

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**DARIO LESKUR**

**MODEL IZAZIVANJA AKUTNOG IRITATIVNOG DERMATITISA**  
**POMOĆU NATRIJEVOG LAURILSULFATA NA LJUDIMA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**DARIO LESKUR**

**MODEL IZAZIVANJA AKUTNOG IRITATIVNOG DERMATITISA**  
**POMOĆU NATRIJEVOG LAURILSULFATA NA LJUDIMA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2020.**

Ova doktorska disertacija izrađena je u sklopu istraživanja na Katedri za farmaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je provedeno u prostorijama Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Darko Modun

## **Zahvala:**

*Prije svega se želim zahvaliti svom mentoru, prof. dr. sc. Darku Modunu, na pomoći i savjetima prilikom provođenja istraživanja i pisanja ove disertacije kao i na ukazanom povjerenju.*

*Hvala prof. dr. sc. Neiri Puizini Ivić, Ani Petrić i Lovri Zekanu na stručnoj i prijateljskoj pomoći u planiranju i provođenju istraživanja. Posebno hvala Lovri na svim satima koje je proveo s nama u laboratoriju pokušavajući stabilizirati nemoguću kremu.*

*Hvala Ani, Josipi i Doris, kolegicama s Katedre za farmaciju koje su bile stalna potpora i nesebično pomagale u provođenju istraživanja. Veliko hvala na svim obvezama koje su preuzele da mi olakšaju znanstveni rad, vlastitom slobodnom vremenu koje su uložile da se ostvari ovo istraživanje te poznanicima, prijateljima i rodbini koje su nagovorile na sudjelovanje.*

*Veliko hvala Heleni, Kristini i Ivani bez čije pomoći, napornog rada i nadljudske moći uvjeravanja ljudi da se uključe u istraživanje, ova disertacija ne bi bila moguća.*

*Želim iskazati posebnu zahvalnost svim ispitanicima koji su u ime znanosti žrtvovali svoju kožu i svoje slobodno vrijeme te time omogućili provođenje ovog istraživanja.*

*Neizmjerne hvala Heleni, Marku, Melani, Dinu, Damiru i Zvoni na prijateljstvu i velikoj potpori te svim kavama, zabavama i planinarenjima koji su mi pomogli da ostanem motiviran, ustrajem i privedem ovaj doktorski rad svom kraju.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, Mari i Draženu, sestri Lari i bratu Marinu na razumijevanju i potpori. Posebno hvala roditeljima na neizmjernoj žrtvi, odricanjima, ohrabrenjima i svemu što su mi u životu pružili, bez kojih danas ne bi bio tu gdje jesam.*

## SADRŽAJ

<b>POPIS OZNAKA I KRATICA.....</b>	<b>1</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>2</b>
1.1. Iritativni dermatitis .....	2
1.2. Model iritativnog dermatitisa .....	6
1.2.1. Model iritativnog dermatitisa induciran natrijevim laurilsulfatom .....	7
1.2.2. Ostali modeli iritacije i oštećenja kože.....	12
1.3. Neinvazivna mjerenja parametara kože .....	14
1.4. Problematika istraživanja .....	17
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE.....</b>	<b>19</b>
2.1. Ciljevi istraživanja .....	19
2.2. Hipoteze istraživanja.....	19
<b>3. METODE I MATERIJALI.....</b>	<b>20</b>
3.1. Ustroj i ishod istraživanja.....	20
3.1.1. Ispitanici .....	23
3.2. Postupci.....	24
3.2.1. Model iritativnog dermatitisa izazvanog natrij laurilsulfatom.....	24
3.2.2. Model mehaničke iritacije tape-stripping metodom.....	25
3.2.3. Model fizikalnog oštećenja kože ultraljubičastim zračenjem.....	25
3.2.4. Terapija .....	25
3.2.5. Mjere ishoda.....	26
3.3. Statistička analiza .....	27
3.3.1. Izračun veličine uzorka.....	27

3.3.2. Randomizacija.....	28
3.3.3. Statistički postupci .....	28
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>30</b>
4.1. Rezultati kliničkog pokusa 1 .....	30
4.1.1. Ispitanici .....	30
4.1.2. Transepidermalni gubitak vode.....	30
4.1.3. Vlažnost kože.....	32
4.1.4. Eritem .....	35
4.1.5. Stopa oporavka kože.....	38
4.1.6. Klinička procjena .....	39
4.1.7. Korelacija bazalnih vrijednosti s odgovorom kože .....	42
4.2. Rezultati kliničkog pokusa 2 .....	43
4.2.1. Ispitanici .....	43
4.2.2. Transepidermalni gubitak vode.....	43
4.2.3. Vlažnost kože.....	44
4.2.4. Eritem .....	45
4.2.5. Melanin .....	46
4.2.6. Stopa oporavka kože.....	47
4.2.7. Korelacija bazalnih vrijednosti s odgovorom kože u modelima oštećenja kože ...	49
4.2.8. Učinci topikalne terapije pripravkom s uljem gospine trave ( <i>Hypericum perforatum</i> ) .....	49
4.2.9. Potpuni pregled podataka za sve modele oštećenja kože i kontrolu .....	49
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>54</b>
5.1. Klinički pokus 1.....	54
5.1.1. Nedostatci i ograničenja kliničkog pokusa 1 .....	57

5.2. Klinički pokus 2.....	58
5.2.1. Nedostatci i ograničenja kliničkog pokusa 2 .....	62
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>63</b>
<b>7. SAŽETAK .....</b>	<b>64</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>65</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>66</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>77</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AUC	površina iznad krivulje (engl. <i>area upon the curve</i> )
C.I.	oznaka bojila (engl. <i>colour index</i> )
ESCD	Europsko društvo za kontaktni dermatitis (engl. <i>European Society of Contact Dermatitis</i> )
GM-CSF	faktor stimulacije rasta granulocitno–makrofagnih kolonija (engl. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
ICAM-1	(engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
IL-1 $\alpha$	interleukin 1 alfa
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-1RA	antagonist receptora za interleukin 1 (engl. <i>interleukin 1 receptor antagonist</i> )
IL-8	interleukin 8
IL-16	interleukin 16
MED	minimalna doza zračenja koja inducira nastanak eritema (engl. <i>minimal erythema dose</i> )
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
NMF	prirodni faktor vlaženja (engl. <i>natural moisturizing factor</i> )
PEG	polietilenglikol
PUVA	terapija kombinacijom topikalnih ili oralnih psoralena i UV A zračenja
SD	standardna devijacija
SLS	natrij laurilsulfat (engl. <i>sodium laurylsulphate</i> )
SOP	standardni operativni postupci
TEWL	transepidermalni gubitak vode (engl. <i>transepidermal water loss</i> )
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
UV	ultraljubičasto zračenje (engl. <i>ultraviolet radiation</i> )



# 1. UVOD

## 1.1. Iritativni dermatitis

Iritativni dermatitis je tip kontaktnog dermatitisa kod kojeg dolazi do lokalizirane kožne reakcije na različite agense iz okoliša (iritansi ili nadražajna sredstva), bez prethodne senzitivacije (1, 2). Iritansi mogu biti kemijski poput kiselina, lužina, organskih otapala te deterdženata i drugih površinski aktivnih tvari. Poznati su i fizikalni iritansi kao što su ultraljubičasto (UV) zračenje, drugi tipovi ionizirajućih zračenja, ali i okolišni čimbenici poput hladnoće i topline. Mehanički čimbenici poput trenja također mogu sudjelovati u nastanku ove vrste dermatitisa. Iritansi mogu biti biljnog podrijetla, uključujući sastojke hrane. Sastojci kozmetike ili topikalno primijenjenih lijekova također mogu djelovati nadražajno kao i tvari suspendirane u zraku poput iritirajuće prašine ili isparavanja. Uzrok iritativnog dermatitisa može biti i produženo izlaganje vodi (3).

Iritans uzrokuje oštećenje kožnog tkiva praćeno imunološkim odgovorom induciranim izravnim učinkom iritansa na keratinocite ili oštećenjem kožne barijere, što rezultira otpuštanjem proupalnih citokina i kemokina (4) Oštećeni keratinociti aktiviraju prirodenu imunost lučenjem citokina. Centralnu ulogu imaju interleukin 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ). Citokin IL-1 $\alpha$  je prethodno sintetiziran i pohranjen u keratinocitima te se njegovo lučenje smatra početnim korakom proupalne kaskade iritativnog dermatitisa (5). Pokazano je da su pojedini genski polimorfizmi IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$  povezani s povećanim i smanjenim rizikom razvoja iritativnog dermatitisa (6, 7). Navedena dva citokina imaju sinergistički učinak i rezultiraju daljnjom aktivacijom i otpuštanjem sekundarnih citokina poput interleukina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), faktora stimulacije rasta granulocitno–makrofagnih kolonija (GM-CSF) i interleukina 8 (IL-8) (6, 7). Ovi citokini aktiviraju Langerhansove stanice u epidermisu te dalje difuzijom prelaze u dermis gdje aktiviraju dermalne dendritičke stanice i stanice endotela (8). Citokin TNF- $\alpha$  povećava ekspresiju gena glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC) skupine II i adhezijskih molekula kao što je ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) u fibroblastima i stanicama endotela (1, 5). Kao konačni učinak dolazi do regrutacije i infiltracije neutrofila, limfocita, makrofaga i mastocita na mjesto oštećenja i daljnjeg napredovanja upalnog procesa (1, 7).

Iritativni dermatitis se može manifestirati nizom različitih simptoma, ovisno o intrinzičnim svojstvima samog iritansa, njegovoj koncentraciji, trajanju kontakta s kožom,

učestalosti izloženosti i postojanju predisponirajućih čimbenika koji mogu utjecati na podložnost razvoja iritacije individualnog pacijenta (2, 5). Intrinzična svojstva o kojima će ovisiti simptomi koje će izazvati iritansi su njegova molekularna građa, toksičnost, topljivost, lipofilnost, pH i pK vrijednosti i agregatno stanje (5). Također, o svojstvima iritansa će ovisiti i njegov put ulaska u kožu. Iritans može prodrijeti u kožu intercelularnim putem (između stanica rožnatog sloja), transcelularno (kroz stanice) te difuzijom preko folikula i žlijezda znojnice. Također je moguć prodor kroz mjesta gdje je narušena kožna barijera, npr. kod pacijenata s atopijskim dermatitisom ili kroz ozljede i rane na koži (8). Upravo je postojanje bolesti ili stanja kod kojih dolazi do poremećaja kožne barijere jedan od čimbenika rizika za razvoj kontaktnog dermatitisa, što uz atopiju, uključuje suhoću kože (kserozu) neovisno o njenoj etiologiji, druge kožne bolesti i pojačano znojenje (5). O navedenim čimbenicima će također ovisiti iritirajući potencijal i simptomi nakon izlaganja (5).

Akutno izlaganje iritansu dovodi do nastanka pojava na koži koje variraju od blagog eritema i edema, eksudacije, do nastanka bula, plikova, krvarenja, pa i do erozija, ulceracija i nekroze u slučaju izloženosti snažnom, kaustičnom iritansu (3, 5, 9). Promjene na koži mogu biti praćene osjećajem pečenja, žarenja, boli ili svrbežom (5, 10). Promjene su najčešće lokalizirane na mjestu kontakta s iritansom i imaju oštru granicu prema nezahvaćenoj i neoštećenoj koži (5). Kod akutne iritacije nastup kožnih promjena je brz. Međutim, nekad se prvi simptomi javljaju od 8 do 24 sata nakon izlaganja. Tada govorimo o odgođenom akutnom iritativnom dermatitisu. Ovaj tip iritacije je karakterističan za iritanse poput kalcipotriola, ditranola, benzalkonijevog klorida, tazarotena ili propilen glikola (5). Kronični iritativni dermatitis je posljedica ponovljenog izlaganja blagom iritansu, koji može biti kemijski, fizikalni ili mehanički. Pojedino izlaganje nije dovoljno da izazove iritaciju. Međutim, uslijed višestrukog izlaganja dolazi do kumulativnog učinka, nadvladana je mogućnost obrane i popravka kože te dolazi do njenog oštećenja. Klinički znakovi kroničnog oblika iritativnog dermatitisa su blagi eritem, suhoća kože, zadebljanje kože, lihenifikacija i hiperkeratoza često praćena nastankom ragada te svrbež i bol (5, 11, 12). Oštećenja su ograničena na mjestima kontakta s iritansima, ali za razliku od akutnog oblika, lezije su slabije definirane (3, 5). Osim navedenih tipova iritativnog dermatitisa, postoji još tipova iritacije koje imaju svoju karakterističnu kliničku sliku. Jedan od njih je subjektivna iritacija koju karakterizira osjetilna nelagoda, obično trnci, žarenje, ili svrbež bez vidljivih promjena na koži i bez postojanja histoloških dokaza iritacije (5, 13). Simptomi nastaju unutar nekoliko sekundi do minuta nakon izlaganja iritansu, obično na licu te se često iritansima smatraju sastojci kozmetike (5, 13).

Iritativne reakcije su kožne reakcije na iritans bez tipične kliničke slike dermatitisa. Karakteriziraju ih jedan ili više od sljedećih simptoma: crvenilo, ljuštenje, ispucalost kože, pustule i erozije. Obično dolazi do brzog cijeljenja koje je praćeno zadebljanjem kože, iako u slučaju ponovljenih epizoda iritacije može napredovati u kronični dermatitis (5). Iritativni dermatitis nakon akutne ozljede kože, uslijed izlaganja vrlo snažnom iritansu, karakterizira nepotpuni oporavak prvotne ozljede kojeg prati pojava lezija nalik onima kod numularnog dermatitisa (5). Iritacija se može javiti i uslijed ponovljenog trenja kože, što je praćeno simptomima eritema, hiperkeratoze i ragada (5).

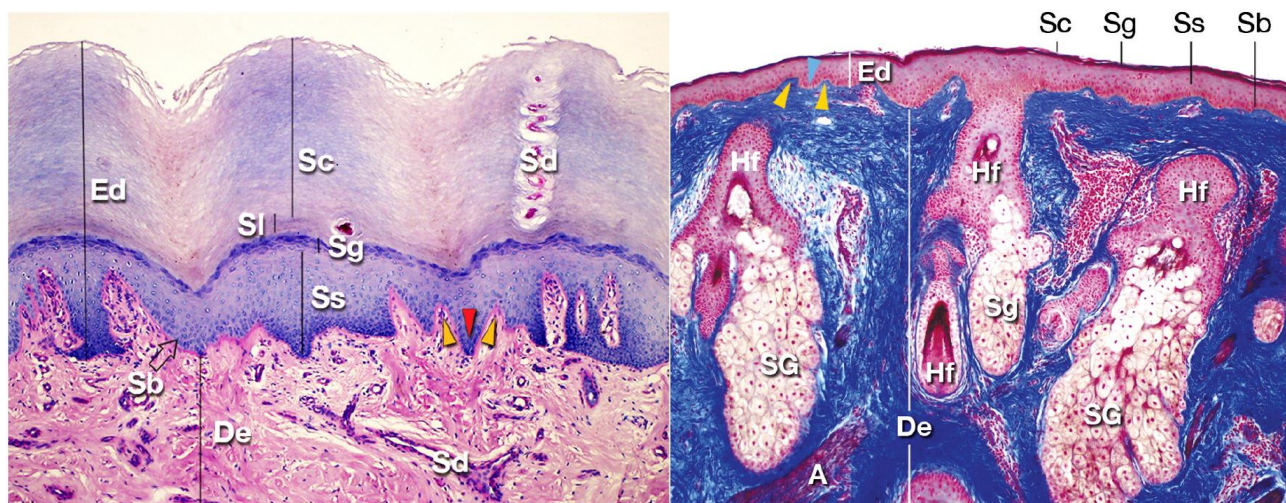
Iritativni dermatitis je česta profesionalna bolest, uslijed izloženosti iritansima na radnom mjestu (11, 14). Kontaktni dermatitis se smatra uzrokom većine profesionalnih kožnih bolesti u Europi (15) te razlogom 4-7% svih dermatoloških konzultacija u Ujedinjenoj Kraljevini (13). Za uspješno liječenje i kontrolu iritativnog dermatitisa je potrebno prepoznati i izbjegavati kontakt s iritansima, odnosno koristiti zaštitna sredstva kada ih nije moguće izbjeći (1, 11, 14). U slučaju izlaganja iritansu, potrebno je isprati zahvaćeno mjesto vodom ili vodom sa sredstvima za čišćenje koja ne sadrže sapun (sindet). Općenito se pacijentima s aktivnim kontaktnim dermatitisom ili s rizikom razvoja istog za svakodnevnu higijenu preporučuje primjena sindeta umjesto sredstava koje sadrže sapune ili druge površinski aktivne tvari koje mogu djelovati iritativno (1, 5, 11, 14). Ruke su najčešće mjesto izlaganja i nastanka iritacije te se savjetuje korištenje rukavica. Polivinil kloridne, lateksne ili nitrilne rukavice mogu biti dostatne za svakodnevne kućanske poslove, međutim za profesionalne potrebe treba odabrati rukavice od odgovarajućeg materijala ovisno o tvarima kojima je osoba izložena (5, 14). Također, pojedine rukavice mogu doprinijeti nastanku dermatitisa, npr. vulkanizirajuća sredstva iz gumenih rukavica mogu izazvati alergijsku reakciju. Potrebno je redovno skidati i mijenjati rukavice s ciljem sprječavanja vlažnosti uslijed znojenja. Iz tog razloga se preporuča koristiti rukavice koje su iznutra obložene pamukom ili nositi gumene rukavice preko pamučnih. Iritaciji može doprinijeti i trenje izazvano rukavicom kao i okluzija koju ona stvara (1, 5, 14). Postoje i zaštitne kreme koje nakon nanošenja na kožu stvaraju tanki film koji onemogućava izravni kontakt iritansa s kožom, međutim njihova klinička korist nije potvrđena (11, 14). Emolijentne kreme, koje poboljšavaju vlažnost kože, mogu se koristiti svakodnevno s ciljem prevencije iritacije intaktne kože, ali i terapijski s ciljem ubrzanja oporavka iritirane kože, iako je za potvrdu njihove učinkovitosti potrebno još istraživanja (1, 11, 14). Uz prevenciju kontakta s iritansima i primjene emolijentnih pripravaka, topikalna terapija izbora su kortikosteroidi. Ne postoji dovoljna količina podataka koji podržavaju njihovu primjenu u

iritativnom dermatitisu (10), postoje kontradiktorni podaci o njihovoj učinkovitosti u terapiji (1, 5, 10, 16), a moguće je da ometaju oporavak rožnatog sloja kože (17). Smjernice Britanskog društva dermatologa predlažu primjenu inhibitora kalcineurina poput takrolimusa kod pacijenata kod kojih je primjena kortikosteroida kontraindicirana ili nije dovela do učinka (14). Međutim, svi pripravci na hrvatskom tržištu su registrirani samo za liječenje atopijskog dermatitisa, a ne i kontaktnog. Za liječenje teškog kroničnog kontaktnog dermatitisa ruku pozitivnu preporuku ima i terapija tretinoinom (14, 17). Prethodno spomenute smjernice preporučuju i primjenu fototerapije UV zračenjem, i to kombinaciju UV A i topikalno ili oralno primijenjenih psoralena, odnosno PUVA terapiju (14). Sustavna primjena kortikosteroida i imunomodulatora poput ciklosporina ili azatioprina je jedna od ponuđenih opcija liječenja, međutim nema dovoljno dokaza o učinkovitosti navedene terapije kod iritativnog dermatitisa te pripravci nisu registrirani za tu indikaciju (14, 17).

Uz iritativni dermatitis, postoji i drugi tip kontaktnog dermatitisa - alergijski kontaktni dermatitis. Alergijski kontaktni dermatitis je reakcija preosjetljivosti tipa IV, gdje dolazi do reakcije imunološkog sustava na alergen na koji je pacijent prethodno senzitiviran (4). Stoga alergeni aktiviraju i specifičnu, stečenu imunost, za razliku od iritansa, koji aktiviraju samo urođenu imunost. Razlika u mehanizmu nastanka dovodi do razlika u svojstvima ta dva tipa kontaktnog dermatitisa. Upalni medijatori pronađeni u rožnatom sloju kože pacijenata s dva tipa kontaktnog dermatitisa su vrlo slični, međutim, razlikuju se u količini interleukina 16 (IL-16) koji je značajno viši u alergijskom dermatitisu (4). Patohistološka analiza oba tipa dermatitisa pokazuje nespecifične promjene, međutim postoje male razlike poput folikularne spongioze u ranoj fazi iritativnog dermatitisa koja nije primjetna u ranoj fazi alergijskog dermatitisa (4). Također, kod iritacije prevladava infiltracija neutrofila, u odnosu na alergijski gdje prevladava infiltracija limfocita i ostalih mononuklearnih stanica (3). Klinički je jako teško razlikovati alergijski i iritativni dermatitis (10). Glavna klinička razlika je mnogo brži nastanak iritacije, u odnosu na alergijsku reakciju, koja se javlja 24-48 sati nakon ponovljenog izlaganja alergenu (3). Alergijski češće izaziva svrbež dok bol češće prati iritativni dermatitis (10).

## 1.2. Model iritativnog dermatitisa

S ciljem ispitivanja iritativnog potencijala različitih tvari, istraživanja mehanizama kojima nastaje iritacija, praćenja promjena koje iritacija izaziva, oporavka nakon iritacije ili djelotvornosti različitih terapijskih opcija provode se *in vitro*, *in vivo* i klinička ispitivanja iritativnog dermatitisa.



Slika 1. Lijevo: građa kože volarne strane palca noge (deblja koža). Desno: građa kože obraza (tanja koža). Koža se sastoji od triju slojeva: epidermisa (Ed), dermisa (De) i potkožnog masnog tkiva (nije prikazano). Epidermis se sastoji od sljedećih slojeva: *stratum basale* (Sb), *stratum spinosum* (Ss), *stratum granulosum* (Sg), *stratum lucidum* (Sl) (prisutan isključivo u debljoj koži) i *stratum corneum* (Sc). Slika prikazuje kožne adneксе: znojne žlijezde (Sd), lojne žlijezde (SG) i folikul dlake (Hf). Preuzeto iz Arda i sur. (18).

*In vitro* ispitivanja uključuju primjenu kultura keratinocita ili fibroblasta, ekvivalente epidermisa, ekvivalente kože i izoliranu kožu. Monokulture keratinocita i fibroblasta su najjednostavniji modeli koji omogućuju istraživanja lučenja citokina i signalnih unutarstaničnih puteva u iritaciji. Kulture stanica mogu biti ljudskog ili životinjskog podrijetla. Ekvivalent epidermisa je potpuno diferencirani ljudski epidermis dobiven nakon rutinskih kirurških zahvata. Za razliku od kultura stanica, sadrži razvijeni rožnati sloj kože. Rožnati sloj nije u potpunosti identičan onome na koži živog čovjeka već postoje razlike u distribuciji lipida i proteina te je ekvivalent epidermisa propusniji za topikalno primijenjene tvari i ima veću permeabilnost za vodu. Građa kože je prikazana na Slici 1. Ekvivalent kože je model koji se sastoji od epidermisa i dermisa. Sastoji se od dvije žive, metabolički aktivne skupine stanica: fibroblasta i keratinocita koji su stalno u interakciji što čini ovaj model fiziološki relevantnijim

od prethodno spomenutih modela. Posljednji model je svježe kirurški odstranjena cijela koža. To je najnapredniji model iz razloga što sadrži više tipova stanica, uključujući, uz keratinocite i fibroblaste, i Langerhansove stanice, melanocite te endotelne stanice te pruža kompetentniju kožnu barijeru (19). U *in vivo* istraživanjima koriste se ponajprije miševi i zamorci kojima se inducira iritativni dermatitis topikalnom primjenom različitih iritansa (20, 21). Najčešće korišteni iritansi su natrijev laurilsulfat (SLS, engl. *sodium laurylsulphate*), ulje biljke *Croton tiglium L.* i organska otapala (21-24). Životinjski modeli ne mogu točno i izravno reflektirati oporavak ljudske kože. Kompleksni slijed zbivanja tijekom oporavka kože ljudi nije uvijek ekvivalentan oporavku životinjskih modela te je reproducibilnost rezultata, njihova prediktivnost i translacija na ljude upitna (25, 26). Također, danas se smanjuje upotreba životinja u eksperimentalne svrhe te se čak potpuno zabranjuje u slučaju postojanja znanstveno prihvaćene alternative (19, 26). Takva alternativa mogu biti napredni *in vitro* sustavi, ali ni jedan trenutni *in vitro* sustav ne može potpuno imitirati kompleksnu kaskadu reakcije koja se događa u ljudskoj koži nakon iritacije (27). To je također razlog postojanja diskrepancije između rezultata *in vitro* istraživanja i istraživanja na ljudima (27). Treća opcija su klinička istraživanja na pacijentima s aktivnim iritativnim dermatitisom (28). Istraživanja na pacijentima imaju niz nedostataka zbog kojih se većina istraživanja na ljudima ipak ne provodi na pacijentima s iritativnim dermatitisom već se on inducira na zdravim ljudima korištenjem određenih iritansa (29). To su *in vivo* ljudski modeli iritativnog dermatitisa.

*In vivo* ljudski modeli iritativnog dermatitisa omogućuju indukciju kontrolirane kožne reakcije, pri čemu istraživač kontrolira izbor iritansa, njegovu koncentraciju, trajanje i učestalost kontakta, mjesto na koži gdje će se vršiti iritacija i ostale čimbenike unutar kojih se odvija eksperiment. Takva kontrola nije moguća kod istraživanja na pacijentima što rezultira slabijom kontrolom čimbenika koji mogu utjecati na tijek, rezultate i zaključke istraživanja. Dalje, moguće je pratiti procese u koži tijekom cijelog vremenskog slijeda iritacije, od kontakta s iritansom i praćenja promjena prije pojave klinički vidljivih simptoma. Kod istraživanja na pacijentima, kožne primjene se mogu pratiti tek nakon nastanka kliničkih simptoma, kada se pacijenti javljaju liječniku. To znači da se tada proučavaju postojeće, razvijene kožne lezije, bez mogućnosti proučavanja promjena kože u ranijim fazama (29, 30).

### **1.2.1. Model iritativnog dermatitisa induciran natrijevim laurilsulfatom**

Kao iritans se koristi niz spojeva poput organskih otapala, kiselina i baza, nonanske kiseline, fenola, ditranola, surfaktanata, ali su ispitivani i učinci hladnoće te mehaničke iritacije

(27, 31, 32). Najčešće korišteni model je iritacija inducirana natrijevim laurilsulfatom. Natrijev laurilsulfat je natrijeva sol organosulfatnog spoja koji se sastoji od hidrofobnog lanca s dvanaest ugljikovih atoma i sulfatne skupine (29). To je površinski aktivna tvar, anionski surfaktant, koja smanjuje površinsku napetost vode i omogućava stvaranje emulzije tipa ulje u vodi zbog čega se koristi u sredstvima za čišćenje i kozmetici (33). Kao iritans se najčešće koristi kao vodena otopina, u masenim koncentracijama od 0,1 do 10%, ili se koristi u vazelinu kao vehikulu (29). Preporuča se primjena SLS-a visoke čistoće (99%) jer je primijećeno da dovodi do nastanka snažnije reakcije u odnosu na SLS farmakopejske kakvoće (29).

Natrij laurilsulfat je izravno toksičan za keratinocite (1). Prethodno se smatralo da surfaktanti uklanjaju lipide rožnatog sloja, međutim u nižim koncentracijama SLS uklanja samo manju količinu lipida .te se smatra da je njegov značajniji učinak sprječavanje sinteze novih lipida (29, 34). Oštećenja koja uzrokuje SLS dovode do lučenja proupalnih intermedijera poput IL-1 i TNF- $\alpha$ , induciranja ekspresije adhezivnih molekula te dolazi do infiltracije stanica imunološkog sustava i nastanka upale. Akutna izloženost SLS-u dovodi do spongioze, unutarstanične vakuolizacije i nakupljanja lipida, parakeratoze u umjerenim reakcijama odnosno nekroze u težim. Klinički znakovi nakon akutnog izlaganja su eritem, ponekad i površinska erozija epidermisa s mogućim nastankom pustula pri višim koncentracijama. U fazi oporavka kože dolazi do naboranosti i hrapavosti kože, njenog ljuštenja te mogućeg nastanka ragada. (29, 35)

Standardizacijska grupa Europskog društva za kontaktni dermatitis (ESCD, engl. *European Society of Contact Dermatitis*) je donijela smjernice za provođenje istraživanja na modelu iritativnog dermatitisa induciranog SLS-om s ciljem ujednačavanja korištene metodologije. Istraživanja su podijelili u dvije kategorije. Pod prvu kategoriju spadaju istraživanja osjetljivosti na iritans, čiji cilj je istražiti endogene i egzogene faktore koji utječu na težinu nastale iritacije. Druga kategorija su „provokacijska“ istraživanja gdje se SLS koristi za izazivanje (provociranje) kožne iritacije kod svih ispitanika, ali bez izazivanja kaustičnih reakcija na koži. Njihov cilj je istraživanje imunoloških i/ili patofizioloških mehanizama kožne iritacije, usporedba iritacijskog potencijala SLS-a i drugih iritansa, istraživanje promjena kože u vremenu nakon iritacije, usporedba osjetljivosti različitih neinvazivnih metoda za mjerenje parametara kože ili određivanje učinaka različitih terapijskih opcija u liječenju poput emolijentnih pripravaka ili lijekova kao što su kortikosteroidi. Izloženost iritansu može biti jednokratna, koja imitira akutnu iritaciju, ili ponovljena gdje dolazi do kumulativnog učinka te

koja predstavlja model kroničnog iritativnog dermatitisa. Također, iritans može biti primijenjen pod okluzijom ili test može biti otvorenog tipa, bez okluzije. (29, 35)

Najčešće korištena metoda, zbog svoje jednostavnosti, brzog provođenja i praktičnosti, je jednokratni okluzivni test. U tom testu primjenjuje se vodena otopina SLS-a ispod testnih komora. Postoji cijeli niz varijacija izvođenja u različitim istraživanjima s obzirom na koncentraciju otopine SLS-a, njen volumen i temperaturu, trajanje izloženosti kože i tipu korištene komore (29). U istraživanjima su korištene koncentracije otopina od 0,125% pa sve do 5%. Volumen korištene otopine SLS-a se kretao od 50  $\mu$ L pa do 60, 100, 200 ili 400  $\mu$ L. Najčešće je vrijeme trajanja izloženosti iritansu iznosilo 24 ili 48 sati, iako je u pojedinim istraživanjima trajalo svega 4 odnosno 7 sati. Često su korištene Finnove komore, različitog promjera, od 8, 12 ili 18 mm. Također su korištene i druge komore poput Duhringove, Hilltop i Agfa-Bayer komore. Smjernice standardizacijske grupe ESCD-a daju prijedlog uvjeta izvođenja jednokratnog okluzijskog testa, s ciljem ujednačavanja metodologije (Tablica 1). Preporučuju primjenu vodene otopine SLS-a u definiranoj koncentraciji i volumenu, trajanju kontakta s kožom kao i vrstu komore te ostale uvjete, ovisno o svrsi testa odnosno o tome u koju od prethodno spomenutih kategorija spada test koji se namjerava provesti. Jednokratni okluzivni test isključivo predstavlja model akutnog iritativnog dermatitisa. Za potrebe imitiranja kroničnog oblika iritacije, koji je klinički realističniji, uveden je ponavljajući okluzivni test, gdje se svakodnevno postavljaju iritansi pod okluzijom na kožu ispitanika. Ponovno se primjećuje različitost provođenja modela između različitih istraživačkih skupina. Iritacija kože ispitanika se provodila jednom ili više puta dnevno, s razlikom u trajanju izlaganja iritansu. Vrijeme provođenja testa je variralo od 20 uzastopnih dana pa do primjene od jednog do tri tjedna gdje se iritacija izazivala samo radnim danima s ciljem imitiranja profesionalnog iritativnog dermatitisa. Primijećena je varijacija i u volumenu i koncentraciji otopine iritansa kao i tipu komore koja se koristila. Ponovno, smjernice daju svoj prijedlog metoda za provođenje ponavljajućeg okluzijskog testa (Tablica 1). Prednosti ovog testa su visoka reproducibilnost i bolja simulacija dnevne izloženosti iritansu u odnosu na jednokratni okluzivni test. Glavni nedostaci su primjena okluzije na način koji neće potpuno realistično imitirati stvarnu izloženost iritansu te je potrebno više vremena za njihovo provođenje. (29, 35)

Otvoreni testovi su bolja simulacija iritacije. Provođe se na način da se otopina iritansa primijeni na kožu bez okluzije, unutar otvorenog zaštitnog prstena, koji onemogućava otjecanje primijenjene otopine. Najčešće se koristi ponavljajući otvoreni test, ali postoji i jednokratni



oblik testa. Još realističniji oblik su imerzijski testovi gdje ispitanici uranjaju podlaktice u vodene otopine SLS-a. Ovaj tip testa je također dostupan za istraživanja akutnog i kroničnog izlaganja iritansu. Navedeni tipovi testova su znatno kompliciraniji za izvođenje u usporedbi s okluzivnim testovima. (29, 35) Pregled preporučenih uvjeta za provođenje testova je dan u Tablici 1.

	Testovi osjetljivosti		Provokacijski testovi	
	Akutna reakcija	Kumulativna reakcija	Akutna reakcija	Kumulativna reakcija
<b>Jednokratni okluzivni test</b>				
• Trajanje primjene	24 h	nije primjenjivo	24 h	nije primjenjivo
• Promjer komore	12 mm		12 mm	
• Konc. SLS (w/v%)	0,5%		2%	
<b>Ponavljajući okluzivni test</b>				
• Trajanje primjene	nije primjenjivo	2h 1x dnevno	nije primjenjivo	2h 1x dnevno
• Period primjene		3 tjedna		3 tjedna
• Promjer komore		18 mm		18 mm
• Konc. SLS (w/v%)		0,25%		1%
<b>Otvoreni test</b>				
• Trajanje primjene	60 min 2x dnevno	10 min 1x dnevno	nije primjenjivo	10 min 1x dnevno
• Period primjene	1 dan	3 tjedna		3 tjedna
• Promjer zaštitnog prstena	20 mm	20 mm		20 mm
• Konc. SLS (w/v%)	10%	1%		2%
<b>Imerzijski test</b>				
• Trajanje uranjanja	30 min 2x dnevno	10 min 1x dnevno	30 min 2x dnevno	10 min 1x dnevno
• Period primjene	1 dan	3 tjedna	1 dan	3 tjedna
• Način primjene	uranjanje podlaktica	uranjanje podlaktica	uranjanje podlaktica	uranjanje podlaktica
• Konc. SLS (w/v%)	0,5%	0,5%	2%	2%

Tablica 1. Smjernice Standardizacijske grupe Europskog društva za kontaktni dermatitis za provođenje testova u modelu iritativnog dermatitisa inducirano g natrijevim laurilsulfatom. Prilagođeno prema Tupker et al. (29)

### 1.2.2. Ostali modeli iritacije i oštećenja kože

*Tape-stripping* je još jedan često korišten model oštećenja kože u kojem se postiže djelomično ili potpuno uklanjanje stanica rožnatog sloja kože ljepljivim trakama (36). Trake se zalijepe za površinu kože, pritisnu jednolikim pritiskom tijekom definiranog vremena te se uklanjaju s kože, pri čemu slojevi stanica zaostaju na traci (36, 37). Na taj način se inducira oštećenje kožne barijere. Ono predstavlja mehanički model iritacije kože. Koristi se za istraživanje svojstava rožnatog sloja epidermisa, kinetike oporavka kože nakon mehaničkog oštećenja, istraživanja djelotvornosti različitih topikalnih terapija u poboljšanju oporavka oštećene kožne barijere i za dobivanje osjetljivije kože prije primjene nekog iritansa ili alergena (37). Također se koristi u istraživanjima dermatofarmakokinetike topikalno primijenjenih lijekova gdje se ispituje prodor aktivne tvari u kožu i njihova biodostupnost (37, 38). Može se koristiti i za određivanje bioekvivalencije topikalnih lijekova (38). Osim u kliničkim istraživanjima, ovaj model se koristi i u *in vitro* istraživanjima te *in vivo* na životinjama (38). Za razliku od modela iritativnog dermatitisa induciranog SLS-om, kod ovog modela nema smjernica koje donose jasne preporuke korištenja modela već svaka istraživačka grupa ima razvijene vlastite standarde provođenja istraživanja (36). Uklonjena količina stanica rožnatog sloja i jačina nastale iritacije ovisi o nizu unutarnjih i vanjskih čimbenika (37). Materijali od kojeg se sastoje trake i tip ljepila su jedan od vanjskih čimbenika (36). Postoje gotove trake koje su proizvedene za ovu svrhu dok neke istraživačke skupine koriste improvizirane ili uredske samoljepljive trake (38). Značajan je i utjecaj načina primjene traka. Pritisak prilikom aplikacije trake, trajanje pritiska te brzina i način uklanjanja trake moraju biti ujednačeni između svake aplikacije trake (37, 38). Mjesto na koži odakle se traka počinje uklanjati mora se mijenjati poslije svake trake (36, 38). Među vanjske čimbenike spadaju temperatura, godišnje doba i doba dana, iz razloga što o njima mogu ovisiti pojedini parametri kože, poput njene vlažnosti (38). Parametri kože poput njene vlažnosti ili elastičnosti te tip kože spadaju u unutarnje čimbenike, kao i dob i spol ispitanika te postojanje kožne bolesti (36, 37). Sve navedene parametre je potrebno kontrolirati da bi se dobilo reproducibilno i ujednačeno oštećenje kože u navedenom modelu. Kao alternativa *tape-stripping* modelu je razvijen model mehaničke iritacije gdje se iritacija inducira trljanjem kože četkama spojenim na mehanički uređaj koji omogućava standardizaciju iritacije primjenom jednolike sile trenja (31).

Vrlo čest razlog oštećenja kože je prekomjerno izlaganje suncu. Biološki učinci sunčeva zračenja se imitiraju u modelu oštećenja kože UV zračenjem (39). Navedeni model

predstavlja fizikalno oštećenje funkcije kože. Provođenje ovog modela također nije standardizirano te se metodologija koja se koristi uvelike razlikuje između različitih istraživačkih grupa. Jedna od razlika je korišteni UV spektar. Dio istraživanja koristi samo dio spektra, najčešće samo UV A zračenje, koje predstavljaju valne duljine svjetla od 320 do 400 nm ili UV B zračenje s valnim duljinama između 280 i 320 nm (40-42), dok druga realističnije imitiraju sunčevo zračenje korištenjem šireg spektra (39, 43). Ispitivanja mogu biti smišljena na način da se koža ispitanika izlaže definiranoj dozi zračenja (44, 45). Alternativno, koža se može ozračiti serijom različitih doza zračenja na temelju čega se određuje najniža doza koja će inducirati nastanak eritema (MED, engl. *minimal erythema dose*) (41, 42). Model se koristi u istraživanju učinaka zračenja na kožu, poput obrazaca lučenja proupalnih medijatora, promjena na koži ili praćenja njenog oporavka (42, 46). Primjenjuje se u ispitivanju učinaka topikalnih, ali i oralnih pripravaka, na oporavak kože nakon oštećenja zračenjem ili njihov utjecaj na prevenciju oštećenja (41, 47-49). Drugi fizikalni model oštećenja kože koji se koristi u istraživanjima na ljudima je model izlaganja kože zračenju vidljivog i infracrvenog dijela elektromagnetskog spektra (50).

### 1.3. Neinvazivna mjerenja parametara kože

Promjene na koži uzrokovane iritacijom su se nekada pratile isključivo kliničkom procjenom definiranih parametara poput pojave eritema, ljuštenja kože ili njene hrapavosti. Smjernice ESCD-a donose preporuke načina provođenja kliničke procjene, uz razvijene zasebne ljestvice za akutne i kronične modele iritacije SLS-om (29). Promjene se mogu pratiti i instrumentalno, primjenom neinvazivnih metoda mjerenja parametara kože. Korištenje instrumenata omogućava objektivnije praćenje promjena na koži, u odnosu na kliničku procjenu, te omogućava praćenje parametara koje nije moguće procijeniti klinički. Neinvazivne, objektivne metode mjerenja parametara kože se koriste u procjeni fizioloških karakteristika kože, praćenja kožnih stanja uslijed bolesti ili izloženosti nekom vanjskom čimbeniku te ocjeni djelotvornosti lijekova i kozmetoloških pripravaka. (51-56)

Jedan od čestih znakova iritacije kože je pojava eritema. Navedeni simptom se može pratiti kliničkom procjenom, ali takva procjena ne može objektivno kvantificirati razliku niti biti dosljedna kod ponovljenih očitavanja (55). Subjektivnosti doprinosi postojanje razlike u percepciji boje te otežanog očitavanja zbog pojave promjena u koži poput deskvamacije (54, 55). Objektivnost se može postići uporabom instrumentnih metoda procjene eritema. Često korištena metoda su spektrofotometrijska mjerenja. Princip rada navedenih uređaja je slanje svjetla definiranog intenziteta u kožu te mjerenje intenziteta svjetla koje se reflektiralo natrag u uređaj. Valne duljine emitiranog te reflektiranog svjetla odgovaraju apsorpcijskom spektru bioloških kromofora poput melanina, hemoglobina i bilirubina. Na taj način se mjeri intenzitet svjetla koje su apsorbirale kromofore kože, što se koristi za izračuna tkz. indeksa eritema i indeksa melanina, koji odgovaraju intenzitetu nastalog eritema odnosno boji kože. (55, 57)

Drugi značajni parametar je vlažnost kože koja se izračunava mjerenjem sadržaja vode na površini rožnatog sloja kože. Vlažnost je značajan parametar o kojem će ovisiti niz svojstava kože poput mehaničkih svojstava, apsorpcije topikalno primijenjenih lijekova ili njene funkcije kao zaštitne barijere. Najčešće korišteni uređaji mjere vlažnost mjerenjem kapacitancije (52, 58). Sonda uređaja sadrži elektrode koje stvaraju električno polje. Elektrode su prekrivene materijalom niske dielektrične permitivnosti (59). Dielektrik je materijal kroz koji prolazi električno polje te se može polarizirati, ali ne vodi naboj (izolator) dok je dielektrična permitivnost mjera električne polarizabilnosti dielektrika. Materijal visoke permitivnosti se lakše polarizira nakon izlaganja električnom polju u odnosu na materijal niske permitivnosti. Rožnati sloj kože se ponaša poput dielektrika te u njemu, pod utjecajem električnog polja

elektrode, nastaje električno polje čija svojstva ovise o navedenim elektrodama i dielektričnom materijalu koji ih prekriva (konstanta kapacitancije) i kapacitanciji kože (varijabilna kapacitancija) (59). Kako su svojstva elektrode i njenog pokrovnog materijala konstantna i poznata, ukupno izmjerena kapacitancija će ovisiti isključivo o permitivnosti rožnatog sloja u kontaktu sa sondom. Povišenje razine vode u rožnatom sloju će povisiti relativnu permitivnost te će posljedično kapacitancija izmjerena na sondi biti viša. (52, 58, 59)

Rožnati sloj kože predstavlja barijeru prolasku tvari u kožu, ali i gubitku vode kroz kožu (56). Zdrava, intaktna koža ipak gubi određenu količinu vode isparavanjem te fiziološko isparavanje stvara sloj vodene pare iznad kože, debljine oko 10 mm (52). Oštećenjem kožne barijere uslijed iritacije, mehaničkog oštećenja ili nekog drugog uzroka, dolazi do povećanog gubitka vode (29). Mjera za gubitak vode kroz kožu je transepidermalni gubitak vlažnosti (TEWL, engl. *transepidermal water loss*) (29, 52). Vrijednost TEWL-a u fiziološkim uvjetima je niska te raste uslijed oštećenja kože, pa se TEWL smatra i mjerom funkcije kožne barijere (29, 56). Porast TEWL vrijednosti je u korelaciji sa stupnjem oštećenja kože. Sonda uređaja za mjerenje TEWL-a sadrži dva para senzora za mjerenje vlažnosti i temperature, postavljena na različitu udaljenost od dijela sonde koji se prisloni na kožu ispitanika (52, 56). Pad vrijednosti vlažnosti (odnosno tlaka vodene pare) između dva para senzora predstavlja TEWL (52, 56). Tako izmjerena TEWL vrijednost je u korelaciji s apsolutnom stopom gubitka vode određenom gravimetrijski (60). Također se pokazala osjetljivom i preciznom mjerom iritativnih učinaka SLS-a na kožu s dokazanom linearnom korelacijom između primijenjene doze SLS-a i izmjerenih promjena TEWL vrijednosti (29, 52). Mjerenje TEWL vrijednosti može dokazati postojanje subkliničkih oštećenja kožne barijere te pokazati kako klinički zdrava koža može imati narušenu funkciju kožne barijere u stanjima kao što je atopijski dermatitis (29).

Osim prethodno navedenih, postoji niz drugih parametara koji se mogu pratiti neinvazivnim metodama poput pH vrijednosti kože, sadržaja sebuma, kožne elastičnosti te drugih biomehaničkih svojstava (61-63).

Mjerenja neinvazivnih parametara kože je potrebno provoditi u standardiziranim uvjetima da bi se dobili pouzdani i reproducibilni podatci (56). Rezultati mjerenja ovise o velikom broju čimbenika te je standardizacija potrebna da bi se osigurala usporedivost istraživanja (52, 55). Za pojedine parametre postoje razvijene smjernice koje opisuju preporučeni način provođenja istraživanja (51-56). Prije početka istraživanja je potrebno kalibrirati sve uređaje koji se koriste za mjerenja. Savjetuje se provoditi istraživanja u

identičnim uvjetima vlažnosti i temperature zraka. Preporučeni raspon je 40 do 60% relativne vlažnosti zraka pri temperaturama od 20 do 22°C (29, 52, 55, 56). Ispitanici se prije početka mjerenja moraju aklimatizirati na uvjete prostorije u kojoj se mjerenje odvija. Aklimatizacija treba trajati minimalno 15 minuta s otkrivenim mjestima na koži gdje će se provoditi mjerenja (52, 55). U prostoriji ne smije biti strujanja zraka iz razloga što ono ometa mjerenja TEWL vrijednosti (56). Također, temperature sonde za mjerenje TEWL vrijednosti moraju biti ujednačene između svakog mjerenja, kao i pritisak korištenih sondi na kožu (52, 55). Ispitanici moraju biti u istom položaju kod svakog mjerenja te ne smiju prije odlaska na mjerenja konzumirati tvari koje bi mogle djelovati vazoaktivno kao što su alkohol ili nikotin (55). Preporuka je svako mjerenje provoditi u triplikatu (53, 55).

#### 1.4. Problematika istraživanja

*In vivo* modeli oštećenja kože su sve češće primjenjivana metoda testiranja djelotvornosti i sigurnosti različitih terapija kožnih bolesti kod ljudi zbog svoje jednostavnosti, ali i drugih prednosti koje imaju nad ispitivanjima s pacijentima s kožnim oboljenjima. Različite istraživačke grupe imaju razvijene vlastite protokole između kojih postoji značajna varijacija. S ciljem standardizacije, ESCD je donio smjernice provođenja modela iritativnog dermatitisa inducirano SLS-om. Jedna od donesenih odluka preporuka je korištenje kože volarne strane podlaktice kao testnog mjesta. Unatoč toj preporuci, brojna istraživanja su provedena na drugim anatomskim lokacijama, ponajprije na koži gornjeg dijela leđa. Ta pozicija ima prednost u odnosu na podlaktice zbog veće površine na kojoj je onda moguće imati više pojedinačnih testnih mjesta. Međutim, parametri kože variraju ovisno o anatomskoj lokaciji (64). Prethodna istraživanja su pokazala da dvije najčešće korištene lokacije u istraživanjima, volarni dio podlaktica i gornji dio leđa, imaju različite bazalne vrijednosti parametara kože poput TEWL-a, vlažnosti i prokrvljenosti kože te debljine rožnatog sloja (65-67). Takve početne razlike bi mogle dovesti do različitog odgovora kože na iritaciju. Razlika u odgovoru na iritaciju je primijećena u drugim modelima, poput iritacije acetonom i *tape stripping-om* (68). Kod navedenih modela su leđa pokazala višu reaktivnost u odnosu na ekstremitete (68). Isto istraživanje je pokazalo postojanje različitog obrasca cijeljenja kože između različitih anatomskih lokacija te da postoji potreba za razvojem režima liječenja koji bi bio specifičan za pojedinu anatomsku lokaciju (68). Dosadašnja istraživanja nisu pronašla značajnu razliku u reakciji na SLS između volarne podlaktice i gornjeg dijela leđa, iako je ona primijećena između drugih lokacija (69, 70). Međutim, navedena istraživanja imaju mali broj uključenih ispitanika te je potrebno provesti istraživanje na većem uzorku (69, 70). Pretragom literature nije pronađeno ni jedno istraživanje koje ispituju postojanje razlika u oporavku kože nakon iritacije SLS-om između anatomskih lokacija. Postojanje razlike u reakciji na iritans te brzine oporavka kože između podlaktica i leđa bi mogli utjecati na usporedivost istraživanja provedenih na tim anatomskim lokacijama. Definiranje značaja tih razlika bi moglo doprinijeti standardizaciji modela iritativnog dermatitisa.

Uz model iritativnog dermatitisa inducirano SLS-om, često se koriste i modeli oštećenja kože inducirani *tape-stripping* procedurom te UV zračenjem. Tri navedena modela dovode do oštećenja kože drugačijim mehanizmima. SLS je kemijski iritans koji djeluje toksično na keratinocite i utječe na sadržaj lipida u rožnom sloju (29). *Tape-stripping*



predstavlja mehaničko, potpuno ili djelomično, uklanjanje gornjih slojeva kože, pri čemu dolazi do izlaganja nižih slojeva epidermisa (36). Ultraljubičasto zračenje je fizikalna noxa, bez izravnog djelovanja na funkciju kožne barijere, međutim dovodi do nastanka reaktivnih oblika kisika koji dovode do nastanka upale, degradacije izvanstaničnog matriksa i oštećenja niza staničnih procesa (71). Na temelju različitih mehanizama kojima izazivamo oštećenja u navedena tri modela, očekujemo i različit odgovor kože koji će se očitovati različitim vrijednostima mjerenih parametara kože te različitu kinetiku oporavka kože. Pregledom literature su pronađeni proturječni podatci o promjenama parametara kože izmjerenim neinvazivnim metodama, u *tape-stripping* i UV modelima (36, 37, 44, 49, 72, 73). Poznavanje promjena parametara kože je izrazito važno kod planiranja istraživanja. Postoji veliki broj različitih parametara koje je moguće pratiti te je izbor adekvatnih mjera ishoda značajan za uspjeh istraživanja, posebno kod istraživačkih skupina s ograničenom opremom. Ograničenost opreme može utjecati i na odabir samog modela koji će se koristiti u istraživanju. Do sada nije provedeno ni jedno istraživanje koje bi uspoređivalo promjene parametara kože i razlike u oporavku kože između tri navedena modela u istim uvjetima, na istim ispitanicima te na istoj anatomskoj lokaciji.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

Glavni ciljevi ove disertacije bili su:

1. Ispitati postojanje razlika u odgovoru kože na iritaciju i cijeljenje u akutnom modelu iritativnog dermatitisa izazvanog SLS-om na različitim anatomskim položajima (leđa i podlaktica).

2. Usporediti razlike u odgovoru kože na tri različita modela oštećenja - kemijskog izazvanog SLS-om, mehaničkog *tape-strippingom* i fizikalnog izazvanog UV zračenjem u istim uvjetima, na istim ispitanicima te na istoj anatomskoj lokaciji.

### **2.2. Hipoteze istraživanja**

Koža leđa će pokazati veću reaktivnost i sporiji oporavak u odnosu na kožu podlaktica u modelu akutnog iritativnog dermatitisa izazvanog SLS-om.

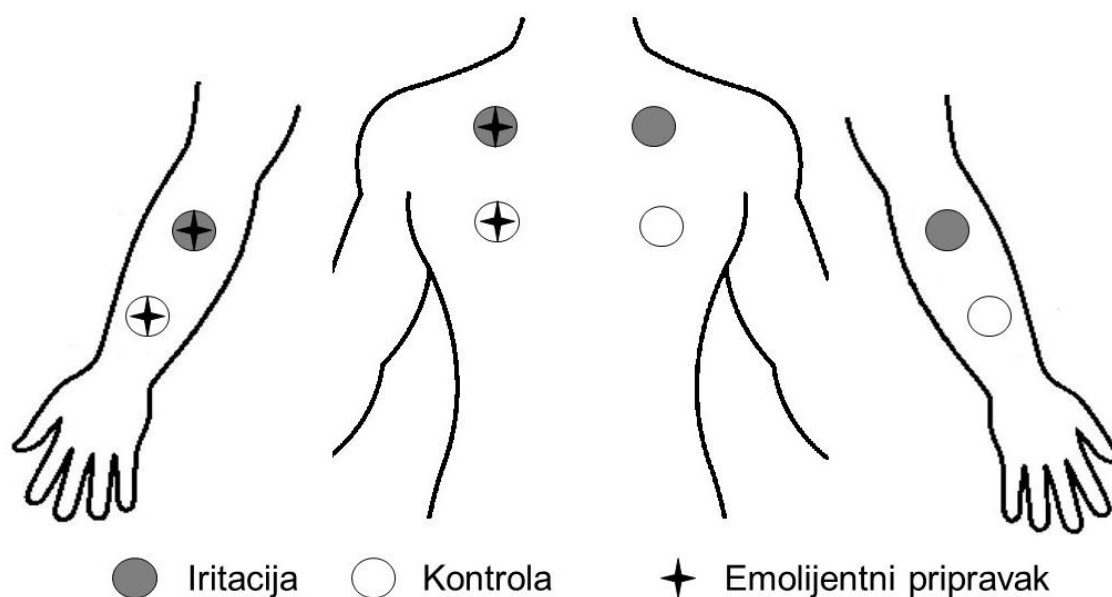
Kemijski, mehanički i fizikalni model oštećenja kože će dovesti do različitog odgovora kože na noksu te će imati različitu kinetiku oporavka.

### 3. METODE I MATERIJALI

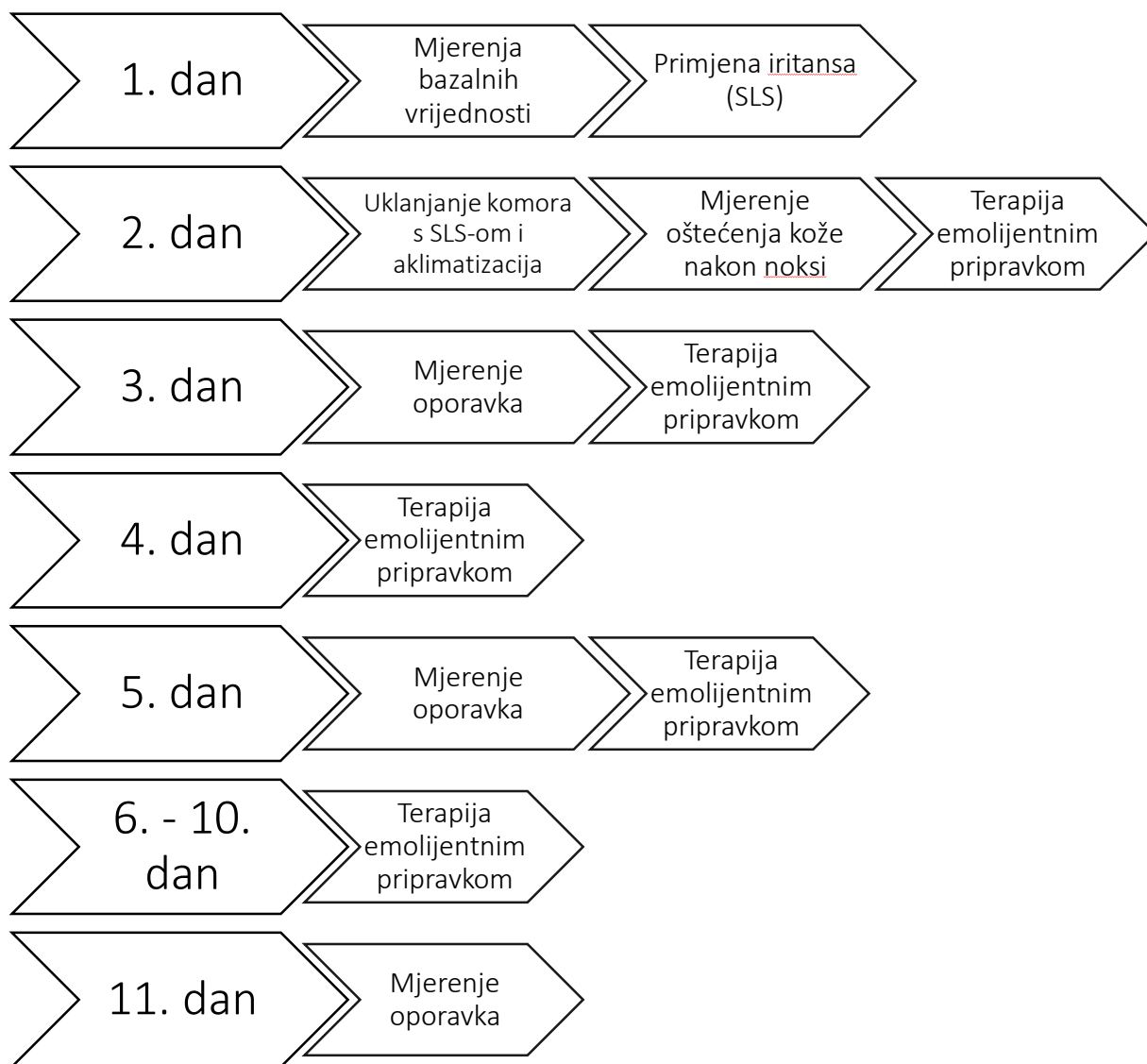
#### 3.1. Ustroj i ishod istraživanja

Istraživanja provedena u sklopu disertacije su uključivala dva randomizirana klinička pokusa provedena u prostorijama Katedre za farmaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

U kliničkom pokusu 1 je istraživano postoji li razlika u odgovoru na iritaciju u ljudskom modelu iritativnog dermatitisa izazvanog natrij laurilsulfatom, s i bez terapije emolijentnim pripravkom. Ispitivana je razlika između dva najčešće korištene lokacije - volarne strane podlaktice i supskapularnog područja gornjeg dijela leđa (Slika 2). Tijek istraživanja je prikazan na Slici 3.

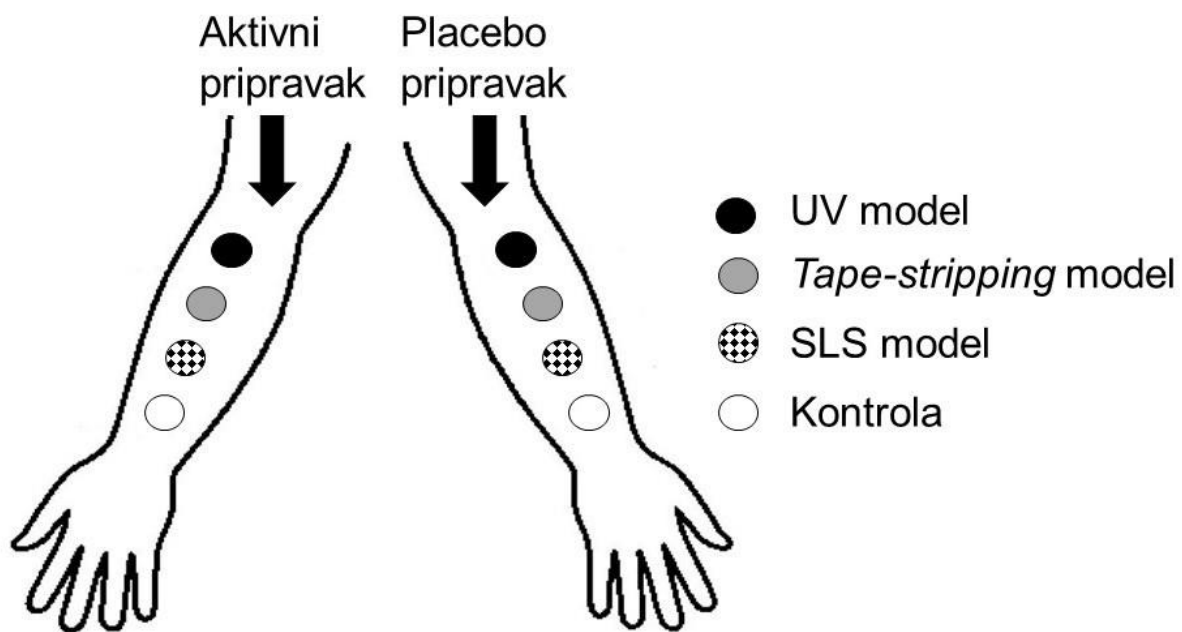


Slika 2. Prikaz testnih mjesta u kliničkom pokusu 1

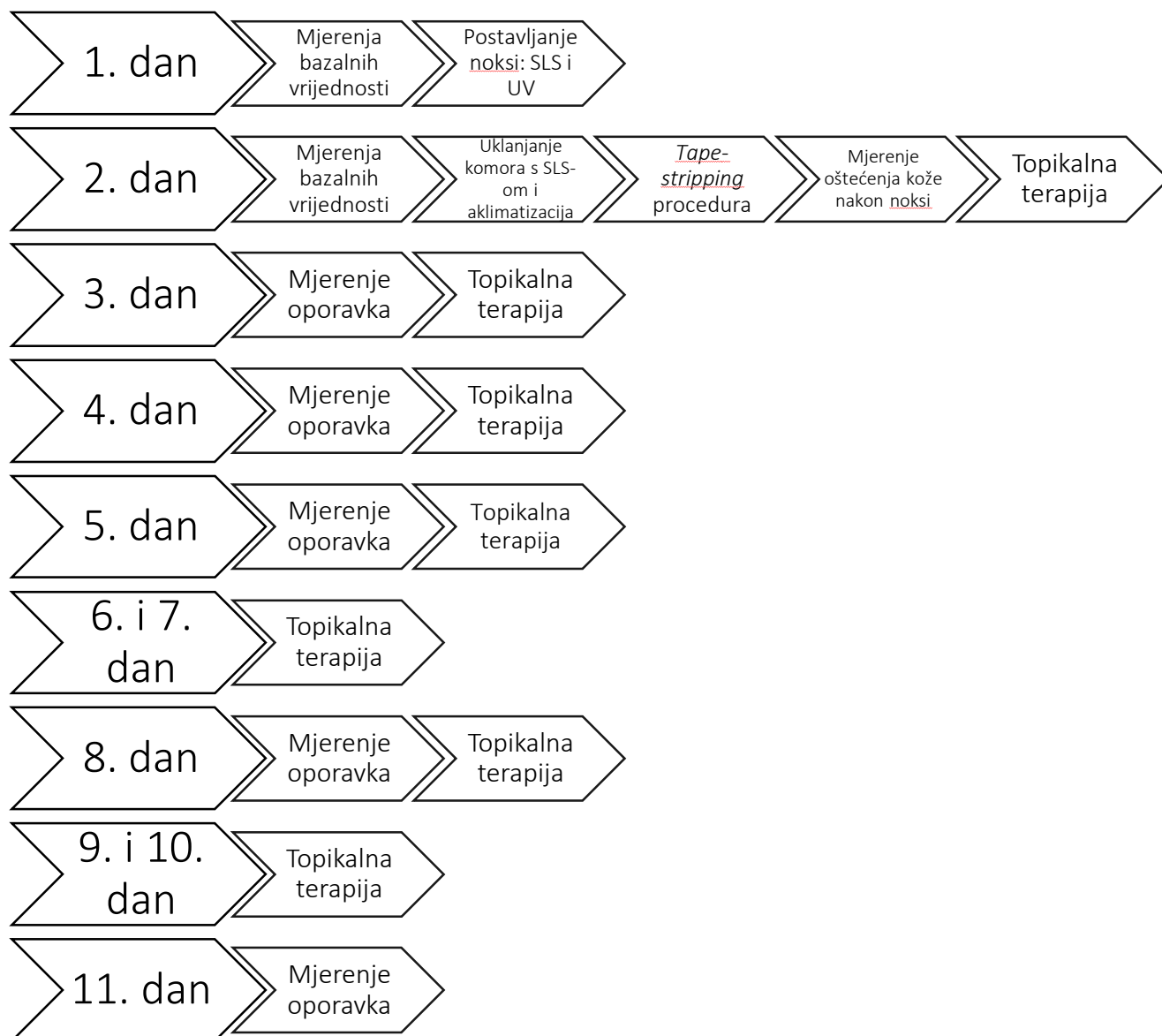


Slika 3. Hodogram kliničkog pokusa 1.

Klinički pokus 2 je istraživao razlike u promjenama parametara kože i oporavku između tri različita modela oštećenja kože (kemijski, mehanički i fizikalni) te neoštećene kontrole na volarnim podlacticama zdravih ispitanika (Slika 4). Također je ispitivan utjecaj terapije na parametre kože u modelima oštećenja te kontroli. Tijek istraživanja je prikazan na Slici 5.



Slika 4. Prikaz testnih mjesta u kliničkom pokusu 2



Slika 5. Hodogram kliničkog pokusa 2.

### 3.1.1. Ispitanici

U kliničke pokuse su uključivani zdravi dobrovoljci koji ispunjavaju sve kriterije uključivanja odnosno ne ispunjavaju kriterije neuključivanja i isključenja.

U klinički pokus 1 uključivani su zdravi ispitanici u dobi od 18 do 35 godina oba spola, bez dijagnosticiranih kožnih bolesti, koji nisu u četiri tjedna koja prethode ispitivanju koristili kortikosteroide, imunomodulatore ili antihistaminike. Ispitanici neće koristiti emolijente 3 dana prije početka ni tijekom trajanja studije. Ispitanici se neće izlagati umjetnom UV zračenju.

Kriteriji neuključivanja uključuju korištenje kortikosteroida, imunomodulatora i antihistaminika mjesec dana prije početka i tijekom trajanja istraživanja, korištenje emolijentnih pripravaka unutar tri dana od početka ispitivanja, trudnoća, dojenje i oštećenja kože na mjestima provođenja ispitivanja. Kriterij isključivanja je osobna želja ispitanika.

U klinički pokus 2 uključene su zdrave odrasle osobe od 18 do 65 godina starosti oba spola bez dijagnosticiranih kožnih bolesti, koji nisu u četiri tjedna koja prethode ispitivanju koristili kortikosteroide, imunomodulatore ili antihistaminike. Ispitanici neće koristiti emolijente 3 dana prije početka ni tijekom trajanja studije. Ispitanici se neće izlagati umjetnom UV zračenju te će izbjegavati izlaganje snažnom sunčevom svjetlu. Ispitanici ne smiju koristiti sapune i šampone na ispitivanim mjestima na koži. Kriteriji neuključivanja su korištenje kortikosteroida, imunomodulatora i antihistaminika unutar tri tjedan od početka ispitivanja, korištenje emolijentnih pripravaka unutar tri dana od početka ispitivanja, korištenje fotosenzibilizirajućih lijekova, ozbiljna sustavna bolest, imunosupresija, karcinom kože, nedavna povijest vitiliga, melasmi, ostalih poremećaja pigmentacija i fotosenzibilnosti, poznate reakcije preosjetljivosti na sastojke topikalne terapije (gospina trava i bojila placebo pripravka), trudnoća i dojenje. Kriteriji isključivanja su osobna želja ispitanika i nepridržavanje plana istraživanja.

## **3.2. Postupci**

### **3.2.1. Model iritativnog dermatitisa izazvanog natrij laurilsulfatom (29)**

U kliničkom pokusu 1 korišteni iritans je bila 2% otopina natrij laurilsulfata u deioniziranoj vodi. Šezdeset (60)  $\mu\text{L}$  otopine SLS-a (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) se propipetom prenijelo na filter papir te potom postavilo na kožu ispitanika pod okluzijom 12 milimetarskom Finnovom komorom (Smart Practice, Phoenix, Arizona, SAD) (29). Finnova komora je aluminijska komora koja se koristi u primjeni alergena i iritansa na kožu u dijagnostičke i znanstvenoistraživačke svrhe. Omogućava zaštitu mjesta primjene iritansa od vanjskih utjecaja. Pod komorom je iritans ostao 24 sata, nakon kojih se ispitanik vratio u laboratorij na uklanjanje iritansa. Ispitanicima nije dopušteno vlažiti mjesta iritacije tijekom navedena 24 sata. Uz iritaciju napraviti će se i kontrola iritacije s deioniziranom vodom umjesto otopine SLS-a, također pod okluzijom (Slika 2).

U kliničkom pokusu 2 je također korišten SLS kao model kemijskog oštećenja kože. Korištena je 1% otopina natrij laurilsulfata u deioniziranoj vodi. Šezdeset (60)  $\mu\text{L}$  otopine SLS

a se propipetom prenijelo na filter papir te potom postavilo na kožu ispitanika pod okluzijom 12 milimetarskom Finnovom komorom (29). Pod komorom je iritans ostao 24 sata, nakon kojih se ispitanik vratio u laboratorij na uklanjanje iritansa. Ispitanicima nije dopušteno vlažiti mjesta iritacije tijekom navedena 24 sata.

### **3.2.2. Model mehaničke iritacije tape-stripping metodom (36, 68)**

Na 4 cm<sup>2</sup> površine kože podlaktica postavila se ljepljiva traka dimenzija 1,5cm x 2,7 cm (Tesafilm, Norderstedt, Njemačka) te se pritisnula aplikatorom (Monaderm, Monako) koji omogućava jednoliki pritisak (150 g/cm<sup>2</sup>) tijekom 5 sekundi. Područje oko trake se označilo te se traka uklonila. Postupak se ponavljao ukupno pet puta nakon čega je slijedilo mjerenje TEWL-a. Cjelokupni postupak se ponavljao svakih 5 traka dok se ne povisi vrijednost TEWL-a na trostruku vrijednost izmjerenog bazalnog TEWL-a. Između posljednjeg uklanjanja trake i mjerenja TEWL-a mora proći minimalno 1,5 minuta s ciljem stabilizacije vrijednosti TEWL-a nakon iritacije.

### **3.2.3. Model fizikalnog oštećenja kože ultraljubičastim zračenjem (41, 45, 72)**

Jedan cm<sup>2</sup> kože ispitanika se ozračio UV zračenjem na udaljenosti od 40 cm od izvora (žarulja Osram Vitalux, München, Njemačka). Doza zračenja je iznosila 3 J/cm<sup>2</sup> mjereno uređajem (YK35UV, Lutron Electronic, Taipei, Tajvan). Na podlaktice ispitanika se postavila UV nepropusna tkanina koja omogućava zaštitu preostalog dijela kože. Također, ispitanici i istraživači su nosili zaštitne naočale te se UV lampe ogradila zaštitnom pregradom.

### **3.2.4. Terapija**

U kliničkom pokusu 1, nakon uklanjanja komora s iritansima i ocjene nastale iritacije (instrumentalno i kliničkom procjenom), započela je terapija emolijentnim pripravkom. Komercijalno dostupna emolijentna krema je korištena na jednoj podlaktici i jednoj strani leđa, dok su suprotna podlaktica i strana leđa bile bez terapije (Slika 2). Sastojci navedene kreme su voda, ulje slatkog badema, polisorbat 80, natrijev akrilat/ natrijev akriloidimetiltaurat kopolimer, izoheksadekan, heksilen glikol, fruktoza, glukoza, sukroza, ureja, dekstrin, alanin, aspartanska kiselina, heksil nikotinat, dehidrooctena kiselina, PEG (polietilenglikol)-12 dimetikon, benzilni alkohol i parfem. Ispitanici su nanosili emolijentnu kremu dva puta dnevno koristeći dozirni oblik koji je omogućavao primjenu 5 mg pripravka po cm<sup>2</sup> kože. Razmak



između dvije primjene je bio minimalno osam sati te su ispitanici dobili uputu da posljednja primjena mora biti minimalno dvanaest sati prije mjerenja.

U kliničkom pokusu 2, nakon ocjene nastalih oštećenja kože, započela je terapija topikalnim pripravkom koji je sadržavao komercijalno dostupno ulje gospine trave (lat. *Hypericum perforatum*). Takav pripravak je primjenjivan na jednoj podlaktici, dok je na drugu korišten placebo pripravak. Aktivni pripravak je sadržavao 20% ulja gospine trave u bijelom vazelinu. Placebo pripravak je sadržavao 20% smjese biljnih ulja korištenih u proizvodnji ulja gospine trave (25% maslinovo i 75% suncokretovo ulje) s dodanim bojilima, u vazelinu. Korištena bojila su: CI 14720; CI 16255; CI 19140; CI 42051. Navedena bojila su prikazana kao njihove C.I. oznake (engl. *Colour index*) i svi se nalaze na Listi dopuštenih bojila u kozmetičkim proizvodima Europske Unije. Pripravci su se nanosili u dozi od 5 mg/cm<sup>2</sup> pripravka, dva puta dnevno, s minimalno osam sati razmaka između dvije primjene, uz uvjet da posljednja primjena mora biti minimalno dvanaest sati prije mjerenja. Ispitanici su nanosili pripravke odmah poslije mjerenja, uz nadzor istraživača. Druga primjena u danu, kao i sve primjene pripravaka na dane kada nije bilo mjerenja, bile su samostalne primjene, bez nadzora. Ispitanici su dobili pripravke u jednodozirnim spremnicima u količinama dovoljnim da potraju do idućeg dolaska na mjerenja. Prazni spremnici su vraćani prilikom povratka na svako mjerenja s ciljem dokazivanja terapijske adherencije. Svaki spremnik je označen šifrom ispitanika te stranom podlaktice na koju treba biti primijenjen. Označavanje spremnika i njihovu raspodjelu ispitanicima je provodila nezainteresirana treća strana.

### **3.2.5. Mjere ishoda**

#### Klinički pokus 1

##### Neinvazivno mjerenje parametara kože

Mjerenje će se izvoditi u kontroliranim uvjetima u laboratoriju Katedre za farmaciju u skladu sa smjernicama za mjerenje parametara kože neinvazivnim metodama s ciljem dobivanja točnih, preciznih i reproducibilnih rezultata (51-56). Izrađeni su interni Standardni operativni postupci (SOP) kojima su propisani postupak podešavanja i rukovanje sondama, kalibracija, uvjeti i priprema prostorije za mjerenje, upute ispitanicima i njihova priprema za mjerenja, postupak mjerenja na ispitanicima, ocjene kakvoće mjerenja i vrijednosti izmjerenih parametara, postupak u slučaju pojave greške tijekom rada te čišćenje i održavanje sonde u skladu s prethodno spomenutim smjernicama.

Parametri kože koji će se mjeriti: transepidermalni gubitak vode, vlažnost kože te razine eritema.

Za navedena mjerenja će se koristiti uređaj MPA6 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Köln, Njemačka) s pripadajućim sondama: a) Tewameter TM300 (TEWL), b) Corneometer CM825 (vlažnost kože), i c) Mexameter MX18 (eritem).

Također, provest će se klinička procjena parametara kože prema ljestvici Europskog društva za kontaktni dermatitis. Pratit će se promjene eritema, hrapavosti, ljuštenja, edema i nastanak ragada na ordinalnoj ljestvici koristeći ocjene od 0 do 3 (29).

## Klinički pokus 2

### Neinvazivno mjerenje parametara kože

Mjerenje će se izvoditi u kontroliranim uvjetima u laboratoriju Katedre za farmaciju u skladu sa smjernicama za mjerenje parametara kože neinvazivnim metodama Europskog društva za kontaktni dermatitis s ciljem dobivanja točnih, preciznih i reproducibilnih rezultata (51-56). Izrađeni su interni Standardni operativni postupci (SOP) kojima su propisani postupak podešavanja i rukovanje sondama, kalibracija, uvjeti i priprema prostorije za mjerenje, upute ispitanicima i njihova priprema za mjerenja, postupak mjerenja na ispitanicima, ocjene kakvoće mjerenja i vrijednosti izmjerenih parametara, postupak u slučaju pojave greške tijekom rada te čišćenje i održavanje sonde u skladu s prethodno spomenutim smjernicama.

Parametri kože koji će se mjeriti: transepidermalni gubitak vode, vlažnost kože te razine eritema i melanina.

Za navedena mjerenja će se koristiti uređaj MPA6 s pripadajućim sondama: a) Tewameter TM300 (TEWL), b) Corneometer CM825 (vlažnost kože), i c) Mexameter MX18 (eritem i melanin).

## **3.3. Statistička analiza**

### **3.3.1. Izračun veličine uzorka**

Potrebni broj ispitanika za klinički pokus 1 je određen na temelju podataka iz studije *Cua et al.* (69), uz statističku značajnost od 0,05 i postavljenu snagu istraživanja od 0,95. Potrebna veličina uzorka iznosi 22.

Potrebni broj ispitanika za klinički pokus 2 je određen na temelju podataka iz studije *Paepe et al.* (74), uz statističku značajnost od 0,05 i postavljenu snagu istraživanja od 0,8. Potrebna veličina uzorka iznosi 28.

Izračuni veličine uzorka su napravljeni koristeći besplatni alat za izračun veličine uzorka dostupan na <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>.

### **3.3.2. Randomizacija**

#### Klinički pokus 1

Slika 2 prikazuje testna mjesta na podlakticama i gornjem dijelu leđa ispitanika uključenih u klinički pokus 1. Mjesta iritacije na Slici 2 su prikazana ilustrativno, iz razloga što je točan položaj iritiranih mjesta i kontrole (gornji ili donji položaj) za svakog ispitanika određen nasumično. Jedna podlaktica i jedna strana leđa su tretirane emolijentnim pripravkom pri čemu je odabir tretirane podlaktice i strane leđa (lijeva ili desna) bio nasumičan. Randomizacije su izvršene koristeći Excel proračunske tablice (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD).

#### Klinički pokus 2

Slika 4 prikazuje testna mjesta na podlakticama i ispitanika uključenih u klinički pokus 2. Položaji na podlakticama na kojima su inducirana oštećenja kože te kontrola su prikazana ilustrativno, iz razloga što su točni položaji za svakog ispitanika određeni nasumično. Jedna podlaktica je tretirana topikalnim pripravkom dok je druga tretirana placebo pripravkom, pri čemu je odabir tretirane podlaktice (lijeva ili desna) bio nasumičan. Randomizacije su izvršene koristeći Excel proračunske tablice (Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD) i mrežni program *randomizer.org* (75).

### **3.3.3. Statistički postupci**

Podatci dobiveni neinvazivnim mjerenjima u kliničkim pokusima su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Usporedbe mjerenih parametara između anatomskih lokacija, usporedbe mjerenih parametara između različitih modela oštećenja kože te analize djelotvornosti korištenih terapija su provedene koristeći dvosmjernu analizu varijance za ponovljena mjerenja (*Two-way RM ANOVA*). Sidak *post-hoc* test je korišten za usporedbe u pojedinim vremenskim intervalima.

Rezultati kliničke procjene iz kliničkog pokusa 1 su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Usporedbe između anatomskih lokacija te djelotvornosti terapije emolijentnim pripravkom su analizirani korištenjem Kruskal-Wallis testa. Dunn *post-hoc* test je korišten za usporedbe u pojedinim vremenskim intervalima.

Stope oporavka kože su definirane kao površina iznad TEWL krivulje (AUC - engl. *area upon the curve*) za vremenske intervale u kojima dolazi do oporavka kože nakon primjene noksi (68). Dobivene AUC vrijednosti su dalje standardizirane prema TEWL vrijednosti nakon provođenja noksi te, u kliničkom pokusu 1, prema omjeru TEWL vrijednosti nakon oporavka kože (u posljednjem danu mjerenja) i bazalne TEWL vrijednosti. Vrijednosti AUC i iz AUC derivirane vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon te analizirane Mann-Whitney U testom.

Korelacija bazalnih vrijednosti parametara kože (TEWL i vlažnost kože) s vrijednostima nakon induciranih oštećenja je određen Pearsonovim koeficijentom korelacije  $r$ .

Statistička obrada je napravljena koristeći program Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornija, SAD). Dobiveni rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati kliničkog pokusa 1

#### 4.1.1. Ispitanici

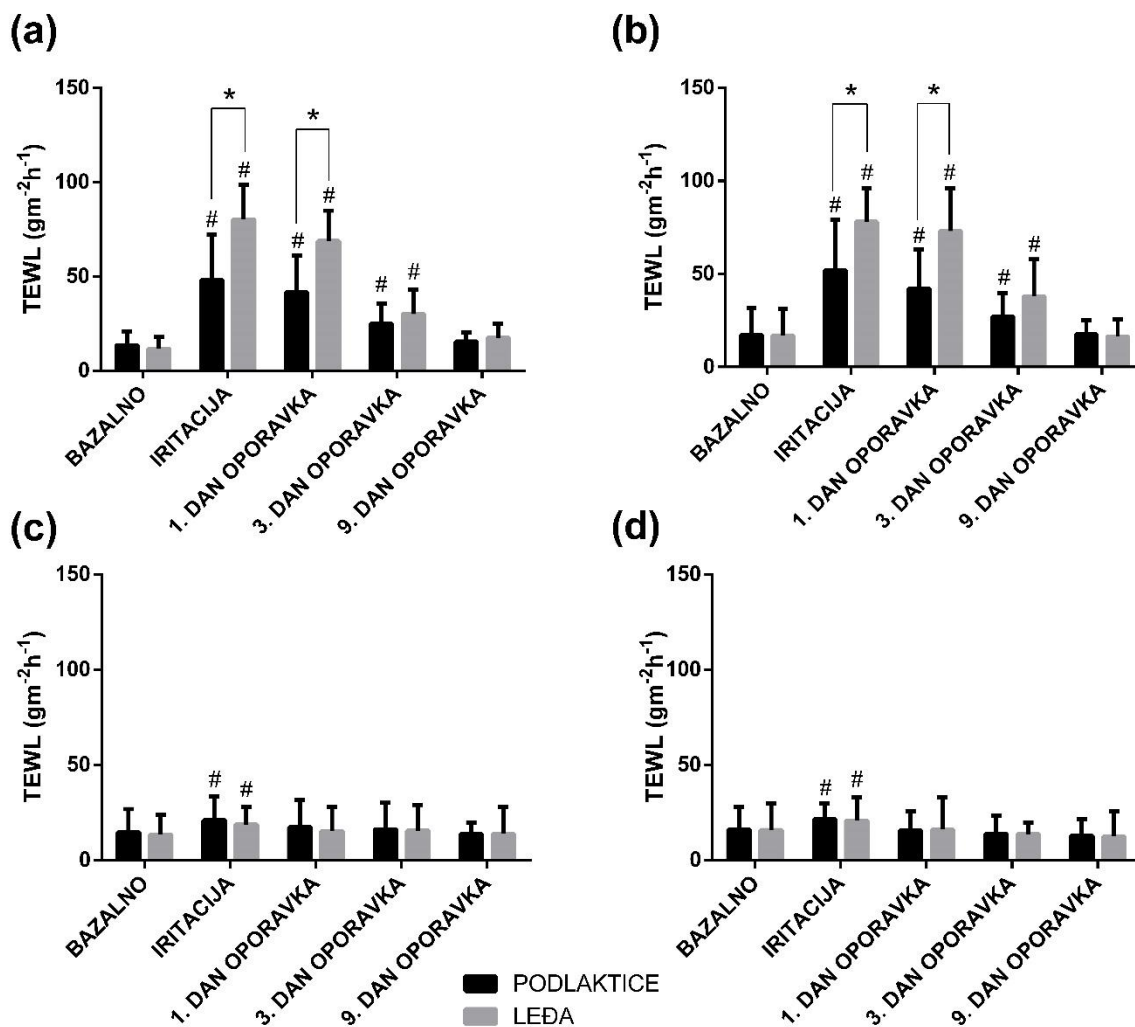
Za potrebe kliničkog pokusa 1 je regrutirano 25 ispitanika te su svi uključeni ispitanici dovršili istraživanje. Demografski značajke uključenih ispitanika su prikazane u Tablici 2.

Demografski podatci	
<b>N</b>	25
<b>Spol</b>	14 žena (56,0%)
<b>Raspon dobi</b>	21,0 - 28,0 godina
<b>Srednja vrijednost dobi (SD)</b>	22,9 (1,8) godina
<b>Medijan dobi (interkvartilni raspon)</b>	22,0 (22,0 - 23,5) godina

Tablica 2. Demografske značajke ispitanika uključenih u klinički pokus 1

#### 4.1.2. Transepidermalni gubitak vode

Bazalne TEWL vrijednosti podlaktice su uspoređene s bazalnim vrijednostima kože leđa. Razlike između bazalnih vrijednosti između dvije anatomske lokacije nisu pronađene. Promjene TEWL vrijednosti nakon izlaganja SLS-u su prikazane na Slici 6. U usporedbi s leđima, podlaktice su imale niže vrijednosti odmah nakon izlaganja iritansu ( $48,0 \pm 24,2$  vs  $80,2 \pm 18,3$   $\text{gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) te na 1. dan mjerenja oporavka ( $41,5 \pm 19,6$  vs  $68,8 \pm 16,2$   $\text{gm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) (Slika 6a). Promjene TEWL-a su bile usporedive neovisno o tretmanu emolijentnim pripravkom (Slika 6b). Primjena emolijentnog pripravka nije dovela do poboljšanja vrijednosti TEWL-a ni na jednoj anatomskej lokaciji, u usporedbi mjestima bez primjene pripravka, ni na iritiranom mjestima ni neoštećenoj koži (Slika 6b i 6d). Blago povišenje TEWL vrijednosti je primijećeno na dan procjene iritacije na mjestima gdje je primijenjena voda umjesto otopine SLS-a, na obje anatomske lokacije (Slika 6c i 6d).



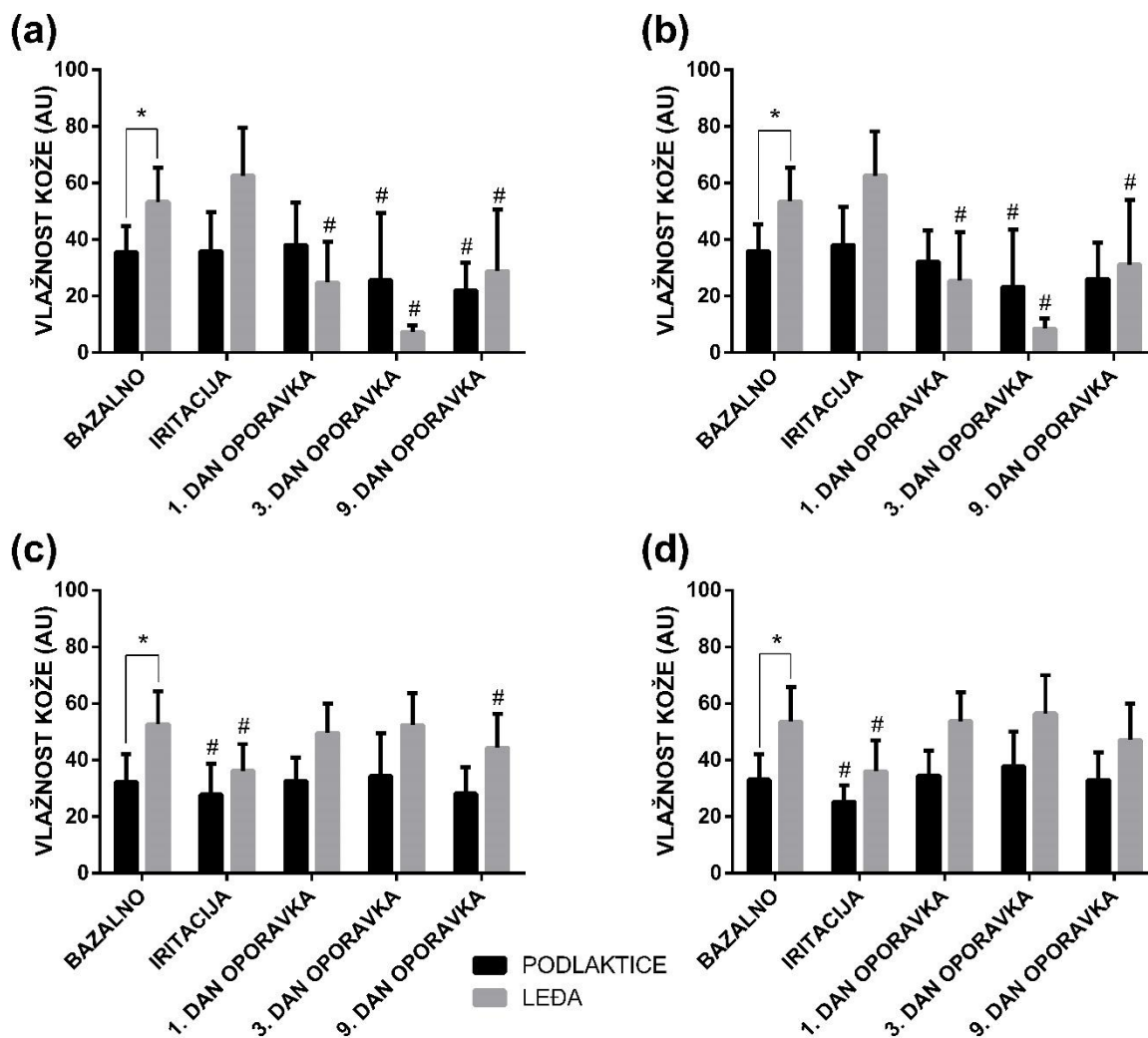
Slika 6. Vrijednosti transepidermalnog gubitka vode (TEWL). a) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, bez primjene emolijentnog pripravka; b) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, primjena emolijentnog pripravka; c) kontrolna iritacija, bez primjene emolijentnog pripravka; d) kontrolna iritacija, primjena emolijentnog pripravka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija.

\*  $p < 0,05$ , razlike između anatomskih lokacija (dvosmjerna analizu varijance za ponovljena mjerenja, Sidak *post-hoc* test)

#  $< 0,05$ , razlika u odnosu na bazalnu vrijednost (dvosmjerna analizu varijance za ponovljena mjerenja, Sidak *post-hoc* test)

### 4.1.3. Vlažnost kože

Bazalne vrijednosti vlažnosti kože na podlakticama su bile značajno niže u usporedbi s vrijednostima na gornjem dijelu leđa (Slika 7). Postojanje takve razlike je zahtijevalo primjenu normalizacije izmjerenih vrijednosti na način da se vrijednostima u svakoj pojedinoj točki, za svakog pojedinog ispitanika, oduzela njena vlastita bazalna vrijednost. Razlike u vrijednostima vlažnosti kože su prikazane na Slici 8. Podlaktice su imale značajno manje izraženu suhoću kože nakon iritacije SLS-om, u usporedbi s leđima (Slika 8a). Razlika je bila statistički značajna nakon prvog ( $2,7 \pm 16,9$  vs  $-28,6 \pm 14,5$  AU), trećeg ( $-9,8 \pm 19,0$  vs  $-46,1 \pm 11,0$  AU) i devetog dan oporavka ( $-13,3 \pm 10,1$  vs  $-24,5 \pm 20,1$  AU). Vlažnost kože je nakon primjene emolijentne terapije bila usporediva s vrijednostima bez primjene terapije (Slika 8b). Emolijentna terapija nije dovela do poboljšanja ni na iritiranoj ni neoštećenoj koži, u usporedbi s mjestima bez terapije (Slika 8b i 8d). Kao i kod TEWL vrijednosti, kontrolna iritacija vodom je dovela do promjene mjenenog parametra te je došlo do smanjenja vlažnosti kože na dan mjerenja učinka iritacije (Slika 7c i 7d). Pad vlažnosti je bio značajno veći na leđima, u odnosu na pad vrijednosti na podlakticama (Slika 8c i 8d).

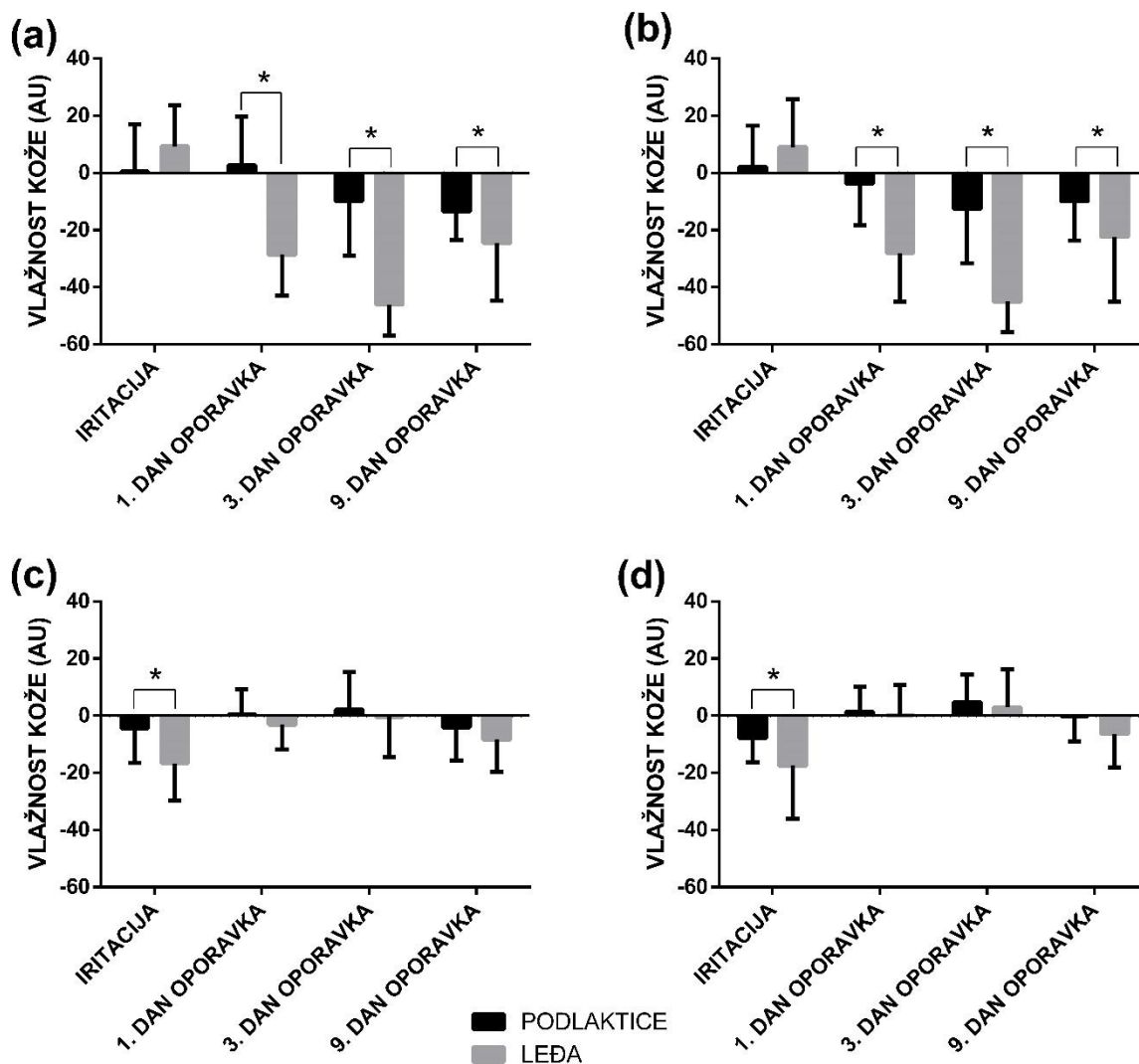


Slika 7. Vrijednosti vlažnosti kože. a) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, bez primjene emolijentnog pripravka; b) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, primjena emolijentnog pripravka; c) kontrolna iritacija, bez primjene emolijentnog pripravka; d) kontrolna iritacija, primjena emolijentnog pripravka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija.

\*  $p < 0,05$ , razlika između bazalnih vrijednosti između anatomskih lokacija (Mann-Whitney U test)

#  $< 0,05$ , razlika u odnosu na bazalnu vrijednost (Friedman test, Dunn *post-hoc* test)





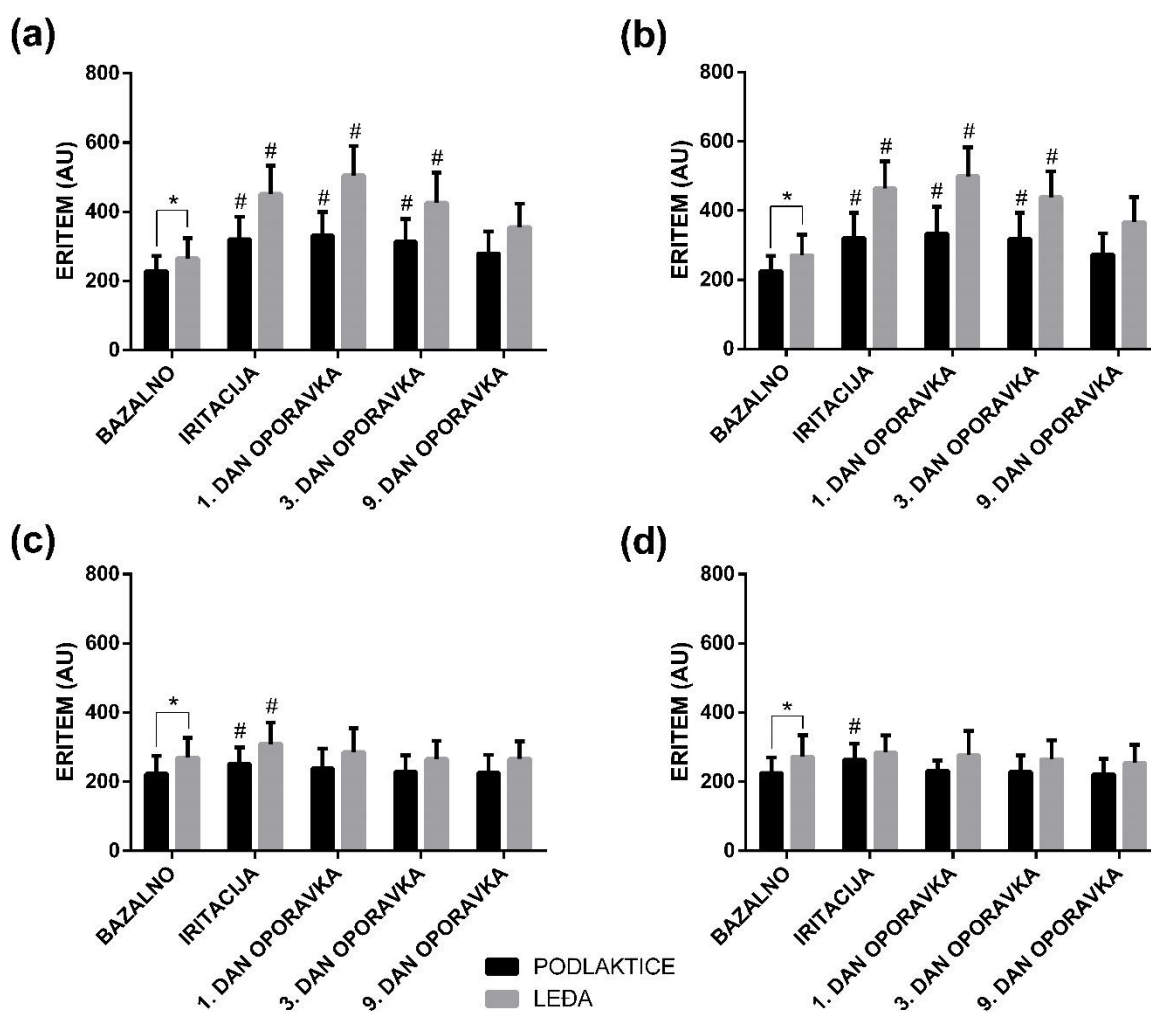
Slika 8. Razlike vrijednosti vlažnosti kože nakon normalizacije. a) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, bez primjene emolijentnog pripravka; b) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, primjena emolijentnog pripravka; c) kontrolna iritacija, bez primjene emolijentnog pripravka; d) kontrolna iritacija, primjena emolijentnog pripravka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost razlika u svakoj vremenskoj točki i bazalne vrijednosti i standardna devijacija.

\*  $p < 0,05$ , razlike između anatomskih lokacija (dvosmjerna analizu varijance za ponovljena mjerenja, Sidak *post-hoc* test)

#### 4.1.4. Eritem

Izmjerene bazalne vrijednosti eritema kože su bile niže na podlakticama te je iz tog razloga izvedena normalizacija oduzimanjem bazalnih vrijednosti od izmjerenih vrijednosti u ostalim točkama mjerenja (Slika 9).

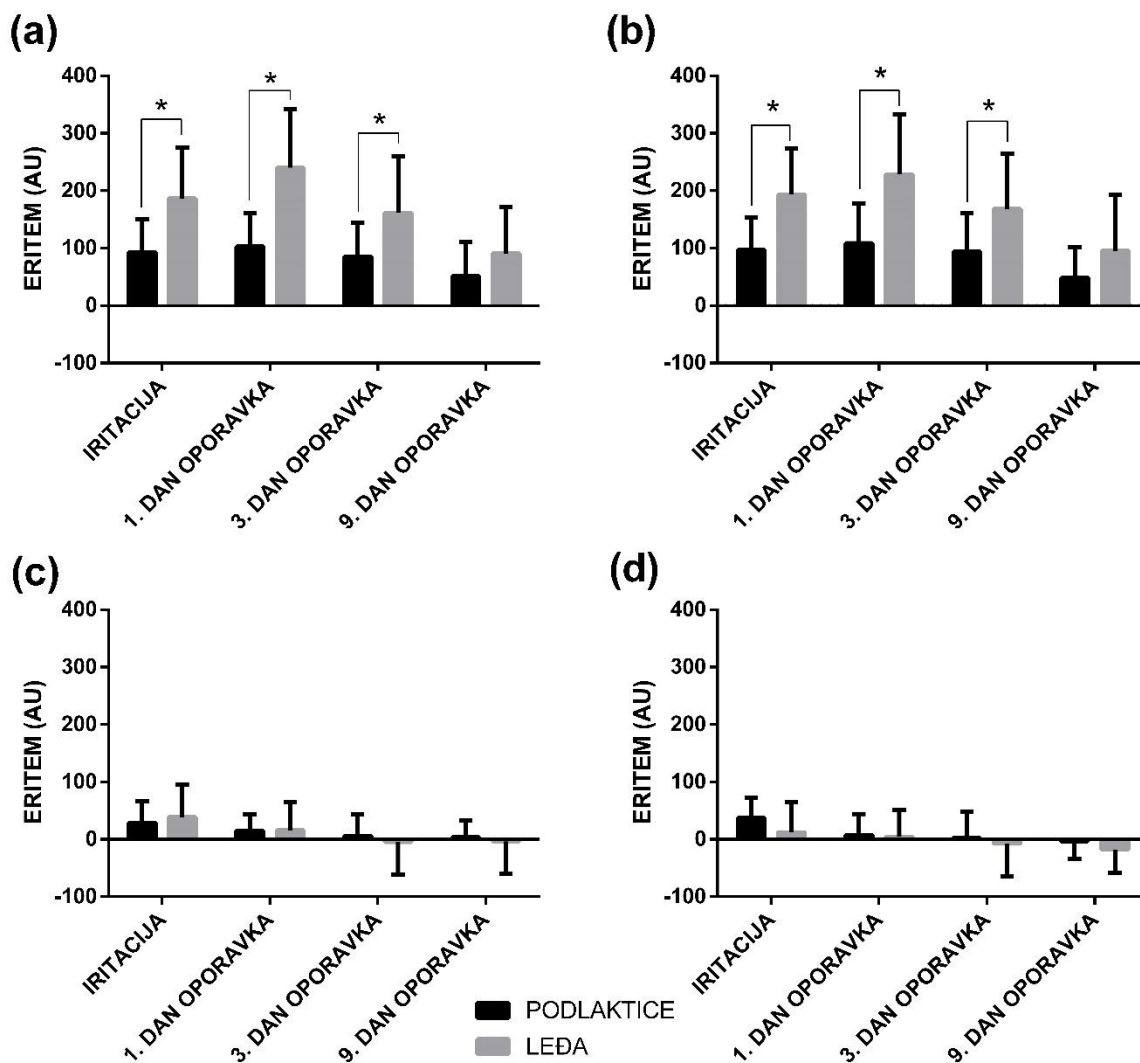
Slika 10 prikazuje vrijednosti eritema nakon normalizacije. Koža podlaktica je imala niže vrijednosti eritema u usporedbi s gornjim dijelom leđa odmah nakon uklanjanja iritansa, ( $92,1 \pm 58,2$  vs  $186,5 \pm 88,4$  AU), nakon prvog ( $102,7 \pm 58,9$  vs  $240,3 \pm 101,7$  AU) i trećeg dana oporavka ( $85,5 \pm 58,8$  AU vs  $161,3 \pm 99,0$  AU) (Slika 9a). Vrijednosti eritema su nakon primjene emolijentne terapije bile usporedive s vrijednostima bez primjene terapije (Slika 10b). Emolijentna terapija nije dovela do poboljšanja ni na iritiranoj ni neoštećenoj koži, u usporedbi s mjestima bez terapije (Slika 10b i 10d). Kontrolna iritacija vodom je ponovno dovela do promjene mjerenog parametra te je došlo do promjene vrijednosti eritema kože na dan mjerenja učinka iritacije (Slika 9c i 9d). Promjena vrijednosti eritema se nije razlikovala između dvije anatomske lokacije (Slika 10c i 10d).



Slika 9. Vrijednosti eritema kože. a) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, bez primjene emolijentnog pripravka; b) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, primjena emolijentnog pripravka; c) kontrolna iritacija, bez primjene emolijentnog pripravka; d) kontrolna iritacija, primjena emolijentnog pripravka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija.

\*  $p < 0,05$ , razlika između bazalnih vrijednosti između anatomskih lokacija (Mann-Whitney U test)

#  $< 0,05$ , razlika u odnosu na bazalnu vrijednost (Friedman test, Dunn *post-hoc* test)

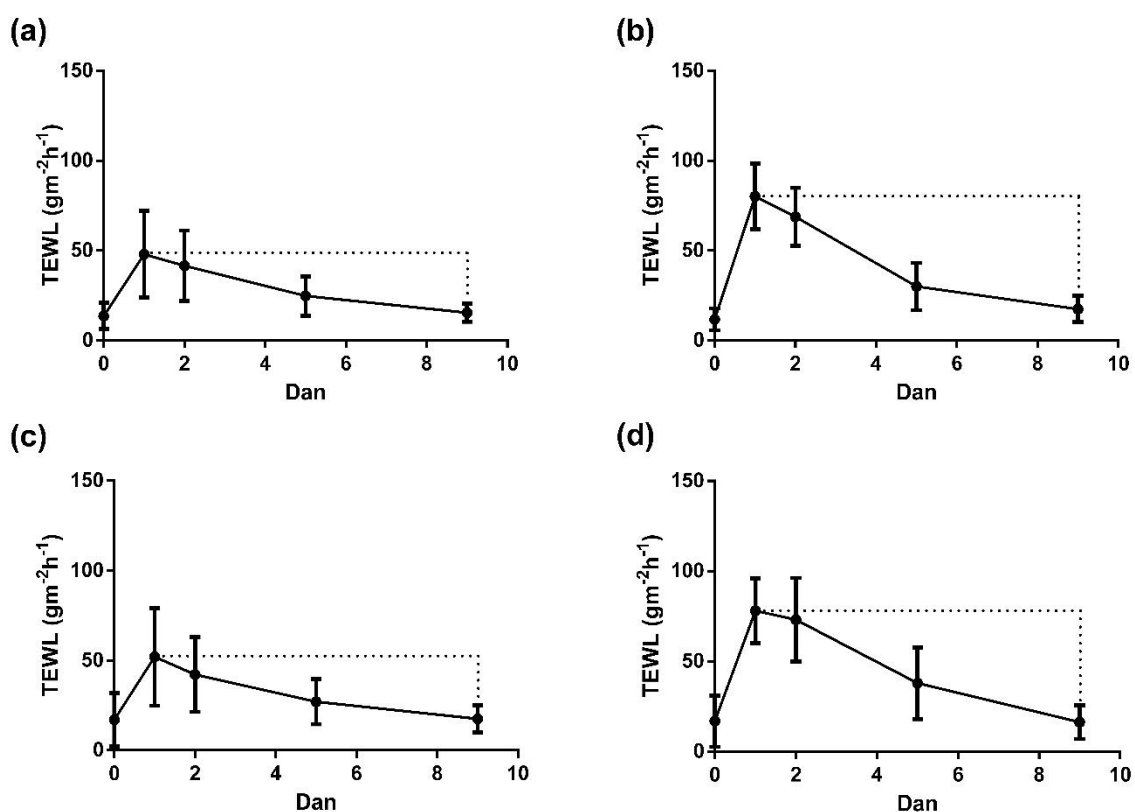


Slika 10. Razlike vrijednosti eritema kože nakon normalizacije. a) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, bez primjene emolijentnog pripravka; b) koža iritirana natrijevim laurilsulfatom, primjena emolijentnog pripravka; c) kontrolna iritacija, bez primjene emolijentnog pripravka; d) kontrolna iritacija, primjena emolijentnog pripravka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost razlika u svakoj vremenskoj točki i bazalne vrijednosti i standardna devijacija.

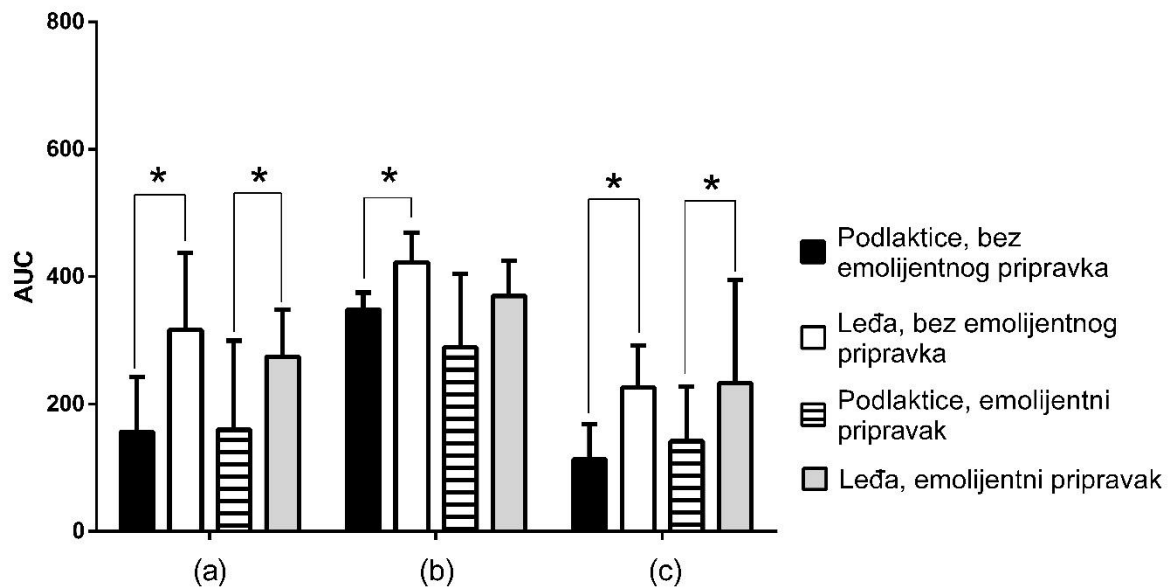
\*  $p < 0,05$ , razlike između anatomskih lokacija (dvosmjerna analizu varijance za ponovljena mjerenja, Sidak *post-hoc* test)

#### 4.1.5. Stopa oporavka kože

Slika 11 ilustrira stope oporavka kože definirane kao površine iznad TEWL krivulje u periodu oporavka kože nakon nokse. Stope oporavka kože su bile statistički značajno niže na podlakticama, u usporedbi s leđima (Slika 12). Emolijentni pripravak nije doveo do poboljšanja stope oporavka, u odnosu na područja bez terapije, ni na jednoj anatomskej lokaciji (Slika 12).



Slika 11. Vrijednosti transepidermalnog gubitka vode (TEWL) u odnosu na vrijeme (dani) s prikazom površina iznad krivulje (AUC) kao površine između iscrtanih linija i TEWL krivulje. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija. a) podlaktica, bez primjene emolijentnog pripravka, b) gornji dio leđa, bez primjene emolijentnog pripravka, c) podlaktica, primjena emolijentnog pripravka, d) gornji dio leđa, primjena emolijentnog pripravka



Slika 12. Stope oporavka kože i derivirani parametri. Rezultati prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. a) AUC; b) AUC / TEWL<sub>iritacija</sub> #; c) AUC / (TEWL<sub>9. dan oporavka</sub>/TEWL<sub>bazalno</sub>)

\*  $p < 0,05$ , razlika između stopa oporavka kože (Mann-Whitney U test)

# podatci pomnoženi sa 100 s ciljem omogućavanja prikaza na istom grafikonu

#### 4.1.6. Klinička procjena

Vrijednosti klinički procijenjenog eritema nakon iritacije su bile niže na podlakticama u usporedbi s gornjim dijelom leđa ( $P < 0,05$ , Tablica 3). Ta razlika je bila statistički značajna na dan uklanjanja iritansa te prvi i treći dan oporavka kože na mjestima bez primjene emolijentnog pripravka (Tablica 3). Vrijednosti eritema su bile u skladu s instrumentalno dobivenim vrijednostima (Slika 10). Vrijednosti s i bez primjene terapije se međusobno ne razlikuju.

Hrapavost kože je bila manje izražena na podlakticama na prvi i treći dan oporavka ( $P < 0,05$ , Tablica 3). Primjena emolijentnog pripravka nije značajno utjecala na rezultate procjene hrapavosti.

Podlaktice su pokazale manje izraženo ljuštenje kože u odnosu na leđa, na mjestima bez terapije ( $P < 0,05$ , Tablica 3). Razlika u toj mjeri ishoda je bila značajna samo na deveti dan

oporavka, na testnim mjestima bez primjene terapije. Razlika između anatomske lokacije je također postojala na mjestima na kojima se primjenjivao emolijentni pripravak, ali ta razlika je bila samo značajna na dan uklanjanja iritansa, prije primjene same terapije (Tablica 3).

Edem je bio prisutan na svim iritiranim mjestima na obje anatomske lokacije, ali samo na dan uklanjanja iritansa. Nije postojala statistički značajna razlika u težini edema između testnih mjesta (Tablica 3).

Ni jedan ispitanik nije razvio ragade.

Znakovi eritema, hrapavosti kože, ljuštenja kože, edema i ragada nisu bili prisutni na kontrolnim mjestima ni na jednom ispitaniku tijekom cijelog trajanja pokusa.

Klinička procjena		Iritacija		1. dan oporavka		3. dan oporavka		9. dan oporavka	
		Podlaktice	Leđa	Podlaktice	Leđa	Podlaktice	Leđa	Podlaktice	Leđa
Eritem	Bez terapije	1,0±0,0*	2,0±0,0	1,0±0,5*	2,0±0,0	1,0±0,5*	1,0±1,0	0,0±0,5	0,5±0,5
	Terapija	1,0±0,0*	2,0±0,0	1,0±0,5*	2,0±0,0	0,5±0,5*	1,0±1,0	0,0±0,5	0,5±1,0
Hrapavost kože	Bez terapije	0,5±1,0	0,5±1,0	0,5±0,5*	1,0±0,5	0,0±0,5*	1,0±0,5	0,0±0,75	0,5±1,0
	Terapija	0,5±0,75	0,5±1,0	0,5±0,5*	0,5±0,75	0,0±0,5*	1,0±0,5	0,0±0,5	0,0±1,0
Ljuštenje kože	Bez terapije	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±1,0
	Terapija	0,0±0,25*	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±1,0
Edem	Bez terapije	0,0±0,0	0,0±0,75	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	Terapija	0,0±1,0	0,0±0,75	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Tablica 3. Klinička procjena iritacije na istraživanim anatomskim lokacijama. Rezultati prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

\* P<0,05, razlika između anatomskih lokacija, Kruskal-Wallis test, Dunn *post-hoc* test.



#### 4.1.7. Korelacija bazalnih vrijednosti s odgovorom kože

Bazalne TEWL vrijednosti nisu pokazale korelaciju s TEW, vrijednostima, vrijednostima vlažnosti kože ni eritema izmjerenim nakon izazivanja iritacije ni na jednoj od dvije anatomske lokacije (Tablica 4).

Međutim, bazalna vrijednost vlažnosti kože je pokazala korelaciju s izmjerenom vrijednošću eritema na podlakticama te s vrijednosti vlažnosti kože nakon iritacije na gornjem dijelu leđa (Tablica 4).

		Pearsonov koeficijent r		
		TEWL	Vlažnost	Eritem
Bazalni TEWL	Podlaktice	0,189	0,051	0,272
	Leđa	-0,121	0,225	0,197
Bazalna vlažnost kože	Podlaktice	0,212	-0,006	0,491*
	Leđa	0,093	0,534**	-0,097

Tablica 4. Korelacija bazalnih TEWL vrijednosti i vrijednosti vlažnosti kože s odgovorom kože na oštećenje u modelu iritacije kože SLS-om na dvije anatomske lokacije.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

## 4.2. Rezultati kliničkog pokusa 2

### 4.2.1. Ispitanici

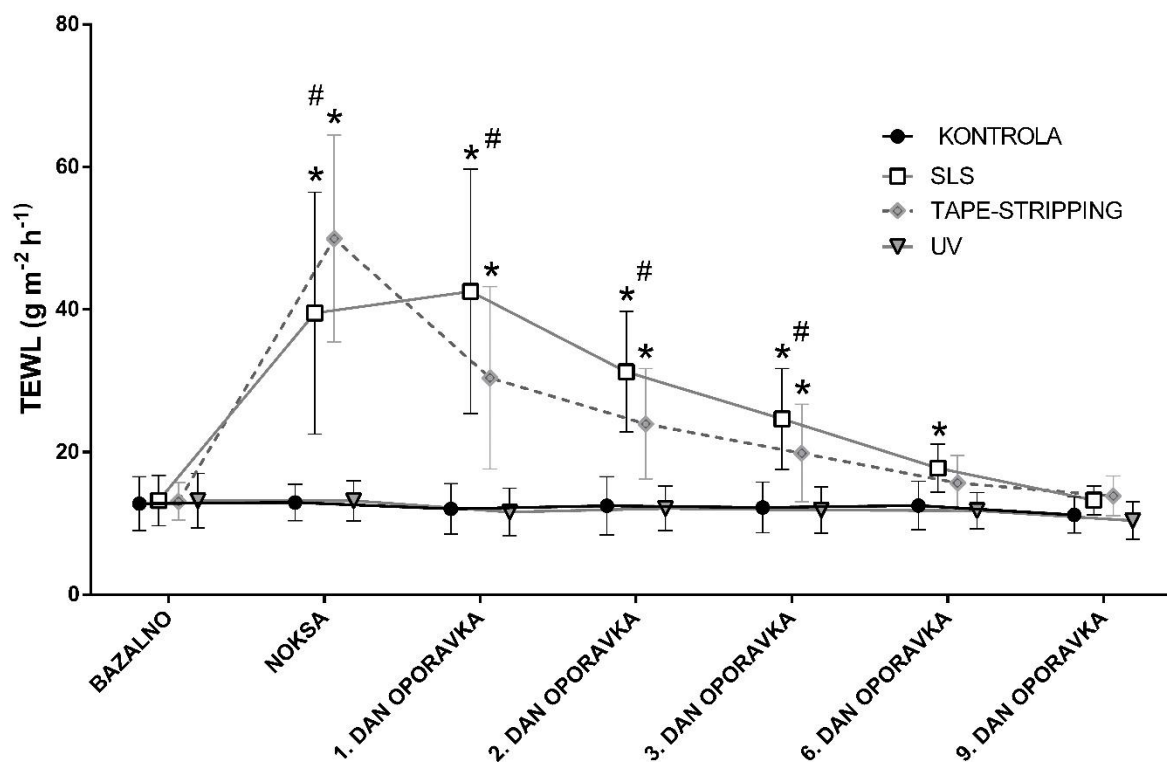
Za potrebe kliničkog pokusa 2 je regrutirano 28 ispitanika te su svi uključeni ispitanici dovršili istraživanje. Demografske značajke uključenih ispitanika su prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Demografske značajke ispitanika uključenih u klinički pokus 2

Demografski podatci	
N	28
Spol	18 žena (64,3%)
Raspon dobi	21,0 - 27,0 godina
Srednja vrijednost dobi (SD)	23,6 (1,4) godina
Medijan dobi (interkvartilni raspon)	23,5 (23,0 - 24,0) godina

### 4.2.2. Transepidermalni gubitak vode

*Tape-stripping* i iritacija inducirana SLS-om su značajno povisili vrijednosti TEWL-a u odnosu na neoštećena, kontrolna mjesta, što ukazuje na oštećenje kožne barijere (Slika 13). Nakon UV zračenja TEWL vrijednost se nije razlikovala od kontrolnih vrijednosti ni u jednoj vremenskoj točki tijekom trajanja pokusa. Oporavak kože, definiran povratkom TEWL vrijednosti na razinu kontrolnih, je ostvaren devet dana nakon SLS inducirane iritacije odnosno šest dana nakon *tape-stripping-a*. *Tape-stripping* je izazvao veće oštećenje kožne barijere, ali su TEWL vrijednosti brzo padale te su bile značajno niže u odnosu na TEWL vrijednosti nakon SLS iritacije prvog, drugog i trećeg dana oporavka.



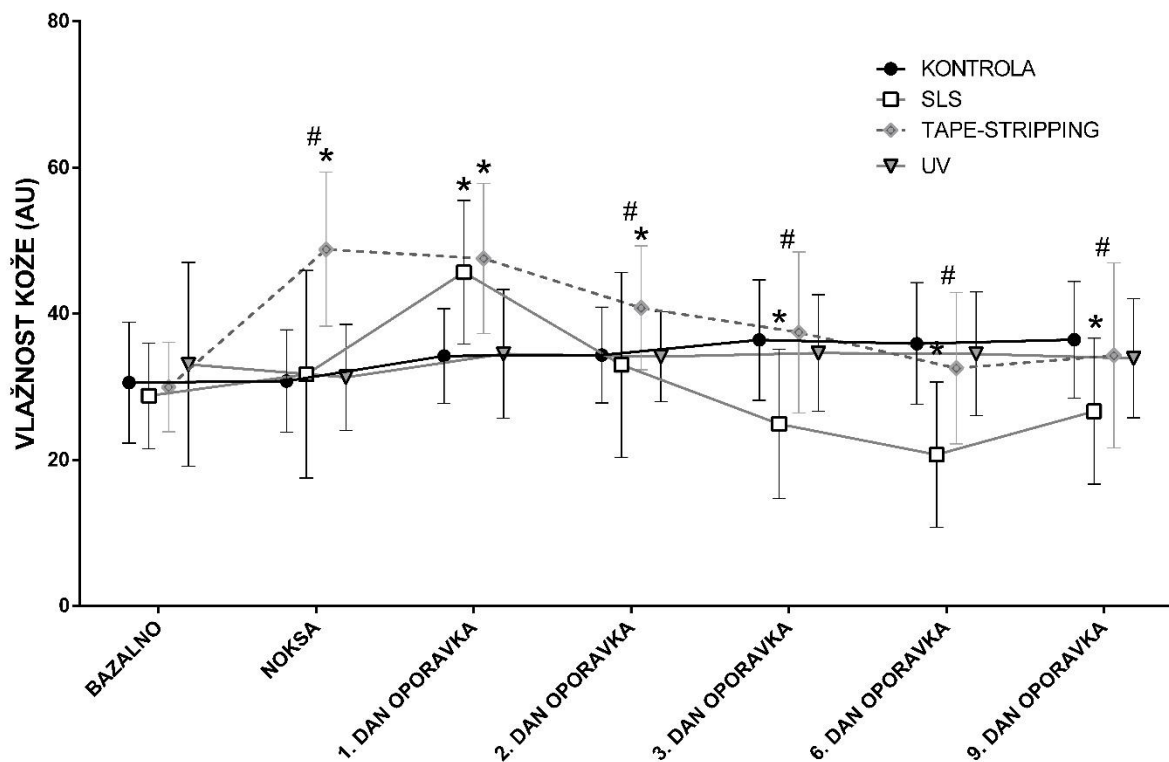
Slika 13. Usporedba vrijednosti transepidermalnog gubitka vode (TEWL) između kontrole i tri modela oštećenja kože. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja i Sidak *post-hoc* testom.

\*  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolom

#  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s *tape-stripping*-om

#### 4.2.3. Vlažnost kože

Na dan procjene inducirano oštećenja kože, SLS i UV zračenje nisu značajno promijenili vrijednosti vlažnosti kože u usporedbi s kontrolom, dok je *tape-stripping* povisio vlažnost (Slika 14). Vrijednosti su ostale povišene prvi, drugi i treći dan oporavka. Međutim, prvi dan oporavka nakon iritacije SLS-om je došlo do povišenja, a zatim na treći, šesti i deveti dan oporavka do naglog sniženja vrijednosti vlažnosti kože. Mjesta izložena UV zračenju ponovno nisu pokazala promjenu vrijednosti mjerenog parametra tijekom pokusa.



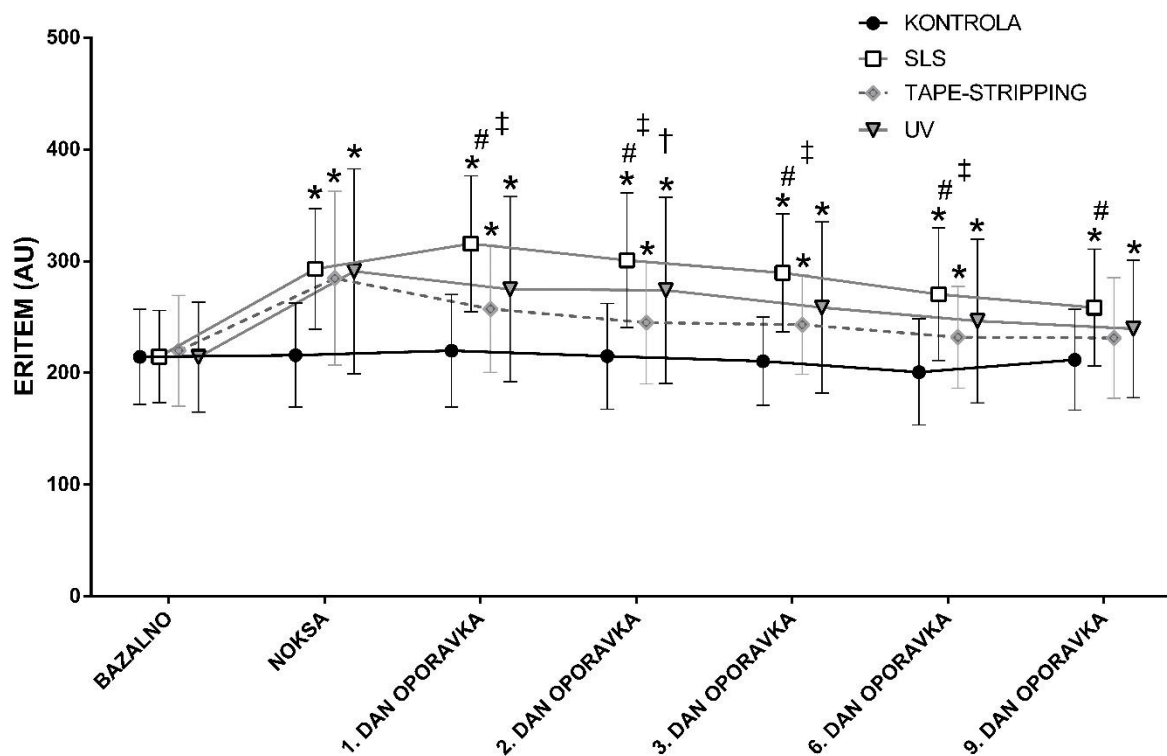
Slika 14. Usporedba vrijednosti vlažnosti između kontrole i tri modela oštećenja kože. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja i Sidak *post-hoc* testom.

\*  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolom

#  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s *tape-stripping*-om

#### 4.2.4. Eritem

Vrijednosti eritema su bile značajno povišene u sva tri ispitivana modela (Slika 15). Vrijednosti odmah nakon oštećenja se nisu razlikovali između tri modela. Međutim, vrijednost eritema se u SLS modelu dalje povisila prvi dan oporavka, u odnosu na mjerenje odmah nakon nokse, dok se u preostala dva modela smanjivala. Nadalje, SLS je izazvao snažniji eritem u odnosu na *tape-stripping* u svim preostalim vremenskim točkama, te snažniji eritem u usporedbi s UV zračenjem na prvi, drugi, treći i šesti dan oporavka. U usporedbi s kontrolom, SLS i UV zračenje su imali značajno više izmjerene vrijednosti u svim točkama mjerenja tijekom pokusa dok se vrijednost eritema nakon *tape-stripping*-a nije razlikovala od kontrolne na posljednji, deveti dan mjerenja.



Slika 15. Usporedba vrijednosti eritema između kontrole i tri modela oštećenja kože. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja i Sidak *post-hoc* testom.

\*  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolom

#  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s *tape-stripping*-om

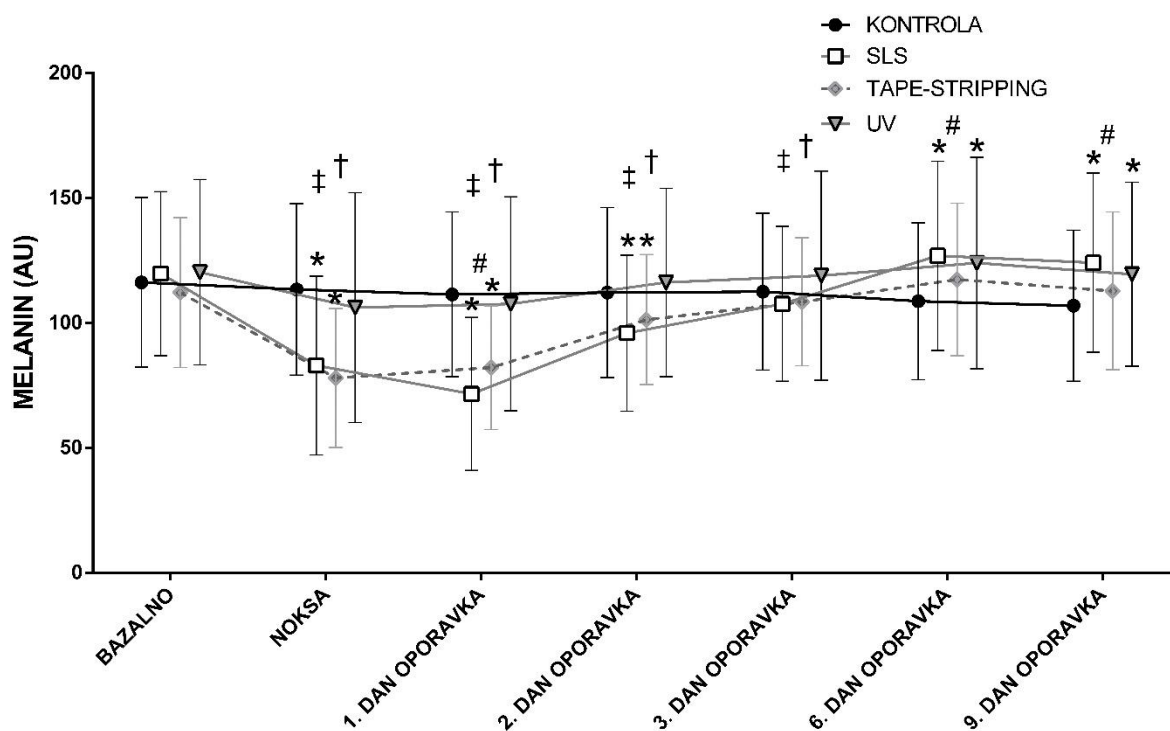
‡  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s UV

†  $P < 0,05$ , *tape-stripping* u usporedbi s UV

#### 4.2.5. Melanin

Oštećenje kože inducirano SLS-om i *tape-stripping*-om je dovelo do smanjenja izmjerene vrijednosti melanina, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na vrijednosti kontrole na dan evaluacije oštećenja te prvi i drugi dan oporavka (Slika 16). Na dan treći dan oporavka je došlo do izjednačavanja vrijednosti melanina kod ta dva modela s kontrolnim vrijednostima. Međutim, izmjerena vrijednost melanina u koži nakon SLS-om inducirane iritacije je dalje nastavila rasti i bila je značajno viša u odnosu na kontrolu u ostalim točkama pokusa. Izmjerene vrijednosti melanina u koži su također bile povišene na mjestima izloženim

UV zračenju šesti i deveti dan oporavka. U usporedbi s kožom nakon *tape-stripping*-a, koža nakon izlaganja SLS-u je imala snažniji pad razine melanina u prvom danu oporavka, ali je SLS izazvao i snažnije povišenje mjenenog melanina na šesti i deveti dan oporavka, iako razlika šesti i deveti dan nije bila statistički značajna.



Slika 16. Usporedba vrijednosti melanina između kontrole i tri modela oštećenja kože. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednosti i standardna devijacija i analizirani dvosmjernom analizom varijance za ponovljena mjerenja i Sidak *post-hoc* testom.

\*  $P < 0,05$  u usporedbi s kontrolom

#  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s *tape-stripping*-om

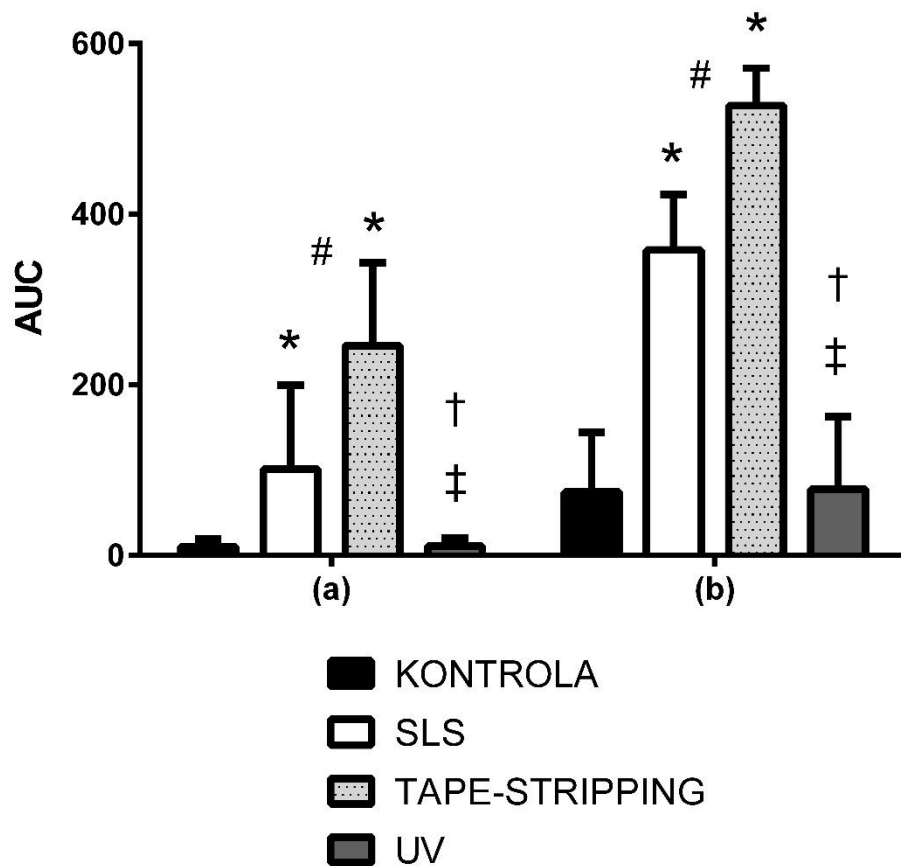
‡  $P < 0,05$ , SLS u usporedbi s UV

†  $P < 0,05$ , *tape-stripping* u usporedbi s UV

#### 4.2.6. Stopa oporavka kože

Slika 17 prikazuje razlike u stopama oporavka kože između modela oštećenja kože. Koža oštećena *tape-stripping*-om je pokazala brži oporavak u odnosu na kožu iritiranu SLS-om (AUC:  $245,9 \pm 157,2$  vs  $101,1 \pm 113,9$ ,  $p < 0,05$ , rezultati prikazani kao medijan i interkvartilni

raspon). Rezultati dobivena preko deriviranog parametra su u suglasnosti s prethodnim rezultatima (AUC / TEWL<sub>Lnoksa</sub>: 5,3±0,9 vs 3,6±1,5, p<0,01, rezultati prikazani kao medijan i interkvartilni raspon).



Slika 17. Stope oporavka kože i derivirani parametri. Rezultati prikazani kao medijan i interkvartilni raspon i analizirani Mann-Whitney U testom.

a) AUC

b) AUC / TEWL<sub>Lnoksa</sub> # podatci pomnoženi sa 100 s ciljem omogućavanja prikaza na istom grafikonu

\* P<0,05 u usporedbi s kontrolom

# P<0,05, SLS u usporedbi s *tape-stripping*-om

‡ P<0,05, SLS u usporedbi s UV

† P<0,05, *tape-stripping* u usporedbi s UV

#### 4.2.7. Korelacija bazalnih vrijednosti s odgovorom kože u modelima oštećenja kože

Bazalne TEWL vrijednosti nisu bile u korelaciji s odgovorom kože ni u jednom mjerenom parametru u modelu oštećenja kože SLS-om, dok je kod *tape-stripping* modela pokazana korelacija samo s TEWL vrijednošću (Tablica 6).

Bazalna vrijednosti vlažnosti kože su korelirale s vrijednostima vlažnosti, eritem i melanina nakon SLS-om induciranog oštećenja kože kao i TEWL vrijednostima, vlažnosti i eritemom nakon *tape-stripping*-a (Tablica 6).

		Pearsonov koeficijent r			
		TEWL	Vlažnost	Eritem	Melanin
Bazalni TEWL	SLS model	0,271	-0,019	0,183	-0,293
	<i>Tape-stripping</i> model	0,503 **	0,318	-0,081	0,027
Bazalna vlažnost kože	SLS model	0,028	0,619 ***	-0,385*	-0,523 **
	<i>Tape-stripping</i> model	0,447 *	0,695 ****	-0,395 *	-0,370

Tablica 6. Korelacija bazalnih TEWL vrijednosti i vrijednosti vlažnosti kože s odgovorom kože na oštećenje u modelu oštećenja kože SLS-om i *tape-stripping*-om.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.2.8. Učinci topikalne terapije pripravkom s uljem gospine trave (*Hypericum perforatum*)

Nije pronađena statistički značajna razlika između aktivnog pripravka s uljem gospine trave (*Hypericum perforatum*) i placebo ni u jednom mjerenom parametru ni u jednom korištenom modelu oštećenja kože. Također, topikalna terapija nije poboljšala parametre neoštećene kontrolne kože. Podatci su prikazani u Tablicama 7, 8, 9 i 10.

#### 4.2.9. Potpuni pregled podataka za sve modele oštećenja kože i kontrolu

Potpuni pregled podataka za sve modele oštećenja kože i kontrolu, po svim mjerenim parametrima, je dan u tablicama 7, 8, 9 i 10.



			Bazalno	Noksa	1. dan oporavka	2. dan oporavka	3. dan oporavka	6. dan oporavka	9. dan oporavka
Transepidermalni gubitak vode (g m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Placebo	Srednja vrijednost	12,8	13,0	12,0	12,5	12,2	12,5	11,2
		SD	3,8	2,6	3,5	4,1	3,5	3,4	2,5
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	14,4	13,7	12,2	12,6	12,6	12,9	11,2
		SD	3,9	2,5	2,9	2,6	2,9	2,6	2,6
Vlažnost kože (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	30,6	30,8	34,2	34,3	36,4	35,9	36,4
		SD	8,3	7,0	6,5	6,6	8,2	8,3	8,0
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	29,6	31,1	34,8	34,2	35,9	37,5	36,9
		SD	8,9	8,0	8,9	6,9	7,7	9,0	7,8
Eritem (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	214,3	215,9	219,8	214,9	210,5	200,8	211,8
		SD	42,5	46,6	50,4	47,3	39,7	47,6	45,1
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	213,4	220,1	217,9	215,1	216,9	203,9	203,3
		SD	44,7	50,1	58,2	44,9	47,6	51,1	46,2
Melanin (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	116,3	113,5	111,5	112,2	112,5	108,7	106,9
		SD	34,0	34,3	32,9	34,0	31,3	31,4	30,2
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	117,3	114,4	114,1	110,6	111,4	113,8	110,5
		SD	35,1	35,3	33,0	32,4	31,6	34,3	34,7

Tablica 7. Kontrola

			Bazalno	Noksa	1. dan oporavka	2. dan oporavka	3. dan oporavka	6. dan oporavka	9. dan oporavka
Transepidermalni gubitak vode (g m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Placebo	Srednja vrijednost	13,2	39,5	42,6	31,3	24,7	17,8	13,2
		SD	3,5	17,0	17,1	8,4	7,1	3,3	2,0
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	14,1	40,9	39,7	30,2	23,0	17,0	13,8
		SD	3,1	17,1	13,2	8,9	4,7	4,2	3,6
Vlažnost kože (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	28,8	31,7	45,7	33,0	24,9	20,7	26,7
		SD	7,2	14,2	9,8	12,7	10,2	10,0	10,0
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	29,3	31,3	43,2	31,4	26,9	22,8	28,3
		SD	6,3	11,1	9,9	10,9	9,5	10,1	9,0
Eritem (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	214,6	293,1	315,6	300,8	289,6	270,4	258,6
		SD	41,2	54,0	60,8	60,2	52,9	59,3	52,3
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	221,3	282,6	314,9	297,0	283,6	258,2	253,2
		SD	49,4	52,9	63,5	62,1	50,9	55,9	54,2
Melanin (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	119,8	83,0	71,6	95,9	107,7	127,0	124,2
		SD	32,9	35,8	30,6	31,2	31,0	37,9	35,9
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	117,4	79,7	69,8	93,8	103,7	129,5	119,2
		SD	30,0	34,5	30,2	29,6	30,9	43,9	30,6

Tablica 8. Model kemijskog modela oštećenja kože - iritativni dermatitis izazvan natrij laurilsulfatom

			Bazalno	Noksa	1. dan oporavka	2. dan oporavka	3. dan oporavka	6. dan oporavka	9. dan oporavka
Transepidermalni gubitak vode (g m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Placebo	Srednja vrijednost	13,1	50,0	30,4	24,0	19,9	15,7	13,9
		SD	2,6	14,5	12,8	7,8	6,9	3,9	2,8
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	13,1	48,9	29,8	23,6	20,9	16,1	13,1
		SD	2,8	10,4	8,1	6,1	5,9	3,7	3,7
Vlažnost kože (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	30,0	48,8	47,6	40,8	37,4	32,6	34,3
		SD	6,1	10,6	10,3	8,5	11,0	10,4	12,7
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	30,3	47,0	47,1	44,3	40,7	34,8	34,6
		SD	6,6	8,6	11,7	10,4	10,0	8,3	10,8
Eritem (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	219,8	284,5	257,3	245,0	243,1	231,9	231,2
		SD	49,5	77,8	56,9	54,8	44,5	45,5	53,8
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	231,4	280,8	256,2	255,4	245,3	225,4	228,7
		SD	51,9	65,7	61,5	55,3	51,4	57,4	55,6
Melanin (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	112,2	78,0	82,2	101,4	108,5	117,5	112,9
		SD	30,0	27,8	24,8	26,0	25,6	30,5	31,6
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	116,0	79,5	80,5	96,6	103,0	110,6	108,3
		SD	29,9	27,4	24,3	27,9	27,6	30,0	29,2

Tablica 9. Model mehaničke iritacije *tape-stripping* metodom

			Bazalno	Noksa	1. dan oporavka	2. dan oporavka	3. dan oporavka	6. dan oporavka	9. dan oporavka
Transepidermalni gubitak vode (g m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Placebo	Srednja vrijednost	13,2	13,2	11,6	12,1	11,9	11,8	10,4
		SD	3,8	2,8	3,3	3,1	3,2	2,5	2,6
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	14,5	13,8	12,0	12,4	12,7	12,8	11,9
		SD	4,2	3,5	2,9	3,5	3,7	4,5	4,2
Vlažnost kože (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	33,1	31,3	34,5	34,1	34,6	34,5	33,9
		SD	14,0	7,3	8,8	6,1	8,0	8,5	8,1
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	28,7	31,3	34,3	33,5	35,1	35,2	35,4
		SD	7,4	6,8	7,7	6,3	8,3	7,8	7,3
Eritem (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	214,2	290,9	274,9	273,9	258,5	246,3	239,4
		SD	49,2	91,6	82,7	83,2	76,7	73,2	61,6
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	211,7	279,0	274,0	274,0	257,7	238,8	238,3
		SD	46,9	93,0	85,5	85,6	78,8	76,0	68,9
Melanin (AU)	Placebo	Srednja vrijednost	120,4	106,2	107,6	116,2	119,0	124,1	119,5
		SD	37,1	46,1	42,9	37,7	41,9	42,3	36,8
	<i>Hypericum perforatum</i>	Srednja vrijednost	117,8	107,1	105,5	111,9	113,2	118,8	116,1
		SD	38,6	41,6	41,1	43,3	36,3	33,3	33,2

Tablica 10. Model fizikalnog oštećenja kože ultraljubičastim zračenjem

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Klinički pokus 1

Cilj kliničkog pokusa 1 je bilo odrediti postojanje razlike u reakciji kože na iritaciju uzrokovanu SLS-om, na dvije anatomske lokacije, podlaktice i gornji dio leđa. Koža gornjeg dijela leđa je imala više izmjerene TEWL vrijednosti nakon iritacije, u usporedbi s podlakticama, što je pokazatelj snažnijeg oštećenja kožne barijere. Nadalje, koža gornjeg dijela leđa je pokazala snažniji upalni odgovor s višim vrijednostima eritema. Iritacija je također dovela do veće suhoće kože na leđima. Rezultati kliničke procjene kože su u ovom pokusu bili konzistentni s rezultatima neinvazivnih mjerenja parametara kože. Druga istraživanja također daju naslutiti postojanje razlike u odgovoru kože na iritaciju između različitih anatomskih lokacija. U istraživanju Cua i sur. (69), iritacija SLS-om kože gornjeg dijela leđa je imala za posljedicu više TEWL vrijednosti i vrijednosti vlažnosti u odnosu na podlaktice, dok je istraživanje Lavrijsen i sur. (70) pokazalo više TEWL vrijednosti i eritem kože leđa, ali bez statističke značajnosti, vjerojatno zbog malog uzorka ispitanika ( $n = 9$ ). U ovom pokusu, bez obzira na snažniji odgovor leđa, nije postojala razlika između izmjerenih TEWL vrijednosti između leđa i podlaktica na posljednji dan mjerenja. To ukazuje na brži oporavak kože leđa što potvrđuje izračun stope oporavka kože (AUC) (68). Osim izračuna stope oporavka, izračunata su i dva derivirana parametra, s ciljem potvrde da nastala razlika u izračunatim stopama nije posljedica toga što su leđa u startu imala više TEWL vrijednosti, već bržeg oporavka kožne barijere. Razlika je postojala i bila statistički značajna nakon obje standardizacije što potvrđuje validnost zaključaka o razlikama u oporavku kože između anatomskih lokacija.

Neinvazivna mjerenja parametara su pokazala razliku između vrijednosti odmah nakon iritacije i bazalnih vrijednosti u svim mjerenim parametrima, na kontrolnim mjestima gdje je umjesto otopine SLS-a primijenjena deionizirana voda. Promjena mjerenih parametara je bila prolazna, pojavljujući se samo na dan procjene iritacije i minimalna u usporedbi s vrijednostima iritacije inducirane SLS-om. Navedene primjene nisu bile okom vidljive te klinička procjena nije pokazala postojanje promjena na koži. Vjerojatni uzrok je bila okluzija kože Finnovom komorom. Vrijednosti mjerenja su se idući dan vratile na bazalne vrijednosti te su ostale jednake bazalnim do kraja pokusa.

Neinvazivna mjerenja parametara su također pokazala razliku u bazalnim vrijednostima vlažnosti i eritema između kože na dvije anatomske lokacije. Vrijednosti oba parametra su bile

niže na podlakticama, što se slaže s prethodno objavljenim podacima (65, 66, 69, 76, 77). Pronađene su i razlike u bazalnim vrijednostima i drugih parametara kože (64). Emtestam i Ollmar su izmjerili niže vrijednosti impedancije na koži podlaktica u odnosu na leđa (78). Još jedno istraživanje je pronašlo razliku u prokrvljenosti kože gdje je koža leđa bila prokrvljenija u odnosu na podlaktice (70). Nadalje, koža na leđima je deblja (66) iako je debljina i broj slojeva stanica rožnatog sloja između leđa i podlaktica međusobno usporediva (79-81). Predložen je odnos bazalne TEWL vrijednosti kože i njene reaktivnosti na iritaciju, pri čemu se smatra da koža s nižim bazalnim TEWL vrijednostima slabije reagira na iritanse (82). Kako se bazalne TEWL vrijednosti izmjerene na podlakticama i leđima u ovom pokusu nisu razlikovale, očekivali bi kako će odgovor kože tih anatomskih lokacija na iritaciju biti sličan. Međutim, rezultati ovog pokusa pokazuju kako je iritacija na leđima bila snažnija u odnosu na iritaciju na podlakticama. Izračun korelacija bazalne TEWL vrijednosti s vrijednostima svih mjerenih parametara nakon iritacije potvrđuje nedostatnost bazalne TEWL vrijednosti kao prediktora iritacije.

Kao uzrok razlika u reakciji kože na iritaciju i njen oporavak su predložene morfološke razlike kože na različitim anatomskim lokacijama (68). Primijećene su razlike u sastavu ceramida i prirodnog faktora vlaženja (NMF, engl. *natural moisturizing factor*) između kože na različitim anatomskim lokacijama, što bi također moglo imati utjecaja na prikazane razlike odgovora na iritaciju i razlika u oporavku (83). Još jedno objašnjenje bi mogla biti razlika u prodoru SLS-a kroz kožu jer je opseg oštećenja u jednom prethodnom istraživanju bio u korelaciji sa stopom penetracije SLS kroz kožu (84). Razlika između kože na različitim anatomskim lokacijama u brzini prodora tvari kroz kožu je prethodno utvrđena (85), poput razlike u apsorpciji hidrokortizona (86). Rezultati jednog istraživanja su pokazali da bazalne razine citokina IL-8 i antagonista receptora za interleukin 1 (IL-1RA) mogu predvidjeti oštećenja kože nakon akutnog izlaganja 1%-tnoj otopini SLS-a (87). Međutim, ne postoji ni jedno istraživanje koje bi potvrdilo postojanje različite bazalne razine citokina u koži na različitim anatomskim lokacijama.

Na temelju svega iznesenog, svojstva kože i podložnost iritaciji bi mogli biti ovisni o anatomskoj lokaciji kože. Također, prethodno opisani čimbenici bi mogli dovesti i do različitog odgovora kože na topikalnu terapiju, ovisno o anatomskoj lokaciji. Iritativni dermatitis se smatra najčešćim uzrokom ekcema ruku, ali iritacija često zahvaća i kožu leđa i lica (2, 88). S obzirom da većina istraživanja ispituje učinkovitost terapije na podlakticama, dobiveni učinak

neće nužno biti moguće replicirati na drugim anatomskim lokacijama. Nadalje, to može onemogućiti izravnu usporedbu rezultata istraživanja između različitih studija koje se razlikuju u izboru anatomske lokacije testiranja. Zbog tih razloga je potrebno točno i detaljno definirati i opisati testna mjesta (70).

Emolijentni pripravci su preporučeni u terapiji i prevenciji iritativnog dermatitisa prema više objavljenih smjernica (13, 14, 89-91). Komercijalno dostupna emolijentna krema je odabrana kao terapija u ovom pokusu na temelju njenih sastojaka. Odabrana formulacija je sadržavala ureu, aminokiseline i jednostavne šećere, sve sastojke NMF-a (92-94). Urea je učinkovit i siguran humektans (95). Lipidna komponenta kreme je bilo ulje badema. Primijećeno je kako su pripravci koji sadrže kombinaciju humektansa i lipida učinkovitiji od formulacija koje sadrže isključivo jedan od navedenih sastojaka (96). Unatoč tome, dostupni dokazi za navedeni pripravak su relativno mali i ograničeni u usporedbi s drugim testiranim emolijentnim pripravcima poput pripravka istraživanog u studiji Akerstrom i sur. (97). U ovom pokusu, uspoređivani su učinci terapije emolijentnom kremom na iritiranoj i intaktnoj koži s ekvivalentnim mjestima bez terapije. Testirana krema nije postigla koristan učinak ni u jednom mjerenom parametru, u usporedbi s fiziološkim oporavkom kože na neiritiranoj koži. Mogući razlog nedostatka učinka može biti dvanaest satni interval između primjene kreme i mjerenja. Ovaj interval je bio potreban za osiguranje validnosti mjerenja TEWL vrijednosti, ali dodatna mjerenja vlažnosti kože su možda mogla pokazati razliku između mjesta s i bez terapije. Također, akutni model iritacije izabran za ovaj pokus dovodi do nastanka snažne iritacije, te emolijentni pripravak sam nije mogao popraviti mjere ishoda. Krema je testirana isključivo kao terapija nakon iritacije. Pretretman zdrave, intaktne kože emolijentnim pripravkom je pokazao sposobnost smanjenja podložnosti kože iritaciji nakon izlaganja SLS-u (98-100) te podložnosti kože nastanku različitih tipova dermatitisa (99, 101). Zbog toga bi takav pretretman mogao utjecati na razliku odgovora na iritans i oporavak između anatomskih lokacija. Potrebna su dodatna istraživanja na različitim modelima iritacije ili na pacijentima s iritativnim dermatitisom s duljim vremenom praćenja za daljnje testiranje učinaka ove emolijentne kreme.

### 5.1.1. Nedostatci i ograničenja kliničkog pokusa 1

U klinički pokus 1 su uključeni samo mladi ispitanici bijele boje kože. Prethodno provedena istraživanja su pokazala da su mladi ljudi podložniji iritaciji SLS-om dok su stariji pokazivali slabije reakcije na taj iritans (69). Nadalje, tip kože i rasa također mogu utjecati na reaktivnost kože (102). Navedeni čimbenici mogu ograničavati generalizaciju pronalazaka ove studije.

Još jedan čimbenik koji je mogao utjecati na rezultate ovog pokusa je moguća alergijska reakcija na sastojke ispitivane emolijentne kreme. Pripravak su koristili svi ispitanici na kontrolnim mjestima bez iritacije, te ni jedan ispitanik nije razvio kliničke znakove alergije ili iritacije, što je dalje potvrđeno neinvazivnim mjerenjima parametara kože. Mjereni parametri na tim mjestima nisu se razlikovali od bazalnih vrijednosti tijekom cijelog trajanja pokusa. Iz tih razloga se smatra da nisu mogli utjecati na rezultate istraživanja.

Bazalne vrijednosti kože i podložnost iritaciji se mogu razlikovati između različitih mjesta na istoj anatomskej lokaciji (103). Utjecaj intraregionalne varijacije na rezultate je smanjen korištenjem dvostruke randomizacije. Mjesta na leđima gdje su postavljane komore s iritansima su uvijek bili na suprotnim stranama leđa, međusobno dovoljno udaljeni, s ciljem izbjegavanja nastanka „*angry back*“ sindroma (70). Ispitanici su samostalno primjenjivali emolijentni pripravak, što može predstavljati ograničenje i djelomično objasniti nedostatak učinaka u ovom pokusu. Ispitanici su dobili upute kako primijeniti testirani pripravak koristeći priloženi dozirni oblik i demonstrirati njegovu primjenu, s ciljem smanjenja utjecaja tog ograničenja, te donijeti prazni spremnik kao dokaz primjene.



## 5.2. Klinički pokus 2

Koža ispitanika je pokazala različitu reakciju na oštećenja inducirana u tri ispitivana modela, s različitim utjecajem na mjerene parametre kože i oporavak. Povišenje TEWL vrijednosti je primijećeno u modelu iritativnog dermatitisa inducirano SLS-om i *tape-stripping* modelu, dok UV model nije doveo do istog učinka na kožu. *Tape-stripping* metoda je mehaničko uklanjanje gornjeg sloja kože (104), dok SLS oštećuje keratinocite, utječe na sintezu lipida i denaturira proteine čime remeti funkcije rožnatog sloja kože (29, 34, 105). Na taj način dolazi do poremećaja funkcije kožne barijere što potvrđuju TEWL mjerenja. Izlaganje UV zračenju dovodi do nastanka oksidativnog stresa i oksidacije staničnih molekula, uključujući lipide stanične membrane (106). Nadalje, inducira upalne i apoptotske signalne puteve te remeti metaboličku aktivnost kože i proliferaciju epidermalnih stanica (106-108). Međutim, ni jedan od navedenih učinaka UV zračenja izravno ne utječe na kožnu barijeru nakon akutne izloženosti i, posljedično, njena funkcija i struktura nisu značajno promijenjene (44, 45). Kronično izlaganje UV zračenju bi moglo dovesti do značajnijeg oštećenja rožnatog sloja kože koje bi imalo utjecaja na mjerene TEWL vrijednosti. Unatoč tome, u studiji Lim i sur. je primijećeno povišenje TEWL vrijednosti nakon akutne izloženosti UV zračenju koje odgovara cijelom sunčevom UV spektru, čak i u dozama nižim od 1 MED (49). Treba napomenuti da je testiranje u toj studiji provedeno na koži leđa, a ne podlaktica, te se ne može izravno usporediti. Međutim, rezultati niza drugih studija ne pokazuju postojanje značajnog povišenja TEWL vrijednosti nakon akutnog izlaganja UV zračenju, pri čemu je dio istraživanja ponovno proveden na leđima, a jedno istraživanje, Zhou i sur. na podlakticama (44, 45, 72). U *tape-stripping* modelu, u periodu oporavka kože dolazi do oštrog pada TEWL vrijednosti, u odnosu na model iritativnog dermatitisa, što ukazuje na brži oporavak kože. Nasuprot tome, kod modela iritativnog dermatitisa TEWL vrijednost je prvi dan oporavka dodatno porasla i ostvarila maksimalnu vrijednost. Uzrok takve promjene može biti produljena imunološka reakcija na iritans ili snažniji prodor SLS-a u niže slojeve epidermisa i njegova produljena prisutnost u koži (109, 110). Razlika u stopi oporavka je potvrđena izračunom AUC vrijednosti. Kako su se izmjerene TEWL vrijednosti na dan procjene oštećenja kože razlikovale između modela, napravljena je standardizacija prema TEWL vrijednosti nakon noksi (111). Rezultati analize podataka za stopu oporavka dobivenu izračunom AUC su se slagali s rezultatima deriviranog parametra što je potvrdilo validnost dobivenih rezultata.

Izmjerene vrijednosti vlažnosti kože su bile povišene u *tape-stripping* modelu odmah nakon nokse, vjerojatno kao posljedica izloženosti donjih slojeva epidermisa koji imaju drugačija svojstva, poput vlažnosti, u odnosu na rožnati sloj (68). U studiji Breternitz i sur. je pronađen pad vlažnosti kože na podlakticama, što je u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja (36), ali je u više drugih studija pronađeno povišenje vlažnosti na podlakticama, ali i na leđima (37, 68). Povišenje mjerene vrijednosti nije ovisilo o načinu provođenja *tape-stripping* postupka. Vrijednosti vlažnosti su se vratile na vrijednosti istovjetne kontrolnima na treći dan oporavka. U modelu iritativnog dermatitisa, vlažnost kože je bila povišena na prvi dan oporavka, moguće kao posljedica literaturno opisane eksudacije mjesta iritacije (111). Poslije dolazi do smanjenja vlažnosti kože iritiranih mjesta, očekivanog učinka SLS-om inducirane iritacije (29, 111), koja je ostala smanjena u odnosu na kontrolne vrijednosti čak i na posljednji dan mjerenja. Vrijednosti vlažnosti nakon izlaganja UV zračenju su ostale nepromijenjene, te se nisu razlikovala od kontrolnih vrijednosti. Navedeni rezultati su u suprotnosti s literaturno pronađenim rezultatima, gdje je primijećen pad vlažnosti kože nakon akutnog izlaganja UV zračenju, uključujući istraživanje gdje je testiranje provedeno na podlakticama (45, 49, 72).

Vrijednosti eritema kože su očekivano bile povišena u svim ispitivanim modelima, bez statistički značajne razlike između modela na dan procjene učinka noksi. Međutim, vrijednost eritema u modelu iritativnog dermatitisa je dalje rasla prvi dan oporavka, poput TEWL vrijednosti u istom modelu, te je bila značajno viša u usporedbi s vrijednostima u ostalim modelima. Vrijednosti u *tape-stripping* modelu karakterizira brzi pad izmjerenih vrijednosti i povratak vrijednosti na kontrolne posljednji dan istraživanja, što je također konzistentno s promjenama TEWL vrijednostima u tom modelu. Rezultati prethodnih istraživanja su međusobno proturječni. U istraživanju Breternitz i sur. nije došlo do promjene eritema nakon nokse na podlakticama, dok su preostala dva pronađena istraživanja u skladu s rezultatima ovog istraživanja (36, 37, 68). Izmjerene vrijednosti eritema na posljednji dan mjerenja u modelima iritativnog dermatitisa i UV modelu su bile značajno više od kontrolnih, što ukazuje da oporavak kože u tim modelima nije bio potpun.

Na dan procjene učinka nokse u *tape-stripping* modelu i modelu iritacije SLS-om je došlo do smanjenja izmjerene vrijednosti melanina dok se vrijednost nakon UV zračenja nije razlikovala od kontrolne. Kasnije, razine melanina su se postupno povećavale u svim modelima. Vrijednost u *tape-stripping* modelu se na posljednji dan mjerenja vratila na

vrijednost kontrole dok su vrijednosti u preostala dva modela porasle značajno iznad kontrolnih. UV zračenje povisuje razine melanina nekoliko sati nakon akutnog izlaganja, kao posljedica preraspodjele i oksidacije melanina, međutim taj učinak nije primijećen u ovom istraživanju (112). Primijećeno je odgođeno tamnjenje koje je vidljivo kao povišenje melanina šesti i deveti dan oporavka (112). Oštećenja kože u preostala dva modela su također dovela do povišenja razine melanina. Prethodna istraživanja su pokazala kako upalni procesi u koži mogu potaknuti sintezu i preraspodjelu melanina u koži (113). *Tape-stripping* i SLS mogu izazvati oštećenje kože čija posljedično nastala upala bi mogla biti dovoljno snažna da dovede do ovog učinka.

Izračun korelacije bazalnih vrijednosti parametara kože i parametara nakon noksi je napravljen za *tape-stripping* model i model iritativnog dermatitisa, kod kojih je došlo do promjene gotovo svih praćenih parametara, za razliku od UV modela. Također, u UV modelu nije došlo do oštećenja kožne barijere. Svrha analize korelacije je bilo određivanje postojanja povezanosti bazalne vrijednosti parametara kože s nastalim oštećenjima kože. Bazalne vrijednosti dva parametra su odabrana: TEWL i vlažnost kože, iz razloga što ih dosadašnja literatura prepoznaje kao prediktore oštećenja kože (114, 115). Bazalna TEWL vrijednost se posebno ističe kao prediktor iritacije inducirane surfaktantima kao što je SLS. Međutim, ovo istraživanje nije pronašlo korelaciju bazalne TEWL vrijednosti ni s jednim parametrom nakon iritacije u modelu iritativnog dermatitisa. Prikazani rezultati su u suprotnosti s ustaljenim mišljenjem u objavljenoj literaturi (82, 105, 116), ali, uz ovo istraživanje, postoji još istraživanja koja su u suprotnosti s navedenom tezom (111, 117). Nasuprot tome, bazalni TEWL je pokazao korelaciju s oštećenjem kože u *tape-stripping* modelu, iako samo u jednom parametru: TEWL vrijednosti nakon nokse. Međutim, takva korelacija je očekivana s obzirom da je trostruko povećanje TEWL vrijednosti u odnosu na bazalnu bila zadana ciljna vrijednost prema metodologiji same nokse. Fujimura i sur. (114) su predložili drugi parametar, vlažnost kože, mjerenu koristeći *Corneometer*, kao prikladniji pokazatelj i prediktor iritacije inducirane SLS-om. Ovo istraživanje se slaže s njihovim zaključcima, jer je bazalna vrijednost vlažnosti bila u korelaciji s vlažnosti, eritemom i vrijednosti melanina nakon nokse u modelu iritativnog dermatitisa. Također, korelacija s bazalnom vrijednosti vlažnosti kože je pronađena u *tape-stripping* modelu. Zbog toga bi se bazalna vrijednost vlažnosti kože mogla koristiti kao prediktor oštećenja kože i u *tape-stripping* modelu, uz primjenu u modelu iritativnog dermatitisa. Parametar vlažnost kože bi mogao biti primjenjiviji od TEWL vrijednosti jer je pokazao korelaciju s više parametara i u oba modela.

Terapija topikalnim pripravkom gospine trave nije utjecala na parametre kože ni u jednom modelu ni na neoštećenoj koži. Izravna usporedba s placeboom nije pokazala postojanje razlike ni u jednom mjerenom parametru ni modelu. Terapija nije izazvala iritaciju ni alergijsku reakciju kod ispitanika. Zbog izostanka očekivanih učinaka terapije (118-121), napravljena je *post-festum* analiza upotrijebljenog ulja gospine trave. Sadržaj hipericina, hiperforina i amentoflavona je određen koristeći HPLC metodu opisanu u Božin i sur. (122). Analiza je pokazala kako korišteno komercijalno ulje nije sadržavalo ni jedan od prethodno navedenih sastojaka. Nedostatak učinaka topikalne terapije se može pripisati nedostatku aktivnih sastojaka u testiranom ulju. Hiperforin se smatra aktivnom tvari ulja gospine trave odgovornom za njegove učinke na cijeljenje rana i oštećenja kože (120, 123-125), iako jedno istraživanje pokazuje kako bi hipericin i flavonoidi gospine trave, ali i ostalih biljnih vrsta iz porodice *Hypericum*, također mogli biti aktivni sastojci (126).

### 5.2.1. Nedostatci i ograničenja kliničkog pokusa 2

U kliničkom pokusu 2, oštećenja kože su inducirana na podlacticama mladih, zdravih ispitanika bijele rase. Navedeno predstavlja moguće ograničenje ovog istraživanja iz razloga što parametri kože, njena reakcija na oštećenja te brzina oporavka mogu ovisiti o anatomskej lokaciji gdje su vršena ispitivanja te dobi i boji kože ispitanika (68, 111, 127, 128).

Kao i u prvom kliničkom pokusu, provedena je dvostruka randomizacija s ciljem ograničavanja učinka intraregionalne varijacije parametara kože.

Također, ispitanici su sami primjenjivali topikalnu terapiju. Sve prve primjene pripravaka na dane mjerenja su provođene uz nadzor, s ciljem smanjenja utjecaja ovog ograničenja. Nadalje, provedene su i druge mjere s ciljem osiguranja adherencije ispitanika i smanjenja mogućnosti nastanka pogreške prilikom primjene terapije, što je detaljno opisano u metodama.

Još jedno ograničenje predstavlja nedostatak aktivnih tvari u ispitivanom pripravku gospine trave. Iz tog razloga nije moguće donijeti nikakve zaključke o učincima ulja gospine trave na parametre kože i njen oporavak u ispitivanim modelima.

## 6. ZAKLJUČAK

Osjetljivost kože na iritaciju SLS-om u modelu akutnog iritativnog dermatitisa je ovisna o anatomske lokaciji, sa značajno snažnijom reakcijom kože gornjeg dijela leđa u odnosu na kožu volarne strane podlaktica.

Stope oporavka kože su također pokazale ovisnost o anatomske lokaciji, sa značajno bržim oporavkom kože gornjeg dijela leđa u odnos na kožu podlaktica.

Ispitivana emolijentna krema nije dovela do poboljšanja mjerenih parametara kože u modelu akutnog iritativnog dermatitisa.

Tri ispitivana modela oštećenja kože su imala značajno različite učinke na parametre kože, pri čemu je u modelu iritativnog dermatitisa došlo do najsnažnijeg oštećenje kože i odgođene reakcije na iritans, kod *tape-stripping* modela je primijećen najbrži oporavak kože nakon nokse dok je nakon UV zračenja došlo do promjene u samo dva mjerena parametra: eritemu i količini melanina.

Ispitivano komercijalno dostupno ulje gospine trave (*Hypericum perforatum*) nije imalo učinka na promjene parametara kože i njen oporavak u korištenim modelima oštećenja kože.

Bazalna TEWL vrijednost, smatrana prediktorom osjetljivosti kože na iritans, nije bila u korelaciji s odgovorom kože na iritans u modelu iritativnog dermatitisa.

Bazalna vrijednost vlažnosti kože je potencijalni novi prediktor oštećenja kože nakon noksi u modelu iritativnog kontaktnog dermatitisa i *tape-stripping* modelu.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Ljudski *in vivo* modeli oštećenja kože se koriste za ispitivanje djelotvornosti topikalnih terapija kožnih bolesti i oštećenja, među kojima se ističe model iritativnog dermatitisa induciranog natrijevim laurilsulfatom (SLS). Provođenje modela se uvelike razlikuje između različitih istraživačkih skupina, s različitim anatomskim lokacija na kojima su se istraživanja provodila. Osim navedenog modela koji predstavlja kemijsku iritaciju, često su korišteni modeli mehaničke iritacije *tape-stripping* postupkom te fizikalno oštećenje kože ultraljubičastim zračenjem.

**Cilj:** Ispitati postojanje razlika u odgovoru kože na iritaciju i cijeljenje u akutnom modelu iritativnog dermatitisa izazvanog SLS-om na podlakticama i leđima te usporediti razlike u odgovoru kože na tri različita modela oštećenja kože u istim uvjetima, na istim ispitanicima te na istoj anatomskoj lokaciji.

**Materijali i metode:** Provedena su dva randomizirana klinička pokusa. U pokusu 1 je na podlakticama i leđima inducirana iritacija SLS-om, uz kontrolnu iritaciju vodom. U pokusu 2 su na podlakticama inducirana oštećenja kože u tri različita modela oštećenja kože. U oba pokusa su praćene nastale promjene kožnih parametara neinvazivnim mjerenjima i oporavak kože, uz primjenu i bez primjene topikalne terapije.

**Rezultati:** U pokusu 1, koža gornjeg dijela leđa je pokazala snažniju reakciju na iritans, ali i brži oporavak kože. U pokusu 2, u modelu iritacije SLS-om je došlo do najsnažnijeg oštećenje kože i odgođene reakcije na iritans. *Tape-stripping* je doveo do najsnažnijeg početnog oštećenja kožne barijere, ali koža je nakon te nokse pokazala najbrži oporavak. Ultraljubičasto zračenje nije imalo učinka na funkciju kožne barijere, ali je dovelo do nastanka eritema i promjene razine melanina. Topikalne terapije u dva pokusa nisu dovele do poboljšanja mjerenih parametara kože.

**Zaključak:** Osjetljivost kože na iritans i stopa oporavka kože nakon iritacije su ovisne o anatomskoj lokaciji. Tri ispitivana modela oštećenja kože su imala značajno različite učinke na parametre kože te različit oporavak nakon noksi.

## 8. SUMMARY

### SODIUM LAURYL SULPHATE INDUCED IRRITATION AS HUMAN *IN VIVO* IRRITANT CONTACT DERMATITIS MODEL

**Introduction:** Human *in vivo* models of skin damage are often used to test the effects of different topical treatments. Commonly used model is irritant contact dermatitis induced by chemical irritant, sodium laurylsulphate (SLS). There is no uniform approach to SLS testing, as different research groups use significantly different variations of the model, especially in regards to anatomical location where testing was conducted. Other commonly used skin damage models include tape-stripping as mechanical and ultraviolet radiation as physical skin damage model.

**Objective:** The aim was to investigate differences in skin response to acute irritation induced by SLS and skin recovery between forearms and upper back, as well as to compare skin parameters in three different skin damage models on the same participants and anatomical location, in the same research conditions.

**Materials and Methods:** Two randomized, controlled trials were conducted. In the trial 1, the skin irritation was induced using SLS on the forearms and upper back of the participants, with sham irritation, using water instead of SLS, as control. In the trial 2, the three skin damage models were induced on test sites on participants' forearms. Changes in skin parameters and skin recovery in both trials were assessed using non-invasive bioengineering methods, with and without topical treatment.

**Results:** In the trial 1, the skin of the upper back had significantly stronger reaction to irritant, as well as higher skin recovery rates. In trial 2, three tested skin damage models led to different changes of the skin parameters. Irritation by SLS induced the strongest skin damage and also showed delayed reaction to the irritant. The strongest initial barrier disruption was noted after tape-stripping. Also, tape-stripped skin had the highest recovery rates. Ultraviolet radiation did not have any effect on skin barrier function and only changed skin erythema and melanin values. Measured parameters were not improved by topical treatments in neither trial.

**Conclusion:** The skin's reaction to irritant and recovery was dependent on anatomical location. Three tested models had distinctive responses to skin damage and recovery.



## 9. LITERATURA

1. Bains SN, Nash P, Fonacier L. Irritant Contact Dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(1):99-109.
2. Tan CH, Rasool S, Johnston GA. Contact dermatitis: allergic and irritant. *Clin Dermatol*. 2014;32(1):116-24.
3. Novak-Bilic G, Vucic M, Japundzic I, Mestrovic-Stefekov J, Stanic-Duktaj S, Lugovic-Mihic L. Irritant and Allergic Contact Dermatitis - Skin Lesion Characteristics. *Acta Clin Croat*. 2018;57(4):713-20.
4. Koppes SA, Ljubojevic Hadzavdic S, Jakasa I, Franceschi N, Jurakic Toncic R, Marinovic B, Brans R, Gibbs S, Frings-Dresen MHW, Rustemeyer T, Kezic S. Stratum corneum profiles of inflammatory mediators in patch test reactions to common contact allergens and sodium lauryl sulfate. *Br J Dermatol*. 2017;176(6):1533-40.
5. Ale IS, Maibach HI. Irritant contact dermatitis. *Rev Environ Health*. 2014;29(3):195-206.
6. Lee HY, Stieger M, Yawalkar N, Kakeda M. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:916497.
7. Leonard A, Guttman-Yassky E. The Unique Molecular Signatures of Contact Dermatitis and Implications for Treatment. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(1):1-8.
8. Rustemeyer T, van Hoogstraten IMW, von Blomberg BME, Gibbs S, Scheper RJ. Mechanisms of Irritant and Allergic Contact Dermatitis. In: Johansen JD, Frosch PJ, Lepoittevin J-P, editors. *Contact Dermatitis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 43-90.
9. Vaninna S, Crepy MN. Irritant Contact Dermatitis: Why It Happens, Who Suffers It and How to Manage. *Current Treatment Options in Allergy*. 2020;7:124-34.
10. Usatine RP, Riojas M. Diagnosis and management of contact dermatitis. *Am Fam Physician*. 2010;82(3):249-55.
11. Bauer A, Schmitt J, Bennett C, Coenraads PJ, Elsner P, English J, Williams HC. Interventions for preventing occupational irritant hand dermatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(6):CD004414.
12. Rashid RS, Shim TN. Contact dermatitis. *BMJ*. 2016;353:i3299.
13. Bourke J, Coulson I, English J. Guidelines for the management of contact dermatitis: an update. *Br J Dermatol*. 2009;160(5):946-54.

14. Johnston GA, Exton LS, Mohd Mustapa MF, Slack JA, Coulson IH, English JS, Bourke JF. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of contact dermatitis 2017. *Br J Dermatol.* 2017;176(2):317-29.
15. Zack B, Arrandale VH, Holness DL. Preventing Occupational Skin Disease: A Review of Training Programs. *Dermatitis.* 2017;28(3):169-82.
16. Levin C, Zhai H, Bashir S, Chew AL, Anigbogu A, Stern R, Maibach H. Efficacy of corticosteroids in acute experimental irritant contact dermatitis? *Skin Res Technol.* 2001;7(4):214-8.
17. English J, Aldridge R, Gawkrödger DJ, Kownacki S, Statham B, White JM, Williams J. Consensus statement on the management of chronic hand eczema. *Clin Exp Dermatol.* 2009;34(7):761-9.
18. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3-13.
19. Gibbs S. In vitro irritation models and immune reactions. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009;22(2):103-13.
20. Rigon C, Marchiori MCL, da Silva Jardim F, Pegoraro NS, Chaves PDS, Velho MC, Beck RCR, Ourique AF, Sari MHM, Oliveira SM, Cruz L. Hydrogel containing silibinin nanocapsules presents effective anti-inflammatory action in a model of irritant contact dermatitis in mice. *Eur J Pharm Sci.* 2019;137:104969.
21. Lauerma AI, Stein BD, Homey B, Lee CH, Bloom E, Maibach HI. Topical FK506: suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. *Arch Dermatol Res.* 1994;286(6):337-40.
22. da Silva GL, Sperotto ND, Borges TJ, Bonorino C, Takyia CM, Coutinho-Silva R, Campos MM, Zanin RF, Morrone FB. P2X7 receptor is required for neutrophil accumulation in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Exp Dermatol.* 2013;22(3):184-8.
23. Homey B, von Schilling C, Blumel J, Schuppe HC, Ruzicka T, Ahr HJ, Lehmann P, Vohr HW. An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;153(1):83-94.
24. Yu CH, Suh B, Shin I, Kim EH, Kim D, Shin YJ, Chang SY, Baek SH, Kim H, Bae ON. Inhibitory Effects of a Novel Chrysin-Derivative, CPD 6, on Acute and Chronic Skin Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
25. Robinson MK, Perkins MA. A strategy for skin irritation testing. *Am J Contact Dermat.* 2002;13(1):21-9.

26. Wilhelm KP, Wilhelm D, Bielfeldt S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Res Technol.* 2017;23(1):3-12.
27. Effendy I, Maibach HI. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1995;33(4):217-25.
28. Maiti R, Sirka CS, Shaju N, Hota D. Halometasone monohydrate (0.05%) in occupational contact dermatitis. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(2):128-33.
29. Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, Serup J. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1997;37(2):53-69.
30. Hendriks AG, Keijsers RR, Seyger MM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Cutaneous application of leukotriene B4 as an in vivo model of psoriasis-like skin inflammation: an immunohistological study. *Skin Pharmacol Physiol.* 2014;27(3):120-6.
31. Fluhr JW, Akengin A, Bornkessel A, Fuchs S, Praessler J, Norgauer J, Grieshaber R, Kleesz P, Elsner P. Additive impairment of the barrier function by mechanical irritation, occlusion and sodium lauryl sulphate in vivo. *Br J Dermatol.* 2005;153(1):125-31.
32. Fluhr JW, Bornkessel A, Akengin A, Fuchs S, Norgauer J, Kleesz P, Grieshaber R, Elsner P. Sequential application of cold and sodium lauryl sulphate decreases irritation and barrier disruption in vivo in humans. *Br J Dermatol.* 2005;152(4):702-8.
33. Bondi CA, Marks JL, Wroblewski LB, Raatikainen HS, Lenox SR, Gebhardt KE. Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. *Environ Health Insights.* 2015;9:27-32.
34. Morris SAV, Thompson RT, Glenn RW, Ananthapadmanabhan KP, Kasting GB. Mechanisms of anionic surfactant penetration into human skin: Investigating monomer, micelle and submicellar aggregate penetration theories. *Int J Cosmet Sci.* 2019;41(1):55-66.
35. Serup J, Jemec BE, Grove GL. *Handbook of non-invasive methods and the skin.* 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis; 2006. 1029 p. p.
36. Breternitz M, Flach M, Prassler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br J Dermatol.* 2007;156(2):231-40.
37. Loffler H, Dreher F, Maibach HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br J Dermatol.* 2004;151(4):746-52.

38. Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW. The tape stripping procedure--evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(2):317-23.
39. Morse NL, Reid AJ, St-Onge M. An open-label clinical trial assessing the efficacy and safety of Bend Skincare Anti-Aging Formula on minimal erythema dose in skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018;34(2):152-61.
40. Faurschou A, Wulf HC. Topical corticosteroids in the treatment of acute sunburn: a randomized, double-blind clinical trial. *Arch Dermatol.* 2008;144(5):620-4.
41. Kohli I, Shafi R, Isedeh P, Griffith JL, Al-Jamal MS, Silpa-Archa N, Jackson B, Athar M, Kollias N, Elmets CA, Lim HW, Hamzavi IH. The impact of oral *Polypodium leucotomos* extract on ultraviolet B response: A human clinical study. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(1):33-41 e1.
42. Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, Liu Y, Owen MR, Kollias N, Lim HW, Hamzavi IH. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130(8):2092-7.
43. Sonti S, Makino ET, Garruto JA, Gruber JV, Rao S, Mehta RC. Efficacy of a novel treatment serum in the improvement of photodamaged skin. *Int J Cosmet Sci.* 2013;35(2):156-62.
44. Faurschou A, Wiegell SR, Wulf HC. Transepidermal water loss after photodynamic therapy, UVB radiation and topical corticosteroid is independent of inflammation. *Skin Res Technol.* 2007;13(2):202-6.
45. Zhou BR, Ma LW, Liu J, Zhang JA, Xu Y, Wu D, Permatasari F, Luo D. Protective Effects of Soy Oligopeptides in Ultraviolet B-Induced Acute Photodamage of Human Skin. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5846865.
46. Kuhn M, Wolber R, Kolbe L, Schnorr O, Sies H. Solar-simulated radiation induces secretion of IL-6 and production of isoprostanes in human skin in vivo. *Arch Dermatol Res.* 2006;297(10):477-9.
47. Chen X, Liu S, Rao P, Bradshaw J, Weller R. Topical application of superoxide dismutase mediated by HIV-TAT peptide attenuates UVB-induced damages in human skin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;107:286-94.
48. Damian DL, Kim YJ, Dixon KM, Halliday GM, Javeri A, Mason RS. Topical calcitriol protects from UV-induced genetic damage but suppresses cutaneous immunity in humans. *Exp Dermatol.* 2010;19(8):e23-30.

49. Lim SH, Kim SM, Lee YW, Ahn KJ, Choe YB. Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation-induced photodamage in Koreans. *Skin Res Technol.* 2008;14(1):93-102.
50. Arndt S, Haag SF, Kleemann A, Lademann J, Meinke MC. Radical protection in the visible and infrared by a hyperforin-rich cream--in vivo versus ex vivo methods. *Exp Dermatol.* 2013;22(5):354-7.
51. Berardesca E. EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin Res Technol.* 1997;3(2):126-32.
52. 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):351-8.
53. du Plessis J, Stefaniak A, Eloff F, John S, Agner T, Chou TC, Nixon R, Steiner M, Franken A, Kudla I, Holness L. 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.* 2013;19(3):265-78.
54. Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1996;35(1):1-10.
55. Pierard GE. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 1998;10(1):1-11.
56. Rogiers V. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(2):117-28.
57. Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: comparison study between Antera((R)) 3D, Mexameter((R)) and Colorimeter((R)). *Skin Res Technol.* 2015;21(3):346-62.
58. Tagami H. Electrical measurement of the hydration state of the skin surface in vivo. *Br J Dermatol.* 2014;171 Suppl 3:29-33.
59. Zuang V, Rona C, Distante F, Berardesca E. The use of a capacitance device to evaluate the hydration of human skin. *Journal of Applied Cosmetology.* 1997;15(3):95-102.
60. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol.* 2006;15(7):483-92.

61. Monteiro Rodrigues L, Fluhr JW. EEMCO Guidance for the in vivo Assessment of Biomechanical Properties of the Human Skin and Its Annexes: Revisiting Instrumentation and Test Modes. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020;33(1):44-60.
62. Parra JL, Paye M. EEMCO guidance for the in vivo assessment of skin surface pH. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2003;16(3):188-202.
63. Pierard GE, Pierard-Franchimont C, Marks R, Paye M, Rogiers V. EEMCO guidance for the in vivo assessment of skin greasiness. The EEMCO Group. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2000;13(6):372-89.
64. Darlenski R, Fluhr JW. Influence of skin type, race, sex, and anatomic location on epidermal barrier function. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):269-73.
65. Kleesz P, Darlenski R, Fluhr JW. Full-body skin mapping for six biophysical parameters: baseline values at 16 anatomical sites in 125 human subjects. *Skin Pharmacol Physiol*. 2012;25(1):25-33.
66. Nedelec B, Forget NJ, Hurtubise T, Cimino S, de Muszka F, Legault A, Liu WL, de Oliveira A, Calva V, Correa JA. Skin characteristics: normative data for elasticity, erythema, melanin, and thickness at 16 different anatomical locations. *Skin Res Technol*. 2016;22(3):263-75.
67. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci*. 2008;30(6):413-34.
68. Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, Weyher I, Diepgen TL, Berardesca E. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol*. 2002;146(5):770-6.
69. Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI. Cutaneous sodium lauryl sulphate irritation potential: age and regional variability. *Br J Dermatol*. 1990;123(5):607-13.
70. Lavrijsen AP, Geelen FA, Oestmann E, Hermans J, Bodda HE, Ponc M. Comparison of human back versus arm skin region for its suitability to test weak irritants. *Skin Res Technol*. 1996;2(2):70-7.
71. Perez-Sanchez A, Barrajon-Catalan E, Caturla N, Castillo J, Benavente-Garcia O, Alcaraz M, Micol V. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J Photochem Photobiol B*. 2014;136:12-8.
72. Nishino A, Sugimoto K, Sambe H, Ichihara T, Takaha T, Kuriki T. Effects of Dietary Paprika Xanthophylls on Ultraviolet Light-Induced Skin Damage: A Double-Blind Placebo-Controlled Study. *J Oleo Sci*. 2018;67(7):863-9.

73. Perugini P, Vettor M, Rona C, Troisi L, Villanova L, Genta I, Conti B, Pavanetto F. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30(2):113-20.
74. De Paepe K, Hachem JP, Vanpee E, Goossens A, Germaux MA, Lachapelle JM, Lambert J, Matthieu L, Roseeuw D, Suys E, Van Hecke E, Rogiers V. Beneficial effects of a skin tolerance-tested moisturizing cream on the barrier function in experimentally-elicited irritant and allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2001;44(6):337-43.
75. Urbaniak GC, Plous S. Research Randomizer. [Computer Software] 2013 [cited 2019 January 21]; Version 4.0:[Available from: <http://www.randomizer.org>].
76. Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI. Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *Br J Dermatol.* 1990;123(4):473-9.
77. Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI. Skin aging. Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch Dermatol.* 1991;127(12):1806-9.
78. Emtestam L, Ollmar S. Electrical impedance index in human skin: measurements after occlusion, in 5 anatomical regions and in mild irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1993;28(2):104-8.
79. Holbrook KA, Odland GF. Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol.* 1974;62(4):415-22.
80. Schwindt DA, Wilhelm KP, Maibach HI. Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *J Invest Dermatol.* 1998;111(3):385-9.
81. Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res.* 1999;291(10):555-9.
82. Agner T. Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate-induced irritation in normal skin. *Contact Dermatitis.* 1991;25(2):108-14.
83. Ishikawa J, Shimotoyodome Y, Ito S, Miyauchi Y, Fujimura T, Kitahara T, Hase T. Variations in the ceramide profile in different seasons and regions of the body contribute to stratum corneum functions. *Arch Dermatol Res.* 2013;305(2):151-62.
84. de Jongh CM, Jakasa I, Verberk MM, Kezic S. Variation in barrier impairment and inflammation of human skin as determined by sodium lauryl sulphate penetration rate. *Br J Dermatol.* 2006;154(4):651-7.

85. Tsai JC, Lin CY, Sheu HM, Lo YL, Huang YH. Noninvasive characterization of regional variation in drug transport into human stratum corneum in vivo. *Pharm Res.* 2003;20(4):632-8.
86. Feldmann RJ, Maibach HI. Regional variation in percutaneous penetration of <sup>14</sup>C cortisol in man. *J Invest Dermatol.* 1967;48(2):181-3.
87. De Jongh CM, Verberk MM, Withagen CE, Jacobs JJ, Rustemeyer T, Kezic S. Stratum corneum cytokines and skin irritation response to sodium lauryl sulfate. *Contact Dermatitis.* 2006;54(6):325-33.
88. Saint-Martory C, Roguedas-Contios AM, Sibaud V, Degouy A, Schmitt AM, Misery L. Sensitive skin is not limited to the face. *Br J Dermatol.* 2008;158(1):130-3.
89. Bourke J, Coulson I, English J. Guidelines for care of contact dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;145(6):877-85.
90. Nicholson PJ, Llewellyn D, English JS. Evidence-based guidelines for the prevention, identification and management of occupational contact dermatitis and urticaria. *Contact Dermatitis.* 2010;63(4):177-86.
91. Menne T, Johansen JD, Sommerlund M, Veien NK. Hand eczema guidelines based on the Danish guidelines for the diagnosis and treatment of hand eczema. *Contact Dermatitis.* 2011;65(1):3-12.
92. Sugawara T, Kikuchi K, Tagami H, Aiba S, Sakai S. Decreased lactate and potassium levels in natural moisturizing factor from the stratum corneum of mild atopic dermatitis patients are involved with the reduced hydration state. *J Dermatol Sci.* 2012;66(2):154-9.
93. Verdier-Sevrain S, Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol.* 2007;6(2):75-82.
94. Varothai S, Nitayavardhana S, Kulthanan K. Moisturizers for patients with atopic dermatitis. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013;31(2):91-8.
95. Pan M, Heinecke G, Bernardo S, Tsui C, Levitt J. Urea: a comprehensive review of the clinical literature. *Dermatol Online J.* 2013;19(11):20392.
96. Proksch E. The role of emollients in the management of diseases with chronic dry skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 2008;21(2):75-80.
97. Akerstrom U, Reitamo S, Langeland T, Berg M, Rustad L, Korhonen L, Loden M, Wiren K, Grande M, Skare P, Svensson A. Comparison of Moisturizing Creams for the Prevention of Atopic Dermatitis Relapse: A Randomized Double-blind Controlled Multicentre Clinical Trial. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):587-92.



98. Crowther JM, Sieg A, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ, Kaczvinsky JR, Rawlings AV. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. *Br J Dermatol*. 2008;159(3):567-77.
99. Loden M. Effect of moisturizers on epidermal barrier function. *Clin Dermatol*. 2012;30(3):286-96.
100. Buraczewska I, Berne B, Lindberg M, Torma H, Loden M. Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):492-8.
101. Hines J, Wilkinson SM, John SM, Diepgen TL, English J, Rustemeyer T, Wassilew S, Kezic S, Maibach HI. The three moments of skin cream application: an evidence-based proposal for use of skin creams in the prevention of irritant contact dermatitis in the workplace. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(1):53-64.
102. Berardesca E, Maibach HI. Sodium-lauryl-sulphate-induced cutaneous irritation. Comparison of white and Hispanic subjects. *Contact Dermatitis*. 1988;19(2):136-40.
103. Van der Valk PG, Maibach HI. Potential for irritation increases from the wrist to the cubital fossa. *Br J Dermatol*. 1989;121(6):709-12.
104. Kucharekova M, Schalkwijk J, Van De Kerkhof PC, Van De Valk PG. Effect of a lipid-rich emollient containing ceramide 3 in experimentally induced skin barrier dysfunction. *Contact Dermatitis*. 2002;46(6):331-8.
105. Lee CH, Maibach HI. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis*. 1995;33(1):1-7.
106. Rajnochova Svobodova A, Gabrielova E, Michaelides L, Kosina P, Rysava A, Ulrichova J, Zalesak B, Vostalova J. UVA-photoprotective potential of silymarin and silybin. *Arch Dermatol Res*. 2018;310(5):413-24.
107. Gegotek A, Ambrozewicz E, Jastrzab A, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. *Arch Dermatol Res*. 2019;311(3):203-19.
108. Lee SE, Takagi Y, Nishizaka T, Baek JH, Kim HJ, Lee SH. Subclinical cutaneous inflammation remained after permeability barrier disruption enhances UV sensitivity by altering ER stress responses and topical pseudoceramide prevents them. *Arch Dermatol Res*. 2017;309(7):541-50.

109. Koopman DG, Kezic S, Verberk MM. Skin reaction and recovery: a repeated sodium lauryl sulphate patch test vs. a 24-h patch test and tape stripping. *Br J Dermatol.* 2004;150(3):493-9.
110. Mao G, Flach CR, Mendelsohn R, Walters RM. Imaging the distribution of sodium dodecyl sulfate in skin by confocal Raman and infrared microspectroscopy. *Pharm Res.* 2012;29(8):2189-201.
111. Leskur D, Bukic J, Petric A, Zekan L, Rusic D, Seselja Perisin A, Petric I, Stipic M, Puizina-Ivic N, Modun D. Anatomical site differences of sodium lauryl sulfate-induced irritation: randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2019;181(1):175-85.
112. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):539-49.
113. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).
114. Fujimura T, Shimotoyodome Y, Nishijima T, Sugata K, Taguchi H, Moriwaki S. Changes in hydration of the stratum corneum are the most suitable indicator to evaluate the irritation of surfactants on the skin. *Skin Res Technol.* 2017;23(1):97-103.
115. Jansen van Rensburg S, Franken A, Du Plessis JL. Measurement of transepidermal water loss, stratum corneum hydration and skin surface pH in occupational settings: A review. *Skin Res Technol.* 2019;25(5):595-605.
116. Effendy I, Loeffler H, Maibach HI. Baseline transepidermal water loss in patients with acute and healed irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 1995;33(6):371-4.
117. Farage MA. The Prevalence of Sensitive Skin. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:98.
118. Arsic I, Zugic A, Tadic V, Tasic-Kostov M, Misic D, Primorac M, Runjaic-Antic D. Estimation of dermatological application of creams with St. John's Wort oil extracts. *Molecules.* 2011;17(1):275-94.
119. Orchard A, van Vuuren SF. Carrier oils in dermatology. *Arch Dermatol Res.* 2019;311(9):653-72.
120. Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine.* 2003;10 Suppl 4:31-7.
121. Wolfle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med.* 2014;80(2-3):109-20.
122. Bozin B, Kladar N, Grujic N, Anackov G, Samojlik I, Gavaric N, Conic BS. Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant

properties of some St. John's wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the Central Balkans. *Molecules*. 2013;18(10):11733-50.

123. Fuller J, Muller-Goymann CC. Anti-proliferative and anti-migratory effects of hyperforin in 2D and 3D artificial constructs of human dermal fibroblasts - A new option for hypertrophic scar treatment? *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;126:108-14.

124. Meinke MC, Schanzer S, Haag SF, Casetti F, Muller ML, Wolfle U, Kleemann A, Lademann J, Schempp CM. In vivo photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity in vitro and ex vivo. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(2):346-50.

125. Takada H, Yonekawa J, Matsumoto M, Furuya K, Sokabe M. Hyperforin/HP-beta-Cyclodextrin Enhances Mechanosensitive Ca(2+) Signaling in HaCaT Keratinocytes and in Atopic Skin Ex Vivo Which Accelerates Wound Healing. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8701801.

126. Suntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Yesilada E. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(2):468-77.

127. Dabrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol*. 2018;24(2):165-74.

128. Logger JGM, Munchhoff CU, Olydam JI, Peppelman M, Van Erp PEJ. Anatomical site variation of water content in human skin measured by the Epsilon: A pilot study. *Skin Res Technol*. 2019;25(3):333-8.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODATCI

**Ime i prezime:** Dario Leskur

**Adresa:** Strmi put 11, 21000 Split

**Telefon:** 098/9136678

**Elektronička pošta:** dario.leskur@mefst.hr

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum i mjesto rođenja:** 06.05.1991., Split

**Matični broj iz Upisnika znanstvenika:** 362105

### Školovanje

**2006. – 2010.** Prirodoslovna-tehnička škola, Split - prirodoslovna gimnazija

**2010. – 2016.** mag. pharm., Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu - Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

**2016. – danas** poslijediplomski doktorski studij “Translacijska istraživanja u biomedicini” (TRIBE), Medicinski fakultet u Splitu

### Radno iskustvo

**2016. – danas** asistent, Katedra za farmaciju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

### MATERINSKI JEZIK

Hrvatski jezik

### OSTALI JEZICI

engleski jezik – aktivno u govoru i pismu

talijanski jezik – pasivno u govoru i pismu

### OSTALE AKTIVNOSTI

Rad na računalu i programski paketi (Microsoft Office, EndNote, Sigma Plot, Graph Prism, MedCalc)

Vozačka dozvola B kategorije

Voditelj brodice, kategorija B

### **Istraživački projekti:**

**2017.** - Istraživanje kliničke djelotvornosti topikalnih pripravaka "morskog ulja", program Tehnološki razvoj, istraživanje i primjena inovacija Splitsko-dalmatinske županije (Broj Ugovora: 201700157267) –suradnik na projektu.

**2016.** - Razvoj farmaceutskih formulacija na osnovi „morskog ulja“ za topikalnu primjenu na koži, program Tehnološki razvoj, istraživanje i primjena inovacija Splitsko-dalmatinske županije (Broj Ugovora: 201600115185) – suradnik na projektu.

### **Nastavne aktivnosti:**

**2014. – danas** asistent na Katedri za farmaciju, Zavod za farmaciju, toksikologiju i farmakogenetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Dodiplomska nastava na predmetima Opća farmakologija, Biokemija lijekova i Farmaceutska kemija 1 (studij farmacije).

### **Znanstveni interesi:**

Istraživanja iz područja dermatofarmacije i kozmetologije.

### **Članstva u stručnim udruženjima i povjerenstvima:**

2016.- član Hrvatske ljekarničke komore, HLJK

2016.- član Hrvatskog društva farmakologa, HDF

### **Publikacije:**

1. Leskur D, Bukic J, Petric A, Zekan L, Rusic D, Seselja Perisin A, i sur. Anatomical Site Differences of Sodium Laurylsulphate Induced Irritation: randomised controlled trial. Br J Dermatol. 2019;181(1):175-85. doi: 10.1111/bjd.17633.

2. Leskur D, Perisic I, Romac K, Susak H, Seselja Perisin A, Bukic J, Rusic D, Kladar N, Bozin B, Modun D. Comparison of mechanical, chemical and physical human models of in vivo skin damage: randomized controlled trial. Skin Res Technol. 2020. doi: 10.1111/srt.12932

3. Bukic J, Rusic D, Bozic J, Zekan L, Leskur D, Seselja Perisin A, Modun D. Differences among health care students' attitudes, knowledge and use of dietary supplements: a cross-sectional study. Complement Ther Med. 2018 Sep 7. doi: 10.1016/j.ctim.2018.09.005.

4. Rusic D, Bozic J, Vilovic M, Bukic J, Zivkovic PM, Leskur D, Perisin AS, Tomic S, Modun D. Attitudes and Knowledge Regarding Antimicrobial Use and Resistance Among Pharmacy and Medical Students at the University of Split, Croatia. *Microb Drug Resist*. 2018 Jun 8. doi: 10.1089/mdr.2018.0010.
5. Rusic D, Bozic J, Bukic J, Seselja Perisin A, Leskur D, Modun D, i sur. Evaluation of accordance of antibiotics package size with recommended treatment duration of guidelines for sore throat and urinary tract infections. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019;8:30. doi: 10.1186/s13756-019-0495-5.
6. Juric D, Pavlicevic I, Marusic A, Malicki M, Buljan I, Sarotic V, Mrduljas-Dujic N, Komparak A, Vujevic M, De Micheli-Vitturi D, Susnjar P, Puljiz T, Jercic M, Leskur D, Marusic M. Effectiveness of treatment of newly diagnosed hypertension in family medicine practices in South Croatia. *BMC family practice*. 2019;20(1):10. doi: 10.1186/s12875-019-0902-2.
7. Seselja Perisin A, Mestrovic A, Bozic J, Kacic J, Bukic J, Leskur D, i sur. Interprofessional pharmacotherapy workshop: intervention to improve health professionals' and students' attitudes towards collaboration between physicians and pharmacists. *Journal of interprofessional care*. 2018;1-8. doi: 10.1080/13561820.2018.1541875.
8. Jukic I, Rusic D, Vukovic J, Marin Zivkovic P, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Luksic M, Modun D. Correlation of registered drug packs with Maastricht V/Florence Consensus Report and national treatment guidelines for management of *Helicobacter pylori* infection. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019. doi: 10.1111/bcpt.13322
9. Bukic J, Rusic D, Mas P, Karabatic D, Bozic J, Seselja Perisin A, Leskur D, Krnic D, Tomic S, Modun D. Analysis of spontaneous reporting of suspected adverse drug reactions for non-analgesic over-the-counter drugs from 2008 to 2017. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2019;20(1):60. doi: 10.1186/s40360-019-0338-2.
10. Zekan L, Mestrovic A, Perisin AS, Bukic J, Leskur D, Rusic D, Modun D. Improving community pharmacists' clinical knowledge to detect and resolve drug-related problems in Croatia: a before/after survey study investigating the efficacy of an educational intervention. *BMJ Open* 2020;10:e034674. doi: 10.1136/bmjopen-2019-034674
11. Bukic J, Rusic D, Perisin AS, Leskur D, Mestrovic A, Modun D. Development and implementation of objective structured clinical examination (OSCE) at the split school of medicine pharmacy studies. *Farm Glas*. 2018;74(2):97-108.

12. Knezevic E, Rusic D, Bukic J, Bozic J, Seselja Perisin A, Leskur D, Modun D, Tomic S. Pregled poticaja za razvoj pedijatrijskih lijekova i broja pedijatrijskih kliničkih ispitivanja faze III u izabranim državama. *Medicina Fluminensis* 2019;55(4):337-345.

### **Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima:**

1. Juric D, Pavlicevic I, Vujevic M, Puljiz T, Jercic M, Malicki M, Leskur D, Marusic M, Marusic A. Effectiveness of hypertension treatment in family medicine clinics in urban and rural environment in South Croatia Third international meeting in hypertension (ISHOP2014); 2014. November 28.-30. 2014.;Osijek, Croatia

2. Leskur D, Šešelja-Perišin A, Meštrović A, Božić J, Kačić J, Bukić J, Modun D Inter-professional pharmacotherapy workshop: Intervention to improve health professionals'/students' attitude toward physician–pharmacists' collaboration 8th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2016. Sep 15-18; Split, Croatia: Croatian Pharmacological Society

3. Bukić J, Zekan L, Meštrović A, Šešelja-Perišin A, Leskur D, Modun D Clinical pharmacy summer school improves the ability of community pharmacists to detect drug related problems (DRP) 8th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2016. Sep 15-18; Split, Croatia: Croatian Pharmacological Society

4. Leskur D, Bukic J, Petric A, Zekan L, Rusic D, Kukoc-Modun L, Modun D Effects of Sea Oil formulations in human irritant contact dermatitis model (pilot study) 2nd Croatian Congress on Clinical Pharmacy with international participation; 2017. April 20.-22.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society

5. Bukic J, Leskur D, Petric A, Zekan L, Rusic D, Kukoc-Modun L, Modun D Sea Oil allergic contact dermatitis 2nd Croatian Congress on Clinical Pharmacy with international participation; 2017. April 20.-22.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society

6. Rusic D, Bozic J, Bukic J, Leskur D, Vilovic M, Zivkovic PM, Modun D Attitudes and knowledge regarding antimicrobial use and resistance among pharmacy and medical students 2nd Croatian Congress on Clinical Pharmacy with international participation; 2017. April 20.-22.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society

7. Leskur D, Seselja Perisin A, Bukic J, Rusic D, Petric A, Petric I, Zekan L, Puizina-Ivic N, Modun D Dermatopharmacokinetic properties of different topical diclofenac formulations 1st Croatian Congress on Dermatopharmacy with international participation; 2018. March 23.-24.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society

8. Bukic J, Leskur D, Rusic D, Seselja Perisin A, Petric A, Petric I, Zekan L, Puizina-Ivic N, Modun D Site differences of cutaneous irritation in sodium lauryl sulphate irritation model 1st Croatian Congress on Dermatopharmacy with international participation; 2018. March 23.-24.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society
9. Rusic D, Bukic J, Leskur D, Seselja Perisin A, Petric A, Petric I, Zekan L, Puizina-Ivic N, Modun D Investigating the safety of "Sea Oil" topical formulations 1st Croatian Congress on Dermatopharmacy with international participation; 2018. March 23.-24.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society
10. Seselja Perisin A, Bukic J, Rusic D, Leskur D, Petric A, Petric I, Zekan L, Stipic M, Modun D (Anti)oxidative properties of vitamin C topical formulations 1st Croatian Congress on Dermatopharmacy with international participation; 2018. March 23.-24.; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmaceutical Society
11. Leskur D, Perišić I, Romac K, Šušak H, Bukić J, Rušić D, Šešelja-Perišin A, Modun D Effects of topical Hypericum perforatum treatment on wound healing in chemical and mechanical skin damage models 9th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2019. Sep 25-28; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmacological Society
12. Rušić D, Jukić I, Bukić J, Leskur D, Šešelja-Perišin A, Modun D. Accordance of registered drug packs with Helicobacter pylori treatment regiments. 9th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2019. Sep 25-28; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmacological Society
13. Bukić J, Kellner M, Leskur D, Rušić D, Šešelja-Perišin A, Mas P, Margan Koletić Z, Tomić S, Modun D. Reporting of over-the-counter drugs adverse drug reactions in 2018. 9th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2019. Sep 25-28; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmacological Society
14. Šešelja-Perišin A, Bota I, Čosić E, Bukić J, Rušić D, Leskur D, Modun D. Antioxidative properties of hydrolates and their potentially protective effect on lipid peroxidation. 9th Croatian Congress of Pharmacology with international participation; 2019. Sep 25-28; Zagreb, Croatia: Croatian Pharmacological Society