. *J Cosmet Dermatol.* 2019 Jun; 18 (3):843-849.
48. C Lee , H Yang , S Kim , M Kim, H Kang , N Kim , S An , J Koh , H Jung. Evaluation of the anti-wrinkle effect of an ascorbic acid-loaded dissolving microneedle patch via a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int J Cosmet Sci.* 2016 Aug; 38 (4):375-81.

49. M Kim, H Yang, H Kim, H Jung, H Jung. Novel cosmetic patches for wrinkle improvement: retinyl retinoate- and ascorbic acid-loaded dissolving microneedles. *Int J Cosmet Sci.* 2014 Jun; 36 (3):207-12.
50. Sooho ChoiJeongmin Han , Ji Hyun Kim , A-Ru Kim , Sang-Heon Kim , Weontae Lee , Moon-Young Yoon , Gyuyoup Kim , Yoon-Seong Kim. Advances in dermatology using DNA aptamer "Aptamin C" innovation: Oxidative stress prevention and effect maximization of vitamin C through antioxidation. *J Cosmet Dermatol* 2020 Apr; 19 (4):970-976.
51. Elhabak M, Ibrahim S, Abouelatta SM. Topical delivery of l-ascorbic acid spanlastics for stability enhancement and treatment of UVB induced damaged skin. *Drug Deliv.* 2021 Dec; 28 (1):445-453.
52. Shima Mohammadi , Javad Shokri , Mohammadreza Ranjkesh, Shahabaddin Akbari Hamed , Farnaz Monajjemzadeh. Comparative physicochemical stability and clinical anti-wrinkle efficacy of transdermal emulgel preparations of 5% sodium ascorbyl phosphate and or ascorbic acid on human volunteers. *J Cosmet Dermatol.* 2021 Jan; 20 (1):174-180.
53. Romain Roure, Virginie Nollent, Liliane Dayan, Etienne Camel, Christiane Bertin. A Double-Blind, 12-Week Study to Evaluate the Antiaging Efficacy of a Cream Containing the NFκB Inhibitor 4-Hexyl-1, 3-Phenylenediol and Ascorbic Acid-2 Glucoside in Adult Females. *J Drugs Dermatol.* 2016 Jun 1;15 (6):750-8.
54. Michelle Ehrlich , Jaggi Rao, Anju Pabby, Mitchel P Goldman. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor beta (1) and l-ascorbic acid. *Dermatol Surg.* 2006 May; 32 (5):618-25.
55. Marek Haftek , Sophie Mac-Mary, Marie-Aude Le Bitoux, Pierre Creidi, Sophie Seité, André Rougier, Philippe Humbert. Clinical, biometric and structural evaluation of the long-

- term effects of a topical treatment with ascorbic acid and madecassoside in photoaged human skin. *Exp Dermatol*. 2008 Nov; 17 (11):946-52.
56. David J Goldberg , Deanne Mraz Robinson , Corinne Granger. Clinical evidence of the efficacy and safety of a new 3-in-1 anti-aging topical night serum-in-oil containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate: 103 females treated from 28 to 84 days. *J Cosmet Dermatol*. 2019 Jun; 18 (3):806-814.
57. David J Goldberg , Deanne Mraz-Robinson, Corinne Granger. Efficacy and safety of a 3-in-1 antiaging night facial serum containing melatonin, bakuchiol, and ascorbyl tetraisopalmitate through clinical and histological analysis. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Apr; 19 (4):884-890.
58. Pattarawan Rattanawiwatpong , Rungsima Wanitphakdeedecha , Akkarach Bumrungpert , Mart Maiprasert. Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Mar; 19 (3):671-676.
59. Richard E Fitzpatrick, Elizabeth F Rostan. Double-blind, half-face study comparing topical vitamin C and vehicle for rejuvenation of photodamage. *Dermatol Surg*. 2002 Mar; 28 (3):231-6.
60. Jared Jagdeo, Alana Kurtti, Steve Hernandez, Nicole Akers, Scott Peterson. Novel Vitamin C and E and Green Tea Polyphenols Combination Serum Improves Photoaged Facial Skin. *J Drugs Dermatol*. 2021 Sep 1; 20 (9):996-1003.
61. James H Herndon Jr, Lily Jiang, Tatiana Kononov, Theresa Fox. An Open Label Clinical Trial of a Multi-Ingredient Anti-Aging Moisturizer Designed to Improve the Appearance of Facial Skin. *J Drugs Dermatol*. 2015 Jul; 14 (7):699-704.

