

# Hidratacija i epidermalna barijera

---

Rončević, Marijana

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:980546>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

**Marijana Rončević**

**HIDRATACIJA I EPIDERMALNA BARIJERA**

**Specijalistički rad**

**Zagreb, 2021.**

PSS studij: Dermatofarmacija i kozmetologija

Mentor: prof. dr. sc. Jelena Filipović Grčić

Specijalistički rad obranjen je dana 13.05.202. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Jelena Filipović Grčić
  2. izv. prof. dr. sc. Ivan Pepić
  3. doc. dr. sc. Ines Sjerobabski Masnec, prim. dr. med.
- Rad ima 63 lista.

## PREDGOVOR

Ovaj rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Dermatofarmacije i kozmetologije pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jelene Filipović-Grčić. Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na stručnoj pomoći i korisnim savjetima pri izradi ovog specijalističkog rada. Zahvaljujem se obitelji i kolegama na razumijevanju i podršci tijekom ostvarivanja ovog cilja.

# SAŽETAK

**Cilj istraživanja** Odgovarajuća razina hidratacije rožnatog sloja epidermisa, bitna je za izgled i funkciju kože odnosno za strukturni integritet i funkcionalnost zaštitne epidermalne barijere. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povećava li se hidratacija rožnatog sloja kod osoba sa suhom kožom nakon kratkotrajne primjene hidratantne kozmetičke formulacije koja u svom sastavu ima hijaluronsku kiselinu, ceramide, hladno prešana biljna ulja i glicerol.

**Materijal/Ispitanici i metode** Hidratantna kozmetička formulacija koja se koristila u ovoj kratkoročnoj studiji hidratacije izrađena je u Gradskoj ljekarni Zagreb, Trg žrtava fašizma 8. S obzirom na sastav, hidratantna kozmetička formulacija je U/V emulzija koja sadrži glicerol, natrijev hijaluronat, ceramide i hladno prešana biljna ulja, u kojoj dominantnu, vodenu fazu čine pročišćena voda i hidrolat nerolija (cvjetova gorke naranče).

Kratkoročna studija hidratacije provedena je na 15 ispitanika s normalnom do suhom kožom i rasponom dobi od 20-45 godina, nakon što su dali svoj pisani pristanak. Istraživanje je provedeno u ljekarničkoj jedinici 02, Trg žrtava fašizma 8, Gradske ljekarne Zagreb pomoću uređaja za analizu kože Multiskin Test Center MC 1000 ("Courage+Khazaka electronic GmbH", Köln, Njemačka), sa sondama koje mjere hidrataciju kože (korneometar) i transepidermalni gubitak vode.

Mjerenja su provedena na središnjem dijelu unutarnje strane podlaktice gdje je prethodno primijenjena hidratantna kozmetička formulacija i na gornjem dijelu podlaktice na koje nije primijenjena kozmetička formulacija te koje je služilo kao kontrola.

Parametri hidratacije i transepidermalnog gubitka vode mjereni su neposredno prije, i u vremenima 1, 3 i 6 sati nakon primjene kozmetičke formulacije. Kako su izabrani ispitanici bili u kategoriji ispitanika s normalnom do suhom kožom, transepidermalni gubitak vode mjereno je kao pokazatelj barijerne funkcije kože i kod svih je ispitanika pokazivao niske vrijednosti kao što je i bilo očekivano.

**Rezultati** Rezultati ove kratkoročne hidratacijske studije pokazali su kako primjenom hidratantne kozmetičke formulacije koja sadrži glicerol, natrijev hijaluronat, ceramide i hladno prešana biljna ulja dolazi do povećanja hidratacije rožnatog sloja epidermisa kod osoba sa normalnom do suhom kožom, uz blago smanjenje transepidermalnog gubitka vode.

**Zaključak** Odabir odgovarajuće kozmetičke formulacije važan je za dobar izgled i zdravlje kože. Najbolja hidratantna kozmetička formulacija je ona koja odgovara sklonostima i specifičnim potrebama pojedinog korisnika što će potaknuti njezinu redovitu primjenu (adherenciju), a samim tim i djelovanje. S obzirom na stanje i tip kože, ljekarnici su ti koji svojim stručnim znanjem mogu kreirati odgovarajuće kozmetičke formulacije za specifične potrebe svojih korisnika.

# SUMMARY

**Objectives** Adequate level of hydration of the stratum corneum is of the most importance for the appearance and function of the skin, i.e. for the structural integrity and functionality of the protective epidermal barrier.

The aim of this study is to evaluate if the moisturizing cosmetic formulation containing hyaluronic acid, ceramides, cold-pressed vegetable oils and glycerol increases stratum corneum hydration in person with dry skin condition.

**Material/Patients and Methods** Moisturizing cosmetic formulation used in this short term hydration study was made in Zagreb City Pharmacy, in Trg žrtava fašizma 8 in Zagreb. This cosmetic formulation is O/W emulsion containing glycerol, sodium hyaluronate, ceramides, and cold-pressed vegetable oils where the dominant water phase is made of purified water and neroli flower water. This short term hydration study was conducted on 15 volunteers with normal or dry skin with age range from 20-45 years after they gave their signed informed consent. Research has been conducted in Zagreb City Pharmacy, in Trg žrtava fašizma 8 in Zagreb using a skin tester Multi Skin Test Center MC 1000 ("Courage+Khazaka electronic GmbH", Köln, Germany), with probes that measure skin hydration (corneometer) and transepidermal water loss. Measurements were performed by applying the formulation to the central part of the inner side of the forearm with a control site in the upper, forearm portion to which the tested cosmetic formulation has not been applied. The hydration and transepidermal water loss parameters were measured immediately before, and then 1, 3 and 6 hours after application of the formulation. Transepidermal water loss was measured only to evaluate skin barrier function and since all subjects were in the category of subjects with normal to dry skin, it showed low values as expected.

**Results** of this short-term hydration study showed that the application of a moisturizing cosmetic formulation that contains glycerol, sodium hyaluronate, ceramides, and cold-pressed vegetable oils increased stratum corneum hydration with a slight decrease in transepidermal water loss.

**Conclusion** Choosing the right cosmetic formulation is important for skin health and good appearance. The best moisturizing cosmetic formulation is the one that corresponds to the preferences and specific needs of an individual user, which will encourage its regular application. Depending on the skin condition, pharmacists are the ones who, with their expert knowledge, can create appropriate cosmetic formulations for the specific needs of their patients.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
<b>1.1. Građa i funkcija kože</b> .....	1
1.1.1. Rožnati sloj i diferencijacija keratinocita.....	2
1.1.2. Strukturne komponente epidermalne barijere.....	3
1.1.2.1. Korneociti-keratinizacija i kornifikacija.....	3
1.1.2.2. Lipidi rožnatog sloja.....	5
1.1.2.2.1. Lipidni sastav rožnatog sloja.....	5
1.1.2.2.2. Lamelarna i lateralna organizacija lipida.....	6
1.1.2.2.3. Novi molekularni modeli organizacije lipida i sebacealni lipidi.....	8
1.1.3. Epidermalna barijera.....	9
1.1.4. Deskvamacija i proteolitička razgradnja korneodezmosoma.....	10
1.1.4.1. Deskvamacija.....	10
1.1.4.2. Proteolitička razgradnja i regulacija deskvamacije.....	11
<b>1.2. Hidratacija kože</b> .....	13
1.2.1. Hidratacija rožnatog sloja kože.....	13
1.2.2. Prirodni faktori vlažnosti (NMF).....	14
1.2.3. Uloga korneocita i intercelularnog lipidnog matriksa u hidrataciji kože.....	15
1.2.4. Slobodna i vezana voda u rožnatom sloju kože.....	16
1.2.5. Najnovije spoznaje o mehanizmima hidratacije kože.....	17
<b>1.3. Hidratantne dermatokozmetičke formulacije; ovlaživači (engl. moisturizers)</b> .....	18
1.3.1. Definicija dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože.....	18
1.3.2. Karakteristike suhe kože.....	18
1.3.3. Funkcionalni sastojci dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože.....	19
1.3.3.1. Humektansi.....	19
1.3.3.2. Okluzivi.....	20
1.3.3.3. Emolijensi.....	20
1.3.4. Karakterizacija i vrste dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože.....	21
1.3.5. Djelovanje dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože.....	23
1.3.6. Primjena dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kod normalne kože.....	25
1.3.7. Neželjene reakcije.....	25
1.3.8. Idealna hidratantna dermatokozmetička formulacija.....	25
<b>1.4. Hidratacijske studije ovlaživača</b> .....	26
1.4.1. Mjerenje hidratacije i transepidermalnog gubitka vode.....	26
1.4.2. Opće smjernice za hidratacijske studije.....	26
1.4.3. Hidratacijske studije.....	27

<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	28
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	29
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	29
3.1.1. Sastav hidratantne kozmetičke formulacije.....	29
3.1.2. Postupak izrade hidratantne kozmetičke formulacije.....	34
<b>3.2. METODE</b> .....	35
3.2.1. Opis provedenog istraživanja.....	35
3.2.2. Etičko odobrenje i suglasnost ispitanika za sudjelovanje.....	35
3.2.3. Aparatura.....	36
3.2.3.1. Korneometar.....	37
3.2.3.2. Sonda za mjerenje transepidermalnog gubitka vode; TEWL-a.....	39
<b>4. REZULTATI</b> .....	41
<b>5. RASPRAVA</b> .....	47
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	49
<b>7. LITERATURA</b> .....	50
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	56



# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. GRAĐA I FUNKCIJA KOŽE

Koža (lat.cutis) je najveći organ ljudskog tijela na koju otpada oko 16 % ukupne tjelesne težine. Najvažnija uloga kože je **zaštitna uloga**, ona štiti ljudsko tijelo od štetnih vanjskih utjecaja i sprječava gubitak vode, elektrolita i ostalih tvari iz ljudskog organizma u okoliš.

Ta najvažnija funkcija kože, **barijerna funkcija**, zasluga je površinskog sloja kože, tzv. **rožnatog sloja** (Stratum corneum; SC).

Koža ima i važnu ulogu kao osjetilni organ, imunološku ulogu na način da sprječava ulazak patogenih mikroorganizama, važnu ulogu u regulaciji tjelesne temperature i sintezi vitamina D (1). Ljudska koža je građena od tri funkcionalna dijela: hipodermisa (potkožno masno tkivo), dermisa (vezivno tkivo građeno od fibroblasta uronjenih u matriks kolagenskih i elastinskih vlakana) i epidermisa (2).

**Epidermis** je vanjski sloj kože, debljine 50-100 µm, građen od 5 različitih slojeva epidermalnih stanica- temeljnog sloja (Stratum basale; SB), trnastog ili nazubljenog sloja (Stratum spinosum; SS), zrnatog sloja (Stratum granulosum; SG), svijetlog sloja (Stratum lucidum; SL, prisutan samo na mjestim gdje je koža najdeblja, kao što su dlanovi i tabani) i rožnatog sloja (Stratum corneum; SC) (2, 5).

Zrnati sloj (S. granulosum), vijabilni je sloj epidermisa građen od svega nekoliko slojeva epidermalnih stanica u kojem se odvijaju ključne reakcije koje dovode do stvaranja rožnatog sloja i epidermalne barijere (1).

Najbrojnije epidermalne stanice su **keratinociti** koje procesom terminalne diferencijacije prelaze u **korneocite** prema kojima je površinski sloj kože i dobio ime (3).

Keratinociti u epidermisu prolaze čitav niz strukturnih i morfoloških promjena te terminalnom diferencijacijom, na granici zrnatog i rožnatog sloja, prelaze u korneocite (4).

Temeljni, trnasti i zrnati sloj (50-100 µm) dio su vijabilnog epidermisa, dok je rožnati sloj (10-20 µm) dio nevijabilnog epidermisa i njegov konačni diferencijacijski produkt (5).

Epidermis je kontinuirano obnavljajući, keratinizirani, skvamozni višeslojni epitel (6, 7).

U epidermisu, osim keratinocita postoje još i drugi tipovi epidermalnih stanica kao što su melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice.

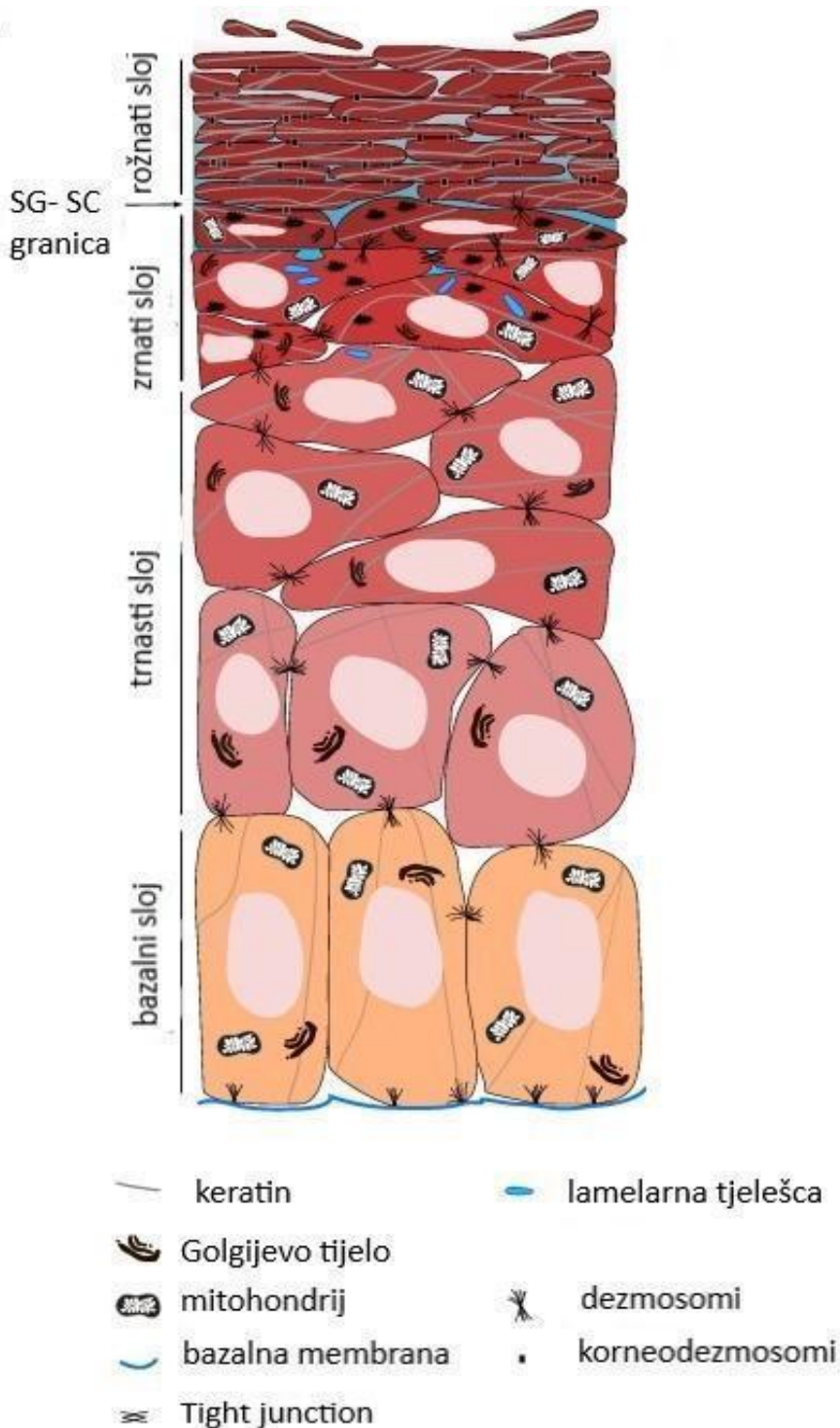
Melanociti su stanice pigmentnog sustava odgovorne za sintezu melanina i zaštitu stanica od djelovanja ultraljubičastog (UV) zračenja, Langerhansove su stanice odgovorne za imunološku funkciju kože dok su Merkelove stanice dio perifernog živčanog sustava koje djeluju kao osjetilni receptori. (1, 7).

### 1.1.1. ROŽNATI SLOJ I DIFERENCIJACIJA KERATINOCITA

Diferencijacija keratinocita predstavlja skup složenih strukturnih i morfoloških promjena keratinocita koje se odvijaju prilikom pomicanja keratinocita kroz različite slojeve epidermisa prema površini kože.

Stanice temeljnog sloja odgovorne su za kontinuirano obnavljanje epidermisa, samo ih je 15 % aktivno uključeno u proces, ostatak stanica nalazi se u stanju mirovanja. Aktiviraju se u stanjima kao što su različite ozljede kože kad je potrebna njena intenzivna obnova pa je povećana proliferacija keratinocita. U temeljnom sloju epidermisa, stanice koje se nalaze uz bazalnu

membranu intenzivno se dijele, dolazi do proliferacije keratinocita u temeljnom sloju koji potom prolaze proces diferencijacije i migracije prema površini kože. Različiti slojevi epidermisa predstavljaju različite stadije diferencijacije keratinocita koji tokom procesa diferencijacije prolaze čitav niz strukturnih i funkcionalnih promjena (6). Kako bi se održala stalna debljina rožnatog sloja, korneociti se ljušte s površine kože. Taj je proces u zdravom epidermisu nevidljiv, svakog dana se barem jedan sloj korneocita ljušti s površine kože i zamjenjuje novim slojem keratinocita u zrnatom sloju (1). U zdravom epidermisu postoji fina ravnoteža između procesa proliferacije i ljuštenja korneocita s površine kože pa se epidermis potpuno obnovi svakih 28 dana (6).



Slika 1. Shematski prikaz epidermisa i diferencijacije keratinocita. Prilagođeno prema (8)

**Rožnati sloj (Stratum corneum, SC)**, površinski je sloj kože, debljine 10-20 µm, građen u prosjeku od 10-25 slojeva mrtvih stanica, korneocita, promjera oko 25 µm, debljine 0.5-1 µm. Korneociti su mrtve stanice bez jezgre, orijentirane paralelno površini kože, karakterističnog, plosnatog oblika čija je unutrašnjost ispunjena vodom i mrežom keratinskih vlakana (1, 5). Rožnati sloj nastaje strogo kontroliranim procesom **orožavanja** ili **keratinizacije** i predstavlja konačan produkt terminalne diferencijacije keratinocita (8). Rožnati sloj kože, osim korneocita, čini i intercelularni lipidni matriks pa se u literaturi često njegova struktura uspoređuje sa tzv. ciglenim zidom (engl. The Bricks and mortar model), gdje pojednostavljeno, korneociti predstavljaju cigle, a intercelularni lipidi, raspoređeni kao visoko uređeni multilamelarni lipidni dvosloji, predstavljaju vezivni materijal (9). Iako na lipide otpada tek 15 % suhe tvari rožnatog sloja epidermisa, intercelularni lipidni matriks ima ključnu ulogu u barijernoj funkciji kože i predstavlja glavni put prolasku tvari kroz kožu (2).

## 1.1.2. STRUKTURNE KOMPONENTE EPIDERMALNE BARIJERE

### 1.1.2.1. KORNEOCITI – keratinizacija i kornifikacija (orožavanje)

Korneociti su mrtve stanice bez jezgre, karakterističnog plosnatog oblika, ispunjene vodom i mrežom keratinskih vlakana (5).

**Keratin** je glavni strukturni protein epidermisa i čini oko 80 % proteinske mase epidermisa. Sintetizira se u keratinocitima, proteže kroz staničnu citoplazmu keratinocita kao mreža keratinskih intermedijarnih vlakana koja završavaju u dezmosomima, spojnim kompleksima koji povezuju susjedne epidermalne stanice.

Tokom diferencijacije keratinocita, djelovanjem filagrina, keratinska se intermedijarna vlakna raspoređuju u pravilne i zbijene nizove ili snopove što potiče kolaps stanica u karakterističan, plosnati oblik korneocita.

Keratinska vlakna daju mehaničku čvrstoću stanicama rožnatog sloja epidermisa (6).

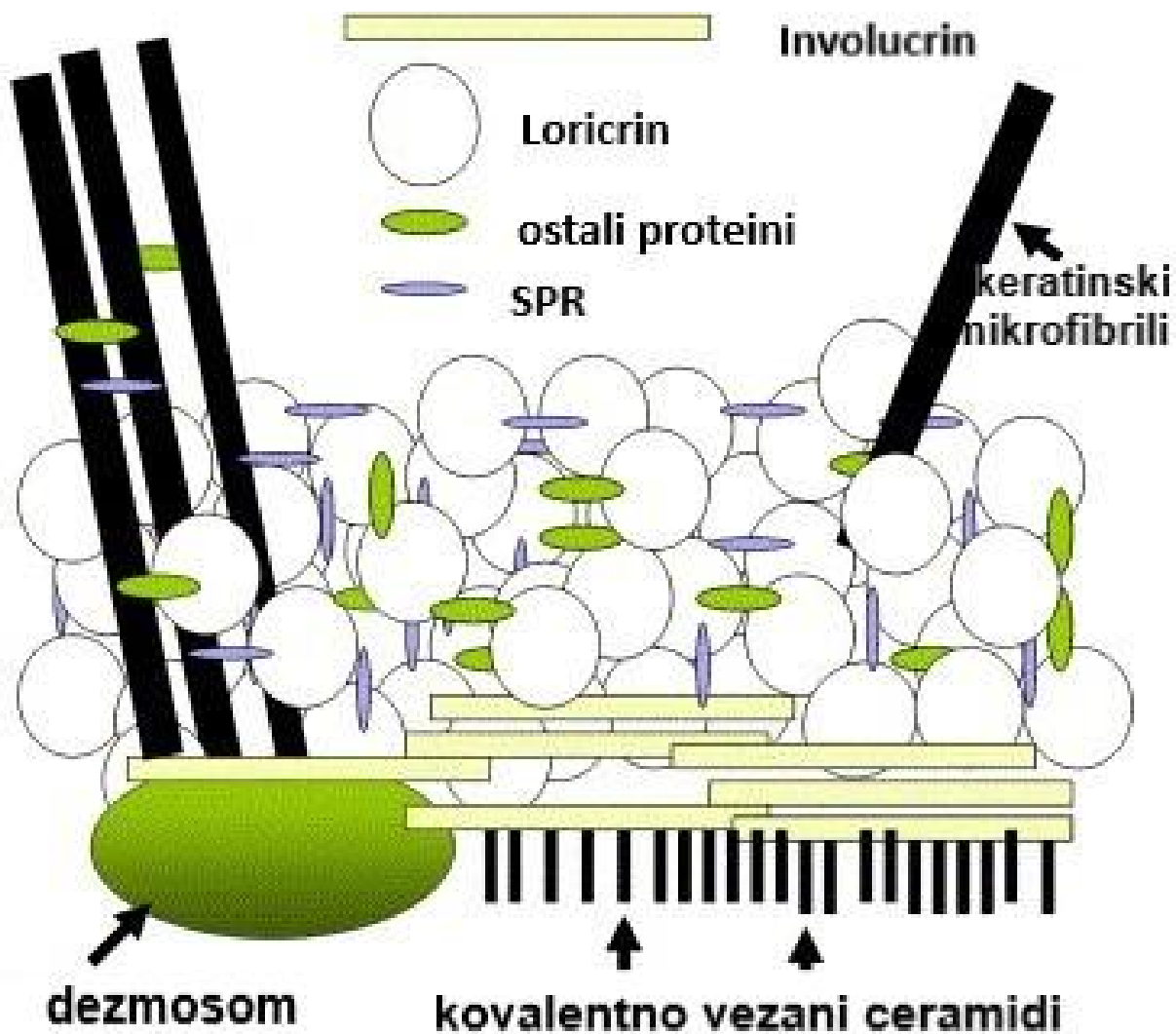
Kako je keratin uz vodu glavni građevni dio rožnatog sloja, a gotova se sva voda u rožnatom sloju (više od 90 %) nalazi unutar korneocita, za pretpostaviti je da i keratin ima važnu ulogu u održavanju hidratacije i elastičnosti rožnatog sloja te njegovoj sposobnosti da zadrži vodu (10).

Epidermalni keratinociti prolaze jedinstven oblik terminalne diferencijacije i programirane stanične smrti poznate kao **kornifikacija** ili orožavanje (8).

Keratinociti u vijabilnom epidermisu imaju karakterističnu fosfolipidnu staničnu membranu koja je odviše propusna da bi stanice preživjele i zadržale vodu pri izlaganju kože isušujućem djelovanju vanjskog okoliša. Zato se na granici zrnatog i rožnatog sloja odvija niz složenih promjena kojima se ta membrana u potpunosti zamjenjuje tzv. rožnatom ovojnicom (1).

Kornifikacija ili orožavanje je proces u kojem dolazi do zamjene cijelog unutar staničnog sadržaja proteinskim citoskeletom (keratinska intermedijarna vlakna), unakrsnog umrežavanja proteina i stvaranja orožene ovojnice te povezivanje korneocita u funkcionalnu, ali biološki mrtvu strukturu. Na prijelazu zrnatog u rožnati sloj epidermisa, keratinociti gube staničnu jezgru i organele, a njihova se stanična membrana zamjenjuje specifičnom strukturom koja se naziva **rožnata ovojnica korneocita** (engl. Corneocyte envelope; **CE**).

Rožnata ovojnica korneocita sastoji se od visoko unakrsno umreženih proteina sintetiziranih u zrnatom sloju epidermisa (8).



**Slika 2. Shematski prikaz rožnate ovojnice korneocita (engl. Corneocyte Envelope; CE)**  
Prilagođeno prema (1).

U trnastom sloju epidermisa, proteini- envoplakin, periplakin i involucrin nakupljaju se ispod stanične membrane i zatim unakrsno povezuju. Involucrin djeluje kao predložak za daljnje unakrsno umrežavanje proteina rožnate ovojnice, dok plakini predstavljaju vezna mjesta za keratinska intermedijarna vlakna koje povezuju sa dezmosomima. Na taj su način i dezmosomi i keratinska intermedijarna vlakna čvrsto vezana za rožnatu ovojnicu korneocita.

U zrnatom sloju epidermisa, loricrin i mali proteini bogati prolinom (engl. small proline-rich proteins; SPR) unakrsno se umrežavaju i ugrađuju u rožnatu ovojnicu na postojeći predložak involucrina. Kao rezultat tog umrežavanja, više od 80 % proteina rožnate ovojnice korneocita otpada upravo na loricrin (11).

Umrežavanje omogućava enzim **transglutaminaza** koji stvara kovalentne veze između glutaminskih i lizinskih ostataka. Izopeptidna veza nastala djelovanjem ovog enzima, izrazito je kemijski stabilna što rožnatom sloju daje koheziju i otpornost (12).

Rožnata ovojnica korneocita, gusta je i visoko umrežena, složena proteinska struktura debljine 15-20 nm, od čega 15 nm otpada na proteine, 5 nm na lipide.

Pojednostavljeno, korneociti se mogu promatrati kao netopljivi, proteinski kompleksi ispunjeni visoko organiziranim mikrofibrilarnim keratinskim matriksom obavijeni proteinskom ovojnicom (13).

Istodobno se monosloj izrazito dugolančanih omega-hidroksi ceramida koji se luči iz lamelarnih tjelešaca unakrsno umrežava i veže za plazmatsku membranu korneocita. Unakrsno umrežavanje s proteinima rožnate ovojnice odvija se kovalentnim vezanjem na glutaminske ostatke involucrina rožnate ovojnice korneocita.

Monosloj dugolančanih, omega-hidroksi ceramida naziva se **lipidnom ovojnicom korneocita** (engl. Corneocyte-bound lipid envelope; CLE).

Omega-hidroksi ceramidi kao monosloj pokrivaju cijelu površinu korneocita i služe kao predložak prema kojem se u izvanstaničnom prostoru korneocita raspoređuju lipidi i organiziraju u multilamelarne lipidne dvosloje intercelularnog lipidnog matriksa (14).

Lipidna ovojnica (CLE) predstavlja sučelje između hidrofilnih keratinocita i lipofilnih multilamelarnih lipidnih slojeva kojima su okruženi korneociti (4).

Rožnata ovojnica korneocita ima vrlo gustu strukturu pa je praktički nepropusna za većinu difundirajućih tvari. Glavni put prolasku tvari kroz rožnati sloj kože predstavljaju intercelularni lipidi organizirani u lamelarne lipidne dvosloje (2, 4).

## 1.1.2.2. LIPIDI ROŽNATOG SLOJA

### 1.1.2.2.1. Lipidni sastav rožnatog sloja

Rožnati sloj epidermisa ima jedinstven lipidni sastav kojeg čine ekvimolarne mješavine ceramida (50 %), kolesterola (25 %) i slobodnih masnih kiselina (15 %).

Lipidi se u prostor između korneocita luče pomoću lamelarnih tjelešaca, malih sekretornih organela (engl. lamellar body, Odland bodies, keratinosomes, cementosomes; LB), ovalnog oblika, promjera oko 0,2-0,3 μm, karakterističnih za keratinocite epidermisa (9, 15).

Istodobno sa sazrijevanjem korneocita i stvaranjem rožnate ovojnice, na prijelazu zrnatog u rožnati sloj epidermisa, lamelarna tjelešca izlučuju lipide u izvanstanični prostor između korneocita.

Lipidi u lamelarnim tjelešcima prekursori su ekstracelularnih lipida rožnatog sloja, a čine ih **fosfolipidi, glukozilceramidi, sfingomijelin i kolesterol**.

Lamelarna tjelešca izlučuju prekursore lipida ekstracelularnog lipidnog matriksa epidermisa zajedno sa enzimima potrebnim za njihovu daljnju pretvorbu, lipidnim hidrolazama.

Beta glukocerebrozidaza pretvara glukozil-ceramide u ceramide, sfingomijelinaza pretvara sfingomijeline u ceramide, enzimi fosfolipaze pretvaraju fosfolipide u glicerol i slobodne masne kiseline (15).

**Ceramidi** su najzastupljeniji lipidi (50 %) u rožnatom sloju epidermisa i imaju važnu ulogu u održavanju barijerne funkcije kože.

Ceramidi su složena, heterogena skupina spojeva, po kemijskom sastavu sfingolipidi kod kojih je dugolančana sfingoidna baza amidnom vezom povezana za dugolančanu masnu kiselinu.

U rožnatom sloju epidermisa otkriveno je najmanje 12 različitih klasa ceramida (engl. ceramides; CER) koji se međusobno razlikuju prema prirodi sfingoidne baze: dihidrosfingozin (dS), sfingozin (S), fitosfingozin (P) i 6 hidroksi-sfingozin (H) i stupnju hidroksilacije acilnog lanca dugolančane masne kiseline koja može biti nehidroksilirana (N), α- hidroksi masna kiselina (A) ili esterificirana, ω- hidroksi masna kiselina (EO) (16).

**Acilceramidi** CER (EOS), CER(EOP), CER (EOH) imaju jedinstvenu strukturu jer sadrže **linolensku kiselinu** (engl. linoleic acid; LA) koja je esterskom vezom vezana za omega-hidroksi masnu kiselinu (EO) ceramida s duljinom acilnog lanca od 30-32 C atoma (4).

Acilceramidi su zbog jedinstvenu strukture kakvu ne nalazimo u drugim tkivima odgovorni za funkcionalnost epidermalne barijere propusnosti. U slučaju deficita esencijalnih masnih kiselina, uglavnom linolenske, ona se zamjenjuje oleinskom što za posljedicu ima poremećaj u lamelarnim lipidnim dvoslojima i povećan transepidermalni gubitak vode (2).

Ceramidi imaju ključnu ulogu u sprečavanju transepidermalnog gubitka vode (engl. TransEpidermal Water Loss; TEWL).

Ceramidi rožnatog sloja: CER (NP) i CER (EOH) zajedno s drugim dugolančanim ceramidima predstavljaju glavnu komponentu epidermalne barijere, dok je CER (EOS) esencijalan za organizaciju lipida u lamelarne lipidne dvosloje. Smanjena razina ovog ceramida mijenja ortorombičnu strukturu epidermalne barijere u hexagonalnu gel strukturu čime se povećava gubitak vode iz kože (16).

Slobodne masne kiseline koje čine oko 10 % lipida rožnatog sloja uglavnom su dugolančane i zasićene, a duljina acilnog lanca im se kreće od 16-26 C atoma (2).

Lipidni matriks ima ključnu ulogu u barijernoj funkciji kože i zaštititi organizma od gubitka vode.

Lipidi rožnatog sloja zbog svog specifičnog sastava, osobito se to odnosi na sastav masnih kiselina koje su izrazito dugolančane i potpuno zasićene i acil-ceramide služe kao hidrofobna barijera (4, 9).

#### **1.1.2.2.1. Lamelarna i lateralna organizacija lipida**

### **LAMELARNA ORGANIZACIJA LIPIDA**

Lipidi se u izvanstaničnom prostoru raspoređuju u slojeve- lamele koje okružuju korneocite.

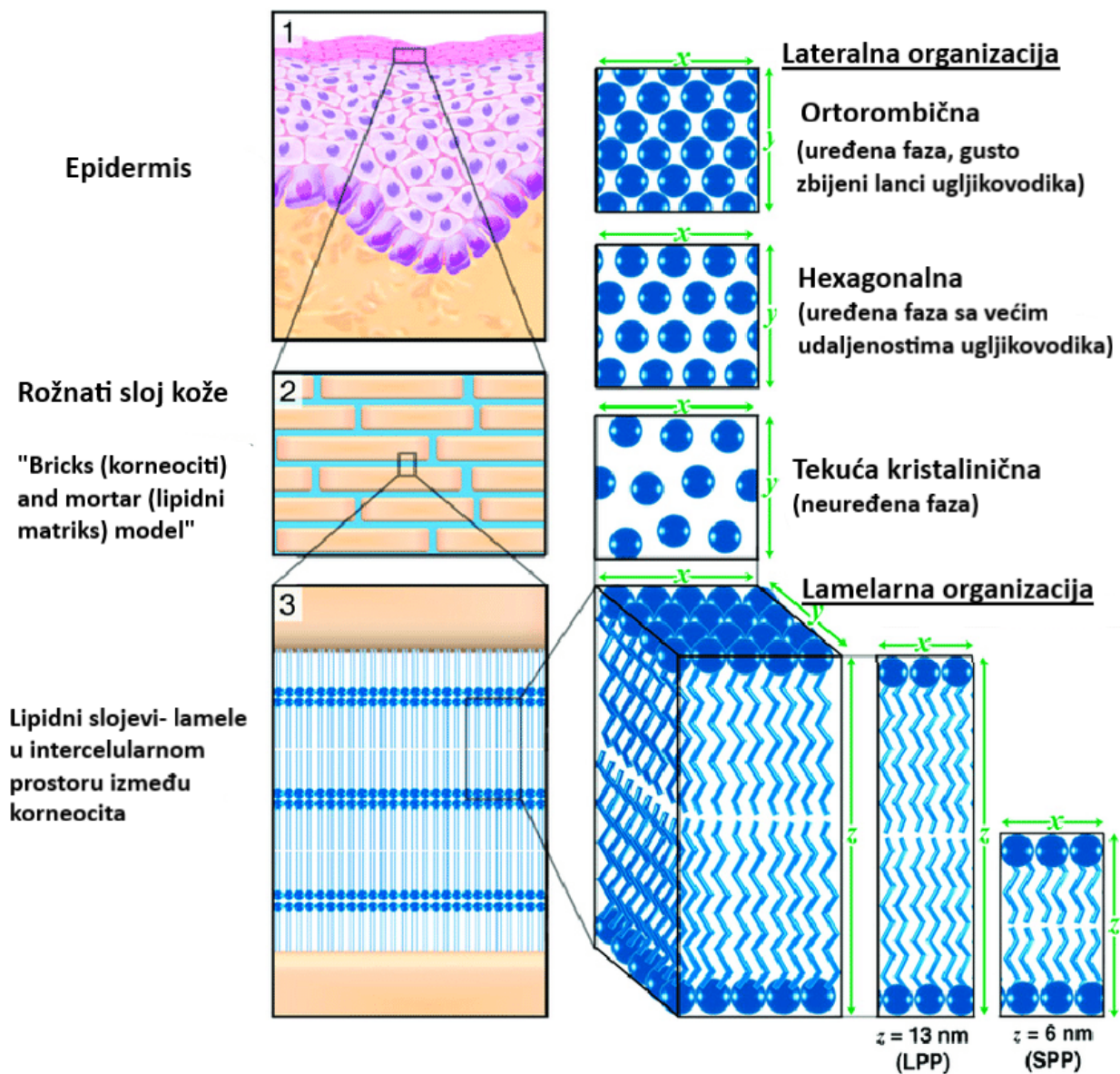
Intercelularne lipidne lamele orijentirane su paralelno s površinom korneocita.

Zbog nepropusnosti rožnate ovojnice korneocita, intercelularni lipidni matriks predstavlja glavni put prolasku tvari kroz kožu kroz dugačak, zavojit put između korneocita.

Lipidi rožnatog sloja imaju ključnu ulogu u barijernoj funkciji kože, njihova organizacija i razmještaj u intercelularne lipidne lamele ključni je događaj u formiranju epidermalne barijere (4).

Lipidi rožnatog sloja koje čine ceramidi, slobodne masne kiseline i kolesterol, iako nepolarni slažu se u slojeve-lamele koje se naizmjenično ponavljaju bilo da je riječ o dugoj, 13 nm (engl. long peridiocity phase; LPP) ili kratkoj, 6 nm (engl. short peridiocity phase; SPP) koegzistirajućoj kristaliničnoj lamelarnoj fazi.

Lamelarna organizacija lipida u slojeve karakteristična je za intercelularni lipidni matriks u rožnatom sloju epidermisa (5, 17).



Slika 3. Shematski prilaz lamelarne i lateralne organizacija lipida u rožnatom sloju  
Prilagođeno prema (5).

**Lamelarna faza duge periodičnosti; LPP** (engl. long peridiocity phase), dominantna je lipidna lamelarna faza u intercelularnom matriksu rožnatog sloja, karakteristične molekularne organizacije s važnom ulogom u barijernoj funkciji kože. Za njeno su stvaranje odgovorni omega- hidroksi ceramidi: CER(EOH), CER(EOP) i CER(EOS) od kojih CER(EOS) ima najvažniju ulogu za upravo takvu lamelarnu organizaciju (4, 18).



## LATERALNA ORGANIZACIJA LIPIDA

Osim lamelarne organizacije lipida u izvanstaničnom matriksu, za barijernu funkciju rožnatog sloja kože bitna je i organizacija lipida unutar samih lamela koja se naziva lateralnom organizacijom lipida (5). Ovisno o udaljenosti ugljikovodičnih lanaca lipida u lamelama, moguće su tri faze: **tekuća kristalinična faza, heksagonalna i ortorombična faza.**

Tekuća kristalinična faza, neuređena je faza kod koje udaljenosti između ugljikovodičnih lanaca nisu dobro definirane, a izražena je povećana permeabilnost rožnatog sloja.

Heksagonalna faza, uređena je faza kod koje su lanci ugljikovodika jednako udaljeni, a permeabilnost rožnatog sloja značajno je manja nego kod tekuće kristalinične faze. Ova se faza u literaturi često naziva gel fazom.

Ortorombična faza, uređena je faza kod koje su lanci ugljikovodika gusto zbijeni, slabe permeabilnosti.

**Ortorombična lateralna organizacija** lipida u lamelarnim slojevima, dominantna je faza lipida intercelularnog matriksa, slabe permeabilnosti, ključna za barijernu funkciju. Optimalni udio sve tri skupine lipida potreban je za ortorombičnu lateralnu organizaciju lipida.

Dokazano je da dugolančane, slobodne masne kiseline potiču ortorombičnu lateralnu organizaciju lipida (2, 4).

Idući od dubljih slojeva rožnatog sloja prema površinskim, povećava se udio heksagonalne lateralne organizacije lipida što je u skladu sa slabljenjem epidermalne barijere u površinskim slojevima kože. Povećani udio heksagonalne lateralne organizacije lipida u površinskim dijelovima rožnatog sloja posljedica je utjecaja kratkolančanih masnih kiselina iz sebuma koje potiču tranziciju iz kristaliničnog u gel stanje lipidnog matriksa, vjerojatno utjecajem na povećanu mobilnost alkilnih lanaca ceramida i slobodnih masnih kiselina (4, 18).

### 1.1.2.2.2. Novi molekularni modeli organizacije lipida i sebacealni lipidi

Istraživanjima je utvrđeno da se vrlo mali dio intercelularnih lipida nalazi u tekućoj kristaliničnoj (fluidnoj) fazi što znači da uz dominantnu ortorombičnu, kristaliničnu fazu koegzistira i fluidna faza. Bowustra je predložila da se ta fluidna domena nalazi unutar lamelarne faze duge periodičnosti, LPP (18). Molekularni model organizacije lamelarne faze duge periodičnosti, LPP nazvala je "sendvič modelom".

Prema tom modelu, u lamelarnoj fazi duge periodičnosti od 13 nm, lipidi su organizirani u 3 sloja, središnji uski lipidni sloj (fluidni sloj, sadrži uglavnom linolensku kiselinu i kolesterol) koji se nalazi između dva deblja, kristalinična sloja, ortorombične konformacije. Unatoč prisustvu fluidne domene za koju se smatra da nije kontinuirana, barijerna funkcija kože ostaje netaknuta.

Budući da su lipidne lamele orijentirane paralelno s površinom korneocita, sve tvari koje prodiru kroz kožu moraju prvo proći kristalinične regije u smjeru okomitom na lipidne lamele čime im je prodor kroz intercelularni lipidni matriks otežan pa barijerna funkcija kože ostaje sačuvana (18).

### Sebacealni lipidi

Za razliku od epidermalnih, lipidi na površini naše kože uglavnom su sebacealnog porijekla. Luče ih žlijezde lojnice iz dermisa na površinu kože. Složena su mješavina nepolarnih lipida, a čine ih trigliceridi (45 %), voštani esteri (25 %), skvalan (12 %), slobodne masne kiseline (10 %) i male količine kolesterola i kolesterol estera. Lipida epidermisa gotovo da i nema na površini kože, njihova je glavna uloga barijerna funkcija rožnatog sloja epidermisa (19).



### 1.1.3. Epidermalna barijera

Epidermis je kontinuirano obnavljajući, keratinizirani, slojeviti, skvamozni epitel čija je glavna uloga da štiti organizam od štetnih vanjskih utjecaja i spriječi gubitak vode i elektrolita iz organizma.

Rožnati sloj, odnosno lipidni lamelarni slojevi koji okružuju korneocite služe kao hidrofobna barijera i sprečavaju gubitak vode i elektrolita iz organizma.

Barijera nije apsolutna jer se male količine vode ipak gube isparavanjem s površine kože, taj normalan gubitak vode s površine kože naziva se transepidermalnim gubitkom vode (TEWL) (6, 7). Propusnost/permeabilnost jedna je od najviše ispitivanih i najvažnijih funkcija epidermalne barijere. Barijerna funkcija kože, zaštitna je funkcija kože koja se često koristi kao sinonim za tzv. homeostazu barijere propusnosti.

Sposobnost kože da ograniči gubitak vode iz organizma u okoliš posljedica je organizacije rožnatog sloja u dvokomponentni sustav u kojem su korneociti, obavijeni nepropusnom rožnatom ovojnicom uronjeni u lipidni matriks.

Apsolutne količine lipida, njihova hidrofobna narav, raspodjela i supramolekulska organizacija u niz lamelarnih dvosloja čine zajedno barijeru propusnosti (20).

U slučaju oštećenja epidermalne barijere, vrlo brzo se aktiviraju homeostatski mehanizmi u vijabilnom epidermisu koji rezultiraju obnovom epidermalne barijere. Dolazi do pojačane sinteze lipida i brzog izlučivanja sadržaja lamelarnih tjelešaca na granici zrnatog i rožnatog sloja pa se već za nekoliko sati pojavljuju novi lamelarni lipidni dvosloji u donjim dijelovima rožnatog sloja epidermisa (20, 21).

U slučaju gubitka cijelog epidermisa (teške opekline kod kojih je zahvaćena velika površina tijela), dolazi do potpunog gubitka vode iz organizma i posljedične smrti, a u slučaju gubitka cijelog rožnatog sloja, dolazi do umjerenog gubitka vode, odnosno povećanog transepidermalnog gubitka vode. To upućuje na zaključak da i vijabilni dijelovi epidermisa imaju važnu ulogu u održavanju epidermalne barijere preko tzv. čvrstih staničnih veza (engl. Tight Junctions; TJ) između epidermalnih stanica.

**Čvrste stanične veze** su veze između epitelnih stanica koje su u zdravom epidermisu zastupljene uglavnom u zrnatom sloju i imaju važnu ulogu u barijernoj funkciji kože. TJ su složeni proteinski kompleksi koji formiraju fizičku barijeru i ograničavaju i kontroliraju prolazak vode i iona između stanica.

Kontroliraju paracelularni put prolaska tvari kroz epidermis, pridonose staničnom polaritetu, tvore paracelularne kanale za selektivnu difuziju iona i tekućina u međustaničnom prostoru.

Čine ih transmembranski proteini, adhezijske molekule i aktinski filamenti, od kojih su najzastupljeniji okcludin i kladin (6, 7).

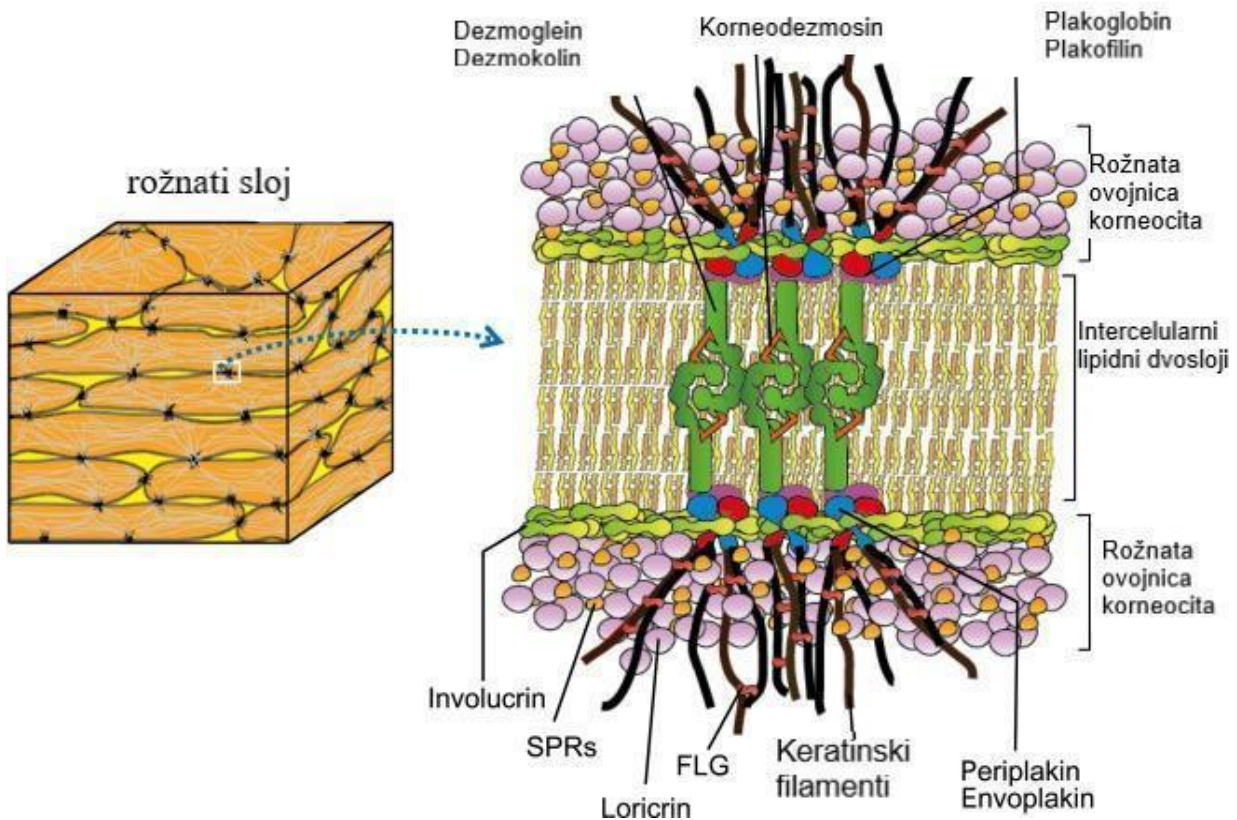
## 1.1.4. Deskvamacija i proteolitička razgradnja korneodezmosoma

### 1.1.4.1. Deskvamacija

**Deskvamacija** je kontinuirani proces kojim se korneociti ljušte s površine kože. Taj je obrambeni proces nevidljiv i predstavlja važnu obrambenu funkciju rožnatog sloja. Integritet/kohezija rožnatog sloja je obrnuto proporcionalna brzini deskvamacije korneocita. Da bi se održala stalna debljina rožnatog sloja kože postoji fina ravnoteža između brzine kojom se korneociti ljušte s površine kože i brzine proliferacije stanica temeljnog sloja. Taj je proces gotovo nevidljiv, a ljušte se pojedinačne stanice rožnatog sloja ili male nakupine stanica rožnatog sloja. Vrijeme u kojem se potpuno zamijene stanice rožnatog sloja iznosi 2- 4 tjedna, a prosječno se svaki dan jedan sloj korneocita ljušti s površine kože i zamjeni sa slojem keratinocita u zrnatom sloju (1, 21). Deskvamacija je složen proces u kojem centralnu ulogu ima eliminacija kohezije između korneocita, odnosno proteolitička degradacija korneodezmosoma (21).

**Dezmosomi** (lat. macula adherens) stanične su strukture okruglog ili ovalnog oblika, promjera oko 0,2-1  $\mu\text{m}$ , sastavljene uglavnom od glikoproteina koje spajaju susjedne epidermalne stanice, a prisutne su u svim vijabilnim dijelovima epidermisa. U bazalnom sloju epidermisa su poprilično mali i rijetki, ali im broj i veličina značajno rastu u diferenciranim dijelovima epidermisa dok se keratinociti pomiču iz bazalnog prema zrnatom sloju. U procesu diferencijacije keratinocita u korneocite, mijenja im se morfologija i sastav (22). Dezmosomi koji spajaju epidermalne keratinocite razlikuju se od onih koji spajaju korneocite u rožnatom sloju. Razlika je u proteinu korneodezmozinu zbog čega se dezmosomi rožnatog sloja često nazivaju korneodezmosomima (23).

**Korneodezmosomi** se po svom sastavu razlikuju se od dezmosoma jer sadrže korneodezmozin, (CDSN), glikoprotein kojeg neposredno prije procesa kornifikacije luče lamelarna tjelešca keratinocita u izvanstanični prostor na granici zrnatog i rožnatog sloja gdje se on spontano ugrađuje u međustanični prostor s dezmosomalnim kadherinima – desmogleinom i dezmokolinom. Korneodezmosomi se sastoje od izvanstanične središnje regije, tzv. dezmogleje (sadrži dva kadherina – desmoglein i dezmokolin), vanjskog gustog plaka (sadrži plakoglobin i plakofilin) i unutarnjeg gustog plaka (sadrži dezmooplakin povezan sa keratinskim filamentima). Strukturno, nemaju troslojnu, već jednoslojnu, homogenu dezmogleju (tzv. dezmosomalna ploča – sadrži dva dezmosomalna kadherina, desmoglein i dezmokolin te korneodezmozin), a prijanjajući plakovi su integrirani u dio rožnate ovojnice korneocita (23, 24). Korneodezmosomi su u dubljim slojevima rožnatog sloja raspoređeni oko čitave površine stanice, dok se u površinskim dijelovima rožnatog sloja nalaze samo na perifernim rubovima susjednih korneocita. Ti lateralni stanični spojevi, tzv. periferni korneodezmosomi ostaju netaknuti u procesu proteolitičke razgradnje sve do same površine rožnatog sloja (25). U procesu deskvamacije, najprije se razgrađuju spojevi između uzastopnih slojeva korneocita dok lateralni spojevi između stanica ostaju netaknuti. Na taj se način rožnati sloj dijeli u visoko kohezivni dio, kompaktni rožnati sloj (SC compactum) sa korneodezmosomima koji okružuju cijelu površinu stanice i nekompaktni sloj (SC disjunctum) koji ima samo lateralne stanične spojeve (24). Periferni korneodezmosomi su zaštićeni od proteolitičke razgradnje zahvaljujući tzv. čvrstim vezama, TJ koje ih okružuju, a za koje se donedavno smatralo kako ih nalazimo samo u vijabilnom epidermisu (25).



**Slika 4. Shematski prikaz korneodezmosoma na spoju između dvije susjedne epidermalne stanice, korneocita u rožnom sloju epidermisa.**  
Prilagođeno prema (11).

#### 1.1.4.2. Proteolitička razgradnja korneodezmosoma i regulacija deskvamacije

Proces proteolitičke degradacije korneodezmosoma, strogo je kontroliran proces u kojem sudjeluje velik broj proteaza i njihovih inhibitora.

Najznačajnije su serinske proteaze, tzv. **kalikreini** (engl. KaLiKrein-related peptidases; KLK-s): SCTE – SC tripsinski enzim (**KLK5**) i SCCE – SC kimotripsinski enzim (**KLK7**).

Serinske proteaze koje sudjeluju u procesu deskvamacije pokazuju optimalnu aktivnost u blago alkalnom pH oko 8, ali zadržavaju značajnu aktivnost i u kiselom pH.

Ostali enzimi uključeni u proces deskvamacije su cisteinske proteaze (katepsini) i aspartat proteaze s optimalnom djelovanjem u kiselom pH.

Katepsini su grupa lizosomalnih proteaza čije je aktivno mjesto cistein ili manjim dijelom aspartatni ostaci. Tu se ubrajaju cistein proteaze – katepsin L2 (CTSL2), katepsin L (CTSL) te aspartat proteaza – katepsin D (CTSD).

Endogeni inhibitori proteaza identificirani u epidermisu različita su grupa spojeva, od metalnih iona, lipida, peptida pa sve do velikih proteina. Najvažniji je limfoepitelni inhibitor serinske proteaze Kazal-tipa 5 - **LEKTI** (engl. LymphoEpithelial Kazal-Type related Inhibitor), pH ovisan regulator deskvamacije i snažan inhibitor serinskih proteaza.

Luče ga lamelarna tjelešca u intercelularni prostor na granici zrnatog i rožnatog sloja, gdje je lokaliziran zajedno s kalikreanima. Neutralna pH vrijednost u intercelularnom prostoru na granici zrnatog i rožnatog sloja omogućava snažnu inhibitornu aktivnost ovog proteina.

Kako se pomicanjem keratinocita prema površinskim dijelovima rožnatog sloja smanjuje i pH vrijednost rožnatog sloja, tako se smanjuje i njegov inhibirajući potencijal.

U površinskim slojevima rožnatog sloja inhibicijska aktivnost LEKTI-ja je dovoljno smanjena za normalnu deskvamaciju.

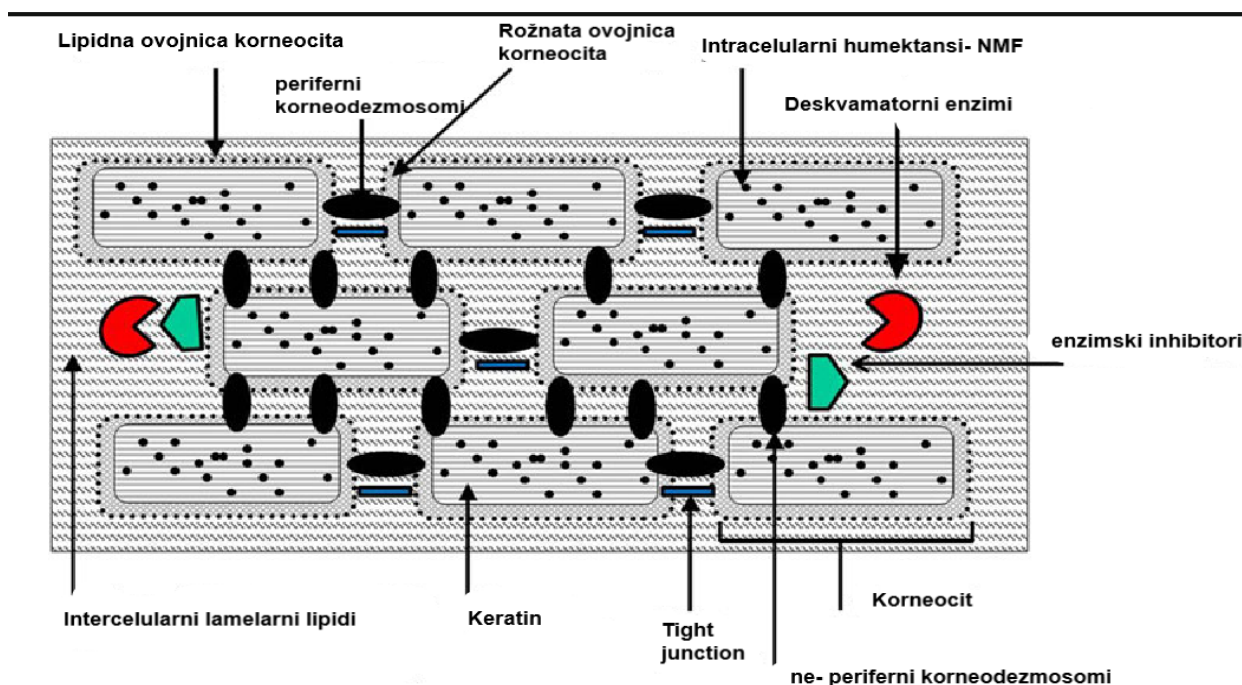
Ostali endogeni inhibitori proteolitičkih enzima su elafin, serinska leukoproteaza- SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor), cistatin M/E (specifičan inhibitor serinskih proteaza), alpha-2 makroglobulin (inhibitor i kalikreina i katepsina), kolesterol sulfat i Zn ioni (26).

Deskvamacija je strogo kontroliran proces u kojem se korneociti ljušte s površine kože i istodobno zamjenjuju s korneocitima iz dubljih dijelova epidermisa, a sve kako bi se održala stalna debljina rožnatog sloja. **pH vrijednost i sadržaj vode u rožnatom sloju** ključni su faktori koji reguliraju proces deskvamacije preko utjecaja na aktivnost proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora (27).

U slučaju neadekvatne hidratacije rožnatog sloja, proteolitički enzimi odgovorni za degradaciju korneodezmosoma ne mogu dobro obavljati svoju funkciju pa korneodezmosomi ostaju intaktni u gornim slojevima SC-a. Posljedica je ljuštenje velikih nakupina korneocita, a ne pojedinačnih stanica pa je golim okom vidljiv velik broj tzv. ljusaka. Povećava se površina rožnatog sloja dostupna za kolonizaciju bakterija (1).

Razgradnja korneodezmosoma je značajno smanjena u uvjetima niske vlažnosti zraka jer je smanjen sadržaj vode u rožnatom sloju. To je čest slučaj zimi, kada su zbog nepovoljnih vremenskih uvjeta česte xeroze i ostala stanja povezana sa suhom kožom, a za koje je karakteristično nakupljanje korneocita na površini kože zbog neuspjele razgradnje korneodezmosoma (3, 27).

Rožnati sloj kože ima pH vrijednost oko 4-5.5 i taj kiseli pH, osim što ima važnu ulogu u zaštiti kože od kolonizacije štetnih bakterija, važan je i za proces deskvamacije. U slučaju upalnih dermatoza kao što su psorijaza i atopijski dermatitis, porastom pH vrijednosti u rožnatom sloju, raste i aktivnost proteolitičkih enzima pa se rožnati sloj posljedično tome stanjuje (20).



Slika 5. Shematski prikaz rožnatog sloja kože i organizacije korneodezmosoma. Prilagođeno prema (26).

## 1.2. HIDRATACIJA KOŽE

### 1.2.1. Hidratacija rožnatog sloja kože

Odgovarajuća razina hidratacije rožnatog sloja epidermisa bitna je za zdravlje i izgled kože koja je kad je optimalno hidratizirana mekana i glatka, a u slučaju da je dehidrirana, koža postaje suha, gruba i ljuskava.

Odgovarajući sadržaj vode u rožnatom sloju epidermisa osim za izgled i funkciju kože, bitan je i za strukturni integritet i funkcionalnost zaštitne epidermalne barijere (28).

Već je davno, znanstvenik Irwin H Blanc, pedesetih godina prošlog stoljeća utvrdio kako sadržaj vode u rožnatom sloju mora biti veći od 10 % kako bi se sve metaboličke reakcije važne za funkciju i strukturu rožnatog sloja nesmetano odvijale (29).

Kako su većina enzima koji sudjeluju u metaboličkim reakcijama koje se odvijaju u rožnatom sloju hidrolitički enzimi, važno je da sadržaj vode ne padne ispod minimalne koncentracije.

Ukoliko sadržaj vode padne ispod te kritične koncentracije, rožnati sloj postaje suh i britak, remeti se odvijanje metaboličkih procesa i narušavaju strukturni integritet i funkcija rožnatog sloja (28).

Zdrava, dobro hidratizirana koža sadrži prosječno oko 15-30 % vode u rožnatom sloju epidermisa, osim na samoj površini kože gdje je koncentracija značajno manja. Kod suhe kože, sadržaj vode može biti izrazito nizak, oko 10-15 % i to kroz čitav rožnati sloj, sve do granice sa zrnatim slojem epidermisa (1, 30). Na samoj površini rožnatog sloja sadržaj vode je niži nego u dubljim slojevima epidermisa i iznosi oko 15 %. Idući od površine kože prema dubljim slojevima epidermisa, sadržaj vode se povećava pa u stanicama vijabilnog epidermisa iznosi čak, oko 70 % (31). Na granici zrnatog i rožnatog sloja epidermisa dolazi do naglog pada koncentracije vode u odnosu na stanice vijabilnog epidermisa na svega 15-30 %. To se prijelazno područje u literaturi često naziva naziva korneo-epidermalnim spojem (engl. Corneo-Epidermal Junction; C.E.J.) i ima važnu ulogu u odvajanju rožnatog sloja od ostatka tijela pomažući pritom da se sačuvaju voda i važni elektroliti u vijabilnom epidermisu (28, 31).

U uvjetima normalne vlažnosti zraka postoji strmi koncentracijski gradijent vode u rožnatom sloju (31). Nepovoljni okolišni uvjeti kao što su: niska vlažnost zraka, vjetar, UV zračenje kao i prekomjerna upotreba agresivnih sredstava za čišćenje kože mogu smanjiti sadržaj vode u rožnatom sloju (32).

Hidratacija rožnatog sloja ovisi o brzini kojom voda iz dubljih slojeva epidermisa pristiže u rožnati sloj, brzini kojom napušta površinu kože i o sposobnosti rožnatog sloja da zadrži vodu (33). Rožnati je sloj uglavnom nepropustan, osim za male količine vode koja iz epidermisa stiže u rožnati sloj kako bi se osigurala hidratacija njegovih površinskih slojeva i nesmetano odvijanje enzimskih procesa.

Sposobnost rožnatog sloja da zadrži vodu ovisi o tri faktora:

- intercelularnim lamelarnim lipidnih dvoslojevima koji djeluju kao hidrofobna barijera koja sprječava transepidermalni gubitak vlage,
- prisustvu prirodnih higroskopskih tvari, tzv. prirodnih faktora vlažnosti kože unutar samih korneocita rožnatog sloja ili u izvanstaničnom prostoru
- postojanju potpuno zrelih korneocita sa razvijenom rožnatom ovojnicom i povezanih korneodezmosomima koji otežavaju i produljuju put difuzije molekulama vode (34).

### 1.2.2. Prirodni faktori vlažnosti kože (NMF)

Održavanje optimalne razine hidratacije rožnatog sloja omogućavaju tzv. prirodni faktori vlažnosti kože (engl. Natural Moisturising Factors; NMF) koji se nalaze u visokim koncentracijama u korneocitima rožnatog sloja epidermisa. NMF čini oko 20-30 % ukupne mase suhe tvari rožnatog sloja i nalazi se isključivo u rožnom sloju epidermisa.

Najvećim ga dijelom čine aminokiseline i njihovi derivati (40 %), uključujući pirolidon-karboksilnu kiselinu (engl. Pyrrolidone Carboxylic Acid; PCA) i urokansku kiselinu (12 %), zajedno s laktatima (12 %), šećerima (8.5 %), ureom (7 %) i anorganskim solima (18 %) koji se mogu naći i u izvanstaničnom prostoru.

Anorganske soli su uglavnom kloridne, citratne i fosfatne soli natrija, kalija, kalcija i magnezija. Prirodni faktori vlažnosti kože, higroskopne su tvari male molekularne mase koje privlače i vežu vodu iz atmosfere pa djeluju kao jako učinkoviti humektansi. Sposobnost NMF-a za apsorpciju i vezanje vode toliko je učinkovita da se prirodni faktori vlažnosti kože doslovno otapaju u vodi koju su apsorbirali.

Glavnina prirodnih faktora vlažnosti kože, odnosno aminokiseline i njihovi derivati nastaju razgradnjom filagrina, histidinom bogatog proteina u rožnom sloju epidermisa (3).

**Filagrin** (engl. FILament AggreGating pRoteIN) je histidinom bogati protein koji veže keratinska intermedijarna vlakna, zbija ih u guste snopove što za posljedicu ima kolaps stanice u karakterističan plosnati oblik, a nastaje razgradnjom profilagrina.

Profilagrin je prekursor filagrina, netopljivi protein velike molekularne mase (400 kDa) koji se stvara u keratohijalinskim granulama zrnatog sloja epidermisa.

Tijekom procesa terminalne epidermalne diferencijacije, profilagrin se na prijelazu zrnatog u rožnati sloj defosforilira i djelovanjem serinskih proteaza proteolitički razgrađuje do konačno 10-12 funkcionalnih monomera filagrina (37 kDa) (36).

Filagrin je važan strukturni protein rožnatog sloja epidermisa koji vezanjem intermedijarnih keratinskih filamenata dovodi do stvaranja kompaktnog, netopljivog intracelularnog keratinskog matriksa neophodnog za normalnu funkciju rožnatog sloja epidermisa (37).

U stanicama rožnatog sloja filagrin se reakcijom deimidacije odvaja od keratinskih filamenata i dalje proteolitički razgrađuje u smjesu higroskopnih, slobodnih aminokiselina (alanin, histidin, glutamin) i njihovih derivata kao što su trans-urokanska kiselina (engl. urocanic acid; UCA) i pirolidon-karboksilna kiselina (Pyrrolidone carboxylic acid; PCA) koji su zajednički poznati kao prirodni faktori vlažnosti kože (Natural Moisturising factors; NMF).

Glavna je uloga prirodnih faktora vlažnosti kože održavanje hidratacije i zadržavanje vode u rožnom sloju, osobito u uvjetima niske vlažnosti zraka. Vlažnost zraka i promjene u sadržaju vode u rožnom sloju faktori su koji predstavljaju okidač za razgradnju filagrina (36).

Koncentracija prirodnih faktora vlažnosti kože najveća je u središnjem dijelu rožnatog sloja, a najmanja u najdubljem dijelu. Najdublji dijelovi rožnatog sloja imaju najmanji kapacitet vezanja vode, manji od površinskih dijelova kože. Sadržaj prirodnih faktora vlažnosti kože u korelaciji je sa sposobnošću rožnatog sloja za vezanjem vode. Visoka razina hidratacije u najdubljim dijelovima rožnatog sloja sprječava razgradnju filagrina na smjesu aminokiselina, do razgradnje filagrina dolazi pomicanjem korneocita prema površinskim dijelovima rožnatog sloja kože.

Najveći je kapacitet vezanja vode u središnjem dijelu rožnatog sloja što odgovara i najvećem sadržaju NMF u tom dijelu kože. Biološki, NMF omogućavaju površinskim slojevima rožnatog sloja kože da zadrže vodu usprkos isušujućem djelovanju vanjskog okoliša (3, 38).

Dugo se smatralo da voda vezana za prirodne faktore vlažnosti u korneocitima plastificira kožu i čini je otpornom na mehanički stres ili pucanje.

Najnovije spoznaje pokazuju da specifična ionska interakcija između prirodnih faktora vlažnosti i keratina, praćena smanjenom mobilnošću vode dovodi do redukcije intermolekularnih sila između keratinskih vlakana i povećanog elastičnosti kože (34).

Ostali prirodni faktori vlažnosti koji se mogu nalaziti u izvanstaničnom prostoru rožnatog sloja su: urea, šećeri, hijaluronska kiselina, osobito laktati za koje se smatra da su porijeklom iz znoja kojeg na površinu kože luče žlijezde znojnice (3).

I za ureu se smatra da je dijelom porijeklom iz znoja, kao i laktati, a prisustvo šećera rezultat je djelovanja enzima beta-d-glukozilceramidaze koji katalizira odcijepljivanje glukoze od glukozil-ceramida prilikom stvaranja lipidnih lamela u dubokim dijelovima rožnatog sloja epidermisa (34).

Optimalna razina hidratacije kože neophodna je zbog važnih metaboličkih procesa koji se tamo odvijaju kao primjerice: pretvorba probarijernih lipida u barijerne da bi se održala barijerna funkcija rožnatog sloja, pravilno sazrijevanje rožnate ovojnice korneocita što rožnatom sloju daje mehaničku čvrstoću, proteolitička razgradnja dezmosoma čime se omogućava obnavljanje i zamjena slojeva epidermisa, proteolitička razgradnja filagrina i posljedično stvaranje prirodnih faktora vlažnosti kože.

### 1.2.3. Uloga korneocita i intercelularnog lipidnog matriksa u hidrataciji kože

Većina se vode u rožnatom sloju kože nalazi unutar korneocita, vrlo se mala količina vode nalazi u lipidnom izvanstaničnom matriksu (35).

Korneociti su odgovorni za mehaničku čvrstoću rožnatog sloja i fleksibilnost kože zahvaljujući svojoj karakterističnoj građi koju čine čvrsta rožnata ovojnica i mreža keratinskih intermedijarnih filamenata. Čvrsti, slojeviti raspored korneocita u rožnatom sloju kože omogućava korneocitima da zadržavaju vodu i produljuju njen difuzijski put. Membrana korneocita je propusna za vodu, ali nepropusna za proteine i velike molekule.

Dio vode u korneocitima koji je povezan s keratinskim intermedijarnim vlaknima odgovoran je za fleksibilnost i plastičnost kože, i taj se udio ne mijenja ovisno o okolišnim uvjetima (30, 32).

Vrlo mala količina vode nalazi se u izvanstaničnom lipidnom matriksu gdje se molekule vode vodikovom vezom vežu za polarne dijelove multilamelarnih intercelularnih lipida (35).

U normalnim uvjetima nema slobodne vode u intercelularnom lipidnom prostoru.

Intercelularni lipidni matriks sprječava prekomjeren gubitak vode i elektrolita iz organizma pa je njegova najvažnija uloga, barijerna funkcija rožnatog sloja.

Osim barijerne funkcije, intercelularni lipidni matriks ima važnu ulogu u regulaciji sadržaja vezane vode u rožnatom sloju (39).

Intercelularni lipidni matriks može biti ili u nepropusnom (gel) ili propusnom stanju (tekući, kristalinični matriks) za vodu te predstavlja glavni put za prolazak hidrofilnih ili lipofilnih tvari kroz kožu (30).

Nepovoljni okolišni uvjeti kao što su: niska vlažnost zraka, vjetar, UV zračenje ili prekomjerna upotreba agresivnih sredstava za čišćenje kože mogu smanjiti sadržaj vode u rožnatom sloju (32).

Na svakodnevnoj fiziološkoj razini dolazi do transporta vode iz dubljih slojeva kože prema površinskim slojevima difuzijom do konačnog isparavanja u okoliš (43)

Normalni protok vode kroz rožnati sloj epidermisa naziva transepidermalni gubitak vode (engl. Transepidermal water loss: TEWL) i njegova brzina ovisi o koncentraciji vode u epidermisu, njenom difuzijskom potencijalu, integritetu i koheziji korneocita, debljini rožnatog sloja i relativnoj vlažnosti zraka (30).

Transepidermalni gubitak vode, važan je pokazatelj barijerne funkcije kože, i idealno, kod zdrave kože njegova bi vrijednost trebala biti što niža.

Više vrijednosti transepidermalnog gubitka vode ukazuju na lošu barijernu funkciju rožnatog sloja i pojačan gubitak vode iz kože (32).



#### 1.2.4. Slobodna i vezana voda u rožnatom sloju kože

U uvjetima normalne vlažnosti zraka, pri optimalnim razinama hidratacije, sva je voda u rožnatom sloju "vezana voda" bilo da je vezana za keratinske filamente i prirodne faktore vlažnosti u korneocitima ili je u izvanstaničnom lipidnom matriksu.

S obzirom na jačinu te veze, možemo ju promatrati kao primarnu- "čvrsto" vezanu vodu (voda vezana za polarne dijelove keratinskih filamenata; njen udio je nepromjenjiv i iznosi oko 5 %) i sekundarnu- "slabo" vezanu vodu (voda vezana za prirodne faktore vlažnosti u korneocitima ili je u intercelularnom lipidnom matriksu) koja se lako otpušta ovisno o okolišnim uvjetima (40).

Prema nekim istraživanjima, udio vezane vode u rožnatom sloju epidermisa iznosi oko 33 %, a važan modulator njenog sadržaja su intercelularni lipidi (39).

Sva voda u rožnatom sloju epidermisa iznad tog sadržaja, slobodna je voda. Ona se u rožnatom sloju zapaža samo u slučajevima iznimno visokih razina hidratacije (40).

U slučajevima izrazito visokih razina hidratacije rožnatog sloja (uvjeti visoke vlažnosti zraka ili uranjanje kože u vodu), povećava se količina vode u korneocitima što za posljedicu ima vidljivo zadebljanje rožnatog sloja epidermisa.

Korneociti vežu dodatnu količinu vode i bubre u smjeru okomitom na površinu kože, povećavajući svoj volumen i do 50 % u visinu kad su potpuno hidrirani. Do bubrenja korneocita dolazi zbog visoke koncentracije prirodnih faktora vlažnosti čime se stvara visok osmotski tlak koji privlači vodu u korneocite i izvlači vodu iz intercelularnog prostora (41, 42).

Strmi koncentracijski gradijent vode u rožnatom sloju kože posljedica je diskontinuiteta u sposobnosti vezanja vode između različitih slojeva korneocita.

Istraživanjima je utvrđeno da pri nižim razinama hidratacije (18-26 % w/w) korneociti ne mijenjaju svoj volumen, što upućuje na zaključak da je u rožnatom sloju prisutna samo vezana voda.

Pri višim razinama hidratacije (57-87 % w/w), korneociti povećavaju svoj volumen, osobito u središnjem dijelu rožnatog sloja gdje je puno veća koncentracija vode nego u površinskim ili dubljim slojevima, a opažaju se samo intracelularni rezervoari slobodne vode. Ta su istraživanja u skladu s istraživanjima distribucije prirodnih faktora vlažnosti čija je koncentracija također najveća u središnjem dijelu rožnatog sloja epidermisa (38, 41).

Pri izrazito visokim razinama hidratacije (300 % w/w), korneociti i dalje bubre i povećavaju svoj volumen uz iznimku onih u najdubljim slojevima koji se nalaze uz vijabilni epidermis.

Osim u korneocitima (intracelularno), opažaju se rezervoari slobodne vode, tzv. "cisternae" i u intercelularnom lipidnom matriksu rožnatog sloja (41, 42).

Produženo izlaganje kože vodi, štetno je za kožu jer za posljedicu ima poremećaj u lipidnoj, lamelarnoj strukturi izvanstaničnog prostora, povećanu permeabilnost kože, a u nekim slučajevima može doći i do kontaktnog dermatitisa (42).



### 1.2.5. Najnovije spoznaje o mehanizmima hidratacije rožnatog sloja

#### Endogeni humektansi

Osim prirodnih faktora vlaženja kože nastalih razgradnjom filagrina, postoje i druge tvari važne za održavanje optimalne razine hidratacije rožnatog sloja, a čije je prisustvo u rožnom sloju otkriveno tek nedavno.

Jedna od njih je hijaluronska kiselina, glikozaminoglikan, velike molekularne mase sa izrazito velikim afinitetom za vezanje molekula vode. Ovaj je higroskopni polimer odgovoran za hidrataciju i strukturni integritet dermisa, tek je nedavno otkriveno da je prisutna i u epidermisu (44).

**Hijaluronska kiselina** je kao endogeni humektans zbog svojeg velikog afiniteta za vezanje molekula vode, važna za hidrataciju rožnatog sloja no ima i druge važne uloge.

Hijaluronska kiselina prisutna u izvanstaničnom prostoru rožnatog sloja, veže se za površinu korneocita preko receptora CD 44 i na taj način ostvaruje svoju ulogu u regulaciji diferencijacije keratinocita, stimulaciji stvaranja intercelularnog lipidnog matriksa i održavanju homeostaze barijere propusnosti (45, 46).

**Glicerol** je dobro poznati kozmetički sastojak no tek je nedavno otkriveno da u rožnom sloju djeluje kao prirodni endogeni humektans (47).

Već su životinjske studije utvrdile važnost endogenog glicerola za normalnu razinu hidratacije rožnatog sloja pošto je dokazano kako smanjena razina endogenog glicerola uzrokuje poremećaje u hidrataciji rožnatog sloja. Topikalnom primjenom glicerola u tim studijama brzo je došlo do normalizacije hidratacije rožnatog sloja kože (48, 49).

Endogeni glicerol porijeklom je iz sebacealnih žlijezda gdje nastaje razgradnjom triglicerida sebama ili iz cirkulacije, gdje se iz krvi preko posebnih vodenih kanala, akvaporina transportira u epidermis (47).

Već je dugo poznato da područja na koži bogata sebacealnim žlijezdama pokazuju puno veće razine hidratacije rožnatog sloja u odnosu na ona područja na koži siromašna sebacealnim žlijezdama.

Dugo se to svojstvo pripisivalo emolijentnom djelovanju površinskih, sebacealnih lipida no novim studijama je dokazano je kako promjene u hidrataciji rožnatog sloja nisu u korelaciji sa promjenama u sadržaju lipida sebama, već isključivo promjenama u sadržaju glicerola (47, 50).

#### Akvaporini

**Akvaporini (AQP)** su mali, hidrofobni, integralni membranski proteini koji formiraju tzv. vodene kanale kroz staničnu membranu i omogućavaju brz i visoko specifičan, selektivan transport vode kroz stanice. Neki od njih, "akvagliceroporini", osim što su selektivno propusni za vodu, omogućavaju transport i manjih molekula kao što su glicerol i urea.

Najistraživaniji je akvaporin-3 (AQP-3), akvagliceroporin kojeg nalazimo u staničnoj membrani keratinocita bazalnog sloja epidermisa pa sve do zrnatog sloja (51, 52).

Akvagliceroporine nalazimo samo u vijabilnom epidermisu, nema ih u rožnom sloju i upravo oni omogućavaju stalni protok vode između vijabilnog epidermisa i rožnatog sloja održavajući pritom stalnu koncentraciju vode u vijabilnom epidermisu (29).

#### **Tight junctions; TJ** (čvrste veze)

Strmi koncentracijski gradijent vode u epidermisu ukazuje na postojanje još jedne barijere na granici rožnatog i zrnatog sloja epidermisa.

Drugu liniju barijere propusnosti u epidermisu predstavljaju tzv. čvrste veze (engl. Tight junctions; TJ), međustanični spojevi u zrnatom sloju epidermisa koji kontroliraju paracelularni protok vode i elektrolita (difuzija vode i elektrolita kroz međustanični prostor) (29).

### 1.3. Hidratantne dermatokozmetičke formulacije – ovlaživači (engl. moisturizers)

### 1.3.1. Definicija hidratantnih dermatokozmetičkih formulacija

Hidratantne dermatokozmetičke formulacije (ovlaživači; engl. moisturizers) složene su kozmetičke formulacije čija je glavna namjena održavanje razine vode u rožnom sloju epidermisa u koncentraciji između 10 i 30 % .

Optimalna hidratacija rožnog sloja kože važna je za izgled i funkciju kože, odnosno za strukturni integritet i funkcionalnost epidermalne barijere propusnosti.

Suha koža (xerosis cutis) posljedica je smanjenog sadržaja vode u rožnom sloju epidermisa zbog čega dolazi do poremećaja u deskvamaciji korneocita. Da bi koža izgledala zdravo, sadržaj vode u rožnom sloju mora biti veći od 10 % .

U slučaju oštećenja epidermalne barijere, povećava se transepidermalni gubitak vode pa je cilj dermatokozmetičkih formulacija zaustaviti gubitak vode dok se ponovno ne uspostavi strukturni integritet kože (53).

Hidratantne dermatokozmetičke formulacije imaju ključnu ulogu u osnovnoj njezi kože, osobito ako je smanjen sadržaj vode u rožnom sloju epidermisa ili oštećena epidermalna barijera.

Dermatokozmetičke pripravke za hidrataciju kože možemo definirati kao topikalne pripravke koji povećavaju/ zadržavaju sadržaj vode u rožnom sloju, obnavljaju oštećenu epidermalnu barijeru, obnavljaju i održavaju strukturni integritet i izgled kože (54).

### 1.3.2. Karakteristike suhe kože

Dermatokozmetički pripravci za hidrataciju kože topikalni su pripravci koji se koriste u njezi normalne kože, ali i za olakšanje i uklanjanje simptoma suhe kože.

**Suha koža** (xerosis cutis) stanje je kože sa smanjenim sadržajem vode u rožnom sloju (manje od 10 %), a karakteriziraju je vizualne, taktilne, osjetilne, kemijske i funkcionalne promjene.

#### Karakteristike suhe kože:

**vizualne promjene:** koža bez sjaja, crvenilo, ljuštenje, perutanje, čak i pukotine na koži

**osjetilne promjene:** osjećaj suhoće, neugode, boli, svrbeža i peckanja

**taktilne promjene:** gruba i neujednačena

**kemijske promjene:** smanjen sadržaj vode i smanjen sadržaj prirodnih faktora vlažnosti, NMF promjene u sastavu i organizaciji lipida

**funkcionalne promjene:** oštećena hidrolipidna barijera, povećana permeabilnost, smanjena otpornost na štetne utjecaje iz okoline, povećan transepidermalni gubitak vode (55).

Suhoća kože najčešći je klinički znak okolišno uvjetovanog dermatitisa kod kojeg je suhoća kože obično udružena sa oštećenom barijernom funkcijom kože. U nekim slučajevima suhoća kože može biti ograničena samo na vanjske, površinske dijelove kože sa očuvanom barijerom propusnosti u dubljim slojevima (56).

Iako ne postoje podaci koji potvrđuju ili opovrgavaju da je suha koža povezana sa smanjenjem sadržaja vode u rožnom sloju, dokazano je da se primjenom ovlaživača ublažavaju znakovi i simptomi suhe kože.

Pošto je sadržaj vode u rožnatom sloju važan za održavanje normalne strukture i funkcije rožnatog sloja, onda su i istraživanja usmjerena na evaluaciju sadržaja vode u ružnatom sloju.

Sadržaj vode u rožnatom sloju ovisi o:

- vodi koja difuzijom pristiže u rožnati sloj iz dubljih, vijabilnih dijelova epidermisa, a zadržava se zahvaljujući barijernoj funkciji lipidnih dvoslojeva.
- vodi prisutnoj u rožnatom sloju koju zadržavaju prirodni faktori vlažnosti
- ravnoteži između vode u površinskim slojevima rožnatog sloja i vanjske vlažnosti zraka pri čemu ovisno o rel.vlažnosti zraka, rožnati sloj može gubiti ili apsorbirati vodu
- primjeni hidratantnog kozmetičkog pripravka na površinu kože (57).

Klinički, suha koža definira se kao suha, ljuskava i gruba koža slabe fleksibilnosti, često praćena osjećajem svrbeža, gdje u ozbiljnim slučajevima, uz ljuskanje može doći i do pucanja kože uz nastanak fisura. Neki autori smatraju kako je suha kože povezana s poremećajima adhezije korneocita, a drugi da je povezana s deficitom epidermalnih lipida ili poremećajem sposobnosti rožnatog sloja da zadrži vodu. Predisponirajući faktori za suhu kožu su smanjen sadržaj vode u rožnatom sloju, epidermalna hiperproliferacija, neadekvatna sinteza lipida i oštećena epidermalna barijera (57, 58).

### **1.3.3. Funkcionalni sastojci dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože**

Dermatokozmetički pripravci za hidrataciju kože hidratiziraju kožu na dva načina: smanjenjem gubitka vode putem okluzivnog djelovanja ulja i lipida u formulaciji na površinu kože ili opskrblom rožnatog sloja vodom i zadržavanjem vode uz pomoć humektansa ili kombinacijom oboje. Neslužbena definicija koja proizlazi iz načina djelovanja dermatokozmetičkih pripravaka za hidrataciju kože jest da su to topikalni pripravci namijenjeni ublažavanju simptoma suhe i dehidrirane kože, a sadrže oba tipa funkcionalnih, kozmetičkih sastojaka za hidrataciju kože, i humektanse i okluzive, uz čest dodatak emolijensa (57, 59).

#### **1.3.3.1. Humektansi**

Humektansi su higroskopne tvari male molekulske mase koje imaju sposobnost da privlače i vežu vodu.

Iznimka su neki polimeri velike molekularne mase kao što su hijaluronska kiselina koja se u zadnjih desetak godina nametnula u dominantni ovlaživač i anti age sastojak.

Najčešće korišteni humektansi su glicerol, propilenglikol, panthenol, sorbitol, pirolidon-karboksilna kiselina, alfa-hidroksi kiseline (glikolna i laktatna kiselina), nikotinamid i urea.

Humektansi djeluju tako da povećavaju apsorpciju vode iz vijabilnih dijelova epidermisa u rožnati sloj, no onda se ta voda lako gubi isparavanjem s površine kože i povećava transepidermalni gubitak vode. Zbog toga se humektansi u kozmetičkim formulacijama gotovo uvijek kombiniraju s okluzivima kako bi se zadržao odgovarajući sadržaj vode u rožnatom sloju epidermisa (53, 60).

Humektansi se međusobno razlikuju prema svom kapacitetu vezanja vode, sposobnosti da prodiru kroz rožnati sloj i utjecaju na stupanj hidratacije rožnatog sloja epidermisa (55).

Humektansi se u ovlaživačima koriste kako bi povećali kapacitet, odnosno sposobnost rožnatog sloja za vezanjem vode.

Ovlaživači s humektansima superiorniji su u odnosu na ovlaživače koji ne sadrže humektanse u liječenju poremećaja suhe kože.

Osim na hidrataciju, humektansi utječu i na fizička svojstva rožnatog sloja pa se nakon apsorpcije humektansa iz ovlaživača povećavaju i hidratacija i elastičnost kože (55, 56).

### 1.3.3.2. Okluzivi

Okluzivi su tvari koje fizički blokiraju transepidermalni gubitak vode u rožnatom sloju epidermisa. Stvaraju hidrofobnu barijeru preko površine kože i sprečavaju isparavanje vode, a najučinkovitiji su kad se primjene na blago vlažnu kožu.

Stvaraju inertni, epikutani i okluzivni film na površini kože i fizički blokiraju transepidermalni gubitak vode.

Okluzivi su po sastavu mješavina dugolančanih ugljikovodika, masnih kiselina, masnih alkohola (lanolin), fosfolipida (lecitin), sterola (kolesterol), voštanih estera i biljnih voskova.

Najpoznatiji su tekući parafin i vazelin, složene mješavine ugljikovodika koji se često u literaturi nazivaju mineralnim uljima (55, 60).

Najučinkovitiji okluziv je vazelin, polučvrsta smjesa ugljikovodika koji već u koncentraciji od 5 % smanjuje transepidermalni gubitak vlage za više od 98 %, a slijede ga lanolin, mineralna ulja i silikoni koji smanjuju transepidermalni gubitak vode između 20 i 30 % (61).

Najnovija kategorija okluziva koje mnogi autori svrstavaju u emolijense, svakako su silikonska ulja kao što su dimetikon i ciklometikon.

Silikoni se često upotrebljavaju u dermatokozmetičkim formulacijama zato što su bez mirisa, hipoalergeni i nekomedogeni, ne smatraju se uljima, tekuće su konzistencije i masnog osjećaja na koži. Popravljaju estetska svojstva pripravaka jer smanjuju masnoću vazelina i poboljšavaju učinkovitost proizvoda (55).

### 1.3.3.3. Emolijensi

Emolijensi su masne tvari, lipidi ili ulja koje omekšavaju i zaglađuju površinu kože.

Sposobnost dermatokozmetičkog pripravka da učini kožu glađom naziva se emolijencija.

Emolijencija se odnosi na sposobnost pripravka da popuni brojne pukotine koje nastaju između korneocita u procesu deskvamacije, a česte su u stanjima suhe kože. Na taj način emolijensi "zaglađuju kožu".

Emolijensi su po svom kemijskom sastavu esteri, masni alkoholi i masne kiseline.

Najčešće korišteni emolijensi iz skupine estera su oleil-oleat, kaprilni trigliceridi, decil-oleat, izopropil stearat, izopropil palmitat, izopropil miristat.

Masne kiseline, obično dugolančane i zasićene (stearinska, linolenska, oleinska) i masni alkoholi (cetilni, stearilni) porijeklom su iz biljnih ulja.

Često se kao emolijensi koriste i pseudo ceramidi, skvalan i kolesterol koji se lako uklapaju u liposome u kozmetičkim pripravcima i čine teksturu kože glađom i mekšom (53, 60).

Emolijensi se međusobno razlikuju po teksturi i brzini apsorpcije u kožu pa izbor emolijensa ovisi o namjeni konačnog proizvoda za njegu kože.

Emolijensi koji su masniji i teže se razmazuju djeluju okluzivno pa su odličan izbor za noćne kreme i kreme oko očiju gdje je okluzivnost poželjna osobina.

Emolijensi slabije apsorpcije s više masnog osjećaja na koži najčešće su biljna ulja kao što su bademovo ulje, ulje marelice, ulje sjemenki grožđa i mnoga druga. Ako se kombiniraju sa laganijim emolijensima zadržavaju okluzivno djelovanje, ali uz smanjen osjećaj masnoće na koži.

Smatra se kako idealna kozmetička formulacija mora kombinirati barem tri do četiri različita emolijensa različitog stupnja apsorpcije u koži.

Taktilna svojstva različitih emolijensa određuju svojstva konačnog proizvoda.

Laganiji emolijensi brze apsorpcije daju pripravcima osjećaj glatkoće na koži, smanjuju masnoću ostalih sastojaka i povećavaju učinkovitost i dugotrajno djelovanje konačnog proizvoda (53).

Osim sposobnosti da zaglade i omekšaju kožu, emolijensi daju tzv. svilenkasti osjećaj na koži što je osobito važno za senzorijalnu domenu dermatokozmetičkog proizvoda.

Najveća razlika između emolijensa i okluziva je u molekularnoj masi, tako se ugljikovodici niske molekularne mase i silikoni poput dimetikona lagano nanose na kožu i brzo apsorbiraju (62).

### 1.3.4. Karakterizacija i vrste dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože

S obzirom na udio vode te ostalih hidrofilnih i lipofilnih tvari u formulaciji, moguća su četiri osnovna tipa dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože: losioni, kreme, masti i gelovi. Najčešće korištena vrsta dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože su kreme.

**Kreme** su u svom najjednostavnijem obliku kozmetičke emulzije, dvofazni sustavi koji sadrže dvije faze koje se ne miješaju, uljnu i vodenu, od čega je jedna faza uz pomoć emulgatora raspršena u drugoj fazi u kapljicnom obliku. Veličina kapljica može biti između 1-100  $\mu\text{m}$  što daje formulacije bijele boje.

Emulzije kod kojih je uljna faza raspršena u vodenoj fazi (U/V) češće su nego emulzije kod kojih je vodena faza raspršena u uljnoj (V/U).

Udio uljne faze u formulaciji obično iznosi između 15 i 30 %, ukoliko se povećava udio uljne faze to se odražava na teksturi formulacije pa ona postaje teža i masnija (55).

Tako nastaju tzv. "barijerne kreme" koje se najčešće primjenjuju za zaštitu jako suhe i oštećene kože jer formiraju zaštitni film na površini kože (59).

Novi tipovi emulgatora i pojačivači apsorpcije mogu znatno utjecati na poboljšanje kozmetičkih i senzorijskih svojstava kozmetičkih formulacija.

S obzirom na udio u formulaciji, tipičan sastav hidratantne kreme čine voda (80 %), ulja (20 %), emulgatori (5 %), humektansi (5 %), silikoni (1 %), biljni ekstrakti (2 %), antioksidansi (0.5 %), miris (0,2 %) (55).

Emulgatori su površinske aktivne tvari čija koncentracija u kremama obično iznosi između 1- 10 %.

U dermatokozmetičkim formulacijama za hidrataciju kože, najčešće se koriste anionski emulgatori koji u sastavu imaju dugolančane zasićene masne kiseline kao što su stearinska i palmitinska.

**Losioni** su kozmetičke emulzije s visokim udjelom vode (U/V emulzije) koje se zbog lagane teksture najčešće koriste za njegu tijela i područja obraslih dlakama.

**Masti** su jednofazni sustavi, mogu biti hidrofilne (miješaju se s vodom) ili hidrofobne (ne miješaju se s vodom), a koriste se kod jako oštećene kože kod koje je potrebno okluzivno djelovanje. Ne preporučuje se njihova primjena u područjima kožnih nabora i ostalih područja na koži sa povećanim sadržajem vode.

**Gelovi** su hidrofilne (hidrogelovi) ili hidrofobne tekućine (oleogelovi) gelirane odgovarajućim gelirajućim agensima. Najčešće se koriste za njegu lica zbog brze apsorpcije, za razliku od masti korisni su i za primjenu u intertriginoznim područjima kože (55, 60).

Funkcionalne sastojke dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože možemo podijeliti i na aktivne tvari (humektansi, esencijalne masne kiseline, ceramidi, vitamini, biljni ekstrakti) i ekscipijense (emulgatori, konzervansi, antioksidansi).

**Uljnu fazu** dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože najčešće čine mono-, di- i trigliceridi, voskovi, dugolančani esteri, masne kiseline, mineralna i biljna ulja. Biljna su ulja u posljednje vrijeme sve više zastupljena u dermatokozmetičkim formulacijama zbog svog prirodnog porijekla. Sastav masnih kiselina karakterističan je za neko biljno ulje i o njemu ovisi kakva će biti stabilnost tog ulja, osjećaj na koži, brzina apsorpcije i djelovanje na kožu.

Neka ulja sadrže esencijalne masne kiseline kao što su linolna i linolenska kiselina od kojih se u organizmu stvaraju novi nizovi omega- 3 i omega- 6 masnih kiselina (63).

Esencijalne masne kiseline utječu na fiziologiju kože preko svog djelovanja na hidrolipinu barijeru, proizvodnju eikosanoida, fluidnost staničnih membrana i signalne putove u stanicama.

Nalaze se uglavnom u epidermalnim fosfolipidima, ali su prisutne i u ceramidima gdje imaju ključnu ulogu u barijernoj funkciji kože. Najzastupljenija esencijalna masna kiselina u koži je linolenska kiselina i njen metabolit, arahidonska kiselina (64).

Voskove možemo podijeliti u životinjske, biljne i mineralne. Najčešće korišten životinjski vosak je lanolin. Lanolin (lat.lana- vuna, oleum- ulje) je složena mješavina estera, di-estera, hidroksi-estera velike molekulske mase, lanolinskih alkohola i lanolinske kiseline. Luče ga sebacealne žlijezde ovaca, za razliku od ljudskog sebuma, ne sadrži trigliceride.

Pčelinji vosak je složena mješavina ugljikovodika, masnih kiselina i estera.

Trigliceridi su esteri glicerola i dugolančanih masnih kiselina, a možemo ih podijeliti na ulja (tekući) i masti (kruti) biljnog ili životinjskog porijekla.

Najzastupljenija zasićena masna kiselina u trigliceridima je stearinska, a od nezasićenih masnih kiselina oleinska i linolenska.

Mineralna ulja su derivati petroleja, najvažniji su tekući parafin i vazelin po sastavu pročišćene, složene mješavine ugljikovodičnih lanaca koji se razlikuju po molekularnoj masi i viskoznosti.

**Emulgatori** su površinske aktivne tvari čija koncentracija u kremama obično iznosi 1- 10 %.

Emulgatori su površinski aktivne tvari koje sadrže hidrofilne i lipofilne dijelove u istoj molekuli, nisu potpuno topljivi ni u vodenoj ni u uljnoj fazi, imaju tendenciju da se raspoređuju na sučelju između dvije faze i na taj način potiču proces emulgacije.

Najčešće su korišteni anionski emulgatori, osobito oni koji u svom sastavu imaju dugolančane zasićene masne kiseline kao što su stearinska i palmitinska.

Djelovanje emulgatora na epidermalnu barijeru ovisi o njegovoj vrsti i udjelu u formulaciji.

Kolesterol je primjer neionskog emulgatora, a bitan je kao jedna od građevnih jedinica lipidnih dvoslojeva kožne barijere.

Neionski emulgatori imaju manji potencijal za izazivanje neželjenih reakcija na koži kao što su iritacija ili peckanje kože (63).

**Vodena faza** dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože, sadrži u najvećem dijelu vodu i u vodi topljive tvari humektanse, tvari male molekularne mase sa velikim afinitetom za vezanje molekula vode.

Humektansi se u ovlaživačima koriste kako bi povećali kapacitet, odnosno sposobnost rožnatog sloja za vezanjem vode (56).

Najčešće korišteni humektansi u hidratantnim pripravcima kao što su glicerol, propilen-glikol, alfa-hidroksi kiseline (osobito glikolna i mliječna) i urea, osim što vežu vodu i hidriraju rožnati sloj kože jako su učinkoviti eksfolijansi, tvari koje potiču deskvamaciju, odnosno ljuštenje površinskih slojeva kože (59).

### 1.3.5. Djelovanje dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože

#### Mehanizam djelovanja

Nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije na kožu, funkcionalni sastojci formulacije mogu ostati na površini kože, penetrirati u kožu, metabolizirati se u kožnim slojevima/odjeljcima, apsorbirati se preko kožne cirkulacije ili mogu nestati isparavanjem s površine kože.

Učinkovitost aktivnih sastojaka u dermatokozmetičkim formulacijama za hidrataciju kože povezana je s njihovom difuzijom kroz epidermalnu barijeru i koncentracijom u formulaciji. Male i topljive molekule s hidrofilnim i lipofilnim svojstvima imaju veću sposobnost prolaska kroz rožnati sloj kože u odnosu na neke polimere ili jako lipofilne tvari.

Sastav formulacije, struktura emulzije i topljivost aktivnih tvari u mikro okolišu formulacije koji je u dodiru s kožom određuju penetraciju aktivnih tvari.

Najjednostavniji način za utjecaj na penetraciju aktivnih tvari je promjena sadržaja lipida u formulaciji.

Kreme i masti kao oblici kozmetičkih proizvoda s većim udjelom lipida omogućavaju bolju penetraciju aktivnih tvari u kožu u odnosu na losione ili tinkture.

Odmah po primjeni formulacije dolazi do taktilnih i vizualnih promjena na površini kože.

Zaglađivanje površine kože rezultat je popunjavanja pukotina između ljuskica nastalih djelomičnom deskvamacijom korneocita (55, 56).

Nakon primjene dermatokozmetičke formulacije na površinu kože povećava se hidratacija rožnatog sloja kože. Što je koncentracija vode u formulaciji veća, više će vode permeirati u kožu.

Hidratacijsko djelovanje je kratkotrajno zato što se voda iz formulacije brzo gubi s površine kože isparavanjem pa je bitno da formulacija sadrži i okluzivne sastojke koji sprečavaju gubitak vode i produlju njeno zadržavanje u rožnatom sloju (65).

Osim što posrednim putem povećavaju sadržaj vode u rožnatom sloju tako što smanjuju gubitak vode s površine kože, lipidi mogu i penetrirati kroz rožnati sloj kože, pa i na taj način utjecati na barijerna svojstva kože (56).

#### Utjecaj na epidermalnu barijeru

Dermatokozmetičke formulacije za hidrataciju kože osim što povećavaju sadržaj vode u rožnatom sloju, utječu i na **strukturu rožnatog sloja i barijernu funkciju kože**.

Stupanj smanjenja, odnosno blokade transepidermalnog gubitka vode ovisi o sastavu, koncentraciji i vrsti lipida u formulaciji.

Lipidi nakon topikalne primjene stvaraju inertnu, epikutanu i okluzivnu membranu koja jednostavno smanjuje gubitak vode s površine kože (56).

Osim što smanjuju gubitak vode s površine kože, topikalno primijenjeni lipidi mogu penetrirati u kožu, pri čemu o vrsti i udjelu lipida u formulaciji ovisi brzina oporavka oštećene epidermalne barijere i narušene barijerne funkcije kože.

Primjena mješavina lipida sličnih međustaničnim lipidima rožnatog sloja kože kao što su ekvimolarne mješavine ceramida, kolesterola i slobodnih masnih kiselina u dermatokozmetičkim formulacijama brzo dovode do uklanjanja simptoma suhe kože i jačanja barijerne funkcije kože (66- 68).

O sastavu dermatokozmetičke formulacije ovisi da li će primjenom formulacije na kožu s oštećenom barijernom funkcijom doći do poboljšanja ili pogoršanja barijerne funkcije kože, odnosno epidermalne barijere propusnosti čak i ako dođe do olakšanja i vidljivog uklanjanja simptoma i znakova suhe kože (69- 73).

Barijerna funkcija kože procjenjuje se mjerenjem transepidermalnog gubitka vode.

Transepidermalni gubitak vode važan je pokazatelj barijerne funkcije kože, a služi i kao indikator permeabilnosti kože u odnosu na topikalno primijenjene tvari.

Permeabilnost kože prema različitim tvarima procjenjuje se primjenom tvari koje izazivaju vazodilataciju (nikotinati), iritaciju (natrij-lauril sulfat), eroziju (natrij-hidroksid), peckanje (laktati) i vazokonstrikciju.

Izlaganje kože kemikalijama, mikroorganizmima, nepovoljnim okolišnim uvjetima kao što su niske temperature i niska vlažnost zraka mogu uzrokovati simptome suhoće kože i abnormalnosti epidermalne barijere.

Akutni i kronični poremećaji epidermalne barijere propusnosti dovode do povećanog stvaranja i sekrecije citokina što za posljedicu može imati nastanak upale, povećanu proliferaciju keratinocita i epidermalnu hiperplaziju.

Simptomi suhoće kože i oštećene barijerne funkcije kože karakteristični su različite kožne bolesti kao što su atopijski dermatitis, psorijaza i ihtioza (63).

Sastojci dermatokozmetičkih formulacija mogu promijeniti lamelarnu i lateralnu organizaciju međustaničnih lipida i na taj način promijeniti permeabilnost kože.

Topikalno primijenjene tvari mogu prodrijeti dublje u kožu i djelovati na sintezu barijernih lipida i sazrijevanje korneocita čime ostvaruju utjecaj na veličinu korneocita i debljinu rožnatog sloja.

U nekim je studijama pokazano da se primjenom lipofilnih dermatokozmetičkih formulacija povećala debljina rožnatog sloja kože dok je nakon primjene hidrofilnih formulacija primjećeno smanjenje debljine rožnatog sloja kože. Moguće objašnjenje za smanjene debljine rožnatog sloja su ili osmotski efekt sastojaka u formulacijama ili što je vjerojatnije, povećana aktivnost proteaza uslijed povećanog sadržaja vode i posljedično tome pojačana deskvamacija (69).



### **1.3.6. Primjena dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju normalne kože**

Hidratantne kozmetičke formulacije se primjenjuju za njegu normalne kože kako bi spriječile suhoću kože, no vrlo je malo istraživanja o utjecaju tih formulacija na epidermalnu barijeru kod normalne, zdrave kože.

Poznato je da se kontinuiranom primjenom hidratantnih kozmetičkih formulacija kod zdrave kože povećava hidratacija rožnatog sloja bez promjene transepidermalnog gubitka vode budući da se zdrava koža odlikuje izvrsnim barijernim svojstvima (55, 56).

### **1.3.7. Neželjene reakcije**

Dermatokozmetičke formulacije za hidrataciju kože rijetko uzrokuju neželjene reakcije na koži nakon primjene.

Najčešće neželjene reakcije su osjetilne i subjektivne reakcije koje uključuju osjećaj peckanja i žarenja kože, a javljaju se odmah po primjeni hidratantne kozmetičke formulacije. Najčešće ih uzrokuju humektansi kao što su laktatna kiselina, urea i propilen-glikol dok gotovo da i nisu zabilježene neželjene reakcije na glicerol kao često korišten humektans (55).

### **1.3.8. Idealna dermatokozmetička formulacija za hidrataciju kože**

Idealna dermatokozmetička formulacija za hidrataciju kože trebala bi: povećati sadržaj vode u rožnatom sloju, učiniti kožu mekom i glatkom, obnoviti oštećenu epidermalnu barijeru i sposobnost rožnatog sloja da zadrži vodu, smanjiti transepidermalni gubitak vode, brzo se upiti u kožu i omogućiti trenutnu hidrataciju rožnatog sloja, imati dugotrajno djelovanje, biti hipoalergena, nekomedogena i bez mirisa (54).

Postoje jasni dokazi da je primjena dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože korisna u njezi normalne kože i u uklanjanju i olakšavanju različitih simptoma i znakova suhe kože. Jednostavnost i lakoća primjene, brza apsorpcija i trenutni, vidljivi učinak takvih formulacija potiču pacijente na suradljivost u primjeni. Najbolja hidratantna kozmetička formulacija za nekog pacijenta je ona koja odgovara njegovim sklonostima i specifičnim potrebama jer će ju na taj način redovito koristiti pa će samim tim biti i djelotvorna (55).

## 1.4. Hidratacijske studije ovlaživača

### 1.4.1. Mjerenje hidratacije i transepidermalnog gubitka vode

Hidratacijske studije dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože provode se kako bi se ispitalo njihov utjecaj na povećanje hidratacije rožnatog sloja i obnovu oštećene epidermalne barijere kod osoba sa normalnom ili suhom kožom.

U tu se svrhu ispituju parametri hidratacije rožnatog sloja i transepidermalnog gubitka vode.

Nemoguće je izmjeriti apsolutan sadržaj vode u rožnatom sloju epidermisa zato što voda nije jednolično raspoređena. U rožnatom sloju kože postoji strmi koncentracijski gradijent vode koji raste prema dubljim slojevima do vijabilnog epidermisa.

Za procjenu stupnja hidratacije površinskih dijelova rožnatog sloja kože koriste se metode koje se temelje na mjerenju električnih svojstava kože, najčešće primjenom visokofrekventne struje od 3,5 MHz. Električna svojstva kože u korelaciji su sa sadržajem vode u rožnatom sloju jer je suhi rožnati sloj tipičan medij slabe električne provodljivosti.

U hidratacijskim se studijama mjere električna svojstva kože kao što su konduktancija ili kapacitancija, a najčešće korišten uređaj za određivanje stupnja hidratacije rožnatog sloja je korneometar (57, 74).

Barijerna funkcija rožnatog sloja procjenjuje se mjerenjem transepidermalnog gubitka vode, TEWL-a, metodom evaporimetrije.

Na svakodnevnoj razini dolazi do pasivne difuzije vode iz dubljih slojeva epidermisa prema površinskim slojevima do njenog konačnog isparavanja u okoliš.

Rožnati sloj predstavlja polupropusnu barijeru između okoliša i vodom zasićenog vijabilnog epidermisa. Kod normalne zdrave kože taj je gubitak vode s površine kože minimalan. Gotovo nemoguće da bilo koja molekula veća od 500 kDa prođe kroz rožnati sloj epidermisa (74, 75).

Mjerenje brzine isparavanja vode kroz rožnati sloj pokazatelj je integriteta barijerne funkcije kože.

Odnos između protoka vode kroz rožnati sloj i sadržaja vode u rožnatom sloju je vrlo složen.

Zdrava koža s različitim rasponom vrijednosti hidratacije pokazuje normalne vrijednosti TEWL-a.

Povećane vrijednosti TEWL- a opažaju se kod različitih bolesti kože kao što su atopijski dermatitis, ihtioza, psorijaza dok u isto vrijeme ne mora nužno biti smanjen stupanj hidratacije rožnatog sloja. Povećane vrijednosti TEWL- a mogu se opaziti neposredno nakon primjene dermatokozmetičkih formulacija na površinu kože što je posljedica isparavanja vode no ne one iz rožnatog sloja nego vode iz same formulacije.

Smanjene vrijednosti TEWL- a opažaju se kad je koža pod okluzijom, bilo da je riječ o uljima, mastima, lipogelovima ili prikladnim emulzijama i to je smanjenje vrijednosti TEWL- a obično praćeno sporim povećanjem hidratacije rožnatog sloja (57).

### 1.4.2. Opće smjernice za studije hidratacije

Za provođenje hidratacijskih studija dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože primjenjuju se opće smjernice.

Prilikom provođenja hidratacijskih studija temperatura i vlažnost zraka trebaju biti konstantni, temperatura oko  $20 \pm 2$  °C, a vlažnost zraka oko  $45 \% \pm 5$  %.

Mjerenja se provode u klimatiziranim prostorijama na ispitanicima koji se barem 15 minuta prilagođavaju na uvjete u prostoriji.

Studije hidratacije izbjegavaju se ljeti kad je zahvaljujući visokoj vlažnosti zraka koža već optimalno hidratizirana, uglavnom se provode zimi kad je čest slučaj suhe, grube kože i ti su uvjeti idealni za studije hidratacije.

Za optimalne studije hidratacije važno je izabrati homogenu grupu ispitanika, primjerice iste dobi, sličnog tipa kože, iste etničke skupine. Obično se odabiru muškarci ili žene normalne, suhe ili vrlo suhe kože, normalne ili masne kože, fototipa II i III.

Broj sudionika studije treba bi biti takav da omogućava statističku analizu podataka, najmanji broj je između 12 i 15 ispitanika.

Za provođenje hidrationskih studija važan je odabir područja na koži na kojem se provode mjerenja zato što postoje razlike u debljini rožnatog sloja, broju i aktivnosti žlijezda znojnice te količini površinskih lipida na različitim područjima kože.

Najčešće se za studije hidratacije mjerenja provode na koži unutarnje strane podlaktice. Mjerenje se provodi na način da se konstantna, dobro definirana količina formulacije (1-3 mg/cm<sup>2</sup>) primijeni na površinu kože, nježno utrljava u kožu s prstom pokrivenim lateksnom rukavicom, a eventualni višak proizvoda ukloni papirnatim rupčićem. Ukoliko se testiraju različite hidratantne kozmetičke formulacije kao kontrolu je potrebno koristiti neku referentnu formulaciju (57).

### 1.4.3. Hidrationske studije

#### Kratkoročne hidrationske studije

Kratkoročne studije hidratacije dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože provode se odmah nakon primjene formulacije na unutarnju stranu obje podlaktice, a mjerenja se provode neposredno prije, zatim 1, 3 i više pa sve do 8 h nakon primjene formulacije.

Područje na unutarnjoj strani podlaktice na koje nije primjenjena ispitivana formulacija smatra se kontrolnim mjestom.

Nakon primjene dermatokozmetičke formulacije za hidrataciju kože raste vrijednost hidratacije rožnatog sloja, a zatim slijedi plato i sporo opadanje vrijednosti prema bazalnim mjerenjima, ovisno o učinkovitosti same formulacije. Posljedica je to kombiniranog djelovanja lipida i humektansa u primijenjenoj formulaciji u kojoj lipidi stvaranjem sloja na površini kože smanjuju evaporaciju, a humektansi povećavaju vezanje vode u rožnom sloju.

#### Dugoročne hidrationske studije

Dugoročne studije hidratacije dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože provode se na način da se ispitivana formulacija primjenjuje obično dva puta dnevno, a procjena stanja hidratacije kože provodi se nakon 2- 4 tjedna kontinuirane primjene formulacije.

U ovom radu provedena je kratkoročna studija hidratacije rožnatog sloja na 15 ispitanika s normalnom do suhom kožom.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako hidratantna kozmetička formulacija koja sadrži glicerol, hijaluronsku kiselinu, ceramide i hladno prešana biljna ulja utječe na hidrataciju rožnatog sloja kože kod osoba sa suhom kožom.

U tu je svrhu provedeno ispitivanje parametara hidratacije rožnatog sloja i transepidermalnog gubitka vode na uzorku od 15 ispitanika.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

Hidratantna kozmetička formulacija izrađena u ljekarničkoj jedinici OJ 2, Trg žrtava fašizma 8, Gradske ljekarne Zagreb, po svom sastavu je U/V krema sa 20 % hladno prešanih biljnih ulja u formulaciji, 5 % glicerola, 3 % ceramida i 0,2 % natrijevog hijaluronata u otopini hidrolata nerolija i pročišćene vode.

##### 3.1.1 Sastav hidratantne kozmetičke formulacije (INCI)

**Sastav:** Citrus aurantium amara flower water, Aqua purificata, Potassium olivoyl hydrolyzed oat protein, Cetearyl alcohol, Glyceryl stearate, Vitis vinifera seed oil, Argania spinosa kernel oil, Simmondsia chinensis seed oil, Vaccinium macrocarpon seed oil, Prunus Armeniaca Kernel oil, Glycerolum, Hexylene Glycol, Fructose, Glucose, Sucrose, Urea, Dextrin, Alanine, Glutamic acid, Aspartic acid, Hexyl nicotinate, Phospholipids, Sphingolipids, Coco-caprylate, Dimethicone, Citrus sinensis essential oil, Citrus reticulata essential oil, Sodium hyaluronate, Dehydroacetic Acid, Benzyl alcohol

#### Arganovo ulje

Ulje argana (INCI: Argania Spinosa Kernel oil), biljno je ulje dobiveno hladnim prešanjem koštica plodova drveta argana, Argania Spinosa (L.) Skeels, Sapotaceae, karakterističnog za suhe, jugozapadne predjele Maroka.

Arganovo ulje je cijenjeno kozmetičko ulje, zlatno žute boje, karakterističnog, nekima neugodnog mirisa. Ono se tradicionalno, stoljećima koristi u Maroku za ublažavanje ožiljaka od akni, njegu suhe i oštećene kože i kose.

Ulje argana sadrži visok udio (80 %) polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, fino uravnoteženog udjela oleinske (45 %) i linolne kiseline (35 %), dok su zasićene masne kiseline (stearinska i palmitinska) slabo zastupljene.

Arganovo ulje, osim nezasićenih masnih kiselina sadrži i polifenole, tokoferole, karotenoide, triterpenske alkohole, skvalen i sterole i upravo je taj specifični sastav odgovoran za djelovanje arganovog ulja.

S obzirom na visok udio nezasićenih masnih kiselina i antioksidansa, osobito  $\gamma$  tokoferola, arganovo se ulje uglavnom koristi za njegu i revitalizaciju suhe i zrele kože (82, 83).

Neobičan sastav sterola, od kojih dominiraju shtenol i spinasterol, karakterističan je za arganovo ulje. Zahvaljujući njima arganovo ulje pokazuje i protuupalno djelovanje, regenerira i omekšava kožu (84).

Za dermatokozmetičke pripravke koje sadrže arganovo ulje tvrdi se da povećaju vlažnost kože, ublažavaju ožiljke, revitaliziraju kožu i povećaju njenu elastičnost, smanjuje dubinu i vidljivost bora, čak i da smanjuju produkciju sebuma (85, 87).

## Ulje sjemenki grožđa

Ulje sjemenki grožđa (INCI: *Vitis vinifera* seed oil) blijedo je zeleno-žuto, do zeleno ulje ugodnog blagog ili karakterističnog mirisa na vino, dobiveno hladnim prešanjem osušenih sjemenki bobica grožđa, *Vitis vinifera* L. Vitaceae.

Ulje sjemenki grožđa sadrži visok udio (90 %) polinezasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, od čega je dominantna linolenska kiselina s udjelom od 58-78 %, ovisno o sorti grožđa.

Za razliku od arganovog ulja gdje dominira oleinska kiselina kao mononezasićena masna kiselina, kod ulja sjemenki grožđa oleinska kiselina je slabije zastupljena.

Ulje sjemenki grožđa osim nezasićenih masnih kiselina, sadrži značajnu koncentraciju vitamina E ( $\alpha$ -tokoferol), visokovrijednih fenolnih spojeva kao što su flavonoidi (kvercetin), polifenoli (katehin, epikatehin, resveratrol, procijanidini), karotenoidi i fitosteroli ( $\beta$ -sitosterol) sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem (88, 89).

Ulje sjemenki grožđa teksturom je ugodno ulje za kožu, a stoga što smanjuje lučenje sebuma pogodno je za njegu masne i mješovite kože. Ulje sjemenki grožđa je zbog visokog sadržaja antioksidansa korisno kod oštećene kože, ali i kod prvih znakova starenja kože jer povećava elastičnost i hidrataciju kože (88, 90).

## Ulje jojobe

Ulje jojobe (INCI: *Simmondsia chinensis* seed oil) ulje je zlatne boje, ugodnog i neutralnog mirisa dobiveno iz sjemenki drvenaste, pustinjske biljke *Simmondsia chinensis* (Link) C.K. Schneid., Simmondsiaceae.

Ulje jojobe je s obzirom na sastav, tekući vosak, smjesa nezasićenih, linearnih, dugolančanih tekućih voštanih estera, zlatne boje.

Jedinstveno je u odnosu na druga biljna ulja jer preko 97 % njegovog sastava čine linearni, dugolančani voštani esteri, uglavnom esteri dugolančanih nezasićenih masnih alokohola (C22- C24) i dugolančanih nezasićenih masnih kiselina (C22- C24).

Trigliceridi čine samo 3 % jojobinog ulja, a ostatak čine vrlo male količine fitosterola ( $\beta$ -sitosterol) i masnih alkohola.

Zbog svog specifičnog kemijskog sastava, ulje jojobe je iznimno stabilno ulje koje nije podložno oksidacijskoj razgradnji (91, 92).

Ulje jojobe je po sastavu slično prirodnom vosku cetaceumu, tradicionalno se stoljećima koristilo za liječenje opekotina, rana i različitih upala kože što je bilo i opravdano jer je današnjim studijama utvrđeno da ulje jojobe primjenjeno na kožu, ubrzava cijeljenje rana i pokazuje protuupalno djelovanje (93, 94).

Pošto je jojobino ulje tekući vosak, stvara lagani, zaštitni sloj na koži i sprečava njeno isušivanje, povećava hidrataciju kože, zaglađuje ju i omekšava (95, 96).

Ulje jojobe je po svom sastavu slično ljudskom sebumu, smanjuje njegovo lučenje pa je dobar izbor za njegu masne, aknama sklone kože (97, 98).

## **Ulje sjemenki američke brusnice**

Ulje sjemenki američke brusnice (INCI: Vaccinium macrocarpon seed oil) ulje je karakterističnog, voćnog, blago kiselog mirisa, žute boje koje se dobiva iz sjemenki američke brusnice, *Vaccinium macrocarpon* Aiton, Ericaceae.

Ulje sjemenki američke brusnice sadrži visok udio esencijalnih, nezasićenih masnih kiselina, linolne (30- 40 %) i  $\alpha$ - linolenske kiseline (35- 50 %) uz nešto manje količine oleinske kiseline (99). S obzirom na sastav kojeg čini visoki udio antioksidansa i jedinstvena mješavina omega- 3, omega- 6 i omega- 9 masnih kiselina kakva se nalazi u drugim biljnim uljima, ulje sjemenki američke brusnice cijenjeno je i jedinstveno biljno ulje (100).

Ulje sjemenki američke brusnice najbogatiji je prirodni izvor  $\gamma$ -tokotrienola, snažnog antioksidansa sa protuupalnim djelovanjem koji štiti stanice od oštećenja uzrokovanih UV zračenjem (101).

Ulje sjemenki američke brusnice skupo je i cijenjeno kozmetičko ulje koje se koristi za njegu suhe i oštećene kože, a kako djeluje na povećanje elastičnosti i čvrstoće kože te štiti kožu od štetnog UV zračenja, često se koristi u dermatokozmetičkim formulacijama za ublažavanje znakova starenja kože (100, 102).

## **Ulje marelice**

Ulje marelice (INCI: Prunus Armeniaca Kernel oil), bistro je ulje blijedo žute do žute boje, karakterističnog okusa i mirisa badema koje se dobiva iz koštica plodova marelice, *Prunus Armeniaca* L., Rosaceae.

Ulje marelice sadrži visok udio nezasićenih masnih kiselina (92 %) od čega najveći udio ima oleinska kiselina (59-74 %), a slijedi ju linolna kiselina (19-32 %) (103).

Osim visokog udjela nezasićenih masnih kiselina, ulje marelice sadrži fitosterole od kojih najveći udio ima  $\beta$ -sitosterol, a  $\gamma$ -tokoferol je dominantan oblik vitamina E (104).

Ulje marelice univerzalno je ulje za njegu svih tipova kože, lagane teksture, bez masnog osjećaja na koži te je kao takvo čest sastojak kozmetičkih pripravaka (105).

## **Hidrolat nerolija**

Hidrolat nerolija (INCI: Citrus aurantium amara flower water), vodeni je destilat cvjetova gorke naranče, *Citrus aurantium* L. ssp amara, Rutaceae dobiven tijekom proizvodnje skupocjenog, eteričnog ulja nerolija, destilacijom vodenom parom.

Odlikuje ga nježan, mekan i svjež miris po cvjetovima gorke naranče (106).

## **Eterično ulje naranče**

Eterično ulje naranče (INCI: Citrus sinensis essential oil), esencijalno je ulje dobiveno destilacijom kore plodova slatke naranče, *Citrus sinensis* L., Rutaceae (107).

## **Eterično ulje mandarine**

Eterično ulje mandarine (INCI: Citrus reticulata essential oil), esencijalno je ulje dobiveno destilacijom kore plodova mandarine, *Citrus reticulata* L., Rutaceae (107).

## Glicerol

Glicerol je često korišten kozmetički sastojak koji se u dermatokozmetičkim pripravcima koristi zbog svoje sposobnosti da vlaži i zagladi kožu.

S obzirom na kemijski sastav, glicerol je jako higroskopna tvar, izvrsno topljiva u vodi i s velikim afinitetom za vezanje molekula vode.

Glicerol se u dermatokozmetičkim formulacijama koristi kao humektans, a kako je riječ o maloju hidrofилnoj molekuli koja lako difundira kroz rožnati sloj i akumulira se kroz cijelu debljinu rožnatog sloja, ima važnu ulogu i u održavanju hidratacije kože (76, 77).

Studijama je utvrđeno da je razina hidratacije rožnatog sloja kože izravno povezana s razinom endogenog glicerola.

Za optimalno hidratizirajuće djelovanje glicerola na kožu, bitan je sastav kozmetičke formulacije i odgovarajuća koncentracija glicerola. Istraživanjima je utvrđeno da glicerol optimalno hidratizirajuće djelovanje pokazuje ako je uklopljen u U/V emulzije u minimalnoj koncentraciji od 3 %, optimalnoj između 5 % i 10 % (78).

Osim na povećanje hidratacije rožnatog sloja kože, glicerol djeluje i na homeostazu epidermalne barijere propusnosti.

Istraživanjima je utvrđeno kako ubrzava oporavak oštećene epidermalne barijere i smanjuje transepidermalni gubitak vode, povećava udio lipida u fluidnoj, tekućoj kristaliničnoj fazi i održava fluidnost lipidne membrane (79, 80).

Osim što povećava hidrataciju rožnatog sloja i djeluje na homeostazu epidermalne barijere propusnosti, glicerol pokazuje i keratolitičko djelovanje. Potiče razgradnju dezmosoma što je važno u stanjima kad je koža zbog smanjenog sadržaja vode u rožnom sloju suha i ljuskava, a povećano je nakupljanje korneocita na površini kože (81).

Glicerol ima i zaštitnu ulogu, štiti kožu od iritacije ili oštećenja epidermalne barijere uzrokovanu različitim tvarima iritativnog potencijala kao što je natrij-lauril sulfat koji je čest sastojak različitih pripravaka za čišćenje kože.

Glicerol ubrzava oporavak oštećene epidermalne barijere i potiče normalizaciju barijerne funkcije kože, poboljšava mehanička svojstva kože kao što su plastičnost i elastičnost i čini površinu kože glađom (77, 78).

## Hijaluronska kiselina

Hijaluronska kiselina (INCI: Hyaluronic acid; Sodium hyaluronate) bijela je praškasta tvar koja otapanjem u vodi stvara viskoznu otopinu ili gel.

Hijaluronska kiselina polimer je velike molekularne mase (1-2 MDa), po kemijskom sastavu glikozaminoglikan, polisaharid, sastavljen od ponavljajućih disaharidnih jedinica N-acetil-D-glukozamina i D-glukuronske kiseline.

Izrazito je higroskopna tvar, ima sposobnost vezanja velike količine vode, može vezati čak tisuću puta veću količinu vode u odnosu na vlastitu težinu.

Hijaluronska kiselina može biti u obliku kiseline (engl. hyaluronic acid) ili natrijeve soli (engl. sodium hyaluronate), a često se za oba oblika u literaturi koristi zajednički naziv, hijaluronan (108).

Zbog jedinstvenih fizičko-kemijskih karakteristika kao što su higroskopnost, biokompatibilnost, biorazgradivost, mukoadezivnost i viskoelastičnost ima široku primjenu u medicini, farmaciji i kozmetičkoj industriji.

Hijaluronska kiselina prirodno je prisutna u ljudskom tijelu, od čega se oko polovice nalazi u koži. Većina se hijaluronske kiseline u koži nalazi u izvanstaničnom matriksu dermisa, nešto manje u epidermisu. U dermisu je hijaluronska kiselina odgovorna za održavanje optimalne razine hidratacije, osmotsku ravnotežu, fizička svojstva i strukturni integritet ekstracelularnog matriksa. U koži ima važnu ulogu jer osim što joj daje elastičnost i hidratizira ju, stimulira proizvodnju kolagena, sudjeluje u procesima regeneracije kože i cijeljenju rana (109).



Starenjem se smanjuje količina hijaluronske kiseline proizvedene u koži što za posljedicu ima smanjenu hidrataciju i elastičnost kože, gubitak tonusa, stanjivanje kože i pojavu bora. Hijaluronska kiselina je često korišten sastojak u kozmetičkim emulzijama gdje predstavlja i humektans i aktivnu tvar.

Zbog sposobnosti vezanja velike količine vode, nastaju viskozne otopine čak i pri malim koncentracijama od svega 0,1 %.

Uobičajena koncentracija hijaluronske kiseline u vodenoj fazi kozmetičke emulzije iznosi 0,1 % - 0,2 %.

S obzirom da nijedna tvar molekularne mase veće od 500 kDa ne može proći rožnati sloj kože, hijaluronska kiselina se parcijalno hidrolizira na fragmente manje molekularne mase, tzv. niskomolekularnu hijaluronsku kiselinu. Upravo je niskomolekularna hijaluronska kiselina ona kojoj se pripisuje *anti age* djelovanje u kozmetičkim pripravcima.

Kao polimer velike molekularne mase, hijaluronska kiselina stvara nevidljivi film na površini kože i smanjuje isparavanje vode s površine kože i na taj način povećava hidrataciju i elastičnost kože. (110).

### **Dimetikon**

Dimetikon (INCI: Dimethicon), bezbojna je, bistra tekućina, bez mirisa, po kemijskom sastavu silikonski polimer, polidimetilsiloksan (engl. polydimethylsiloxane) (111).

U ispitivanoj je kremi korišten kako bi poboljšao osjetilnu funkciju kozmetičkog proizvoda jer siloksani daju osjećaj glatkoće.

### **Cetiol C5**

Cetiol C5 (INCI: Coco-caprylate), bezbojna je do blijedo žuta, bistra tekućina, bez mirisa, alkilni ester kaprilne kiseline i dugolančanih alkohola kokosa (112).

U emulzijskim sustavima koristi se kao pojačivač penetracije biljnih ulja, ostavlja lagan i gladak osjećaj na koži (53).

### **Hygroplex™ HHG**

Hygroplex (INCI: Hexylene Glycol, Fructose, Glucose, Sucrose, Urea, Dextrin, Alanine, Glutamic acid, Aspartic acid, Hexyl nicotinate) blijedo je žuta, vodena otopina, blagog, karakterističnog mirisa. Kompleks je prirodnih ovlaživača, odnosno smjesa higroskopskih tvari, mono i disaharida, aminokiseline, uree i heksil-nikotinata koji poboljšava mikrocirkulaciju u koži. U kozmetičkim se formulacijama koristi u koncentraciji između 2 % i 5 %.

Kao smjesa humektansa, koristi se za intenzivnu hidrataciju kože slično prirodnim faktorima vlažnosti u koži, sposobnost vezanja vode ne mijenja se ni u slučaju niske vlažnosti zraka. Pogodan je za primjenu u kozmetičkim emulzijama koje se koriste za njegu suhe, dehidrirane kože bilo da je suhoća uzrokovana nepovoljnim vremenskim uvjetima, bilo da je riječ o prirodnom procesu starenja kože (113).

### **Olivoil avenat**

Olivoil avenat (INCI: Potassium olivoyl hydrolyzed oat protein, Cetearyl alcohol, Glyceryl stearate, Glyceryl oleate), prirodni je emulgator biljnog porijekla, kao tvar dolazi u obliku blijedo žutih, prozirnih voskastih blokova.

Olivoil avenat sadrži hidrolizirane proteine zobi na koje su amidnom vezom vezane nezasićene masne kiseline iz maslinovog ulja, uz dodatak koemulgatora, cetearilnog alkohola i gliceril-monostearata.

Olivoil avenat se tali pri temperaturi 62- 67° C. U kozmetičkim emulzijama se koristi u

koncentracijama 2 % - 5 % za izradu fluidnih emulzija (uz obaveznu stabilizaciju vodene faze geliranjem) ili 5 % - 10 % za izradu emulzija bogatije teksture.

Kozmetičke formulacije koje sadrže ovaj emulgator, emulzije su strukture tekućih kristala, a odlikuje ih ugodna, glatka i bogata tekstura, s mekanim, glatkim i svilenkasti osjećajem na koži (114).

### **Ceramidni kompleks CLR™ K**

*Ceramide complex* CLR™ K (INCI: Water, Phospholipids, Sphingolipids) blijedo je žuta tekućina bez mirisa koja sadrži 2 % smjesu biljnih fosfolipida i sfingolipida kompleksne multilamelarne strukture tekućih kristala.

*Ceramide complex* koristi se u kozmetičkim emulzijama namijenjenim njezi suhe i oštećene kože jer povećava razinu hidratacije u koži i pomaže obnavljanju i održavanju zdrave barijerne funkcije kože.

*Ceramide complex* se u kozmetičkim emulzijama koristi u koncentracijama od 5 % - 10 %. Dobro penetrira u kožu, a zbog termolabilnosti dodaje se tek nakon emulgiranja i hlađenja emulzije, odnosno pri temperaturi od 35 °C (115).

### **Geogard 221**

Geogard 221 (INCI: Dehydroacetic Acid, Benzyl alcohol, Water), bistra je, blijedo žuto tekućina, sintetski konzervans, topljiv u vodi, dodaje se na kraju emulgacijskog procesa, koristi se u koncentracijama od 0,2 % - 0,8 % (116).

### **3.1.2. Postupak izrade hidratantne kozmetičke formulacije**

Hidratantna kozmetička formulacija izrađena je u laboratorijskoj čaši, upotrebom staklenog štapića i kozmetičkog miksera. Korištene su dvije laboratorijske čaše, jedna za sastojke vodene faze, druga za sastojke uljne faze.

Najprije se rastrlja hijaluronska kiselina s glicerolom, potom se doda hidrolat nerolija i pročišćena voda uz miješanje na magnetnoj miješalici. Nakon potpunog otapanja hijaluronske kiseline i nastanka viskozne otopine, doda se *Hygroplex*.

Vodena i uljna faza (emulgator i biljna ulja) zagriju se u vodenoj kupelji na 70 °C uz stalno miješanje uljne faze staklenim štapićem. Uljna faza se dodaje vodenoj te emulgira uz pomoć staklenog štapića i kozmetičkog miksera. Nakon hlađenja emulzije ispod 35 °C dodaju se ceramidi i emulzija homogenizira korištenjem profesionalnog uređaja FagronLab BCS- Basic Compounding System.

Svi materijali korišteni za izradu hidratantne kozmetičke formulacije nabavljeni su od tvrtke Fagron d.o.o. (Hrvatska) s pripadajućim analitičkim certifikatima i upotrijebljeni su kako su dobiveni.

## **3.2. METODE ISTRAŽIVANJA**

### **3.2.1. OPIS PROVEDENOG ISTRAŽIVANJA**

Kratkoročna studija hidratacije provedena je na 15 ispitanika s rasponom dobi od 20- 45 godina, nakon što su dali svoj pisani pristanak. Istraživanje je provedeno u ljekarničkoj jedinici 02, Trg žrtava fašizma 8, Gradske ljekarne Zagreb na način da je napravljena analiza kože pomoću uređaja Multiskin Test Center MC 1000 ("Courage+Khazaka electronic GmbH", Köln, Njemačka) neposredno prije, te u vremenima 1, 3 i 6 sati nakon primjene kozmetičke formulacije.

Mjerenja su provedena primjenom formulacije na središnji dio unutarnje strane podlaktice na površini kože od oko 9 cm<sup>2</sup> s kontrolnim mjestom na gornjem dijelu podlaktice.

Korištene su sonde za mjerenje hidratacije rožnatog sloja kože (korneometar) i sonde za mjerenje transepidermalnog gubitka vode.

Ispitanici su na dan ispitivanja, prije svakog mjerenja, proveli najmanje 15 minuta u ljekarničkoj jedinici, OJ 2, Trg žrtava fašizma 8, Gradske ljekarne Zagreb kako bi se koža potpuno prilagodila na sobnu temperaturu  $24 \pm 2$  °C i relativnu vlažnost zraka od 40- 60 %.

Ispitivanja su provedena na način da se mjerilo stanje hidratacije kože i transepidermalni gubitak vode prije primjene kozmetičke formulacije, te u vremenima 1, 3 i 6 sati nakon primjene formulacije.

Kako su izabrani ispitanici bili u kategoriji ispitanika s normalnom do suhom kožom, transepidermalni gubitak vode mjeren je kao pokazatelj barijerne funkcije kože.

### **3.2.2. ETIČKO ODOBRENJE I SUGLASNOST ISPITANIKA ZA SUDJELOVANJE**

Ispitivanje kozmetičke formulacije na hidrataciju rožnatog sloja ispitanika provedeno je po svim važećim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupaka i sigurnost osoba koje sudjeluju u znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 100/18, 125/19, 147/20) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Svi ispitanici su prije sudjelovanja potpisali Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ono provodi, koji je postupak i koji mogli biti rizici za njihovo zdravlje ukoliko pristanu sudjelovati. Identitet ispitanika ostao je povjerljiv i zaštićen.

Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

### 3.2.3. APARATURA

Multiskin Test Center MC 1000 profesionalni je modularni uređaj koji se sastoji od Visioscope kamere i različitih sondi za ispitivanje kože povezanih s računalno integriranim sveobuhvatnim softverskim programom pod nazivom Complete Skin Investigation (CSI).

Uz primjenu odgovarajućih računalno povezanih sondi (korneometar, sebumetar, pH metar, TEWL-metar, termometar) uređaj omogućuje objektivno i neinvazivno određivanje stanja kože (hidratacija, elastičnost, sadržaj sebuma), određivanje tipa kože, analizu hiperpigmentacijskih mrlja, analizu kapilara, crvenila na koži, širine i stanja pora, dubine i lokalizacije bora, mjerenje transepidermalnog gubitka vode (TEWL) i pregled kože mikrokamerom (117).



Slika 6. Multiskin Test Center MC 1000 (117)

### 3.2.3.1. KORNEOMETAR (Corneometer CM 825)

Korneometar je uređaj kojim se mjeri stupanj hidratacije površinskog sloja epidermisa, odnosno rožnatog sloja kože na dubini od 10-20  $\mu\text{m}$  od površine kože

#### Princip mjerenja:

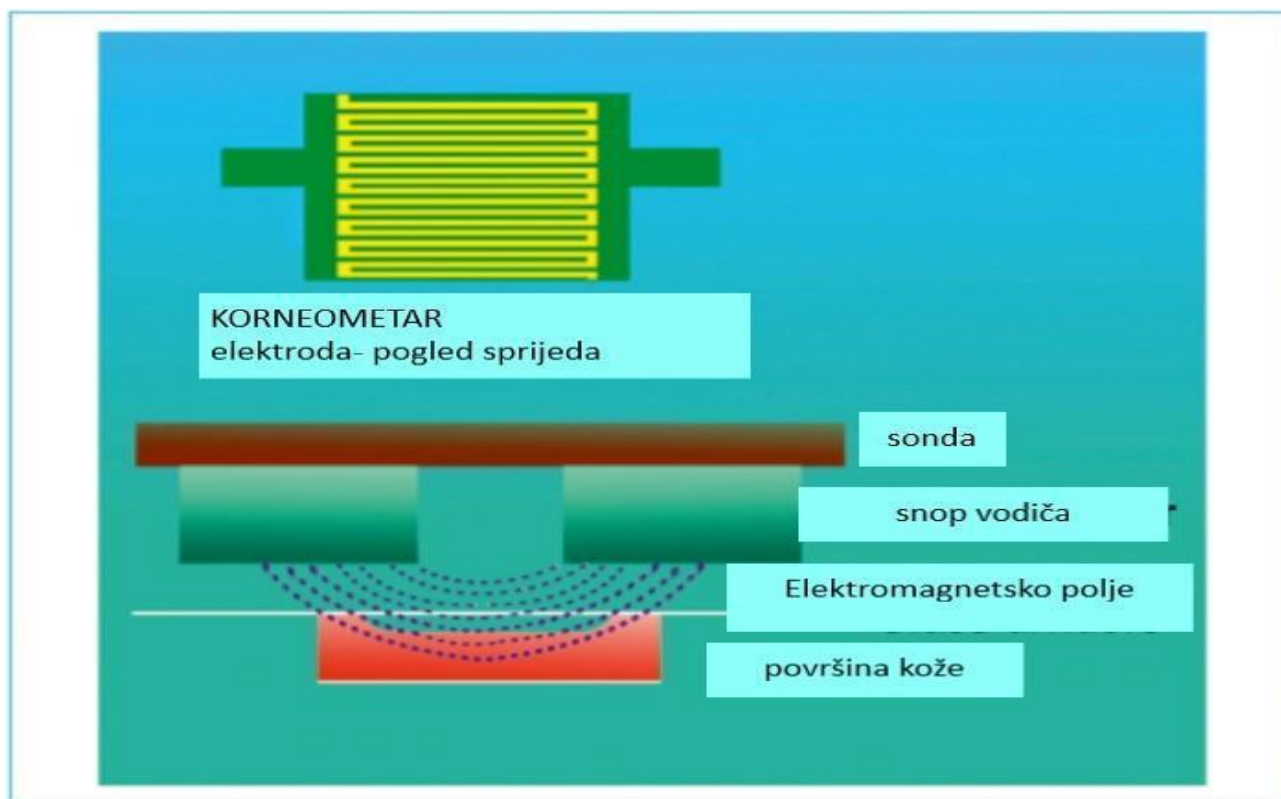
Mjerenje hidratacije zasniva se na mjerenju kapacitancije (kapacitivnog otpora) dielektričnog medija, u ovom slučaju rožnatog sloja kože. Povećanjem hidratacije rožnatog sloja kože mijenjaju se njegova dielektrična svojstva.

Mjerenje se zasniva na činjenici da voda ima veću dielektričnu konstantu ( $\epsilon=81$ ) od većine ostalih tvari ( $\epsilon<7$ ).

Korneometar sadrži dvije elektrode sa različitim električnim nabojima koje stvaraju elektromagnetsko polje koje određuje dielektričnost rožnatog sloja. Korneometar mjeri promjenu dielektrične konstante jer hidratacija kože u površinskom dijelu rožnatog sloja mijenja kapacitivni otpor preciznog kondenzatora.

Dielektrična konstanta (permitivnost) je mjera sposobnosti tvari da smanji sile između dva nabijena tijela. Ako se na tvar relativno visoke vrijednosti permitivnosti djeluje električnim poljem, magnituda električnog polja ovisit će o količini te tvari pa se na taj način određuje hidratacija površine kože.

Kapacitet pločastog kondenzatora ovisi o površini i razmaku između ploča te o permitivnosti tvari koja se nalazi između ploča.



Slika 7. Princip rada korneometra. Prilagođeno prema (119).

### Sonda- tehnički podaci:

- dimenzija 11 cm
- površina mjerenja 49 mm<sup>2</sup>
- jedinice: arbitrarne 0-120
- mjerni princip: kapacitancija
- frekvencija mjerenja: 0.9- 1,2 MHz
- točnost mjerenja:  $\pm 3 \%$  (118)

### Primjena metode:

Korneometar je profesionalni uređaj koji omogućuje točne i reproducibilne rezultate mjerenja hidratacije rožnatog sloja epidermisa što ga čini idealnim za ispitivanje učinkovitosti dermatokozmetičkih formulacija, procjenu stanja hidratacije kože, praćenje dermatološke terapije u kliničkim studijama, kreiranje kozmetičkih formulacija i odgovarajućih znanstvenih tvrdnji. Korneometar je uređaj koji mjeri stupanj hidratacije rožnatog sloja kao osnovni parametar dermatoloških i kozmetoloških ispitivanja.

### Prednosti metode:

Prednosti mjerenja hidratacije rožnatog sloja kože pomoću korneometra uključuju: vrlo brzo vrijeme mjerenja (1 sec), velika osjetljivost aparata koji detektira i najmanje promjene u razini hidratacije, reproducibilne vrijednosti mjerenja.

Sonda za mjerenje je izrazito malena, lagana i jednostavna za rukovanje, opruga ugrađena u sondu osigurava stalni tlak na površini kože, a moderna elektronika omogućava temperaturnu stabilnost i isključuje interferencije osnovnog kapaciteta ili bilo kakve oscilacije napajanja. Nema galvanskog kontakta između aparature i mjernog područja na koži (na rezultate ne utječu ionska provodljivost ili učinci polarizacije) (119).

Na rezultate mjerenja ne utječu preparati primjenjeni na kožu ni voda u dubljim slojevima kože jer se mjerenja provode u krajnjem površinskim dijelovima rožnatog sloja na dubini od 10-20  $\mu\text{m}$ . Ova metoda mjerenja hidratacije rožnatog sloja kože prihvaćena je u cijelom svijetu kao "korneometrija" sa velikim brojem kliničkih studija (118).

Korneometar je profesionalni uređaj koji se preporučuje za mjerenje hidratacije kože u najnovijim smjernicama koje su izdali stručnjaci EEMCO (European group of efficacy measurement and evaluation of cosmetics and other products) (120).



Slika 8. Korneometar (Corneometer CM 825) (118)

### 3.2.3.2. Sonda za mjerenje transepidermalnog gubitka vode; TEWL- a

Sonda za mjerenje TEWL- a je profesionalni uređaj kojim se mjeri transepidermalni gubitak vode kao najvažniji parametar za procjenu barijerne funkcije kože.

#### Princip mjerenja:

Mjeri se gradijent isparavanja vode, odnosno gradijent tlaka vodene pare uz pomoć dva senzora, jednog za temperaturu, a drugog za relativnu vlažnost koji se nalaze unutar šupljeg cilindra, tzv. "otvorenog odjeljka".

Metodom otvorenog odjeljka gradijent tlaka vodene pare izračuna se mjerenjem razlike u tlaku vodene pare između dvije različite točke poravnate okomito na površinu kože. Jedan otvoreni kraj sonde stavlja se na kožu dok drugi djeluje kao ispuh koji omogućuje vodenoj pari da izađe u atmosferu. Mjerenje ovim uređajem ograničeno je na horizontalne površine kože kako bi se izbjegle interferencije zbog prirodnog strujanja zraka.

Transepidermalni gubitak vode predstavlja permeaciju kondenzirane vode kroz rožnati sloj u vanjski okoliš putem difuzije (121).

Evaporacija vode izračunava se uz pomoć formule za Fickov zakon difuzije:

$$dm/dt = - D \times A \times dp/dx$$

$dm/dt$  – fluks vode =TEWL [g/m<sup>2</sup>/h]

D – difuzijski koeficijent vodene pare u zraku [g/m] pri određenom tlaku zraka

A – površina kože [m<sup>2</sup>]

$dp/dx$  – promjena tlaka vodene pare ovisno o udaljenosti od površine kože [mm Hg/m]

#### TEWAMETER TM 300 Courage + Khazaka electronics GmbH

#### Sonda tehnički podaci:

-šuplji cilindar dimenzije 2 cm, Ø 1 cm, sonda 15.3 cm

-površina kože 0.79 cm<sup>2</sup>

-težina 90 g

-vrijeme mjerenja 15 sec

-jedinice:indeksne vrijednosti 0-20

-točnost mjerenja ± 0.5 g/m<sup>2</sup>/h za RH ≥30 %;± 1.0 g/m<sup>2</sup>/h za RH ≤ 30 % u temperaturnom području 10-40 °C i TEWL vrijednosti < 70 g/m<sup>2</sup>/h

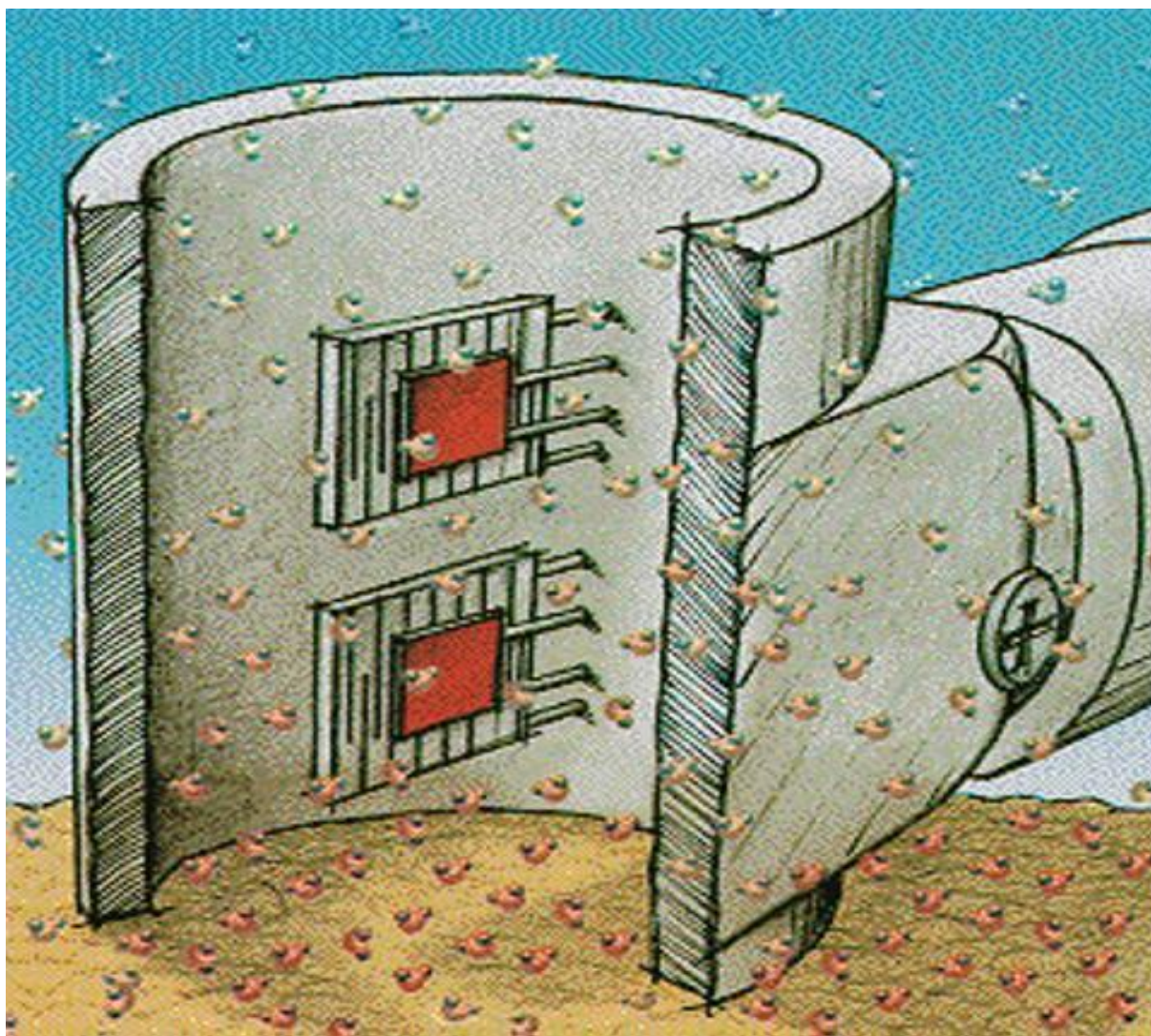
#### Prednosti metode:

korištenje otvorenog odjeljka pri mjerenju osigurava kontinuirano mjerenje TEWL-a bez utjecaja na površinu kože, mala veličina sonde osigurava minimalnu turbulenciju zraka pri mjerenju i lagano rukovanje (122).

#### Primjena metode:

kozmetičke i dermatološke studije učinkovitosti formulacija koje utječu na epidermalnu barijeru kod fizioloških i patofizioloških stanja kože, hidratacijske studije, potpora kozmetičkih tvrdnji za formulacije (blagost proizvoda, smanjenje iritacije, obnova oštećene kože, zaštita kože od UV zračenja), procjene sigurnosti formulacija, in vitro ispitivanja permeabilnosti kože (123)





Slika 9. Princip rada sonde za mjerenje transepidermalnog gubitka vode- TEWL- a, metoda "otvorenog odjeljka" (122).



## 4. REZULTATI

Za interpretaciju izmjerenih rezultata obavljena je deskriptivna statistička analiza, a podaci su obrađeni i vizualizirani računalnim programom Microsoft Office Excel 2019.

Usporedne vrijednosti za parametre hidratacije (AU) i TEWL-a ( $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ ) izmjerene na unutarnjoj strani podlaktice petnaest ispitanika neposredno prije, te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije prikazane su na **Slikama 10- 13**.

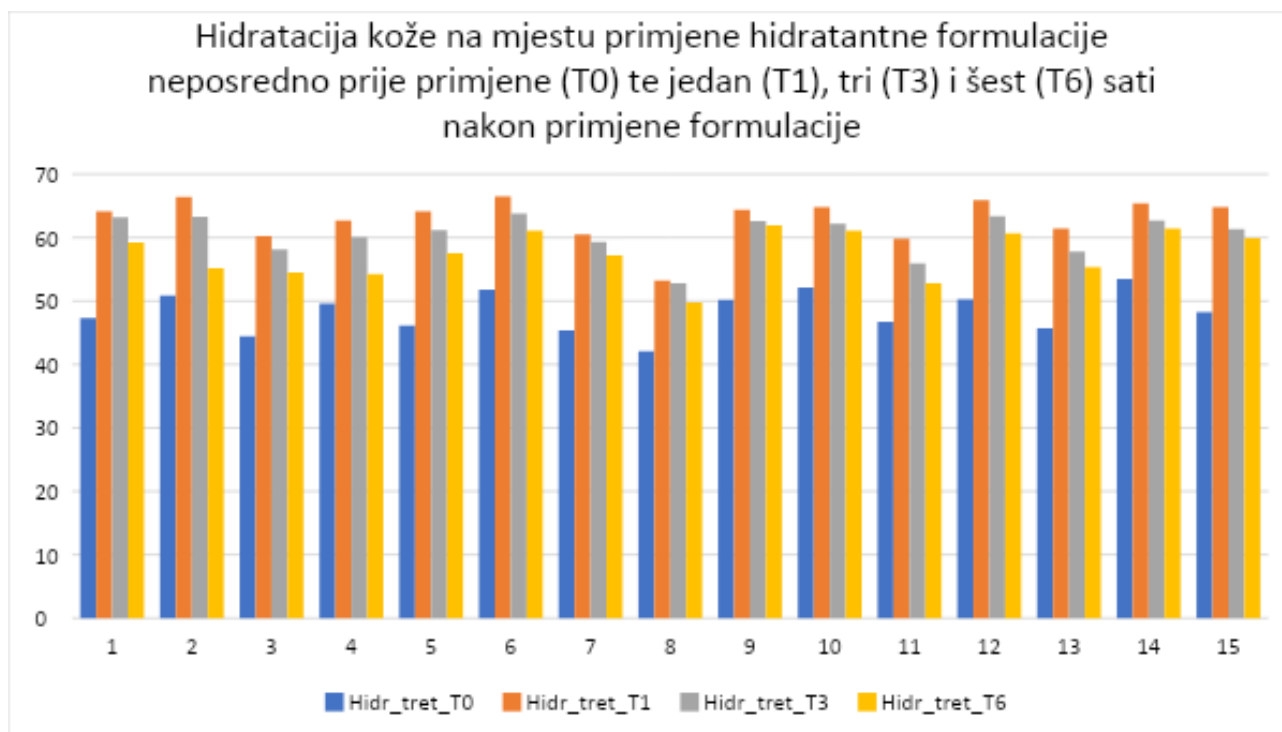
Iz rezultata prikazanih na Slici 10. vidljivo je povećanje vrijednosti parametara hidratacije u svih ispitanika, u svakoj vremenskoj točki izmjerenoj nakon primjene ispitivane hidratantne kozmetičke formulacije.

Iz rezultata prikazanih na Slici 11. vidljivo je kako se na kontrolnom mjestu (mjestu na unutarnjoj strani podlaktice na koje nije primijenjena hidratantna kozmetička formulacija) vrijednosti parametara hidratacije nisu značajnije mijenjale niti u jednoj vremenskoj točki.

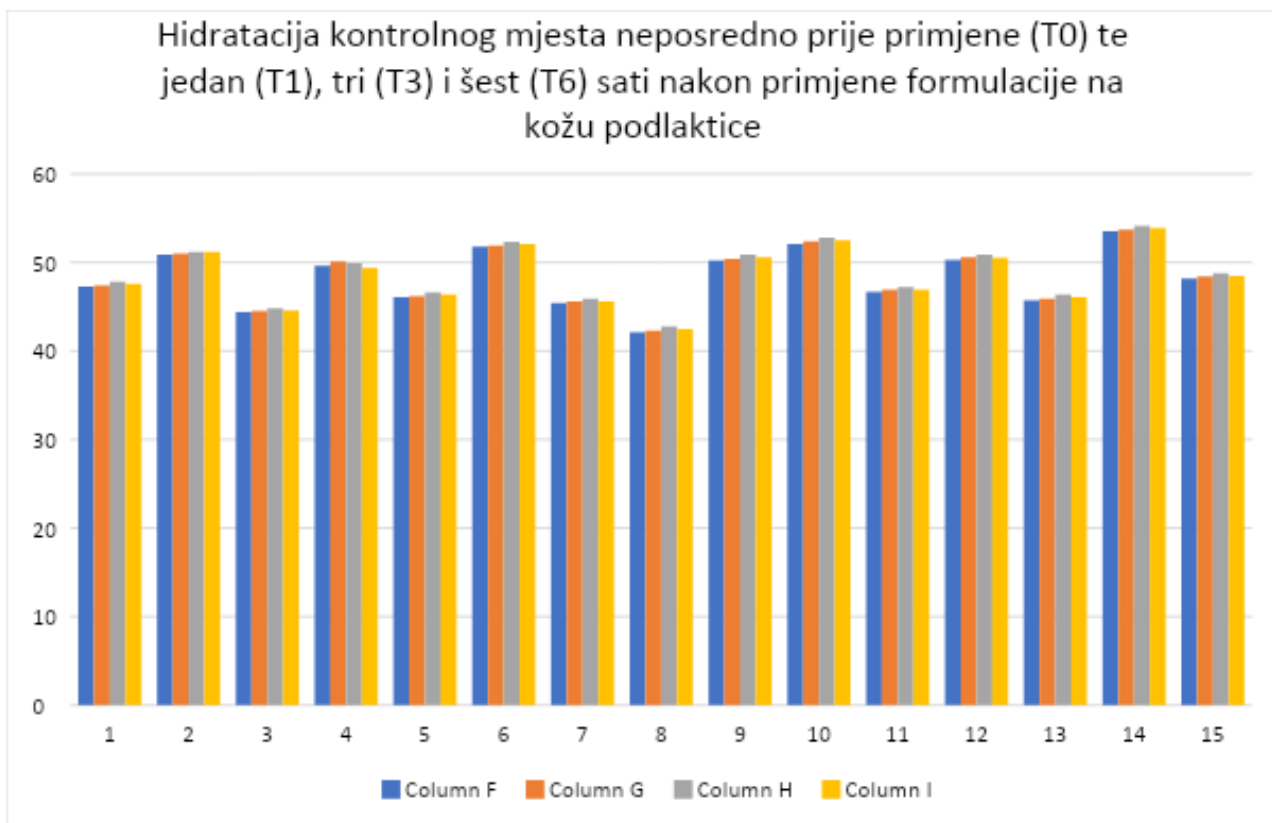
Slike 12. i 13. prikazuju vrijednosti parametara transepidermalnog gubitka vode, TEWL- a ( $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ ) na mjestu primjene hidratantne kozmetičke formulacije na podlaktici i kontrolnom mjestu neposredno prije, te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene formulacije.

Iz rezultata prikazanih na Slici 12. vidljivo je blago smanjenje vrijednosti parametra TEWL- a kod nekih ispitanika, u pojedinim vremenskim točkama nakon aplikacije ispitivane hidratantne kozmetičke formulacije.

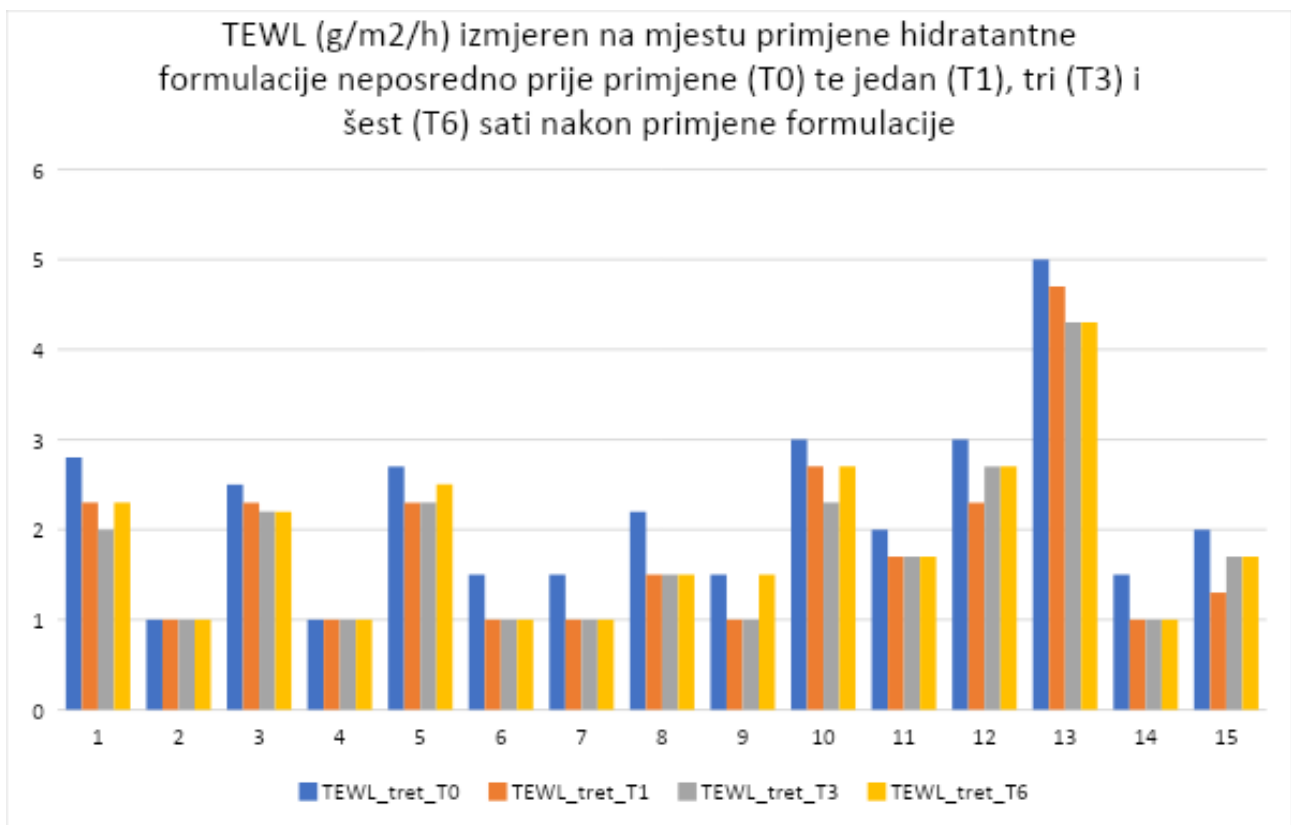
Iz rezultata prikazanih na Slici 13. vidljivo je kako se na kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice vrijednosti parametra TEWL nisu značajnije mijenjale niti kod jednog od ispitanika. Srednje, odnosno medijalne vrijednosti parametara hidratacije i TEWL-a izmjerenih na unutarnjoj strani podlaktice neposredno prije, te jedan, tri i šest sati nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije zajedno sa vrijednostima istih parametara izmjerenih na kontrolnom mjestu u cjelokupnom uzorku ispitanika prikazane su na **Slikama 14. i 15**.



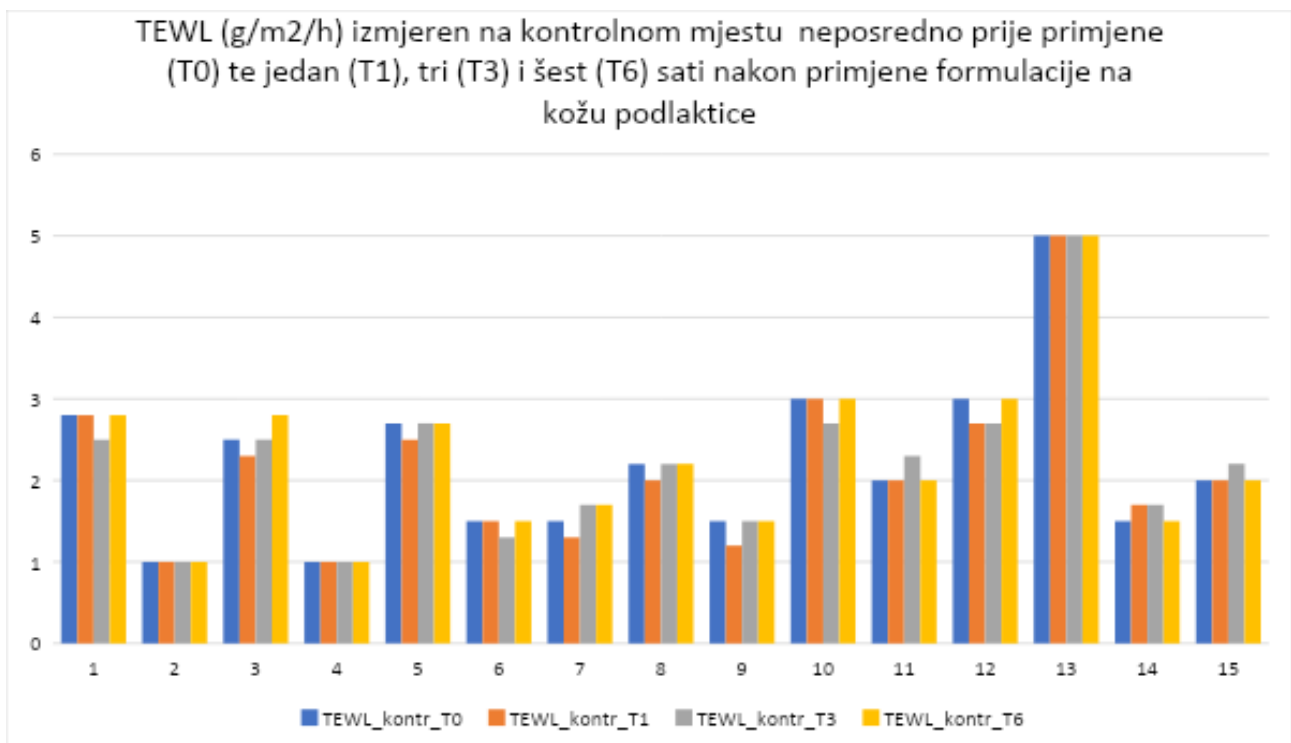
**Slika 10.** Hidratacija kože (AU) na mjestu primjene na unutarnjoj strani podlaktice svih ispitanika neposredno prije te u vremenima 1, 3 i 6 sati nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije



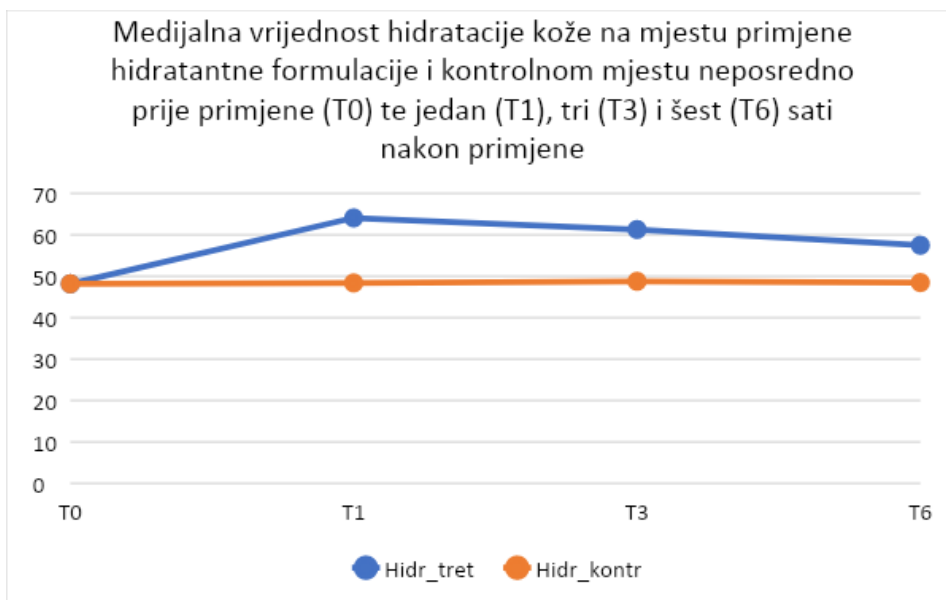
**Slika 11.** Hidratacija kože (AU) izmjerena na kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice svih ispitanika neposredno prije te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene ispitivane hidratantne kozmetičke formulacije



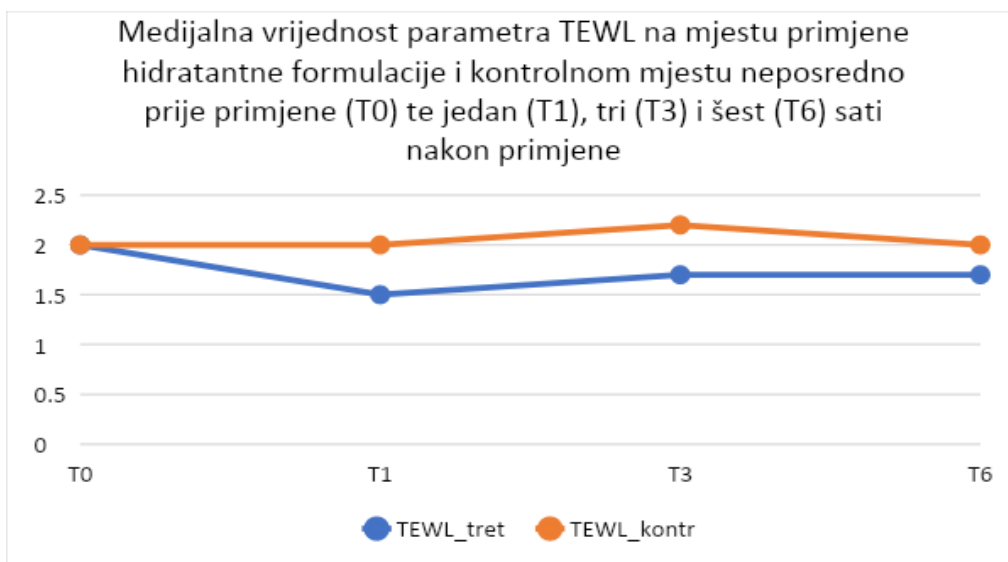
**Slika 12.** TEWL-vrijednosti izmjerene na unutarnjoj strani podlaktice svih ispitanika neposredno prije (T<sub>0</sub>), te u vremenima jedan (T<sub>1</sub>), tri (T<sub>3</sub>) i šest sati (T<sub>6</sub>) nakon primjene formulacije.



**Slika 13.** TEWL (g/m<sup>2</sup>/h) izmjeren na kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice ispitanika neposredno prije (T<sub>0</sub>), te jedan (T<sub>1</sub>), tri (T<sub>3</sub>) i šest sati (T<sub>6</sub>) nakon primjene formulacije.



**Slika 14.** Medijalna vrijednost parametra hidratacije kože (AU) izmjerenih na mjestu primjene hidratantne kozmetičke formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice svih ispitanika neposredno prije (T<sub>0</sub>) te jedan (T<sub>1</sub>), tri (T<sub>3</sub>) i šest sati (T<sub>6</sub>) nakon primjene ispitivane formulacije.



**Slika 15.** Medijalna vrijednost parametra TEWL-a (g/m<sup>2</sup>/h) izmjerenih na mjestu primjene hidratantne kozmetičke formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice svih ispitanika neposredno prije (T<sub>0</sub>) te jedan (T<sub>1</sub>), tri (T<sub>3</sub>) i šest sati (T<sub>6</sub>) nakon primjene ispitivane formulacije.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 14.** vidljivo je da je sat vremena nakon primjene ispitivane hidratantne kozmetičke formulacije na površinu kože, medijalna vrijednost parametra hidratacije kože povećana za oko 32 % u odnosu na početnu vrijednost (izmjerenu prije primjene formulacije), tri sata nakon primjene formulacije stopa povećanja iznosila je oko 27 % da bi nakon šest sati od primjene formulacije iznosila oko 19 %.

Sasvim očekivano, promjena medijalne vrijednosti hidratacije kontrolnog mjesta gotovo je nepostojeća.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 15.** vidljivo je da je sat vremena nakon primjene ispitivane hidratantne kozmetičke formulacije na površinu kože, medijalna vrijednost parametra TEWL-a smanjena za 25 % u odnosu na početnu vrijednost (izmjerenu prije primjene formulacije), tri sata nakon primjene formulacije stopa smanjenja iznosila je 15 % da bi nakon šest sati od primjene formulacije ostala nepromijenjena, odnosno iznosila 15 %.

Sasvim očekivano, slika pokazuje kako je promjena medijalne vrijednosti parametra TEWL- a kontrolnog mjesta gotovo nepostojeća.

S ciljem utvrđivanja statistički značajnih razlika između vrijednosti parametara hidratacije i TEWL-a izmjerenih na mjestu primjene hidratantne kozmetičke formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice ispitanika neposredno prije, te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije provedena je statistička obrada podataka rezultata primjenom Mann-Whitneyjevog U testa.

Uspoređene su vrijednosti parametara hidratacije izmjerenih na mjestu primjene hidratantne kozmetičke formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice ispitanika neposredno prije te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene formulacije. Isti statistički postupak primijenjen je i za izmjerene vrijednosti parametra TEWL.

S obzirom da ispitivana hidratantna kozmetička formulacija nije primijenjena na kontrolno mjesto na unutrašnjoj strani podlaktice, vrijednosti parametra hidratacije i TEWL-a izmjereni neposredno prije te u vremenima jedan, tri i šest sati nakon primjene formulacije poslužili su kao kontrola (kontrolne vrijednosti).

Rezultati inferencijalne statističke analize za utvrđivanje statističke značajnosti razlike u vrijednosti parametra hidratacije na ispitivanom i kontrolnom mjestu na unutrašnjoj strani podlaktice ispitanika u pojedinim vremenskim točkama nakon nanošenja hidratantne kozmetičke formulacije prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Statistički parametri (U, p,  $\alpha$ ) određeni primjenom Mann-Whitneyjevog U testa za usporedbu vrijednosti hidratacije izmjerenih na mjestu primjene i kontrolnom mjestu neposredno prije primjene ( $T_0$ ), te jedan ( $T_1$ ), tri ( $T_3$ ) i šest sati ( $T_6$ ) nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije.

Uspoređivani setovi varijabli	U-vrijednost	Standardna pogreška	P	$\alpha$
Hidratacija/vrijednosti mjesto primjene i kontrolno mjesto- početne vrijednosti (prije primjene)	112,50	24,069	1,000	0,05
Hidratacija/vrijednosti mjesto primjene i kontrolno mjesto-1h nakon primjene	1,00	24,104	0,000	0,05
Hidratacija/vrijednosti mjesto primjene i kontrolno mjesto- 3h nakon primjene	1,50	24,104	0,000	0,05
Hidratacija/vrijednosti mjesto primjene i kontrolno mjesto- 6h nakon primjene	7,00	24,106	0,000	0,05

Rezultati inferencijalne statističke analize za utvrđivanje statističke značajnosti razlike u vrijednosti parametra TEWL na ispitivanom i kontrolnom mjestu na unutrašnjoj strani podlaktice ispitanika u pojedinim vremenskim točkama nakon nanošenja hidratantne kozmetičke formulacije prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Statistički parametri (U, p,  $\alpha$ ) određeni primjenom Mann-Whitneyevog U testa za usporedbu vrijednosti TEWL-a izmjerenih na mjestu primjene i kontrolnom mjestu neposredno prije primjene ( $T_0$ ), te jedan ( $T_1$ ), tri ( $T_3$ ) i šest sati ( $T_6$ ) nakon primjene hidratantne kozmetičke formulacije.

Uspoređivani setovi varijabli	U-vrijednost	Standardna pogreška	P	$\alpha$
TEWL/vrijednosti mjesto primjene formulacije i kontrolno mjesto- početne vrijednosti (prije primjene)	112,50	23,788	1,000	0,05
TEWL/vrijednosti mjesto primjene formulacije i kontrolno mjesto- 1 h nakon primjene	142,00	23,807	0,215	0,05
TEWL/vrijednosti mjesto primjene formulacije i kontrolno mjesto- 3 h nakon primjene	149,00	23,801	0,125	0,05
TEWL/vrijednosti mjesto primjene formulacije i kontrolno mjesto- 6 h nakon primjene	142,50	23,872	0,209	0,05

Rezultati statističke analize prikazani u Tablici 1. ukazuju da nema statistički značajne razlike između vrijednosti hidratacije kože na mjestu primjene formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice ispitanika na samom početku ispitivanja, prije nanošenja hidratantne kozmetičke formulacije ( $p = 1,000$ ).

Nakon nanošenja hidratantne kozmetičke formulacije na unutarnju stranu podlaktice ispitanika, povećanje vrijednosti hidratacije mjesta primjene formulacije u usporedbi s kontrolnim mjestom statistički je značajno ( $p = 0,000$ ) u svakoj promatranoj vremenskoj točki.

Rezultati statističke analize prikazani u Tablici 2. ukazuju da nema statistički značajne razlike između vrijednosti TEWL-a na mjestu primjene formulacije i kontrolnom mjestu na unutarnjoj strani podlaktice ispitanika na samom početku ispitivanja, prije nanošenja formulacije ( $p = 1,000$ ). Nakon nanošenja hidratantne kozmetičke formulacije na unutarnju stranu podlaktice ispitanika, dolazi do blagih razlika u vrijednosti parametra TEWL u usporedbi s kontrolnim mjestom, no te razlike ni u jednoj vremenskoj točki nisu statistički značajne ( $p = 0,214$ ,  $p = 0,125$ ,  $p = 0,209$ ).

**Zaključak:**

Ispitivana hidratantna kozmetička formulacija primijenjena na unutarnju stranu podlaktice ispitanika dovela je do statistički značajnog povećanja hidratacije rožnatog sloja, dok je vrijednost transepidermalnog gubitka vode; TEWL-a nešto smanjena, ali ne dovoljno kako bi to bilo statistički značajno.

## 5.RASPRAVA

Odgovarajuća razina hidratacije rožnatog sloja epidermisa, bitna je za izgled i funkciju kože, odnosno za strukturni integritet i funkcionalnost zaštitne epidermalne barijere.

Dermatokozmetičke formulacije imaju ključnu ulogu u njezi kože, osobito ako je smanjen sadržaj vode u rožnatom sloju ili oštećena epidermalna barijera.

U slučaju oštećenja epidermalne barijere, dolazi do povećanog transepidermalnog gubitka vode i u tom je slučaju cilj dermatokozmetičkih formulacija zaustaviti gubitak vode dok se ponovno ne uspostavi strukturni integritet kože

Osim što povećavaju sadržaj vode u rožnatom sloju, dermatokozmetičke formulacije utječu i na strukturu rožnatog sloja i barijernu funkciju kože (53, 54).

Dermatokozmetičke formulacije hidratiziraju kožu djelovanjem na smanjenje gubitka vode s površine kože okluzivnim djelovanjem ulja i lipida u formulaciji ili opskrbom rožnatog sloja vodom i zadržavanjem vode uz pomoć humektansa ili kombinacijom oboje.

Hidratantna kozmetička formulacija koja se koristila u ovoj kratkoročnoj studiji hidratacije kao djelatne tvari za povećanje hidratacije kože sadrži **glicerol, natrijev hijaluronat i kompleksnu smjesu ovlaživača** (fruktoza, glukoza, sukroza, dekstrin, urea, alanin, glutamat, heksilen-glikol).

Humektansi se u kozmetičkim formulacijama koriste kako bi povećali kapacitet, odnosno sposobnost rožnatog sloja za vezanjem vode. Kozmetičke formulacije s humektansima superiornije su u odnosu na formulacije koje ih ne sadrže. Osim na hidrataciju, humektansi utječu i na fizička svojstva rožnatog sloja pa se nakon apsorpcije humektansa iz ovlaživača povećavaju i hidratacija i elastičnost kože (55).

Glicerol je dobro poznat kozmetički sastojak, jako higroskopna tvar i izvrstan humektans. U dermatokozmetičkim se pripravcima koristi već desetljećima zbog svoje sposobnosti da vlaži i zagladi kožu, ima važnu ulogu u održavanju hidratacije kože (76, 77).

Hijaluronska kiselina polimer je velike molekularne mase, izrazito higroskopna tvar koja može vezati velike količine vode, a posljednjih se godina nametnula kao dominantni ovlaživač i *antiage* sastojak (53, 109)

*Hygroplex*<sup>TM</sup> HHG, prirodan je kompleks ovlaživača, mješavina higroskopnih tvari, mono i disaharida, aminokiselina, uree i heksil-nikotinata koji poboljšava mikrocirkulaciju u koži.

Kao mješavina humektansa koristi se za intenzivno vlaženje kože, slično prirodnim faktorima vlažnosti (natural moisturizing factors; NMF) (113).

Ostali djelatni sastojci emulzije, **ceramidi** i nezasićene, **esencijalne masne kiseline**, linolna i linolenska (sadržane u biljnim uljima argana, američke brusnice, ulju sjemenki grožđa) obnavljaju i jačaju epidermalnu barijeru i smanjuju transepidermalni gubitak vode.

Lipidi nakon topikalne primjene tvore inertan, epikutani, okluzivni film na površini kože i fizički blokiraju transepidermalni gubitak vode.

Osim što posrednim putem povećavaju sadržaj vode u rožnatom sloju na način da smanjuju gubitak vode s površine kože, lipidi mogu i penetrirati kroz rožnati sloj kože pa na taj način, osim na povećanje hidratacije rožnatog sloja mogu utjecati i na barijerna svojstva kože (56).

Esencijalne masne kiseline, linolna i linolenska, utječu na fiziologiju kože preko svog djelovanja na hidrolipinu barijeru, proizvodnju eikozanoida, fluidnost membrana i signalne putove u stanicama (64).

Mjerenje hidratacije i transepidermalnog gubitka vode važno je u dermatologiji i kozmetologiji za procjenu stanja kože i učinkovitosti topikalno primijenjenih formulacija (120). Idealna dermatokozmetička formulacija omogućava trenutnu hidrataciju rožnatog sloja, čini kožu mekom i glatkom, povećava sadržaj vode u rožnatom sloju, obnavlja oštećenu hidrolipidnu barijeru i sposobnost rožnatog sloja da zadrži vodu, smanjuje transepidermalni gubitak vode, brzo se apsorbira, ima dugotrajno djelovanje, hipoalergena je, bez mirisa i nekomedogena (54).

Provjera učinkovitosti hidratantne kozmetičke formulacije provedena je na skupini od 15 ispitanika, s rasponom dobi od 19-45 godina, nanošenjem formulacije na unutarnju stranu podlaktice te mjerenjem parametara hidratacije i transepidermalnog gubitka vode neposredno prije, te jedan, tri i šest sati nakon primjene formulacije.

Mjerenjem parametra hidratacije, utvrđeno je da je hidratantna kozmetička formulacija nakon primjene na površinu kože povećala hidrataciju rožnatog sloja kože za 32 % prvi sat nakon primjene, 27 % tri sata nakon primjene, a šest sati nakon primjene 19 %. To je povećanje hidratacije rožnatog sloja značajno i dokazuje da ispitivana kozmetička formulacija povećava razinu hidratacije kože.

Transepidermalni gubitak vode mjeren je kao procjena barijerne funkcije kože ispitanika. Mjerenjem parametra TEWL- a utvrđeno je da je primjenom hidratantne kozmetičke formulacije transepidermalni gubitak vode smanjen za 25 % prvi sat nakon primjene, tri sata nakon primjene stupanj smanjenja iznosio je 15 %, a šest sati nakon primjene ostao je nepromijenjen i iznosio 15 %. Usporedbom rezultata s kontrolnim (ne-tretiranim) mjestom, utvrđeno je da blago smanjenje TEWL-a i nije statistički značajno.

Kontinuiranom primjenom dermatokozmetičkih formulacija za hidrataciju kože povećava se hidratacija rožnatog sloja kože bez promjene transepidermalnog gubitka vode. Smanjenje transepidermalnog gubitka vode važnije je kod suhe kože s oštećenom epidermalnom barijerom nego kod normalne kože s funkcionalnom epidermalnom barijerom (56).



## 6. ZAKLJUČAK

Rezultati kratkoročne hidratacijske studije kozmetičke formulacije za hidrataciju kože izrađene u ljekarničkoj jedinici 02, Trg žrtava fašizma 8, Gradske ljekarne Zagreb pokazali su da kozmetička formulacija zahvaljujući visokom udjelu humektansa (glicerola, natrijevog hijaluronata i kompleksne smjese ovlaživača) i odgovarajućem udjelu ceramida i biljnih ulja bogatih esencijalnim, nezasićenim masnim kiselinama značajno podiže razinu hidratacije kože (32 % - 1 h; 27 % - 3 h; 19 % - 6 h nakon primjene) i blago smanjuje transepidermalni gubitak vode (25 % - 1 h; 15 % - 3 h; 15 % - 6 h nakon primjene).

## 7. LITERATURA

1. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*. 2006;34(10):98-110.
2. Sahle FF, Gebre-Mariam T, Dobner B, Wohlrab J, Neubert RH. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2015;28(1):42-55.
3. Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*. 2004;17(1):43-48.
4. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in a healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(12):2080-2095.
5. Van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):295-313.
6. Baroni A, Buommino E, de Gregorio V, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*. 2012;30(3):257-262.
7. Takeshi M, Masayuki A. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International Immunology*. 2015;27(6):269-280.
8. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3471-3480.
9. Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*. 1983;80(1):44-49.
10. Norlen L, Al-Amoudi A. Stratum Corneum Keratin Structure, Function and Formation: The Cubic Rod-Packing and Membrane Templating Model. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004;123:715-732.
11. Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergology International*. 2018;67: 3-11.
12. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*. 2005;124(3):481-492.
13. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Therap*. 2004;17(1):6-15.
14. Elias PM, Gruber R, Crumrine D, Menon G, Williams ML, Wakefield JS, Holleran WM, Uchida Y. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):314-318.
15. Feingold KR. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2531-2546.
16. Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, An S. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int J Mol Med*. 2016;38(1):16-22.
17. Mojumdar EH, Gooris GS, Barlow DJ, Lawrence MJ, Deme B, Bouwstra JA. Skin lipids: localization of ceramide and fatty acid in the unit cell of the long periodicity phase. *Biophys J*. 2015;108(11):2670-2679.
18. Bouwstra J, Gooris G, Ponc M. The lipid organisation of the skin barrier: liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases. *J Biol Phys*. 2002;28(2):211-223.
19. Pappas A. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol*. 2009;1(2):72-76.
20. Elias PM. Stratum corneum defensive functions: An integrated view. *J Invest Dermatol*. 2005;125(2):183-200.
21. Egelrud T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl*. 2000;208:44-45.
22. Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:95-118.
23. Ishida-Yamamoto A, Igawa S. The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res*. 2015;360(3):477-482.
24. Haftek M. Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. *Cell Tissue Res*. 2015;360(3):483-490.

25. Igawa S, Kishibe M, Murakami M, et al. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol*. 2011;20(1):53-57.
26. Rawlings AV, Voegeli R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):217-235.
27. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci*. 2000;22(1):21-52.
28. Bonte F. Skin moisturization mechanisms: New data. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2011;69:135-14.
29. Blanc IH. Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 1952;18:433-440.
30. Pouillot A, Dayan N, Polla AS, Polla LL. The stratum corneum: a double paradox. *J Cosmet Dermatol*. 2008;7:143-148.
31. Warner RR, Myers MC, Taylor DA. Electron probe analysis of human skin: Determination of the water concentration profile. *J Invest Dermatol*. 1988;90(2):218-224.
32. Verdier-Sevrain S, Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol*. 2007;6:75-82.
33. Blank IH. Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 1953;21:259-271.
34. Rawlings AV, Matts PJ. Stratum corneum moisturization on a molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*. 2005;124:1099-1110.
35. Wertz PW. Stratum corneum lipids and water. *Exogenous Dermatol*. 2004;3:53-56.
36. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009;122:1285-94.
37. Čepelak I, Dodig S, Filipović Grčić J. Filaggrin-multifunkcijski protein. *Acta Med Croatica* 2016;70:125-130.
38. Hashimoto-Kumasaka K, Horii I, Tagami H. In vitro comparison of water-holding capacity of the superficial and deeper layers of the stratum corneum. *Arch Dermatol Res*. 1991;283(5):342-346.
39. Imokawa G, Hiroshi K, Kawai M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol*. 1991;96:845-85.
40. Takenouchi M, Suzuki H, Tagami H. Hydration characteristics of pathologic stratum corneum-evaluation of bound water. *J Invest Dermatol*. 1986;87(5):574-576.
41. Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijssse J, Wiechers JW, van Aelst AC. Water distribution and related morphology in the human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol*. 2003;120(5):750-758.
42. Warner RR, Stone KJ, Boissy YL. Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *J Invest Dermatol*. 2003;120(2):275-284.
43. Blanc IH. The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content. *J Invest Dermatol*. 1984;82:188-194.
44. Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S. Hyaluronan exists in the normal stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1184-1187.
45. Tammi R, Ripellino JA, Margolis RU, Tammi M. Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J Invest Dermatol*. 1998; 90: 412-414.
46. Bourguignon LY, Ramez M, Gilad E et al. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocytes differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1356- 65.
47. Choi EH, Man MQ, Wang F, Zhang X, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans? *J Invest Dermatol*. 2005; 125(2):288-293.

48. Fluhr JW, Mao-Qiang M, Brown BE et al. Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice. *J Invest Dermatol.* 2003;120:728–737.
49. Hara M, Ma T, Verkman AS. Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem.* 2002;277:46616–46621.
50. Black D, Del Pozo A, Lagarde JM, Gall Y. Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Res Technol.* 2000;6:70–6.
51. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2008;128(9):2145-2151.
52. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(1):13-28.
53. Draelos ZD. Therapeutic moisturizers. *Dermatol Clin.* 2000;18(4):597-607.
54. Lynde CW. Moisturizers: what they are and how they work. *Skin Therapy Lett.* 2001;6(13):3-5.
55. Loden M. The clinical benefit of moisturizers. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19(6): 672-687.
56. Loden M. Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clin Dermatol.* 2012;30(3): 286-296.
57. Barel AO, Clarys P, Gabard B. In Vivo Evaluation of the Hydration State of the Skin: Measurements and Methods for Claim Support. In: Elsner P., Maibach H.I., Merk H.F. (eds) *Cosmetics* 1999:57-80
58. Fischer TW, Wigger-Alberti W, Elsner P. Assessment of 'dry skin': current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(4):183-195.
59. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121(2):231-241.
60. Sethi A, Kaur T, Malhotra SK, Gambhir ML. Moisturizers: The Slippery Road. *Indian J Dermatol.* 2016;61(3):279-283
61. Ghadially R, Halkier-Sorensen L, Elias PM. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26(3 Pt 2):387-396.
62. Lee C, Bajor J, Moaddel T, et al. Principles of Moisturizer Product Design. *J Drugs Dermatol.* 2019;18(1s):89-95.
63. Loden M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol.* 2003;(11):771-788
64. Rhodes LE, Storey A. Essential fatty acids: biological functions and potential applications in the skin. In: *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function.* 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, 2006: 311–325.
65. Lodén M. The increase in skin hydration after application of emollients with different amounts of lipids. *Acta Derm Venereol.* 1992;72(5):327-330.
66. Lodén M, Barany E. Skin-identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape-stripped and detergent-perturbed human skin. *Acta Derm Venereol.* 2000;80:412-5
67. Chamlin SL, Kao J, Frieden IJ, et al. Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47:198-208.
68. Man MM, Feingold KR, Thornfeldt CR, Elias PM. Optimization of physiological lipid mixtures for barrier repair. *J Invest Dermatol.* 1996;106:1096-101.
69. Crowther JM, Matts P, Kaczvinsky J. Changes in Stratum Corneum Thickness, Water Gradients and Hydration by Moisturizers. In: *Treatment of Dry Skin Syndrome: The Art and Science of Moisturizers.* 2011;545-560
70. Held E, Sveinsdottir S, Agner T. Effect of long term use of moisturizer on skin hydration, barrier function and susceptibility to irritants. *Acta Derm Venereol.* 1999;79:49–51
71. Buraczewska I, Berne B, Lindberg M et al. Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2007; 156:492–498

72. Breternitz M, Kowatski D, Langenauer M et al. Placebo controlled, double blind, randomized prospective study of a glycerol-based emollient on eczematous skin in atopic dermatitis: biophysical and clinical evaluation. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21:39–45
73. Loden M, Andersson AC, Andersson C et al. Instrumental and dermatologist evaluation of the effect of glycerine and urea on dry skin in atopic dermatitis. *Skin Res Technol*. 2001; (7):209–213
74. Tagami H. Electrical measurement of the hydration state of the skin surface in vivo. *Br J Dermatol*. 2014;171(3):29-33.
75. Baker H, Kligman AM. Measurement of transepidermal water loss by electrical hygrometry. Instrumentation and responses to physical and chemical insults. *Arch Dermatol*. 1967;96(4): 441-452.
76. Fluhr JW, Darlenski R, Surber C. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol*. 2008;159(1):23-34.
77. Okamoto T, Inoue H, Anzai S et al. Skin-moisturizing effect of polyols and their absorption into the human stratum corneum. *J Cosmet. Sci*. 1998;49:57–5.
78. Fluhr JW, Bornkessel A, Berardesca E. Glycerol–Just a Moisturizer ? Biological and Biophysical Effects. In *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function*. 2 nd edition. CRC Press, Boca Raton, 2006: 227-243.
79. Fluhr JW, Gloor M, Lehmann L. et al. Glycerol accelerates recovery of barrier function in vivo. *Acta Derm. Venereol*. 1999, 79: 418–21.
80. Froebe CL. Prevention of stratum corneum lipid phase transition in vitro by glycerol-an alternative mechanism for skin moisturization. *J Soc Cosmet Chem*. 1990;41:51–65.
81. Rawlings A, Harding C, Watkinson A et al. The effect of glycerol and humidity on desmosome degradation in stratum corneum. *Arch Dermatol Res*. 1995; 287:457–64.
82. Guillaume D, Charouff Z. Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. *Eur J Lip Sci Technol*. 2011;113(4):403-408
83. Monfalouti HE, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z. Therapeutic potential of argan oil: a review. *J Pharm Pharmacol*. 2010;62(12):1669-1675.
84. Charouff Z, Guillaume D Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2008;110(7):632-636
85. Boucetta KQ, Charrouf Z, Aguenau H, Derouiche A, Bensouda Y. The effect of dietary and/or cosmetic argan oil on postmenopausal skin elasticity. *Clin Interv Aging*. 2015;10:339–49
86. Dobrev H. Clinical and instrumental study of the efficacy of a new sebum control cream. *J Cosmet Dermatol*. 2007;6(2):113–8.
87. Fabre B, Belle R, Charveron M, Baudouin C. Use of an unsaponifiable extract of plant pulp in the treatment of skin ageing. US 2009/0012049 P. Fabre Dermo Cosmetique SA, 2009.
88. Garavaglia J, Markoski MM, Oliveira A, Marcadenti A. Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutr Metab Insights*. 2016;9:59-64.
89. Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem*. 2008;108(3):1122-1132.
90. Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *Int J Mol Sci*. 2017;19(1):70
91. Pazyar N, Yaghoobi R, Ghassemi MR, Kazerouni A, Rafeie E, Jamshyidian N. Jojoba in dermatology: a succinct review. *G Ital Dermatol Venereol*. 2013;148(6):687-691.
92. El-Mallah MH, El-Shami SM. Investigation of liquid wax components of Egyptian jojoba seeds. *J Oleo Sci*. 2009;58(11):543-548.
93. Ranzato E, Martinotti S, Burlando B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. *J Ethnopharmacol*. 2011;134(2):443-449.
94. Habashy RR, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, Al-Azizi MM. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. *Pharmacol Res*. 2005;51(2):95-105.

95. Meyer J, Marshall B, Gacula M Jr, Rheins L. Evaluation of additive effects of hydrolyzed jojoba (*Simmondsia chinensis*) esters and glycerol: a preliminary study. *J Cosmet Dermatol*. 2008;7(4):268-274.
96. Matsumoto Y, Ma S, Tominaga T, et al. Acute Effects of Transdermal Administration of Jojoba Oil on Lipid Metabolism in Mice. *Medicina (Kaunas)* 2019;55(9):594.
97. Vaughn AR, Clark AK, Sivamani RK, Shi VY. Natural Oils for Skin-Barrier Repair: Ancient Compounds Now Backed by Modern Science. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(1):103-117.
98. Meier L, Stange R, Michalsen A, Uehleke B. Clay jojoba oil facial mask for lesioned skin and mild acne- results of a prospective, observational pilot study. *Forsch Komplementmed*. 2012;19(2):75-79.
99. Johansson A, Laakso P, Kallio H. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1997;204:300-307.
100. Johnson BJ, Lin B, Bongard JE. Genus *vaccinium*: medicine, cosmetics, and coatings. *Recent Pat Biotechnol*. 2010;4(2):112-124.
101. Yang B, Ahotupa M, Määttä P, Kallio H. Composition and antioxidative activities of supercritical CO<sub>2</sub>- extracted oils from seeds and soft parts of northern berries *Food Research Intern*. 2011;4(7):209-217.
102. Makpol S, Abidin AZ, Sairin K, Mazlan M, Top GM, Ngah WZ. gamma-Tocotrienol prevents oxidative stress-induced telomere shortening in human fibroblasts derived from different aged individuals. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(1):35-43.
103. Alpaslan M, Hayta M. Apricot kernel: Physical and chemical properties. *J Amer Oil Chem Soc*. 2006;83:469-471.
104. Turan S, Topcu A, Karabulut I, Vural H, Hayaloglu AA. Fatty acid, triacylglycerol, phytosterol, and tocopherol variations in kernel oil of Malatya apricots from Turkey. *J Agric Food Chem*. 2007;55(26):10787-10794.
105. Stryjecka M, Kiełtyka-Dadasiewicz A, Michalak M, Rachoń L, Głowacka A. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Oils from the Seeds of Five Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Cultivars. *J Oleo Sci*. 2019;68(8):729-738.
106. Ammar AH, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M, Zagrouba F. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* l. flowers essential oil (Neroli oil). *Pak J Biol Sci*. 2012;15(21):1034-1040.
107. Dosoky NS, Setzer WN. Biological Activities and Safety of *Citrus* spp. Essential Oils. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1966.
108. Stern R, Maibach HI. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation *Clin Dermatol*. 2008;26(2):106-122.
109. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium *Polymers (Basel)* 2018;10(7):701.
110. Šmejkalova D, Huerta G, Ehlova T. Hyaluronan (Hyaluronic acid): a natural moisturizer for skin care In *Harry's cosmeticology 9 th editon* 2015;2:605-622.
111. Walker EB, Naisbitt CS. Direct Analysis of Dimethicone in Aqueous Emulsions by Infrared Spectroscopy. *J Cosmet Sci*. 2019;70(4):209-216.
112. Fiume MM, Heldereth BA, Bergfeld WF, et al. Safety Assessment of Alkyl Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*. 2015;34(2 Suppl):5S-69S.
113. CLR ( Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH). Sažetak opisa svojstava proizvoda- Hygroplex™ HHG. 2008. Dostupno na: <https://www.clr-berlin.com/fr/products/hygroplex-hhg/>, pristupljeno 02.09.2020.
114. Kalichem. Sažetak opisa svojstava proizvoda- Olivoil avenate emulsifier. Dostupno na: <https://kalichem.it/allegati/brochure/olivoilavenatemulsifier-brochure.pdf>, pristupljeno 02.09.2020.
115. CLR ( Chemisches Laboratorium Dr. Kurt Richter GmbH). Sažetak opisa svojstava proizvoda- Ceramide complex CLR™ K. Dostupno na:

- <https://www.clr-berlin.com/products/ceramide/complex-clr-k>, pristupljeno 02.09.2020.
116. Lonza. Sažetak opisa svojstava proizvoda- Geogard 221. 2018. Dostupno na: <https://lonza.com/products-services/consumer-health/preservation/preservatives/geogard> pristupljeno 02.09.2020.
  117. Courage+Khazaka electronic GmbH. Multiskin Test Center MC 1000. Dostupno na: <https://www.courage-khazaka.de/en/products-for-cosmetic-consulting/all-products/23-produkte/alle-produkte/210-mc-100-e>, pristupljeno 02.09.2020.
  118. Courage+Khazaka electronic GmbH. Corneometer CM 825. Dostupno na: <https://www.courage-khazaka.de/en/scientific-products/all-products/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/183-corneometer-e>, pristupljeno 02.09.2020.
  119. Constantin MM, Poenaru E, Poenaru C, Constantin T. Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies. *Maedica (Buchar)*. 2014;9(1):33-38.
  120. Berardesca E, Loden M, Serup J, Masson P, Rodrigues LM. The revised EEMCO guidance for the in vivo measurement of water in the skin. *Skin Res Technol*. 2018;24(3):351-358.
  121. du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, et al. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration *Skin Res Technol. Hydration*. 2013;19(3):265-278.
  122. Courage+Khazaka electronic GmbH. Tewameter TM 300. Dostupno na: <https://www.courage-khazaka.de/en/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/172-tewameter-e>, pristupljeno 02.09.2020.
  123. Rogiers V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(2):117-128.