

1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επίδραση τοπικής εφαρμογής
νέου αντιφλεγμονώδους – αντιοξειδωτικού παράγοντα
σε δέρμα διαβητικών μυών
μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία**

ΕΛΕΝΗ ΔΕΛΗ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

κ. Αγγελική Κουρουνάκη,

κ. Μιχαήλ Ράλλης

ΑΘΗΝΑ 2017

Τριμελής Επιτροπή

Αγγελική Κουρουνάκη,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια τομέα Φαρμακευτικής Χημείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μιχαήλ Ράλλης,

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παρασκευάς Δάλλας,

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρώτα από όλα τους καθηγητές μου, την κ. Αγγελική Κουρουνάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια και τον κ. Μιχαήλ Ράλλη, Επίκουρο Καθηγητή, για την πολύτιμη βοήθεια τους και συνεργασία σε όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Παρασκευά Δάλλα, Επίκουρο Καθηγητή του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας και μέλος της Τριμελούς Επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Ευχαριστώ τον κ. Σφηνιαδάκη για τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης καθώς και τον κ. Καραλή Ευάγγελο για την προθυμία του και τα συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Θερμές ευχαριστίες στην κ. Μαρία Κυριαζή για τις συμβουλές και τις οδηγίες της αλλά και για την προθυμία με την οποία με βοήθησε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα «παιδιά του εργαστηρίου», τους συναδέλφους μου, για τη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα εκπόνησης της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική, και όχι μόνο, στήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Τίποτα δεν θα είχε γίνει χωρίς την συμπαράσταση και τη βοήθειά τους.

Ελένη Δελή

Αθήνα, 2017

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	III
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	VII
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	IX
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	X
ABSTRACT	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΔΕΡΜΑ	4
1.1. Ανατομία δέρματος.....	4
1.2. Φυσιολογία δέρματος	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ	7
2.1. Φάσμα UV ακτινοβολίας και βιολογική δράση	7
2.2. Μορφολογικές και δομικές αλλοιώσεις.....	9
2.3. Φλεγμονή.....	11
2.3.1. Φλεγμονή επαγόμενη από UV.....	12
2.4. Οξειδωτικό στρες	15
2.4.1 Οξειδωτικό στρες και UVR	15
2.4.2. Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή.....	17
2.4.3. Βιοχημικοί δείκτες αξιολόγησης αντιοξειδωτικής ικανότητας του ιστού 18	
2.4.3.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα του δέρματος και UVR	19
2.4.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑ.....	21
3.1. Διαβήτης, η ασθένεια	21
3.2. Δομικές αλλοιώσεις δέρματος.....	21
3.3. Διαβήτης και οξειδωτικό στρες	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ.....	25
4.1. Αντιφλεγμονώδη φάρμακα	25
4.1.1. Τολφαιναμικό οξύ.....	25
4.2. Αντιοξειδωτικά.....	26
4.2.1. Αιθυλεστέρας Κυστεΐνης.....	26
4.3. Παράγωγο τολφαιναμικού οξέος	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	29
6.1. Ενώσεις που μελετήθηκαν	29
6.2. Προετοιμασία φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων για τοπική χρήση	29
6.3. Ζωικά πειραματικά πρωτόκολλα:	30
6.4. Πειραματικές διαδικασίες	33
6.5. Μέθοδοι εκτίμησης μετρήσιμων παραμέτρων	34
6.6. Ιστοπαθολογική μελέτη	38
6.7. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
7.1. Πειραματική μελέτη 1	42
7.1.1. Αποτελέσματα TEWL	42
7.1.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης	46
7.1.3. Αποτελέσματα Πάχους	50
7.1.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας	54
7.1.5. Φωτοτεκμηρίωση	57
7.1.6. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης	59
7.2. Πειραματική μελέτη 2	62
7.2.1. Αποτελέσματα TEWL	62
7.2.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης	67
7.2.3. Αποτελέσματα Πάχους	76
7.2.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας	79
7.2.5. Φωτοτεκμηρίωση	84
7.2.6. Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικών Δεικτών του δέρματος	86
7.2.6.1. Αποτελέσματα ομογενοποίησης δέρματος	86
7.2.6.2. Αποτελέσματα Strippings	89
7.2.7. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης	98
7.3. Πειραματική μελέτη 3	102
7.3.1. Αποτελέσματα TEWL	102
7.3.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης	107
7.3.3. Αποτελέσματα Πάχους	112
7.3.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας	116
7.3.5. Φωτοτεκμηρίωση	120
7.3.6. Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικών Δεικτών του δέρματος	124
7.3.6.1. Αποτελέσματα ομογενοποίησης ιστού δέρματος	124
7.3.6.2. Αποτελέσματα Strippings	127
7.3.7. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	138

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 1.....	30
Πίνακας 2. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 2.....	31
Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 3.....	32
Πίνακας 4. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) ($n=8$).	42
Πίνακας 5. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.....	43
Πίνακας 6. Paired t-test για τη σύγκριση της TEWL μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	44
Πίνακας 7. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.....	45
Πίνακας 8. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.....	45
Πίνακας 9. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.....	45
Πίνακας 10. Μέσος όρος τιμών της Ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) ($n=8$).	46
Πίνακας 11. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής της Ενυδάτωσης.	47
Πίνακας 12. Paired t-test για τη σύγκριση της Ενυδάτωσης μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	48
Πίνακας 13. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.....	49
Πίνακας 14. One way-ANOVA για σύγκριση της μεταβλητής της Ενυδάτωσης την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.....	49
Πίνακας 15. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 7 μεταξύ των ομάδων.....	49
Πίνακας 16. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων.	49
Πίνακας 17. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.	49
Πίνακας 18. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) ($n=8$).	51
Πίνακας 19. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους.	52
Πίνακας 20. Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	52
Πίνακας 21. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 4....	53
Πίνακας 22. Μέσος όρος τιμών ($\pm$ τυπική απόκλιση) των παραμέτρων (R2, R5, R6, R7) της ελαστικότητας ($n=8$) την ημέρα 0 και την ημέρα 14.....	54
Πίνακας 23. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές παραμέτρων ελαστικότητας.....	55
Πίνακας 24. Paired t-test για σύγκριση τιμών παραμέτρων ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0 και 14 σε κάθε ομάδα.....	56
Πίνακας 25. One way-ANOVA για σύγκριση τιμών παραμέτρου R5 την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.....	57
Πίνακας 26. One way-ANOVA για σύγκριση τιμών παραμέτρου R7 την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.....	57

Πίνακας 27. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).....	62
Πίνακας 28. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.	63
Πίνακας 29. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβολής της TEWL από την ημέρα 0 έως τη 14.....	64
Πίνακας 30. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της TEWL τις μέρες 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	64
Πίνακας 31. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.....	65
Πίνακας 32. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 7 μεταξύ των ομάδων.....	65
Πίνακας 33. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων.....	66
Πίνακας 34. Independent t-test για τη σύγκριση της μεταβολής της TEWL σε 14 μέρες μεταξύ των ομάδων AK1 0.1% και Tolf 0.1%.....	66
Πίνακας 35. Μέσος όρος τιμών της ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).....	67
Πίνακας 36. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της ενυδάτωσης.	69
Πίνακας 37. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβολής των τιμών της ενυδάτωσης.....	69
Πίνακας 38. Paired t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τις μέρες 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	70
Πίνακας 39. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.....	71
Πίνακας 40. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.....	71
Πίνακας 41. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση την ημέρα 7.....	72
Πίνακας 42. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση την ημέρα 11.	72
Πίνακας 43. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση τη ημέρα 14.....	73
Πίνακας 44. Independent t-test για τις τιμές της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων AK1 0.1% και Control τη 14 ^η ημέρα.....	73
Πίνακας 45. One way-ANOVA για τις τιμές των μεταβολών της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων από τη 0 ως τη 14 ^η ημέρα.....	74
Πίνακας 46. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).	76
Πίνακας 47. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους.	77
Πίνακας 48. Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	78
Πίνακας 49. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους τη ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.....	79
Πίνακας 50. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).	80
Πίνακας 51. Paired t-test για τις παραμέτρους της ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0 και 14 σε κάθε ομάδα.	82
Πίνακας 52. One way - ANOVA για σύγκριση των τιμών της R5 τη ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.....	83

Πίνακας 53. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) του ασκορβικού, του ουρικού οξέος και της γλουταθειόνης (n=6).	86
Πίνακας 54. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών.....	88
Πίνακας 55. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος στο δέρμα.	89
Πίνακας 56. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=6).	89
Πίνακας 57. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των αντιοξειδωτικών δεικτών στην κεράτινη στιβάδα πριν και μετά την ακτινοβολήση.....	90
Πίνακας 58. One way-ANOVA για τη συγκέντρωση ουρικού οξέος την ημέρα 0 των strippings.....	92
Πίνακας 59. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=6).	92
Πίνακας 60. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος την ημέρα 14 των strippings.	94
Πίνακας 61. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης την ημέρα 14 των strippings.....	94
Πίνακας 62. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος στα strippings μεταξύ των ημερών 0 και 14.....	94
Πίνακας 63. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στα strippings μεταξύ των ημερών 0 και 14.....	95
Πίνακας 64. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).	102
Πίνακας 65. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.	103
Πίνακας 66. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της TEWL τις μέρες -0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	104
Πίνακας 67. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 4.....	105
Πίνακας 68. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 7.....	105
Πίνακας 69. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 11.....	105
Πίνακας 70. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 14	105
Πίνακας 71. One way-ANOVA για τη μεταβολή της μεταβλητής TEWL κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	105
Πίνακας 72. Independent t-test για τη σύγκριση της μεταβολής της TEWL στις 7 πρώτες μέρες μεταξύ των ομάδων AK1 και Excipient.	106
Πίνακας 73. Μέσος όρος τιμών της ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10)....	107
Πίνακας 74. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής Ενυδάτωσης.	108
Πίνακας 75. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης τις ημέρες -0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	109
Πίνακας 76. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης τη ημέρα 1.....	110
Πίνακας 77. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης τη ημέρα 4.....	110
Πίνακας 78. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 7.....	110
Πίνακας 79. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 11...110	
Πίνακας 80. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 14...110	

Πίνακας 81. One way-ANOVA για τη μεταβολή της Ενυδάτωσης τις πρώτες 7 μέρες του πειράματος.....	110
Πίνακας 82. One way-ANOVA για τη μεταβολή της Ενυδάτωσης από την 4 ^η έως τη 14 ^η ημέρα του πειράματος.....	111
Πίνακας 83. Independent t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τη ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control.	111
Πίνακας 84. Independent t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τη ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control.	111
Πίνακας 85. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).	112
Πίνακας 86. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους	113
Πίνακας 87. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών του πάχους τις μέρες -0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.....	114
Πίνακας 88. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 4.	115
Πίνακας 89. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 11.....	115
Πίνακας 90. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 14.....	115
Πίνακας 91. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) των παραμέτρων (R2, R5, R6, R7) της ελαστικότητας τις ημέρες -0, 0 και 14 (n=8-10).....	116
Πίνακας 92. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές παραμέτρων ελαστικότητας.....	118
Πίνακας 93. Paired t-test για τη σύγκριση των παραμέτρων της ελαστικότητας σε κάθε ομάδα τις μέρες -0 με 14.....	118
Πίνακας 94. Paired t-test για τη σύγκριση των παραμέτρων της ελαστικότητας σε κάθε ομάδα τις μέρες 0 με 14.....	119
Πίνακας 95. Μέσος όρος τιμών (mg/dl) γλυκόζης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10)....	122
Πίνακας 96. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές γλυκόζης στο αίμα.	123
Πίνακας 97. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) του ουρικού οξέος, της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος στο δέρμα (n=8-10).....	124
Πίνακας 98. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών.....	126
Πίνακας 99. One way-ANOVA για σύγκριση συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στο δέρμα.....	126
Πίνακας 100. One way-ANOVA για σύγκριση συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος στο δέρμα.....	126
Πίνακας 101. Μέσος όρος τιμών συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=8-10) των strippings (αρχικά, ημέρα -0)....	127
Πίνακας 102. Μέσος όρος τιμών συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=8-10) των strippings (ημέρα 0).....	128
Πίνακας 103. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος, γλουταθειόνης και ασκορβικού οξέος (n=8-10) των strippings τη 14 ^η ημέρα.....	128
Πίνακας 104. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των αντιοξειδωτικών δεικτών τις ημέρες -0, 0 και 14 του πειράματος.....	130

Πίνακας 105. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στα strippings μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.	131
Πίνακας 106. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος στα strippings μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.	131
Πίνακας 107. One way-ANOVA για συγκέντρωση γλουταθειόνης την ημέρα 14 των strippings.....	132

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 7-9) εντός της ίδιας ημέρας.....	43
Διάγραμμα 2. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 13-17) εντός της ίδιας ημέρας.	47
Διάγραμμα 3. Μεταβολή του πάχους του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακας 21) εντός της ίδιας ημέρας.	51
Διάγραμμα 4. Μεταβολή της παραμέτρου R2 και R5 τη 0 και τη 14 ^η ημέρα.	54
Διάγραμμα 5. Μεταβολή της παραμέτρου R6 και R7 τη 0 και τη 14 ^η ημέρα.	55
Διάγραμμα 6. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 31-34) εντός της ίδιας ημέρας.	63
Διάγραμμα 7. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 39-44) εντός της ίδιας ημέρας.	68
Διάγραμμα 8. Μεταβολή πάχους δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	77
Διάγραμμα 9. Μεταβολή των παραμέτρων R2 και R5 τη 0 και τη 14 ^η ημέρα: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακες 52) εντός της ίδιας ημέρας.....	80
Διάγραμμα 10. Μεταβολή των παραμέτρων R6 και R7 τη 0 και τη 14 ^η ημέρα.	81
Διάγραμμα 11. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο δέρμα: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακας 55).....	87
Διάγραμμα 12. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στο δέρμα.....	87
Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στο δέρμα.	88

Διάγραμμα 14. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε φυσιολογικούς μύες (ημέρα 0).....	91
Διάγραμμα 15. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα σε φυσιολογικούς μύες (ημέρα 0).....	91
Διάγραμμα 16. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε ακτινοβολημένους μυς μετά από αγωγή (ημέρα 14): Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακας 61).....	93
Διάγραμμα 17. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα σε ακτινοβολημένους μυς μετά από αγωγή (ημέρα 14). Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακας 61).....	93
Διάγραμμα 18. Σύγκριση συγκεντρώσεων ουρικού οξέος μεταξύ ημερών 0 & 14...	95
Διάγραμμα 19. Σύγκριση συγκεντρώσεων γλουταθειόνης μεταξύ ημερών 0 & 14..	96
Διάγραμμα 20. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικές/Σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 67-70) εντός της ίδιας ημέρας	103
Διάγραμμα 21. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 76-80) εντός της ίδιας ημέρας.	108
Διάγραμμα 22. Μεταβολή του πάχους σε βάθος χρόνου 14 ημερών. Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 88-90) εντός της ίδιας ημέρας.	113
Διάγραμμα 23. Μεταβολή των R2 και R5 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	116
Διάγραμμα 24. Μεταβολή των R6 και R7 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	117
Διάγραμμα 25. Μεταβολή της γλυκόζης στο αίμα σε βάθος χρόνου 14 ημερών: πριν την πρόκληση διαβήτη (-0), εμφάνιση διαβήτη (0), και τέλος του πειράματος (14).....	122
Διάγραμμα 26. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στο διαβητικό δέρμα.	124
Διάγραμμα 27. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στο διαβητικό δέρμα.	125
Διάγραμμα 28. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο διαβητικό δέρμα.	125
Διάγραμμα 29. Σύγκριση των συγκεντρώσεων του ουρικού οξέος μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.	129
Διάγραμμα 30. Σύγκριση των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14. Σημαντική διαφορά * $p \leq 0.02$ σε σχέση με όλες τις άλλες αγωγές (Πίνακες 107) εντός της ίδιας ημέρας.....	129
Διάγραμμα 31. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο διαβητικό δέρμα (14 ^η ημέρα).	130

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Δομή δέρματος, (SC= Stratum Corneum, SG= Stratum Granulosum, SS= Stratum Spinosum, SB= Stratum Basale).....	6
Εικόνα 2. Διείσδυση ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα και οι βιολογικές αλλοιώσεις που προκαλεί.....	8
Εικόνα 3. Ενεργοποίηση p53 μετά από UV ακτινοβολία.....	11
Εικόνα 4. Ενεργοποίηση NF-κΒ	12
Εικόνα 5. Ρύθμιση της έκφρασης των MMPs από τη UVR στο δέρμα.....	15
Εικόνα 6. Αμφίδρομη σχέση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες	18
Εικόνα 7. Επαγωγή οξειδωτικού στρες από υπεργλυκαιμία.....	24
Εικόνα 8. Δομή τολφαιναμικού οξέος.	25
Εικόνα 9. Δομή του αιθυλεστέρα της κυστεΐνης.	26
Εικόνα 10. Δομή παραγώγου τολφαιναμικού οξέος 2-[2-3-χλωρο-2-μεθυλφαινυλαμινο) βενζαμιδο]-3-μερκαπτοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (AK1).....	27
Εικόνα 11. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	43
Εικόνα 12. Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών. ...	47
Εικόνα 13. Ενδεικτικές φωτογραφίες κάθε ομάδας τις ημέρες 0, 1, 4, 7, 11 και 14...	58
Εικόνα 14. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x200).....	59
Εικόνα 15. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 5% (μεγέθυνση x200).....	59
Εικόνα 16. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 5% (μεγέθυνση x400).	60
Εικόνα 17. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 5% (μεγέθυνση x400).	60
Εικόνα 18. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x200).....	61
Εικόνα 19. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	63
Εικόνα 20. Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης των ομάδων σε βάθος χρόνου 14 ημερών.	68
Εικόνα 21. Ποσοστιαία μεταβολή των R2 και R5 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.	81
Εικόνα 22. Ποσοστιαία μεταβολή των R6 και R7 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.	81
Εικόνα 23. Ενδεικτικές φωτογραφίες κάθε ομάδας τις ημέρες 0, 1, 4, 7, 11 και 14 ...	84
Εικόνα 24. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x100).....	98
Εικόνα 25. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 0.1% (μεγέθυνση x100).	98
Εικόνα 26. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 1% (μεγέθυνση x100).....	99
Εικόνα 27. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 0.1% (μεγέθυνση x100).....	99
Εικόνα 28. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 1% (μεγέθυνση x100).	100
Εικόνα 29. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 0.1% (μεγέθυνση x100).....	100
Εικόνα 30. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 1% (μεγέθυνση x100).	101
Εικόνα 31. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x200).....	101
Εικόνα 32. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 4, 7 και 14 ημερών.	103
Εικόνα 33. Ποσοστιαία μεταβολή ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 4, 7, 14 ημερών.	108
Εικόνα 34. Ποσοστιαία μεταβολή των παραμέτρων της ελαστικότητας από τη -0 έως την 14 ^η μέρα.....	117

Εικόνα 35. Ποσοστιαία μεταβολή των παραμέτρων της ελαστικότητας από τη 0 έως την 14 ^η ημέρα.	117
Εικόνα 36. Ενδεικτικές φωτογραφίες από κάθε ομάδα τις ημέρες -0, 0, 1, 4, 7, 11 και 14.	121
Εικόνα 37. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x200).	133
Εικόνα 38. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 1% (μεγέθυνση x400).	133
Εικόνα 39. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 1% (μεγέθυνση x200).	134
Εικόνα 40. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 1% (μεγέθυνση x400).	134
Εικόνα 41. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x100).	135

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AGEs	Advanced Glycation End products (Τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης)
AK1	2-[2-3-χλωρο-2-μεθυλφαινυλαμινο]βενζαμιδο]-3-μερκαπτοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας
APCs	Antigen Presenting Cells (Αντιγονοπαραρυσιαστικά κύτταρα)
Cys	Ethylester of Cysteine (Αιθυλεστέρας κυστεΐνης)
LCs	Langerhans Cells (Κύτταρα του Langerhans)
NF-κB	Nuclear Factor κB (Πυρηνικός παράγοντας κB)
NSAID	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs
PGs	Prostaglandins (Προσταγλανδίνες)
ROS	Reactive Oxygen Species (Ενεργείς μορφές οξυγόνου)
SC	Stratum Corneum (Κεράτινη στιβάδα)
TEWL	Transepidermal Water Loss (Άδηλη Απώλεια Νερού)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor (Παράγοντας νέκρωσης όγκων)
Tolf	Tolfenamic Acid (Τολφαιναμικό οξύ)
UVR	Ultraviolet Radiation (Υπεριώδης ακτινοβολία)
ΜΣΑΦ	Μη στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

ABSTRACT

Skin inflammation is associated with almost all cutaneous disorders. Diabetes mellitus also influences skin physiology producing dryness and accelerating ageing. The development of effective and safe topical anti-inflammatory/antioxidant agents may be beneficial in such cases. The present study was conducted in order to evaluate the effect of a novel multifunctional derivative (AK1) that combines structural moieties of tolfenamic acid (a known NSAID) and cysteine ethyl ester (a known antioxidant molecule).

The study was divided into three parts (studies), firstly in order to estimate the dose which produces the best therapeutic effect and subsequently to study the effect of the selected dose on diabetic skin. In the first study, 5 groups of 8 male hairless SKH-2 mice in each group were exposed to acute UVR (2,5) MED and a (twice) daily topical application of tolfenamic acid 5% (Tolf group) or cysteine ethyl ester (Cys group) (both as reference agents) and AK1 5% (AK1 group) in a mixture of polyethylenoglycols (PEG100/PEG400, 3:1) used as excipient. Additionally, there was another group treated with the Excipient (Excipient group) and one without any treatment (Control). In the second study, 8 groups of 6 male hairless SKH-2 mice were irradiated under the same conditions, while we investigated the topical effect of the above agents, in a dose of 1% and 0.1%, respectively (Tolf 1%, Tolf 0.1% Cys 1%, Cys 0.1%, AK1 1%, AK1 0.1%, Excipient, Control). Finally, a third study was performed in order to examine the pharmacological effect of AK1 1% or reference molecules on irradiated diabetic mice (Tolf, Cys, AK1, Excipient, Control) after diabetes was induced by intraperitoneal administration of STZ (40mg/kg/day, for 5 days).

The parameters that examined were TEWL (transepidermal water loss), Stratum Corneum (SC) Hydration, Thickness and Elasticity. We also measured the concentration of endogenous antioxidants (glutathione, ascorbic acid and uric acid) using HPLC. Finally, histopathological studies took place on skin sections of the irradiated dorsal skin of the mice using Hematoxylin and Eosin staining.

The results were promising considering the amelioration of the inflammation in AK1-treated groups, as well as the reinforcement of antioxidant defense system in the skin. In conclusion, the outcome suggests that the novel derivative of NSAID with cysteine ethyl ester (AK1) may exhibit an effective therapeutic effect in UVB-induced inflammatory and oxidative skin damages in conditions such as diabetes mellitus.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φλεγμονή στο δέρμα σχετίζεται με όλες σχεδόν τις δερματολογικές διαταραχές. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης επίσης, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογία του δέρματος επάγοντας την αφυδάτωσή του και επιταχύνοντας τη γήρανση. Η ανάπτυξη αποτελεσματικών και ασφαλών τοπικών αντιφλεγμονωδών-αντιοξειδωτικών παραγόντων μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική σε τέτοιες περιπτώσεις. Η παρούσα εργασία διεξήχθη με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης ενός καινοτόμου πολυλειτουργικού παραγώγου (AK1) που συνδυάζει δομικά τμήματα του τολφαιναμικού οξέος (γνωστού ΜΣΑΦ) καθώς και του αιθυλεστέρα της κυστεΐνης (γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο).

Η πειραματική μελέτη χωρίστηκε σε τρία επιμέρους τμήματα (μελέτες) με σκοπό αρχικά να προσδιοριστεί η κατάλληλη δόση που οδηγεί στο βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα και εν συνεχεία να μελετηθεί η επίδραση της επιλεχθείσας δόσης στο διαβητικό δέρμα. Στην πρώτη μελέτη, 5 ομάδες από 8 αρσενικούς, άτριχους μύες SKH-2 σε κάθε ομάδα, εκτέθηκαν σε εφάπαξ UV ακτινοβολήση (2,5) MED. Εν συνεχεία, εφαρμόστηκαν τοπικά σε καθημερινή βάση (δύο φορές/ημέρα) διαλύματα τολφαιναμικού οξέος (ομάδα Tolf) και αιθυλεστέρα της κυστεΐνης (ομάδα Cys) ως ενώσεις αναφοράς, καθώς και του παραγώγου AK1 (ομάδα AK1) σε συγκέντρωση 5% σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών (PEG600/PEG400, 3:1) ενώ μία ομάδα έλαβε μόνο το φορέα (ομάδα Excipient) και η τελευταία δεν έλαβε καμία αγωγή (ομάδα Control). Στη δεύτερη πειραματική μελέτη, 8 ομάδες των 6 μυών σε κάθε ομάδα ακτινοβολήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες ενώ εξετάσαμε την τοπική εφαρμογή των παραπάνω ουσιών σε συγκεντρώσεις 1% και 0.1% (Tolf 1%, Tolf 0.1% Cys 1%, Cys 0.1%, AK1 1%, AK1 0.1%, Excipient, Control). Τέλος, διεξήγαμε μία τρίτη πειραματική μελέτη, για να εξετάσουμε τη φαρμακολογική δράση του AK1 (στη δόση 1%) και των μητρικών του μορίων σε ακτινοβολημένους μύες που έχουν όμως προηγουμένως αναπτύξει διαβήτη (Tolf, Cys, AK1, Excipient, Control) μετά από χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) (ενδοπεριτοναϊκώς 40mg/kg/ημέρα, για 5 συνεχόμενες μέρες).

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν οι εξής: Άδηλη απώλεια νερού (TEWL), ενυδάτωση κεράτινης στιβάδας, πάχος και ελαστικότητα δέρματος. Επιπλέον, μετρήθηκε η συγκέντρωση των υδρόφιλων ενδογενών μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών (γλουταθειόνη, ασκορβικό και ουρικό οξύ) στο δέρμα και στην κεράτινη στιβάδα με χρήση HPLC. Τέλος, εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά δείγματα από τμήμα της ακτινοβολημένης ράχης των μυών.

Τα αποτελέσματα ήταν πολλά υποσχόμενα, καθώς οι ομάδες στις οποίες εφαρμόστηκε η αγωγή με AK1 επέδειξαν σημαντική βελτίωση των περισσότερων

δεικτών της φλεγμονής, καθώς και ενισχυμένη αντιοξειδωτική άμυνα στο δέρμα. Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το καινοτόμο παράγωγο τολφαιναμικού οξέος κι αιθυλεστέρα της κυστεΐνης εκδηλώνει αποτελεσματική φαρμακολογική δράση έναντι φλεγμονών του δέρματος προκληθέντων από υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και βλαβών του δέρματος σε ασθένειες με αυξημένο οξειδωτικό στρες όπως αυτή του σακχαρώδους διαβήτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΔΕΡΜΑ

1.1. Ανατομία δέρματος

Το δέρμα καλύπτει όλη την εξωτερική επιφάνεια του ανθρώπινου σώματος και αποτελεί το μεγαλύτερο όργανό του. Διακρίνεται σε τρία τμήματα από έξω προς τα μέσα: την επιδερμίδα, το χόριο ή ιδίως δέρμα και τον υποδόριο ιστό ή υπόδερμα. Περιέχει εξαρτήματα (τρίχες, νύχια, ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες) καθώς και αγγεία και νεύρα (Young et al., 2006).

Το εξωτερικό στρώμα του δέρματος είναι η επιδερμίδα. Πρόκειται για ένα πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο που απαρτίζεται κυρίως από κερατινοκύτταρα που συνιστούν το 95% του κυτταρικού πληθυσμού και από ελάχιστη μεσοκυττάρια ουσία. Η επιδερμίδα με τα σειρά της διακρίνεται σε πέντε στιβάδες:

Η πρώτη είναι η βασική στιβάδα (Stratum basale) που βρίσκεται πάνω από το χόριο και αποτελείται από ένα στοίχο κυβοειδών ή κυλινδρικών κυττάρων. Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής πολλαπλασιάζονται τροφοδοτώντας την επιδερμίδα με νέα κύτταρα. Τα θυγατρικά αυτά κύτταρα μεταναστεύουν προς την επιφάνεια της επιδερμίδας, σχηματίζουν την κεράτινη στιβάδα και τελικώς αποπύπτουν. Η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων της βασικής στιβάδας στα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας ονομάζεται κερατινοποίηση. Η διάρκεια ζωής ενός κερατινοκυττάρου από τη στιγμή που θα σχηματιστεί μέχρι την απόπτωσή του είναι περίπου 28 ημέρες. Στη στιβάδα αυτή απαντούν επίσης τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα Merkel. Η επόμενη στιβάδα είναι η ακανθωτή (Stratum Spinosum) και αποτελείται από πολυεδρικά κύτταρα (από 4-12 σειρές) που όσο ανεβαίνουν προς τα πάνω αποπλατύνονται. Τα κερατικύτταρα αυτά συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά ινίδια που ονομάζονται δεσμοσωμάτια. Στη στιβάδα αυτή ανευρίσκονται και τα κύτταρα του Langerhans που συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση ενάντια στους μικροοργανισμούς ως αντιγονοπαρουσιαστικά. Ακολουθεί η κοκκώδης στιβάδα (Stratum Granulosum), η οποία αποτελείται από αποπλατυσμένα ρομβοειδή κύτταρα σε οριζόντια διάταξη, απύρρηνα που φέρουν στο πρωτόπλασμα κοκκία κερατοϋαλίνης ή προφίλαγγρίνης. Επίσης, εμφανίζονται και τα πεταλιώδη σωμάτια ή σωμάτια του Odland, τα οποία περιέχουν λιπίδια που εκλύονται στο μεσοκυττάριο χώρο με εξωκύτωση (McLafferty et al., 2012). Τελευταία ακολουθεί η κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum) και πρόκειται για αυτή που είναι εκτεθειμένη στο περιβάλλον. Τα κύτταρά της από δομικής απόψεως έχουν χάσει τον πυρήνα τους και τα άλλα οργάνίδια τους ενώ μορφολογικά είναι αποπλατυσμένα. Στη στιβάδα αυτή βρίσκονται λιπίδια (στερόλες, λιπαρά οξέα και κεραμίδια) τα οποία προέρχονται από τα σώματα του Odland (**Εικόνα 1**) (Young et al., 2006).

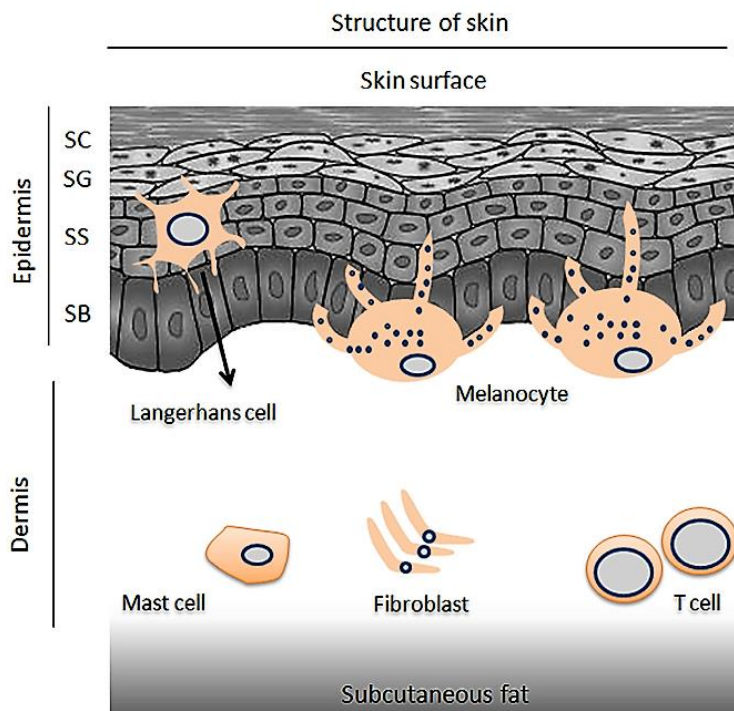
1.2. Φυσιολογία δέρματος

Όπως προαναφέρθηκε, η επιδερμίδα μπορεί να διαιρεθεί σε πολλές στρώσεις που περιλαμβάνουν τη βασική, την ακανθωτή, την κοκκιώδη και την κεράτινη στιβάδα, ανάλογα με τη διαδικασία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Τα κερατινοκύτταρα της κεράτινης στιβάδας χάνουν τον πυρήνα τους και μαζί με τα εξωκυττάρια συμπαγή μόρια συμβάλλουν στον φυσικό φραγμό του δέρματος ενώ αυτή η διαδικασία διαφοροποίησης αποτελεί το μοντέλο της φυσιολογικής απόπτωσης των κυττάρων στην επιδερμίδα (Pincelli and Marconi, 2010). Εκτός από τα κερατινοκύτταρα, στα κύρια κύτταρα της επιδερμίδας περιλαμβάνονται τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα του Langerhans (LCs). Τα περισσότερα μελανοκύτταρα απαντούν στην βασική στιβάδα συνθέτοντας και μεταφέροντας μελανίνη στα γειτονικά κερατινοκύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, συμβάλλουν στο χρώμα του δέρματος και την φωτοπροστασία του (Gray-Schopfer et al, 2007). Τα LCs από την άλλη μεριά, είναι εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα APCs (antigen presenting cells) και η μακριά «δενδριτική» δομή τους αποτελεί την πρώτη γραμμή του ανοσολογικού φραγμού (Koch et al., 2006). Ενεργοποιούνται από ενδογενή ή εξωγενή αντιγονά και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες του δέρματος για να ενεργοποιήσουν με τη σειρά τους τα T-λεμφοκύτταρα. Αυτά επιστρέφουν και επάγουν ανοσολογική απόκριση έναντι των αντιγόνων. Όσον αφορά το χόριο, εδώ απαντούν διάφοροι τύποι κυττάρων όπως λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες. Αυτή η στιβάδα αποτελεί φυσική προστασία και θρέφει το δέρμα (Lugo et al., 2011) ενώ το τρίτο στρώμα του δέρματος, το υποδόριο λίπος, συμβάλλει κυρίως στη διαδικασία της θερμομόνωσης καθώς και ως αποθεματικός χώρος θερμίδων (Hayward and Keatinge, 1981). Το λίπος έχει επίσης ενδοκρινή λειτουργία, απελευθερώνοντας την ορμόνη λεπτίνη, η οποία δρα στον υποθάλαμο για να ρυθμίζει το αίσθημα της πείνας και το μεταβολισμό. Άλλες λειτουργίες των λιπωδών κυττάρων περιλαμβάνουν την αναδιαμόρφωση ιστού και τη φαγοκυττάρωση ενώ η θερμоруθμιση επιτυγχάνεται και με την αγγειοδιαστολή ή αγγειοσυστολή των αιμοφόρων αγγείων, καθώς και με τη βοήθεια των εκκρινών ιδρωτοποιών αδένων (McGrath and Uitto, 2010).

Σημαντική λειτουργία του επιδερμικού φραγμού είναι η παρεμπόδιση της διαρροής νερού και ηλεκτρολυτών (από μέσα προς τα έξω) και η διείσδυση μικροβίων και χημικών ουσιών. Η διείσδυση εξουδετερώνεται από μια σειρά χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του δέρματος όπως το χαμηλό pH, την παρουσία αντιβακτηριακών συστατικών και τη συνεχή αποβολή κερατινοκυττάρων (Darlenski et al., 2011). Όσον αφορά τον αντιμικροβιακό φραγμό, το δέρμα παράγει έναν αριθμό αντιμικροβιακών πεπτιδίων και πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των ντιφενσινών και καθελυσιδινών. Αυτά τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγγενή άμυνα του ξενιστή, είναι μικρά κατιονικά

πολυπεπτίδια και έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροβίων (Lee et al., 2006).

Το σμήγμα, που παράγεται από τους σμηγματογόνους αδένες, εμπλέκεται στο σχηματισμό του υμενίου νερού-λιπιδίου της επιφάνεια του δέρματος και συνεπώς συμμετέχει και αυτό στη δημιουργία του επιδερμικού φραγμού. Το ανθρώπινο σμήγμα αποτελείται από λιπαρά οξέα (47%), εστέρες κηρού (17%), κεραμίδια (13%), σκουαλένιο (11%), χοληστερόλη (7%), τριγλυκερίδια (3%) και εστέρες χοληστερόλης (2%). Τα λιπαρά οξέα συμβάλλουν στην εμφάνιση οξύτητας στην επιφάνεια του δέρματος και κατ' επέκταση στον αμυντικό μηχανισμό κατά της παθογόνου χλωρίδας καθώς και στη συντήρηση της ομοιόστασης του φραγμού. Για αυτό το λόγο και η μειωμένη έκκριση σμήγματος αποτελεί βασικό στοιχείο της παθογένειας της γεροντικής ξηρότητας και του ατοπικού δέρματος (Darlenski et al., 2011).



Εικόνα 1. Δομή δέρματος, (SC= Stratum Corneum, SG= Stratum Granulosum, SS= Stratum Spinosum, SB= Stratum Basale)

Πηγή: Lee et al., 2013

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

2.1. Φάσμα UV ακτινοβολίας και βιολογική δράση

Το φως του ήλιου αποτελείται από ένα συνεχές φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που διακρίνεται σε τρία κύρια μήκη κύματος: την υπεριώδη (ultraviolet), την ορατή (visible) και την υπέρυθρη (infrared). Η υπεριώδης ακτινοβολία με τη σειρά της χωρίζεται στις: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Το στρώμα του όζοντος απορροφά έντονα τη UVC, σε μικρότερο βαθμό τη UVB και καθόλου τη UVA (Snobodova, 2006). Καθώς το μήκος κύματος αυξάνεται σταθερά από τη UVB στη UVA, στο ορατό και στη συνέχεια στο υπέρυθρο, η ενέργεια κάθε φωτονίου μειώνεται ενώ η ικανότητα διείσδυσης στο βιολογικό ιστό αυξάνει (**Εικόνα 2**) (Diffey and Kochevar, 2007).

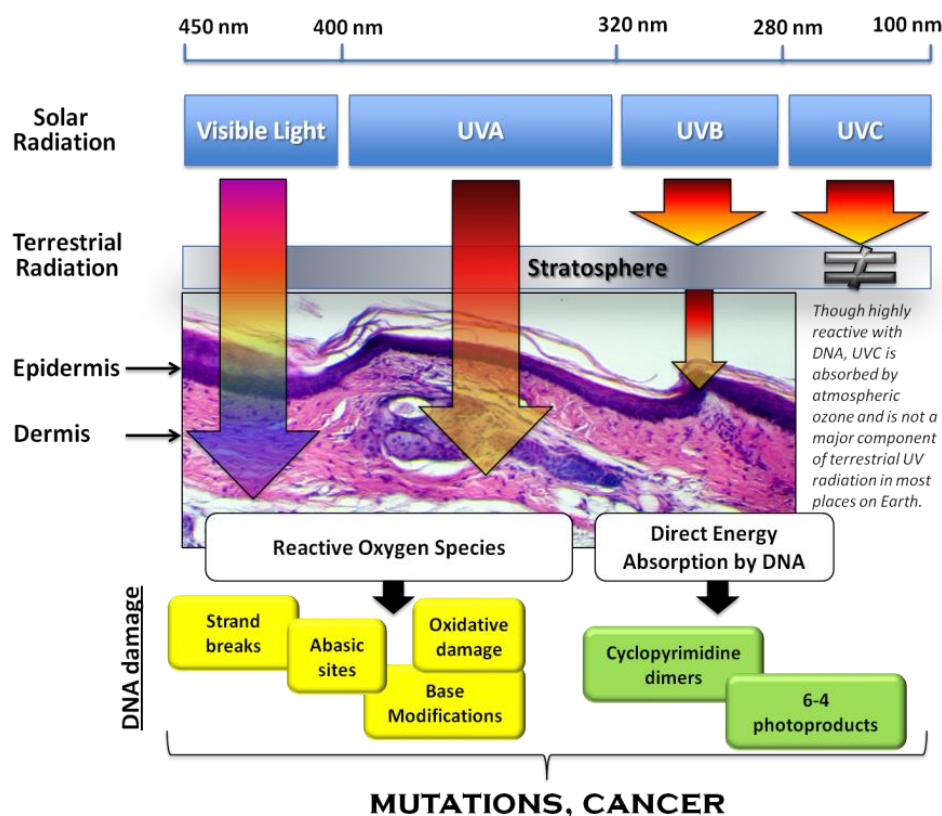
Παρά την ευεργετική δράση της UV ακτινοβολίας σε περιπτώσεις όπως αυτή της σύνθεσης βιταμίνης D, της διέγερσης ορμονών που ρυθμίζουν τον κίρκαδικό ρυθμό και τη διάθεση και της φωτοθεραπείας, η παρατεταμένη έκθεση είναι επιβλαβής για το δέρμα. Η άμεση απόκριση στη UVR περιλαμβάνει τη φλεγμονή-ερύθημα, το «μαύρισμα» και την τοπική/συστηματική ανοσοκαταστολή, ενώ τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα αφορούν τη φωτογήρανση, τη ανοσοκαταστολή και τη φωτοκαρκινογένεση (Polefka et al., 2012).

Έτσι, σε αντίθεση με τη UVB, η UVA διεισδύει βαθύτερα στην επιδερμίδα και το χόριο του δέρματος ενώ είναι 1000 φορές πιο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση της μελανινογένεσης (Clydesdale 2001). Προκαλεί νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων καταστρέφοντας έτσι, τα αιμοφόρα αγγεία του δέρματος και επάγει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι επαγόμενες από τη UVA απαντήσεις στα κύτταρα συμβαίνουν εμμέσως μέσω οξειδωτικών διαδικασιών που υποκινούνται από ενδογενείς φωτοευαίσθητοποιητές όπως πορφυρίνες και συστατικά της αίμης. Η έντονη ή εκτεταμένη έκθεση μπορεί να προκαλέσει έγκαιρα στο «ευαίσθητο» δέρμα ενώ σε περίπτωση παρατεταμένης έκθεσης είναι δυνατό να προκληθεί βλάβη στις υποκείμενες δομές του χορίου και να οδηγήσει σε πρόωρη φωτογήρανση. Η χρόνια επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ήλιο από την παιδική ηλικία ακόμη, επιδημιολογικά φαίνεται πως είναι η κύρια αιτία καρκίνου του δέρματος (Ichihashi 2003).

Η υπεριώδης ακτινοβολία B έχει πειραματικά αποδειχθεί σε ζώα ότι είναι η πιο αποτελεσματική ακτινοβολία για την πρόκληση καρκίνου του δέρματος. Ειδικότερα μπορεί να προκαλέσει άμεση βλάβη στο DNA μέσω διμερών κυκλοβουτανίου (διμερή θυμίνης ή κυτοσίνης) και φωτοπροϊόντων που επάγουν μεταλλάξεις στα κύτταρα της επιδερμίδας οδηγώντας στην εμφάνιση καρκινικών κυττάρων ενώ

συγχρόνως ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση γονιδίων μέσω ενδοκυττάρων μοριακών μονοπατιών συμβάλλοντας στην εμφάνιση καρκίνου του δέρματος (Ichihashi 2003). Επιπλέον, επιδρά έμμεσα στα μακρομόρια επάγοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών και μειώνοντας την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο δέρμα. Προκαλεί φωτισομερίωση του trans ουροκανικού οξέος (UCA) σε cis (Trautinger 2001), επάγει τη δραστηριότητα του ενζύμου, δεκαρβοξυλάση ορνιθίνης και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και εμποδίζει τη λειτουργική σύνθεση του DNA στο δέρμα (Snobodona, 2006). Τέλος, καταστέλλει την ανοσολογική απάντηση καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι οι φωτοχημικές βλάβες του DNA ενδεχομένως να ενεργοποιούν ανοσοκατασταλτικούς μηχανισμούς και να επάγουν μια κατάσταση ανοσιακής αντοχής σε διάφορα αντιγονικά ερεθίσματα και νεοπλασματικά κύτταρα (Kripke MI, 1981).

Όσον αφορά τη UVC, παρά την ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνο και τοξική της δράση, απορροφάται πλήρως από την ατμόσφαιρα της γης.



Εικόνα 2. Διείσδυση ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα και οι βιολογικές αλλοιώσεις που προκαλεί

Πηγή: D'Orazio et al., 2013

2.2. Μορφολογικές και δομικές αλλοιώσεις

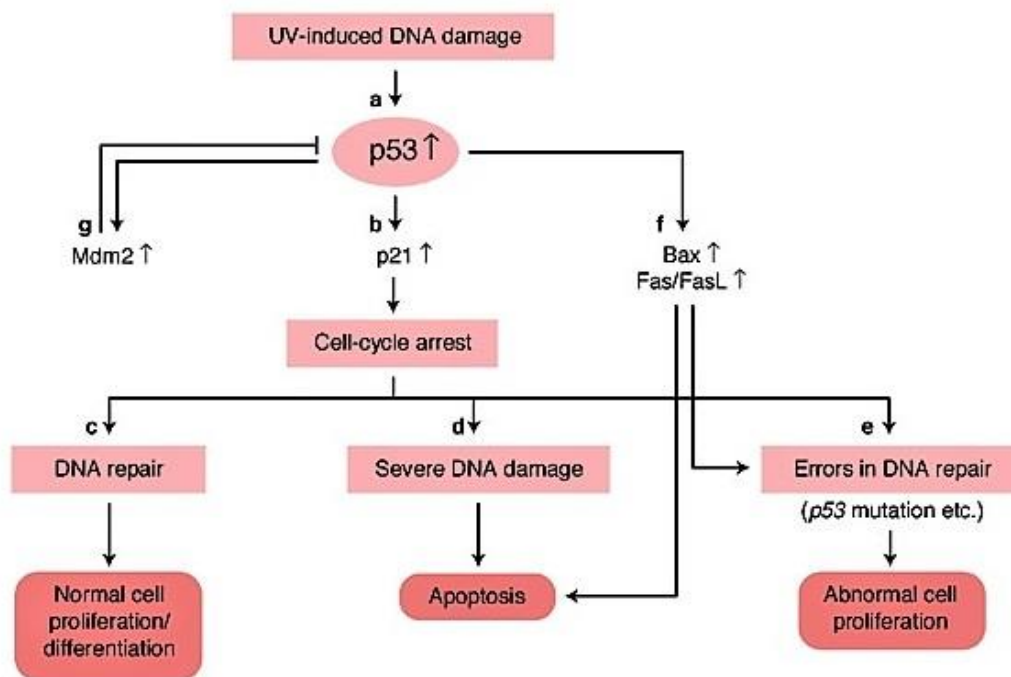
Οι βλάβες του δέρματος που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία εξαρτώνται από ποικίλες παραμέτρους όπως το μήκος κύματος, τη δόση και τη συχνότητα της ακτινοβολήσης, καθώς και τα χαρακτηριστικά του ίδιου του ιστού (Svobodova, 2006). Ένα κλασσικό παράδειγμα είναι οι διαφορές στο αποτέλεσμα μεταξύ της οξείας και της χρόνιας έκθεσης. Στην πρώτη περίπτωση εμφανίζεται ερύθημα, θερμότητα, οίδημα, άλγος και κνησμός που ακολουθείται από πάχυνση του δέρματος ενώ στη δεύτερη μπορεί να προκληθεί γήρανση του δέρματος και καρκινογένεση. Τέλος, όταν το ερύθημα επάγεται από την ηλιακή ακτινοβολία η αντίδραση στο φως χαρακτηρίζεται ως «ηλιακό έγκαυμα» (Luciann Lisi Hruza et al., 1993).

Μία συνέπεια της έκθεσης στη UVR είναι η βλάβη των επιδερμικών κυττάρων η οποία γίνεται εμφανής 2 ώρες μετά την ακτινοβολήση (Logan et al., 1966). Μία πρώτη ένδειξη της βλάβης είναι η μείωση των σωματιδίων του Odland που συνεπάγεται το σχηματισμό δυσκερατωτικών κυττάρων. Αρχικά, εμφανίζεται ενδοκυτταρικό οίδημα, το οποίο στη συνέχεια αναπτύσσεται διακυτταρικά ανάμεσα στα κατεστραμμένα κερατινοκύτταρα. Τα καμένα κύτταρα θεωρούνται χαρακτηριστικό παράδειγμα απόπτωσης. Τα αποπτωτικά κύτταρα (Ultraviolet-induced apoptotic cells) φαγοκυτταρώνονται άμεσα από τα περιβάλλοντα κερατινοκύτταρα καθώς και από τα μακροφάγα, η συγκέντρωση των οποίων μειώνεται δραματικά στο δέρμα μετά από επίδραση της UVB. Μέσα από σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιείται η πρωτεΐνη p53, ένας μεταγραφικός παράγοντας που προκαλεί παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) δίνοντας χρόνο στο κύτταρο είτε να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση (D’Orazio et al., 2013). Αναλυτικότερα, όταν εμφανιστεί βλάβη στο DNA από άπαξ ακτινοβολήση, ενεργοποιείται η πρωτεΐνη p53, μετά από φωσφορυλίωσή της Σερίνης της στη θέση 15 και της Σερίνης στη θέση 20. Η συσσώρευσή της επάγει αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 επιτρέποντας την επιδιόρθωση του DNA πριν τη διαδικασία διπλασιασμού στη φάση S (Huang et al., 1996). Η ενεργοποιημένη p53, συνδέεται στο DNA κι ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων WAF1/CIP1 που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη p21, ένα αναστολέα της κινάσης εξαρτημένης από κυκλίνη, CDK. (Harper et al., 1993). Πιο συγκεκριμένα, η p21 συνδέεται με τη CDK, απενεργοποιώντας το σύμπλεγμα CDK-κυκλίνη οδηγώντας σε προσωρινή διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, στην περίπτωση που η βλάβη του DNA δεν επιδιορθώνεται, η p53 επάγει την απόπτωση, ρυθμίζοντας προς τα πάνω την έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως τις Bax, Fas/Apo-1 ή ρυθμίζοντας προς τα κάτω την έκφραση κατασταλτικών της απόπτωσης γονιδίων που κωδικοποιούν την Bcl-2 (Müllauer et al., 2001). Επιπλέον, η p53 μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο Fas με σύνδεση τόσο στην περιοχή του

εκκινητή, όσο και στην περιοχή που ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων (Muller et al., 1998) ενώ έχει διαπιστωθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι σημαντικές για το σχηματισμό «καμένων κυττάρων» από τη UVR σε δέρμα μύος (**Εικόνα 3**) (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

Η επαγόμενη από UVR απόπτωση διακρίνεται στην άμεση και στην καθυστερημένη. Η τελευταία θεωρείται ότι οφείλεται σε βλάβη του DNA από την ακτινοβολήση και όχι τόσο στην επίδραση των ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, η άμεση απόπτωση δεν απαιτεί τη διενέργεια πρωτεϊνικής σύνθεσης όπως η καθυστερημένη. Παρόμοιες αποπτωτικές αλλαγές σημειώνονται και στα επιδερμικά κύτταρα του Langerhans (LC) που είναι πιο ευαίσθητα στην UVR σε σχέση με τα κερατινοκύτταρα, καθώς η βλάβη γίνεται αντιληπτή σε χαμηλότερες δόσεις ακτινοβολίας. Οι εκφυλιστικές αλλαγές και για τα δύο είδη κυττάρων περιλαμβάνουν μιτοχονδριακή διόγκωση και ρήξη, συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος και εμφάνιση πυκνωτικού πυρήνα (Clydesdale et al., 2001). Ωστόσο, αρκετές ώρες μετά την ακτινοβολήση, η σηματοδότηση για την κυτταρική απόπτωση περιορίζεται και τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται ραγδαία (D' Orazio et al., 2013). Η υπερπύκνωση που παρατηρείται, οφείλεται τόσο σε επιδερμική υπερπλασία, όσο και στην αύξηση του πάχους της κεράτινης στιβάδας, καθώς η αύξηση στην κυτταρική διαίρεση που παρατηρείται οδηγεί σε συσσώρευση των επιδερμικών κυττάρων. Συνήθως, η μέγιστη αύξηση στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων παρατηρείται 48 ώρες μετά την ακτινοβολήση (Clydesdale et al., 2001). Η επιδερμική υπερπλασία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας ενάντια στην εισχώρηση της UVR στο δέρμα (D' Orazio et al., 2013). Όλες αυτές οι αλλαγές λοιπόν, προκαλούν μία γενικότερη μείωση της λειτουργίας του επιδερμικού φραγμού.

Σε συνδυασμό με την επιδερμική υπερκεράτωση συμβαίνει και το “μαύρισμα” (tanning) δηλαδή προσαρμοστική μελανινογένεση. Αυτή η διαδικασία είναι επίσης διφασική, καθώς περιλαμβάνει το άμεσο μαύρισμα (IPD, Immediate Pigment Darkening) και το καθυστερημένο σχηματισμό νέας μελανίνης (DT, Delayed Tanning). Το IPD συμβαίνει δευτερόλεπτα μετά την έκθεση στη UVR, προκειμένου να προστατεύσει τους πυρήνες των επιδερμικών κυττάρων της βασικής στιβάδας σχηματίζοντας «πυρηνικά περιβλήματα» (nuclear caps). Προκύπτει από την τροποποίηση και ανακατανομή τμημάτων μελανίνης που υπάρχουν ήδη στο δέρμα. Αντίθετα, το DT σχετίζεται με αύξηση της δραστηριότητας των μελανινοκυττάρων όταν πρόκειται για μονή δόση ακτινοβολίας ενώ με συνεχείς δόσεις ακτινοβολήσης παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους. Τέλος, ενισχύεται η δράση της τυροσινάσης, ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή της τυροσίνης σε μελανίνη ενώ η επιταχυνόμενη μεταφορά μελανίνης στα κερατινοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα μεγάλη αύξηση των κοκκίων μελανίνης στην επιδερμίδα (Matsumura and Ananthaswamy, 2002) .



Εικόνα 3. Ενεργοποίηση p53 μετά από UV ακτινοβολία

Πηγή: Matsumura and Ananthaswamy, 2002

2.3. Φλεγμονή

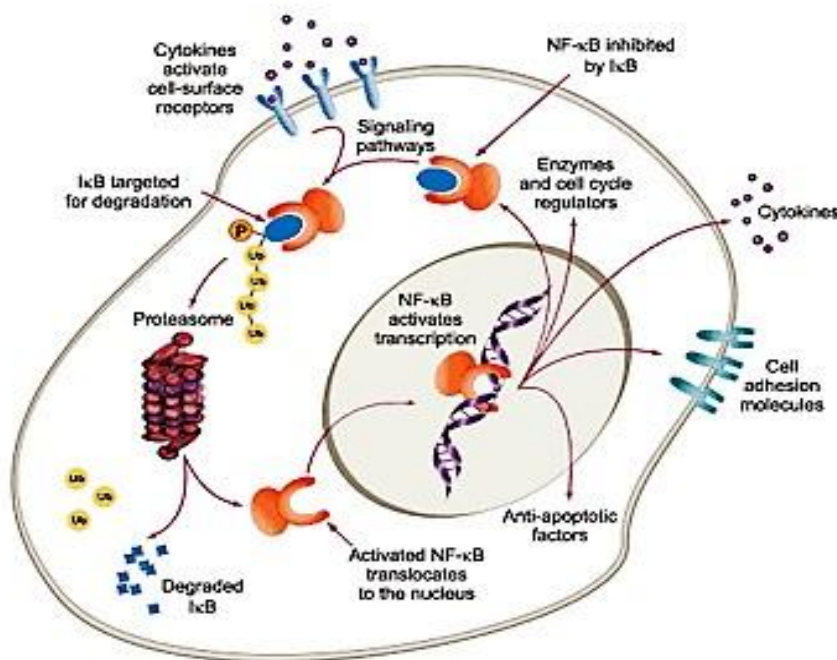
Η φλεγμονή είναι η εστιασμένη απόκριση του σώματος στη μόλυνση ή τον τραυματισμό ενώ οι λειτουργίες της είναι η καταστροφή ή η απενεργοποίηση των ξένων εισβολέων και η επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης. Μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών μεσολαβητών όπως μικροβιακοί παράγοντες, τοξίνες και μεταβολές στο pH είναι ικανοί να επάγουν τη φλεγμονώδη απάντηση με αποτέλεσμα μία οξεία δερματίτιδα. Εξωγενή φυσικά ερεθίσματα όπως η θερμότητα, το κρύο ή η ακτινοβολία UV μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ομοιόσταση του δέρματος και να ενεργοποιήσουν την απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιούνται μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν την ανασύσταση της ακεραιότητας του ιστού (Medzhitov, 2008). Η οξεία αντίδραση περιλαμβάνει δύο διαδοχικές φάσεις: την αρχική «σιωπηλή φάση» που συνεπάγεται την απελευθέρωση μακροφάγων, ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων κλπ, και τη δεύτερη που χαρακτηρίζεται από αγγειοδιαστολή και αυξημένη διαπερατότητα ακολουθούμενη από τη διήθηση κυτταρικών μεσολαβητών. Οι κοινές τοπικές εκδηλώσεις της φλεγμονής είναι η ερυθρότητα, το οίδημα, η αύξηση της θερμοκρασίας, ο πόνος και η απώλεια της λειτουργίας του ιστού ή του πάσχοντος οργάνου.

2.3.1. Φλεγμονή επαγόμενη από UV

Η αρχική φλεγμονώδης απόκριση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι η αγγειοδιαστολή των τοπικών αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ερυθρήματος (Clydesdale et al., 2001)

Η διαδικασία της φλεγμονής περιλαμβάνει έναν καταρράκτη γεγονότων που συνεπάγεται τη διήθηση φλεγμονωδών λευκοκυττάρων (μακροφάγα, ουδετερόφιλα), την αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών (PGs) και την απελευθέρωση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α), του πυρηνικού παράγοντα κ B (NF- κ B) και κυτοκινών όπως ιντερλευκινών IL-1 α , IL-1 β , IL-6 (Afaq and Mukhtar, 2002).

Ο παράγοντας NF- κ B αποτελεί ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένο στο κυτταρόπλασμα με την ανασταλτική πρωτεΐνη I κ B που το καθιστά αδρανές. Ένα φλεγμονώδες ερέθισμα, λοιπόν, όπως είναι η UV ακτινοβολία οδηγεί σε φωσφορυλίωση της I- κ B από την I κ B κινάση (IKK) και τελικά σε αποδόμηση του συμπλόκου. Ο πλέον ελεύθερος NF- κ B μεταφέρεται στον πυρήνα, συνδέεται με το DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών, προσκολλητικών μορίων, του TNF- α , της COX-2, της λιποξυγονάσης, της επαγόμενης συνθετάσης του NO (iNOS) και της μυελοϋπεροξειδάσης (**Εικόνα 4**) (Huang et al., 2004).



Εικόνα 4. Ενεργοποίηση NF- κ B

Πηγή: Montagut et al., 2005

Η UV ακτινοβολία λοιπόν, μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση της IL-1 από την κεράτινη στιβάδα για την έναρξη των φλεγμονωδών αποκρίσεων στα ζώντα στρώματα του δέρματος. Επιπλέον, διεγείρει την σύνθεση του TNF- α από τα κερατινοκύτταρα και την απελευθέρωση του στην κυκλοφορία επιτρέποντας την εμφάνιση συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης. Οι δύο αυτές κύριες κυτταροκίνες επάγουν με τη σειρά τους τη σύνθεση και την απελευθέρωση άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών. Γενικά, έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής IL-1, IL-3 και IL-6 μετά από έκθεση σε UVR καθώς και υπερέκφραση της IL-1, IL-10 και IL-7. Παραδόξως, ενώ η UVB επάγει τη σύνθεση των ιντερλευκινών 10 και 12 στα κερατινοκύτταρα, η IL-12 δεν επηρεάζεται από τη UVA. Εκτός από τις ιντερλευκίνες, αυξημένα επίπεδα παρουσιάζει κι ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυτταρικών μακροφάγων GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) που παίζει ρόλο όχι μόνο στη φλεγμονή, αλλά και στην ανοσοκαταστολή (Pillai et al., 2005). Αυτός και ο TNF- α έχουν πλειοτροπική δράση και μπορούν να ενεργοποιήσουν διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς στο δέρμα όπως τα κύτταρα του Langerhans (LCs, Langerhans Cells) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του δέρματος. Συγκεκριμένα, ο TNF- α επάγει μία σειρά δευτερογενών δράσεων όπως την έκφραση ενδοκυττάρων μορίων προσκολλησίσεως ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) και πολυάριθμων χημειοκινών (Albanesi et al., 2005). Όσον αφορά τον GM-CSF είναι ένας προφλεγμονώδης παράγοντας, αναγκαίος για την ανάπτυξη των DC καθώς και για τη ρύθμιση των λειτουργιών τους. Μαζί με την IL-6 διεγείρουν τη μιτογόνο δράση στα κερατινοκύτταρα και θεωρούνται αυτοκρινείς παράγοντες υπεύθυνοι για τον ενισχυμένο πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (Pastore et al., 2006). Άλλοι παράγοντες που εκλύονται από τα κερατινοκύτταρα είναι IL-1RA (IL-1 Receptor Antagonist), η μελανοτρόπος ορμόνη α -MSH (Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας NGF (Nerve Growth Factor) (Pillai et al., 2005). Οι ανωτέρω αυξητικοί παράγοντες παρέχουν μιτογόνο ερέθισμα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα νευρικά κύτταρα (Clydesdale et al., 2001). Επιπλέον, παρατηρείται ενεργοποίηση της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (iNOS) που οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις του μονοξειδίου του αζώτου NO (nitric oxide), το οποίο φαίνεται ότι παίζει ρόλο μεσολαβητή ή ανοσοτροποποιητή σε επαγόμενες από UV δερματικές αντιδράσεις όπως το ηλιακό έγκαυμα και φωτοεπαγόμενες ανοσολογικές αλλοιώσεις (Seo et al., 2002). Η ενεργοποίηση της iNOS φαίνεται ότι παίζει ρόλο και στην αγγειογένεση και την αυξημένη διαπερατότητα που προκαλείται από τον VEGF (Lu et al., 2012).

Στις βιοχημικές αλλαγές περιλαμβάνονται επίσης η απελευθέρωση ισταμίνης και η συσσώρευση προϊόντων αραχιδονικού οξέος (AA) (προσταγλανδίνες και

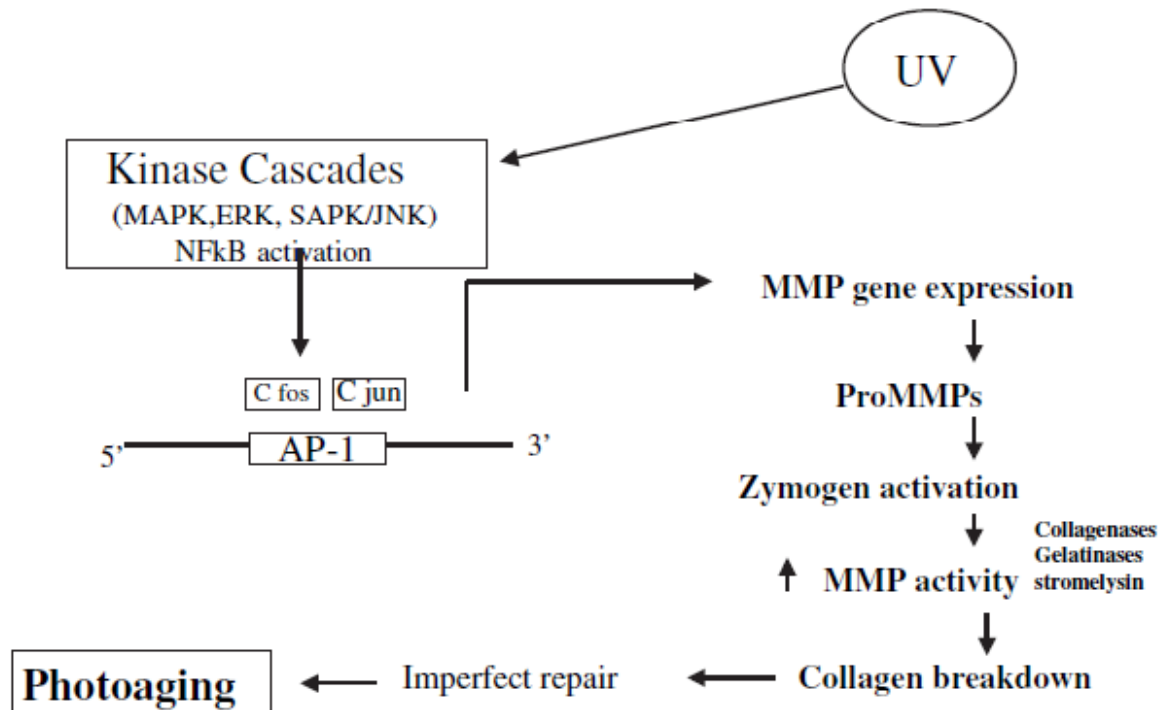
λευκοτριένια) από τη δράση κυκλοξυγονάσης COX και λιποξυγονάσης αντίστοιχα (Pillai et al., 2005). Το AA είναι πρόδρομος των προφλεγμονωδών εικοσανοειδών και η απελευθέρωσή του καταλύεται από την φωσφολιπάση A2 (PLA₂) (Huang et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί λοιπόν, αυξημένη δραστηριότητα της PLA₂ (Hruza and Pentland, 1993) και επαγωγή της COX-2 από τη UVA και από τη UVB με αποτέλεσμα την αυξημένη απελευθέρωση AA και κατά συνέπεια την αυξημένη παραγωγή προσταγλανδινών PGs (Svobodova et al., 2006), εκ των οποίων την υψηλότερη χημειοτακτική ικανότητα φέρει η PGE2 ενώ από τα λευκοτριένια, η LTB4 (Huang et al., 2004).

Μία σημαντική επιπλοκή της φλεγμονής είναι και ο τραυματισμός του ιστού και σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζουν οι πρωτεάσες που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα. Αναλυτικότερα, τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, PMN, εκκρίνουν ένζυμα όπως την ελαστάση, τη διάμεση κολλαγενάση MMP-1, και την καθεψίνη G (Pillai et al., 2005). Η ελαστάση είναι μία πρωτεάση σερίνης που απελευθερώνεται κατά τη διήθηση των ουδετεροφίλων στην επιδερμίδα και επάγει τον υπερπολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων *in vitro* και *in vivo*, πιθανότατα μέσω διέγερσης του TGF- α και της ενεργοποίησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR (Meyer-Hoffert et al., 2004).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMPs από την άλλη μεριά, είναι μία κατηγορία ενδοπεπτιδασών εξαρτημένων από ψευδάργυρο που συμμετέχουν στην αλλαγή και την αναδιαμόρφωση του χορίου (Brennan et al., 2003). Στο φυσιολογικό δέρμα τα επίπεδά τους διατηρούνται σε χαμηλές τιμές ενώ παραμένουν σε αδρανή κατάσταση, συνδεδεμένες με τους αναστολείς τους. Στο ανθρώπινο δέρμα εκφράζονται κυρίως τρεις κολλαγενάσες, οι MMP-1, -8 και -13. Αντίθετα, η UV ακτινοβολία και η φλεγμονή μπορούν να τις ενεργοποιήσουν και να οδηγήσουν σε αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM, Extracellular Matrix). Η δράση τους ρυθμίζεται κυρίως από ιστικούς ενδογενείς αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών τους TIMPs, αλλά η αποδόμηση του κολλαγόνου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απάντησης, της επούλωσης ενός τραυματισμού και της φωτογήρανσης ρυθμίζεται βάσει της διαμόρφωσης της έκφρασης των MMP από τις κυτοκίνες καθώς και από μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από τη UVR όπως τον NF- κ B και τους AP-1, -2 (**Εικόνα 5**) (Pillai et al., 2005).

Αναλυτικότερα, ο AP-1 ή διαφορετικά πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1, είναι ένα διμερές που σχηματίζεται από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα ογκογονίδια Fos και Jun. Ο AP-1, λοιπόν, συνδέεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή στο γονίδιο που εκφράζει την MMP και ενεργοποιεί την έκφρασή της (Mauviel, 1993), ενώ ο μηχανισμός με τον οποίο οι κυτοκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες Fos και Jun εμπλέκει τρεις διακριτές κατηγορίες κινασών: τις ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες MAPKs, τις ρυθμιζόμενες από

εξωκυττάριο ερέθισμα κινάσες ERKs και τις ενεργοποιημένες από στρες κινάσες SAPK/JNKs (Pillai et al., 2005).



Εικόνα 5. Ρύθμιση της έκφρασης των MMPs από τη UVR στο δέρμα

Πηγή: Pillai et al., 2005

2.4. Οξειδωτικό στρες

2.4.1 Οξειδωτικό στρες και UVR

Η έκθεση στη UVR έχει ως αποτέλεσμα, μεταξύ άλλων, και την συνεχή παραγωγή ROS σε κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες, οι οποίες απομακρύνονται άμεσα από μη ενζυματικά (ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλη, ουμπικινόνη και γλουταθειόνη-GSH) και ενζυμικά αντιοξειδωτικά (καταλάση, δεσμουτάση του υπεροξειδίου, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) που διατηρούν την προοξειδωτική-αντιοξειδωτική ισορροπία. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή ROS, που δημιουργούνται από την αντίδραση φωτονίων UV με ενδογενείς φωτοευαίσθητοποιητές στο δέρμα, μπορεί να υπερτερήσει της αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες. Η βλάβη μάλιστα του DNA είναι μία από τις κυριότερες συνέπειες των UV επαγόμενων οξειδωτικών διεργασιών (Cadet et al., 2001). Σε σχέση με τη UVB, η UVA έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στη διατάραξη της προοξειδωτικής-αντιοξειδωτικής ισορροπίας επάγοντας ROS/RNS που καταστρέφουν το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια

αλλά συγχρόνως οδηγούν σε ελάττωση του NADH κι έτσι σε εξάντληση των αναγωγικών αποθεμάτων του κυττάρου (Halliday, 2005). Η υπέρβαση των ελεύθερων ριζών οδηγεί σε έναν καταρράκτη μηνυμάτων που οδηγούν σε μια προοδευτική αλλαγή στην κυτταρική δομή και λειτουργία που με τη σειρά τους καταλήγουν στη διαφοροποίηση νεοπλασματικών ιστών. Οι ROS/RNS επάγουν ποικίλους τύπους οξειδωτικών αλλοιώσεων στο DNA που παίζουν σημαντικό ρόλο στο αρχικό στάδιο καρκινογένεσης.

Η UV ακτινοβολία προκαλεί οξειδωτική βλάβη με δύο μηχανισμούς: τον Τύπο 1 (μεταφορά ηλεκτρονίου) και τον Τύπο 2 που εξαρτάται από ένα φωτοευαισθητοποιητή. Στη δεύτερη περίπτωση, μεταφέρεται ενέργεια από το διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο και παράγεται $^1\text{O}_2$ με μακρά διάρκεια ζωής, ικανό να αλληλεπιδράσει με μόρια του κυττάρου. Η μεταφορά ηλεκτρονίου στο οξυγόνο οδηγεί στη δημιουργία υπεροξειδικού ανιόντος $\text{O}_2^{\cdot-}$ το οποίο μετατρέπεται σε H_2O_2 , πρόδρομο της εξαιρετικά τοξικής ρίζας υδροξυλίου $\text{OH}^{\cdot}$ (Trautinger F. 2001).

Αυτά τα υψηλής δραστηριότητας, βραχύβια μόρια προκαλούν θραύσεις μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA (single or double strand DNA), διασταυρούμενες ενώσεις και τροποποιήσεις των νουκλεοτιδικών βάσεων. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις όπως τη μεταστροφή της γουανίνης σε θυμίνη που παρατηρείται συχνά σε καρκίνο του δέρματος. Λόγω χαμηλής ενέργειας ιονισμού, η γουανίνη είναι πιο επιρρεπής στη οξείδωση σε σχέση με την αδενίνη που έρχεται δεύτερη και με τις πυριμιδίνες, κυτοσίνη και θυμίνη. Τα κύρια ενδιάμεσα που προκύπτουν από την αντίδραση Τύπου 1 είναι κατιονικές ρίζες που υφίστανται ραγδαία ενυδάτωση ή αποπρωτονίωση. Υπό συνθήκες αναγωγής η ρίζα μετατρέπεται σε 2,6-διαμινο-4υδροξυ-5-φορμαμιδογουανίνη ενώ υπό οξειδωτικές συνθήκες π.χ. παρουσία μοριακού οξυγόνου, μετατρέπεται σε 8-οξο-7,8-διυδρο-2-δεοξυγουανίνη. Η αποπρωτονίωση οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων που καταλήγουν στην παραγωγή ενός σταθερού προϊόντος, της οξαζολόνης. Όσον αφορά την αντίδραση Τύπου 2, τα κύρια ενδιάμεσα είναι ενδοϋπεροξειδία που προκύπτουν από αντίδραση του ιμιδαζολικού δακτυλίου με δραστηκή μορφή οξυγόνου. Οι τροποποιήσεις των νουκλεοτιδικών βάσεων απαντούν συχνότερα μετά από έκθεση σε UVA σε σχέση με τη σχάση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας ή τις διασταυρούμενες διασυνδέσεις του DNA (Svobodova et al., 2006).

Εκτός από τις αλλαγές στο πυρηνικό DNA, αλλοιώσεις μπορούν να προκληθούν και στο μιτοχονδριακό DNA. Σε αυτή την περίπτωση, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης είναι λιγότερο αποτελεσματικός και για το λόγο αυτό οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται με σχετικά ταχύ ρυθμό. Οι μέχρι τώρα μεταλλάξεις που έχουν προσδιοριστεί είναι κυρίως απαλοιφές οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν την ικανότητα του κυττάρου για οξειδωτική φωσφορυλίωση (Pinnell, 2003).

Οι ROS προκαλούν ακόμα βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες, μέσω υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της φωσφολιπιδικής βιολογικής μεμβράνης. Κατά τη διαδικασία αυτή σχηματίζονται μονοϋδροϋπεροξειδία λιπιδίων και ελεύθερες ρίζες. Τα υπεροξειδία των λιπιδίων έχουν σχετικά μεγάλη διάρκεια ζωής και επάγουν αλυσιδωτές αντιδράσεις που ενισχύουν την οξειδωτική βλάβη. Επιπλέον, οι επαγόμενες από UV ROS αντιδρούν και με τα αμινοξέα, οδηγώντας στην τροποποίηση πρωτεϊνών στον ιστό και σχηματίζοντας καρβονυλικά παράγωγα (Svobodova et al., 2006).

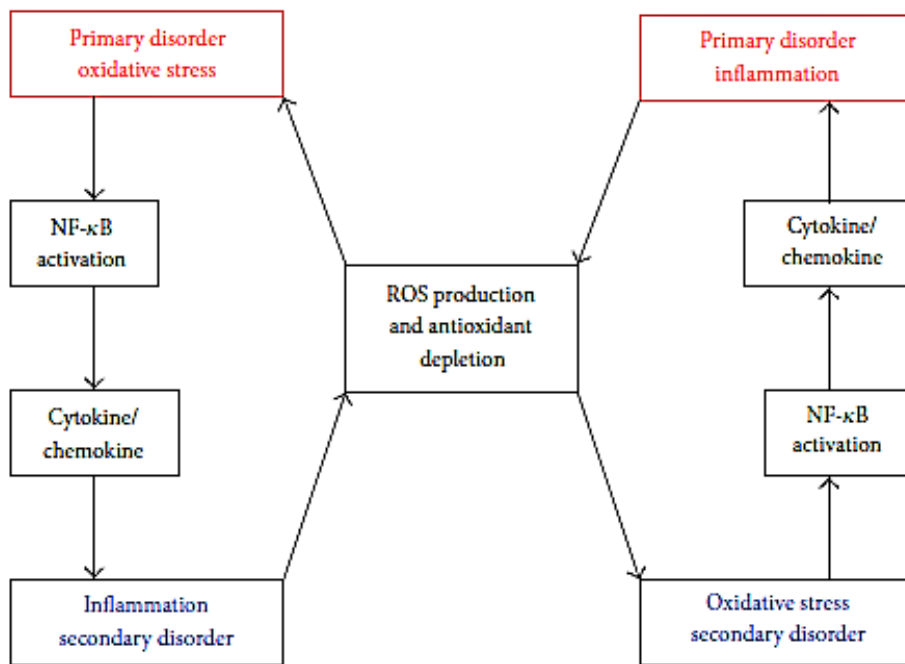
2.4.2. Οξειδωτικό στρες και φλεγμονή

Οι ROS παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής καθώς αποτελούν κι αυτές μέρος της άμυνας του οργανισμού για την καταστροφή του μολυσματικού παράγοντα. Μάλιστα η σχέση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες είναι αμφίδρομη, καθώς η πρώτη μπορεί να επάγει το δεύτερο και αντίστροφα (**Εικόνα 6**) (Biswas, 2016). Καταρχήν, τα λευκοκύτταρα που εμπλέκονται στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης παρουσιάζουν συγχρόνως αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου που ονομάζεται «αναπνευστική έκρηξη» (respiratory burst). Κατά τη φάση αυτή παράγονται πολλές ελεύθερες ρίζες, καθώς και άλλες σχετικές με το οξυγόνο τοξικές ενώσεις, εκ των οποίων και το πολύ τοξικό υποχλωριώδες οξύ (HOCL) που η σύνθεσή του καταλύεται από μυελοϋπεροξειδάσες (Huang et al., 2004). Ένας ακόμη ρόλος τους είναι η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως αυτή του NF-κΒ. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στη σύνθεση των προφλεγμονωδών ιντερλευκινών και του TNF-α προωθώντας τη κυτταρική νέκρωση και την απόπτωση (Zhan et al., 2016) ενώ συγχρόνως ρυθμίζει την απελευθέρωση μορίων προσκόλλησης όπως των ICAM-1, CD11b και CD18 (Fratice et al., 1996).

Το οξειδωτικό στρες διενεργεί επίσης, σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) που οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου φλεγμονοσώματος. Το φλεγμονόσωμα είναι ένα πρωτεϊνικό μοριακό σύμπλεγμα που διεγείρει τη φυσική ανοσία και ενεργοποιεί την ωρίμανση και τα μονοπάτια έκκρισης της IL-1β και της IL-18. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης μπορεί να περιλαμβάνει είτε ROS που απελευθερώνονται από μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί βλάβη είτε οξείδωση του μιτοχονδριακού DNA (Biswas, 2016).

Επιπλέον, η αλλαγή νουκλεοτιδικών βάσεων επαγόμενη από ROS φαίνεται ότι είναι σημαντική για την πρόκληση φλεγμονής. Για παράδειγμα, το σύστημα εκτομής-επιδιόρθωσης νουκλεοτιδίων μπορεί να επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν σε ενεργοποίηση του NF-κΒ (Biswas, 2016). Επίσης, ένα παράγωγο αραχιδονικού οξέος που αποτελεί και δείκτη οξειδωτικού στρες, το ισοπροστανό-8, έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την έκφραση της IL-8 στα μακροφάγα μέσω

ενεργοποίησης των MAP κινασών (Scholz et al., 2003). Ο μηχανισμός ενεργοποίησης δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητός, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες λειτουργούν με τρεις τρόπους: α) επαγωγή ανεξάρτητης συναρμοτή συσπείρωσης και ενεργοποίησης μεμβρανικών υποδοχέων όπως τον EGFR, β) απενεργοποίηση των φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν τις MAP κινάσες και γ) τροποποίηση της πρωτεϊνικής δομής των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης και των MAPK οδηγώντας σε μη αναστρέψιμη ενεργοποίησή τους (Fuller, 2015).



Εικόνα 6. Αμφίδρομη σχέση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες
Πηγή: Biswas, 2016

2.4.3. Βιοχημικοί δείκτες αξιολόγησης αντιοξειδωτικής ικανότητας του ιστού

Γενικά, οι μέθοδοι για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της ποσοτικοποίησης των χαμηλού μοριακού βάρους μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών είναι η απορρόφηση σε υπεριώδη μήκη κύματος UV, αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (GS-MS) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (Kohen and Gati, 2000). Ως γνωστόν, το δέρμα είναι εξοπλισμένο τόσο με ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, η συγκέντρωση των οποίων είναι σημαντικά υψηλότερη στην επιδερμίδα σε σχέση με το χόριο. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι η επιδερμίδα είναι περισσότερο εκτιθέμενη σε εξωγενείς πηγές οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα να έχει εξελίξει σε μεγαλύτερο βαθμό την αντιοξειδωτική της άμυνα (Dreher, 2017).

2.4.3.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα του δέρματος και UVR

Η δεσμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase, SOD) ανήκει στα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην ομοιοστάση των δραστικών μορφών οξυγόνου στην επιδερμίδα, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στον έλεγχο της γήρανσης και της πρόκλησης καρκίνου. Ειδικότερα, καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Απαντά σε τρεις ισομορφές: την κυτταροπλασματική SOD1, τη μιτοχονδριακή SOD2 και την εξωκυττάρια SOD3 (Kurahashi and Fujii, 2015). Πολλές μελέτες έχουν υποδείξει μείωση της δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου μετά από έκθεση σε UVA/UVB. Παρόλα αυτά, μονές και επαναλαμβανόμενες δόσεις μόνο UVA ακτινοβολίας ανθρώπινων ινοβλαστών *in vitro* οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της SOD3 σε πρωτεϊνικό και mRNA επίπεδο κι αυτή η επαγωγή προσέφερε σημαντική προστασία έναντι της κυτταροτοξικής δράσης της ακτινοβολίας (Afaq and Mukhtar, 2001). Αντίστοιχα, η ακτινοβόληση ανθρώπινων κερατινοκυττάρων με UVB υπέδειξε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της SOD1 (Svobodova et al., 2006).

Άλλο ένα ένζυμο είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) που στο ενεργό της κέντρο φέρει σελήνιο και καταλύει την αναγωγή του επαγόμενου από τη UVR H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη (GSH) ως συνυπόστρωμα. Η δραστηριότητά της δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα από την UVR ενώ συγχρόνως θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά του αμυντικού μηχανισμού στο δέρμα (Afaq and Mukhtar, 2001).

Τέλος, η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Η δραστηριότητά της μειώνεται αισθητά μετά από έκθεση σε UVA/UVB. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μη αναστρέψιμη οξείδωση του ενζύμου (Svobodova et al., 2006).

2.4.3.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Η κατηγορία αυτή διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες, τα λιπόφιλα όπως τα ομόλογα της βιταμίνης E (τοκοφερόλη και τοκοτριενόλη) και τα υδρόφιλα. Σε μοριακή βάση, τα υδρόφιλα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβανομένων του ασκορβικού οξέος, της γλουταθειόνης, GSH και του ουρικού οξέος είναι τα κυρίαρχα αντιοξειδωτικά στο δέρμα. Αξιοπερίεργο είναι το γεγονός ότι ενώ η βιταμίνη E βρίσκεται σε ίδια ποσοστά στην κεράτινη στιβάδα και τις κατώτερες στιβάδες της επιδερμίδας, τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό και το ουρικό οξύ εμφανίζονται σε μικρότερη συγκέντρωση στην κεράτινη στιβάδα σε

σχέση με τις υπόλοιπες, κάτι που πιθανότατα οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό της πρώτης (Dreher, 2017).

Το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς Βιταμίνη C καθώς είναι υδατοδιαλυτό, βρίσκεται στα υδατικά διαμερίσματα των κυττάρων. Όταν το δέρμα έρχεται σε επαφή με UVR, αρχίζει η παραγωγή ROS όπως προαναφέρθηκε. Προστατεύει, λοιπόν, το δέρμα προσφέροντας διαδοχικά ηλεκτρόνια, ώστε να εξουδετερωθούν οι ελεύθερες ρίζες ενώ είναι το ίδιο αποτελεσματικό τόσο απέναντι στη UVA όσο και τη UVB. Οι οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος είναι σχετικά αδρανείς. Επιπλέον, η επαναφορά στην κανονική του μορφή καταλύεται από την αναγωγή του δεϋδροασκορβικού οξέος παρουσία γλουταθειόνης. Έχει παρατηρηθεί η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του ασκορβικού οξέος στο δέρμα, ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (Telang, 2013). Εκτός από αντιοξειδωτική δράση, εμφανίζει επίσης και αντιφλεγμονώδη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι εμποδίζει την ενεργοποίηση του TNF- α από τον παράγοντα NF- κ B μέσω αναστολής της φωσφορυλίωσης της I κ B (Huang et al., 2004), καθώς και μέσω ενεργοποίησης της p38 MAP κινάσης (Bowie and O'Neill, 2000).

Η γλουταθειόνη λειτουργεί ως ρυθμιστής οξειδοαναγωγών και προστατεύει τα κύτταρα από την τοξικότητα ενδογενών και εξωγενών ηλεκτρονιοφίλων ενώσεων. Σε όλους τους τύπους κυττάρων συναντάται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.5 και 10mM (Lushchak, 2012). Επιπλέον, αποτελεί συμπαραγοντα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ενώ τρανσφεράσες της γλουταθειόνης καταλύουν τη σύζευξή της με τοξικές ενώσεις, σχηματίζοντας υδατοδιαλυτά προϊόντα μειωμένης τοξικότητας (Schafer and Werner, 2008).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση της UVR στα αντιοξειδωτικά του δέρματος κι έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία, αν και τα αποτελέσματα ποικίλουν. Παραδείγματος χάριν, σε καλλιεργούμενο μοντέλο ανθρώπινου δέρματος, το ασκορβικό και το ουρικό οξύ ήταν λιγότερο επιρρεπή στη UVR σε σύγκριση με την α -τοκοφερόλη ή την ουμπικινόνη-10 (Podda et al., 1998). Όμως, σε μελέτη που διεξήχθη σε άτριχους μύες διαπιστώθηκε η μείωση των επιπέδων ασκορβικού σε χαμηλότερη ερυθματώδη δόση ακτινοβολίας σε σύγκριση με τη δόση που απαιτήθηκε για τη μείωση των λιπόφιλων αντιοξειδωτικών ή της γλουταθειόνης (Dreher, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑ

3.1. Διαβήτης, η ασθένεια

Ο σακχαρώδης διαβήτης (diabetes mellitus, DM) είναι μία χρόνια και συστηματική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και σοβαρές επιπλοκές όπως αμφιβληστροπάθεια, νευροπάθεια και νεφροπάθεια. (American Diabetes Association 2013). Οι διαβητικοί διαιρούνται σε δύο ομάδες ανάλογα με τις ανάγκες τους σε ινσουλίνη: στον ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη Τύπου 1 και τον μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη Τύπου 2. Ο δεύτερος σχετίζεται με την παχυσαρκία και την αντοχή στην ινσουλίνη (Zimmet et al., 2001).

3.2. Δομικές αλλοιώσεις δέρματος

Το δέρμα επηρεάζεται ποικιλοτρόπως στο σακχαρώδη διαβήτη. Οι πιο σοβαρές δερματικές αλλοιώσεις που συναντώνται είναι τα χρόνια έλκη που δημιουργούνται ως συνέπεια της ατελούς επούλωσης του διαβητικού δέρματος (Falanga, 2005). Είναι πολύ εύκολο να προσβληθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς και πολλές φορές μπορεί να οδηγήσουν ακόμα και σε ακρωτηριασμό (Brem and Tomic-Canic, 2007). Η συνοσηρότητα μάλιστα αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης στο σακχαρώδη διαβήτη, ακόμα κι αν είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η επίδραση της (Quondamatteo, 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αυξημένα επίπεδα του *Staphylococcus aureus* σε ακέραιες περιοχές του πέλματος ενός διαβητικού ασθενή σε σχέση με έναν υγιή (Redel et al. 2013). Έτσι προκύπτει το ερώτημα αν ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με βλάβη στον επιδερμικό φραγμό, κάτι που εκφράζεται και με τη μέτρηση της TEWL (Transepidermal Water Loss). Η TEWL ή αλλιώς άδηλη απώλεια νερού είναι ένα απλό μέτρο της ποσότητας του νερού που διέρχεται από τα βαθύτερα στρώματα του δέρματος μέσω της επιδερμίδας στην ατμόσφαιρα με εξάτμιση και διάχυση. Η δυσλειτουργία του φραγμού του δέρματος παρουσιάζεται με αυξημένη τιμή της TEWL. Η μέθοδος λήψης της TEWL για τη λειτουργία φραγμού έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από τρεις δεκαετίες και μπορεί να εφαρμοστεί όχι μόνο στο δέρμα των ζώων αλλά και στο ανθρώπινο δέρμα. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής για τη μέτρηση αυτή, η τιμή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη θέση του ανιχνευτή ενώ τόσο η θερμοκρασία περιβάλλοντος όσο και η υγρασία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μέτρηση. Πρέπει να τονιστεί ότι αντικατοπτρίζει τη λειτουργία του φραγμού από μέσα προς τα έξω και όχι το ανάποδο (Natsuga, 2014). Σύμφωνα με τον Sakai και τους συνεργάτες του πάντως, η διαβητική κατάσταση δε φαίνεται να προκαλεί αύξηση της άδηλης απώλειας νερού. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η μειωμένη ενυδάτωση

που εμφανίζεται στο δέρμα συσχετίζεται με την υψηλή γλυκόζη του πλάσματος και όχι με αύξηση της TEWL, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η αφυδάτωση σχετίζεται με την κατάσταση της υπεργλυκαιμίας αλλά όχι με βλάβη του επιδερμικού φραγμού. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν μία μείωση της TEWL σε αντιστοιχία με υψηλά επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι αυτό οφείλεται στις επιπτώσεις της γήρανσης και ότι είναι ανεξάρτητη του DM. Τέλος συσχέτισαν τις λιπιδικές μεταβολές της κεράτινης στιβάδας με τη γήρανση ενώ τόνισαν ότι η αφυδάτωση που παρατηρείται ούτως ή άλλως στη γήρανση, επιταχύνεται από την υπεργλυκαιμία και τις μεταβολές στο σμήγμα. (Sakai et al., 2005). Ωστόσο αυτή η άποψη αντικρούεται από μελέτη όπου παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του σμήγματος στο μέτωπο διαβητικών ασθενών χωρίς αντίστοιχη μεταβολή της ενυδάτωσης (Seirafi et al., 2009). Παρά τις διαφορές τους, κι από τις δύο αυτές μελέτες προκύπτει ότι σε ακέραιο διαβητικό δέρμα δεν υπάρχει μεταβολή της TEWL. Ωστόσο, το 2011 ο Park και οι συνεργάτες του παρατήρησαν δομικές αλλοιώσεις και μεταβολές που θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικές ενός ελαττωματικού επιδερμικού φραγμού. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση στα πεταλιώδη σωμάτια και στα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας, αξιοσημείωτη μείωση στη σύνθεση της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων καθώς και μια αντίστοιχη μείωση στην έκφραση των ενζύμων περιορισμού του ρυθμού σύνθεσης των λιπιδίων της επιδερμίδας. Στα ευρήματα προστίθεται και η μείωση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Park et al., 2011). Συνεπώς υποδηλώνεται δυσλειτουργία του επιδερμικού φραγμού, βλάβη που μπορεί να υπάρχει, ακόμα και απουσία αυξημένης TEWL. Μία πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι η αιματική κυκλοφορία, η οποία ενώ υπό κανονικές συνθήκες αποτελεί κινητήρια δύναμη της εξάτμισης του νερού, στο διαβητικό δέρμα είναι περιορισμένη και δεν την υποβοηθάει, με αποτέλεσμα να μη γίνεται αντιληπτή μέσω της μεταβολής της TEWL (Quondamatteo, 2013). Όσον αφορά το πάχος της επιδερμίδας και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων οι απόψεις διίστανται. Σε αρουραίους με διαβήτη Τύπου 2 δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στο πάχος της επιδερμίδας (Park et al., 2011) ενώ σε μύες με διαβήτη Τύπου 1 επαγόμενο από στρεπτοζοτοκίνη STZ παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ το πάχος της επιδερμίδας παρουσίασε μείωση (Chen et al. 2010). Σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM, Extracellular Matrix) που βασίζονται κυρίως σε αλλαγές στο κολλαγόνο και στον σχηματισμό τελικών προϊόντων προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης AGEs. Συμβάλλουν στη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών με ενδοπρωτεϊνικούς ή διαπρωτεϊνικούς διασταυρούμενους δεσμούς (cross links) μεταξύ ίδιων ή διαφορετικών πρωτεϊνών μεταβάλλοντας τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Επειδή στη θέση γλυκοζυλίωσης συναντάται το αμινοξύ λυσίνη, τα μόρια κολλαγόνου που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα υπολοίπων λυσίνης θεωρούνται ιδανικοί στόχοι. Μελετήθηκε, λοιπόν, η συμπεριφορά εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM, Extracellular Matrix) με

γλυκοζυλιωμένο κολλαγόνο και διαπιστώθηκε ότι είναι πιο άκαμπτη, μηχανικά υποδεέστερη και πιο εύθραυστη σε σχέση με την αντίστοιχη φυσιολογικού κολλαγόνου (Liao et al., 2009). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί μείωση του προκολλαγόνου 1 σε διαβητικούς ασθενείς και αταξία των δεσμίδων κολλαγόνου σε διαβητικούς ασθενείς με έλκος ενώ έχει επίσης διαπιστωθεί μία μείωση στο λόγο κολλαγόνο I/III. Τέλος, η απορρύθμιση μηχανισμών μεταγραφής καθώς και η εναπόθεση εύθραυστων ινιδίων κολλαγόνου στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ενισχύουν την άποψη της μειωμένης μηχανικής σταθερότητας του διαβητικού δέρματος (Quondamatteo, 2013).

3.3. Διαβήτης και οξειδωτικό στρες

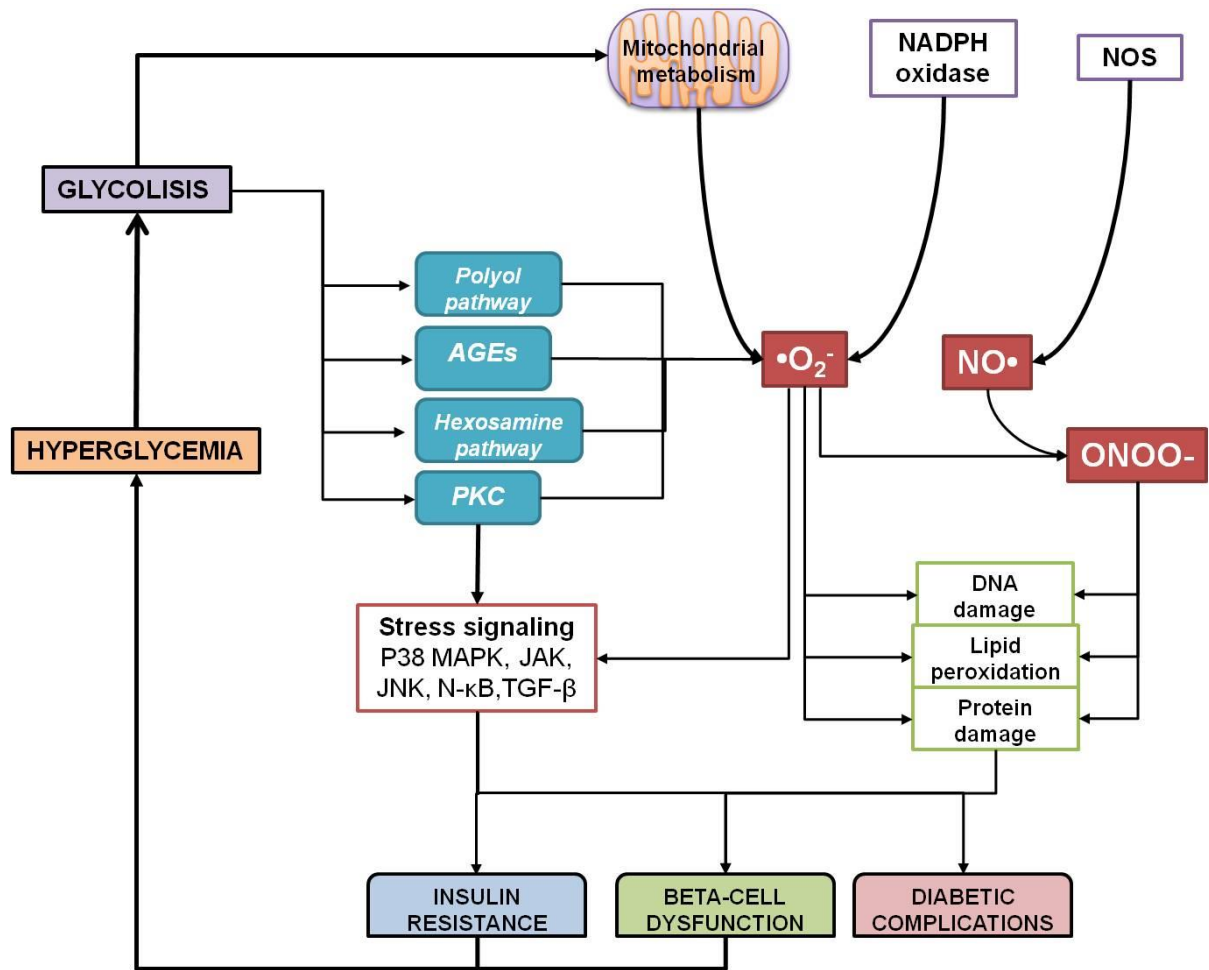
Είναι γνωστό ότι η υπεργλυκαιμία, από τη μία πλευρά επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και από την άλλη βλάπτει την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα των διαβητικών ασθενών. Παράλληλα, έχουν παρατηρηθεί βιοδείκτες λιπιδικής και πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης σε αυξημένα ποσοστά και στους δύο τύπους διαβήτη, φαινόμενα που διενεργούν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση επιπλοκών όπως αυτή της αθηροσκλήρωσης.

Γενικά, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και οι λιποπρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στη δράση των ελευθέρων ριζών λόγω των πολλαπλών διπλών δεσμών τους. Πολλές μελέτες λοιπόν, έχουν αναφερθεί σε αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL, oxLDL, σε διαβητικούς ασθενείς, η οποία επιδρά στα αγγειακά τοιχώματα διεγείροντας την παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, καθώς κι αναστέλλοντας την αγγειοδιασταλτική δράση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Matough et al., 2012).

Ένας ακόμα μηχανισμός που οδηγεί σε αγγειακές βλάβες στην περίπτωση του διαβήτη αφορά το μεταβολισμό τα γλυκόζης από την αναγωγή της αλδόζης. Το ένζυμο αυτό ανάγει τη γλυκόζη σε φρουκτόζη μέσω NADPH, παράγοντα που απαιτείται για την αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης. Συνεπώς, η αυξημένη κατανάλωση NADPH οδηγεί σε εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Giacco and Brownlee, 2010).

Σημαντικό ρόλο διενεργεί και η ενδοκυτταρική παραγωγή πρόδρομων AGEs που μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα με τρεις γενικούς μηχανισμούς. Πρώτον, ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες τροποποιούνται από τα AGEs, αλλάζοντας με τον τρόπο αυτό τη λειτουργία τους. Δεύτερον, συστατικά εξωκυττάρια θεμέλια ουσίας τροποποιημένα από πρόδρομα μόρια των AGEs αλληλεπιδρούν ασυνήθιστα με άλλα συστατικά της θεμέλιας ουσίας και υποδοχείς της (ιντεγκρίνες) που

εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Τέλος, πρωτεΐνες του πλάσματος κι αυτές λόγω τροποποίησης τους συνδέονται με υποδοχείς των AGEs σε κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειακά κύτταρα λείων μυών. Η σύνδεση με τους υποδοχείς επάγει την παραγωγή ROS, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ, προκαλώντας πολλαπλές παθολογικές αλλαγές στην έκφραση γονιδίων (Goldin et al., 2006). (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Επαγωγή οξειδωτικού στρες από υπεργλυκαιμία

Πηγή: M. Lazo-de-la-Vega-Monroy and C. Fernández-Mejía, 2013

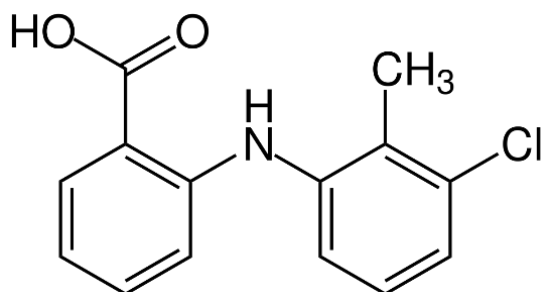
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

4.1. Αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Γενικά τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) επιδρούν στη φλεγμονώδη διεργασία και ανεξάρτητα από τον παθογενετικό μηχανισμό της, επιτυγχάνουν την υποχώρηση των φλεγμονωδών φαινομένων. Ο τρόπος δράσης τους δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά στα περισσότερα από αυτά σχετίζεται με την αναστολή στη σύνθεση των προσταγλανδινών μέσω αναστολής του ενζύμου COX. Αυτό συναντάται σε δύο ισομορφές: COX-1 και COX-2. Η πρώτη περιγράφεται ως ένζυμο «συντήρησης» και συμμετέχει στις φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου όπως τη γαστρική κυταροπροστασία και τη λειτουργία των νεφρών και των αιμοπεταλίων. Συνεπώς, η μειωμένη παραγωγή προσταγλανδινών στα παραπάνω όργανα έχει ως επακόλουθο την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Αντίθετα, η COX-2 είναι επαγόμενη πρωτεΐνη που η έκφρασή της αυξάνει κυρίως στη φάση της φλεγμονής. Δευτερευόντως, τα ΜΣΑΦ δρουν επιδρώντας στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, αναστέλλοντας τη μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων, σταθεροποιώντας τις μεμβράνες των λυσοσωματίων και αναστέλλοντας τη σύνθεση λευκοτριενίων μέσω αδρανοποίησης του κύκλου της λιποοξυγονάσης (Howland et al., 2006).

4.1.1. Τολφαιναμικό οξύ

Το τολφαιναμικό οξύ είναι παράγωγο του ανθρανιλικού οξέος και ανήκει στις φαιναμάτες. Δρα μέσω αναστολής της σύνθεσης προσταγλανδινών και λευκοτριενίων ως αναστολέας της COX-2. Οι εκλεκτικοί αναστολείς της COX-2 αποτελούν μία νέα τάξη φαρμάκων με αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα παρόμοια των συμβατικών NSAIDs, αλλά με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες (Kay-Mugford et al., 2000). Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας έχουν κυρίως αναλγητική και αντιπυρετική δράση και σε μικρότερο βαθμό αντιφλεγμονώδη (**Εικόνα 8**).



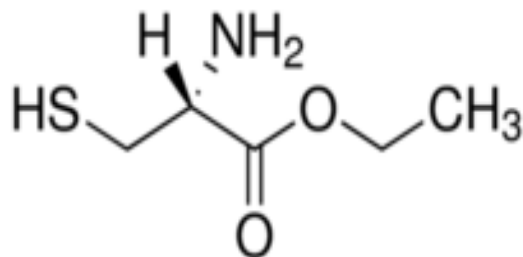
Εικόνα 8. Δομή τολφαιναμικού οξέος.

4.2. Αντιοξειδωτικά

4.2.1. Αιθυλεστέρας Κυστεΐνης.

Ουσίες που φέρουν σουλφυδρυλική ομάδα θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά εξ αιτίας της υψηλής δραστηριότητας της θειόλης έναντι των ελεύθερων ριζών. Αυτή η δραστηριότητα, πιθανότατα οφείλεται στην χαμηλή ενέργεια ιονισμού του θείου σε σχέση με αυτή άλλων ατόμων (Miura et al., 2014). Επιπλέον οι ενώσεις θειόλης βρίσκονται ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σε υψηλές συγκεντρώσεις και αντιδρούν με υποαλογονώδη οξέα που παράγονται από μυελοϋπεροξειδάσες (MPO). Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τις οξειδοαναγωγικές ρυθμιστικές λειτουργίες των βιολογικών θειολών (biothiols) όπως της Κυστεΐνης, της ομοκυστεΐνης, της γλουταθειόνης και άλλων πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε διάφορα βιολογικά συστήματα. Οι θειόλες αυτές είναι σαρωτές ελεύθερων ριζών με σειρά δραστηριότητας Κυστεΐνη>Ομοκυστεΐνη>Γλουταθειόνη υποδηλώνοντας ότι η δράση οφείλεται κυρίως στα θειολικά ιόντα (thiolate ions) ενώ η δραστηριότητα μειώνεται καθώς αυξάνεται η pKa της θειόλης. Αν και είναι λιγότερο δραστικές από το ασκορβικό οξύ, έχουν πιο ισχυρή δράση από το ουρικό. Συγκεκριμένα η κυστεΐνη είναι ένα αμινοξύ ενώ αποτελεί και κύριο συστατικό αυτών των θειολών (Takashima et al., 2012). Παράγωγο κυστεΐνης όπως η N-Ακέτυλοκυστεΐνη, μετά από τοπική χορήγηση, παρουσίασε αποτελεσματική προστασία ενάντια στη λιπιδική υπεροξείδωση, την κυτταροτοξικότητα και την απόπτωση που προκλήθηκαν από UV ακτινοβολία δέρματος χοίρου ex vivo ενώ σε τοπική εφαρμογή παρατηρήθηκε και αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης, (GSH) με αντίστοιχη μείωση της οξειδωμένης μορφής της (GSSG) (Dreher, 2017).

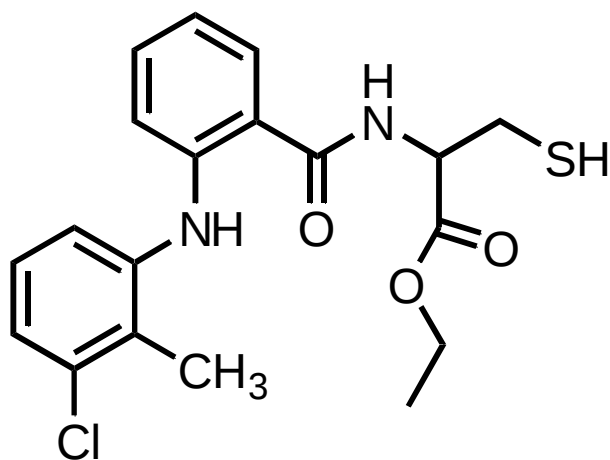
Το 2014, ο Yukari Miura και οι συνεργάτες του σχεδίασαν παράγωγα της κυστεΐνης βασιζόμενοι στις τροποποιήσεις αμινομάδων και καρβοξυλομάδων στη β-θέση της ομάδας της -SH. Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε και συγκρίθηκε η ανασταλτική δράση των παραγώγων στην οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε άνυδρο περιβάλλον και φάνηκε ότι την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση την παρουσίασε ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης (**Εικόνα 9**) (Miura et al., 2014).



Εικόνα 9. Δομή του αιθυλεστέρα της κυστεΐνης.

4.3. Παράγωγο τολφαιναμικού οξέος

Παρόλο που τα γνωστά αντιφλεγμονώδη φάρμακα έχουν ως στόχο την αναστολή σύνθεσης των προσταγλανδινών, μέσω αναστολής του ενζύμου της κυκλοοξυγονάσης αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές αντιοξειδωτικές ενώσεις παρουσιάζουν επίσης αντιφλεγμονώδη δράση. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του γαστρεντερικού έλκους (gastrointestinal ulceration), μίας από τις πιο κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες των NSAIDs. Ως εκ τούτου, θεωρείται ενδιαφέρων ο σχεδιασμός μορίων που να συνδυάζουν «κλασσικές» αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες με αντιοξειδωτική δράση. Η δομική τροποποίηση (χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά η αντιφλεγμονώδης δράση) των γνωστών NSAIDs (Ινδομεθακίνη, δικλοφενάκη, τολφαιναμικό οξύ, και ιβουπροφαίνη), η ενσωμάτωση ενός αντιοξειδωτικού τμήματος (Κυστεαμίνη) και ταυτόχρονα η κάλυψη της καρβοξυλικής λειτουργίας αυτών των φαρμάκων, αποσκοπούν σε μια ενισχυμένη αντιφλεγμονώδη δράση μέσω πολλαπλών μηχανισμών, καθώς και σε μειωμένη ελκογενή δραστηριότητα (**Εικόνα 10**). Συνεπώς, η αμιδοποίηση των όξινων ΜΣΑΦ οδηγεί σε ενεργούς αναστολείς της COX με μειωμένο γαστρεντερικό ερεθισμό (Kourounakis et al., 1999), (Kourounakis et al., 2000), (Galanakis et al., 2004).



Εικόνα 10. Δομή παραγώγου τολφαιναμικού οξέος 2-[2-(3-χλωρο-2-μεθυλφαινυλαμινο) βενζαμιδο]-3-μερκαπτοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (AK1).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η φλεγμονή (και η επιδιωκόμενη αναστολή της) είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που αναπτύσσεται μέσω ποικιλίας μηχανισμών και μεσολαβητών μόνο σε ζώντες οργανισμούς. Η ανάπτυξη ενός νέου φαρμακομορίου ως αντιφλεγμονώδες για τοπική χρήση προϋποθέτει την αποτελεσματικότητά του *in vivo* καθώς και την αξιολόγησή του σε σχέση με γνωστά αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ή ενώσεις αναφοράς).

Παρόλη την θεωρητικά ευεργετική δράση που θα μπορούσε να έχει ένα ΜΣΑΦ σε φλεγμονή του δέρματος, η χρήση τους έως τώρα δεν ενδείκνυται λόγω δερματικής τοξικότητας (ερεθιστικότητα). Η συγκεκριμένη πειραματική μελέτη της παρούσας εργασίας έχει ως στόχο τη διερεύνηση της τοπικής δράσης ενός νέου αντιφλεγμονώδους παραγώγου του τολφαιναμικού οξέος (AK1) που εμφανίζει μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με το πρόδρομο ΜΣΑΦ (τολφαιναμικό οξύ) (Galanakis et al., 2004). Αρχικά θα επιλεγθεί η δόση στην οποία το φαρμακομόριο παρουσιάζει τη μέγιστη θεραπευτική του δράση ενώ στη συνέχεια θα συγκριθεί η δράση του σε σχέση με τα δύο μητρικά του μόρια. Η συγκεκριμένη μελέτη περιλαμβάνει ένα ζωικό πρότυπο ήπιας φλεγμονής (επαγόμενο από UV ακτινοβολία) που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επίδρασης αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ουσιών στο δέρμα μετά από τοπική εφαρμογή. Οι ενώσεις υπό εξέταση αξιολογούνται ως προς την οξεία αντιφλεγμονώδη δράση τους μέσω της εκτίμησης της ικανότητάς τους να συμβάλουν στην γρήγορη και πιο αποτελεσματική επούλωση εγκαυμάτων (επαγόμενων από UV ακτινοβολία) πρώτα σε φυσιολογικό δέρμα και δεύτερον σε διαβητικό δέρμα ζωικού προτύπου. Ως γνωστό, ο διαβήτης είναι μια πολυσυστηματική διαταραχή με επιπλοκές που μεταξύ άλλων παρεμποδίζουν τη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία. Χαρακτηριστικά, η πληγή σε διαβητικό δέρμα παρουσιάζει μία παρατεταμένη φάση φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από συνεχή εισροή ουδετερόφιλων, τα οποία απελευθερώνουν κυτταροτοξικά ένζυμα, ελεύθερες ρίζες και φλεγμονώδεις παράγοντες, επάγοντας οξειδωτικό στρες και εκτεταμένη βλάβη. Επομένως, ο περιορισμός αυτών καθώς και η αντιμετώπιση της παρατεταμένης φλεγμονώδους φάσεως μέσω ενός αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικού παράγοντα χωρίς τοπική τοξικότητα αποτελεί μία σημαντική στρατηγική στη θεραπεία της φλεγμονής στο δέρμα και της επούλωσης εγκαυμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

6.1. Ενώσεις που μελετήθηκαν

1. Νέο παράγωγο τολφαιναμικού οξέος 2-[2-3-χλωρο-2-μεθυλφαινυλαμινο) βενζαμιδο]-3-μερκαπτοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (AK1) (M.B.=392,90)
2. Οι μητρικές ενώσεις (ενώσεις αναφοράς):
 - ✓ Αιθυλεστέρας της κυστεΐνης (M.B.=149,21)
 - ✓ Τολφαιναμικό Οξύ (M.B=261,70)

6.2. Προετοιμασία φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων για τοπική χρήση

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ήταν:

1. Διαλύματα αιθυλεστέρας της Κυστεΐνης:
 - ✓ διάλυμα 5% αιθυλεστέρα της κυστεΐνης σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών: 70% PEG600 και 25% PEG400 δηλαδή σε αναλογία 2,8 : 1.
 - ✓ διάλυμα 1% αιθυλεστέρα της κυστεΐνης σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 5%.
 - ✓ διάλυμα 0,1% αιθυλεστέρα της κυστεΐνης σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά από αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 1%.
2. Διαλύματα τολφαιναμικού οξέος:
 - ✓ διάλυμα 5% τολφαιναμικού οξέος σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών: 70% PEG600 και 25% PEG400 δηλαδή σε αναλογία 2,8 : 1.
 - ✓ διάλυμα 1% τολφαιναμικού οξέος σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 5%.
 - ✓ διάλυμα 0,1% τολφαιναμικού οξέος σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά από αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 1%.
3. Διαλύματα παραγώγου τολφαιναμικού οξέος AK1:
 - ✓ διάλυμα 5% AK1 σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών: 70% PEG600 και 25% PEG400 δηλαδή σε αναλογία 2,8 : 1.
 - ✓ διάλυμα 1% AK1 σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 5%.
 - ✓ διάλυμα 0,1% AK1 σε φορέα-μίγμα πολυαιθυλενογλυκολών μετά από αραιώση του αντίστοιχου διαλύματος 1%.

6.3. Ζωικά πειραματικά πρωτόκολλα:

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ήταν:

Πειραματική μελέτη 1:

Σαράντα (40) άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-2 χωρίστηκαν σε 5 ομάδες των 8. Σε όλους τους μύες προκλήθηκε φλεγμονή με άπαξ ακτινοβολήση (2,5 MED). Σε κάθε ομάδα εφαρμόστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 5% ενώ μία ομάδα έλαβε θεραπεία με το φορέα και μία άλλη δεν έλαβε καμία θεραπεία:

- 1) φορέας μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Excipient).
- 2) τολφαιναμικό οξύ μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς, Tolf).
- 3) ένωση παράγωγο τολφαιναμικού οξέος μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα αγωγής με την ένωση AK1).
- 4) αιθυλεστέρας της κυστεΐνης μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς, Cys).
- 5) χωρίς επάλειψη μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Control).

Έγιναν επαλείψεις δύο φορές ημερησίως για 14 ημέρες. Κάθε τρεις μέρες γινόταν μέτρηση των παραμέτρων: ενυδάτωση, TEWL, πάχος δέρματος, ερυθρότητας, και σωματικού βάρους μύος ενώ στην αρχή και το τέλος του πειράματος έγιναν μετρήσεις ελαστικότητας καθώς και ελήφθησαν δείγματα της κεράτινης στιβάδας με τη διαδικασία του stripping. Σε ράχη άτριχου μύος εφαρμόστηκαν διαδοχικά δύο scotch/ταινίες με τρεις πιέσεις το καθένα και η αφαίρεση τους έγινε με μία και γρήγορη κίνηση. Έγινε ζύγιση των ταινιών πριν και μετά την εφαρμογή πάνω στο δέρμα του μύος. Μετά τις τελευταίες μετρήσεις τα ζώα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση και με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού και χειρουργικής λαβίδας ελήφθη τμήμα του δέρματος της ράχης σε διαστάσεις 2cm x 2cm το οποίο και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 1.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜ. ΜΥΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΕΠΑΛΕΙΨΗ	ΣΥΓΚ/ΡΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ
Excipient	8	8-10 εβδομάδων	Φλεγμονή	14 ημέρες	2 φορές /ημέρα	5%	Ενυδάτωση, TEWL, Ερυθρότητα, πάχος δέρματος, Βάρος, Ελαστικότητα
Tolf							
AK1							
Cys							
Control					Χωρίς		

Πειραματική μελέτη 2:

Σαράντα οχτώ (48) άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-2 χωρίστηκαν σε 8 ομάδες των 6. Σε όλους τους μύες προκλήθηκε φλεγμονή με άπαξ ακτινοβολήση (2,5 MED). Σε κάθε ομάδα εφαρμόστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1% ή 0,1% ενώ μία ομάδα έλαβε θεραπεία με το φορέα και μία άλλη δεν έλαβε καμία θεραπεία:

- 1) φορέας μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Excipient).
- 2) τολφαιναμικό οξύ μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς Tolf 0.1% ή 1%).
- 3) ένωση παράγωγο τολφαιναμικού οξέος μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδες αγωγής με την ένωση AK1 0.1% ή 1%).
- 4) αιθυλεστέρας της κυστεΐνης μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς Cys 0.1% ή 1%).
- 5) χωρίς επάλειψη μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Control).

Έγιναν επαλείψεις δύο φορές ημερησίως για 14 ημέρες. Κάθε τρεις μέρες γινόταν μέτρηση των παραμέτρων: ενυδάτωση, TEWL, πάχος δέρματος, ερυθρότητα, βάρος μυ ενώ στην έναρξη και το τέλος του πειράματος έγιναν μετρήσεις ελαστικότητας. Όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στην πειραματική μελέτη 1, ελήφθησαν δείγματα της κεράτινης στιβάδας με τη διαδικασία του stripping. Μετά τις τελευταίες μετρήσεις τα ζώα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση και με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού και χειρουργικής λαβίδας ελήφθη τμήμα του δέρματος της ράχης σε διαστάσεις 2cm x 2cm το οποίο και αποθηκεύτηκε στους - 20°C μέχρι περαιτέρω χρήση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 2.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜ. ΜΥΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΕΠΑΛΕΙΨΗ	ΣΥΓΚ/ΡΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ
Excipient	6	8-10 εβδομάδων	Φλεγμονή	14 ημέρες	2 φορές /ημέρα		Ενυδάτωση, TEWL, Ευθρότητα, πάχος δέρματος, Βάρος, Ελαστικότητα, μέτρηση αντιοξειδωτικών
Tolf						0,1%	
AK1							
Cys						1%	
Tolf							
AK1							
Cys							
Control					Χωρίς		

Πειραματική μελέτη 3:

Πενήντα (50) άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-2 χωρίστηκαν σε 5 ομάδες των 10. Σε όλους τους μύες προκλήθηκε διαβήτης τύπου 1 με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης σε ενέσιμη μορφή ενδοπεριτοναϊκά (40mg/kg) για πέντε συνεχόμενες μέρες. Μετά την εμφάνιση διαβήτη, προκλήθηκε φλεγμονή με άπαξ ακτινοβολήση (2,5 MED). Οι ομάδες σχηματίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη μεταβολή της τιμής της γλυκόζης στο αίμα και την ηλικία των ζώων, ώστε να είναι ομοιόμορφες. Σε κάθε ομάδα εφαρμόστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1% ενώ μία ομάδα έλαβε θεραπεία με το φορέα και μία άλλη δεν έλαβε καμία θεραπεία:

- 1) φορέας μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Excipient).
- 2) τολφαιναμικό οξύ μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς, Tolf).
- 3) ένωση παράγωγο τολφαιναμικού οξέος μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα αγωγής με την ένωση AK1).
- 4) αιθυλεστέρας της κυστεΐνης μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα ένωσης αναφοράς, Cys).
- 5) χωρίς επάλειψη μετά από πρόκληση φλεγμονής (ομάδα Control).

Έγιναν επαλείψεις δύο φορές ημερησίως για 14 ημέρες. Κάθε τρεις μέρες γινόταν μέτρηση των παραμέτρων: ενυδάτωση, TEWL, πάχος δέρματος, ερυθρότητα, βάρος μυ ενώ στην έναρξη, στη μέση και στο τέλος του πειράματος έγιναν μετρήσεις ελαστικότητας και ελήφθησαν δείγματα της κεράτινης στιβάδας με τη διαδικασία του stripping. Μετά τις τελευταίες μετρήσεις τα ζώα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση και με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού και χειρουργικής λαβίδας ελήφθη τμήμα του δέρματος της ράχης σε διαστάσεις 2cm x 2cm το οποίο και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή της πειραματικής μελέτης 3.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜ. ΜΥΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΕΠΑΛΕΙΨΗ	ΣΥΓΚ/ΡΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ
Excipient	8-10	8-10 εβδομάδων	Διαβήτης Φλεγμονή	14 ημέρες	2 φορές /ημέρα	1%	Ενυδάτωση, TEWL, Ερυθρότητα, πάχος δέρματος, Βάρος, Ελαστικότητα, μέτρηση αντιοξειδωτικών, μέτρηση γλυκόζης
Tolf							
AK1							
Cys							
Control					Χωρίς		

6.4. Πειραματικές διαδικασίες

Πειραματόζωα:

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-2, ηλικίας 8-10 εβδομάδων. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Μικρών Πειραματοζώων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μύες και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 22°C και 25°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 BIO 07).

Επίδραση UV ακτινοβολίας στο δέρμα:

Όργανο: Λάμπα ξένου 1000W (Oriol)

Κάθε μυς ακτινοβολήθηκε για 17sec (~2,5 M.E.D.) Η λάμπα ξένου είναι τοποθετημένη σε κατάλληλη διάταξη στήριξης, ψύξης και τροφοδοσίας και η ακτινοβολία UVA έχει ισχύ 6,5mW/cm² και η UVB 6,5 mW/cm². Η ισχύς της ακτινοβολίας ελέγχθηκε πριν την ακτινοβολήση με αντίστοιχο μετρητή (probe).

Πρωτόκολλο πρόκλησης διαβήτη τύπου 1:

Υλικό: Zanosar® (1g καθαρή στρεπτοζοτοκίνη, 220mg άνυδρο κιτρικό οξύ).

Σε 50 μύες έγινε ένεση διαλύματος στρεπτοζοτοκίνης για 5 συναπτές ημέρες. Οι μύες ήταν νηστικοί για 4 ώρες πριν τη στιγμή της ένεσης και το διάλυμα της στρεπτοζοτοκίνης (STZ) παρασκευαζόταν καθημερινά πριν την ένεση. Ζυγίζονταν κατάλληλη ποσότητα στρεπτοζοτοκίνης (Zanosar®) και αραιωνόταν σε φυσιολογικό ορό 0,9% , ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα 10% w/v. Η δόση που αντιστοιχεί σε κάθε μυ είναι 40 mg STZ/kg μύς.

Επάλειψη διαλυμάτων:

Στις ομάδες των μυών που εφαρμόστηκαν τα διαλύματα, πραγματοποιήθηκε επάλειψη καθενός μυ με χρήση πιπέτας και χειρουργικών γαντιών στο κάτω μέρος της ράχης τους. Τα σκευάσματα φυλάσσονταν στο ψυγείο στους 4°C.

6.5. Μέθοδοι εκτίμησης μετρήσιμων παραμέτρων

Μέτρηση Άδηλης Απώλειας νερού:

Όργανο: TEWAMETER® TM 240

Για την άδηλη απώλεια ύδατος χρησιμοποιήθηκε το όργανο TEWAMETER® TM 240 (Courage-Khazaka, Germany). Η συγκεκριμένη παράμετρος δίνει την ικανότητα να αξιολογηθεί η λειτουργία του φραγμού στο δέρμα. Μόλις εμφανιστεί η παραμικρή βλάβη, η τιμή της εξάτμισης αυξάνεται. Ο αισθητήρας μπορεί να μετρήσει τη διαφορά στην εξάτμιση του ύδατος μέσω ενός ζεύγους ανιχνευτών όπου διαθέτει (έναν για τη μέτρηση της θερμοκρασίας και έναν για τη μέτρηση της σχετικής υγρασίας). Ένας μικροεπεξεργαστής δίνει το ρυθμό εξάτμισης σε g/h/m².

Μέτρηση της ενυδάτωσης:

Όργανο: CORNEOMETER® CM 820

Το Corneometer® μετρά σε αυθαίρετες μονάδες από 0 (καθόλου νερό) - 120 (για το νερό). Οι μονάδες μέτρησης έχουν καθιερωθεί ως «μονάδες Corneometer». Το βάθος διείσδυσης του ηλεκτρικού πεδίου σκέδασης είναι αποδεδειγμένα πολύ μικρό, έτσι ώστε μόνο η υγρασία στην επιφάνεια του δέρματος να μετριέται. Η πολύ σύντομη χρονική διάρκεια της μέτρησης (1 δευτερόλεπτο) αποτρέπει τη δημιουργία απόφραξης που επηρεάζει το αποτέλεσμα. Η μικρή κεφαλή μέτρησης επιτρέπει μετρήσεις σε όλα τα σημεία του σώματος. Η μέτρηση της χωρητικότητας πρέπει να έχει πλήρη επαφή με την επιφάνεια στήριξης.

Μέτρηση του πάχους του δέρματος:

Όργανο: ψηφιακό παχύμετρο.

Με τη χρήση του ψηφιακού παχύμετρου μετρήθηκε το πάχος του δέρματος. Η ένδειξη του οργάνου ήταν σε mm.

Μέτρηση της ελαστικότητας:

Όργανο: Cutometer® MPA 580

Το CUTOMETER® (Courage-Khazaka, Germany) προορίζεται για τη μέτρηση της ελαστικότητας του ανώτερου στρώματος του δέρματος με τη χρήση αρνητικής πίεσης η οποία παραμορφώνει το δέρμα μηχανικά. Η μέτρηση αυτή βασίζεται στη μέθοδο αναρρόφησης. Αρνητική πίεση δημιουργείται στη συσκευή και το δέρμα τραβιέται μέσα στο άνοιγμα του καθετήρα και μετά από ένα καθορισμένο χρόνο

απελευθερώνονται και πάλι. Μέσα στον ανιχνευτή, το βάθος διείσδυσης καθορίζεται από ένα οπτικό σύστημα μέτρησης. Αυτό το οπτικό σύστημα μετρήσεων αποτελείται από μια πηγή φωτός και ένα ελαφρύ δέκτη, καθώς και δύο αντικριστά πρίσματα, τα οποία προβάλλουν το φως από τον πομπό προς τον υποδοχέα. Η ένταση του φωτός διαφέρει λόγω του βάθους διείσδυσης του δέρματος. Η αντίσταση του δέρματος στην αρνητική πίεση (σταθερότητα) και η ικανότητά του να επιστρέψει στην αρχική του θέση (ελαστικότητα) εμφανίζονται ως (βάθος διείσδυσης σε mm / ώρα) καμπύλες σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Αυτή η αρχή της μέτρησης επιτρέπει να πάρει πληροφορίες σχετικά με τις ελαστικές και μηχανικές ιδιότητες της επιφάνειας του δέρματος και επιτρέπει να ποσοτικοποιηθεί αντικειμενικά η γήρανση του δέρματος.

Το λογισμικό του CUTOMETER® MPA 580 επιτρέπει τον υπολογισμό διάφορων παραμέτρων από τα διαφορετικά τμήματα της καμπύλης μέτρησης. Συγκεκριμένα μετρήσαμε τις εξής παραμέτρους:

R2: Gross elasticity: αντίσταση έναντι της ικανότητας επιστροφής. Όσο πιο κοντά στο 1 (100%) είναι η τιμή τόσο πιο ελαστικό είναι το δέρμα.

R5: Net elasticity: Όσο πιο κοντά στο 1 (100%) είναι η τιμή τόσο πιο ελαστικό είναι το δέρμα.

R6: Portion of the visco-elasticity on the elastic part of the curve: Όσο πιο μικρή η τιμή τόσο πιο υψηλή η διατασιμότητα των ινών ελαστίνης.

R7: Portion of the elasticity compared to the complete curve. Όσο υψηλότερη η τιμή της, τόσο πιο ελαστικό το δέρμα.

Μελέτη του δέρματος-Φωτοτεκμηρίωση:

Όργανο: φωτογραφική μηχανή Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF.

Η μελέτη του δέρματος των μυών έγινε με τη λήψη φωτογραφιών με τη φωτογραφική μηχανή Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF Aspherical, η οποία βρισκόταν σε απόσταση 30cm κάθετα από το αντικείμενο φωτογράφισης.

Μέτρηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα:

Όργανα:

- i. Χειρουργικό ψαλιδάκι
- ii. Μετρητής και ταινίες γλυκόζης (ABBOTT Freestyle Precision)

Ανοίχτηκε μια ταινία μέτρησης γλυκόζης και εισήχθη στην υποδοχή του μετρητή το άκρο της ταινίας που έχει 3 μαύρες γραμμές. Με το ψαλιδάκι κόπηκε με προσοχή απειροελάχιστο κομμάτι από την ουρά του μυός, ώστε να σχηματιστεί μικρή σταγόνα αίματος που τοποθετήθηκε στην άκρη της ταινίας (λευκή περιοχή). Η ταινία μέτρησης λειτούργησε ως σπόγγος, τραβώντας το αίμα στο εσωτερικό της. Η μέτρηση ξεκίνησε αυτόματα όταν τοποθετήθηκε επαρκής ποσότητα αίματος. Δεν έπρεπε να απομακρυνθεί η ουρά από την ταινία μέχρι να αρχίσει η μέτρηση. Η μέτρηση ολοκληρώθηκε σε λίγα δευτερόλεπτα και το αποτέλεσμα εμφανίστηκε αυτόματα στην οθόνη του μετρητή.

Μέτρηση αντιοξειδωτικών δεικτών του δέρματος με HPLC:

Η εκτίμηση των αντιοξειδωτικών δεικτών γλουταθειόνης, ασκορβικού και ουρικού οξέος πραγματοποιήθηκε με χρήση HPLC μεθόδου.

Συσκευή HPLC:

- ✓ SP 8800 ternary HPLC pump (μοντέλο της Spectra Physics),
- ✓ 20 µl injection loop,
- ✓ C-18 Hypersil Hypurity TM Elite 5u στήλη '4,6 mm x 25 cm'
- ✓ Αμπερομετρικός ηλεκτροχημικός ανιχνευτής 840-EC της Jasco.
- ✓ Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Clarity HPLC Data System.

Προετοιμασία Πρότυπων Διαλυμάτων:

- ✓ Ουρικού & ασκορβικού οξέος

Ζυγίστηκαν 1,761mg ασκορβικού (M.B.= 176,1) και 1,681mg ουρικού οξέος (M.B.= 168,1) αντίστοιχα και τέθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml σε κινητή φάση. Παρασκευάστηκαν έτσι μητρικά διαλύματα συγκέντρωσης των 100 µM. Από τα παραπάνω μητρικά με κατάλληλες αραιώσεις και διαλύτη αραιώσης την κινητή φάση παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ασκορβικού και ουρικού οξέος συγκεντρώσεων : 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.05 µM.

- ✓ Γλουταθειόνης

Ζυγίστηκαν 0,01536 g GSH (M.B.= 307,32) και τέθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 ml σε κινητή φάση. Παρασκευάστηκε έτσι μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης των 1 mM. Από το παραπάνω μητρικό με κατάλληλες αραιώσεις και διαλύτη αραιώσης την κινητή φάση παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλουταθειόνης συγκεντρώσεων : 250µM, 200 µM, 160 µM, 130 µM, 100 µM, 80 µM, 60 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM.

Τα πρότυπα διαλύματα δύνανται να φυλάσσονται για μία εβδομάδα στους -75°C .

Παρασκευή κινητών φάσεων:

Για τον προσδιορισμό του ουρικού και ασκορβικού οξέος χρησιμοποιήθηκε κοινή κινητή φάση η οποία παρασκευάστηκε ως εξής:

- ✓ Διαλύθηκαν 50 ml 800 mM (3,281 gr) οξικού νατρίου σε 900 ml νερό σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Προστέθηκαν 0,2010 g Na_2EDTA .
- ✓ Προστέθηκαν στη συνέχεια 50 ml MeOH και 3 ml Q12 ion pair cocktail.
- ✓ Αραιώθηκε η κινητή έως 1 L με 50 ml νερού.
- ✓ Ακολούθησε διήθηση αυτής υπό κενό.
- ✓ Τοποθετήθηκε η κινητή φάση στους υπερήχους για 15 λεπτά.

Για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης παρασκευάστηκε διαφορετική κινητή φάση ως εξής:

- ✓ Διαλύθηκαν 9,4 g χλωροξικό οξύ σε 950 ml νερό και 40 ml μεθανόλη σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε 3-3.5 με καυστικό νάτριο (περίπου 2,2 gr NaOH). Το αρχικό pH ήταν ίσο με 2.
- ✓ Αραιώθηκε η κινητή έως 1 L με νερό.
- ✓ Ακολούθησε διήθηση αυτής υπό κενό.
- ✓ Τοποθετήθηκε η κινητή φάση στους υπερήχους για 15 λεπτά.

Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων για την επεξεργασία των δειγμάτων:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 90 % MeOH / 10 % EDTA:
Διαλύθηκαν 0,01861 g EDTA σε 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$. Από αυτό το διάλυμα 10 ml αναμίχθηκαν με 90 ml MeOH.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα BHT:
Διαλύθηκαν 0,01 g BHT σε 1 ml αιθανόλης.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Desferal:
Διαλύθηκαν 0,00328 g Desferal σε 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$.

Επεξεργασία δειγμάτων

α) ομογενοποίηση ιστού δέρματος:

Ζυγίστηκε ποσότητα (20mg) παγωμένου ιστού δέρματος ράχης άτριχου μυός. Το δέρμα κόπηκε σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκε σε γυάλινο υποδοχέα για να ομογενοποιηθεί με προσθήκη:

- ✓ 300 μl (90 % MeOH/10% 1 mM Na₂EDTAx2H₂O
- ✓ 10 μl 10 mg/ml BHT σε αιθανόλη_{HPLC} προς αποφυγή αυτό-οξείδωσης
- ✓ 1,5 μl 10 mM Desferal σε H₂O_{HPLC}

Ομογενοποιήθηκε το δέρμα για 5 λεπτά με τη βοήθεια συσκευής Dounce homogenizer. Το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε errendorf και φυλάχτηκε σε πάγο χωρίς να εκτίθεται στο φως. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 7 λεπτά στις 5000 στροφές και στους 4°C. 200 μl του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο από τα οποία 50 μl αραιώθηκαν με κινητή φάση 1:1 για το ασκορβικό και ουρικό οξύ και 1:5 για τη γλουταθειόνη. Ακολούθησε ένεση στην HPLC.

β) strippings δέρματος:

Τα strippings που είχαν ληφθεί κατά τις πειραματικές μελέτες 1,2 και 3 τοποθετήθηκαν ανά δύο αντιδιαμετρικά με λαβίδα μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο και προστέθηκαν:

- ✓ 0,5 ml H₂O_{HPLC}
- ✓ 200 μl 90 % MeOH/10% 1 mM Na₂EDTAx2H₂O
- ✓ 75 μl 10 mg/ml BHT σε αιθανόλη_{HPLC} προς αποφυγή αυτό-οξείδωσης
- ✓ 1,5 μl 10 mM Desferal σε H₂O_{HPLC}

Έγινε ανάδευση του φιαλιδίου στο Vortex στις 2500 στροφές για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 7 min στις 10.000 στροφές στους 4° C. 200 μl του υπερκείμενου μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο. Ακολούθησε ένεση στην HPLC.

6.6. Ιστοπαθολογική μελέτη

Οι ιστοπαθολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών. Σε τομές δερμάτων από κάθε ομάδα μυών έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και στη συνέχεια βγήκαν συμπεράσματα για τη φλεγμονή, την υπερκεράτωση και τον ερεθισμό του δέρματος. Αναλυτικότερα, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε block παραφίνης μετά τη διαδικασία μονιμοποίησης που λαμβάνει χώρα στην ιστοκινέττα και περιλαμβάνει τα κάτωθι στάδια:

- 1) Φορμόλη A: 2h
- 2) Φορμόλη B: 2h
- 3) Αλκοόλη 70°: 1h
- 4) Αλκοόλη 96°: 1h
- 5) Αλκοόλη 96°: 1h
- 6) Αλκοόλη 96°: 1h
- 7) Αλκοόλη 100°: 1h:30'
- 8) Αλκοόλη 100°: 1h:30'
- 9) Ξυλόλη A: 1h:30'
- 10) Ξυλόλη B: 1h:30'
- 11) Παραφίνη A: 1h:30'
- 12) Παραφίνη B: 1h:30'

Στη συνέχεια έγινε χρώση αιματοξιλίνης - ηωσίνης που περιλαμβάνει τα κάτωθι στάδια:

- 1) Ξυλόλη A: 10'
- 2) Ξυλόλη B: 10'
- 3) Αλκοόλη 100° : Εμβαπτίσεις
- 4) Αλκοόλη 96° : Εμβαπτίσεις
- 5) Ξέπλυμα σε νερό βρύσης
- 6) Αιματοξυλίνη: 5'-8'
- 7) Ξέπλυμα σε νερό βρύσης
- 8) Διαφοροποίηση σε Αλκοόλη 80° – HCL (οξυνισμένο)
- 9) Ξέπλυμα σε νερό βρύσης
- 10) Αλκοόλη 70° : Εμβαπτίσεις
- 11) Ηωσίνη Αλκοολική: 1'-2'
- 12) Αλκοόλη 70° : Εμβαπτίσεις
- 13) Αλκοόλη 96° : Εμβαπτίσεις
- 14) Αλκοόλη 96° : Εμβαπτίσεις
- 15) Αλκοόλη 100° : Εμβαπτίσεις
- 16) Αλκοόλη 100° : Εμβαπτίσεις
- 17) Ξυλόλη Γ: 5'
- 18) Ξυλόλη Δ: 5'

Ακολούθησαν η επικάλυψη και η μικροσκόπηση.

6.7. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στην παρούσα εργασία έγινε παρουσίαση των περιγραφικών μεγεθών των δεδομένων και χρησιμοποιήθηκαν μία σειρά από παραμετρικές μεθόδους ανάλυσης. Για την εύρεση του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Excel® (Microsoft Office 2007). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό SPSS για Windows (έκδοση 22.0; SPSS, Inc, an IBM Company, Chicago, IL).

Έλεγχος κανονικότητας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων προκειμένου να επιλεγούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Το κριτήριο αυτό αποτελεί μία μη παραμετρική στατιστική μέθοδο που ελέγχει αν η κατανομή του πληθυσμού, από τον οποίο προήλθε το τυχαίο δείγμα, ακολουθεί μία συγκεκριμένη κατανομή πιθανότητας (πχ. κανονική). Στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε για καθεμία ομάδων μυών και ξεχωριστά κάθε χρονική στιγμή. Σε όλες τις περιπτώσεις, προέκυψε ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή ($p > 0,05$).

ANOVA

Για τη διαπίστωση τυχόν στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των επεμβάσεων εφαρμόστηκε η ανάλυση διασποράς (ANOVA). Η ANOVA χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών των μέσων όρων περισσότερων από δύο ομάδων-δειγμάτων. Βασική αρχή της ανάλυσης διακύμανσης είναι ότι η συνολική διασπορά που παρατηρείται σε μία μέτρηση, προέρχεται από δύο πηγές:

- Τη διακύμανση μεταξύ των ομάδων (Μ.Ο.). Για κάθε ομάδα-δείγμα της έρευνας προκύπτει διαφορετικός μέσος όρος. Όσο περισσότερο διαφέρουν, μεταβάλλονται οι μετρήσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, τόσο πιθανότερο είναι να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση.
- Τη διακύμανση εντός των ομάδων (Ε.Ο.). Από όλα τα υποκείμενα της ίδιας ομάδας δεν λαμβάνουμε την ίδια τιμή. Υπάρχουν ατομικές διαφορές. Αυτή η πηγή διαφοροποίησης των μετρήσεων αναφέρεται και ως σφάλμα. Όσο

μικρότερο είναι το σφάλμα της μέτρησης, τόσο πιθανότερο είναι να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση.

Τα αποτελέσματα της ANOVA αξιολογήθηκαν παρατηρώντας την τιμή της σημαντικότητας και την εφαρμογή κριτηρίων post-hoc. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση τα post-hoc κριτήρια που εφαρμόστηκε ήταν το LSD (Least Significant Difference), το Tukey, το Tamhane, το Bonferonni και το Dunnett T₃. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p \leq 0,05$.

Paired t-test

Το κριτήριο t για εξαρτημένα δείγματα ελέγχει αν οι πληθυσμιακοί μέσοι όροι ανάμεσα σε ζεύγη παρατηρήσεων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Στην περίπτωση αυτή αναφερόμαστε στις τιμές της ίδιας ποσοτικής μεταβλητής που παρατηρήθηκαν κάτω από δύο διαφορετικές καταστάσεις (π.χ. περίπτωση αρχικής και τελικής ημέρας πειράματος).

Independent samples t-test

Το κριτήριο t για ανεξάρτητα δείγματα ελέγχει αν οι πληθυσμιακοί μέσοι όροι δύο ανεξάρτητων ομάδων, διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Κατά την πραγματοποίηση αυτού του ελέγχου στο SPSS ουσιαστικά εμπλέκονται δύο μεταβλητές: μία ποσοτική και μία μεταβλητή που κατηγοριοποιεί τις παρατηρήσεις του αρχείου σε δύο ομάδες και η σύγκριση αφορά τις μέσες τιμές της ποσοτικής μεταβλητής στις δύο ομάδες που χωρίζονται από τις τιμές της μεταβλητής ομαδοποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

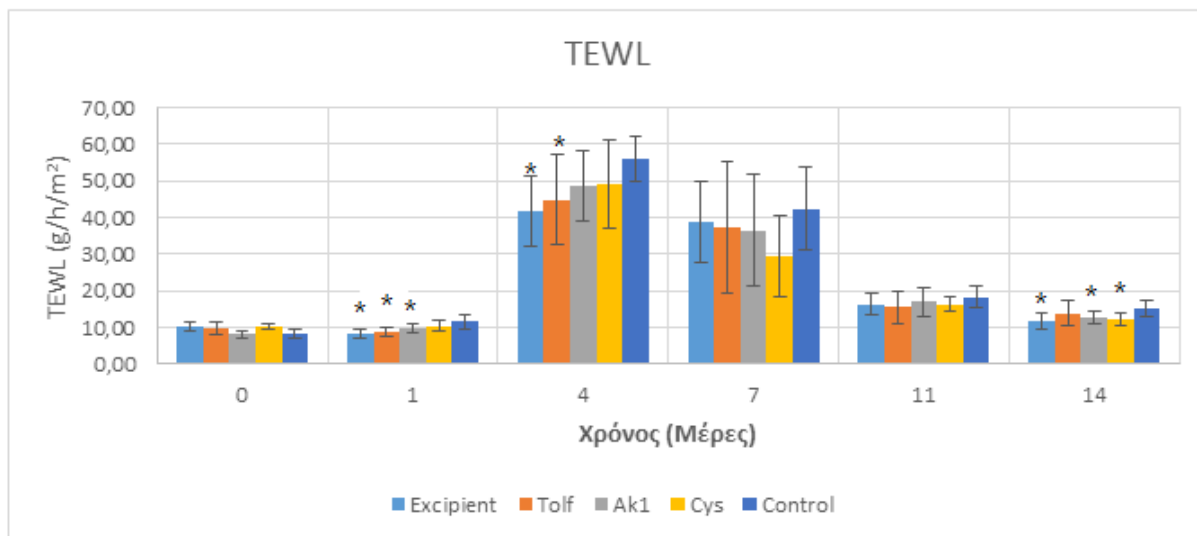
7.1. Πειραματική μελέτη 1

7.1.1. Αποτελέσματα TEWL

Η βλάβη του δέρματος είναι δυνατό να διαπιστωθεί και να καθοριστεί με την μέτρηση της άδηλης απώλειας νερού, TEWL. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει πάντα μια καθορισμένη εξάτμιση ύδατος από την επιδερμίδα, ως τμήμα του φυσιολογικού δερματικού μεταβολισμού, αλλά όσο μεγαλύτερη η τιμή της εξάτμισης, τόσο πιο πιθανό είναι η λειτουργία του επιδερμικού φραγμού να έχει υποστεί βλάβη. Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της TEWL στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) δίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 4** και στο αντίστοιχο **Διάγραμμα 1**.

Πίνακας 4. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	10,19 ($\pm 1,22$)	8,43 ($\pm 1,30$)	41,93 ($\pm 9,55$)	38,66 ($\pm 11,03$)	16,30 ($\pm$ 2,83)	11,83 ($\pm 2,28$)
Tolf 5%	9,86 ($\pm 1,70$)	8,96 ($\pm 1,26$)	44,94 ($\pm 12,49$)	37,25 ($\pm 17,95$)	15,49 ($\pm 4,47$)	13,95 ($\pm 3,56$)
AK1 5%	8,08 ($\pm 1,09$)	9,73 ($\pm 1,21$)	48,63 ($\pm 9,50$)	36,43 ($\pm 15,19$)	16,96 ($\pm 3,19$)	12,73 ($\pm 1,75$)
Cys 5%	10,18 ($\pm 0,75$)	10,30 ($\pm 1,48$)	49,00 ($\pm 12,15$)	29,48 ($\pm 10,93$)	16,34 ($\pm 1,80$)	12,25 ($\pm 1,78$)
Control	8,43 ($\pm 1,32$)	11,50 ($\pm 2,16$)	56,17 ($\pm 6,17$)	42,49 ($\pm 11,09$)	18,33 ($\pm 2,82$)	15,20 ($\pm 2,41$)



Διάγραμμα 1. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 7-9) εντός της ίδιας ημέρας.

	Ποσοστιαία μεταβολή
Excipient	17%
Tolf	44%
AK1	60%
Cys	21%
Control	82%

Εικόνα 11. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της TEWL ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	0,666	0,930	0,964	0,922	0,921	0,970
Tolf 5%	0,875	0,918	0,967	0,787	0,938	0,515
AK1 5%	0,999	0,582	0,869	0,885	0,669	0,910
Cys 5%	0,636	0,699	0,845	0,720	0,464	0,646
Control	0,992	0,764	0,950	0,988	0,648	0,970

Στον **Πίνακα 5** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η

μεταβλητή TEWL ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6. Paired t-test για τη σύγκριση της TEWL μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	-39,37	-24,10	0,000
	4-14	23,81	36,38	0,000
	0-14	-3,32	0,05	0,056
Tolf 5%	0-4	-45,69	-24,45	0,000
	4-14	19,64	42,32	0,000
	0-14	-7,25	-0,91	0,019
AK1 5%	0-4	-48,63	-32,46	0,000
	4-14	28,64	43,15	0,000
	0-14	-6,33	-2,96	0,000
Cys 5%	0-4	-48,87	-28,77	0,000
	4-14	26,29	47,20	0,000
	0-14	-3,68	-0,46	0,019
Control	0-4	-52,76	-42,70	0,000
	4-14	35,66	46,26	0,000
	0-14	-8,28	-5,24	0,000

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στους **Πίνακες 7-9**.

Πίνακας 7. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient – Control	0,020	Tukey
	0,000	LSD
	0,002	Bonferroni
	0,031	Tamhane
	0,028	Dunnett T3
Excipient - Cys 5%	0,020	LSD
Tolf 5% - Control	0,014	Tukey
	0,002	LSD
	0,018	Bonferroni
AK1 5% - Control	0,024	LSD

Πίνακας 8. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient – Control	0,048	Tukey
	0,006	LSD
	0,037	Tamhane
	0,033	Dunnett T3
Tolf 5% - Control	0,029	LSD

Πίνακας 9. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient – Control	0,007	LSD
AK1 5% - Control	0,044	
Cys 5% - Control	0,018	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 1** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η πορεία των τιμών της TEWL σε όλες τις ομάδες έως την 4η ημέρα (έξαρση φλεγμονής) είναι ανοδική ενώ από την 7η ημέρα οι τιμές ακολουθούν καθοδική πορεία (**Διάγραμμα 1**). Επιπλέον σε όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 4η και η 14η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τη 14η ημέρα υπάρχει βελτίωση της TEWL σε σύγκριση με την 4^η ημέρα παρόλο που ο επιδερμικός φραγμός δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0) (**Πίνακας 6**).
- ✓ Τη μεγαλύτερη αύξηση της TEWL εμφάνισε η ομάδα των μαρτύρων, ακολουθούμενη από την ομάδα AK1 (**Εικόνα 11**).

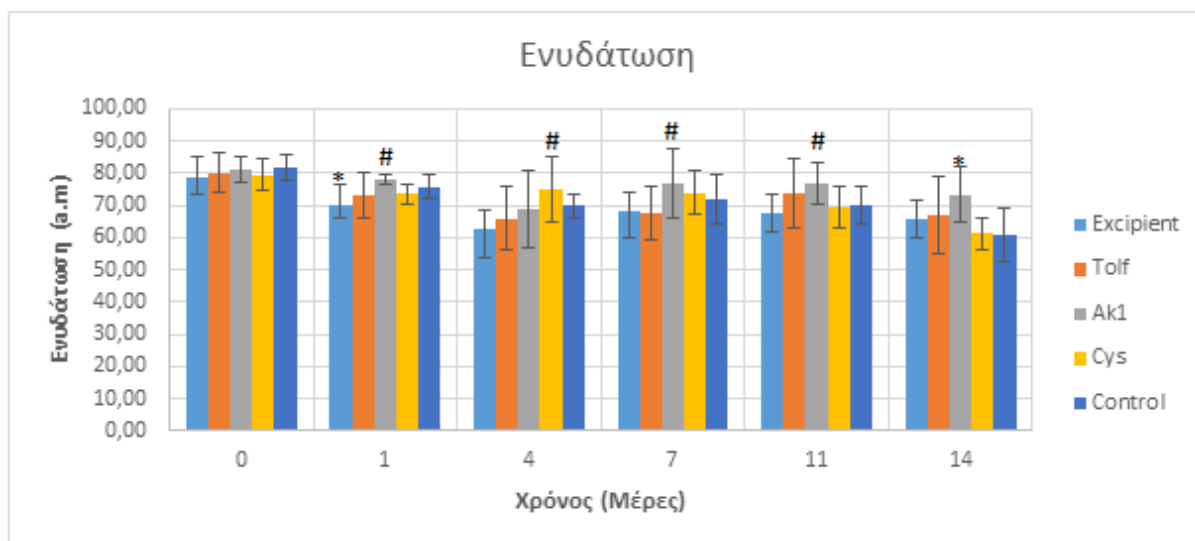
- ✓ Την 1^η ημέρα, τη μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζει η ομάδα Control που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την AK1, την Tolf και την Excipient που εμφανίζει αντίστοιχα τα χαμηλότερα επίπεδα TEWL (**Πίνακας 7**).
- ✓ Την 4^η ημέρα μεγαλύτερη επιδείνωση της βλάβης παρουσιάζει η ομάδα Control, καθώς είναι η μόνη που δεν λαμβάνει κάποια θεραπεία ενώ την καλύτερη εικόνα δίνουν οι ομάδες Tolf 5% και Excipient. Είναι πιθανό το τολφαιναμικό οξύ ως αντιφλεγμονώδες να αναστέλλει την εμφάνιση της φλεγμονής στα αρχικά στάδια (**Πίνακας 8**).
- ✓ Τέλος, τη 14^η ημέρα οι τιμές των ομάδων είναι μειωμένες με τις ομάδες AK1, Excipient και Cys να εμφανίζουν σημαντικά μικρότερες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα Control (**Πίνακας 9**).
- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη βλάβη εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων Control καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

7.1.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της Ενυδάτωσης στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) παρατίθενται στον **Πίνακα 10** και στο αντίστοιχο **Διάγραμμα 2**.

Πίνακας 10. Μέσος όρος τιμών της Ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	78,88 ($\pm 5,11$)	70,25 ($\pm 1,26$)	62,63 ($\pm 1,26$)	68,13 ($\pm 1,26$)	67,50 ($\pm 1,26$)	65,88 ($\pm 1,26$)
Tolf 5%	80,25 ($\pm 6,27$)	73,25 ($\pm 7,11$)	66,00 ($\pm 9,67$)	67,38 ($\pm 8,31$)	73,88 ($\pm 10,97$)	67,13 ($\pm 11,84$)
AK1 5%	81,13 ($\pm 3,80$)	77,88 ($\pm 1,55$)	68,88 ($\pm 11,89$)	76,75 ($\pm 10,93$)	76,63 ($\pm 6,52$)	73,38 ($\pm 8,43$)
Cys 5%	79,50 ($\pm 5,01$)	73,50 ($\pm 2,93$)	74,75 ($\pm 10,18$)	74,00 ($\pm 6,72$)	69,63 ($\pm 6,39$)	61,25 ($\pm 4,98$)
Control	81,78 ($\pm 3,83$)	75,78 ($\pm 3,67$)	69,89 ($\pm 3,69$)	71,89 ($\pm 7,56$)	70,22 ($\pm 5,67$)	61,00 ($\pm 8,15$)



Διάγραμμα 2. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 13-17) εντός της ίδιας ημέρας.

	Ποσοστιαία μεταβολή
Excipient	-16%
Tolf	-16%
AK1	-9%
Cys	-23%
Control	-25%

Εικόνα 12. Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ενυδάτωσης ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov–Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

Πίνακας 11. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής της Ενυδάτωσης.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	0,927	0,806	0,937	0,962	0,527	0,738
Tolf 5%	0,888	0,815	0,997	0,869	0,835	0,987
Ak1 5%	0,998	0,842	0,991	0,938	0,968	0,855
Cys 5%	0,871	0,394	0,785	0,949	0,987	0,981
Control	0,992	0,669	0,936	0,702	0,935	0,868

Στον **Πίνακα 11** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η

μεταβλητή της ενυδάτωσης ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12. Paired t-test για τη σύγκριση της Ενυδάτωσης μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	5,69	26,80	0,008
	4-14	-9,00	2,50	0,223
	0-14	5,94	20,05	0,003
Tolf 5%	0-4	2,99	25,51	0,020
	4-14	-10,45	8,20	0,784
	0-14	1,35	24,90	0,034
AK1 5%	0-4	0,46	24,04	0,044
	4-14	-11,29	2,29	0,161
	0-14	-0,06	15,56	0,051
Cys 5%	0-4	-6,88	16,38	0,366
	4-14	7,01	19,99	0,002
	0-14	11,78	24,72	0,000
Control	0-4	7,92	15,85	0,000
	4-14	0,75	17,03	0,036
	0-14	13,80	27,76	0,000

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στους **Πίνακες 13-17**.

Πίνακας 13. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 5%	0,001	LSD
	0,009	Tukey-Dunnett T3
	0,011	Bonferroni-Tamhane
Excipient - Control	0,012	LSD
Tolf 5% - AK1 5%	0,038	LSD
AK1 5% - Cys 5%	0,049	LSD
	0,034	Tamhane
	0,030	Dunnett-T3

Πίνακας 14. One way-ANOVA για σύγκριση της μεταβλητής της Ενυδάτωσης την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Cys 5%	0,012	LSD

Πίνακας 15. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 7 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 5%	0,049	LSD
Tolf 5% - AK1 5%	0,033	LSD

Πίνακας 16. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 5%	0,016	LSD

Πίνακας 17. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της Ενυδάτωσης την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
AK1 5% - Cys 5%	0,006	LSD
	0,042	Tukey
	0,056	Bonferroni
	0,046	Tamhane
	0,041	Dunnett T3
AK1 5% - Control	0,004	LSD
	0,029	Tukey
	0,038	Bonferroni

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 2** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

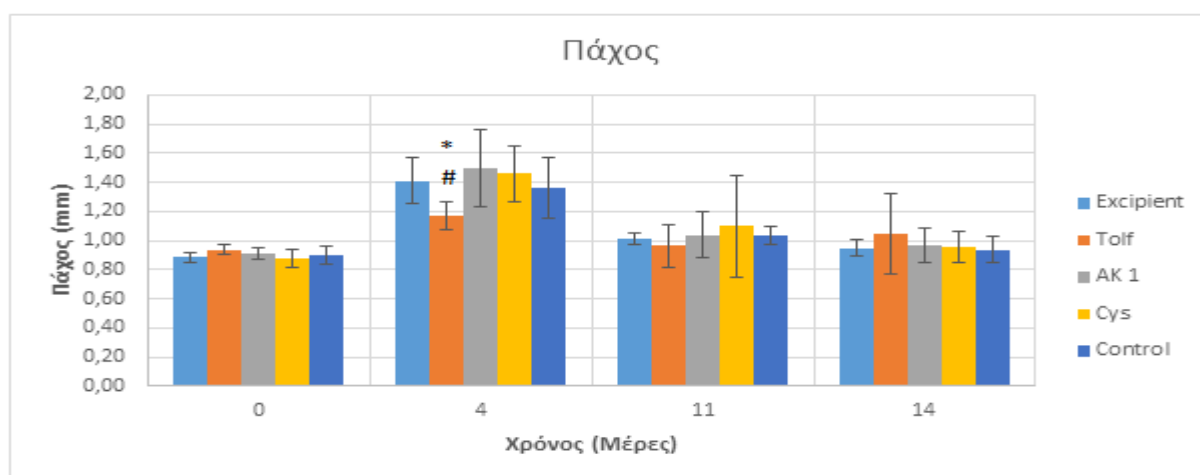
- ✓ Οι ομάδες Excipient, Tolf και Control παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών 0 με 4 και 0 με 14 καθώς μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η ενυδάτωση του δέρματος των μυών λόγω της φλεγμονής ψωρίς να επανέρχεται στο τέλος του πειράματος. Στην ομάδα της κυστεΐνης (Cys) φαίνεται ότι η ενυδάτωση δεν επηρεάστηκε σημαντικά έως την 4η ημέρα, αλλά μειώθηκε σημαντικά στο τέλος του επιρ.αματος (14^η ημέρα) (**Πίνακας 12**).
- ✓ Την 1^η ημέρα μετά από την ακτινοβολήση, η ομάδα AK1 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ($P \leq 0,05$) ενώ η ομάδα του εκδόχου έχει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ενυδάτωσης κι από την ομάδα των μαρτύρων (**Πίνακας 13**).
- ✓ Την 4^η ημέρα η ομάδα Excipient (μικρότερη ενυδάτωση) διαφέρει σημαντικά από την ομάδα Cys 5% (μεγαλύτερη ενυδάτωση) (**Πίνακας 14**).
- ✓ Την 7^η ημέρα που αρχίζει η φλεγμονή να υποχωρεί, η AK1 5% παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα ενυδάτωσης διαφέροντας σημαντικά και από την ομάδα Tolf κι από την Excipient (**Πίνακας 15**).
- ✓ Την 11^η ημέρα η ομάδα Excipient (μικρότερη ενυδάτωση) διαφέρει σημαντικά από την ομάδα AK1 5% (μεγαλύτερη ενυδάτωση) (**Πίνακας 16**).
- ✓ Τέλος, τη 14η ημέρα η ομάδα AK1 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση από όλες τις ομάδες διαφέροντας σημαντικά από την ομάδα Excipient και Cys 5% (**Πίνακας 17**).
- ✓ Γενικά, η ομάδα AK1 5% παρουσιάζει καλύτερα επίπεδα ενυδάτωσης συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες, ενώ η ομάδα Excipient έχει τα χαμηλότερα επίπεδα ακόμα και από την ομάδα των μαρτύρων (Control) εκτός από την τελευταία ημέρα.
- ✓ Συνοπτικά, η ομάδα AK1 παρουσιάζει τη μικρότερη μείωση ενυδάτωσης η οποία μεταβάλλεται κατά 9% έναντι 25% της ομάδας Control (**Εικόνα 12**).

7.1.3. Αποτελέσματα Πάχους

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων του πάχους στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) δίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 18** και το αντίστοιχο **Διάγραμμα 3**.

Πίνακας 18. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ			
	0	4	11	14
Excipient	0,88 ($\pm 0,04$)	1,41 ($\pm 0,16$)	1,01 ($\pm 0,04$)	0,95 ($\pm 0,06$)
Tolf 5%	0,94 ($\pm 0,03$)	1,17 ($\pm 0,10$)	0,97 ($\pm 0,15$)	1,05 ($\pm 0,28$)
AK1 5%	0,91 ($\pm 0,04$)	1,50 ($\pm 0,26$)	1,04 ($\pm 0,16$)	0,97 ($\pm 0,12$)
Cys 5%	0,88 ($\pm 0,06$)	1,46 ($\pm 0,19$)	1,10 ($\pm 0,35$)	0,95 ($\pm 0,11$)
Control	0,90 ($\pm 0,07$)	1,36 ($\pm 0,21$)	1,03 ($\pm 0,07$)	0,94 ($\pm 0,09$)



Διάγραμμα 3. Μεταβολή του πάχους του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (**Πίνακας 21**) εντός της ίδιας ημέρας.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές του πάχους καθώς και οι μεταβολές των τιμών του ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 19**.

Πίνακας 19. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ			
	0	4	11	14
Excipient	0,878	0,994	0,929	0,412
Tolf 5%	0,82	0,602	0,904	0,311
AK1 5%	0,994	0,924	0,161	0,211
Cys 5%	0,911	0,217	0,066	0,956
Control	0,491	0,441	0,842	0,933

Στον **Πίνακα 19** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή του πάχους ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 20**.

Πίνακας 20. Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	-0,67	-0,39	0,000
	4-14	0,29	0,63	0,000
	0-14	-0,11	-0,02	0,009
Tolf 5%	0-4	-0,31	-0,16	0,000
	4-14	-0,14	0,40	0,302
	0-14	-0,35	0,13	0,318
AK1 5%	0-4	-0,80	-0,39	0,000
	4-14	0,34	0,72	0,000
	0-14	-0,16	0,04	0,189
Cys 5%	0-4	-0,78	-0,39	0,000
	4-14	0,41	0,60	0,000
	0-14	-0,19	0,04	0,150
Control	0-4	-0,60	-0,33	0,000
	4-14	0,32	0,53	0,000
	0-14	-0,10	0,02	0,174

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 21**.

Πίνακας 21. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 4.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Tolf 5%	0,019	LSD
	0,039	Tamhane
	0,034	Dunnett T3
Tolf 5% - Ak1 5%	0,002	LSD
	0,014	Tukey
	0,017	Bonferroni
Tolf 5% - Cys 5%	0,005	LSD
	0,038	Tukey
	0,050	Bonferroni
	0,034	Tamhane
	0,029	Dunnett T3
Tolf 5% - Control	0,049	LSD

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 3** και αντίστοιχοι πίνακες) διαπιστώνεται ότι:

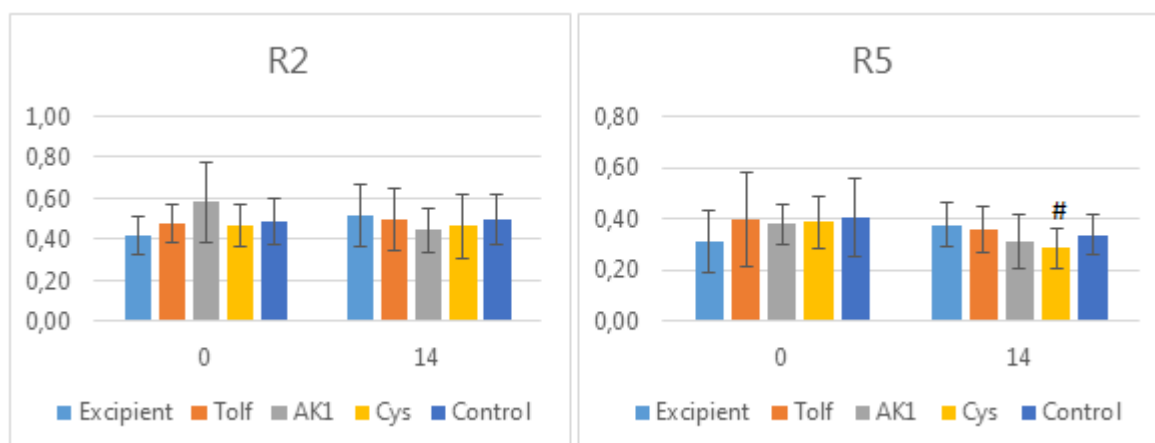
- ✓ Το πάχος του δέρματος, ακολουθεί μία σταθερή ανοδική πορεία μέχρι την 4^η ημέρα της φλεγμονής. Την ημέρα εκείνη, παρατηρείται έξαρση της φλεγμονής και υπερπύκνωση της επιδερμίδας σε όλες τις ομάδες όπως αναμενόταν καθώς η επιδερμική υπερπλασία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας ενάντια στην εισχώρηση της UVR στο δέρμα (D' Orazio et al., 2013).
- ✓ Από τον **Πίνακα 20** φαίνεται ότι τη 14^η ημέρα, σε όλες τις ομάδες εκτός του Excipient δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά σε σχέση με τη ημέρα πριν την ακτινοβολήση (ημέρα 0). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι μόνο στην ομάδα του Excipient δεν επανήλθε το πάχος του δέρματος στην πρότερή του κατάσταση.
- ✓ Σημαντικές διαφορές σημειώνονται την 4^η ημέρα, για την ομάδα Tolf, καθώς εμφανίζει τη μικρότερη υπερπλασία σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες (**Πίνακας 21**).
- ✓ Συμπερασματικά, το τολφαιναμικό οξύ (Tolf) φαίνεται ότι προστάτευσε περισσότερο την 4^η ημέρα (έξαρση φλεγμονής) ενώ δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές στο πάχος του δέρματος μεταξύ των ομάδων στο τέλος του πειράματος.

7.1.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας

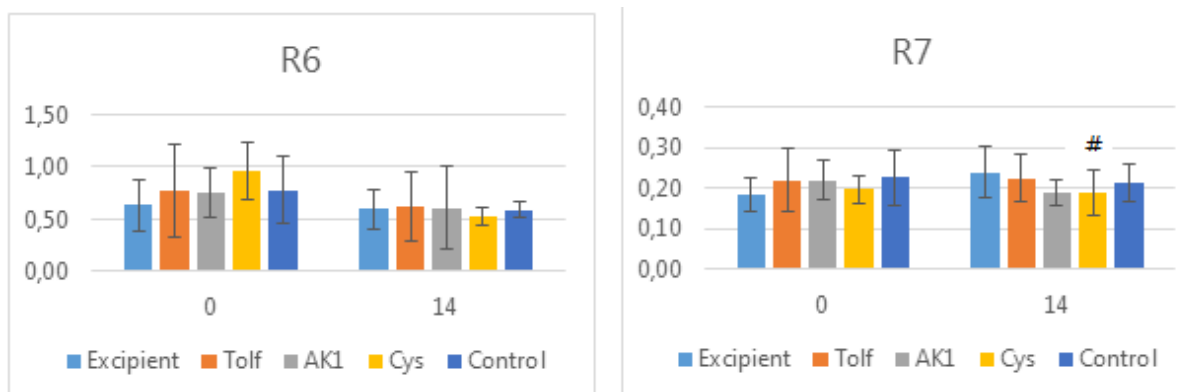
Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των διαφόρων παραμέτρων (R2, R5, R6, R7, βλ. Υλικά και Μέθοδοι) της ελαστικότητας που μετρήθηκαν στην αρχή (ημέρα 0-πριν την πρόκληση φλεγμονής) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-μετά την πρόκληση φλεγμονής) δίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 22** και τα **Διαγράμματα 4-5**.

Πίνακας 22. Μέσος όρος τιμών ($\pm$ τυπική απόκλιση) των παραμέτρων (R2, R5, R6, R7) της ελαστικότητας (n=8) την ημέρα 0 και την ημέρα 14.

ΟΜΑΔΑ	R2		R5		R6		R7	
	0	14	0	14	0	14	0	14
Excipient	0,42 ($\pm 0,09$)	0,52 ($\pm 0,15$)	0,31 ($\pm 0,12$)	0,38 ($\pm 0,09$)	0,63 ($\pm 0,25$)	0,60 ($\pm 0,18$)	0,18 ($\pm 0,04$)	0,24 ($\pm 0,06$)
Tolf	0,48 ($\pm 0,15$)	0,50 ($\pm 0,17$)	0,40 ($\pm 0,19$)	0,36 ($\pm 0,09$)	0,77 ($\pm 0,45$)	0,62 ($\pm 0,33$)	0,22 ($\pm 0,08$)	0,23 ($\pm 0,06$)
AK1	0,58 ($\pm 0,20$)	0,44 ($\pm 0,11$)	0,38 ($\pm 0,08$)	0,31 ($\pm 0,11$)	0,75 ($\pm 0,23$)	0,61 ($\pm 0,40$)	0,22 ($\pm 0,05$)	0,19 ($\pm 0,03$)
Cys	0,47 ($\pm 0,10$)	0,46 ($\pm 0,16$)	0,39 ($\pm 0,10$)	0,28 ($\pm 0,08$)	0,96 ($\pm 0,27$)	0,53 ($\pm 0,09$)	0,20 ($\pm 0,04$)	0,19 ($\pm 0,06$)
Control	0,49 ($\pm 0,12$)	0,50 ($\pm 0,12$)	0,41 ($\pm 0,15$)	0,34 ($\pm 0,08$)	0,78 ($\pm 0,32$)	0,59 ($\pm 0,08$)	0,23 ($\pm 0,07$)	0,21 ($\pm 0,05$)



Διάγραμμα 4. Μεταβολή της παραμέτρου R2 και R5 τη 0 και τη 14^η ημέρα.



Διάγραμμα 5. Μεταβολή της παραμέτρου R6 και R7 τη 0 και τη 14^η ημέρα.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές των παραμέτρων της ελαστικότητας ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 23**.

Πίνακας 23. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές παραμέτρων ελαστικότητας.

ΟΜΑΔΑ	R2		R5		R6		R7	
	0	14	0	14	0	14	0	14
Excipient	0,822	0,628	0,657	0,839	0,980	0,870	0,832	0,856
Tolf	0,985	0,228	0,849	0,700	0,322	0,592	0,895	0,985
Cys	0,703	0,924	0,995	0,903	0,762	0,487	0,982	0,270
AK1	0,603	0,791	0,928	0,278	0,850	0,619	0,604	0,521
Control	0,543	0,814	0,888	0,978	0,840	0,747	0,900	0,976

Στον **Πίνακα 23** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή του πάχους ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 24**.

Πίνακας 24. Paired t-test για σύγκριση τιμών παραμέτρων ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	R2	-0,24	0,03	0,108
	R5	-0,20	0,06	0,268
	R6	-0,27	0,34	0,792
	R7	-0,12*	0,01	0,075
Tolf 5%	R2	-0,27	0,23	0,834
	R5	-0,15	0,23	0,647
	R6	-0,369	0,67	0,500
	R7	-0,12	0,11	0,914
AK1 5%	R2	-0,04	0,31	0,104
	R5	-0,04	0,18	0,186
	R6	-0,32	0,60	0,489
	R7	-0,01	0,07	0,134
Cys 5%	R2	-0,16	0,17	0,972
	R5	0,01	0,19	0,031
	R6	0,17	0,70	0,006
	R7	-0,04	0,06	0,686
Control	R2	-0,11	0,10	0,885
	R5	-0,05	0,19	0,232
	R6	-0,07	0,45	0,138
	R7	-0,04	0,07	0,515

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στους **Πίνακες 25-26**.

Πίνακας 25. One way-ANOVA για σύγκριση τιμών παραμέτρου R5 την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Cys 5% - Excipient	0,046	LSD

Πίνακας 26. One way-ANOVA για σύγκριση τιμών παραμέτρου R7 την ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.

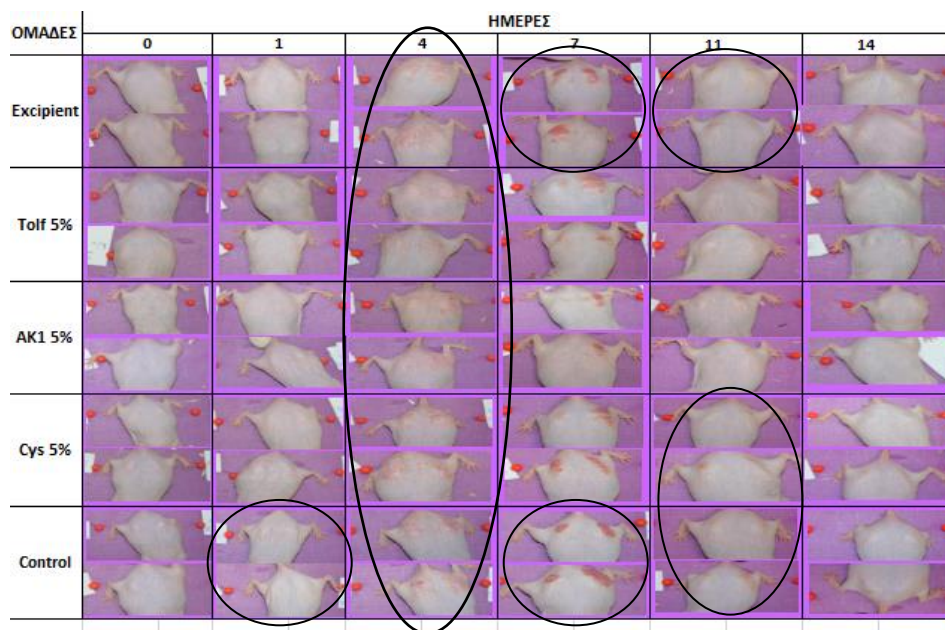
ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Cys 5% - Excipient	0,052	LSD

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 4-7** και αντίστοιχοι πίνακες) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Όλες οι ομάδες εμφανίζουν μία πτώση στην ελαστικότητα του δέρματος, ενώ σημαντική μείωση παρατηρείται μόνο στην Cys 5% σε σχέση με τις αρχικές τιμές των παραμέτρων R5 και R6 (**Πίνακας 24**).
- ✓ Επιπλέον, την τελευταία ημέρα η Cys έχει οριακά σημαντικά χαμηλότερες τις παραμέτρους R5 και R7 (επομένως μικρότερη ελαστικότητα) σε σχέση με την ομάδα Excipient (μεγαλύτερη ελαστικότητα) (**Πίνακες 25-26**).
- ✓ Οι υπόλοιπες ομάδες δεν εμφανίζουν διαφορές στην ελαστικότητα μεταξύ της 0 και της 14^{ης} ημέρας, υποδηλώνοντας ότι η ελαστικότητα επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα ή δεν επηρεάστηκε σημαντικά (**Πίνακας 24**).
- ✓ Συμπερασματικά, η ελαστικότητα είναι μία παράμετρος που συνήθως επηρεάζεται σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής/γήρανσης του δέρματος και όχι τόσο σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής όπως στην παρούσα μελέτη. Αυτό το συμπέρασμα συμβαδίζει και με τα παραπάνω αποτελέσματα όπου εκτός από την ομάδα Cys που εμφανίζει πτώση στην ελαστικότητα του δέρματος, οι υπόλοιπες ομάδες δεν εμφανίζουν σημαντικές αλλαγές.

7.1.5. Φωτοτεκμηρίωση

Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ελήφθησαν φωτογραφίες από όλα τα ζώα της κάθε ομάδας. Από αυτές 2 ενδεικτικές φωτογραφίες από κάθε ομάδα που πάρθηκαν στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) παρατίθενται στην **Εικόνα 13**.



Εικόνα 13. Ενδεικτικές φωτογραφίες κάθε ομάδας τις ημέρες 0, 1, 4, 7, 11 και 14.

Από τη μελέτη της κατάστασης του δέρματος (ερύθημα, οίδημα, ξηροδερμία) των αντίστοιχων πειραματοζώων (ενδεικτικές φωτογραφίες στην **Εικόνα 13**) συμπεραίνεται ότι:

- ✓ Την ημέρα 1 μετά την ακτινοβολήση, δεν φαίνονται ακόμη στοιχεία φλεγμονής ούτε διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, παρατηρήθηκε οίδημα στην ομάδα των μαρτύρων (Control).
- ✓ Την 4^η ημέρα (έξαρση φλεγμονής) παρατηρείται εμφάνιση διάχυτης ερυθρότητας, ξηροδερμίας και οίδημα εμφανίζεται πλέον σε όλες τις ομάδες. Καλύτερη κλινική εικόνα παρουσιάζει η ομάδα Tolf ενώ οι μάρτυρες (Control) τη χειρότερη.
- ✓ Την 7^η ημέρα το οίδημα αρχίζει να υποχωρεί. Σε όλες τις ομάδες η ένταση του ερυθήματος έχει αυξηθεί ενώ η ερυθρότητα είναι πλέον εντοπισμένη. Τη χειρότερη εικόνα δείχνουν οι ομάδες Excipient και Control.
- ✓ Την 11^η ημέρα η φλεγμονή φαίνεται να υποχωρεί σημαντικά σε όλες τις ομάδες με υπόλοιπα ερυθήματος κυρίως στις ομάδες Excipient, Control και Cys.
- ✓ Τη 14^η ημέρα το δέρμα των μυών έχει σχεδόν επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση.
- ✓ Συνολικά, την καλύτερη κλινική εικόνα επέδειξαν οι ομάδες Tolf και AK1 ενώ τη μεγαλύτερη επιδείνωση κατά τη διάρκεια του πειράματος εμφάνισε η ομάδα Control.

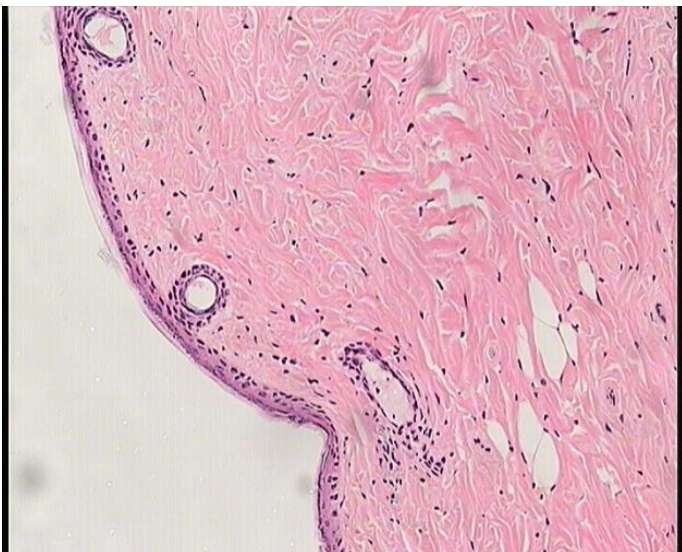
7.1.6. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης

Από τα δείγματα δέρματος που ελήφθησαν στο τέλος του πειράματος, σχηματίστηκαν τομές στις οποίες έγινε χρώση αιμοτοξυλίνης-ηωσίνης και παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο και βγήκαν συμπεράσματα για τη φλεγμονή, την υπερκεράτωση και τον ερεθισμό. Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες δέρματος από κάθε ομάδα.



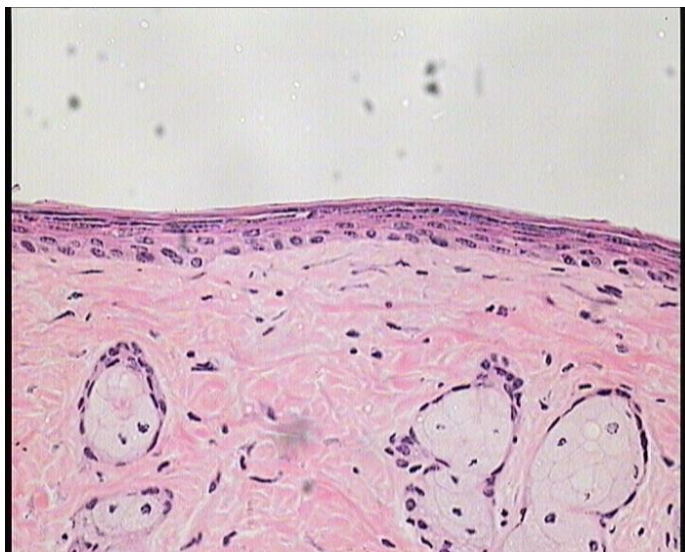
Εικόνα 14. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x200).

Η ομάδα του εκδόχου (Excipient) παρουσιάζει υπερκεράτωση με εμφανή κοκκία κερατοϋαλίνης (στοιχεία ωρίμανσης των κυττάρων της επιδερμίδας), καθώς και αραιά λεμφοκύτταρα (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 15. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 5% (μεγέθυνση x200).

Η ομάδα Tolf 5% εμφανίζει φυσιολογική επιδερμίδα, αλλά τα φλεγμονώδη στοιχεία είναι έντονα (παρόμοια εικόνα με μάρτυρες, Control) (**Εικόνα 15**)



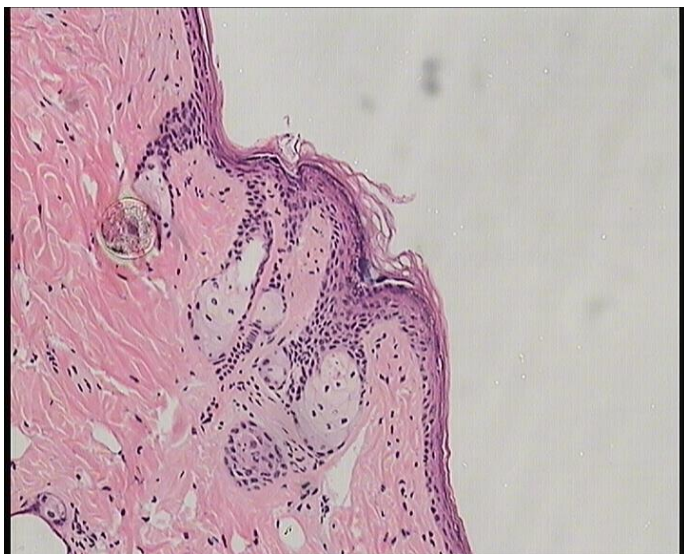
Εικόνα 16. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 5% (μεγέθυνση x400).

Στην ομάδα Cys 5% δεν παρατηρείται υπερκεράτωση ενώ σημειώνονται ελάχιστα μεμονωμένα λεμφοκύτταρα (**Εικόνα 16**).



Εικόνα 17. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 5% (μεγέθυνση x400).

Η ομάδα της ένωσης AK1 5% εμφανίζει φυσιολογική επιδερμίδα χωρίς φλεγμονώδη στοιχεία (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 18. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x200).

Οι ομάδα των μαρτύρων (Control) παρουσιάζει ήπια εστιακή υπερκεράτωση στην επιδερμίδα με εμφανή κοκκία κερατοϋαλίνης. Παρατηρούνται αραιά μεμονωμένα λεμφοκύτταρα (**Εικόνα 18**).

Συμπερασματικά, την καλύτερη εικόνα δέρματος επέδειξε απ' όλες τις ομάδες, η ομάδα AK1 ενώ τη χειρότερη η ομάδα Control.

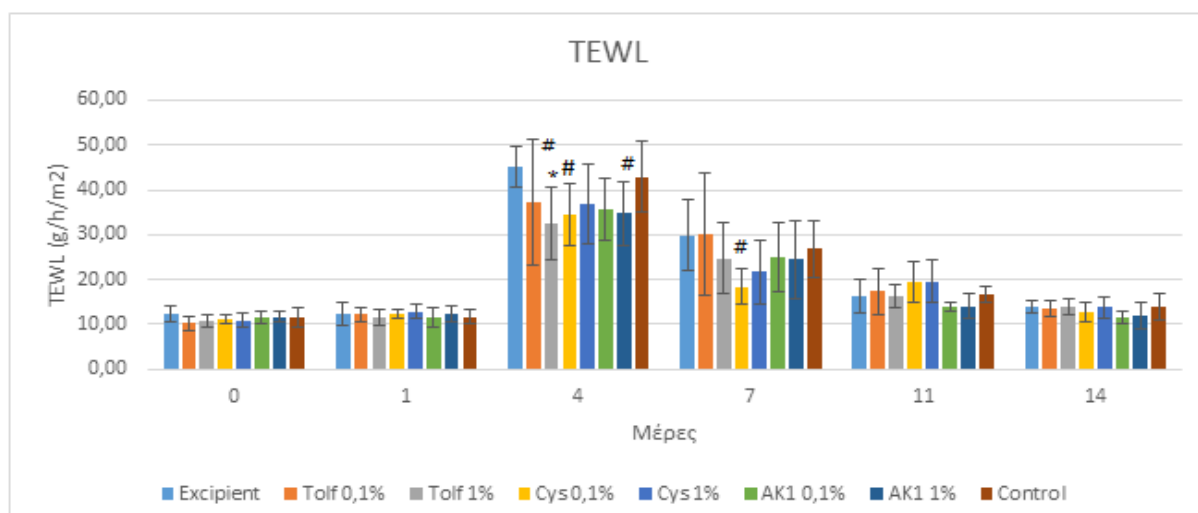
7.2. Πειραματική μελέτη 2

7.2.1. Αποτελέσματα TEWL

Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της TEWL στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) δίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 27** και το αντίστοιχο **Διάγραμμα 6**.

Πίνακας 27. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	12,37 ($\pm 1,59$)	12,38 ($\pm 2,66$)	45,08 ($\pm 4,45$)	29,92 ($\pm 7,89$)	16,33 ($\pm 3,91$)	13,83 ($\pm 1,40$)
Tolf 0,1%	10,22 ($\pm 1,58$)	12,18 ($\pm 1,52$)	37,30 ($\pm 14,02$)	30,17 ($\pm 13,8$)	17,33 ($\pm 5,24$)	13,42 ($\pm 1,75$)
Tolf 1%	10,87 ($\pm 1,43$)	11,45 ($\pm 1,79$)	32,50 ($\pm 7,97$)	24,80 ($\pm 7,88$)	16,22 ($\pm 2,49$)	13,92 ($\pm 1,80$)
Cys 0,1%	11,25 ($\pm 0,99$)	12,38 ($\pm 1,01$)	34,40 ($\pm 6,89$)	18,33 ($\pm 3,99$)	19,35 ($\pm 4,58$)	12,67 ($\pm 2,15$)
Cys 1%	10,92 ($\pm 1,66$)	12,95 ($\pm 1,73$)	36,87 ($\pm 8,72$)	21,67 ($\pm 7,17$)	19,60 ($\pm 4,75$)	13,85 ($\pm 2,34$)
AK1 0,1%	11,60 ($\pm 1,24$)	11,52 ($\pm 2,19$)	35,68 ($\pm 6,92$)	25,05 ($\pm 7,74$)	13,97 ($\pm 0,82$)	11,57 ($\pm 1,24$)
AK1 1%	11,73 ($\pm 1,18$)	12,35 ($\pm 1,76$)	34,77 ($\pm 7,18$)	24,52 ($\pm 8,79$)	14,13 ($\pm 2,81$)	11,95 ($\pm 3,12$)
Control	11,43 ($\pm 2,18$)	11,73 ($\pm 1,51$)	42,9 ($\pm 7,94$)	26,85 ($\pm 6,34$)	16,80 ($\pm 1,86$)	13,83 ($\pm 2,97$)



Διάγραμμα 6. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 31-34) εντός της ίδιας ημέρας.

	Ποσοστιαία Μεταβολή
Excipient	14%
Tolf 0,1%	33%
Tolf 1%	32%
Cys 0,1%	12%
Cys 1%	30%
AK1 0,1%	1%
AK1 1%	3%
Control	28%

Εικόνα 19. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της TEWL καθώς και οι μεταβολές των τιμών της ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους Πίνακες 28-29.

Πίνακας 28. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΡΕΣ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	0,873	0,982	0,976	0,994	0,975	0,990
Tolf 0,1%	0,860	0,831	0,979	0,992	0,450	0,980
Tolf 1%	0,999	0,562	0,93	0,835	0,825	0,979
Cys 0,1%	0,752	0,616	0,958	0,988	0,974	1,000
Cys 1%	0,849	0,968	0,906	0,706	0,995	0,98
AK1 0,1%	0,906	0,674	0,992	0,99	0,857	0,842
AK1 1%	0,951	0,969	0,849	0,925	0,858	0,925
Control	0,566	0,973	0,995	0,991	0,519	0,851

Πίνακας 29. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβολής της TEWL από την ημέρα 0 έως τη 14.

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ TEWL 0-14
Excipient	0,998
Tolf 0,1%	0,971
Tolf 1%	0,986
Cys 0,1%	0,768
Cys 1%	0,959
AK1 0,1%	0,612
AK1 1%	0,727
Control	0,903

Στους **Πίνακες 28-29** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή TEWL ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test, ANOVA και Independent t-test).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 30**.

Πίνακας 30. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της TEWL τις μέρες 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	-36,82	-28,61	0,000
	4-14	25,77	36,73	0,000
	0-14	-3,71	0,778	0,154
Tolf 0,1%	0-4	-42,47	-11,70	0,006
	4-14	9,15	38,61	0,009
	0-14	-5,44	-0,96	0,014
Tolf 1%	0-4	-30,55	-12,72	0,002
	4-14	10,08	27,09	0,002
	0-14	-6,33	0,23	0,063
Cys 0,1%	0-4	-30,48	-15,82	0,000
	4-14	14,76	28,71	0,000
	0-14	-3,01	0,18	0,072
Cys 1%	0-4	-35,12	-16,78	0,001

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
	4-14	14,03	32,01	0,001
	0-14	-6,57	0,70	0,093
AK1 0,1%	0-4	-32,25	-15,92	0,001
	4-14	17,74	30,49	0,000
	0-14	-2,13	2,20	0,970
AK1 1%	0-4	-29,61	-16,46	0,000
	4-14	16,13	29,50	0,000
	0-14	-3,64	3,21	0,877
Control	0-4	-41,70	-21,23	0,001
	4-14	20,98	37,15	0,000
	0-14	-7,26	2,46	0,261

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$, απεικονίζονται στους **Πίνακες 31-33**.

Πίνακας 31. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Excip-Tolf 1%	0,013
	Excip-Cys 0,1%	0,034
	Excip-AK1 1%	0,040
	Tolf 1% - Control	0,038

Πίνακας 32. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 7 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Excip - Cys 0.1%	0,021
	Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,019

Πίνακας 33. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Cys 0,1% - AK1 0.1%	0,014
	Cys 0,1% - AK1 1%	0,017
	Cys 1% - AK1 0.1%	0,010
	Cys 1% - AK1 1%	0,012

Τα αποτελέσματα του Independent t-test μεταξύ των ομάδων AK1 0.1% και Tolf 0.1% απεικονίζονται στον **Πίνακα 34**.

Πίνακας 34. Independent t-test για τη σύγκριση της μεταβολής της TEWL σε 14 μέρες μεταξύ των ομάδων AK1 0.1% και Tolf 0.1%.

	P	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ
Equal variances assumed	0,024	0,053	0,59
Equal variances not assumed	0,024	0,052	0,59

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 6** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Παρατηρούμε ότι την 4^η ημέρα του πειράματος εμφανίζονται οι μεγαλύτερες τιμές άδηλης απώλειας νερού. Στη συνέχεια οι τιμές ακολουθούν μία πτωτική πορεία μέχρι τη 14^η ημέρα που οι τιμές πλησιάζουν τις αρχικές.
- ✓ Από την **Εικόνα 19** παρατηρούμε ότι οι ομάδες στις οποίες εφαρμόστηκε η ένωση παρουσιάζουν τη μικρότερη μεταβολή σε βάθος χρόνου 14 ημερών ενώ τη μεγαλύτερη μεταβολή εμφανίζουν οι ομάδες που έλαβαν τολφαιναμικό οξύ. Επιπλέον, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε AK1 0.1% και της ομάδας Tolf 0.1% ($p=0,024<0,05$) που ελέγχθηκε με independent t-test (**Πίνακας 34**).
- ✓ Από τον **Πίνακα 30** παρατηρούμε ότι οι όλες οι ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ των ημερών 0 και 4, καθώς και 4 με 14, ενώ μόνο η ομάδα Tolf 0.1% παρουσιάζει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των ημερών 0 και 14 υποδηλώνοντας ότι ο φραγμός δεν έχει επανέλθει στην αρχική του κατάσταση. Στα ίδια συμπεράσματα μας οδηγούν και οι τιμές στα διαστήματα εμπιστοσύνης.
- ✓ Την 4^η ημέρα η ομάδα του εκδόχου (Excipient) παρουσιάζει στατιστικά μεγαλύτερη τιμή συγκριτικά με τις ομάδες που έλαβαν Tolf 1%, Cys 0.1% και την

ένωση AK1 1% ενώ η ομάδα Tolf 1% διαφέρει σημαντικά και από τους μάρτυρες (Control) (**Πίνακας 31**).

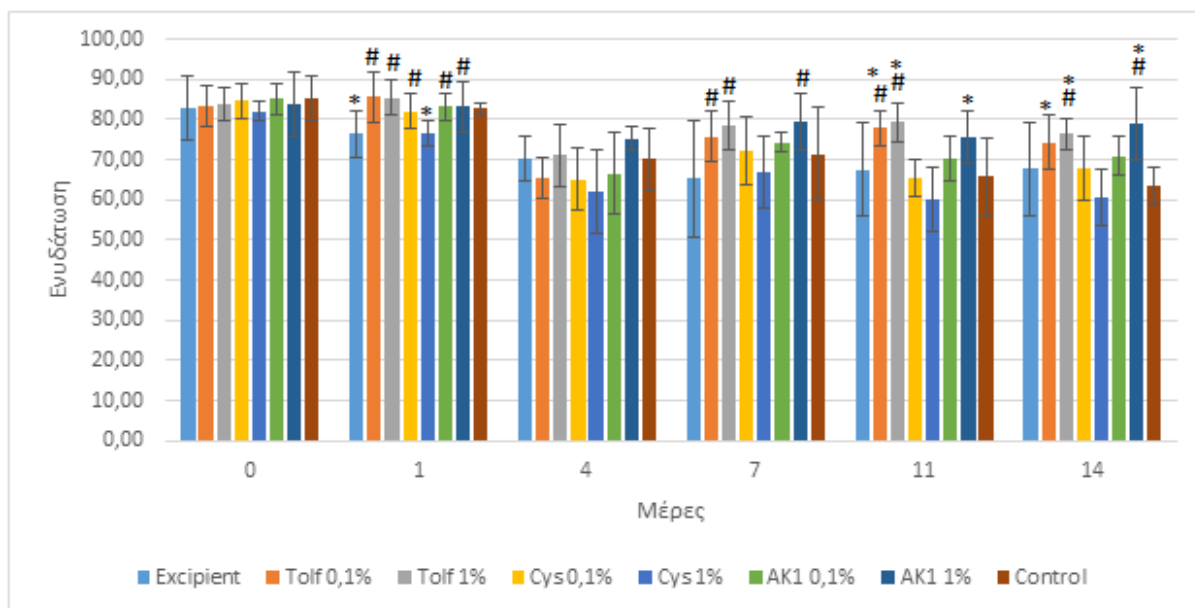
- ✓ Την 7^η ημέρα η ομάδα της κυστεΐνης (Cys) 0,1% παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη τιμή TEWL σε σχέση με την ομάδα του εκδόχου καθώς και με την ομάδα του τολφαιναμικού οξέος 0,1% (**Πίνακας 32**).
- ✓ Όσον αφορά την ημέρα 11, διαπιστώνεται ότι η ομάδα Cys 1% παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη τιμή TEWL συγκριτικά με τις ομάδες που έλαβαν την ένωση AK1 σε ποσοστό 1% και 0,1%. Επίσης, σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ της ομάδας Cys 0.1% σε σχέση με τις ομάδες που έλαβαν την ένωση AK1 σε ποσοστό 1% και 0,1% (**Πίνακας 33**).
- ✓ Τις ημέρες 1 και 14 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.
- ✓ Συνολικά, τη μικρότερη βλάβη στον επιδερμικό φραγμό εμφανίζουν οι ομάδες AK1 1% και AK1 0.1%.

7.2.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της ενυδάτωσης στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) παρατίθενται στον **Πίνακα 35** και στο αντίστοιχο **Διάγραμμα 7**.

Πίνακας 35. Μέσος όρος τιμών της ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΡΑ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	83,00 ($\pm 8,10$)	76,50 ($\pm 5,86$)	70,17 ($\pm 5,64$)	65,33 ($\pm 14,57$)	67,57 ($\pm 11,62$)	67,67 ($\pm 11,81$)
Tolf 0,1%	83,33 ($\pm 5,16$)	85,67 ($\pm 6,28$)	65,33 ($\pm 5,16$)	75,83 ($\pm 6,27$)	77,83 ($\pm 4,36$)	74,33 ($\pm 6,89$)
Tolf 1%	83,33 ($\pm 4,31$)	85,50 ($\pm 4,23$)	71,17 ($\pm 7,70$)	78,67 ($\pm 6,02$)	79,33 ($\pm 4,93$)	76,50 ($\pm 3,94$)
Cys 0,1%	84,67 ($\pm 4,32$)	82,17 ($\pm 4,17$)	65,17 ($\pm 7,70$)	72,17 ($\pm 8,52$)	65,50 ($\pm 4,51$)	67,67 ($\pm 7,99$)
Cys 1%	82,17 ($\pm 4,32$)	76,67 ($\pm 3,20$)	62,00 ($\pm 10,41$)	67,00 ($\pm 8,92$)	60,17 ($\pm 7,83$)	60,67 ($\pm 7,23$)
AK1 0,1%	85,17 ($\pm 3,87$)	83,17 ($\pm 3,19$)	66,50 ($\pm 10,19$)	74,33 ($\pm 2,50$)	70,50 ($\pm 5,54$)	71,00 ($\pm 4,69$)
AK1 1%	83,83 ($\pm 7,91$)	83,17 ($\pm 6,15$)	75,33 ($\pm 3,01$)	79,50 ($\pm 7,09$)	75,50 ($\pm 6,57$)	79,17 ($\pm 8,91$)
Control	85,33 ($\pm 5,65$)	82,67 ($\pm 1,37$)	70,17 ($\pm 7,68$)	71,50 ($\pm 11,83$)	65,83 ($\pm 9,60$)	63,5 ($\pm 4,68$)



Διάγραμμα 7. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 39-44) εντός της ίδιας ημέρας.

	Ποσοστιαία Μεταβολή
Excipient	-19%
Tolf 0,1%	-25%
Tolf 1%	-8%
Cys 0,1%	-20%
Cys 1%	-26%
Ak1 0,1%	-16%
Ak1 1%	-6%
Control	-25%

Εικόνα 20. Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης των ομάδων σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ενυδάτωσης καθώς και οι μεταβολές των τιμών της ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους Πίνακες 36-37.

Πίνακας 36. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της ενυδάτωσης.

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΡΕΣ					
	0	1	4	7	11	14
Excipient	0,905	0,922	0,774	0,992	0,841	0,986
Tolf 0.1%	0,337	0,247	0,999	0,859	0,765	0,986
Tolf 1%	0,989	0,982	0,982	0,581	0,932	0,940
Cys 0,1%	0,766	0,833	1,000	0,914	0,952	0,537
Cys 1%	0,955	0,957	0,673	0,829	0,956	0,983
AK1 0.1%	0,987	0,601	0,662	0,913	0,966	0,966
AK1 1%	0,756	0,634	0,731	0,889	0,823	0,688
Control	0,947	0,889	0,994	0,956	0,913	0,764

Πίνακας 37. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβολής των τιμών της ενυδάτωσης.

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ 0-14
Excipient	0,929
Tolf 0,1%	0,932
Tolf 1%	0,751
Cys 0,1%	0,999
Cys 1%	0,991
AK1 0,1%	0,444
AK1 1%	1,000
Control	0,966

Στους **Πίνακες 36-37** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή ενυδάτωση ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 38**.

Πίνακας 38. Paired t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τις μέρες 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	1,94	23,73	0,029
	4-14	-10,11	15,11	0,632
	0-14	7,35	23,32	0,004
Tolf 0.1%	0-4	10,15	25,86	0,002
	4-14	-11,97	-6,03	0,001
	0-14	0,55	17,45	0,041
Tolf 1%	0-4	4,02	21,31	0,013
	4-14	-14,25	3,59	0,185
	0-14	-0,81	15,48	0,069
Cys 0.1%	0-4	9,29	29,71	0,004
	4-14	-10,06	5,06	0,434
	0-14	10,01	23,99	0,002
Cys 1%	0-4	8,82	31,52	0,006
	4-14	-9,18	11,84	0,758
	0-14	12,19	30,81	0,002
AK1 0.1%	0-4	5,05	32,28	0,017
	4-14	-16,93	7,93	0,395
	0-14	6,91	21,42	0,004
AK1 1%	0-4	2,32	14,69	0,017
	4-14	-11,09	3,42	0,232
	0-14	0,08	9,25	0,047
Control	0-4	4,90	25,44	0,013
	4-14	0,93	12,40	0,031
	0-14	14,97	28,68	0,000

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$, απεικονίζονται στους **Πίνακες 39-45**.

Πίνακας 39. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
Tukey HSD	Excipient – Tolf 0.1%	0,026
	Excipient –Tolf 1%	0,031
	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,031
	Tolf 1% - Cys 1%	0,036
LSD	Excipient – Tolf 0.1%	0,001
	Excipient –Tolf 1%	0,002
	Excipient – Cys 0.1%	0,039
	Excipient – AK1 0.1%	0,016
	Excipient – AK1 1%	0,016
	Excipient - Control	0,025
	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,002
	Tolf 1% - Cys 1%	0,002
	Cys 0.1% - Cys 1%	0,045
	Cys 1% - AK1 0.1%	0,019
	Cys 1% - AK1 1%	0,019
	Cys 1% - Control	0,029
Bonferroni	Excipient – Tolf 0.1%	0,037
	Excipient – Tolf 1%	0,044
	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,044
Dunnett T3	Tolf 1% - Cys 1%	0,049

Πίνακας 40. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Tolf 0.1% - AK1 1%	0,027
	Tolf 1% - Cys 1%	0,042
	Cys 0.1% - AK1 1%	0,025
	Cys 1% - AK1 1%	0,004
	AK1 0.1% - AK1 1%	0,050

Πίνακας 41. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση την ημέρα 7.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Excipient - Tolf 0.1%	0,048
	Excipient - Tolf 1%	0,013
	Excipient - AK1 1%	0,009
	Tolf 1% - Cys 1%	0,029
	Cys 1% - AK1 1%	0,020

Πίνακας 42. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση την ημέρα 11.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
Tukey HSD	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,003
	Tolf 1% - Cys 0.1%	0,040
	Tolf 1% - Cys 1%	0,001
	Tolf 1% - Control	0,049
	Cys 1% - AK1 1%	0,016
LSD	Excipient - Tolf 0.1%	0,019
	Excipient - Tolf 1%	0,008
	Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,006
	Tolf 0.1 - Cys 1%	0,000
	Tolf 0.1 - Control	0,007
	Tolf 1% - Cys 0.1%	0,002
	Tolf 1% - Cys 1%	0,000
	Tolf 1% - AK1 0.1%	0,042
	Tolf 1% - Control	0,003
	Cys 0.1% - AK1 1%	0,023
	Cys 1% - AK1 0.1%	0,019
	Cys 1% - AK1 1%	0,001
	AK1 1% - Control	0,027
Bonferroni	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,004
	Tolf 1% - Cys 1%	0,001
	Cys 1% - AK1 1%	0,022
Tamhane	Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,020
	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,038
	Tolf 1% - Cys 0.1%	0,014
	Tolf 1% - Cys 1%	0,023
Dunnett T3	Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,015
	Tolf 0.1% - Cys 1%	0,025
	Tolf 1% - Cys 0.1%	0,011
	Tolf 1% - Cys 1%	0,016

Πίνακας 43. One way-ANOVA για τη μεταβλητή Ενυδάτωση τη ημέρα 14.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ		P
Tukey HSD	Tolf 0.1%	Cys 1%	0,051
	Tolf 1%	Cys 1%	0,014
	Cys 1%	AK1 1%	0,002
	Control	AK1 1%	0,016
LSD	Excipient	Tolf 1%	0,046
	Excipient	AK1 1%	0,011
	Tolf 0.1%	Cys 1%	0,003
	Tolf 0.1%	Control	0,016
	Tolf 1%	Cys 0.1%	0,046
	Tolf 1%	Cys 1%	0,001
	Tolf 1%	Control	0,004
	Cys 0.1%	AK1 1%	0,011
	Cys 1%	AK1 0.1%	0,021
	Cys 1%	AK1 1%	0,000
	Control	AK1 1%	0,001
Bonferroni	Tolf 1%	Cys 1%	0,019
	Cys 1%	AK1 1%	0,003
	AK1 1%	Control	,021
Tamhane	Tolf 1%	Cys 1%	,046
	Tolf 1%	Control	,012
Dunnett T3	Tolf 1%	Cys 1%	,030
	Tolf 1%	Control	,009

Πίνακας 44. Independent t-test για τις τιμές της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων AK1 0.1% και Control τη 14^η ημέρα.

	P	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ
Equal variances assumed	0,020	1,47	13,53
Equal variances not assumed	0,020	1,47	13,53

Πίνακας 45. One way-ANOVA για τις τιμές των μεταβολών της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων από τη 0 ως τη 14^η ημέρα

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,053	LSD
Tolf 0.1% - Cys 1%	0,046	Tukey
	0,002	LSD
Tolf 0.1% - Control	0,004	LSD
Tolf 1% - Excipient	0,039	LSD
Tolf 1% - Cys 0.1%	0,021	LSD
Tolf 1% - Cys 1%	0,016	Tukey
	0,001	LSD
	0,021	Bonferroni
Tolf 1% - Control	0,027	Tukey
	0,001	LSD
	0,038	Bonferroni
Cys 1% - AK1 0.1%	0,046	LSD
AK1% - Excipient	0,01	LSD
AK1 % - Cys 0.1%	0,005	LSD
AK1% - Cys 1%	0,003	Tukey
	0	LSD
	0,004	Bonferroni
	0,043	Dunnnett T3
AK1 % - AK1 0.1%	0,036	LSD
AK1 1% - Control	0,005	Tukey
	0	LSD
	0,007	Bonferroni
	0,006	Tamhane
	0,005	Dunnnett T3

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 7** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Οι τιμές της ενυδάτωσης τη ημέρα πριν την ακτινοβολήση και τη ημέρα μετά παραμένουν σχεδόν σταθερές στις ομάδες μέχρι την 4^η ημέρα ενώ στη συνέχεια ακολουθούν πτωτική πορεία, μέχρι τη 14^η ημέρα (τέλος πειράματος).
- ✓ Σε βάθος χρόνου 14 ημερών τη μεγαλύτερη μείωση της ενυδάτωσης της επιδερμίδας παρουσιάζουν οι ομάδες Cys 1% και Control ενώ τη μικρότερη εμφανίζει η ομάδα της ένωσης AK1 1% και η Tolf 1% (**Εικόνα 20**).
- ✓ Καθ' όλη την πορεία της πειραματικής μελέτης η ομάδα Excipient και η Cys 1% παρουσιάζουν σταθερά χαμηλά επίπεδα ενυδάτωσης υποδηλώνοντας ότι δεν συνέλαβαν στην ενυδάτωση της επιδερμίδας σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις.

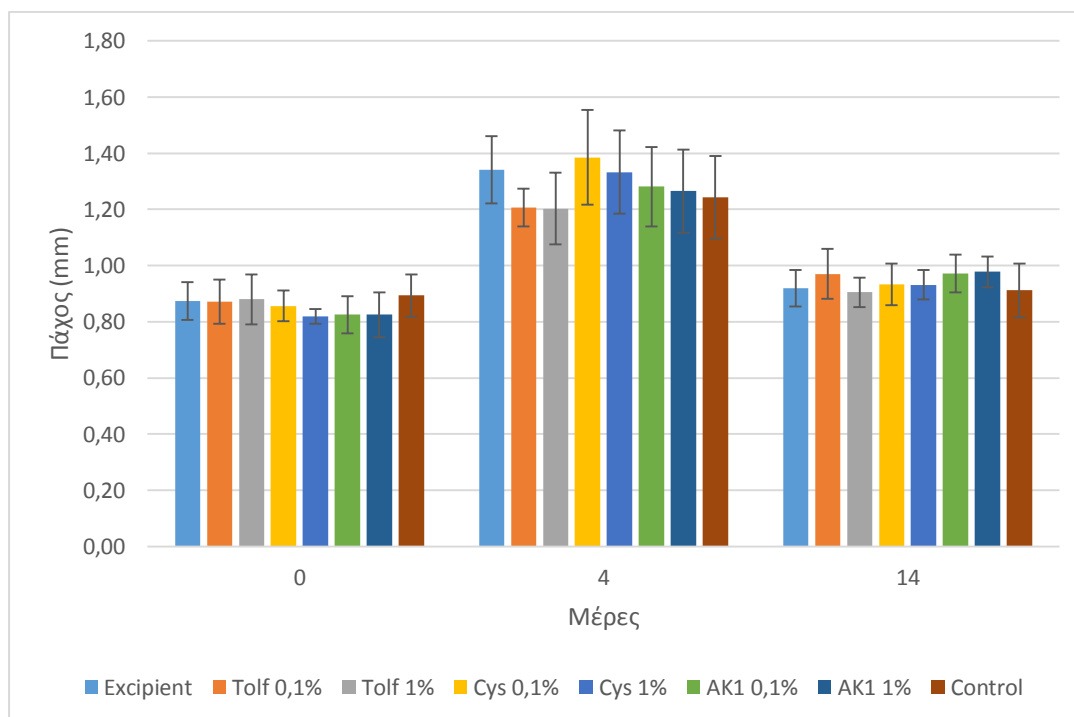
- ✓ Η ομάδα Tolf 0.1% παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη μεταβολή σε σχέση με τις ομάδες Cys, καθώς και με την Control. Αντίστοιχα, η ομάδα Tolf παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη μεταβολή από τις ομάδες Excipient, Cys και Control. Όσον αφορά τις ομάδες της υπο μελέτη ένωσης, η ομάδα AK1 0.1% εμφανίζει μικρότερη μείωση της ενυδάτωσης σε σύγκριση με την Cys 1%, ενώ η ομάδα της AK1 1% παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη μεταβολή ενυδάτωσης από τις ομάδες Control, AK1 0.1%, καθώς και τις δύο ομάδες Cys (**Πίνακας 45**).
- ✓ Την 1^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση, η ομάδα Excipient εμφανίζει σημαντικά μικρότερη ενυδάτωση από τις υπόλοιπες ομάδες εκτός της Cys 1%, καθώς κι η ίδια εμφανίζει μειωμένα επίπεδα ενυδάτωσης που πλησιάζουν αυτά του Excipient (**Πίνακας 39**).
- ✓ Την 4^η ημέρα του πειράματος, η ομάδα AK1 1% παρουσιάζει τα μεγαλύτερα επίπεδα ενυδάτωσης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες, ενώ με την ομάδα AK1 0.1% η διαφορά κυμαίνεται στα όρια της σημαντικότητας. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι οι ομάδες που έλαβαν την ένωση παρουσίασαν την καλύτερη εικόνα όσον αφορά την 4^η ημέρα (**Πίνακας 40**).
- ✓ Την 7^η ημέρα, η ομάδα Excipient καθώς και η ομάδα Cys 1% εμφανίζουν τα μικρότερα επίπεδα ενυδάτωσης. Συγκεκριμένα, η ομάδα Excipient διαφέρει σημαντικά από τις ομάδες Tolf 0.1%, Tolf 1% και AK1 1% ενώ η Cys 1% διαφέρει από τις Tolf 1% και AK1 1% (**Πίνακας 41**).
- ✓ Την 11^η ημέρα μεγάλη ενυδάτωση εμφανίζουν με φθίνουσα σειρά οι ομάδες: Tolf 1% > Tolf 0.1% > AK1 1% > AK1 0.1% ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έχει η Cys 1%. Συνεπώς, οι ομάδες Tolf διαφέρουν σημαντικά από τις ομάδες Excipient, Control, Cys 0.1% και Cys 1% ενώ η ομάδα AK1 1% διαφέρει σημαντικά από τις ομάδες Control, Cys 1% και Cys 0.1%. Τέλος, η AK1 0.1% διαφέρει σημαντικά από την ομάδα Tolf 1% (μεγαλύτερη ενυδάτωση) και από την ομάδα Cys 1% (μικρότερη ενυδάτωση) (**Πίνακας 42**).
- ✓ Όσον αφορά τη 14^η ημέρα, η σειρά των ομάδων με βάση την ενυδάτωση διαμορφώνεται ως εξής: AK1 1%, Tolf 1%, Tolf 0.1%, AK 0.1%, Cys 0.1%, Excipient, Control, Cys 1%. Με την ομάδα Control διαφέρουν οι Tolf 0.1%, Tolf 1% και AK1 1% ενώ με την ομάδα του Excipient διαφέρουν οι Tolf 1% και AK1 1%. Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται και μεταξύ των ομάδων Cys 1% με AK1 1%, AK1 % και Cys 0.1% με AK1%, AK1 0.1% με Control, Tolf 1% με Cys 0.1% και Cys 1%, και τέλος μεταξύ των ομάδων Cys 1% με Tolf 0.1% (**Πίνακας 43-44**).
- ✓ Συμπερασματικά, η AK1 και η ομάδες Tolf διατήρησαν υψηλά επίπεδα ενυδάτωσης διαφέροντας σημαντικά από τις ομάδες Excipient και Control καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος.

7.2.3. Αποτελέσματα Πάχους

Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων του πάχους στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) παρατίθενται στον **Πίνακα 46** και το αντίστοιχο **Διάγραμμα 8**.

Πίνακας 46. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ		
	0	4	14
Excipient	0,87 ($\pm 0,07$)	1,34 ($\pm 0,12$)	0,92 ($\pm 0,06$)
Tolf 0,1%	0,87 ($\pm 0,08$)	1,21 ($\pm 0,07$)	0,97 ($\pm 0,09$)
Tolf 1%	0,88 ($\pm 0,09$)	1,20 ($\pm 0,13$)	0,91 ($\pm 0,05$)
Cys 0,1%	0,86 ($\pm 0,05$)	1,39 ($\pm 0,17$)	0,93 ($\pm 0,07$)
Cys 1%	0,82 ($\pm 0,03$)	1,33 ($\pm 0,15$)	0,93 ($\pm 0,05$)
AK1 0,1%	0,83 ($\pm 0,07$)	1,28 ($\pm 0,14$)	0,97 ($\pm 0,07$)
AK1 1%	0,83 ($\pm 0,08$)	1,27 ($\pm 0,15$)	0,98 ($\pm 0,05$)
Control	0,89 ($\pm 0,08$)	1,24 ($\pm 0,15$)	0,91 ($\pm 0,10$)



Διάγραμμα 8. Μεταβολή πάχους δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές του πάχους ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 47**.

Πίνακας 47. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους.

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΡΕΣ		
	0	4	14
Excipient	0,999	0,308	0,703
Tolf 0,1%	0,956	0,863	0,949
Tolf 1%	0,993	0,994	0,865
Cys 0,1%	0,943	0,962	0,869
Cys 1%	0,996	0,869	0,994
AK1 0,1%	0,985	0,995	0,682
AK1 1%	0,877	0,984	0,845
Control	0,987	0,988	0,943

Στον **Πίνακα 47** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή TEWL ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 48**.

Πίνακας 48. Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	-0,562	-0,37	0,000
	4-14	0,31	0,54	0,000
	0-14	-0,13	0,03	0,200
Tolf 0,1%	0-4	-0,41	-0,26	0,000
	4-14	0,13	0,34	0,002
	0-14	-0,18	-0,02	0,028
Tolf 1%	0-4	-0,46	-0,19	0,002
	4-14	0,19	0,41	0,001
	0-14	-0,11	0,06	0,465
Cys 0,1%	0-4	-0,65	-0,41	0,000
	4-14	0,33	0,57	0,000
	0-14	-0,12	-0,04	0,005
Cys 1%	0-4	-0,66	-0,36	0,000
	4-14	0,30	0,51	0,000
	0-14	-0,16	-0,07	0,001
AK1 0,1%	0-4	-0,59	-0,33	0,000
	4-14	0,17	0,45	0,002
	0-14	-0,20	-0,09	0,001
AK1 1%	0-4	-0,58	-0,30	0,000
	4-14	0,16	0,42	0,002
	0-14	-0,23	-0,08	0,003
Control	0-4	-0,48	-0,22	0,001
	4-14	0,23	0,43	0,000
	0-14	-0,10	0,06	0,567

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 49**.

Πίνακας 49. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους τη ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

ΚΡΙΤΗΡΙΟ	ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P
LSD	Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,029
	Tolf 1% - Cys 0.1%	0,026

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 8** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

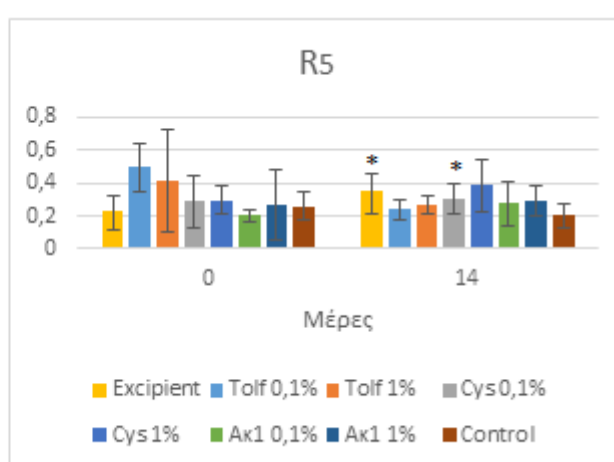
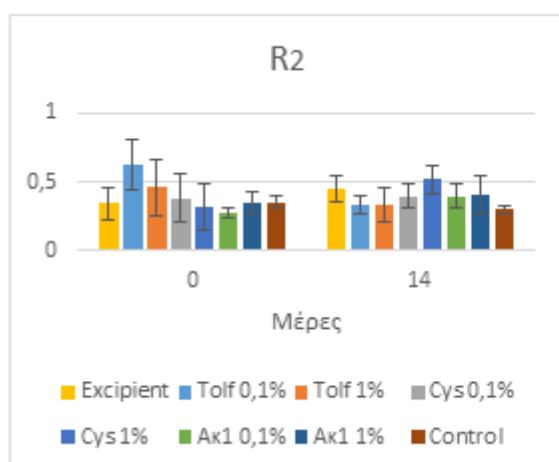
- ✓ Το πάχος του δέρματος, ακολουθεί μία σταθερή πορεία μέχρι την 4^η ημέρα της φλεγμονής. Τη ημέρα εκείνη, παρατηρείται έξαρση της φλεγμονής και υπερπάχυνση της επιδερμίδας σε όλες τις ομάδες όπως αναμενόταν καθώς η επιδερμική υπερπλασία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας ενάντια στην εισχώρηση της UVR στο δέρμα (D' Orazio et al., 2013).
- ✓ Οι ομάδες Excipient, Tolf 1% και Control δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών 0 και 14, υποδηλώνοντας ότι το πάχος έχει επανέλθει στα αρχικά του επίπεδα (**Πίνακας 48**).
- ✓ Η μόνη ημέρα που παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι η 4^η, όπου η ομάδα Tolf 1% διαφέρει από την ομάδα Cys 1% και η ομάδα Tolf 0.1% διαφέρει αντίστοιχα από την ομάδα Cys 0.1%, καθώς οι ομάδες του αιθυλεστέρα της κυστεΐνης (Cys) εμφανίζουν μεγαλύτερο πάχος (**Πίνακας 49**).

7.2.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας

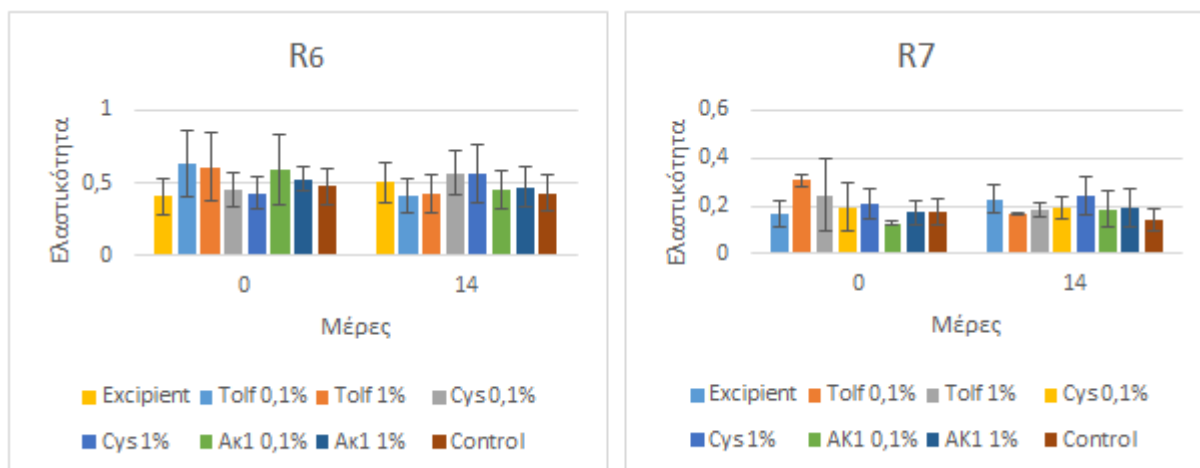
Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των διαφόρων παραμέτρων (R2, R5, R6, R7, βλ. Υλικά και Μέθοδοι) της ελαστικότητας που μετρήθηκαν στην αρχή (ημέρα 0-πριν την πρόκληση φλεγμονής) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-μετά την πρόκληση φλεγμονής) παρατίθενται στον **Πίνακα 50** και τα αντίστοιχα **Διαγράμματα 9-10**.

Πίνακας 50. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=6).

ΟΜΑΔΑ	R2		R5		R6		R7	
	0	14	0	14	0	14	0	14
Excipient	0,35 ($\pm 0,11$)	0,45 ($\pm 0,09$)	0,24 ($\pm 0,09$)	0,35 ($\pm 0,01$)	0,41 ($\pm 0,13$)	0,50 ($\pm 0,14$)	0,17 ($\pm 0,06$)	0,23 ($\pm 0,06$)
Tolf 0.1%	0,63 ($\pm 0,190$)	0,33 ($\pm 0,06$)	0,50 ($\pm 0,15$)	0,24 ($\pm 0,06$)	0,64 ($\pm 0,23$)	0,41 ($\pm 0,12$)	0,31 ($\pm 0,10$)	0,17 ($\pm 0,03$)
Tolf 1%	0,46 ($\pm 0,20$)	0,34 ($\pm 0,13$)	0,41 ($\pm 0,31$)	0,26 ($\pm 0,06$)	0,61 ($\pm 0,24$)	0,43 ($\pm 0,14$)	0,25 ($\pm 0,15$)	0,18 ($\pm 0,03$)
Cys 0.1%	0,38 ($\pm 0,18$)	0,40 ($\pm 0,09$)	0,29 ($\pm 0,16$)	0,30 ($\pm 0,09$)	0,45 ($\pm 0,12$)	0,57 ($\pm 0,15$)	0,19 ($\pm 0,10$)	0,19 ($\pm 0,05$)
Cys 1%	0,32 ($\pm 0,17$)	0,52 ($\pm 0,11$)	0,29 ($\pm 0,09$)	0,39 ($\pm 0,16$)	0,43 ($\pm 0,11$)	0,56 ($\pm 0,20$)	0,20 ($\pm 0,06$)	0,24 ($\pm 0,08$)
AK1 0.1%	0,28 ($\pm 0,04$)	0,40 ($\pm 0,09$)	0,20 ($\pm 0,04$)	0,28 ($\pm 0,14$)	0,59 ($\pm 0,24$)	0,53 ($\pm 0,09$)	0,20 ($\pm 0,04$)	0,19 ($\pm 0,06$)
AK1 1%	0,35 ($\pm 0,08$)	0,40 ($\pm 0,14$)	0,27 ($\pm 0,09$)	0,29 ($\pm 0,13$)	0,53 ($\pm 0,22$)	0,47 ($\pm 0,09$)	0,17 ($\pm 0,05$)	0,20 ($\pm 0,08$)
Control	0,35 ($\pm 0,13$)	0,30 ($\pm 0,09$)	0,26 ($\pm 0,09$)	0,20 ($\pm 0,07$)	0,47 ($\pm 0,12$)	0,43 ($\pm 0,13$)	0,17 ($\pm 0,05$)	0,14 ($\pm 0,05$)



Διάγραμμα 9. Μεταβολή των παραμέτρων R2 και R5 τη 0 και τη 14^η ημέρα: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακες 52) εντός της ίδιας ημέρας.



Διάγραμμα 10. Μεταβολή των παραμέτρων R6 και R7 τη 0 και τη 14^η ημέρα.

	% Μεταβολή R2		% Μεταβολή R5
Excipient	31%	Excipient	48%
Tolf 0,1%	-47%	Tolf 0,1%	-52%
Tolf 1%	-27%	Tolf 1%	-36%
Cys 0,1%	3%	Cys 0,1%	5%
Cys 1%	62%	Cys 1%	32%
Ak1 0,1%	43%	Ak1 0,1%	38%
Ak1 1%	17%	Ak1 1%	9%
Control	-15%	Control	-22%

Εικόνα 21. Ποσοστιαία μεταβολή των R2 και R5 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

	% Μεταβολή R6		% Μεταβολή R7
Excipient	24%	Excipient	37%
Tolf 0,1%	-36%	Tolf 0,1%	-46%
Tolf 1%	-30%	Tolf 1%	-25%
Cys 0,1%	26%	Cys 0,1%	-2%
Cys 1%	30%	Cys 1%	18%
Ak1 0,1%	-23%	AK1 0,1%	48%
Ak1 1%	-11%	AK1 1%	13%
Control	-9%	Control	-21%

Εικόνα 22. Ποσοστιαία μεταβολή των R6 και R7 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 51**.

Πίνακας 51. Paired t-test για τις παραμέτρους της ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	R2	-0,27	0,06	0,154
	R5	-0,24	0,01	0,070
	R6	-0,25	0,05	0,157
	R7	-0,13	0,01	0,075
Tolf 0.1%	R2	0,113	0,50	0,010
	R5	0,11	0,42	0,007
	R6	-0,16	0,49	0,239
	R7	0,06	0,24	0,009
Tolf 1%	R2	-0,13	0,38	0,274
	R5	-0,20	0,49	0,321
	R6	-0,18	0,55	0,256
	R7	-0,10	0,23	0,380
Cys 0.1%	R2	-0,18	0,16	0,851
	R5	-0,18	0,15	0,834
	R6	-0,35	0,12	0,261
	R7	-0,10	0,11	0,926
Cys 1%	R2	-0,33	-0,06	0,014
	R5	-0,22	0,03	0,121
	R6	-0,25	-0,01	0,038
	R7	-0,11	0,03	0,223
AK1 0.1%	R2	-0,25	0,01	0,060
	R5	-0,22	0,07	0,225
	R6	-0,11	0,39	0,216
	R7	-0,15	0,026	0,132
AK1 1%	R2	-0,20	0,08	0,344
	R5	-0,19	0,14	0,711
	R6	-0,15	0,26	0,510
	R7	-0,11	0,06	0,532
Control	R2	-0,15	0,26	0,534
	R5	-0,10	0,22	0,396
	R6	-0,12	0,21	0,534
	R7	-0,07	0,14	0,408

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 52**.

Πίνακας 52. One way - ANOVA για σύγκριση των τιμών της R5 τη ημέρα 14 μεταξύ των ομάδων.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient-Control	0,021	LSD
Tolf 0.1% - Cys 1%	0,020	
Cys 1% - Control	0,005	

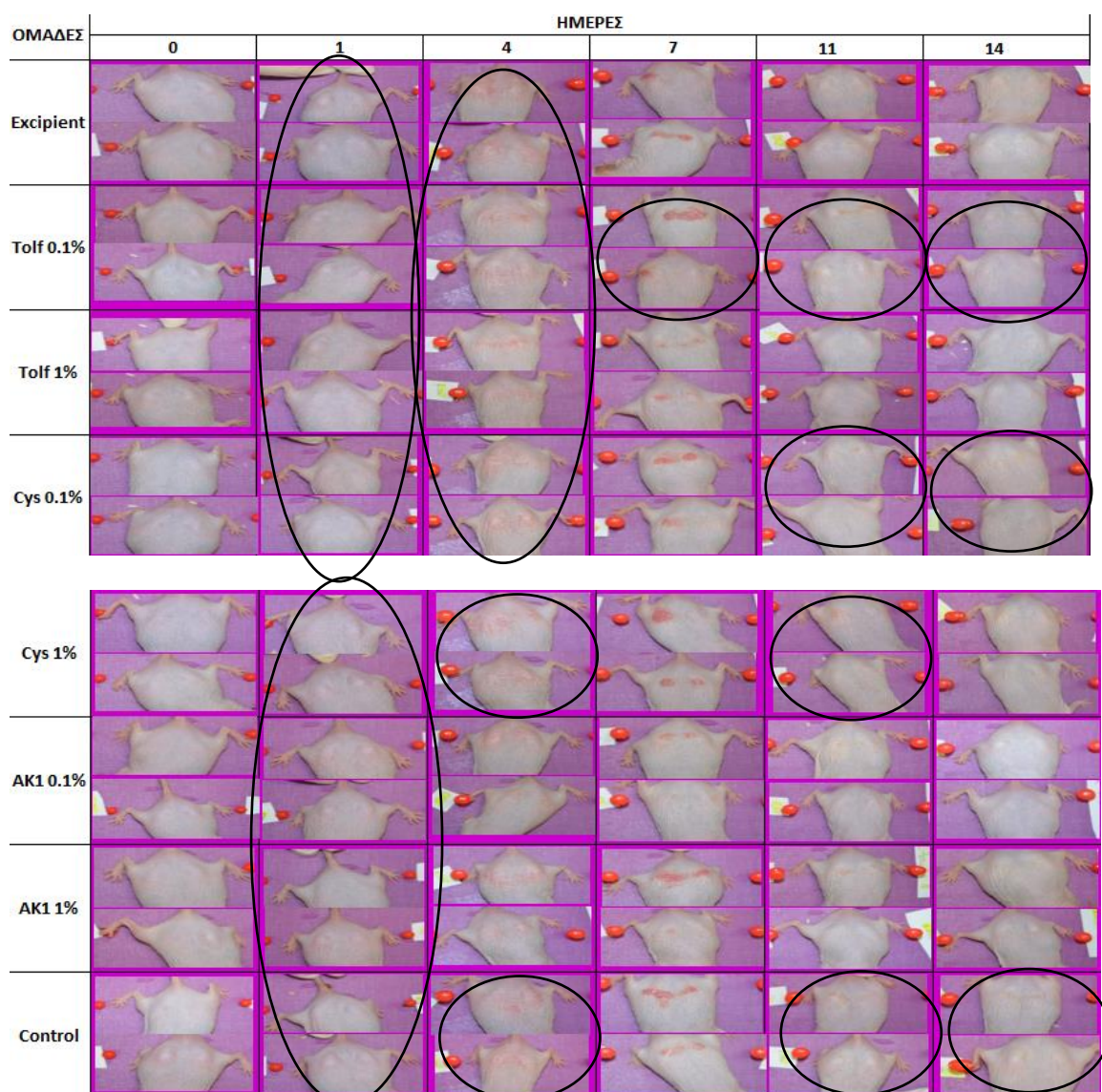
Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 9-10** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η αύξηση των μεταβλητών R2 και R5 στις ομάδες AK1 0.1%, Excipient, Cys 0.1% και AK1 1% υποδηλώνει βελτίωση της ελαστικότητας, καθώς ισχύει ότι όσο περισσότερο τείνουν οι R2 και R5 προς τη μονάδα (1), τόσο μεγαλύτερη ελαστικότητα εμφανίζει το δέρμα (**Εικόνα 21**). Αυτό επιβεβαιώνεται κι από το γεγονός ότι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών 0 και 14 (**Πίνακας 51**). Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η ελαστικότητα του δέρματος στις ομάδες αυτές επανήλθε στα αρχικά επίπεδα.
- ✓ Οι ομάδες Tolf 1% και Control παρά τη μείωση που εμφανίζουν στις παραμέτρους R2, R5, R7 δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών 0 και 14 (**Πίνακας 51**). Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η ελαστικότητα του δέρματος και σε αυτές τις ομάδες επανήλθε στα αρχικά επίπεδα.
- ✓ Αντίθετα, η ομάδα Tolf 0.1% παρουσιάζει διαφορές στις παραμέτρους R2, R5, R7 μεταξύ της αρχικής (ημέρα 0) και της τελικής ημέρας (ημέρα 14), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ελαστικότητα του δέρματος δεν έχει επανέλθει πλήρως στο τέλος της πειραματικής μελέτης και έχει μειωθεί σημαντικά (**Πίνακας 51**).
- ✓ Η ομάδα Cys 1% παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους R2 και R6 μεταξύ της αρχικής και της τελικής ημέρας του πειράματος. Αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση στη μεταβλητή R2 υποδηλώνει ότι όχι μόνο επανήλθε η ελαστικότητα του δέρματος, αλλά πιθανόν να επήλθε και βελτίωση. Ωστόσο, η διατασιμότητα των ινών ελαστίνης μειώθηκε σημαντικά (**Εικόνα 22, Πίνακας 51**).
- ✓ Τέλος, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων Control-Excipient και Control-Cys 1% στην παράμετρο R5, υποδηλώνοντας ότι οι ομάδες Excipient και Cys 1% εμφανίζουν καλύτερη ελαστικότητα από αυτή των μαρτύρων (**Πίνακας 52**).
- ✓ Συμπερασματικά, η ελαστικότητα είναι μία παράμετρος που συνήθως επηρεάζεται σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής/γήρανσης του δέρματος και όχι τόσο σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής όπως στην παρούσα μελέτη. Αυτό το

συμπέρασμα συμβαδίζει και με τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς η ελαστικότητα έχει επανέλθει σε όλες τις ομάδες εκτός της Tolf 0.1% που φαίνεται να έχει επηρεαστεί σημαντικά ενώ οι ομάδες Cys 1% και Excipient εμφανίζουν καλύτερη ελαστικότητα από τους μάρτυρες μόνο για την παράμετρο 5.

7.2.5. Φωτοτεκμηρίωση

Καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος ελήφθησαν φωτογραφίες από όλα τα ζώα της κάθε ομάδας. Από αυτές 2 ενδεικτικές φωτογραφίες από κάθε ομάδα που πάρθηκαν στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 7, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14) παρατίθενται στην **Εικόνα 23**.



Εικόνα 23. Ενδεικτικές φωτογραφίες κάθε ομάδας τις ημέρες 0, 1, 4, 7, 11 και 14

Από τη μελέτη της κατάστασης του δέρματος (ερύθημα, οίδημα, ξηροδερμία) των αντίστοιχων πειραματοζώων (ενδεικτικές φωτογραφίες στην **Εικόνα 23**) συμπεραίνεται ότι:

- ✓ Την 1η ημέρα σε όλες τις ομάδες εμφανίζεται οίδημα ως αποτέλεσμα της ακτινοβολήσης (D’Orazio et al., 2013).
- ✓ Την 4^η ημέρα εμφανίζεται ερυθρότητα σε όλες τις ομάδες ενώ πιο έντονη παρατηρείται στις ομάδες Excipient, Tolf 0.1%, Cys 0.1%, Cys 1% και Control. Λιγότερο έντονη εμφανίζουν οι ομάδες AK1 0.1% και AK1 1%. Επιπλέον, οι ομάδες του Tolf, του Excipient, καθώς και Control εμφανίζουν έντονη ξηροδερμία.
- ✓ Την 7^η ημέρα, το ερύθημα υποχωρεί σε όλες τις ομάδες και παρατηρείται μεγαλύτερη βελτίωση στις ομάδες AK1 0.1% και Tolf 1% ενώ η χειρότερη εικόνα παρατηρείται στην ομάδα Tolf 0.1%.
- ✓ Την 11η ημέρα η φλεγμονή φαίνεται να υποχωρεί σημαντικά σε όλες τις ομάδες με υπόλοιπα ερυθήματος κυρίως στις ομάδες Control, Tolf 0.1%, Cys 0.1% και Cys 1%.
- ✓ Τη 14^η ημέρα, όλες οι ομάδες έχουν επανέλθει με ελάχιστες περιπτώσεις μη επαναφοράς κάποιων μυών στις ομάδες Control, Cys 0.1% και Tolf 0.1%.
- ✓ Συμπερασματικά, την καλύτερη κλινική εικόνα εμφανίζουν οι ομάδες AK1 0.1%, AK1 1% και Tolf 1%.

7.2.6. Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικών Δεικτών του δέρματος

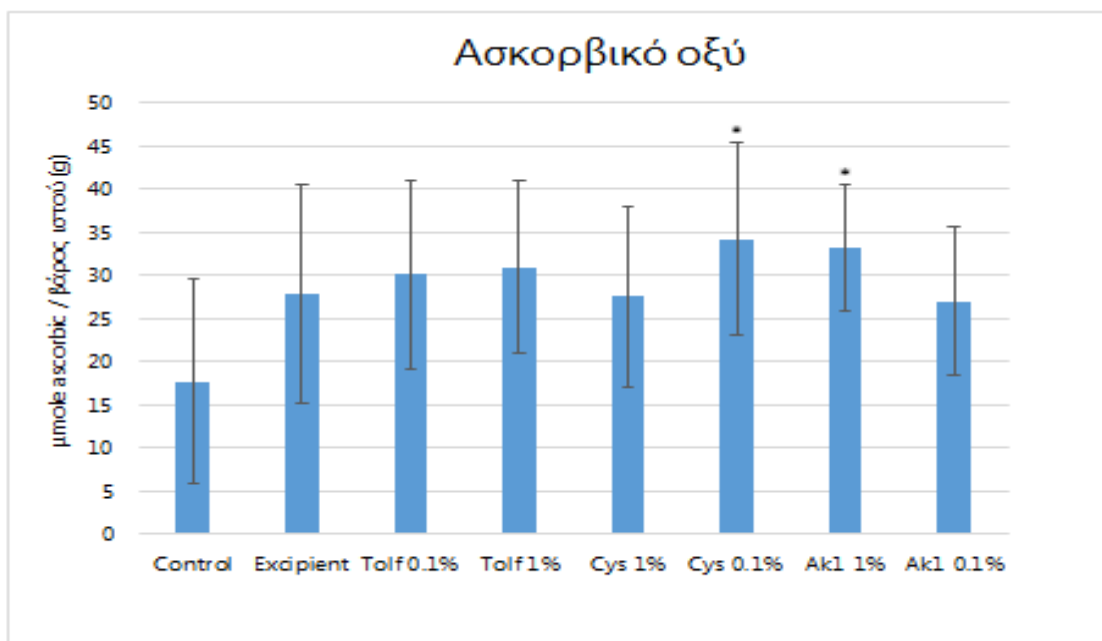
Εκτιμήθηκαν ως αντιοξειδωτικοί δείκτες τα επίπεδα του ουρικού οξέος, της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος σε ομογενοποίημα ιστού δέρματος (δέρμα) και σε stripping δέρματος που αντιστοιχεί στην κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας.

7.2.6.1. Αποτελέσματα ομογενοποίησης δέρματος

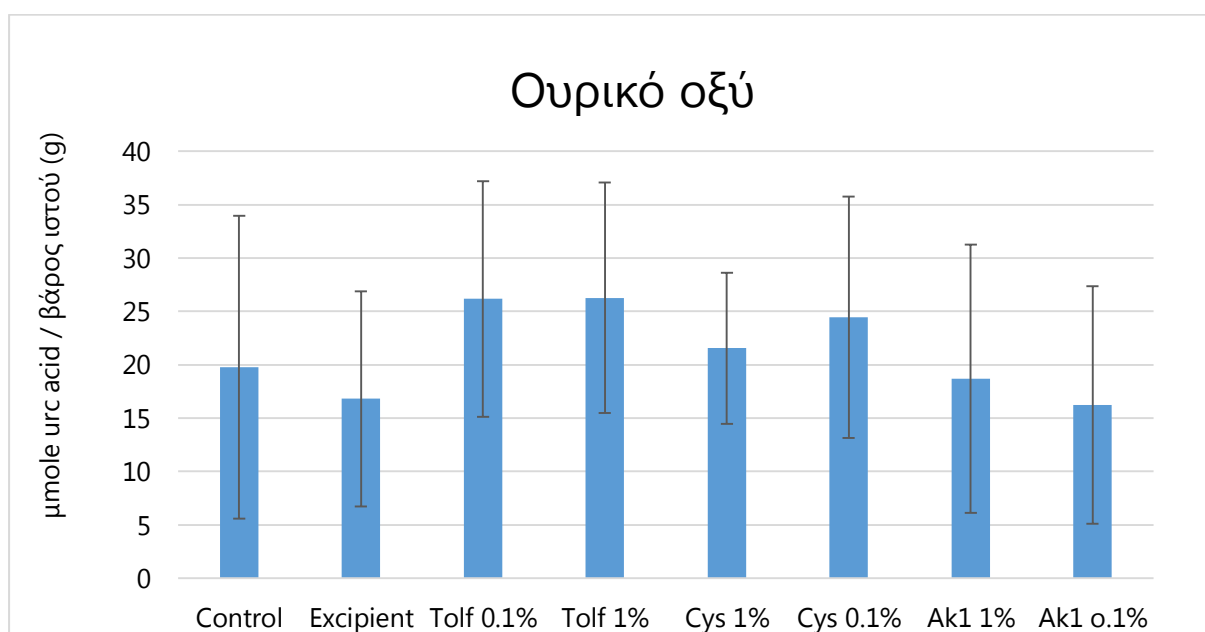
Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων των αντιοξειδωτικών στο δέρμα μετά από ομογενοποίησή του παρατίθενται στον **Πίνακα 53** και τα αντίστοιχα **Διαγράμματα 11-13**.

Πίνακας 53. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) του ασκορβικού, του ουρικού οξέος και της γλουταθειόνης (n=6).

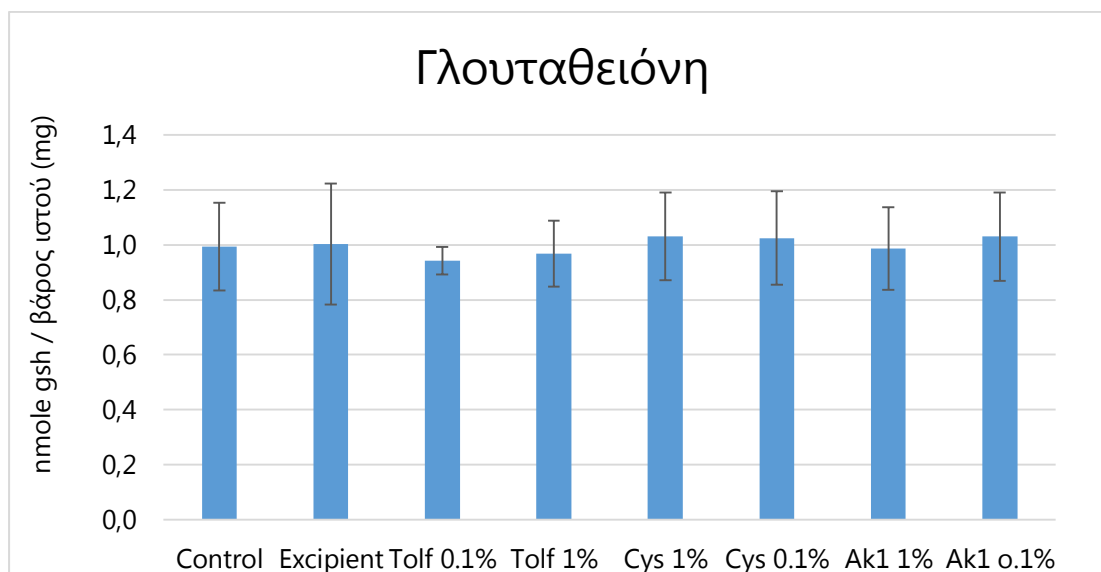
ΟΜΑΔΑ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)
Control	17,71 ($\pm 11,94$)	19,76 ($\pm 14,17$)	0,99 ($\pm 0,16$)
Excipient	27,78 ($\pm 12,6$)	16,81 ($\pm 10,08$)	1,00 ($\pm 0,22$)
Tolf 0.1%	30,10 ($\pm 10,93$)	26,16 ($\pm 11,03$)	0,94 ($\pm 0,05$)
Tolf 1%	30,93 ($\pm 9,94$)	26,27 ($\pm 10,79$)	0,97 ($\pm 0,12$)
Cys 1%	27,51 ($\pm 10,38$)	21,54 ($\pm 7,06$)	1,03 ($\pm 0,16$)
Cys 0.1%	34,21 ($\pm 11,11$)	24,46 ($\pm 11,3$)	1,02 ($\pm 0,17$)
AK1 1 %	33,25 ($\pm 7,29$)	18,67 ($\pm 12,56$)	0,99 ($\pm 0,15$)
AK1 0.1 %	27,00 ($\pm 8,54$)	16,23 ($\pm 11,12$)	1,03 ($\pm 0,16$)



Διάγραμμα 11. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο δέρμα: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακας 55).



Διάγραμμα 12. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στο δέρμα.



Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στο δέρμα.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 54**.

Πίνακας 54. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών.

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
Excipient	0,944	0,646	0,329
Tolf 0.1%	0,593	0,971	0,974
Tolf 1 %	0,910	0,937	0,993
Cys 0.1%	0,985	0,978	0,958
Cys 1%	0,659	0,674	0,990
Ak1 0.1%	0,694	0,635	0,935
Ak1 1%	0,875	0,971	0,702
Control	0,773	0,815	0,999

Στον **Πίνακα 54** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (ANOVA).

Τα αποτελέσματα ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 55**.

Πίνακας 55. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος στο δέρμα.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Cys 0.1% - Control	0,019	LSD
Tolf 1% - Control	0,056	
AK1 1% - Control	0,026	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 11-13** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Εξετάστηκαν τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά ασκορβικό, ουρικό οξύ και γλουταθειόνη, καθώς είναι αυτά που κυριαρχούν στο ανθρώπινο δέρμα (Godic et al., 2014).
- ✓ Δεν ανιχνεύονται διαφορές μεταξύ των ομάδων στα δείγματα ιστού σχετικά με το ουρικό οξύ και τη γλουταθειόνη.
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα ασκορβικού οξέος και υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα Cys 0.1% (υψηλότερη συγκέντρωση), καθώς και με την AK1 1% και την Tolf 1% (**Πίνακας 55**).
- ✓ Συμπερασματικά, τα καλύτερα επίπεδα αντιοξειδωτικών, επομένως και καλύτερη προστασία ενάντια στη φλεγμονή παρουσιάζουν οι ομάδες Cys 0.1% και AK1 1%.

7.2.6.2. Αποτελέσματα Strippings

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων των αντιοξειδωτικών στην SC μετά από εκχύλιση Strippings στην αρχή, πριν την ακτινοβόληση (ημέρα 0) και στο τέλος μετά την ακτινοβόληση (ημέρα 14) παρατίθενται στους **Πίνακες 56** και **59** και τα αντίστοιχα **Διαγράμματα 14-17**.

Ημέρα 0:

Πίνακας 56. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=6).

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
	nmole / βάρος ιστού (mg)	nmole / βάρος ιστού (mg)
Control	14,99 ($\pm 1,56$)	22,65 ($\pm 0,06$)
Excipient	13,31	22,67

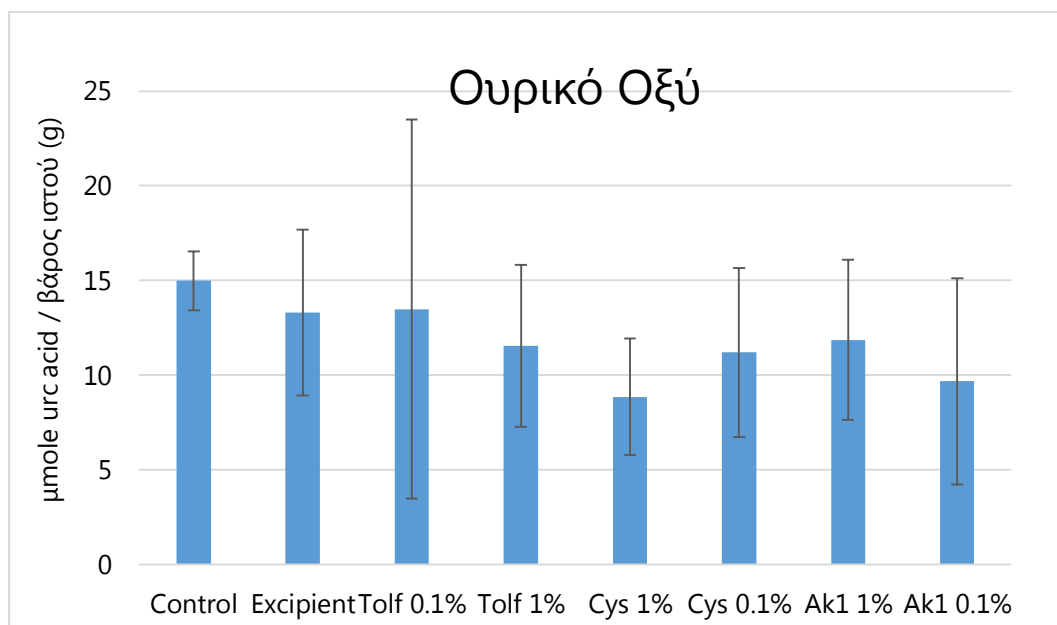
	(±4,39)	(±0,38)
Tolf 0.1%	13,49 (±10,01)	22,69 (±0,23)
Tolf 1%	11,56 (±4,27)	22,68 (±0,14)
Cys 1%	8,86 (±3,08)	22,66 (±0,13)
Cys 0.1%	11,20 (±4,46)	22,66 (±0,08)
AK1 1 %	11,87 (±4,21)	22,69 (±0,14)
AK1 0.1 %	9,68 (±5,45)	22,70 (±0,08)

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές των αντιοξειδωτικών και στις δύο φάσεις των strippings ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 57**.

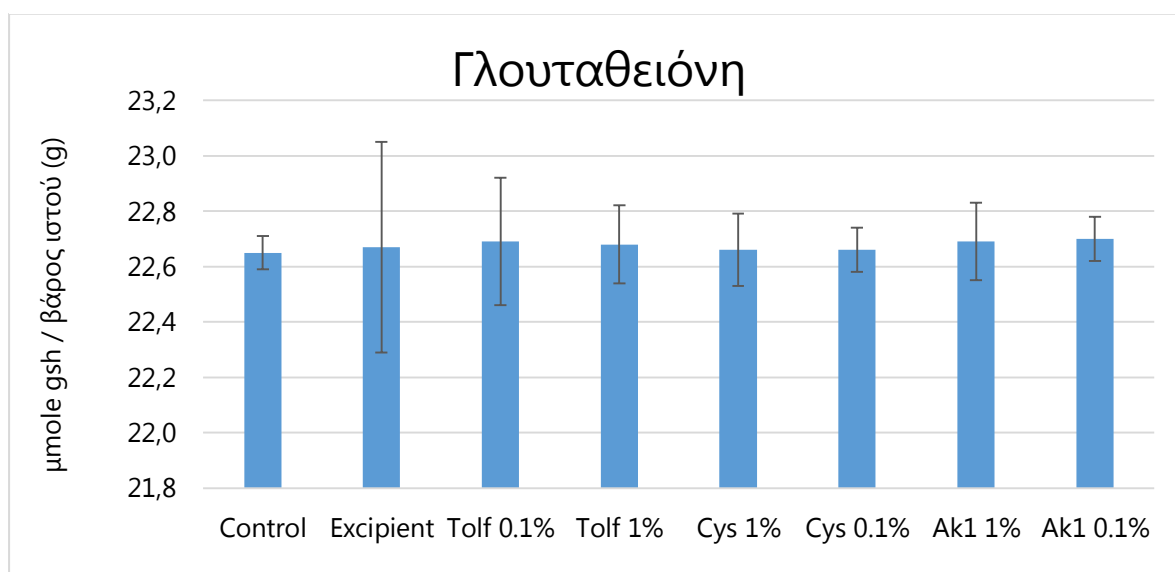
Πίνακας 57. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των αντιοξειδωτικών δεικτών στην κεράτινη στιβάδα πριν και μετά την ακτινοβολήση.

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ		ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	
	0	14	0	14
Excipient	0,881	0,376	0,317	0,708
Tolf 0.1%	0,801	0,948	0,423	0,596
Tolf 1 %	0,628	0,922	0,986	0,912
Cys 0.1%	0,941	0,937	0,823	0,878
Cys 1%	0,668	0,997	0,963	0,973
AK1 0.1%	0,973	0,798	0,916	0,878
AK1 1%	0,981	0,969	0,863	0,963
Control	0,965	0,822	0,798	1,000

Στον **Πίνακα 57** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (ANOVA και paired t-test).



Διάγραμμα 14. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε φυσιολογικούς μύες (ημέρα 0).



Διάγραμμα 15. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα σε φυσιολογικούς μύες (ημέρα 0).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 58**.

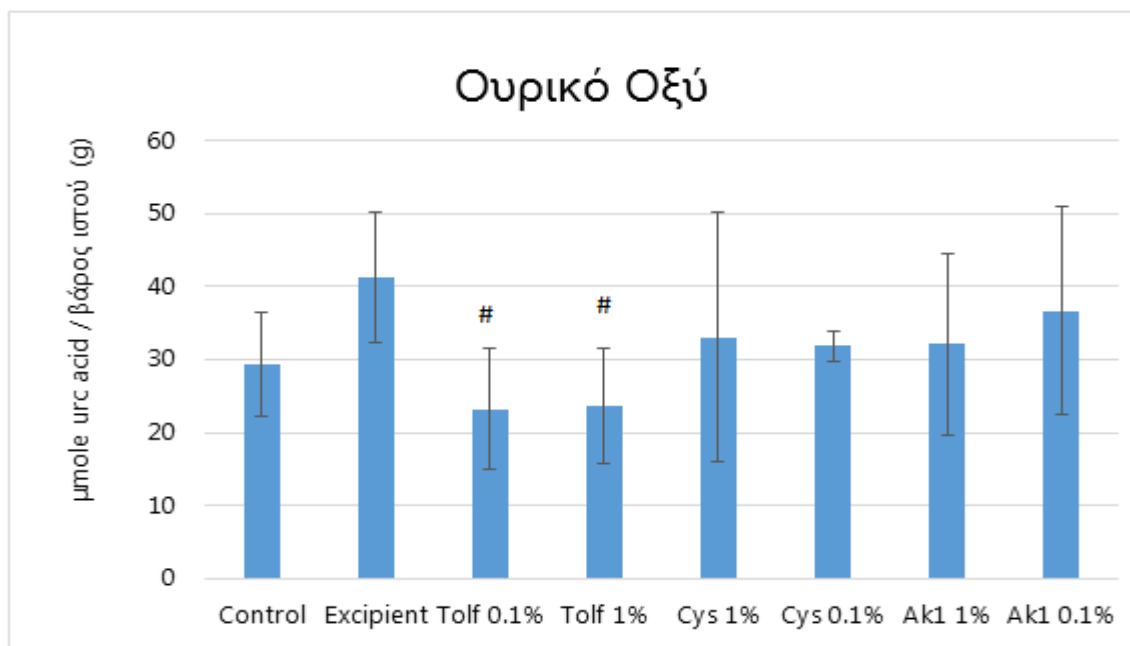
Πίνακας 58. One way-ANOVA για τη συγκέντρωση ουρικού οξέος την ημέρα 0 των strippings.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Control - Cys 1%	0,052	LSD

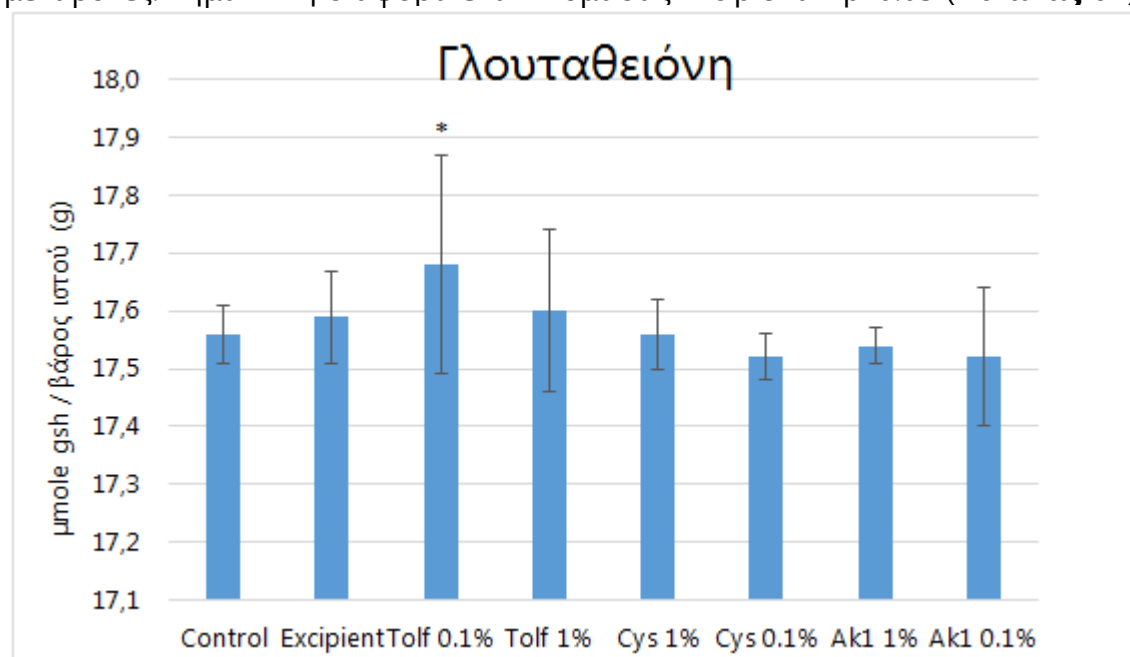
Ημέρα 14:

Πίνακας 59. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=6).

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)
Control	29,25 ($\pm 7,14$)	17,56 ($\pm 0,05$)
Excipient	41,33 ($\pm 8,9$)	17,59 ($\pm 0,08$)
Tolf 0.1%	23,20 ($\pm 8,36$)	17,68 ($\pm 0,19$)
Tolf 1%	23,64 ($\pm 7,86$)	17,60 ($\pm 0,14$)
Cys 1%	33,05 ($\pm 17,03$)	17,56 ($\pm 0,06$)
Cys 0.1%	31,86 ($\pm 2,07$)	17,52 ($\pm 0,04$)
AK1 1 %	32,09 ($\pm 12,5$)	17,54 ($\pm 0,03$)
AK1 0.1 %	36,68 ($\pm 14,28$)	17,52 ($\pm 0,12$)



Διάγραμμα 16. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε ακτινοβολημένους μυες μετά από αγωγή (ημέρα 14): Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακας 61).



Διάγραμμα 17. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα σε ακτινοβολημένους μυες μετά από αγωγή (ημέρα 14). Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ (Πίνακας 61).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στους Πίνακες 60-61.

Πίνακας 60. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος την ημέρα 14 των strippings.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Tolf 0.1%	0,006	LSD
Excipient - Tolf 1%	0,011	
Ak1 0.1% - Tolf 0.1%	0,039	
Ak1 0.1% - Tolf 1%	0,056	

Πίνακας 61. One way-ANOVA για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης την ημέρα 14 των strippings.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Tolf 0.1% - Cys 0.1%	0,010	LSD
Tolf 0.1% - Cys 1%	0,048	
Tolf 0.1% - Ak1 0.1%	0,010	
Tolf 0.1% - Ak1 1%	0,018	
Tolf 0.1% - Control	0,043	

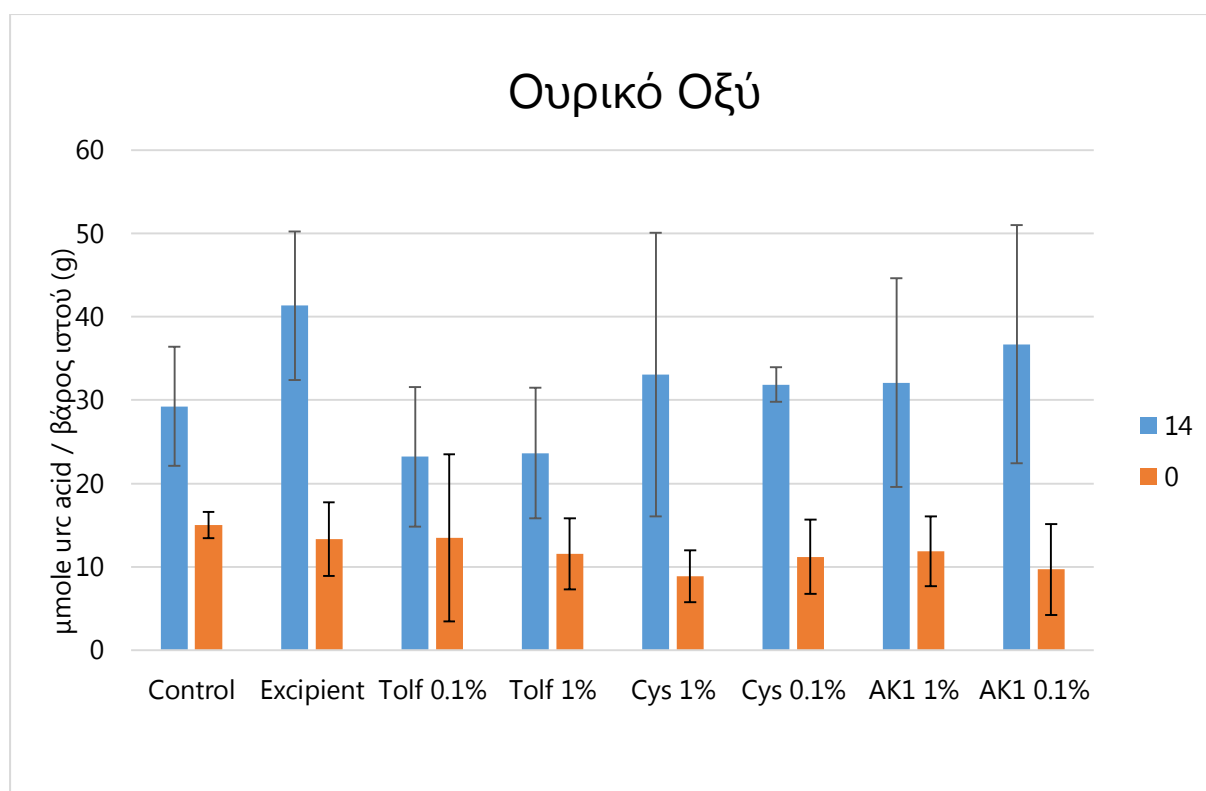
Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στους **Πίνακες 62-63**.

Πίνακας 62. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος στα strippings μεταξύ των ημερών 0 και 14.

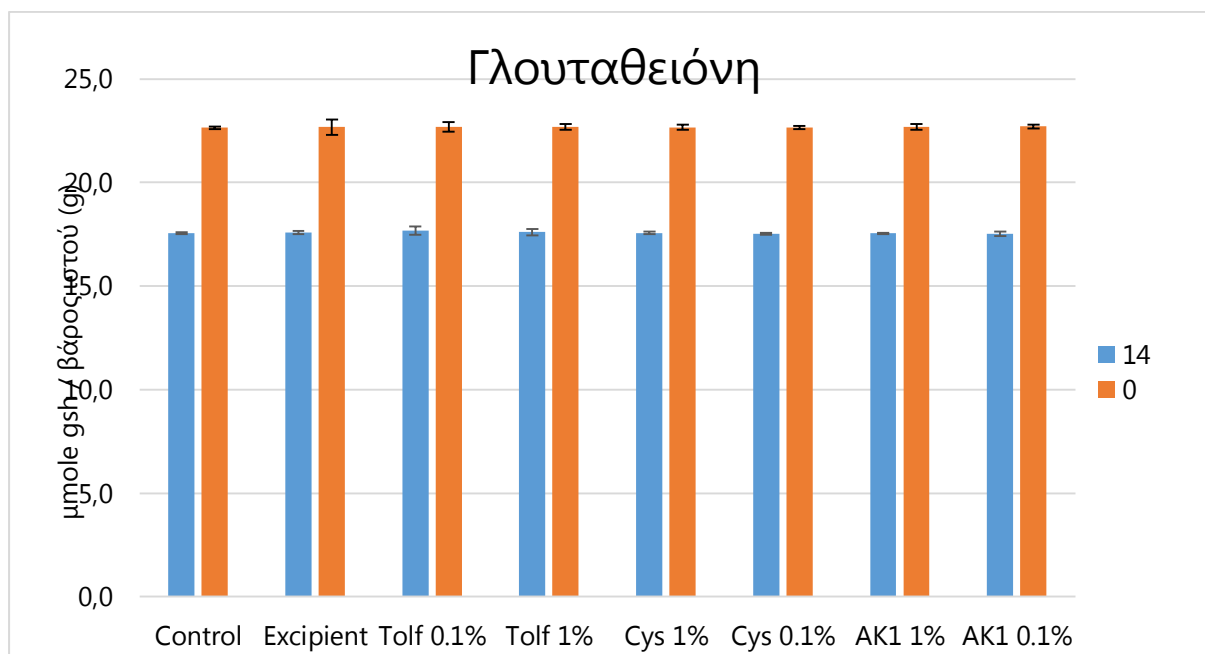
ΟΜΑΔΑ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	-30,64	-20,44	0,000
Tolf 0.1%	-27,38	7,94	0,216
Tolf 1%	-26,15	3,39	0,099
Cys 0.1%	-25,54	-14,01	0,002
Cys 1%	-43,83	-4,56	0,025
AK1 0.1%	-51,13	-6,52	0,023
AK1 1%	-36,37	-4,08	0,023
Control	-20,57	-7,95	0,002

Πίνακας 63. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στα strippings μεταξύ των ημερών 0 και 14.

ΟΜΑΔΑ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	4,63	5,53	0,000
Tolf 0.1%	4,83	5,19	0,000
Tolf 1%	4,91	5,25	0,000
Cys 0.1%	5,05	5,21	0,000
Cys 1%	4,92	5,26	0,000
AK1 0.1%	5,07	5,29	0,000
AK1 1%	5,00	5,30	0,000
Control	5,02	5,16	0,000



Διάγραμμα 18. Σύγκριση συγκεντρώσεων ουρικού οξέος μεταξύ ημερών 0 & 14.



Διάγραμμα 19. Σύγκριση συγκεντρώσεων γλουταθειόνης μεταξύ ημερών 0 & 14.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 14-19** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

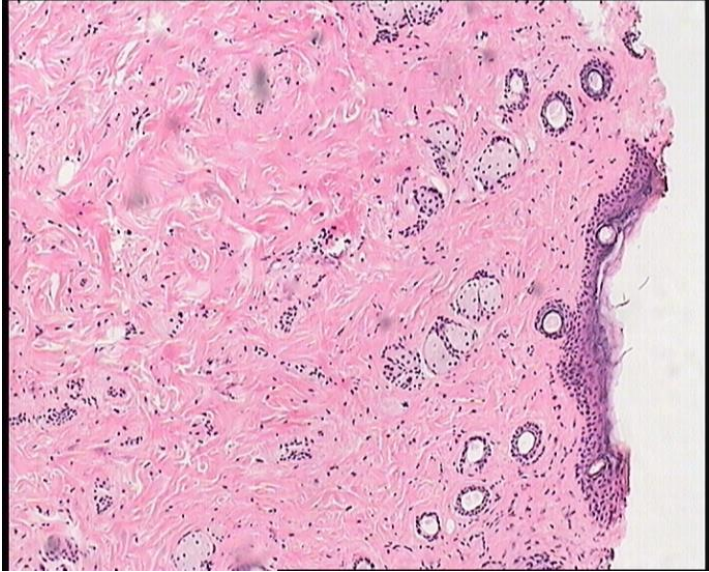
- ✓ Σε αντίθεση με τους ιστούς των δερμάτων των μυών, τις ημέρες 0 και 14 των strippings η πλειοψηφία των δειγμάτων δεν έδειξε ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ασκορβικού. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά δεν είναι ισόποσα καταναμεμένα στην κεράτινη στιβάδα, καθώς στις εξωτερικές στιβάδες οι συγκεντρώσεις είναι μειωμένες ενώ όσο προχωρούμε προς τα βαθύτερα στρώματα, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών αυξάνονται. Μία πιθανή εξήγηση αυτής της ανομοιόμορφης κατανομής είναι η πρόκληση ήπιου οξειδωτικού στρες εξ' αιτίας της υψηλής μερικής πίεσης οξυγόνου που συναντάται στα εξωτερικά στρώματα της κεράτινης στιβάδας, με αποτέλεσμα τη μερική μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων (Godic et al., 2014).
- ✓ Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία επηρεάζει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων ασκορβικού και γλουταθειόνης τόσο στην περιοχή της επιδερμίδας όσο και στο χόριο μετά από έκθεση σε UVB ακτινοβολία (Shindo, Witt and Packer, 1993). Συνεπώς, αναμένεται η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών μορίων την ημέρα 0 όπου δεν είχαν ακτινοβοληθεί οι μύες να είναι υψηλότερη σε σχέση με την ημέρα 14. Ωστόσο, αυτή τη συμπεριφορά ακολουθεί μόνο η γλουταθειόνη, ενώ το ουρικό οξύ όχι. Σύμφωνα με τους Y. Sautin και R. Johnson το ουρικό οξύ εμπλέκεται σε σύνθετες αντιδράσεις με διάφορα οξειδωτικά και μπορεί να έχει προστατευτικά αποτελέσματα υπό ορισμένες συνθήκες. Παρόλαυτα, μπορεί να λειτουργήσει και προ-οξειδωτικά αντιδρώντας με άλλα οξειδωτικά και σχηματίζοντας ρίζες που στοχεύουν κυρίως λιπίδια (LDL και μεμβράνες) και όχι άλλα κυτταρικά

συστατικά. Ταυτόχρονα, το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργείται από τα λιπίδια είναι δυσμενές για τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις του ουρικού οξέος και τα οξειδωμένα λιπίδια μπορούν ακόμη και να μετατρέψουν το ουρικό οξύ σε οξειδωτικό παράγοντα (Sautin and Johnson, 2008).

- ✓ Η ανάλυση διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) υποδηλώνει ότι η διαφορά των επιπέδων ουρικού οξέος μεταξύ της ομάδας Control (υψηλότερη συγκέντρωση) και της ομάδας Cys 1% (χαμηλότερη συγκέντρωση) την ημέρα 0 κυμαίνεται στα όρια της σημαντικότητας, αλλά γενικότερα δεν υπάρχουν διαφορές, όπως αναμενόταν, καθώς σε καμία ομάδα μυών δεν έχει ακόμα εφαρμοστεί επάλειψη με το αντίστοιχο διάλυμα (**Πίνακας 58**). Παρόμοια είναι τα συμπεράσματα για τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης.
- ✓ Όσον αφορά την ημέρα 14, τη χαμηλότερη συγκέντρωση ουρικού οξέος παρουσιάζουν οι ομάδες Tolf 1% και Tolf 0.1% ενώ διαφέρουν σημαντικά από την ομάδα Excipient (υψηλότερη συγκέντρωση) και την AK1 0.1% που ακολουθεί δεύτερη (**Πίνακας 60**). Αντίστοιχα στην περίπτωση της γλουταθειόνης, στην ομάδα Tolf 0.1% ανιχνεύεται σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις ομάδες που έλαβαν κυστεΐνη, την ένωση AK1, καθώς και την ομάδα Control (**Πίνακας 61**).
- ✓ Οι ομάδες Excipient, Control, Cys 0.1%, Cys 1%, AK1 1% και AK1 0.1% εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φάσεων στις τιμές του ουρικού οξέος ενώ οι Tolf 1% και Tolf 0.1% δεν διαφέρουν (**Πίνακας 62**). Συνεπώς δεν επηρεάστηκαν σημαντικά τα επίπεδα του ουρικού οξέος από την ακτινοβολήση. Αντίστοιχα στην περίπτωση της γλουταθειόνης όλες οι ομάδες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φάσεων καθώς παρατηρήθηκε σαφής μείωση (**Πίνακας 63**).
- ✓ Συμπερασματικά, καλύτερη αντιοξειδωτική κανότητα παρουσίασαν οι ομάδες AK1 1%, καθώς και οι Tolf 0.1% και Cys 0.1%.

7.2.7. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης

Από τα δείγματα δέρματος που ελήφθησαν στο τέλος του πειράματος, σχηματίστηκαν τομές στις οποίες έγινε χρώση αιμοτοξυλίνης-ηωσίνης και παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο και βγήκαν συμπεράσματα για τη φλεγμονή, την υπερκεράτωση και τον ερεθισμό. Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες δέρματος από κάθε ομάδα.



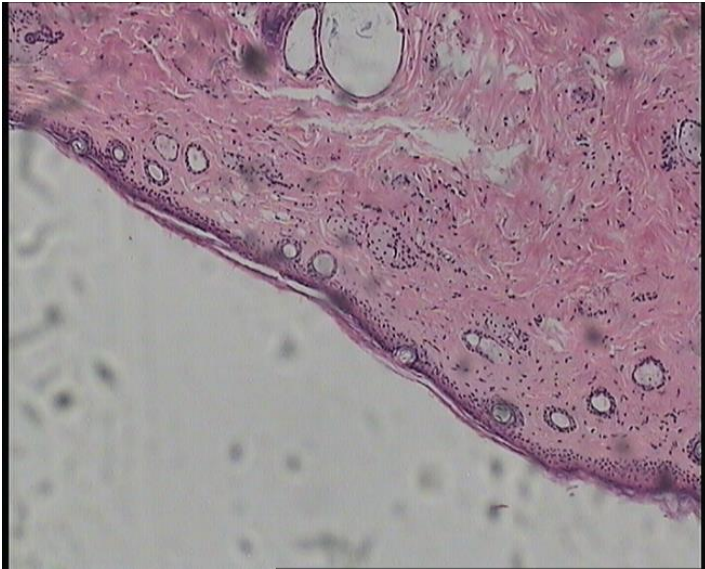
Εικόνα 24. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα του Excipient παρουσιάζει μέτρια φλεγμονή κυρίως στο εν τω βάθει χόριο ενώ η επιδερμίδα είναι φυσιολογική (**Εικόνα 24**).



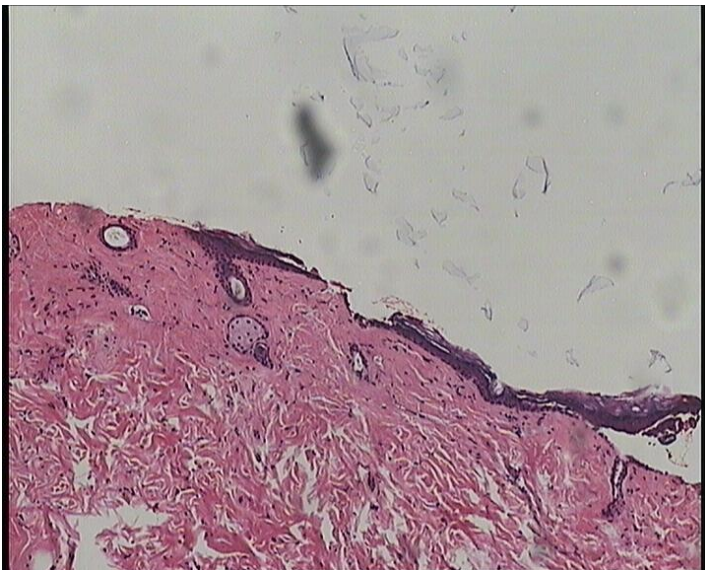
Εικόνα 25. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 0.1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα Tolf 0.1% εμφανίζει έντονη υπερπλασία στην επιδερμίδα και παρατηρείται μέτρια φλεγμονώδης διήθηση στο ανώτερο χόριο (**Εικόνα 25**).



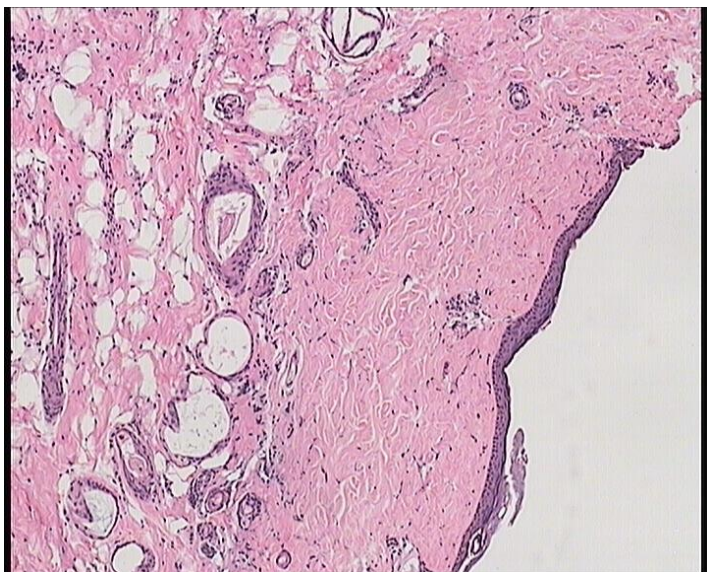
Εικόνα 26. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα Tolf 1% εμφανίζει υπερκεράτωση-υπερπλασία της επιδερμίδας με μέτριου βαθμού φλεγμονή (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 27. Τομή δέρματος μυ ομάδας Cys 0.1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα Cys 0.1% παρουσιάζει ήπια, μέτριου βαθμού φλεγμονή χωρίς πάχυνση της επιδερμίδας (**Εικόνα 27**).



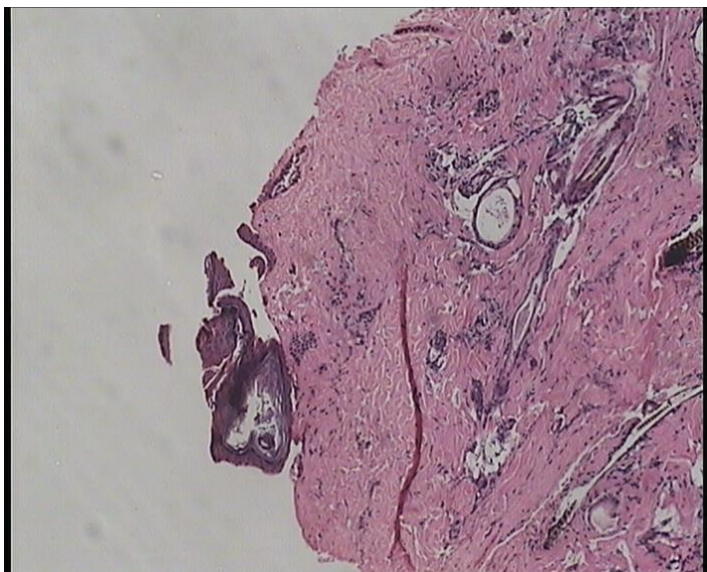
Εικόνα 28. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα Cys1% δεν εμφανίζει υπερπλασία στην επιδερμίδα. Παρατηρείται αραιή διασπορά λεμφοκυττάρων (**Εικόνα 28**).



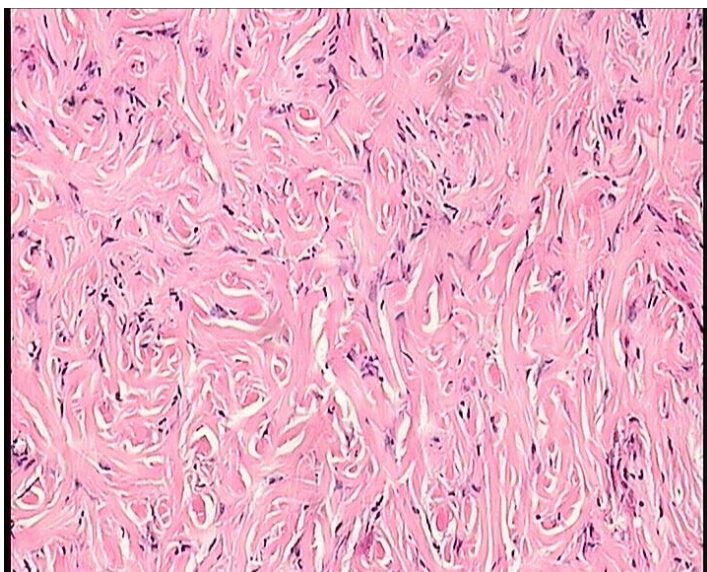
Εικόνα 29. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 0.1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα της ένωσης AK1 0.1% εμφανίζει σε περιορισμένη έκταση υπερκεράτωση χωρίς φλεγμονώδη στοιχεία (**Εικόνα 29**).



Εικόνα 30. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 1% (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα της ένωσης AK1 1% δεν παρουσιάζει στοιχεία φλεγμονής, μόνο μια ελαφριά φλεγμονή κυρίως στο εν τω βάθει χόριο. Από την εικόνα της τομής δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων για την επιδερμίδα (**Εικόνα 30**).



Εικόνα 31. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x200).

Οι ομάδα των μαρτύρων (Control) παρουσιάζει μεγαλύτερη φλεγμονή. Παρατηρείται ακόμη, ινοβλαστική αντίδραση στο ανώτερο χόριο ενώ δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων για την κατάσταση της επιδερμίδας (**Εικόνα 31**).

Συμπερασματικά, η ομάδα Control επέδειξε τη μεγαλύτερη φλεγμονή ενώ την καλύτερη εικόνα παρουσίασε η ομάδα AK1.

7.3. Πειραματική μελέτη 3

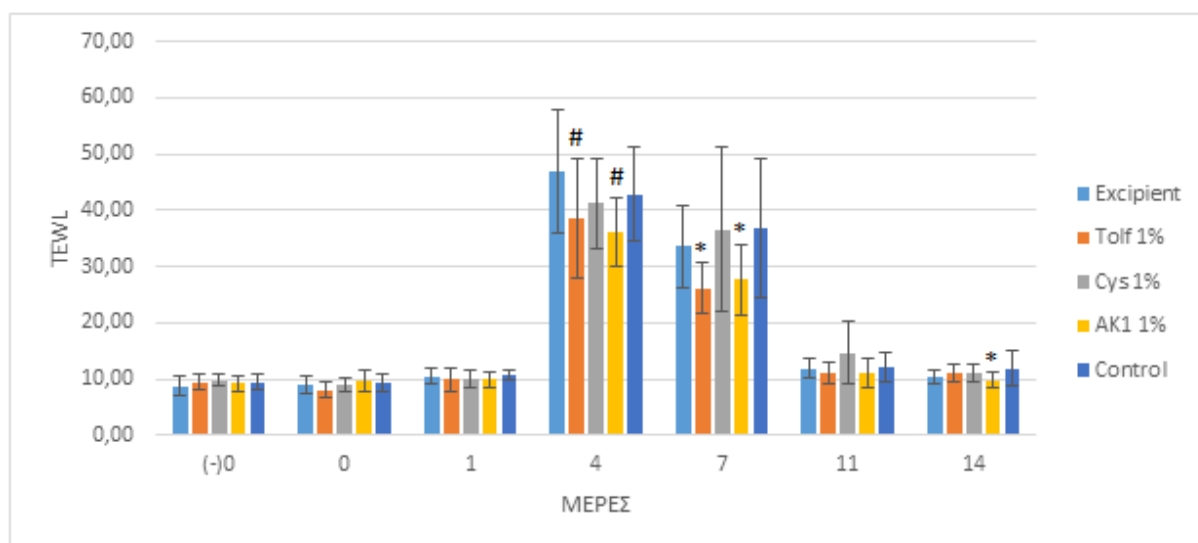
Από τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα των πειραμάτων 1 και 2, εκτιμήθηκε τελικά ότι η καταλληλότερη δόση της ένωσης AK1, καθώς και της πλειοψηφίας των ενώσεων για την πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση της φλεγμονής σε ακτινοβολημένο δέρμα φυσιολογικού μυός είναι το 1%. Έτσι, ακολούθησε η μελέτη της ένωσης AK1 και των υπόλοιπων ενώσεων στη δόση αυτή (1%) σε φλεγμονή ακτινοβολημένου δέρματος διαβητικών μυών.

7.3.1. Αποτελέσματα TEWL

Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της TEWL στην αρχή (ημέρα -0, φυσιολογικοί μύες), στη μέση (ημέρα 0, διαβητικοί μύες μη ακτινοβολημένοι και ημέρες 1, 4, 7, και 11, διαβητικοί μύες ακτινοβολημένοι) καθώς και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) παρατίθενται στον **Πίνακα 64** και στο αντίστοιχο **Διάγραμμα 20**.

Πίνακας 64. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).

ΟΜΑΔΑ	ΜΕΡΑ						
	-0	0	1	4	7	11	14
Excipient	8,73 ($\pm 1,73$)	8,87 ($\pm 1,51$)	10,51 ($\pm 1,41$)	46,93 ($\pm 11,10$)	33,66 ($\pm 7,29$)	11,90 ($\pm 1,75$)	10,36 ($\pm 1,26$)
Tolf 1%	9,45 ($\pm 1,43$)	8,03 ($\pm 1,48$)	9,85 ($\pm 1,94$)	38,62 ($\pm 10,59$)	26,18 ($\pm 4,56$)	11,04 ($\pm 1,90$)	11,05 ($\pm 1,59$)
Cys 1%	9,81 ($\pm 1,05$)	9,02 ($\pm 1,32$)	10,01 ($\pm 1,59$)	41,33 ($\pm 8,01$)	36,63 ($\pm 14,57$)	14,67 ($\pm 5,60$)	11,00 ($\pm 1,56$)
AK1 1%	9,30 ($\pm 1,40$)	9,65 ($\pm 1,77$)	9,87 ($\pm 1,25$)	36,11 ($\pm 6,05$)	27,62 ($\pm 6,26$)	11,01 ($\pm 2,57$)	9,82 ($\pm 1,41$)
Control	9,42 ($\pm 1,31$)	9,30 ($\pm 1,49$)	10,78 ($\pm 0,88$)	42,80 ($\pm 8,38$)	36,89 ($\pm 12,40$)	12,12 ($\pm 2,48$)	11,90 ($\pm 3,18$)



Διάγραμμα 20. Μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικές/Σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 67-70) εντός της ίδιας ημέρας

από 0 έως 4η ημέρα		0 έως 7η ημέρα		0 έως 14η ημέρα	
Excipient	449%	Excipient	289%	Excipient	19%
Tolf	398%	Tolf	241%	Tolf	41%
Cys	365%	Cys	319%	Cys	25%
AK1	277%	AK1	195%	AK1	5%
Control	393%	Control	323%	Control	37%

Εικόνα 32. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 4, 7 και 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της TEWL καθώς και οι μεταβολές των τιμών της ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 65**.

Πίνακας 65. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής TEWL.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ					
	ΔΙΑΒΗΤΗΣ					
	-0	0	4	7	11	14
Excipient	0,952	0,751	0,696	0,810	0,971	0,789
Tolf 1%	0,699	0,979	0,930	0,953	0,931	0,757
Cys 1%	0,756	0,651	0,803	0,963	0,216	0,977
Ak1 1%	0,856	0,710	0,641	0,999	0,267	1,000
Control	0,952	0,846	0,851	0,444	0,803	0,670

Στον **Πίνακα 65** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική

υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή TEWL ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test, ANOVA και Independent t-test).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 66**.

Πίνακας 66. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της TEWL τις μέρες -0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	0-4	-46,55	-30,045	0,000
	4-14	28,14	44,82	0,000
	0-14	-2,81	-0,17	0,031
	-0-4	-46,45	-30,50	0,000
	-0-14	-2,93	-0,33	0,020
Tolf 1%	0-4	-38,29	-22,90	0,000
	4-14	19,24	35,90	0,000
	0-14	-4,59	-1,45	0,002
	-0-4	-36,34	-22,00	0,000
	-0-14	-2,90	-0,31	0,021
Cys 1%	0-4	-37,92	-26,70	0,000
	4-14	24,34	36,32	0,000
	0-14	-3,54	-0,42	0,018
	-0-4	-37,70	-25,34	0,000
	-0-14	-2,39	0,01	0,052
AK1 1%	0 - 4	-32,25	-20,05	0,000
	4-14	19,24	32,36	0,000
	0-14	-1,65	1,25	0,758
	-0-4	-32,55	-21,25	0,000
	-0-14	-1,956	1,38	0,700
Control	0-4	-40,89	-26,45	0,000
	4-14	24,145	39,03	0,000
	0-14	-5,90	0,28	0,069
	-0-4	-39,56	-27,29	0,000
	-0-14	-4,65	-0,50	0,021

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$, απεικονίζονται στους **Πίνακες 67-71**.

Πίνακας 67. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 4.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 1%	0,019	LSD
Excipient - Tolf 1%	0,053	

Πίνακας 68. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 7.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Tolf 1% - Cys 1%	0,02	LSD
Tolf 1% - Control	0,024	
AK1 1% - Cys 1%	0,043	
AK1 1% - Control	0,049	

Πίνακας 69. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Cys 1%	0,058	LSD
Tolf 1% - Cys 1%	0,014	
AK1 1% - Cys 1%	0,014	

Πίνακας 70. One way-ANOVA για τη μεταβλητή TEWL τη ημέρα 14 .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
AK1 1% - Control	0,025	LSD

Πίνακας 71. One way-ANOVA για τη μεταβολή της μεταβλητής TEWL κατά τη διάρκεια του πειράματος.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΗΜΕΡΩΝ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 1%	0-4	0,023	LSD
Tolf 1% - AK1%	0-14	0,019	LSD
AK1 1% - Control		0,046	

Πίνακας 72. Independent t-test για τη σύγκριση της μεταβολής της TEWL στις 7 πρώτες μέρες μεταξύ των ομάδων AK1 και Excipient.

	P	Ελάχιστο	Μέγιστο
Equal variances assumed	0,052	-0,01	1,88
Equal variances not assumed	0,053	-0,01	1,89

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 20** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Την 4^η ημέρα του πειράματος εμφανίζονται οι μεγαλύτερες τιμές άδηλης απώλειας νερού λόγω έξαρσης της φλεγμονής. Στη συνέχεια οι τιμές ακολουθούν μία πτωτική πορεία μέχρι τη 14^η ημέρα που οι τιμές πλησιάζουν τις αρχικές.
- ✓ Η ομάδα στην οποία εφαρμόστηκε η ένωση AK1 1% παρουσιάζει τη μικρότερη μεταβολή στην άδηλη απώλεια νερού σε βάθος χρόνου 14 ημερών ενώ τη μεγαλύτερη μεταβολή εμφανίζουν η ομάδα που έλαβε Tolf και η Control (**Εικόνα 32**). Επιπλέον, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε AK1 1% και της ομάδας Tolf 1% καθώς και της AK1 σε σχέση με την Control (**Πίνακας 71**).
- ✓ Από τον πίνακα... παρατηρούμε ότι οι όλες οι ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των ημερών -0 και 0 (δηλαδή πριν και αφού εξελιχθούν οι μύες σε διαβητικούς) με 4, καθώς και 4 με 14, ενώ μόνο η ομάδα AK1 1% δεν παρουσιάζει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των ημερών 0 και 14. Στα ίδια συμπεράσματα μας οδηγούν και οι τιμές στα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι στο τέλος του πειράματος ο φραγμός επανήλθε στην πρότερη του κατάσταση στην ομάδα AK1 1%.
- ✓ Την 1^η ημέρα (μετά την ακτινοβολήση) δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.
- ✓ Την 4^η ημέρα η ομάδα του εκδόχου (Excipient) παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη TEWL σε σύγκριση με την ομάδα AK1 1% καθώς και με την ομάδα Tolf 1%. Στη δεύτερη περίπτωση η διαφορά τους κυμαίνεται στα όρια της σημαντικότητας. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το διάλυμα AK1 1% και το διάλυμα Tolf 1% συνέβαλαν στην μείωση της φλεγμονής με αποτέλεσμα οι αντίστοιχες ομάδες να παρουσιάσουν πιο ήπια διαταραχή του φραγμού.
- ✓ Την 7^η ημέρα η φλεγμονή αρχίζει να υποχωρεί καθώς σε όλες τις ομάδες παρατηρείται μείωση της TEWL. Η AK1 1% και η Tolf 1% παρουσιάζουν και αυτήν την ημέρα τις χαμηλότερες τιμές και διαφέρουν σημαντικά από την ομάδα των μαρτύρων (Control) και της Cys 1%.

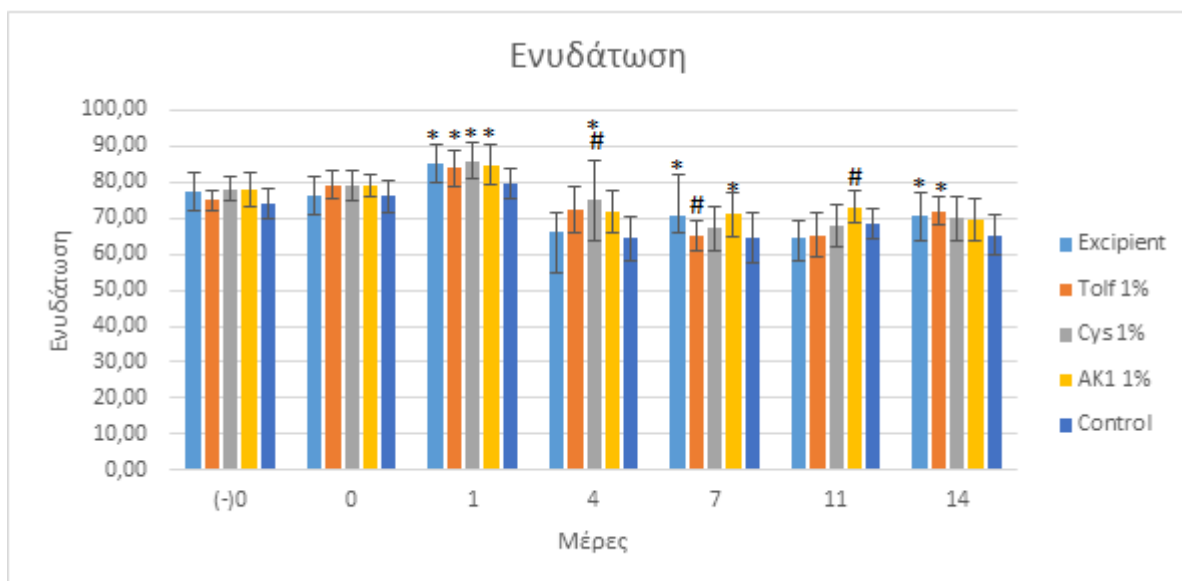
- ✓ Όσον αφορά τη ημέρα 11, διαπιστώνεται ότι η ομάδα Cys 1% παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη τιμή TEWL συγκριτικά με τις ομάδες που έλαβαν την ένωση AK1 1% και Tolf 1% ενώ η διαφορά της τιμής TEWL μεταξύ της Cys 1% και της ομάδας Excipient κυμαίνεται στα όρια της σημαντικότητας.
- ✓ Τη 14^η ημέρα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control.
- ✓ Σχετικά με τη σύγκριση των μεταβολών της TEWL των ομάδων, όπως παρατηρείται από τα διαγράμματα, καθώς κι από τους πίνακες σημαντικότητας,, η ομάδα Excipient παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση TEWL σε σχέση με την AK1 1% τις πρώτες 4 μέρες του πειράματος και το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται κι από την **Εικόνα 32** για τις 7 πρώτες μέρες του πειράματος.
- ✓ Συμπερασματικά, η AK1 επέδειξε τη μικρότερη TEWL κι επομένως την καλύτερη εικόνα επιδερμικού φραγμού σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

7.3.2. Αποτελέσματα Ενυδάτωσης

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της Ενυδάτωσης στην αρχή (ημέρα -0, φυσιολογικοί μύες), στη μέση (ημέρα 0, διαβητικοί μύες μη ακτινοβολημένοι και ημέρες 1 ,4, 7, και 11, διαβητικοί μύες ακτινοβολημένοι) καθώς και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) δίνονται στον **Πίνακα 73** και το **Διάγραμμα 21**.

Πίνακας 73. Μέσος όρος τιμών της ενυδάτωσης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ						
	-0	0	1	4	7	11	14
Excipient	77,60 ($\pm 5,23$)	76,30 ($\pm 5,08$)	85,20 ($\pm 5,39$)	66,40 ($\pm 11,55$)	70,50 ($\pm 4,74$)	64,70 ($\pm 6,27$)	70,60 ($\pm 7,09$)
Tolf 1%	75,10 ($\pm 2,81$)	79,30 ($\pm 3,80$)	84,00 ($\pm 5,10$)	72,30 ($\pm 6,43$)	65,10 ($\pm 4,07$)	65,10 ($\pm 6,18$)	72,00 ($\pm 3,92$)
Cys 1%	78,20 ($\pm 3,52$)	79,00 ($\pm 4,06$)	85,80 ($\pm 4,98$)	74,90 ($\pm 11,18$)	67,10 ($\pm 6,38$)	67,90 ($\pm 5,93$)	69,90 ($\pm 6,01$)
AK1 1%	78,00 ($\pm 4,76$)	78,90 ($\pm 3,03$)	84,80 ($\pm 5,67$)	71,80 ($\pm 6,09$)	71,00 ($\pm 6,18$)	73,11 ($\pm 4,57$)	64,90 ($\pm 5,93$)
Control	74,00 ($\pm 4,14$)	76,20 ($\pm 4,52$)	79,60 ($\pm 4,01$)	64,38 ($\pm 5,95$)	68,30 ($\pm 4,14$)	77,60 ($\pm 5,23$)	65,30 ($\pm 5,68$)



Διάγραμμα 21. Μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών: Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (Πίνακες 76-80) εντός της ίδιας ημέρας.

από 0 έως 4η ημέρα		από 0 έως 7η ημέρα		από 0 έως 14η ημέρα	
Excipient	-12%	Excipient	-7%	Excipient	-7%
Tolf	-9%	Tolf	-18%	Tolf	-9%
Cys	-5%	Cys	-15%	Cys	-12%
AK1	-9%	AK1	-10%	AK1	-12%
Control	-15%	Control	-15%	Control	-14%

Εικόνα 33. Ποσοστιαία μεταβολή ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 4, 7, 14 ημερών.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της Ενυδάτωσης καθώς και οι μεταβολές των τιμών της ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 74**.

Πίνακας 74. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής Ενυδάτωσης.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ						
	ΔΙΑΒΗΤΗΣ						
	-0	0	1	4	7	11	14
Excipient	0,428	0,823	0,604	0,715	0,916	0,911	0,964
Tolf 1%	0,880	0,445	0,998	0,893	0,873	0,819	0,815
Cys 1%	0,877	0,819	0,998	0,947	0,986	0,997	0,787
AK1 1%	0,890	0,754	0,977	0,993	0,931	0,818	0,929
Control	0,480	0,934	0,630	0,796	0,991	0,766	0,987

Στον **Πίνακα 74** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή ενυδάτωση ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (Paired t-test, ANOVA, Independent t-test).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 75**.

Πίνακας 75. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης τις ημέρες - 0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	-0-4	2,34	20,06	0,019
	0-4	0,031	19,77	0,049
	-0-14	0,45	13,55	0,039
	0-14	-0,25	11,65	0,058
	4-14	-14,87	6,47	0,396
Tolf 1%	-0-4	-1,95	7,55	0,216
	0-4	2,48	11,52	0,007
	-0-14	0,13	6,07	0,042
	0-14	3,54	11,06	0,002
	4-14	-3,76	4,36	0,871
Cys 1%	-0-4	-6,24	12,84	0,454
	0-4	-4,27	12,47	0,296
	-0-14	3,97	12,63	0,002
	0-14	5,59	12,61	0,000
	4-14	-3,14	13,14	0,198
AK1 1%	-0-4	1,65	10,75	0,013
	0-4	1,97	12,23	0,012
	-0-14	2,94	14,26	0,007
	0-14	3,91	15,09	0,004
	4-14	-4,35	9,15	0,442
Control	-0-4	3,08	17,92	0,012
	0-4	5,87	16,38	0,002
	-0-14	3,61	13,79	0,004
	0-14	5,67	16,13	0,001
	4-14	-8,67	6,92	0,798

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$, απεικονίζονται στους **Πίνακες 76-82**.

Πίνακας 76. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης τη ημέρα 1.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Control	0,017	LSD
Tolf 1% - Control	0,058	
Cys 1% - Control	0,009	
AK1 1% - Control	0,026	

Πίνακας 77. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης τη ημέρα 4.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Cys 1%	0,035	LSD
Cys 1% - Control	0,015	

Πίνακας 78. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 7.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Control	0,027	LSD
Excipient - Tolf 1%	0,041	
AK1 1% - Tolf 1%	0,027	
AK1 1% - Control	0,017	

Πίνακας 79. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 1%	0,002	LSD
Tolf 1% - AK1 1%	0,003	
AK1 1% - Cys 1%	0,045	

Πίνακας 80. One way-ANOVA για τη μεταβλητή της Ενυδάτωσης την ημέρα 14.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Control	0,047	LSD
Tolf 1% - Control	0,013	

Πίνακας 81. One way-ANOVA για τη μεταβολή της Ενυδάτωσης τις πρώτες 7 μέρες του πειράματος.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Tolf 1%	0,017	LSD

Πίνακας 82. One way-ANOVA για τη μεταβολή της Ενυδάτωσης από την 4^η έως τη 14^η ημέρα του πειράματος.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Cys 1%	0,056	LSD

Τα αποτελέσματα του Independent t-test μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control απεικονίζονται στους **Πίνακες 83-84**.

Πίνακας 83. Independent t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τη ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control.

	P	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ
Equal variances assumed	0,019	1,36	13,49
Equal variances not assumed	0,020	1,36	13,49

Πίνακας 84. Independent t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης τη ημέρα 11 μεταξύ των ομάδων AK1 1% και Control.

	P	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ
Equal variances assumed	0,028	0,60	9,02
Equal variances not assumed	0,029	0,56	9,06

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 21** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η ενυδάτωση αυξάνεται σε όλες τις ομάδες την 1^η ημέρα μετά την ακτινοβολή και στη συνέχεια ακολουθεί μία καθοδική πορεία μέχρι την 7^η ημέρα ενώ σταθεροποιείται μεταξύ 11^{ης} και 14^{ης} ημέρας. Πιθανότατα η αύξηση την 1^η ημέρα να οφείλεται σε εμφάνιση οιδήματος ως επακόλουθο της πρόκλησης φλεγμονής.
- ✓ Τις πρώτες 4 μέρες η ομάδα Cys 1% εμφανίζει τη μικρότερη μεταβολή (**Εικόνα 33**) ενώ τις πρώτες 7 μέρες η ομάδα Excipient παρουσιάζει τη μικρότερη μείωση και διαφέρει σημαντικά από τη μεταβολή της Tolf 1% που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση της Ενυδάτωσης (**Πίνακας 81**).
- ✓ Σε όλες τις ομάδες σχεδόν η ημέρα 0 με τη ημέρα 14 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενυδάτωση της επιδερμίδας δεν έχει καταφέρει να επανέλθει πλήρως μέχρι το τέλος του πειράματος (**Πίνακας 75**).

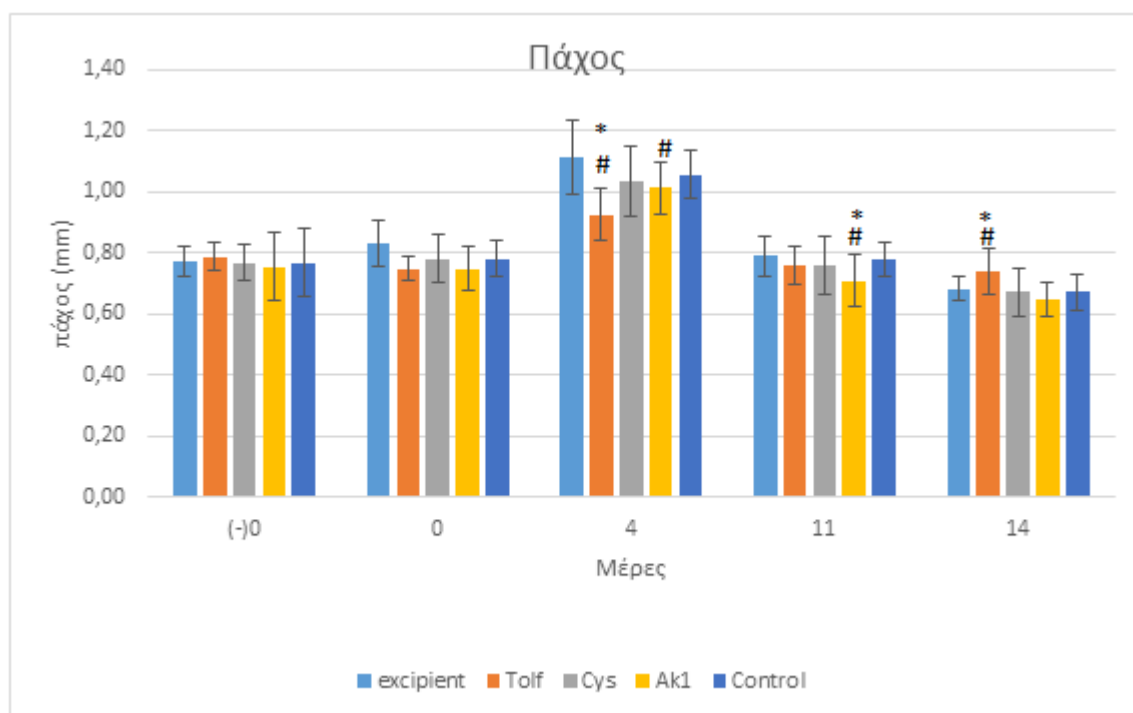
- ✓ Την 1^η ημέρα η ομάδα Control παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα ενυδάτωσης και διαφέρει στατιστικά σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες ομάδες αγωγής (**Πίνακας 76**).
- ✓ Την 4^η ημέρα η ομάδα Cys 1% εμφανίζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενυδάτωσης σε σχέση με τις ομάδες Excipient και Control (**Πίνακας 77**) ενώ η AK1 1% εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη ενυδάτωση από την ομάδα Control (**Πίνακας 83**).
- ✓ Την 7^η ημέρα την υψηλότερη ενυδάτωση παρουσιάζουν οι ομάδες AK1 1% και Excipient που διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με τον **Πίνακα 78** σε σχέση με τις ομάδες Control και Tolf 1%.
- ✓ Την 11^η ημέρα η ομάδα AK1 1% εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση και διαφέρει σημαντικά από τις ομάδες Excipient, Tolf 1%, Cys 1% και Control (**Πίνακας 79**). Το γεγονός ότι από την 7^η έως την 11^η ημέρα η AK1 1% διατηρεί υψηλότερα επίπεδα ενυδάτωσης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ένωση αυτή συμβάλλει ταχύτερα στην επαναφορά του φραγμού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις και τον φορέα.
- ✓ Τέλος, τη 14^η ημέρα, η ομάδα των μαρτύρων (μικρότερη ενυδάτωση) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις ομάδες Excipient και Tolf 1% που εμφανίζουν την υψηλότερη ενυδάτωση (**Πίνακας 80**).
- ✓ Συμπερασματικά, η AK1 εμφανίζει υψηλότερη ενυδάτωση συγκριτικά τις ημέρες 7 και 11.

7.3.3. Αποτελέσματα Πάχους

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων του πάχους στην αρχή (ημέρα -0, φυσιολογικοί μύες), στη μέση (ημέρα 0, διαβητικοί μύες μη ακτινοβολημένοι και ημέρες 1, 4, 7, και 11, διαβητικοί μύες ακτινοβολημένοι) καθώς και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) δίνονται στον **Πίνακα 85** και στο αντίστοιχο **Διάγραμμα 22**.

Πίνακας 85. Μέσος όρος τιμών του πάχους ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ				
	-0	0	4	7	14
Excipient	0,77 ($\pm 0,05$)	0,83 ($\pm 0,08$)	1,11 ($\pm 0,12$)	0,79 ($\pm 0,07$)	0,68 ($\pm 0,04$)
Tolf 1%	0,79 ($\pm 0,05$)	0,75 ($\pm 0,04$)	0,93 ($\pm 0,08$)	0,76 ($\pm 0,06$)	0,74 ($\pm 0,08$)
Cys 1%	0,77 ($\pm 0,06$)	0,78 ($\pm 0,08$)	1,03 ($\pm 0,11$)	0,76 ($\pm 0,09$)	0,67 ($\pm 0,08$)
AK1 1%	0,75 ($\pm 0,11$)	0,75 ($\pm 0,07$)	1,01 ($\pm 0,09$)	0,71 ($\pm 0,08$)	0,65 ($\pm 0,06$)
Control	0,77 ($\pm 0,11$)	0,78 ($\pm 0,06$)	1,06 ($\pm 0,08$)	0,78 ($\pm 0,06$)	0,67 ($\pm 0,06$)



Διάγραμμα 22. Μεταβολή του πάχους σε βάθος χρόνου 14 ημερών. Ενδεικτικά οι σημαντικότερες μεταβολές: Σημαντική διαφορά έναντι ομάδας Control * $p \leq 0.05$ και έναντι ομάδας Excipient # $p \leq 0.05$ (**Πίνακες 88-90**) εντός της ίδιας ημέρας.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές του Πάχους καθώς και οι μεταβολές των τιμών του ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 86**.

Πίνακας 86. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές της μεταβλητής του πάχους

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ				
	ΔΙΑΒΗΤΗΣ				
	-0	0	4	11	14
Excipient	0,994	0,962	0,876	0,999	0,999
Tolf 1%	0,633	0,719	0,261	0,938	0,819
Cys 1%	0,849	0,880	0,677	0,802	0,598
AK1 1%	0,418	0,816	0,952	0,902	0,488
Control	0,999	0,963	0,953	0,825	0,897

Στον **Πίνακα 86** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή ενυδάτωση ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον **Πίνακα 87**.

Πίνακας 87. Paired t-test για τη σύγκριση των τιμών του πάχους τις μέρες -0, 0, 4 και 14 σε κάθε ομάδα.

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	-0-4	-0,43	-0,26	0,000
	0 - 4	-0,36	-0,21	0,000
	-0-14	0,03	0,15	0,005
	0-14	0,08	0,21	0,001
	4-14	0,33	0,53	0,000
Tolf 1%	-0-4	-0,20	-0,08	0,001
	0 -4	-0,24	-0,12	0,000
	-0-14	-0,00	0,09	0,061
	0 -14	-0,04	0,06	0,732
	4-14	0,11	0,26	0,000
Cys 1%	-0-4	-0,33	-0,20	0,000
	0-4	-0,30	-0,20	0,000
	-0-14	0,05	0,15	0,002
	0-14	0,06	0,16	0,001
	4-14	0,29	0,43	0,000
AK1 1%	-0-4	-0,33	-0,19	0,000
	0-4	-0,31	-0,21	0,000
	-0-14	0,05	0,17	0,003
	0-14	0,07	0,14	0,000
	4-14	0,31	0,42	0,000
Control	-0-4	-0,40	-0,18	0,000
	0-4	-0,34	-0,21	0,000
	-0-14	0,05	0,14	0,001
	0-14	0,06	0,16	0,001
	4-14	0,32	0,45	0,000

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$, απεικονίζονται στους **Πίνακες 88-90**.

Πίνακας 88. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 4.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Tolf 1%	0,000	LSD
Excipient - AK1 1%	0,024	
Tolf 1% - Cys 1%	0,020	
Tolf 1% - AK1 1%	0,056	
Tolf 1% - Control	0,005	

Πίνακας 89. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK11%	0,017	LSD
Control - AK1 1%	0,048	

Πίνακας 90. One way-ANOVA για τη μεταβλητή του Πάχους την ημέρα 14.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - Tolf 1%	0,045	LSD
Tolf 1% - Cys 1%	0,020	
Tolf 1% - AK1 1%	0,001	
Tolf 1% - Control	0,020	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διάγραμμα 22** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Το πάχος του δέρματος, ακολουθεί μία σταθερή πορεία μέχρι την 4^η ημέρα της φλεγμονής. Τη ημέρα εκείνη, παρατηρείται έξαρση της φλεγμονής και υπερπάχυνση της επιδερμίδας σε όλες τις ομάδες όπως αναμενόταν καθώς η επιδερμική υπερπλασία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας ενάντια στην διείσδυση της UVR στο δέρμα (D' Orazio et al., 2013). Επίσης, την 14^η ημέρα παρατηρείται σε όλες τις ομάδες λέπτυνση του δέρματος συγκριτικά με το πάχος που εμφάνιζαν οι ομάδες πριν το διαβήτη [-0 ημέρα]. Αυτό συμβαδίζει με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Chen et al. 2010).
- ✓ Στην ομάδα Tolf 1% η τελευταία ημέρα του πειράματος δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με την αρχική πριν οι διαβητικοί μύες ακτινοβοληθούν (ημέρα 0), καθώς και με την ημέρα [-0] πριν οι μύες εμφανίσουν διαβήτη (**Πίνακας 87**). Συμπεραίνουμε, έτσι ότι το πάχος του δέρματος στην ομάδα Tolf 1% επανήλθε στο τέλος του πειράματος και δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω λέπτυνση όπως στις υπόλοιπες ομάδες.
- ✓ Την 4^η ημέρα το Tolf εμφανίζει μικρότερο πάχος συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες ενώ η ομάδα AK1 ακολουθεί δεύτερη διαφέροντας σημαντικά από τη ομάδα Excipient (μεγαλύτερο πάχος) (**Πίνακας 88**).
- ✓ Τη ημέρα 7 δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ομάδων.

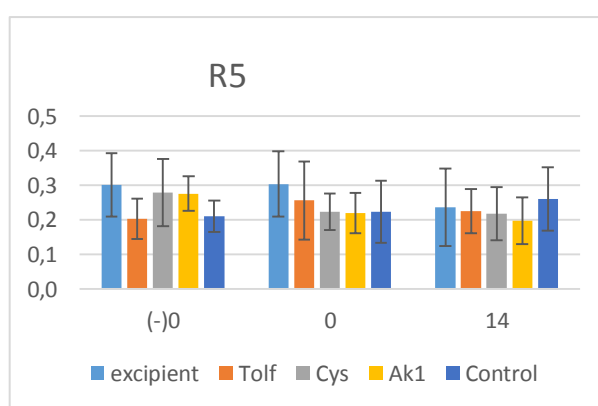
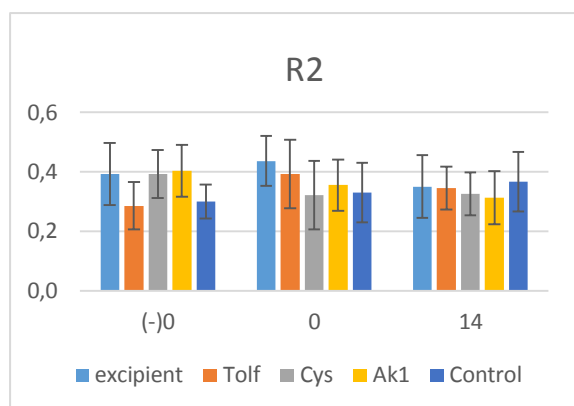
- ✓ Τη ημέρα 11 η AK1 εμφανίζει τη μικρότερη υπερπλασία και διαφέρει σημαντικά από τις ομάδες Control και Excipient που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα πάχη (**Πίνακας 89**).
- ✓ Τέλος, τη 14^η ημέρα η ομάδα Tolf 1% εμφανίζει το μεγαλύτερο πάχος συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες (**Πίνακας 90**).
- ✓ Συμπερασματικά, με τά την ομάδα Tolf 1%, η ομάδα AK1 είχε τη μικρότερη πάχυνση δέρματος.

7.3.4. Αποτελέσματα Ελαστικότητας

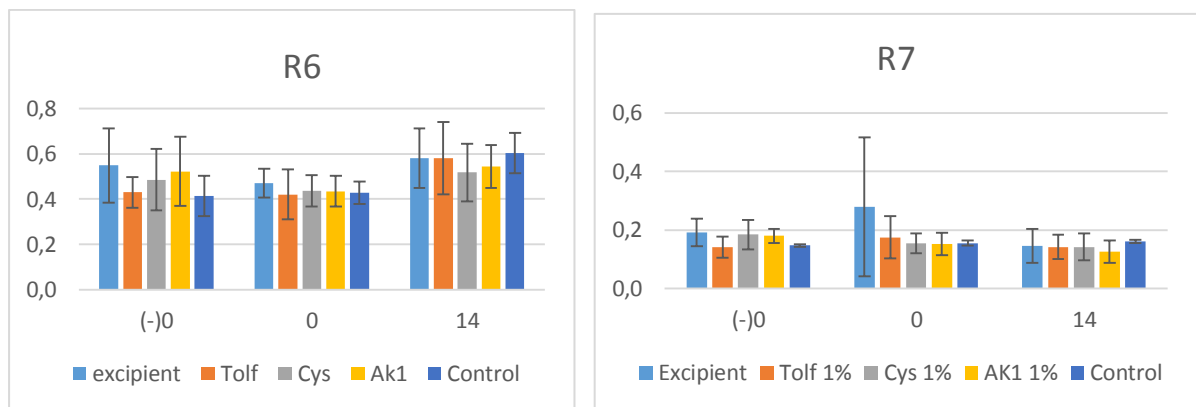
Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων των παραμέτρων (R2, R5, R6, R7, βλ. Υλικά και Μέθοδοι) της ελαστικότητας στην αρχή (ημέρα -0, φυσιολογικοί μύες), στη μέση (ημέρα 0, διαβητικοί μύες μη ακτινοβολημένοι και ημέρες 1, 4, 7, και 11, διαβητικοί μύες ακτινοβολημένοι) καθώς και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) παρατίθενται στον **Πίνακα 91** και στα **Διαγράμματα 23-24**.

Πίνακας 91. Μέσος όρος τιμών της TEWL ($\pm$ τυπική απόκλιση) των παραμέτρων (R2, R5, R6, R7) της ελαστικότητας τις ημέρες -0, 0 και 14 (n=8-10)

	R2			R5			R6			R7		
ΟΜΑΔΑ	-0	0	14	-0	0	14	-0	0	14	-0	0	14
Excipient	0,39 $\pm 0,10$	0,44 $\pm 0,08$	0,35 $\pm 0,11$	0,30 $\pm 0,09$	0,30 $\pm 0,09$	0,24 $\pm 0,11$	0,55 $\pm 0,16$	0,47 $\pm 0,06$	0,58 $\pm 0,13$	0,19 $\pm 0,05$	0,28 $\pm 0,24$	0,15 $\pm 0,06$
Tolf	0,29 $\pm 0,08$	0,39 $\pm 0,12$	0,35 $\pm 0,07$	0,20 $\pm 0,06$	0,26 $\pm 0,11$	0,23 $\pm 0,06$	0,43 $\pm 0,07$	0,42 $\pm 0,11$	0,58 $\pm 0,16$	0,14 $\pm 0,04$	0,18 $\pm 0,07$	0,14 $\pm 0,04$
Cys	0,39 $\pm 0,12$	0,32 $\pm 0,12$	0,33 $\pm 0,10$	0,28 $\pm 0,10$	0,22 $\pm 0,05$	0,22 $\pm 0,08$	0,48 $\pm 0,14$	0,44 $\pm 0,07$	0,52 $\pm 0,13$	0,18 $\pm 0,05$	0,16 $\pm 0,03$	0,14 $\pm 0,05$
AK1	0,40 $\pm 0,09$	0,36 $\pm 0,09$	0,31 $\pm 0,09$	0,28 $\pm 0,05$	0,22 $\pm 0,06$	0,20 $\pm 0,07$	0,52 $\pm 0,15$	0,43 $\pm 0,07$	0,54 $\pm 0,09$	0,18 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,04$	0,13 $\pm 0,04$
Control	0,30 $\pm 0,06$	0,33 $\pm 0,10$	0,37 $\pm 0,10$	0,21 $\pm 0,05$	0,22 $\pm 0,09$	0,26 $\pm 0,09$	0,41 $\pm 0,09$	0,43 $\pm 0,05$	0,60 $\pm 0,09$	0,15 $\pm 0,03$	0,16 $\pm 0,06$	0,16 $\pm 0,05$



Διάγραμμα 23. Μεταβολή των R2 και R5 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.



Διάγραμμα 24. Μεταβολή των R6 και R7 σε βάθος χρόνου 14 ημερών.

Ομάδα	% Μεταβολή R2	Ομάδα	% Μεταβολή R5
Excipient	5%	Excipient	-5%
Tolf	32%	Tolf	22%
Cys	-11%	Cys	-13%
AK1	-19%	AK1	-26%
Control	23%	Control	24%

Ομάδα	% Μεταβολή R6	Ομάδα	% Μεταβολή R7
Excipient	13%	Excipient	-12%
Tolf	40%	Tolf	9%
Cys	16%	Cys	-17%
AK1	15%	AK1	-29%
Control	51%	Control	9%

Εικόνα 34. Ποσοστιαία μεταβολή των παραμέτρων της ελαστικότητας από τη -0 έως την 14^η μέρα.

Ομάδα	% Μεταβολή R2	Ομάδα	% Μεταβολή R5
Excipient	-18%	Excipient	-17%
Tolf	-4%	Tolf	6%
Cys	73%	Cys	5%
AK1	-8%	AK1	-4%
Control	21%	Control	27%

Ομάδα	% Μεταβολή R6	Ομάδα	% Μεταβολή R7
Excipient	28%	Excipient	-30%
Tolf	48%	Tolf	-4%
Cys	23%	Cys	-4%
AK1	27%	AK1	-12%
Control	43%	Control	12%

Εικόνα 35. Ποσοστιαία μεταβολή των παραμέτρων της ελαστικότητας από τη 0 έως την 14^η ημέρα.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ελαστικότητας ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 92**.

Πίνακας 92. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές παραμέτρων ελαστικότητας

	R2			R5			R6			R7		
ΟΜΑΔΑ	-0	0	14	-0	0	14	-0	0	14	-0	0	14
Excipient	0,91	0,97	0,84	1,00	0,61	0,51	0,61	0,82	1,00	0,98	0,14	0,48
Tolf	0,94	0,88	0,69	0,97	0,78	0,76	0,80	0,95	0,74	0,93	0,75	0,78
Cys	1,00	0,69	0,91	0,88	1,00	0,91	0,90	0,55	0,97	0,93	0,98	0,84
AK1	0,96	0,64	0,72	0,97	0,42	0,64	0,80	0,83	0,80	0,90	0,32	0,58
Control	0,70	0,71	0,74	0,91	0,33	1,00	0,79	0,56	0,58	0,96	0,55	0,99

Στον **Πίνακα 92** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή ενυδάτωση ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (paired t-test).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στους **Πίνακες 93-94**.

Πίνακας 93. Paired t-test για τη σύγκριση των παραμέτρων της ελαστικότητας σε κάθε ομάδα τις μέρες -0 με 14.

ΟΜΑΔΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	R2	-0,10	0,18	0,512
	R5	-0,06	0,18	0,258
	R6	-0,18	0,12	0,636
	R7	-0,02	0,11	0,146
Tolf 1%	R2	-0,15	0,02	0,144
	R5	-0,10	0,05	0,503
	R6	-0,29	-0,02	0,033
	R7	-0,05	0,04	0,942
Cys 1%	R2	-0,02	0,15	0,109
	R5	-0,02	0,15	0,142
	R6	-0,18	0,11	0,623

ΟΜΑΔΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
	R7	-0,00	0,09	0,065
AK1 1%	R2	-0,01	0,19	0,062
	R5	0,02	0,14	0,020
	R6	-0,18	0,14	0,758
	R7	0,02	0,09	0,006
Control	R2	-0,12	-0,01	0,023
	R5	-0,10	0,00	0,052
	R6	-0,25	-0,13	0,000
	R7	-0,04	0,02	0,307

Πίνακας 94. Paired t-test για τη σύγκριση των παραμέτρων της ελαστικότητας σε κάθε ομάδα τις μέρες 0 με 14.

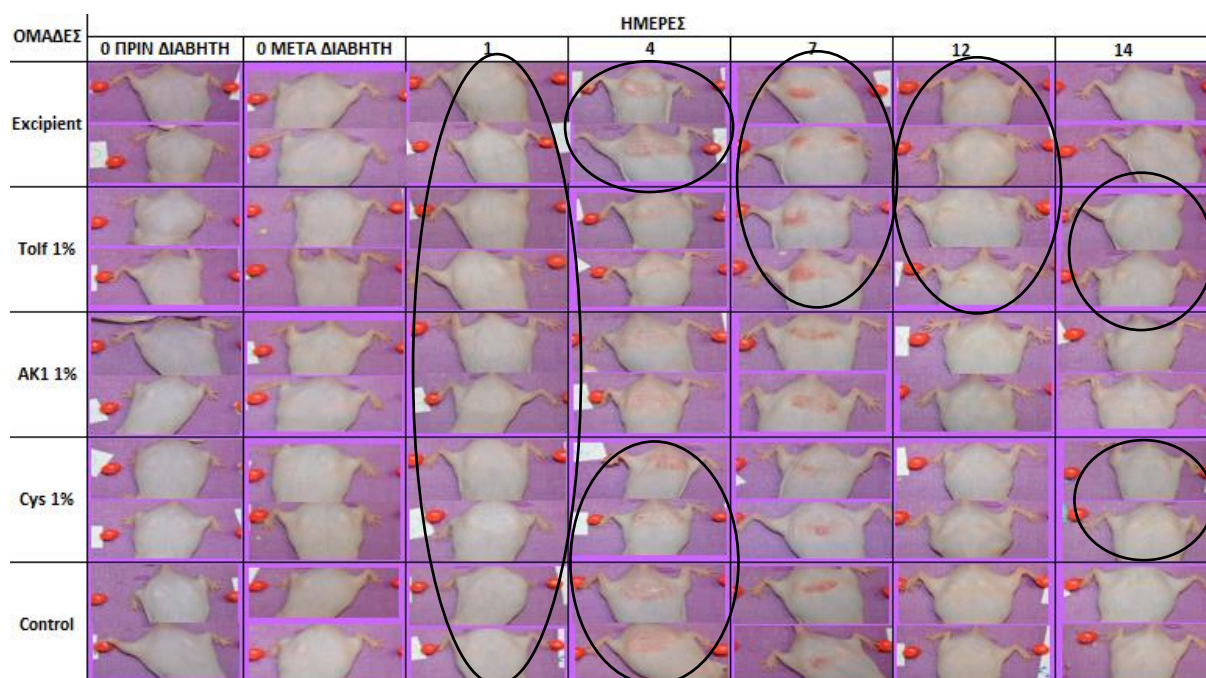
ΟΜΑΔΑ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	P
Excipient	R2	0,01	0,16	0,033
	R5	-0,02	0,16	0,123
	R6	-0,24	0,02	0,083
	R7	-0,04	0,31	0,124
Tolf 1%	R2	-0,06	0,15	0,342
	R5	-0,08	0,14	0,530
	R6	-0,31	-0,01	0,041
	R7	-0,03	0,10	0,300
Cys 1%	R2	-0,10	0,10	0,931
	R5	-0,07	0,08	0,863
	R6	-0,20	0,03	0,143
	R7	-0,03	0,06	0,516
AK1 1%	R2	-0,05	0,13	0,315
	R5	-0,05	0,09	0,478
	R6	-0,17	-0,05	0,003
	R7	-0,02	0,07	0,211
Control	R2	-0,15	0,08	0,498
	R5	-0,13	0,06	0,388
	R6	-0,26	-0,09	0,001
	R7	-0,06	0,05	0,801

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 23-24** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Στον έλεγχο της μεταβολής των παραμέτρων από τη ημέρα -0 έως τη ημέρα 14 διαπιστώνεται σημαντική αύξηση του R6 (άρα μείωση της διατασιμότητας των ινών ελαστίνης) στις ομάδες Tolf και Control. Εντούτοις, οι παράμετροι R2, R5 αυξάνονται σημαντικά στην περίπτωση του Control. Αντίθετα η σημαντική μείωση στις παραμέτρους R7 και R2 στην AK1 υποδεικνύουν μείωση της ελαστικότητας. Τέλος, στις ομάδες Cys και Excipient η ελαστικότητα έχει επανέλθει στα φυσιολογικά της επίπεδα (**Πίνακας 93**).
- ✓ Στον έλεγχο της μεταβολής των παραμέτρων από την ημέρα 0 έως την ημέρα 14 διαπιστώνεται σημαντική αύξηση του R6 (άρα μείωση της διατασιμότητας των ινών ελαστίνης) στις ομάδες Tolf, AK1 και Control. Επιπλέον, η R2 μειώνεται σημαντικά στην περίπτωση του εκδόχου. Οι υπόλοιπες παράμετροι στις ομάδες έχουν επανέλθει (**Πίνακας 94**).
- ✓ Συμπεραίνεται και πάλι ότι η ελαστικότητα είναι μία παράμετρος που συνήθως επηρεάζεται σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής/γήρανσης του δέρματος και όχι τόσο σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής όπως στην παρούσα μελέτη. Αυτό το συμπέρασμα συμβαδίζει και με τα παραπάνω αποτελέσματα όπου την τελευταία ημέρα δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ομάδων σε καμία παράμετρο της ελαστικότητας.

7.3.5. Φωτοτεκμηρίωση

Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ελήφθησαν φωτογραφίες από όλα τα ζώα της κάθε ομάδας. Από αυτές 2 ενδεικτικές φωτογραφίες από κάθε ομάδα που πάρθηκαν στην αρχή (ημέρα -0, φυσιολογικοί μύες), στη μέση (ημέρα 0, διαβητικοί μύες μη ακτινοβολημένοι και ημέρες 1, 4, 7, και 11, διαβητικοί μύες ακτινοβολημένοι), καθώς και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 14-διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) παρατίθενται στην **Εικόνα 36**.



Εικόνα 36. Ενδεικτικές φωτογραφίες από κάθε ομάδα τις ημέρες -0, 0, 1, 4, 7, 11 και 14.

Από τη μελέτη της κατάστασης του δέρματος (ερύθημα, οίδημα, ξηροδερμία) των αντίστοιχων πειραματοζώων (ενδεικτικές φωτογραφίες στην **Εικόνα 36**) συμπεραίνεται ότι:

- ✓ Την ημέρα -0 πριν την πρόκληση διαβήτη καθώς και τη ημέρα 0 μετά την πρόκληση διαβήτη χωρίς ακτινοβολήση δεν παρατηρούνται αλλαγές στο δέρμα των μυών.
- ✓ Τη ημέρα 1 μετά την ακτινοβολήση, δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, όλες σχεδόν οι ομάδες εμφανίζουν οίδημα.
- ✓ Την 4^η (έξαρση φλεγμονής) ημέρα παρατηρείται εμφάνιση διάχυτης ερυθρότητας και ξηροδερμίας. Καλύτερη κλινική εικόνα παρουσιάζει η ομάδα Tolf και ακολουθεί η AK1. Αντίθετα, οι ομάδες Excipient, Control και λιγότερο η ομάδα Cys εμφανίζουν χειρότερη εικόνα.
- ✓ Την 7^η ημέρα το οίδημα αρχίζει να υποχωρεί. Σε όλες τις ομάδες η ένταση του ερυθήματος έχει αυξηθεί ενώ η ερυθρότητα είναι πλέον εντοπισμένη. Τη χειρότερη εικόνα συγκριτικά δείχνει η ομάδα Excipient και δευτερευόντως η Tolf.
- ✓ Την 12^η ημέρα η φλεγμονή φαίνεται να υποχωρεί σημαντικά σε όλες τις ομάδες με υπόλοιπα ερυθήματος μόνο στις ομάδες Excipient και Tolf.
- ✓ Τη 14^η ημέρα οι μύες έχουν σχεδόν επανέλθει στη φυσιολογική τους εικόνα με μερικές εξαιρέσεις στις ομάδες Cys και Tolf.
- ✓ Συνοπτικά, τη μεγαλύτερη επιδείνωση εμφάνισε η ομάδα του Excipient σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ενώ η ομάδα Tolf παρόλη την αρχική ευεργετική

δράση της αγωγής, στη συνέχεια (π.χ. από την ημέρα 7 και μετά) δεν προστάτεψε στην εξέλιξη της φλεγμονής.

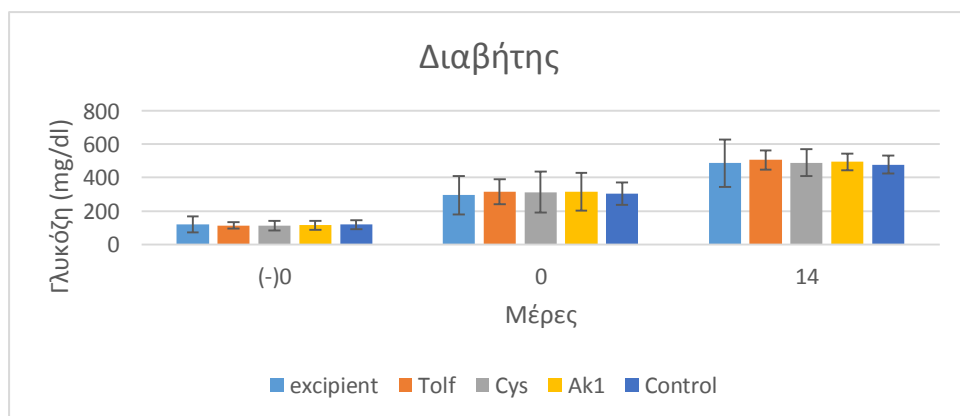
- ✓ Συμπερασματικά, η ομάδα AK1 εμφάνισε την πιο αποτελεσματική και γρήγορη βελτίωση.

7.3.6. Αποτελέσματα Μέτρησης Επιπέδων Γλυκόζης στο αίμα

Μετά τη χορήγηση STZ και διάστημα 15 ημερών, παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όπως αναμενόταν. Τα ζώα χαρακτηρίστηκαν διαβητικά εφόσον τα επίπεδα της γλυκόζης ξεπερνούσαν τα 250mg/dl. Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της γλυκόζης στο αίμα τη ημέρα -0 (χωρίς διαβήτη), τη ημέρα 0 (εκδήλωση διαβήτη) και 14 παρατίθενται στον **Πίνακα 95** και στο **Διάγραμμα 25**.

Πίνακας 95. Μέσος όρος τιμών (mg/dl) γλυκόζης ($\pm$ τυπική απόκλιση) (n=8-10).

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ		
	-0	0	14
Excipient	120,8 ($\pm 32,87$)	295,4 ($\pm 81,48$)	486,9 ($\pm 36,14$)
Tolf 1%	113,8 ($\pm 18,97$)	316,3 ($\pm 74,33$)	506,3 ($\pm 57,70$)
Cys 1%	114,4 ($\pm 28,7$)	313,6 ($\pm 121,79$)	489,6 ($\pm 81,49$)
AK1 1%	114,8 ($\pm 27,17$)	316,5 ($\pm 112,75$)	494,1 ($\pm 51,18$)
Control	119,7 ($\pm 27,40$)	305,7 ($\pm 66,96$)	478,3 ($\pm 54,79$)



Διάγραμμα 25. Μεταβολή της γλυκόζης στο αίμα σε βάθος χρόνου 14 ημερών: πριν την πρόκληση διαβήτη (-0), εμφάνιση διαβήτη (0), και τέλος του πειράματος (14).

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές του πάχους ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 96**.

Πίνακας 96. Τιμές κριτηρίου K-S για τιμές γλυκόζης στο αίμα.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ		
	ΔΙΑΒΗΤΗΣ		
	-0	0	14
Excipient	0,771	0,985	0,384
Tolf 1%	0,619	0,999	0,821
Cys 1%	0,377	0,367	0,975
AK1 1%	0,969	0,572	0,909
Control	0,736	1,000	0,661

Στον **Πίνακα 96** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή ενυδάτωση ακολουθεί κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA), αλλά δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, καθώς , η τιμή της σημαντικότητας p είναι μεγαλύτερη του 0,05. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνει την ομοιομορφία των ομάδων στην ανάπτυξη διαβήτη.

7.3.6. Αποτελέσματα Αντιοξειδωτικών Δεικτών του δέρματος

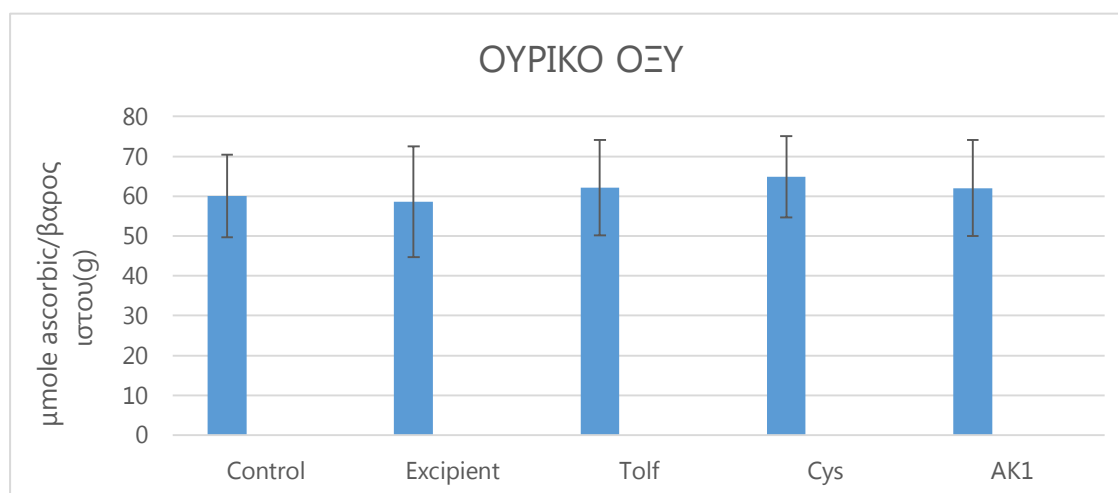
Εκτιμήθηκαν ως αντιοξειδωτικοί δείκτες τα επίπεδα του ουρικού οξέος, της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος σε ομογενοποίημα ιστού δέρματος (δέρμα) και σε stripping δέρματος που αντιστοιχεί στην κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας.

7.3.6.1. Αποτελέσματα ομογενοποίησης ιστού δέρματος

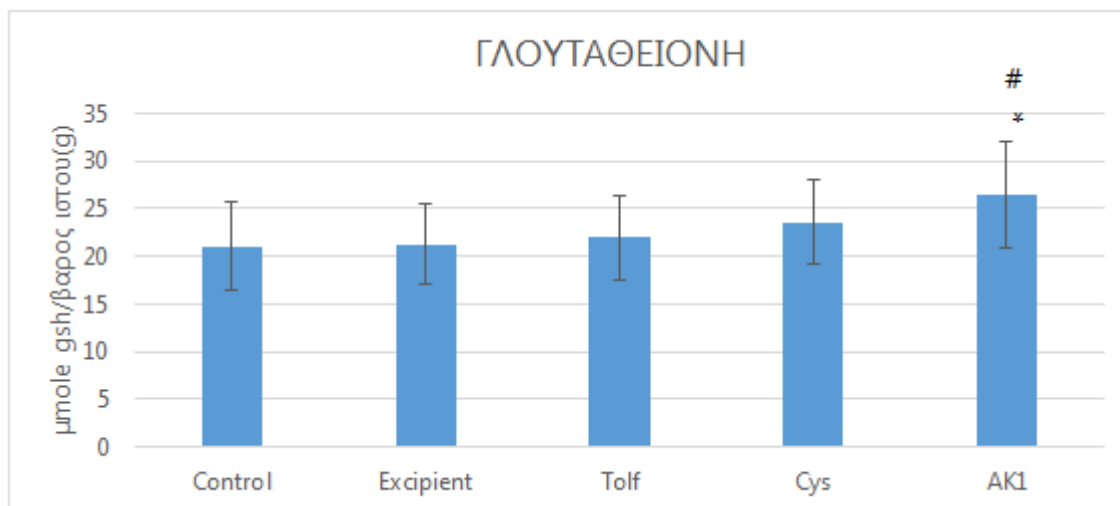
Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών στο δέρμα διαβητικών μυών που έχουν υποστεί φλεγμονή με ακτινοβολήση (τέλος του πειράματος, 14^η μέρα) παρατίθενται στον **Πίνακα 97** και στα **Διαγράμματα 26-28**.

Πίνακας 97. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) του ουρικού οξέος, της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος στο δέρμα (n=8-10).

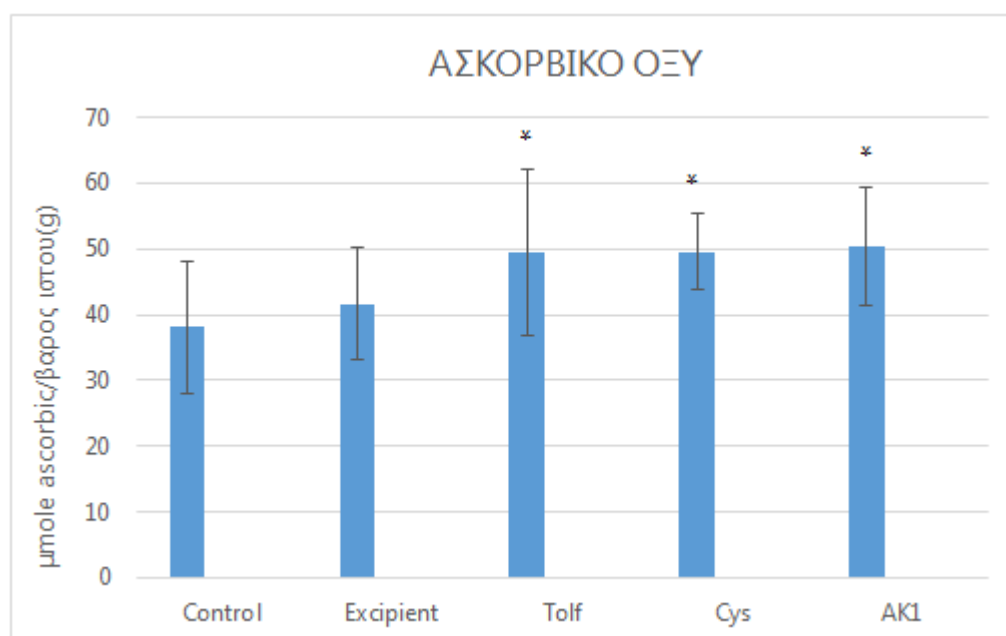
ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ
	$\mu\text{mole} / \text{βάρος ιστού (g)}$	$\mu\text{mole} / \text{βάρος ιστού (g)}$	$\mu\text{mole} / \text{βάρος ιστού (g)}$
Control	60,06 ($\pm 10,37$)	21,10 ($\pm 4,63$)	38,05 ($\pm 9,94$)
Excipient	58,62 ($\pm 13,84$)	21,29 ($\pm 4,18$)	41,68 ($\pm 8,54$)
Tolf 1%	62,10 ($\pm 11,98$)	21,99 ($\pm 4,47$)	49,46 ($\pm 12,55$)
Cys 1%	64,91 ($\pm 10,20$)	23,60 ($\pm 4,38$)	49,57 ($\pm 5,73$)
AK1 1 %	62,04 ($\pm 12,01$)	26,42 ($\pm 5,55$)	50,48 ($\pm 8,98$)



Διάγραμμα 26. Συγκέντρωση ουρικού οξέος στο διαβητικό δέρμα.



Διάγραμμα 27. Συγκέντρωση γλουταθειόνης στο διαβητικό δέρμα.



Διάγραμμα 28. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο διαβητικό δέρμα.

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov–Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 98**.

Πίνακας 98. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών.

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ
Excipient	0,995	0,889	0,811
Tolf 1 %	0,982	0,896	0,942
Cys 1%	0,833	0,763	0,924
AK1 1%	0,996	0,791	0,728
Control	0,839	0,704	0,770

Στον **Πίνακα 98** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (ANOVA).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) και για τους τρεις αντιοξειδωτικούς δείκτες που βρέθηκαν σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στους **Πίνακες 99-100**.

Πίνακας 99. One way-ANOVA για σύγκριση συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στο δέρμα.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 1%	0,041	LSD
Tolf 1% - AK1 1%	0,042	
Control - AK1 1%	0,043	

Πίνακας 100. One way-ANOVA για σύγκριση συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος στο δέρμα.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Control - Tolf 1%	0,026	LSD
Control - Cys 1%	0,024	
Control - AK1 1%	0,024	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (**Διαγράμματα 26-28** και αντίστοιχοι **Πίνακες**) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Στην περίπτωση του ουρικού οξέος στο δέρμα δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.
- ✓ Όσον αφορά τη γλουταθειόνη, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει η ομάδα AK1 και παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τις ομάδες Excipient και Control (**Πίνακας 99**).

- ✓ Υψηλότερες συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος παρουσιάζουν οι ομάδες AK1, Cys και Tolf ενώ και οι τρεις εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα Control (**Πίνακας 100**).
- ✓ Συνοπτικά, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στο δέρμα παρουσίασε η ομάδα AK1 και δευτερευόντως οι ομάδες Cys και Tolf.

7.3.6.2. Αποτελέσματα Strippings

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών στην κεράτινη στιβάδα (SC) πριν την πρόκληση διαβήτη και φλεγμονής, ημέρα -0 (φυσιολογικοί μύες) παρατίθενται στους **Πίνακες 101** και στα **Διαγράμματα 29-31**.

Πίνακας 101. Μέσος όρος τιμών συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=8-10) των strippings (αρχικά, ημέρα -0).

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)
Control	42,94 ($\pm 13,20$)	114,01 ($\pm 36,27$)
Excipient	48,74 ($\pm 21,16$)	144,73 ($\pm 41,96$)
Tolf 1%	51,39 ($\pm 16,50$)	135,40 ($\pm 65,45$)
Cys 1%	53,60 ($\pm 19,93$)	152,15 ($\pm 26,15$)
AK1 1 %	53,68 ($\pm 22,55$)	142,37 ($\pm 57,11$)

Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών στην κεράτινη στιβάδα πριν την πρόκληση φλεγμονής, ημέρα 0 (διαβητικοί μύες) παρατίθενται στον **Πίνακα 102** και στα **Διαγράμματα 29-31**.

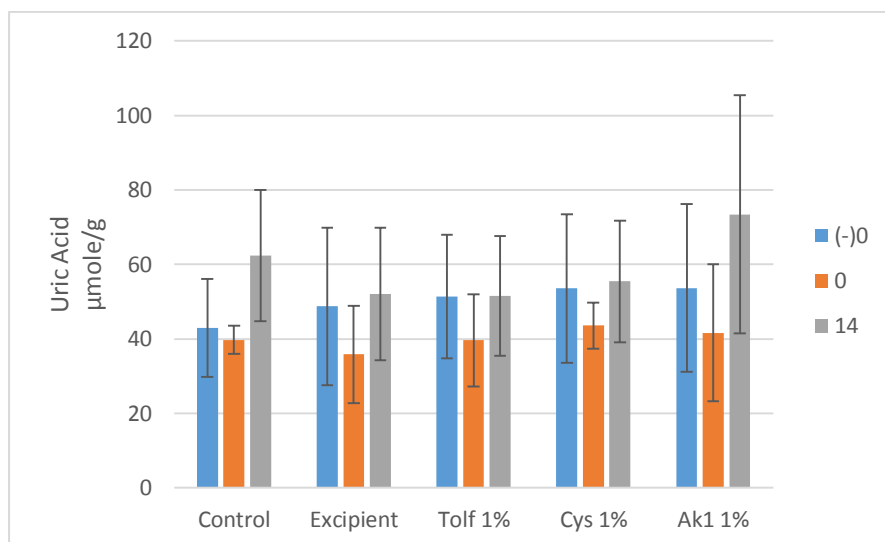
Πίνακας 102. Μέσος όρος τιμών συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος και γλουταθειόνης (n=8-10) των strippings (ημέρα 0).

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ
	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)
Control	39,76 ($\pm 3,75$)	82,98 ($\pm 15,74$)
Excipient	35,84 ($\pm 13,14$)	105,24 ($\pm 39,21$)
Tolf 1%	39,66 ($\pm 12,42$)	105,22 ($\pm 32,00$)
Cys 1%	43,58 ($\pm 6,26$)	103,63 ($\pm 25,31$)
AK1 1 %	41,64 ($\pm 18,38$)	95,91 ($\pm 20,64$)

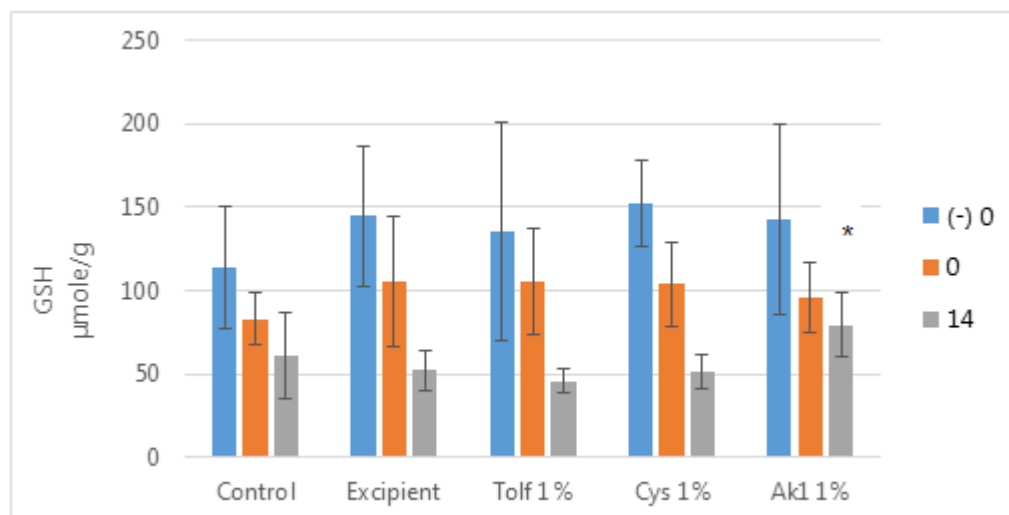
Ο μέσος όρος (M.O.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών στην κεράτινη στιβάδα την ημέρα 14 παρατίθενται στον **Πίνακα 103** και στα **Διαγράμματα 29-31**.

Πίνακας 103. Μέσος όρος τιμών των συγκεντρώσεων ($\pm$ τυπική απόκλιση) ουρικού οξέος, γλουταθειόνης και ασκορβικού οξέος (n=8-10) των strippings τη 14^η ημέρα.

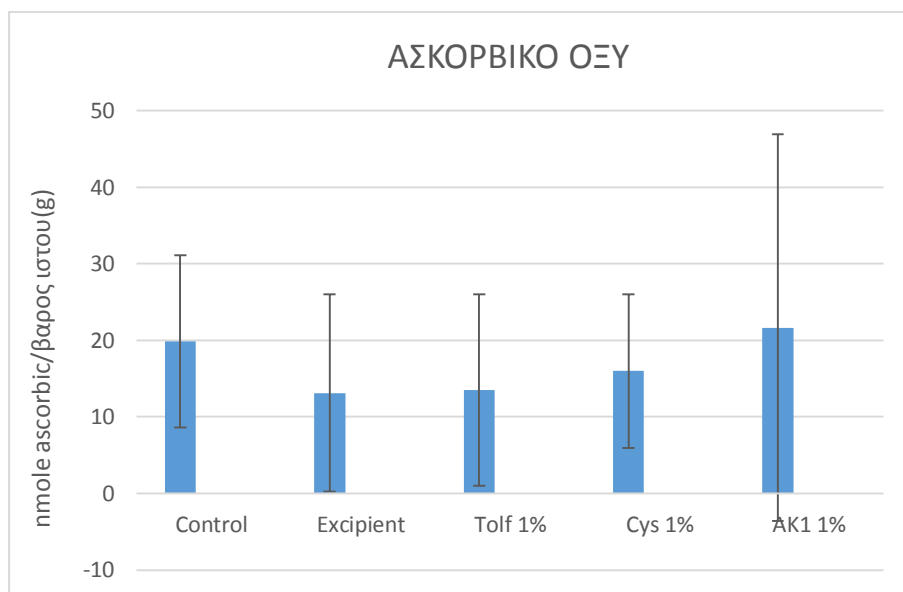
ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ
	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)	μmole / βάρος ιστού (g)
Control	62,38 ($\pm 17,58$)	60,85 ($\pm 25,50$)	19,85 ($\pm 11,23$)
Excipient	52,13 ($\pm 17,78$)	52,29 ($\pm 12,11$)	13,11 ($\pm 12,87$)
Tolf 1%	51,56 ($\pm 16,11$)	45,94 ($\pm 7,54$)	13,53 ($\pm 12,51$)
Cys 1%	55,44 ($\pm 16,33$)	51,35 ($\pm 9,67$)	16,00 ($\pm 10,05$)
AK1 1 %	73,42 ($\pm 32,00$)	79,49 ($\pm 19,31$)	21,66 ($\pm 25,22$)



Διάγραμμα 29. Σύγκριση των συγκεντρώσεων του ουρικού οξέος μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.



Διάγραμμα 30. Σύγκριση των συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14. Σημαντική διαφορά * $p \leq 0.02$ σε σχέση με όλες τις άλλες αγωγές (Πίνακες 107) εντός της ίδιας ημέρας.



Διάγραμμα 31. Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος στο διαβητικό δέρμα (14^η ημέρα).

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές των αντιοξειδωτικών και στις τρεις φάσεις των strippings ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov – Smirnov (K-S). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 104**.

Πίνακας 104. Τιμές κριτηρίου K-S για τις τιμές των αντιοξειδωτικών δεικτών τις ημέρες -0, 0 και 14 του πειράματος.

ΟΜΑΔΑ	ΟΥΡΙΚΟ	GSH	ΟΥΡΙΚΟ	GSH	ΟΥΡΙΚΟ	GSH	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ
	-0		0		14		
Excipient	0,841	0,904	1,000	0,989	0,419	0,957	0,435
Tolf 1 %	0,997	0,312	0,902	0,984	0,747	0,989	0,889
Cys 1%	0,741	0,773	0,964	0,845	0,849	0,404	0,875
Ak1 1%	0,994	0,976	0,901	0,971	1,000	0,963	0,708
Control	0,992	0,997	0,944	0,990	0,688	0,697	0,836

Στον **Πίνακα 104** φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του ελέγχου K-S είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές των αντιοξειδωτικών ακολουθούν κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης (paired t-test και ANOVA).

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στους **Πίνακες 105-106**.

Πίνακας 105. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων γλουταθειόνης στα strippings μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΕΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ ($\times 10^{-4}$)	ΜΕΓΙΣΤΟ ($\times 10^{-4}$)	P
Excipient	(-)0-14	5,96	0,125	0,000
	0-14	2,10	8,49	0,005
	(-)0-0	-30,19	8,20	0,065
Tolf	(-)0-14	4,26	0,145	0,003
	0-14	3,84	8,88	0,000
	(-)0-0	-2,31	8,35	0,232
Cys	(-)0-14	7,94	0,116	0,000
	0-14	3,12	7,34	0,000
	(-)0-0	2,60	8,29	0,003
AK1	(-)0-14	54,15	9,91	0,033
	0-14	-57,75	3,05	0,155
	(-)0-0	90,87	8,384	0,020
Control	(-)0-14	1,56	9,84	0,013
	0-14	-59,44	5,01	0,107
	(-)0-0	1,08	5,12	0,007

Πίνακας 106. Paired t-test για τη σύγκριση των συγκεντρώσεων ουρικού οξέος στα strippings μεταξύ των ημερών -0, 0 και 14.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΕΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ ($\times 10^{-4}$)	ΜΕΓΙΣΤΟ ($\times 10^{-4}$)	P
Excipient	(-)0-14	-1,32	55,06	0,364
	0-14	-3,47	12,53	0,064
	(-)0-0	-74,14	3,32	0,177
Tolf	(-)0-14	-1,89	2,28	0,828
	0-14	-3,56	1,34	0,309
	(-)0-0	-850,31	3,51	0,059
Cys	(-)0-14	-3,67	2,46	0,633
	0-14	-2,32	47,92	0,152
	(-)0-0	-44,43	3,25	0,103
AK1	(-)0-14	-7,19	3,25	0,353
	0-14	-8,49	79,56	0,083
	(-)0-0	-77,69	4,52	0,121
Control	(-)0-14	-3,19	-10,77	0,040
	0-14	-5,19	-30,69	0,035
	(-)0-0	-1,85	1,93	0,952

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς κατά ένα παράγοντα (One way-ANOVA) που βρέθηκαν να είναι σημαντικά με $p \leq 0.05$ απεικονίζονται στον **Πίνακα 107**.

Πίνακας 107. One way-ANOVA για συγκέντρωση γλουταθειόνης την ημέρα 14 των strippings.

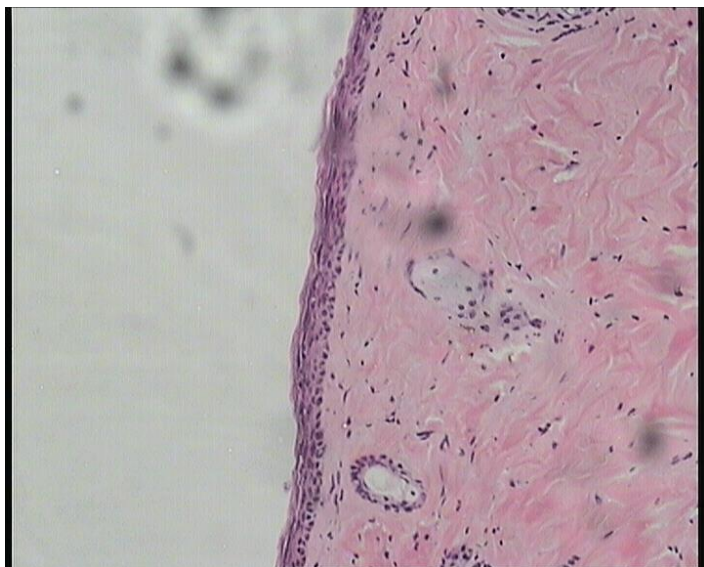
ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	P	ΚΡΙΤΗΡΙΟ
Excipient - AK1 1%	0,001	LSD
Tolf 1% - AK1 1%	0,000	
Cys 1% - AK1 1%	0,000	
Control - AK1 1%	0,019	

Από τα παραπάνω αποτελέσματα (Διαγράμματα **29-31** και αντίστοιχοι Πίνακες) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Τις ημέρες -0 και από τα strippings δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς τις συγκεντρώσεις ουρικού και γλουταθειόνης όπως αναμενόταν, καθώς οι μύες δεν έχουν λάβει διαφορετική αγωγή. Επίσης, σε αυτές τις ημέρες, η πλειοψηφία των δειγμάτων δεν έδειξε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος.
- ✓ Τη 14^η ημέρα, η ομάδα AK1 1% εμφανίζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης γλουταθειόνης σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες ενώ δεν διαφαίνονται ιδιαίτερες διαφορές στις συγκεντρώσεις ουρικού και ασκορβικού οξέος μεταξύ των ομάδων (**Πίνακας 107**).
- ✓ Σε όλες τις ομάδες παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης από την ημέρα -0 (φυσιολογικοί μύες) έως τη 14^η (διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες) ενώ οι ομάδες Excipient, Tolf και Cys εμφανίζουν επίσης σημαντική μείωση από την ημέρα 0 έως τη 14^η, υποδηλώνοντας ότι η αγωγή που έλαβαν δεν ήταν ικανή να επιβραδύνει τις βλαβερές επιπτώσεις του διαβήτη. Αντίθετα, αξιοσημείωτο είναι ότι τη μικρότερη μείωση επιπέδων γλουταθειόνης εμφανίζει η ομάδα AK1 (**Πίνακας 105**).
- ✓ Σε όλες τις ομάδες, το ουρικό οξύ μειώνεται από την ημέρα -0 έως 0, αλλά στη συνέχεια, παραδόξως, ακολουθεί αντίθετη πορεία από αυτή της γλουταθειόνης. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνεται από την ημέρα 0 έως τη 14 και μάλιστα στην περίπτωση της ομάδας Control, αυτή η αύξηση είναι στατιστικά σημαντική (**Πίνακας 106**). Φάνεται ότι ενώ τα επίπεδά του μειώνονται μειώνονται σε περίπτωση αρχικών σταδίων διαβήτη, εν συνεχεία αυξάνονται σε προχωρημένο στάδιο διαβήτη και ακτινοβολίας. Πάντως ο ρόλος του ουρικού είναι αμφιλεγόμενος (Satin Y. And Johnson R., 2008).
- ✓ Συμπερασματικά, η μόνη αγωγή που έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ήταν αυτή της AK1 που επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση όσον αφορά τα επίπεδα γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

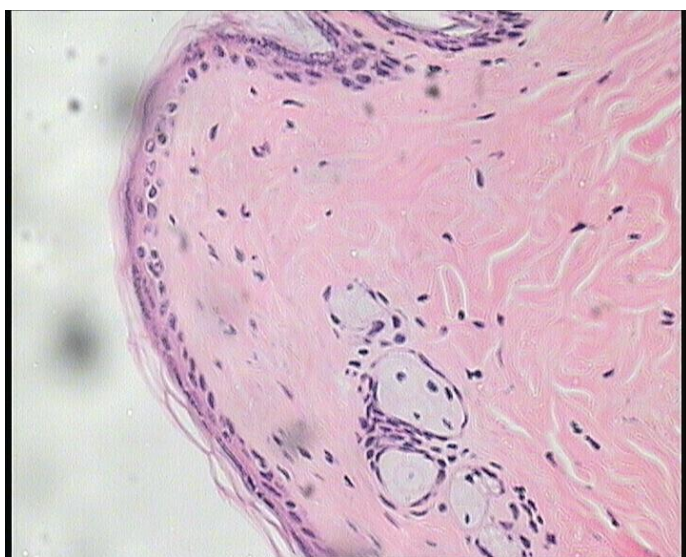
7.3.7. Αποτελέσματα ιστοπαθολογικής μελέτης

Από τα δείγματα δέρματος που ελήφθησαν στο τέλος του πειράματος, σχηματίστηκαν τομές στις οποίες έγινε χρώση αιμοτοξυλίνης-ηωσίνης και παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο και βγήκαν συμπεράσματα για τη φλεγμονή, την υπερκεράτωση και τον ερεθισμό. Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες δέρματος από κάθε ομάδα.



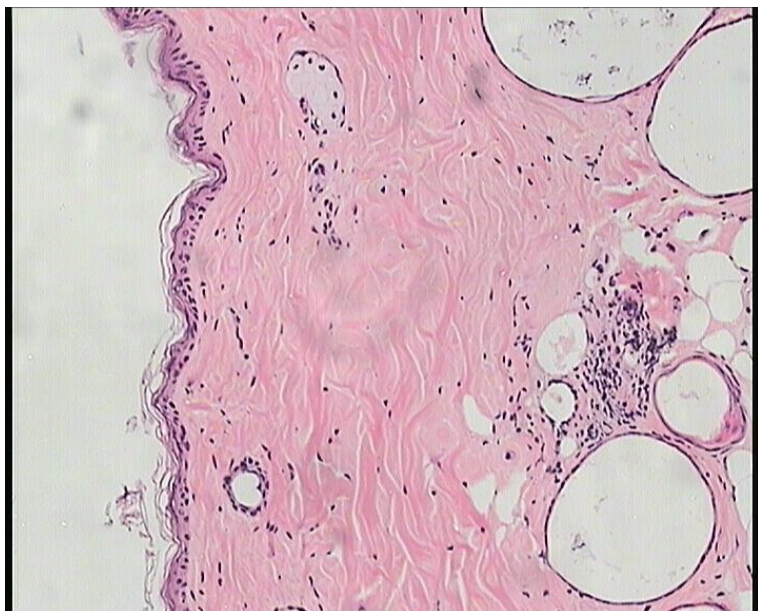
Εικόνα 37. Τομή δέρματος μυός ομάδας Excipient (μεγέθυνση x200).

Η ομάδα Excipient (έκδοχο) παρουσιάζει μέτρια φλεγμονή, καθώς παρατηρούνται αραιά λεμφοκύτταρα (**Εικόνα 37**).



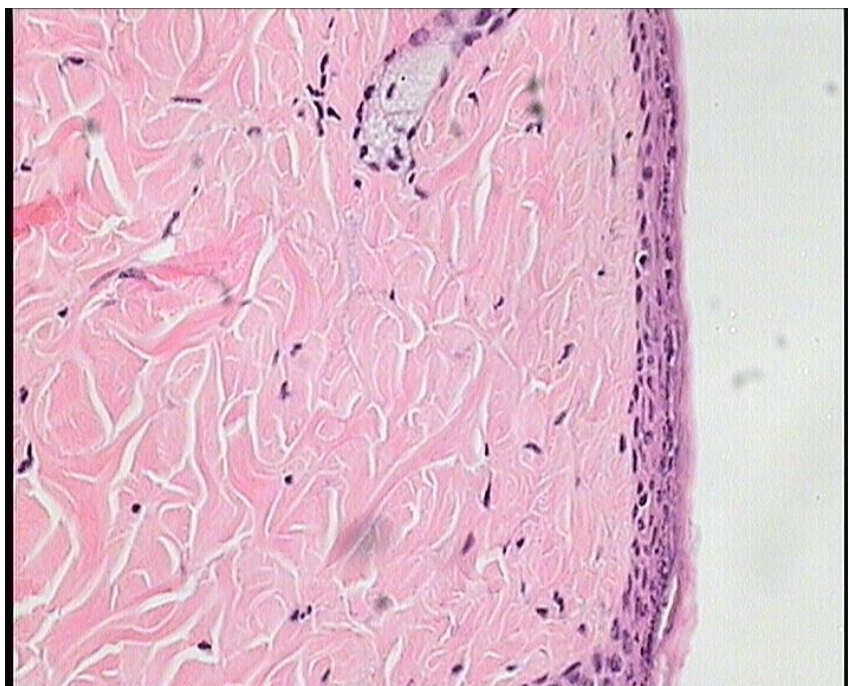
Εικόνα 38. Τομή δέρματος μυός ομάδας Tolf 1% (μεγέθυνση x400).

Η ομάδα Tolf 1% εμφανίζει αραιά και μέτρια σε αριθμό λεμφοκύτταρα, παρουσιάζοντας μία λιγότερο καλή κλινική εικόνα σε σχέση με την ομάδα Excipient (**Εικόνα 38**).



Εικόνα 39. Τομή δέρματος μυός ομάδας Cys 1% (μεγέθυνση x200).

Στην ομάδα Cys 1% παρατηρούνται καταθροίσεις και μεμονωμένα λεμφοκύτταρα. Η κλινική εικόνα είναι καλύτερη από τις προηγούμενες ομάδες (**Εικόνα 39**).



Εικόνα 40. Τομή δέρματος μυός ομάδας AK1 1% (μεγέθυνση x400).

Η ομάδα AK1 1% παρουσιάζει φυσιολογική επιδερμίδα χωρίς σημεία υπερπάχυνσης ενώ συγχρόνως δεν παρατηρούνται στοιχεία φλεγμονής (**Εικόνα 40**).



Εικόνα 41. Τομή δέρματος μυός ομάδας Control (μεγέθυνση x100).

Η ομάδα Control εμφανίζει ελαφρού βαθμού υπερκεράτωση. Παρατηρείται έντονη φλεγμονή λόγω εμφάνισης μεγάλου αριθμού λεμφοκυττάρων (**Εικόνα 41**).

Συμπερασματικά, η ομάδα Control εμφάνισε την πιο έντονη φλεγμονή, ακολουθούμενη από την ομάδα Tolf, Excipient και Cys. Η ομάδα AK1 έδειξε την καλύτερη κλινική εικόνα καθώς παρουσιάζει φυσιολογική επιδερμίδα χωρίς στοιχεία φλεγμονής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η *in vivo* φαρμακολογική δράση του AK1 που έχει σχεδιαστεί και αναπτυχθεί ως πολυλειτουργικό αντιοξειδωτικό-αντιφλεγμονώδες μόριο, την εκτίμηση της δόσης στην οποία το φαρμακομόριο παρουσιάζει τη μέγιστη θεραπευτική του δράση, καθώς και τη σύγκριση της δράσης του σε σχέση με δύο μητρικά μόρια (ενώσεις αναφοράς).

- Στην πρώτη πειραματική μελέτη, παρατηρήσαμε ότι η ομάδα των μαρτύρων που δεν έλαβε κάποια αγωγή (Control) εκδήλωσε τη μεγαλύτερη επιδείνωση μετά την ακτινοβόληση, καθώς παρουσίασε σημαντική αύξηση της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από την κλινική εικόνα (φωτοτεκμηρίωση). Η AK1 ήρθε δεύτερη στην αύξηση της TEWL, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι μείωσε τη μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού, αλλά όχι τόσο όσο οι υπόλοιπες ομάδες των ενώσεων αναφοράς. Ωστόσο, εμφάνισε καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την ενυδάτωση. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική εξέταση, πάντως, η AK1 εμφάνισε καλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες αγωγές καθώς η σειρά με την οποία κατατάσσονται οι ομάδες βάσει της ίασης της φλεγμονής είναι: 1. AK1, 2. Cys, 3. Excipient, 4. Control, 5. Tolf.
- Στη δεύτερη πειραματική μελέτη, η AK1 σε ποσοστά 0,1% και 1% εκδήλωσε ισχυρότερη θεραπευτική δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, καθώς παρουσίασε τις μικρότερες τιμές TEWL. Και σε αυτή την περίπτωση, ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης δε συνέβαλε στην προστασία της επιδερμίδας από UV, καθώς στην έξαρση της φλεγμονής οι αντίστοιχες ομάδες εμφάνισαν υπερπλασία. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική εξέταση, την πιο ευεργετική δράση παρουσίασε το παράγωγο AK1 σε ποσοστό 0,1% και 1%, καθώς δεν παρατηρήθηκαν φλεγμονώδη στοιχεία. Τέλος, καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στο δέρμα εμφάνισαν το παράγωγο AK1 σε ποσοστό 1%, το τολφαιναμικό οξύ και ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης σε ποσοστό 0,1%, καθώς αύξησαν τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του δέρματος ενώ το τολφαιναμικό σε ποσοστό 0,1% αύξησε τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα.
- Στην τρίτη πειραματική μελέτη, η AK1 εμφάνισε ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς προκάλεσε τη μικρότερη αύξηση της TEWL κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επιπλέον, το διάλυμα AK1 1% συνέβαλε σημαντικά στη μείωση της φλεγμονής την ημέρα της έξαρσής της, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχη ομάδα να παρουσιάσει πιο ήπια διαταραχή του επιδερμικού φραγμού. Επιπλέον, το γεγονός ότι από την 7^η έως την 11^η ημέρα η AK1 1% διατηρεί υψηλότερα

επίπεδα ενυδάτωσης, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ένωση AK1 συμβάλλει ταχύτερα στην επαναφορά του φραγμού σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις και τον φορέα. Η ένωση AK1 και ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης βελτίωσαν πολύ πιο γρήγορα την κλινική εικόνα των μυών σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική εξέταση, την πιο ευεργετική δράση και στην περίπτωση διαβητικών μυών παρουσίασε το παράγωγο AK1 ενώ στη συνέχεια ακολουθούν ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης, το έκδοχο και το τολφαιναμικό οξύ. Σημαντικά μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στο δέρμα παρουσίασε επίσης το παράγωγο AK1 και δευτερευόντως ο αιθυλεστέρας της κυστεΐνης και το τολφαιναμικό οξύ. Στο ίδιο συμπέρασμα μας οδηγούν και τα αποτελέσματα της μέτρησης της γλουταθειόνης στην κεράτινη στιβάδα, καθώς η τοπική εφαρμογή του AK1 συνέβαλε στην προστασία της γλουταθειόνης στην επιδερμίδα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μέτρησης των αντιοξειδωτικών μεταξύ των δύο τελευταίων πειραματικών μελετών, καθώς διεξήχθησαν υπό διαφορετικές συνθήκες. Επίσης, ορισμένοι περιορισμοί της διαδικασίας μέτρησης των αντιοξειδωτικών στην παρούσα φάση αποτελούν αντικείμενο βελτιστοποίησης της μεθόδου αυτής στο μέλλον.

- Μεταξύ ακτινοβολημένων διαβητικών και ακτινοβολημένων μη διαβητικών μυών παρατηρήθηκαν ομοιότητες όσον αφορά στην επιδερμίδα, καθώς και στις δύο περιπτώσεις στο τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε ελαφριά υπερκεράτωση. Παρολαυτά, τα στοιχεία της φλεγμονής ήταν εντονότερα στους διαβητικούς μύες. Αντίθετα, η ομάδα AK1 εμφάνισε και στις δύο περιπτώσεις φυσιολογική επιδερμίδα χωρίς υπερκεράτωση ενώ παρατηρήθηκε μόνο μία ελαφριά εν τω βάθει φλεγμονή στους μη διαβητικούς μύες.
- Εν κατακλείδι, η μελέτη μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ένωση AK1, παράγωγο που συνδυάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, έχει μεγαλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα από τα δύο μητρικά μόρια-ενώσεις αναφοράς.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afaq, F. and Mukhtar, H. (2001). Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), pp.61-69.
- Afaq, F. and Mukhtar, H. (2002). Photochemoprevention by Botanical Antioxidants. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(5), pp.297-306.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. and Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in Inflammatory Skin Diseases. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(3), pp.329-334.
- American Diabetes Association (2013). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 36 (Supplement_1), pp.S67-S74.
- Biswas, S. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp.1-9.
- Bowie, A. and O'Neill, L. (2000). Vitamin C Inhibits NF- B Activation by TNF Via the Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Immunology*, 165(12), pp.7180-7188.
- Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1219-1222.
- Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G., Varani, J. and Voorhees, J. (2003). Matrix Metalloproteinase-1 is the Major Collagenolytic Enzyme Responsible for Collagen Damage in UV-irradiated Human Skin¹. *Photochemistry and Photobiology*, 78(1), pp.43-48.
- Cadet J, Douki T, Pouget J-P et al. (2001) Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Curr Probl Dermatol* 29 pp.62-73.
- Chen, X., Lin, W., Lu, S., Xie, T., Ge, K., Shi, Y., Zou, J., Liu, Z. and Liao, W. (2010). Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats. *Experimental Dermatology*, 19(12), pp.1088-1095.
- Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. (2001) Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 79, 547-68.

- D’Orazio, J., Jarrett, S., Marsch, A., Lagrew, J. and Cleary, L. (2013). Melanoma — Epidemiology, Genetics and Risk Factors. In: L. Davids, ed., *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, 1st ed.
- Darlenski, R., Kazandjieva, J. and Tsankov, N. (2011). SKIN BARRIER FUNCTION: MORPHOLOGICAL BASIS AND REGULATORY MECHANISMS. *J. Clin. Med*, 4(1), pp.36-45.
- Diffey, B. and Kochevar, I. (2007). Basic principles of photobiology. In: H. Lim, H. Honigsmann and J. Hawk, ed., *Photodermatology*, 1st ed.
- Dreher, F. (2017). Antioxidants. In: R. Baran and H. Maibach, ed., *Textbook of Cosmetic Dermatology*, 5th ed. CRC Press, pp.80-85.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), pp.1736-1743.
- Fratlicelli, A., Serrano, C., Bochner, B., Capogrossi, M. and Zweier, J. (1996). Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1310(3), pp.251-259
- Fuller, B. (2015). Antioxidants and Anti-inflammatories. In: Z. Draelos, ed., *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*, 1st ed. John Wiley & Sons.
- Galanakis, D., Kourounakis, A., Tsiakitzis, K., Doulgeris, C., Rekka, E., Gavalas, A., Kravaritou, C., Charitos, C. and Kourounakis, P. (2004). Synthesis and Pharmacological Evaluation of Amide Conjugates of NSAIDs with L-Cysteine Ethyl Ester, Combining Potent Antiinflammatory and Antioxidant Properties with Significantly Reduced Gastrointestinal Toxicity. *ChemInform*, 35(47).
- Giacco, F. and Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*, 107(9), pp.1058-1070.
- Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M. and Dahmane, R. (2014). The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, pp.1-6.
- Goldin, A., Beckman, J., Schmidt, A. and Creager, M. (2006). Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*, 114(6), pp.597-605.

- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), pp.851-857
- Halliday, G. (2005). Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2), pp.107-120.
- Harper, J., Adami GR, G., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), pp.805-816.
- Hayward, M. and Keatinge, W. (1981). Roles of subcutaneous fat and thermoregulatory reflexes in determining ability to stabilize body temperature in water. *The Journal of Physiology*, 320(1), pp.229-251.
- Howland, R., Mycek, M., Harvey, R. and Champe, P. (2006). *Lippincott's illustrated reviews*. 1st ed. Philadelphia etc.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hruza, L. and Pentland, A. (1993). Mechanisms of UV-Induced Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(1), pp.S35-S41.
- Huang, M., Ghai, G. and Ho, C. (2004). Inflammatory Process and Molecular Targets for Antiinflammatory Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(4), pp.127-139.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189: 21–39
- Kay-Mugford, P., Benn, S., LaMarre, J. and Conlon, P. (2000). In vitro effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 61(7), pp.802-810.
- Koch, S., Kohl, K., Klein, E., Vonbubnoff, D. and Bieber, T. (2006). Skin homing of Langerhans cell precursors: Adhesion, chemotaxis, and migration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), pp.163-168.
- Kohen, R. and Gati, I. (2000). Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*, 148(2-3), pp.149-157.
- Kourounakis, A., Galanakis, D., Tsiakitzis, K., Rekka, E. and Kourounakis, P. (1999). Synthesis and pharmacological evaluation of novel derivatives of anti-

- inflammatory drugs with increased antioxidant and anti-inflammatory activities. *Drug Development Research*, 47(1), pp.9-16.
- Kourounakis, P., Tsiakitzis, K., Kourounakis, A. and Galanakis, D. (2000). Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. *Toxicology*, 144(1-3), pp.205-210.
- Kurahashi, T. and Fujii, J. (2015). Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *Journal of Developmental Biology*, 3(2), pp.57-70
- Lee, C., Wu, S., Hong, C., Yu, H. and Wei, Y. (2013). Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), pp.6414-6435.
- Lee, S., Jeong, S. and Ahn, S. (2006). An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Medical Journal*, 47(3), p.293.
- Liao, H., Zakhaleva, J. and Chen, W. (2009). Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials*, 30(9), pp.1689-1696.
- Logan G, Wilhelm DL. Vascular permeability changes in inflammation. (1966) I. The role of endogenous permeability factors in ultraviolet injury. *Br. J. Exp. Pathol.* 47: 300-14.
- Lu, W. and Wu, S. (2012). Mechanism for dynamic regulation of iNOS expression after UVB-irradiation. *Molecular Carcinogenesis*, 52(8), pp.627-633.
- Lugo, L., Lei, P. and Andreadis, S. (2011). Vascularization of the Dermal Support Enhances Wound Re-Epithelialization by In Situ Delivery of Epidermal Keratinocytes. *Tissue Engineering Part A*, 17(5-6), pp.665-675.
- Lushchak, V. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, pp.1-26.
- M. Lazo-de-la-Vega-Monroy and C. Fernández-Mejía (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.)

- Matough, F., Budin, S., Hamid, Z., Alwahaibi, N. and Mohamed, J. (2012). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(1), pp.5-18.
- Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. (2002). Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(26).
- Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(3), pp.298-308.
- Mauviel, A. (1993). Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4), pp.288-295
- McGrath, J. and Uitto, J. (2010). Anatomy and Organization of Human Skin. In: T. Burns, S. Breathnach, N. Cox and C. Griffiths, ed., *Rook's Textbook of Dermatology*, 8th ed.
- McLafferty, E., Hendry, C. and Farley, A. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nursing Standard*, 27(3), pp.35-42.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.428-435.
- Miura, Y., Honda, S., Masuda, A. and Masuda, T. (2014). Antioxidant activities of cysteine derivatives against lipid oxidation in anhydrous media. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(8), pp.1452-1455.
- Montagut, C., Rovira, A., Gascon, P., Ross, J. and Albanell, J. (2005). Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer treatment. *Drugs of Today*, 41(5), p.299.
- Müllauer, L., Gruber, P., Sebinger, D., Buch, J., Wohlfart, S. and Chott, A. (2001). Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488(3), pp.211-231.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S., Galle, P., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P. (1998). p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(11), pp.2033-2045
- Natsuga, K. (2014). Epidermal Barriers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4(4), pp.a018218.

- Park, H., Kim, J., Jung, M., Chung, C., Hasham, R., Park, C. and Choi, E. (2011). A long-standing hyperglycaemic condition impairs skin barrier by accelerating skin ageing process. *Experimental Dermatology*, 20(12), pp.969-974.
- Pastore, S., Mascia, F., Mariani, V. and Girolomoni, G. (2006). Keratinocytes in skin inflammation. *Expert Review of Dermatology*, 1(2), pp.279-291.
- Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 27(1), pp.17-34.
- Pincelli, C. and Marconi, A. (2010). Keratinocyte stem cells: Friends and foes. *Journal of Cellular Physiology*, 225(2), pp.310-315.
- Pinnell, S. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), pp.1-22.
- Podda, M., Traber, M., Weber, C., Yan, L. and Packer, L. (1998). UV-Irradiation Depletes Antioxidants and Causes Oxidative Damage in a Model of Human Skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1), pp.55-65.
- Quondamatteo, F. (2013). Skin and diabetes mellitus: what do we know?. *Cell and Tissue Research*, 355(1), pp.1-21.
- Redel, H., Gao, Z., Li, H., Alekseyenko, A., Zhou, Y., Perez-Perez, G., Weinstock, G., Sodergren, E. and Blaser, M. (2013). Quantitation and Composition of Cutaneous Microbiota in Diabetic and Nondiabetic Men. *Journal of Infectious Diseases*, 207(7), pp.1105-1114.
- Sakai, S., Kikuchi, K., Satoh, J., Tagami, H. and Inoue, S. (2005). Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *British Journal of Dermatology*, 153(2), pp.319-323.
- Sautin, Y. and Johnson, R. (2008). Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27(6-7), pp.608-619.
- Schafer, M. and Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*, 58(2), pp.165-171.
- Scholz, H., Yndestad, A. and Damas, J. (2003). 8-Isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovascular Research*, 59(4), pp.945-954.

- Seirafi, H., Farsinejad, K., Firooz, A., Davoudi, S., Robati, R., Hoseini, M., Ehsani, A. and Sadr, B. (2009). Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23(2), pp.146-149.
- Seo, S., Choi, H., Chung, H. and Hong, C. (2002). Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines. *British Journal of Dermatology*, 147(4), pp.655-662.
- Shindo, Y., Witt, E. and Packer, L. (1993). Antioxidant Defense Mechanisms in Murine Epidermis and Dermis and Their Responses to Ultraviolet Light. *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3), pp.260-265.
- Svobodova, A., Walterova, D. and Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical Papers*, 150(1), pp.25-38.
- Takashima, M., Shichiri, M., Hagihara, Y., Yoshida, Y. and Niki, E. (2012). Reactivity toward oxygen radicals and antioxidant action of thiol compounds. *BioFactors*, 38(3), pp.240-248
- Telang, P. (2013). Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 4(2), p.143.
- Trautinger, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(7), pp.573-577.
- Young, B., Lowe, J., Stevens, A. and Heath, J. ed., (2006). Skin. In: *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*, 5th ed. pp.167-185.
- Zhan, J., Wang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, L., Chen, J., Huang, S., Zeng, H. and Lai, X. (2016). Andrographolide Sodium Bisulfate Prevents UV-Induced Skin Photoaging through Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016, pp.1-12.
- Zimmet, P., Alberti, K. and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), pp.782-787.