



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΣΗ ΗΜΙΣΤΕΡΕΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ
ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ, ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ IN VITRO
ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ IN VIVO
ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ**



ΑΡΙΤΖΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ-ΜΑΡΙΑ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

Τριμελής Επιτροπή

Παρασκευάς Δάλλας,

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μιχαήλ Ράλλης,

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευάγγελος Καραλής,

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μετά το πέρας της εργασίας αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παρασκευά Δάλλα για τη συνεχή καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη για τις παρατηρήσεις και συμβουλές του σε πολλά στάδια της εργασίας.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εύαγγελο Καραλή για τη βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων
- Τον κ. Σφηνιαδάκη, Ιατρό-Ιστοπαθολόγο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών για την βοήθειά του στην ιστοπαθολογική εξέταση δειγμάτων.
- Τους συνάδελφους μεταπτυχιακούς φοιτητές στα εργαστήρια Φαρμακευτικής Τεχνολογίας για το κλίμα συνεργασίας και αλληλοβοήθειας.
- Την εταιρεία FAGRON HELLAS για την χορήγηση της δραστικής ουσίας Ρεσβερατρόλης και του Transcutol[®].

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη συνεχή στήριξη και το ενδιαφέρον τους.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	1
1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά	1
1.1.2 Δομή Δέρματος	1
1.1.3 Αιμάτωση του δέρματος	11
1.1.4 Νεύρωση του δέρματος	11
1.1.5 Εξαρτήματα του δέρματος.....	12
1.1.6 Φυσιολογία Δέρματος	15
1.2 ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	17
1.2.1 Εισαγωγή.....	17
1.2.2 Διαπέραση ουσιών από το δέρμα	19
1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση.....	28
1.2.4 Βελτιστοποίηση Διαδερμικής Απορρόφησης	34
1.2.5 Μέθοδοι μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης.....	42
1.2.6 Κριτήρια επιλογής κατάλληλου φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση.....	51
1.3 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	53
1.3.1 Υπεριώδης ακτινοβολία	53
1.3.2 Επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα	54
1.3.3 Φλεγμονή από UV ακτινοβολία	58
1.3.4 Καταπολέμηση φλεγμονής επαγόμενης από UV ακτινοβολία.....	59
1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑ	60
1.4.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	60
1.4.2 Οξειδωτικό στρες στο δέρμα προκαλούμενο από UV ακτινοβολία	62
1.4.3 Αντιοξειδωτικά στο δέρμα	63
1.5 ΡΕΣΣΕΡΑΤΡΟΛΗ	64
1.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	64
1.5.2 Φαρμακοκινητική.....	65
1.5.3 Φαρμακοδυναμική.....	65
1.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	69
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	73
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	74
2 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑ.....	74
2.1 ΥΛΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	74
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	76
2.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	76
2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	76
2.3 ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ.....	79
2.3.1 Επιλογή κατάλληλου φορέα	79
2.3.2 Παρασκευή των γελών	81
2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών	81
2.3.4 Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα	82
2.3.5 In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας	83
2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ	87
2.4.1 Επιλογή κατάλληλου φορέα	87

2.4.2	Πειράματα προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού	88
2.4.3	Παρασκευή των γελών	89
2.4.4	Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών	89
2.4.5	In vitro πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας	90
3	IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ	91
3.1	ΥΛΙΚΑ, ΌΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	91
3.2	ΖΩΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:.....	92
3.2.1	Ζωικό πειραματικό πρωτόκολλο	92
3.2.2	Πειραματική διαδικασία	94
3.3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΜΕΤΡΗΣΙΜΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.....	96
3.3.1	Μέτρηση Άδηλης Απώλειας νερού	96
3.3.2	Μέτρηση της ενυδάτωσης:	96
3.3.3	Μέτρηση του πάχους του δέρματος:.....	97
3.3.4	Μέτρηση ερυθρότητας του δέρματος :	97
3.3.5	Μέτρηση της ελαστικότητας:.....	97
3.3.6	Φωτοτεκμηρίωση:.....	98
4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	98
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
5	IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑ.....	101
5.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΛΗΨΕΩΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ ΤΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ 101	
5.2	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	101
5.2.1	Εμφάνιση χρωματογραφήματος.....	101
5.2.2	Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων χρωματογραφικές κορυφές	102
5.3	ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ	102
5.3.1	Επιλογή κατάλληλου φορέα φορέα.....	102
5.3.2	Παρασκευή των γελών	104
5.3.3	Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών	105
5.3.4	Προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα	106
5.3.5	In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας	108
5.3.6	Πείραμα διάχυσης σε τεχνητή μεμβράνη STRAT-M	108
5.3.7	Πείραμα διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα	115
5.4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ	121
5.4.1	Επιλογή φορέα	122
5.4.2	Πειράματα υπολογισμού διαλυτότητας κορεσμού στους τελικούς φορείς.....	123
5.4.3	Παρασκευή των γελών	124
5.4.4	Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών	124
5.4.5	Επιβεβαίωση καταλληλότητας διαλύματος υποδοχέα	126
5.4.6	In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας	127
5.4.7	Επιβεβαίωση αποτελεσματικότητας επιταχυντή διαβατότητας σε συγκέντρωση 5% 136	
6	IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ- ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ.....	142
6.1.1	Αποτελέσματα –Συζήτηση άδηλης απώλειας νερού TEWL	143
6.1.2	Αποτελέσματα -Συζήτηση Ενυδάτωσης	155
6.1.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση Ερυθρότητας.....	166
6.1.4	Αποτελέσματα-Συζήτηση Πάχους	176
6.1.5	Αποτελέσματα-Συζήτηση Ελαστικότητας	186
6.1.6	Φωτοτεκμηρίωση.....	198
6.1.7	Ιστοπαθολογική εξέταση	201
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	210
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	214

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Λειτουργίες του δέρματος	16
Πίνακας 2 παράγοντες που καθορίζουν την καταλληλότητα ενός φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση.....	52
Πίνακας 3 Συνθήκες ανάλυσης της ρεσβερατρόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	76
Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων	77
Πίνακας 5 Διαλυτότητα Ρεσβερατρόλης στους διαλύτες.....	79
Πίνακας 6 Σύσταση Φορέων	80
Πίνακας 7 Τελικές συνταγές.....	81
Πίνακας 8 Σύσταση Φορέα	87
Πίνακας 9 Σύσταση των τελικών φορέων με ενισχυτή διαπερατότητας	88
Πίνακας 10 Τελικές συνταγές με ενισχυτή διαπερατότητας	89
Πίνακας 11 Σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην In Vivo μελέτη	91
Πίνακας 12 Περιγραφή Ζωικού Πρωτοκόλλου	94
Πίνακας 13 Σύσταση και διαλυτότητες κορεσμού στα προκαταρκτικά πειράματα προσδιορισμού του κατάλληλου φορέα	103
Πίνακας 14 Τελικές αναλογίες φορέων	104
Πίνακας 15 Συνταγές Ρεσβερατρόλης.....	104
Πίνακας 16 Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των γελών για T=0.....	105
Πίνακας 17 Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των γελών για T=30 ημέρες ...	105
Πίνακας 18 Διαλυτότητα κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο υπό εξέταση διαλύμα του υποδοχέα	106
Πίνακας 19 Συνταγές Ρεσβερατρόλης που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα διάχυσης σε Strat-M.....	109
Πίνακας 20 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm ²) που διαπέρασε την συνθετική μεμβράνη στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές.....	109
Πίνακας 21 Τιμές κριτηρίου κανονικότητας (W-S ή K-S) για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm ²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.....	111
Πίνακας 22 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 3h.	112
Πίνακας 23 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 6h.	112
Πίνακας 24 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 12h.	113
Πίνακας 25 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 24h.	113

Πίνακας 26 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm ²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές.....	115
Πίνακας 27 Τιμές κριτηρίου κανονικότητας (W-S ή K-S) για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm ²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.....	117
Πίνακας 28 . One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h.	118
Πίνακας 29 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h.	118
Πίνακας 30 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h.	119
Πίνακας 31 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h.	119
Πίνακας 32: $Q=(C \cdot V)/A$ (μg/cm ²) στις 12 και 24 ώρες.....	122
Πίνακας 33 Σύσταση τελικών φορέων της δεύτερης πειραματικής μελέτης.....	123
Πίνακας 34 Διαλυτότητες κορεσμού της ρεσβερατρόλης στους πρόδρομους φορείς (n=3)	124
Πίνακας 35 Τελικές Συνταγές Ρεσβερατρόλης.....	124
Πίνακας 36 Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των τελικών γελών για T=0	125
Πίνακας 37 Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των τελικών γελών για T=30 ημέρες	125
Πίνακας 38 Συνταγές ρεσβερατρόλης με ενισχυτή διαπερατότητας.....	128
Πίνακας 39 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm ²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές.....	128
Πίνακας 40 Ροή (J) (μg/cm ² /h) συνταγών με ενισχυτή 5 και 10% ανά 24 ώρες του πειράματος.....	130
Πίνακας 41 : Δείκτης επιτάχυνσης για τη ρεσβερατρόλη.....	130
Πίνακας 42 Τιμές κριτηρίου WS για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm ²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.....	131
Πίνακας 43 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h	132
Πίνακας 44 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h	132
Πίνακας 45 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h	133
Πίνακας 46 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h.....	133
Πίνακας 47: Συνταγές ρεσβερατρόλη με ενισχυτή διαπερατότητας 5%.....	136
Πίνακας 50 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm ²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές.....	137
Πίνακας 49 Ροή (J) (μg/cm ² /h) ανά 24 ώρες του πειράματος	138

Πίνακας 50 : Δείκτης επιτάχυνσης για τη ρεσβερατρόλη	138
Πίνακας 51 Τιμές κριτηρίου SW για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	139
Πίνακας 52 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h	140
Πίνακας 53 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h	140
Πίνακας 54 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h	140
Πίνακας 55 One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h	141
Πίνακας 56 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της TEWL	143
Πίνακας 57 Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών	145
Πίνακας 58 Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής TEWL σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	145
Πίνακας 59 Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής TEWL σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	145
Πίνακας 60 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 0 μεταξύ των ομάδων	146
Πίνακας 61 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων	147
Πίνακας 62 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων	147
Πίνακας 63 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 8 μεταξύ των ομάδων	147
Πίνακας 64 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 8 μεταξύ των ομάδων	148
Πίνακας 65 . One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 15 μεταξύ των ομάδων	148
Πίνακας 66 Paired t-test για τη σύγκριση του TEWL μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα	149
Πίνακας 67 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της ενυδάτωσης	155
Πίνακας 68 Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών	156
Πίνακας 69 Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ενυδάτωσης σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	156
Πίνακας 70 Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ενυδάτωσης σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	157
Πίνακας 71 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 0	158
Πίνακας 72 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1	158
Πίνακας 73 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4	158
Πίνακας 74 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 8	159
Πίνακας 75 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 11	159
Πίνακας 76 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 15	160

Πίνακας 81 Paired t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.	160
Πίνακας 78 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της ερυθρότητας.....	166
Πίνακας 79 Ποσοστιαία μεταβολή της ερυθρότητας σε βάθος χρόνου 14 ημερών	167
Πίνακας 80 Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ερυθρότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.....	167
Πίνακας 81 Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ερυθρότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	168
Πίνακας 82 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 0.....	168
Πίνακας 83 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 1.....	169
Πίνακας 84 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4.....	169
Πίνακας 85 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 8.....	170
Πίνακας 86 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 11.....	170
Πίνακας 87 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 15.....	170
Πίνακας 88 Paired t-test για τη σύγκριση της ερυθρότητας μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.	171
Πίνακας 89 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών του πάχους.....	177
Πίνακας 90: Ποσοστιαία μεταβολή του πάχους σε βάθος χρόνου 14 ημερών.....	177
Πίνακας 91 Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής του πάχους σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	178
Πίνακας 92 Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής του πάχους σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	178
Πίνακας 93 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 0	179
Πίνακας 98 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 1	179
Πίνακας 95 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 4	180
Πίνακας 96 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 8.	180
Πίνακας 97 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 11	180
Πίνακας 98 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 15.	181
Πίνακας 99 Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.	181
Πίνακας 100 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών του ελαστικότητας.....	186
Πίνακας 101 Ποσοστιαία μεταβολή της ελαστικότητας σε βάθος χρόνου 14 ημερών	187
Πίνακας 102 : Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ελαστικότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.....	188
Πίνακας 103 Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ελαστικότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%	188
Πίνακας 104 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 0. ..	189
Πίνακας 105 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 1. .	189
Πίνακας 106 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 4.	190
Πίνακας 107 . One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 8.	190
Πίνακας 108 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 11.	190
Πίνακας 109 One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 15.	191
Πίνακας 110 Paired t-test για τη σύγκριση της ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.	191

Πίνακας 115 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μυών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος	199
--	-----

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Εγκάρσια τομή του δέρματος.....	1
Εικόνα 2 Διαμερισματικό μοντέλο για τη δομή της κεράτινης στιβάδας (“brick and mortar model”).....	3
Εικόνα 3 Δομή της επιδερμίδας	5
Εικόνα 4 : Κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας	6
Εικόνα 5 : Χημική δομή της ευμελανίνης. Το βέλος δείχνει προς τα που συνεχίζει το πολυμερές	8
Εικόνα 6 Δομή δέρματος και των εξαρτημάτων του	12
Εικόνα 7 Η ανατομία του νυχιού.....	14
Εικόνα 8 Αθροιστική ποσότητα του φαρμάκου που διέρχεται διαμέσου του δέρματος ανά μονάδα επιφανείας (μg/cm ²) σε σχέση με το χρόνο (23).....	23
Εικόνα 9 Οδοί διέλευσης προς το δέρμα. Οδός 1: Διέλευση της ουσίας μέσα από την επιδερμίδα. Οδός 2: Θύλακας της τρίχας και σμηγματογόνοι αδένες. Οδός 3: Ιδρωτοποιοί αδένες.....	24
Εικόνα 10 Ενδοκυτταρική και διακυτταρική διαδρομή διάχυσης στην κεράτινη στιβάδα....	26
Εικόνα 11 Στάδια απορρόφησης φαρμάκου από το δέρμα	28
Εικόνα 12 Επίδραση των διάφορων φορέων στην περιεκτικότητα του νερού της κεράτινης στιβάδας και στη διείσδυση των δραστικών συστατικών (3).....	35
Εικόνα 13 Θέσεις δράσεις των επιταχυντών διαβατότητας σύμφωνα με τη θεωρία L-P-P... 38	
Εικόνα 14 Παραδείγματα επιταχυντών διαβατότητας	39
Εικόνα 15 Μικροβελόνες (32)	40
Εικόνα 16 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Ιοντοφόρησης (32).....	41
Εικόνα 17 Συσκευή Ιοντοφόρησης (32)	41
Εικόνα 18 Συσκευή Ηλεκτροφόρησης (32)	42
Εικόνα 19 Τεχνική Tape Stripping	45
Εικόνα 20 Μικροδιάλυση. Το φυσιολογικό διάλυμα που διοχετεύεται στο εσωτερικό του καθετήρα βρίσκεται σε ισορροπία με τα διαχεόμενα μόρια των γύρω ιστών.	46
Εικόνα 21 Τυπικό κύτταρο διάχυσης	49
Εικόνα 22 Φάσμα UV της Ηλιακής Ακτινοβολίας	53
Εικόνα 23 Σημεία Φωτογήρανσης	57
Εικόνα 24 Φωτοϊσομερισμός της Ρεσβερατρόλης	65
Εικόνα 25 Μηχανισμός Αντιφλεγμονώδους δράσης της Ρεσβερατρόλης	66
. .Εικόνα 26 Σχηματική παράσταση διεργασίας ή συστήματος	71
Εικόνα 27 Σχηματική παράσταση διεργασίας ή συστήματος.....	71
Εικόνα 28 Δομή Μεμβράνης STRAT-M	84
Εικόνα 29 Χρωματογράφημα Ρεσβερατρόλης	101
Εικόνα 30 Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 10 μg/ml σε υποδοχεία	102

Εικόνα 31 Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης κορεσμού σε συνάρτηση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης PEG400-Γλυκερίνη.....	103
Εικόνα 32 Επίδραση του Transcutol [®] στη λιπιδική διπλοστιβάδα της κεράτινης στιβάδας	134
Εικόνα 33 Μηχανισμός δράσης επιταχυντών διαβατότητας στη λιπιδική διπλοστιβάδα της κερατινής.....	135
Εικόνα 34: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 1 την 15 ^η ημέρα του πειράματος.....	201
Εικόνα 35: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 1 την 15η ημέρα του πειράματος.....	202
Εικόνα 36: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 2 την 15η ημέρα του πειράματος.....	202
Εικόνα 37: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 1 την 15η ημέρα του πειράματος.....	203
Εικόνα 38: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 1 την 15η ημέρα του πειράματος	204
Εικόνα 39: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 2 την 15η ημέρα του πειράματος.....	205
Εικόνα 40: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 2 την 15η ημέρα του πειράματος	206
Εικόνα 41: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100).....	207
Εικόνα 42: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X200).....	207
Εικόνα 43: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος	208
Εικόνα 44: Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος	208

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης *in vitro* σε κύτταρα Franz καθώς και η αποτελεσματικότητα της τοπικής αντιφλεγμονώδους δράσης της *in vivo* σε άτριχους μύες τύπου SKH-1. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της *in vivo* διαπερατότητας με την *in vivo* αποτελεσματικότητα.

Στόχος των *in vitro* πειραμάτων διαπερατότητας ήταν να γίνει μία προσπάθεια ενίσχυσης της διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης αλλά και να εκτιμηθεί μια σειρά παραγόντων που επηρεάζουν τη διαπερατότητα όπως η συγκέντρωση της ουσίας, η θερμοδυναμική ενεργότητα, η σύσταση του φορέα και η επίδραση ενισχυτή διαπερατότητας. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα τόσο σε συνθετική μεμβράνη STRAT-M όσο και σε ανθρώπινη επιδερμίδα, όπου χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα ρεσβερατρόλης με αύξουσα συγκέντρωση (1%, 2,5% και 5%-συγκεντρώσεις κορεσμού). Παρατηρήθηκε ότι το σκέυασμα συγκέντρωσης 2,5% παρουσίασε τη βέλτιστη διαδερμική διαπερατότητα. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το φορέα του σκευάσματος αυτού έγινε μία προσπάθεια ενίσχυσης της διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης με τη χρήση Transcutol® (ethylenglycol monoethyl ether) ως επιταχυντή διαπερατότητας. Το Transcutol® χρησιμοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις (5% και 10%) και η ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση κορεσμού. Και στις δύο συγκεντρώσεις φάνηκε ότι η διαπερατότητα ενισχύθηκε σημαντικά σε σχέση με τη συνταγή που δεν περιείχε ενισχυτή. Η μεγαλύτερη διαπερατότητα επιτεύχθηκε όταν ο επιταχυντής χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5% διαφέροντας σημαντικά από το 10%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in vivo* πείραμα προκειμένου να εκτιμηθεί η αντιφλεγμονώδης δράση της ρεσβερατρόλης αλλά και η επίδραση του ενισχυτή διαπερατότητας και της θερμοδυναμικής ενεργότητας στην κλινική αποτελεσματικότητα. Για το σκοπό αυτό προκλήθηκε φλεγμονή στο δέρμα των μυών με UV ακτινοβολία και εφαρμόστηκαν τα 3 σκευάσματα ρεσβερατρόλης που είχαν δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα στο *in vitro* πείραμα διαπερατότητας. Φάνηκε πως η ρεσβερατρόλη παρουσίασε αντιφλεγμονώδη δράση καθώς οι μάρτυρες παρουσίασαν σημαντικά εντονότερη φλεγμονή από τις ομάδες που έλαβαν θεραπεία με κάποιο σκέυασμα. Όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων φάνηκε πως το σκέυασμα που έδωσε τη βέλτιστη διαπερατότητα ήταν αυτό που έδωσε και τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα κατά της φλεγμονής.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ανατομία και Φυσιολογία Δέρματος

1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

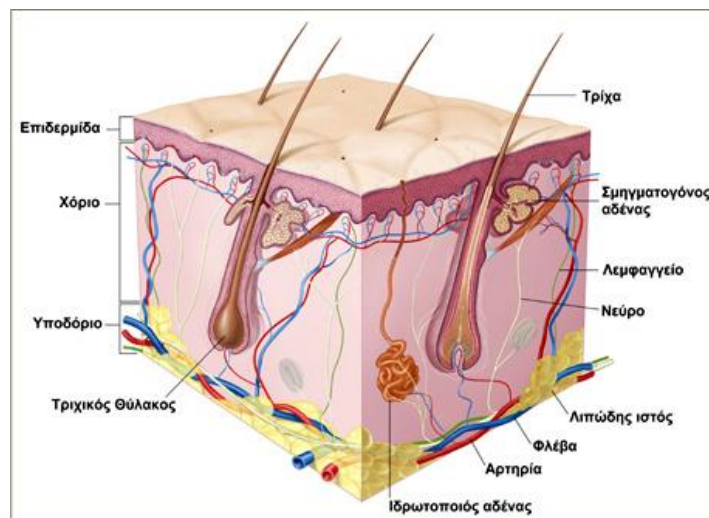
Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος, καλύπτει εξ'ολοκλήρου την εξωτερική του επιφάνεια και αποτελεί το 16% του ολικού του βάρους. Η συνολική επιφάνεια του δέρματος κυμαίνεται από 2500cm² στα νεογνά, μέχρι 18000cm² στους ενήλικες. Το πάχος του ποικίλει από άτομο σε άτομο και ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή. Στους άνδρες γενικά είναι παχύτερο σε σχέση με τις γυναίκες σε όλες τις ανατομικές περιοχές και στα παιδιά είναι σχετικά λεπτό και σταδιακά αυξάνει μέχρι και την 5η δεκαετία που αρχίζει και λεπταίνει. Το χρώμα του επίσης, ποικίλει από άτομο σε άτομο ανάλογα με τη φυλή και την ανατομική περιοχή και εξαρτάται τόσο από την ποσότητα της μελανίνης, της φυσιολογικής χρωστικής που απαντάται στην κεράτινη στιβάδα όσο και από τον αριθμό και το εύρος των αγγείων του. (1) (2) (3)

1.1.2 Δομή Δέρματος

Το δέρμα αποτελείται από έξω προς τα έσω από το ακόλουθα στρώματα:

- επιδερμίδα
- χόριο
- υπόδερμα -υποδόρια στρώματα λίπους-υποδόριος ιστός

Οι τρεις στιβλαδες του δέρματος φαίνονται ξεκάθαρα Στην εικόνα 1 ενώ περισσότερες πληροφορίες για κάθε μια από τις στιβάδες παρατίθενται λεπτομερώς παρακάτω:



Εικόνα 1. Εγκάρσια τομή του δέρματος

1.1.2.1 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα αποτελεί το εξωτερικό στρώμα του δέρματος και είναι ένα πολύστιβο, πλακώδες επιθήλιο που αποτελείται από πέντε οριζόντιες στιβάδες. Έχει μέσο πάχος 1 χιλιοστό, και διαπερνάται από τα εξαρτήματα του δέρματος. Η επιδερμίδα λειτουργεί ως προστατευτική ασπίδα για το σώμα, ενώ ανανεώνεται πλήρως περίπου κάθε 15-30 ημέρες, ανάλογα με τη περιοχή του σώματος. (Εικόνα 1)

Η επιδερμίδα χωρίζεται, αλλά και συνδέεται με το υποκείμενο χόριο, με την κυματοειδή χοριοεπιδερμική συμβολή. Βασικό χαρακτηριστικό της επιδερμίδας είναι ότι στερείται αγγείων και για τη θρέψη της και την αποβολή των προϊόντων του μεταβολισμού εξαρτάται από τη λέμφο που διακινείται μέσω της χοριοεπιδερμικής συμβολής. (2)

Τα κύτταρα που τη συνθέτουν είναι κυρίως κερατινοκύτταρα, σε ποσοστό περίπου 95%, αλλά περιλαμβάνει επίσης μελανοκύτταρα, κύτταρα του Langerhans και κύτταρα Merkel.

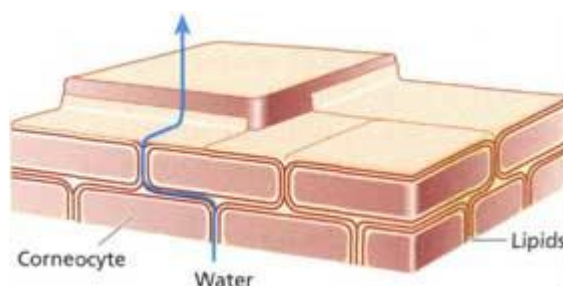
Η επιδερμίδα αποτελείται από 5 στιβάδες οι οποίες από έξω προς τα μέσα είναι:

- Η κεράτινη στιβάδα
- Διαυγής στιβάδα
- Κοκκιώδης στιβάδα
- Ακανθωτή στιβάδα
- Βασική ή στιβάδα μητρική

Κάθε μία στιβάδα αντιπροσωπεύει ένα στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, καθώς τα τελευταία έχουν ως αφετηρία τη βασική στιβάδα και μεταναστεύουν προς την επιφάνεια κατά την πορεία της διαφοροποίησης τους. Η διαδικασία διαφοροποίησης του κερατινοκυττάρου, το οποίο ξεκινάει από τη βασική στιβάδα και τελικά καταλήγει στη κεράτινη στιβάδα σαν απύρηνο, αποπλατυσμένο πετάλιο, λέγεται κερατινοποίηση και διαρκεί 28 μέρες. Έτσι η επιδερμίδα υφίσταται διαρκή ανανέωση.

Κεράτινη στιβάδα: Είναι το πιο επιφανειακό στρώμα της επιδερμίδας και αποτελείται από σκληρά κερατινοκύτταρα που το κυτταρόπλασμα τους γεμίζει από μία νηματοειδή πρωτεΐνη, την κερατίνη. Στην κερατίνη οφείλεται η αντοχή και η σκληρότητα της στιβάδας αυτής που είναι απαραίτητη για την προστασία από μηχανικούς ερεθισμούς. Τα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας είναι αποπλατυσμένα, απύρηνα (νεκρά) κύτταρα και αποπίπτουν συνεχώς. Η κεράτινη στιβάδα μπορεί να έχει πάχος 8-16 στρώματα κυττάρων, ενώ στις παλάμες και στα πέλματα η κεράτινη στιβάδα μπορεί να είναι έως και 10 φορές παχύτερη.

Το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τη δομή της κεράτινης στιβάδας είναι το διαμερισματικό μοντέλο ("brick and mortar model"). Σύμφωνα με αυτό, τα πλούσια σε πρωτεΐνες κύτταρα της κεράτινης στιβάδας αποτελούν τα «τούβλα» ("bricks") που παρέχουν την αναγκαία στήριξη και δύναμη στον δερματικό φραγμό. Το ρόλο του «τσιμέντου» ("mortar") έχουν τα λιπίδια που είναι διατεταγμένα με την μορφή λιπιδικών διπλοστιβάδων. Οι λιπιδικές διπλοστιβάδες αποτελούνται από κεραμίδια, ελεύθερες στερόλες (κυρίως χοληστερόλη), ελεύθερα λιπαρά οξέα, σφιγγολιπίδια και μη πολικά λιπίδια (4)



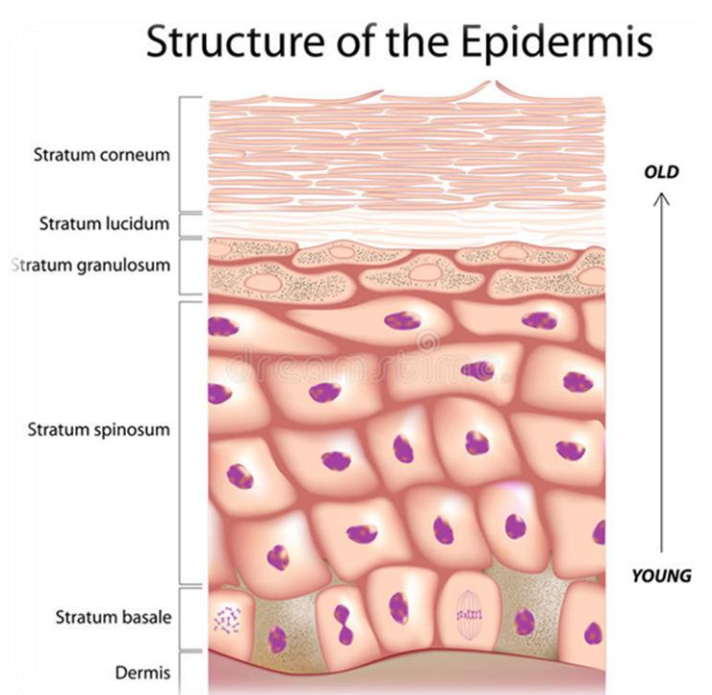
Εικόνα 2. Διαμερισματικό μοντέλο για τη δομή της κεράτινης στιβάδας ("brick and mortar model")

Διαυγής στιβάδα: Η διαυγής στιβάδα βρίσκεται μεταξύ της κεράτινης και της κοκκιώδους στιβάδας και ονομάζεται έτσι διότι δεν βάφεται από τις κοινές χρωστικές. Εμφανίζεται αποκλειστικά στις παλάμες και στα πέλματα και τα κύτταρα της στιβάδας αυτής περιέχουν μια ουσία που ονομάζεται ελαιοειδίνη. Η ουσία αυτή είναι πιθανώς προϊόν αποσύνθεσης της κερατοϋαλίνης και έχει τις χρωστικές ιδιότητες των λιπών και λιποειδών. (2) (3) (5)

Κοκκιώδης στιβάδα: Σχηματίζεται από 2-3 σειρές αποπλατυσμένων ρομβοειδών κυττάρων τα οποία εμφανίζουν οριζόντια διάταξη. Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιέχει βασεόφιλα κοκκία, τα κοκκία κερατοϋαλίνης ή φιλαγγρίνης. Τα κοκκία αυτά περιέχουν προφιλαγγρίνη. Η προφιλαγγρίνη έχει μεγάλο μοριακό βάρος και περιέχει σημαντικό ποσοστό βασικών αμινοξέων. Κατά τη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων προς κερατινοκύτταρα της κεράτινης στιβάδας η προφιλαγγρίνη αποφωσφορυλιώνεται και μερικώς πρωτεολύεται σχηματίζοντας τη φιλαγγρίνη. Η πρωτεόλυση αυτή αποτελεί μια πηγή αμινοξέων και παραγώγων τους, τα οποία συμβάλλουν στην προστασία της κεράτινης στιβάδας από την αφυδάτωση. Η φιλαγγρίνη κρατάει συνδεδεμένα τα μόρια κερατινών στα κατώτερα στρώματα της κερατίνης στιβάδας. Οι κερατίνες είναι οι πρωτεΐνες των κερατινοκυττάρων. Η στιβάδα αυτή δεν υπάρχει στους βλεννογόνους. (2)

Ακανθωτή στιβάδα: Αποτελείται από 8-10 στρώματα κυττάρων και είναι η παχύτερη της επιδερμίδας. Σε αυτό το στρώμα, τα κερατινοκύτταρα αρχίζουν να γίνονται κάπως αποπλατυσμένα. Στα ανώτερα στρώματα εμφανίζονται τα σωμάτια του Odland ή πεταλιώδη σωμάτια. Τα σωμάτια Odland είναι μικρά ωοειδή οργανίδια με διάμετρο 02,-0,3 μm. Απελευθερώνονται στο μεσοκυττάριο χώρο και συμβάλλουν στον επιδερμικό φραγμό. Επίσης εξασφαλίζουν τη σύνδεση των κερατινοκυττάρων μεταξύ τους. Συγκεκριμένα τα πεταλιώδη σωμάτια παράγουν ένα σύμπλεγμα ουδετέρων σακχάρων συνδεδεμένων με λιπίδια ή πρωτεΐνες (γλυκοσφιγγολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες), υδρολυτικά ένζυμα και ελεύθερες στερόλες. Το σχηματιζόμενο σύμπλεγμα που ελευθερώνεται από τα ανωτέρως διατεταγμένα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας πιθανώς δρα ως συγκολλητική ουσία μεταξύ των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας. Συγχρόνως αυτό το σύμπλοκο καθιστά την κεράτινη στιβάδα αδιαπέραστη από το νερό. (2) (6)

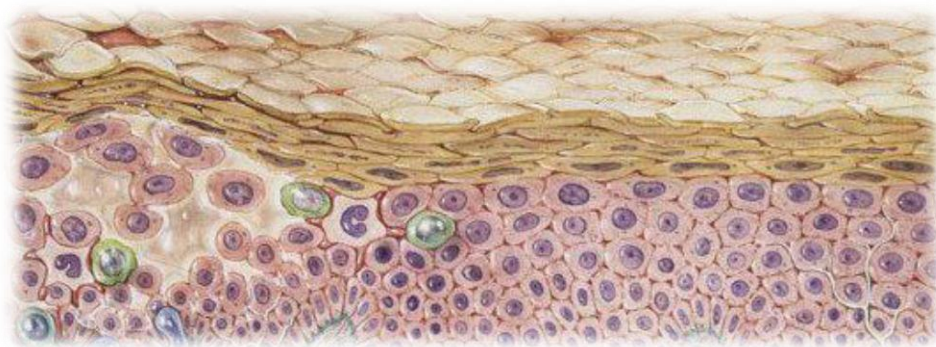
Βασική ή μητρική στιβάδα: Είναι το βαθύτερο στρώμα της επιδερμίδας. Αποτελείται από ένα στοίχο κυττάρων κυλινδρικού σχήματος. Είναι εμπύρνηνα κύτταρα με ωοειδή ή επιμήκη πυρήνα, το κυτταρόπλασμα τους είναι πλούσιο σε ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και λυσοσώματα ενώ συχνά περιέχουν και κοκκία μελανίνης, τα οποία μεταφέρονται από τα γειτονικά μελανοκύτταρα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας διαιρούνται συνεχώς, δημιουργώντας νέα κερατινοκύτταρα, αντικαθιστώντας τα παλιά που έχουν απομακρυνθεί από την επιφάνεια του δέρματος. Συνεπώς, η βασική στιβάδα είναι πολύ σημαντική διότι από αυτή παράγονται όλες οι άλλες στιβάδες της επιδερμίδας αλλά και διότι είναι υπεύθυνη για τη συνεχή ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων. (2)



Εικόνα 3. Δομή της επιδερμίδας

Τα κύτταρα της επιδερμίδας

Κερατινοκύτταρα: Τα κερατινοκύτταρα είναι ο κυρίαρχος τύπος κυττάρου της επιδερμίδας. Παράγουν μια ινώδη πρωτεΐνη που ονομάζεται κερατίνη, συμβάλλοντας στην ακαμψία του εξωτερικού στρώματος του δέρματος. Προστατεύουν το σώμα από το εξωτερικό περιβάλλον, για παράδειγμα από τη διέγερση, την τριβή και τους παθογόνους εξωτερικούς παράγοντες, ενώ διατηρούν την υγρασία. Παράγονται στη βασική στιβάδα, όπου και εμφανίζουν τη μέγιστη μιτωτική τους δραστηριότητα. Στη συνέχεια κινούνται προς τις εξωτερικές στιβάδες σε κάθε μια από τις οποίες υφίστανται διάφορες μεταβολικές διεργασίες, με διάρκεια περίπου 28 ημέρες, για να καταλήξουν νεκρά, στην κεράτινη στιβάδα. Τα κερατινοκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με ένα είδος πρωτεϊνών που ονομάζονται δεσμοσώματα, και δημιουργούν ένα πυκνό πλέγμα μεταξύ τους. Τα δεσμοσώματα έχουν και στα δύο τους άκρα από ένα κερατινοκύτταρο μεταξύ τους. Οι πρωτεΐνες που συνδέουν τα κερατινοκύτταρα στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας ονομάζονται ημιδεσμοσώματα. Στην Εικόνα 4 που παρατίθεται παρακάτω φαίνονται τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας. (1) (2)



Εικόνα 4. Κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας

Μελανινοκύτταρα: Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ και κάτω από το κύτταρο της βασικής στιβάδας και ρόλος τους είναι να παράγουν και να μεταφέρουν μελανίνη, μία από τις κύριες χρωστικές ουσίες του δέρματος που απορροφούν το φως. Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα νευρογενούς προέλευσης και φέρουν δενδρίτες που διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, περιέχουν εξειδικευμένα οργάνιδia, τα μελανοσώματα. Όταν το δέρμα εκτίθεται στο ηλιακό φως, τα μελανοσώματα ενεργοποιούνται και παράγουν μελανίνη η οποία μεταφέρεται ακολούθως μέσω των δενδριτών στις υπόλοιπες στιβάδες της επιδερμίδας. Η πυκνότητα των μελανοσωμάτων εξαρτάται από την περιοχή του σώματος. Για παράδειγμα, συναντώνται σε μεγαλύτερη πυκνότητα στις περιοχές του σώματος που εκτίθενται συχνά στο ηλιακό φως, όπως το πρόσωπο.

Κύτταρα Langerhans: Τα κύτταρα του Langerhans (LC) είναι δενδριτικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και σχηματίζουν ένα δίκτυο κυττάρων ανάμεσα στην ακανθωτή και τη βασική στιβάδα.. Ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα και συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση έναντι διαφόρων παθογόνων ερεθισμάτων, με την αναγνώριση και παρουσίαση των αντιγόνων. (1) (2) (3)

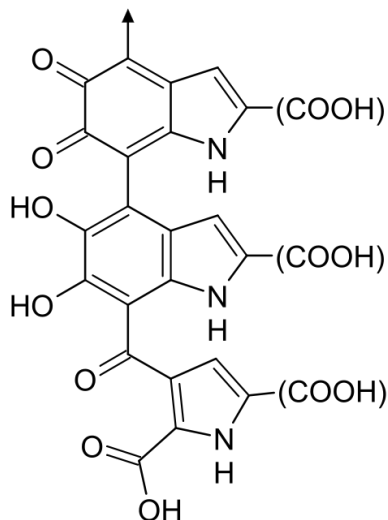
Κύτταρα Merkel: Τα κύτταρα του Merkel είναι νευρο-ενδοκρινή κύτταρα και διαθέτουν κοκκία, δεσμοσώματα και ίνες κερατίνης. Ανευρίσκονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας σε διαφορετικό αριθμό ανάλογα με την ανατομική περιοχή. Εξυπηρετούν την αισθητική λειτουργία του δέρματος και είναι άφθονα σε περιοχές μεγάλης ευαισθησίας. Συγκεκριμένα, ο αριθμός τους είναι μεγαλύτερος στις ράγες των δακτύλων, στα χείλη και στις ρίζες των τριχών. Συνέχονται στενά με ελεύθερες νευρικές απολήξεις και ευρίσκονται είτε μόνα τους είτε σε συμπλέγματα που ονομάζονται δίσκοι του Merkel ή τριχοειδείς δίσκοι. (3) (2)

Χρωστικές της επιδερμίδας

Το δέρμα οφείλει ένα μέρος του χρώματος του στην αιμοσφαιρίνη των αιμοφόρων αγγείων και στα καροτενοειδή του υποδερμικού λίπους, όμως ο κύριος καθοριστικός παράγοντας του χρώματος είναι η μελανίνη. Η μελανίνη είναι μία σκούρα χρωστική και αποτελεί προϊόν ειδικών κυττάρων των μελανοκυττάρων (melanocytes). Το χαρακτηριστικό στοιχείο των μελανοκυττάρων είναι ένα ειδικό κυτταροπλασματικό οργανίδιο γνωστό σαν μελανόσωμα, στο οποίο η μελανίνη σχηματίζεται με τη δράση του ενζύμου τυροσινάση.

Οι μελανίνες είναι κινοειδή πολυμερή δύο ειδών: Οι φαίομελανίνες που είναι κίτρινες ή κόκκινες και οι ευμελανίνες που είναι καφέ ή μαύρες. Τα δύο παραπάνω είδη μελανινών σχηματίζονται με τα ίδια αρχικά στάδια που περιλαμβάνουν οξείδωση της τυροσίνης σε 3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνης (dopa) και τη μετατροπή της στην αντίστοιχη κινόνη. Ο σχηματισμός ευμελανίνης, περιλαμβάνει μερικά ακόμη στάδια για το σχηματισμό ινδολο-5,6-κινόνης που στη συνέχεια πολυμερίζεται και συνδέεται με πρωτεΐνη. Οι φαίομελανίνες σχηματίζονται με άλλο τρόπο: η ντοπα-κινόνη αντιδρά με κυστεΐνη για να σχηματίσει 5-S και 2-S κυστεΐνυλο-ντόπα. Τα ισομερή αυτά οξειδώνονται σε ενδιάμεσα προϊόντα που πολυμερίζονται. (3) (7)

Το χρώμα του δέρματος διαφέρει ανάλογα με την εθνικότητα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην ποσότητα της μελανίνης που παράγεται και όχι στον αριθμό των μελανοκυττάρων που υπάρχουν. Η εναπόθεση χρωστικής μπορεί να αυξηθεί με έκθεση στον ήλιο ή με ενδοκρινολογικούς παράγοντες όπως η εγκυμοσύνη. Η κύρια λειτουργία της μελανίνης είναι αδιαμφισβήτητη η προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία. Γενικά η ποσότητα της χρωστικής εξαρτάται από την ηλιακή ένταση και είναι μεγαλύτερη στα τροπικά κλίματα, ελαττώνεται στα εύκρατα και αυξάνεται εκ νέου, μερικώς σε περιοχές που ακτινοβολεί το χιόνι (8)



Εικόνα 5. Χημική δομή της ευμελανίνης. Το βέλος δείχνει προς τα που συνεχίζει το πολυμερές

1.1.2.1 Χόριο ή Δερμίδα ή Κυρίως δέρμα

Χοριοεπιδερμική ένωση

Η ένωση επιδερμίδας με το χόριο γίνεται με καταδύσεις της επιδερμίδας στο χόριο και αντίστοιχες αναδύσεις του χορίου γνωστές ως θηλές. Μία μεμβράνη, η βασική μεμβράνη χωρίζει την επιδερμίδα από το χόριο και αποτελείται από δύο λεπτά πέταλα διακριτά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το πέταλο αυτά είναι το διαυγές πέταλο που βρίσκεται σε επαφή με τη βασική στιβάδα και το πυκνό πέταλο που βρίσκεται σε επαφή με το χόριο. Το πυκνό πέταλο είναι πλούσιο σε ινίδια κολλαγόνου, τα οποία λειτουργούν σαν άγκυρες (anchoring fibrils) και «δένουν» την επιδερμίδα με το χόριο. Η δερμοεπιδερμική ένωση εξασφαλίζει μηχανική υποστήριξη της επιδερμίδας και λειτουργεί και σαν ημιδιαπερατό φίλτρο που ρυθμίζει τη δίοδο ουσιών από τα έξω προς τα μέσα και αντίστροφα. Επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη θρέψη της επιδερμίδας.

Χόριο ή Δερμίδα ή Κυρίως δέρμα

Το χόριο είναι ένας ινώδης ιστός με μεγάλη σταθερότητα και ελαστικότητα που βρίσκεται ανάμεσα στην επιδερμίδα και τον υποδόριο ιστό και αποτελείται από ίνες, κύτταρα και βασική ουσία. Επίσης περιέχει αγγεία και νεύρα. Η κύρια λειτουργία του είναι η θρέψη και στήριξη της επιδερμίδας. Το πάχος του χορίου ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική περιοχή

από 0,5 έως 4 mm. Η δομή του είναι πολύπλοκη και αποτελείται από δύο στιβάδες, την ανώτερη ή θηλώδη στιβάδα, που ονομάζεται έτσι από τον τρόπο που διεισδύει υπό μορφή θηλών στην επιδερμίδα, και την κατώτερη ή δικτυωτή στιβάδα, που ονομάζεται έτσι λόγω της δικτυωτής μορφής που παρουσιάζει. (3) (2) (7) (Εικόνα 1)

Το χόριο αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και λιγότερο από ελαστικές ίνες, καθώς και από θεμέλια ή βασική ουσία. Στην ανώτερη δερμίδα οι ίνες κολλαγόνου είναι πιο χαλαρές και αραιές μεταξύ τους, σε αντίθεση με την κατώτερη στιβάδα της δερμίδας, όπου είναι πιο πυκνές. Τη δομή του χορίου συμπληρώνει μία άμορφη κολλώδης ουσία, σαν gel, που αποτελείται από ένα μίγμα κυρίως πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών, η θεμέλιος ουσία. Ο κυτταρικός πληθυσμός του χορίου απαρτίζεται κυρίως από ινοβλάστες, καθώς και από ιστιοκύτταρα (μονοκύτταρα/μακροφάγα) και μαστοκύτταρα. (3)

Το χόριο είναι πολύ πλούσιο σε αιμάτωση, και περιέχει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Περιέχει πλούσιο δίκτυο νευρικών ινών, λείες μυϊκές ίνες (τους ανελκτήρες των τριχών) και μέσα σε αυτό περιέχονται τα εξαρτήματα του δέρματος, όπως οι τρίχες και οι αδένες, όπως περιγράφονται ακολούθως. (3)

Συστατικά του χορίου

Κολλαγόνο: Είναι το κύριο ινώδες συστατικό του χορίου και αποτελεί το 75% του ξηρού βάρους και το 18-30% του όγκου του. Παράγεται από τους ινοβλάστες. Το κολλαγόνο αποτελείται από μόρια τροποκολλαγόνου που είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με αναδίπλωση κατά το ένα τέταρτο του μήκους της αλυσίδας τους. Το κολλαγόνο του δέρματος περιέχει μεγάλη ποσότητα γλυκίνης, προλίνης και υδροξυ-προλίνης. Τα μόρια του τροποκολλαγόνου αποτελούνται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες που κάθε μία περιέχει 1000 περίπου αμινοξέα. (3) (9)

Ελαστίνη: Αποτελεί το 4% του ξηρού βάρους και το 1% του όγκου του χορίου. Είναι ίνες λεπτές και ευθείες, διακλαδίζονται ελεύθερα και μπορούν να επιμηκυνθούν κατά 100% και περισσότερο, αλλά επανέρχονται στο αρχικό τους μήκος, όταν απομακρυνθεί το αίτιο που προκάλεσε την επιμήκυνση. Η ελαστίνη διαφέρει από το κολλαγόνο ότι έχει μόνο το 1/4 της ποσότητας των όξινων και βασικών αμινοξέων του, το 1/10 της ποσότητας της υδροξυ-προλίνης, μια σχετικά μεγάλη ποσότητα βαλίνης και ένα αμινοξύ γνωστό σαν δεσμοσύνη, που φαίνεται ότι είναι το μοναδικό στην ελαστίνη που συνδέεται με διασταυρούμενη

σύνδεση (cross-linkage). Το χρώμα της είναι κίτρινο σε αντίθεση με τις ίνες κολλαγόνου που είναι διαφανείς. (3), (10)

Ρετικουλίνη: Είναι λεπτές διακλαδισμένες ίνες, που αποτελούν το 0,4% του ξηρού βάρους του χορίου. (3)

Θεμέλια ουσία: Είναι η άμορφη ουσία μέσα στην οποία βρίσκονται οι ίνες και τα κύτταρα, και αποτελείται από ποικιλία υδατανθράκων και πρωτεϊνών, που ονομάζονται γλυκο-πρωτεΐνες και όξινους βλεννοπολυσακχαρίτες κυριότερος από τους οποίους στο δέρμα είναι το υαλουρονικό οξύ και η θειική δερματίνη. (3)

Ινοβλάστες: Προέρχονται από το μεσέγχυμα και είναι τα κύρια κύτταρα του χορίου που ευθύνονται για την έκκριση των ινών ελαστικής και κολλαγόνου, και των γλυκοζαμινογλυκανών, που συνιστούν το πλαίσιο του υποστηρικτικού συστήματος του δέρματος. Βρίσκονται στην ινώδη μήτρα και παραμένουν συνδεδεμένοι με τα δίκτυα ινών που δημιουργούν. (3)

Ιστοκύτταρα: Προέρχονται από το μεσέγχυμα και χαρακτηρίζονται από κυτταρόπλασμα γεμάτο με κοκκία. Περιέχουν και έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν ηπαρίνη και ισταμίνη. Σε πολλές περιπτώσεις καταστροφής του δέρματος, παρατηρείται ρήξη των κυττάρων αυτών με απελευθέρωση των κοκκίων και ισταμίνης που είναι υπεύθυνη για φλεγμονές, ερεθισμούς

1.1.2.2 Το Υπόδερμα – Υποδόρια στρώματα λίπους λλες δερματικές διαταραχές

Το υπόδερμα ή υποδόριος ιστός είναι το βαθύτερο στρώμα του δέρματος, αμέσως κάτω από το χόριο. Ο υποδόριος ιστός αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό που στερεώνει χαλαρά το δέρμα πάνω στα υποκείμενα όργανα, επιτρέποντάς του να διολισθαίνει πάνω στις υποκείμενες δομές. Σε συγκεκριμένες περιοχές (π.χ. όσχεο) ο υποδόριος ιστός απουσιάζει και το δέρμα είναι σε άμεση επαφή με τους μυς (Εικόνα 1)

Το πάχος του ποικίλλει από 2 έως 30 mm, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την περιοχή του σώματος. Είναι παχύτερος στους γλουτούς, στις παλάμες των χεριών και στα πέλματα των ποδιών. Με την πάροδο της ηλικίας, ο υποδόριος ιστός αρχίζει να ατροφεί, ακολουθώντας τη γήρανση του δέρματος.

Αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και ινώδη διαφραγμάτια και περιέχει τα αγγεία και νεύρα, που διέρχονται προς το υπερκείμενο χόριο και σε ορισμένες περιοχές τα κατώτερα τμήματα εξαρτημάτων του δέρματος.

Συμβάλλει στη διατήρηση της θερμότητας του σώματος, αφού μονώνει το σώμα από το κρύο και προστατεύει τον οργανισμό από τραυματισμούς, λειτουργώντας ως «αμορτισέρ» για την απορρόφηση των κραδασμών. Στα λιπώδη κύτταρα του υποδόριου ιστού αποθηκεύονται θρεπτικά συστατικά και ενέργεια. (2)

1.1.3 Αιμάτωση του δέρματος

Η αιμάτωση του δέρματος είναι πολύ πλούσια και σχεδόν δεκαπλάσια ως προς τις ανάγκες θρέψης του. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αιμάτωση του δέρματος εξυπηρετεί καταρχήν το μεταβολισμό του, αλλά επίσης παίζει ουσιαστικό ρόλο στη θερμορύθμιση του οργανισμού. Η αιμάτωση του δέρματος γίνεται χάρη στην ύπαρξη πολυάριθμων αγγείων τα οποία βρίσκονται στην υποδερμίδα και το χόριο, ενώ η επιδερμίδα είναι ανάγγεια και τρέφεται αποκλειστικά από τον ορό και τη λέμφο. Στο χόριο ανευρίσκεται πλούσιο δίκτυο αρτηριών, φλεβών και λεμφαγγείων. (2) (1)

1.1.4 Νεύρωση του δέρματος

Η νεύρωση του δέρματος είναι εξαιρετικά πλούσια εφόσον αποτελεί ένα όργανο επικοινωνίας και αλληλεπίδρασης του οργανισμού με το εξωτερικό περιβάλλον. Αποτελείται από ένα δίκτυο από νευρικούς σχηματισμούς και από ελεύθερες νευρικές απολήξεις.

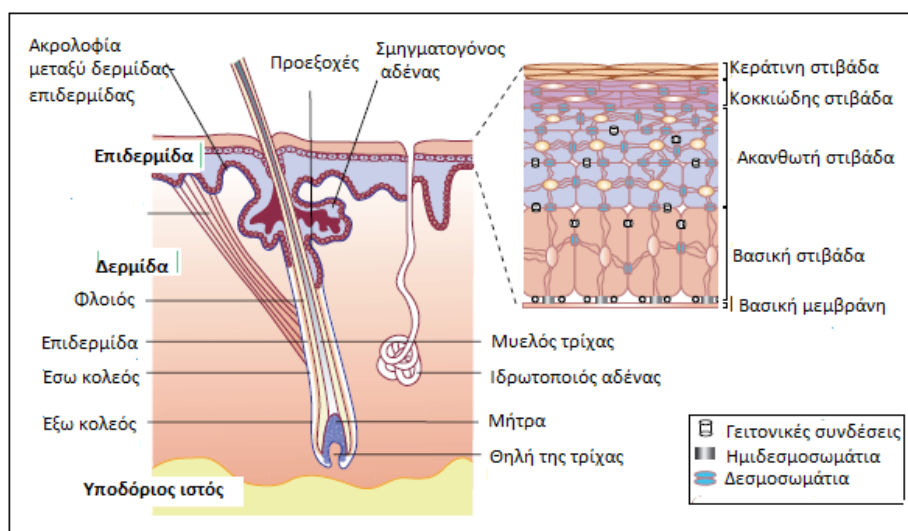
Τα νεύρα του δέρματος παίζουν αμφίδρομο ρόλο καθώς όχι μόνο λαμβάνουν ερεθίσματα από το εξωτερικό περιβάλλον αλλά στέλνουν και σήματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα σε αυτό, επηρεάζοντας σημαντικά τις λειτουργίες του και πυροδοτώντας διαδικασίες όπως φλεγμονής, ανοσοαντίδρασης κ.ά. Η νεύρωση του δέρματος προέρχεται τόσο από το ζωικό, όσο και από το αυτόνομο (φυτικό) νευρικό σύστημα. Στο φυτικό νευρικό σύστημα ανήκουν οι κλάδοι που διανέμονται στους αδένες, τα αγγεία και τους ορθωτήρες μύες των τριχών. Στο ζωικό νευρικό σύστημα ανήκουν οι κλάδοι που προέρχονται από τα αισθητικά νεύρα και εξυπηρετούν κυρίως τη λειτουργία του δέρματος ως αισθητηρίου οργάνου. (11)

Οι αισθητήριες απολήξεις διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες. Τις σωματιδιακές, που έχουν ενσωματωμένα μη νευρικά στοιχεία και τις ελεύθερες που δεν έχουν και βρίσκονται στο δέρμα-επιδερμίδα. Τα θυλάκια των τριχών έχουν αισθητήριες απολήξεις διαφόρων βαθμίδων πολυπλοκότητας. (1)

1.1.5 Εξαρτήματα του δέρματος

Τα εξαρτήματα του δέρματος είναι τα νύχια, οι τρίχες και οι αδένες. Για την ακρίβεια πρόκειται για εξαρτήματα της επιδερμίδας, επειδή είναι επιθηλιακές δομές που προέρχονται εμβρυολογικά από την επιδερμίδα, ωστόσο βρίσκονται στο χόριο (εκτός από τα νύχια) ή ακόμη και μέσα στον υποδόριο ιστό σε ορισμένες ανατομικές περιοχές, όπως το πρόσωπο. Συγκεκριμένα οι τρίχες και οι αδένες αναπτύσσονται ως εγκολπώσεις της επιδερμίδας μέσα στο χόριο κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Τα εξαρτήματα του δέρματος είναι τα εξής:

- Τρίχες
- Νύχια
- Αδένες (ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι)



Εικόνα 6. Δομή δέρματος και των εξαρτημάτων του

Τρίχες

Οι τρίχες είναι επιμήκεις, κερατινοποιημένες δομές με σχήμα νηματοειδές και κυλινδρικό που προβάλλουν στην επιφάνεια του δέρματος. Απαντώνται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος εκτός από τα πέλματα, τις παλάμες, την πόσθη και την ονυχοφόρο φάλαγγα των δακτύλων. Η μορφολογία και η κατανομή τους διαφέρει από άτομο σε άτομο και ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή του σώματος. Το δέρμα της κεφαλής έχει 600 τρίχες /cm² ενώ του υπόλοιπου σώματος 60 τρίχες /cm² . Το χρώμα τους επίσης ποικίλει και εξαρτάται μέχρι ενός σημείου από την ποσότητα της μελανίνης που περιέχεται.

Κάθε τρίχα εκφύεται από μία επιδερμική εγκόλπωση, το τριχοθυλάκιο, που παρουσιάζει διαλείπουσα δραστηριότητα καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής. Το κατώτερο σημείο του τριχοθυλακίου είναι διογκωμένο και ονομάζεται βολβός. Στη βάση του βολβού κατά την περίοδο ανάπτυξης της τρίχας δημιουργείται ένα εντύπωμα που εγκολπώνει μία προσεκβολή του χρόνου πλούσια σε αγγεία και νεύρα, τη θηλή της τρίχας. Η θηλή είναι απαραίτητη για τη θρέψη και την ανάπτυξη της τρίχας. Στο κάθε τριχοθυλάκιο βρίσκεται προσαρτημένος ένας σμηγματογόνος αδένας, ο οποίος προσφέρει στην τρίχα την απαραίτητη ενδυστάωση και ελαστικότητα μέσω της λίπανσης που εξασφαλίζει το σμήγμα και εδώ προσφύεται και ο ορθωτήρας μυς της τρίχας . Το τριχοθυλάκιο μαζί με το σμηγματογόνο αδένα και τον ορθωτήρα μυ της τρίχας ονομάζεται τριχοσμηγματογόνος μονάδα.

Η τρίχα διακρίνεται σε δύο τμήματα: το στέλεχος και τη ρίζα. Το στέλεχος είναι το ορατό μέρος της τρίχας και επεκτείνεται από το σημείο όπου εκβάλλει ο σμηγματογόνος αδένας μέχρι το ελεύθερο άκρο της. Η ρίζα είναι το μη ορατό τμήμα της τρίχας το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του τριχοθυλακίου. Η τρίχα αποτελείται από τρεις βασικές στιβάδες, το περιτρίχιο εξωτερικά, το φλοιό και στο κέντρο το μυελό. (2) (12)

Νύχια

Τα νύχια είναι αποπλατυσμένες, ελαφρώς κυρτές, κερατινοποιημένες πλάκες που καλύπτουν το μεγαλύτερο τμήμα της ραχιαίας επιφάνειας της τελικής φάλαγγας των δακτύλων και των ποδιών. Ο ρόλος των νυχιών έγκειται στην προστασία των ευαίσθητων και πολύ σημαντικών άκρων των δακτύλων, ενώ παίζουν ρόλο και στην

αίσθηση της αφής. Το νύχι αποτελείται από τη ρίζα, την ονυχαία πλάκα και το ελεύθερο άκρο. Η δομή του νυχιού παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα: (2)



Εικόνα 7. Η ανατομία του νυχιού

Σμηγματογόνοι αδένες

Οι σμηγματογόνοι αδένες βρίσκονται στο χόριο και απαντώνται στο μεγαλύτερο μέρος του σώματος εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα. Η συγκέντρωσή τους ανέρχεται σε 100/cm², αλλά σε ορισμένες ανατομικές περιοχές μπορεί και να φθάσει 400-900/cm². Αποτελούν μέρος της τριχοσμηγματογόνου μονάδας. Είναι ολοκρινείς αδένες που αποτελούνται από το αδενικό σώμα και τον εκφορητικό πόρο. Ο πόρος είναι βραχύς και ευρύς και συνήθως καταλήγει στην άνω μοίρα ενός τριχοθυλακίου. Οι σμηγματογόνοι αδένες αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία, καθώς πολλαπλασιάζονται, υφίστανται λιπώδη εκφύλιση. Στο τέλος τα κύτταρα αυτά διαρρηγνύονται και το προϊόν της διεργασίας αυτής το σμήγμα (έκκριμα των σμηγματογόνων αδένων). Ο ρόλος του σμήγματος είναι η λίπανση των τριχών, ώστε να διατηρείται η ελαστικότητά τους, η λίπανση του δέρματος για να προστατεύεται από τη τριβή καθώς και η αδιαβροχοποίηση του. (Εικόνα 6) (13) (3) (2)

Ιδρωτοποιοί αδένες

Το δέρμα διαθέτει δύο τύπους ιδρωτοποιών αδένων, τους εκκρινείς και τους αποκρινείς. Ο αριθμός τους υπολογίζεται σε πάνω από 2 εκατομμύρια. Ανευρίσκονται σχεδόν σε όλη την επιφάνεια του δέρματος και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκονται στις μασχάλες, παλάμες, πέλματα και μέτωπο. Η νεύρωση τους γίνεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα από χολινεργικές νευρικές ίνες. Η φυσιολογική λειτουργία των ιδρωτοποιών αδένων έγκειται στην παραγωγή του ιδρώτα. Η εφίδρωση ελέγχεται κυρίως

από το νευρικό σύστημα και ανάλογα με το ερέθισμα που την προκαλεί διακρίνεται σε συγκινησιακή, θερμορυθμιστική και γευστική. Ο ιδρώτας, μετά την απελευθέρωσή του στην επιφάνεια του δέρματος, εξατμίζεται, προκαλώντας απόψυξη της επιφάνειας και αποβολή θερμότητας. Οι ιδρωτοποιοί αδένες λειτουργούν επίσης ως επικουρικό απεκκριτικό όργανο για την απομάκρυνση ουσιών που είναι άχρηστες για τον οργανισμό όπως π.χ. ουρία, ουρικό οξύ κ.α. (Εικόνα 6) (2)

1.1.6 Φυσιολογία Δέρματος

Το εξωτερικό περίβλημα του ανθρώπου, το δέρμα παρεμποδίζει την απώλεια του εσωτερικού ύδατος στο ξηρό περιβάλλον που ζει. Η επιδερμίδα και το χόριο περιλαμβάνουν επιπλέον διάφορα εξαρτήματα τα οποία συμβάλλουν περαιτέρω στην προστασία του οργανισμού. Οι εξωκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες και τα αγγεία του δέρματος συμβάλλουν στη ρύθμιση της θερμοκρασίας, ενώ οι σμηγματογόνοι αδένες μεταφέρουν ταχέως λιπίδια και πρωτεΐνες στην επιφάνεια του δέρματος., τα οποία λειτουργούν ως αντι-μικροβιακοί παράγοντες, προωθώντας παράλληλα και τη διαδικασία της απολέπισης. Τέλος, η παρουσία χημιο-, μηχανο-, και θερμο-ευαίσθητων προσαγωγών και απαγωγών νευρικών ινών συμβάλλει στην έγκαιρη ειδοποίηση του συστήματος για την παρουσία τραύματος. Το υποδόριο λίπος, που αποτελεί την εσωτερική στιβάδα του ανθρώπινου δέρματος, πέρα από τις μεταβολικές του δράσεις, συμμετέχει στη θερμορύθμιση καθώς δρα ως μονωτικό υλικό μειώνοντας τη μετακίνηση της θερμότητας στο εσωτερικό και εξωτερικό του σώματος, ενώ απορροφά ταυτόχρονα τη παραγόμενη ενέργεια από μηχανικό τραύμα. Στη τελευταία λειτουργία, συμβάλλει και η δερμίδα που αποτελείται από σύμπλοκα κολλαγόνου και γλυκοζαμινών. Στην επιδερμίδα με την κεράτινη στιβάδα που έρχεται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, έχει ως κύριο ρόλο την παρεμπόδιση της απώλειας ύδατος και ταυτόχρονα την προστασία από τοξικές ουσίες, μικροοργανισμούς και υπεριώδη ακτινοβολία. Πέρα από τα κερατινοκύτταρα, η επιδερμίδα με τα μελανοκύτταρα παρέχει περαιτέρω προστασία απορροφώντας την υπεριώδη ακτινοβολία με τη μελανίνη. Καθώς επίσης, περιέχει και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση αποτελώντας έτσι μέρος των αμυντικών μηχανισμών της επιδερμίδας εναντίον εξωγενων και παθογόνων παραγόντων. (14) (15)

Λειτουργίες του δέρματος
1. Προστασία από την απώλεια υγρών ενδοκυττάριου χώρου
2. Προστασία από την είσοδο ενδοκυττάριων ουσιών
3. Προστασία από την είσοδο μικροοργανισμών-Ανοσολογική απόκριση
4. Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία
5. Προστασία κατά βλάβης από μηχανικό τραύμα
6. Προστασία κατά βλάβης από ηλεκτρικό ρεύμα χαμηλής τάσης
7. Προστασία από ακραίες περιβαλλοντικές θερμοκρασίες

Πίνακας 1. Λειτουργίες του δέρματος

Μία από τις κυριότερες λειτουργίες του δέρματος η οποία αξίζει να αναλυθεί περαιτέρω στην παρούσα εργασία είναι η προστασία που προδφέρει από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία

Το δέρμα διαθέτει δύο βασικούς φραγμούς κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας, έναν πρωτεϊνικό φραγμό, ο οποίος βρίσκεται στην κεράτινη στιβάδα και έναν φραγμό μελανίνης κατανεμημένο σε όλη την επιδερμίδα. Και οι δύο λειτουργούν μέσω απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, παρεμποδίζοντας την απορρόφηση της από το DNA, σημαντικές κυτταρικές πρωτεΐνες και λιπίδια μεμβρανών.

Η μελανίνη συντίθεται από τα μελανοκύτταρα και μεταφέρεται στα περιβάλλοντα κερατινοκύτταρα με τη μορφή εκκριτικών κοκκίων, γνωστών ως μελανοσωμάτων. Ο πιο σημαντικός αμυντικός μηχανισμός που συσχετίζεται με τη παραγωγή μελανίνης είναι το «μαύρισμα» του δέρματος το οποίο οδηγεί σε ωρίμανση του τύπου των μελανοσωμάτων (I-IV) και σε αύξηση της σύνθεσης μελανίνης, που μεταφέρεται μέσω των μελανοσωμάτων στα κερατινοκύτταρα.

Η υπεριώδης ακτινοβολία αυξάνει τη σύνθεση της κυτταροκίνης ιντερλευκίνης 1α (IL-1 α) από τα κερατινοκύτταρα, που μαζί με τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF), αναστέλλει την επαγόμενη από υπεριώδη ακτινοβολία μελανινογένεση. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζουν τη συσσώρευση κυτταροτοξικών προϊόντων προερχόμενων από το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης.

Τα λιπίδια της επιδερμίδας, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων της βιταμίνης D, όπως και άλλα προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους αποδόμησης των πρωτεϊνών της επιδερμίδας, μπορούν να συμβάλλουν στην προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία απορροφώντας κάποιο βαθμό ακτινοβολίας. (2) (16)

1.2 Διαδερμική χορήγηση

1.2.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα για την επίτευξη συστηματικής δράσης των φαρμάκων, έχει επικεντρωθεί σε εναλλακτικές οδούς χορήγησης, που εμφανίζουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές οδούς, όπως είναι η από του στόματος και η ενδοφλέβια χορήγηση. Συγκεκριμένα έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα τοπικής και διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου, με σκοπό την ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στον ιστό-στόχο, τη ρύθμιση της δόσης και την αποφυγή των παρενεργειών από την επίδραση σε άλλα συστήματα του οργανισμού. Οι μέθοδοι αυτές αποτελούν μία αποτελεσματική μη-επεμβατική λύση στα προβλήματα που μπορεί να εμφανιστούν από τη χορήγηση μέσω των συμβατικών οδών.

Οι μέθοδοι χορήγησης φαρμάκου μέσω του δέρματος μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με την κατανομή της δραστικής ουσίας σε συγκεκριμένες περιοχές του οργανισμού και ανάλογα με το θεραπευτικό αποτέλεσμα στο οποίο στοχεύουν. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι εξής :

- **Τοπική/Δερματική χορήγηση (Topical/Dermal drug delivery):** Αυτή η οδός χορήγησης επιλέγεται με σκοπό την τοπική φροντίδα του δέρματος ή τη θεραπεία δερματικών παθήσεων όπως ακμή, ατοπική δερματίτιδα κ.α
- **Τοπική/Περιφερειακή χορήγηση (Topical/Regional drug delivery):** Η συγκεκριμένη οδός χορήγησης έχει ως στόχο την τοπική ανακούφιση των ιστών που βρίσκονται αμέσως κάτω από την περιοχή όπου εφαρμόζεται το σκεύασμα π.χ. οστεοαρθρίτιδα.
- **Διαδερμική χορήγηση (Transdermal drug delivery, TDD):** η χορήγηση μέσω αυτής της οδού αποσκοπεί στην επίτευξη θεραπευτικών δόσεων του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία του οργανισμού με ελεγχόμενη αποδέσμευση του φαρμάκου διαμέσου του δέρματος. (17) (18)

Η διαδερμική χορήγηση διαφέρει από την παραδοσιακή τοπική χορήγηση φαρμάκων, γιατί η τελευταία προϋποθέτει την μεταφορά του φαρμάκου στην ζώσα επιδερμίδα και την δερμίδα για τοπική δράση, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό της ουσίας μεταφέρεται στην συστηματική κυκλοφορία. Αντίθετα κατά τη διαδερμική χορήγηση επιτυγχάνεται η αποδέσμευση ορισμένης ποσότητας φαρμάκου, που διαμέσου του δέρματος φτάνει στη γενική κυκλοφορία κι έτσι επιτυγχάνεται συστηματική δράση.

Η διαδερμική οδός χορήγησης χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια καθώς παρουσιάζει παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την από του στόματος και την ενδοφλέβια χορήγηση. Τα σπουδαιότερα απ' αυτά αναλύονται παρακάτω :

- Μέσω της διαδερμικής οδού χορήγησης ,αποφεύγεται το φαινομένο πρώτης διόδου (first pass effect) από το ήπαρ. Πιο αναλυτικά, ένα πρόβλημα που εμφανίζεται συχνά σε φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα είναι ότι μεταβολίζονται ταχύτατα από το ήπαρ με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνονται οι θεραπευτικές δόσεις του φαρμάκου. Έτσι η διαδερμική οδός χορήγησης αποτελεί μια αποτελεσματική εναλλακτική οδό χορήγησης για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας .
- Μέσω της διαδερμικής οδού χορήγησης επιτυγχάνεται σταθερή αποδέσμευση του φαρμάκου για μια παρατεταμένη χρονική περίοδο. Έτσι η αργή και σταθερή απορρόφηση που παρέχεται από αυτές τις δοσολογικές μορφές παρέχει σχετικά σταθερές συγκεντρώσεις στο πλάσμα που οδηγούν σε βελτιωμένη συμμόρφωση του ασθενούς, σε σταθερή θεραπευτική αποτελεσματικότητα και σε μείωση της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Μέσω της διαδερμικής οδού χορήγησης αποφεύγεται η αλληλεπίδραση του χορηγούμενου φαρμάκου με τα γαστρικά και εντερικά υγρά, με τροφές καθώς και οι αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα. Επίσης περιορίζεται η μεταβλητότητα του χρόνου διέλευσης του γαστρεντερικού σωλήνα
- Η διαδερμική οδός είναι ανώδυνη και μη επεμβατική μέθοδος θεραπείας με χαρακτηριστικά συγκρίσιμα με αυτά της ενδοφλέβιας έγχυσης
- Μέσω της διαδερμικής οδού επιτυγχάνεται μείωση της συχνότητας χορήγησης και απλούστευση του δοσολογικού σχήματος: Σε αντιθεση με τα φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα 2-4 φορές την ημέρα η διαδερμική χορήγηση γίνεται 1, 2 ή 7 φορές την εβδομάδα
- Παρέχει τη δυνατότητα άμεσης διακοπής της θεραπείας, με απλή απομάκρυνση του διαδερμικού θεραπευτικού προϊόντος από το δέρμα.

Ωστόσο παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η διαδερμική οδός χορήγησης δημιουργούνται και κάποιοι περιορισμοί κατά την κλινική εφαρμογή της. Ειδικότερα:

1. Η κεράτινη στιβάδα του δέρματος αποτελεί πολύ ισχυρό φάρμο στη διαπεραση ξενοβιοτικών ουσιών. Έτσι τα φάρμακα που χορηγούνται μέσω αυτής της οδού πρέπει να απορροφηθούν σε επαρκή βαθμό μέσω της κεράτινης στιβάδας για να φθάσουν στα δερματικά τριχοειδή αγγεία και να παρέχουν την επιθυμητή θεραπευτική συγκέντρωση στη συστηματική κυκλοφορία.
2. Η λειτουργία του φραγμού του δέρματος αλλάζει από τη μια περιοχή στην άλλη στο ίδιο πρόσωπο, από άτομο σε άτομο και ανάλογα με την ηλικία με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαπερατότητα του φαρμάκου.
3. Η ικανότητα επικόλλησης των διαδερμικών θεραπευτικών συστημάτων εξαρτάται από τις παραμέτρους του δέρματος και επηρεάζεται αρνητικά σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.
4. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί για όλες τις κατηγορίες φαρμάκων, καθώς υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί για τη μορφοποίηση μιας δραστικής ουσίας σε διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα. Για παράδειγμα πολλά φάρμακα με υδρόφιλη δομή παρουσιάζουν χαμηλή διείσδυση μέσω του δέρματος και δεν επιτυγχάνουν το επιθυμητό θεραπευτικό όφελος. Τα φάρμακα με λιπόφιλο χαρακτήρα, ωστόσο, είναι καλύτερα προσαρμοσμένα για διαδερμική χορήγηση.
5. Υπάρχει πιθανότητα πρόκλησης ερεθισμών και ευαισθητοποίησης του δέρματος στην περιοχή που εφαρμόζεται η θεραπεία. Πολλά προβλήματα όπως ερύθημα, κνησμός και τοπικό οίδημα μπορεί να προκληθούν από το φάρμακο, το συγκολλητικό ή άλλα έκδοχα. (19)

1.2.2 Διαπέραση ουσιών από το δέρμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το δέρμα αποτελεί τον σπουδαιότερο φραγμό στην διαδερμική διαπέραση των φαρμάκων. Αποτελεί την εξωτερική στοιβάδα του ανθρωπίνου σώματος, που χωρίζει το εσωτερικό από το εξωτερικό περιβάλλον και ενεργεί ως διπλός φραγμός: αποτρέπει την είσοδο μορίων από το εξωτερικό περιβάλλον και την έξοδο ουσιών από το σώμα. Η διαδερμική οδός διαπέρασης περιλαμβάνει διάχυση διαμέσου της κεράτινης στοιβάδας και της ζώσας επιδερμίδας και τελικά μέσω των ανώτερων στοιβάδων του

χορίου, στην μικροκυκλοφορία. Η μεγαλύτερη αντίσταση, και ουσιαστικά το καθοριστικό βήμα, στην διείσδυση ουσιών από το δέρμα οφείλεται στην κεράτινη στιβάδα.

Η διαπερατότητα των ουσιών μέσα στο δέρμα ή διαμέσου αυτού ελέγχεται από το πυκνό στρώμα πρωτεϊνών και λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας. Έτσι λοιπόν η διαπέραση της κεράτινης στιβάδας αποτελεί το καθοριστικό βήμα για την απορρόφηση ουσιών από το δέρμα¹. Στην κεράτινη στιβάδα, ανακαλύπτουμε ένα σχηματισμένο σύστημα από τρία διαδοχικά παθητικά φράγματα:

Το πρώτο είναι ο υδρολιπιδικός μανδύας, που καλύπτει εξωτερικά την επιδερμίδα. Το φυσικό αυτό γαλάκτωμα από τη μίξη σμήγματος και ιδρώτα ονομάζεται επίσης όξινο μανδύας, επειδή έχει ελαφρά όξινο pH. Η ισορροπημένη χημική φύση του, καλύπτει διπλό σκοπό. Έτσι ενώ γενικά εμποδίζει τη διείσδυση των ουσιών, συγχρόνως είναι φιλικός και προς τις δύο πολικές φύσεις μιας ουσίας, την υδατική και τη λιπαρή.

Το δεύτερο και ισχυρότερο φράγμα είναι η ίδια η δομή της κεράτινης στιβάδας η οποία είναι τόσο αδιαπέραστη που παρομοιάζεται με έναν τοίχο από τούβλα. Τα τούβλα είναι τα νεκρά κύτταρα και το τσιμέντο η ενδιάμεση ουσία (λιπίδια και NMF). Τα νεκρά κύτταρα είναι σχετικά αδιαπέραστα, έτσι η είσοδος και έξοδος ουσιών γίνεται κυρίως μέσω της ενδιάμεσης ουσίας. Ταυτόχρονα στην κεράτινη στιβάδα υπάρχει μια πολύπλοκη σειρά λιπιδίων (κυρίως κεραμιδίων) που είναι δομημένα με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται διπλοστιβάδες. Έτσι η διαχόμενη ουσία θα πρέπει να διασχίσει, διαδοχικά, υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές προκειμένου να διαπεράσει την κεράτινη στιβάδα. Οι λιπιδικές αλυσίδες των κεραμιδίων που βρίσκονται κοντά στις ομάδες των πολικών κεφαλών συγκρατούνται σφιχτά μαζί, γεγονός που επιβραδύνει περαιτέρω την πρόοδο της διαχόμενης ουσίας καθώς πρέπει να περάσει μέσα από μια ιώδη περιοχή. Το μήκος του «μονοπατιού» που πρέπει να διασχίσει μια διαχεόμενη ουσία εξαρτάται από αριθμό των κυτταρικών στιβάδων και από το μέγεθος των κυττάρων. Για παράδειγμα στην περιοχή του προσώπου η διαπερατότητα των ουσιών μέσω του δέρματος είναι ευκολότερη διότι υπάρχουν λιγότερες κυτταρικές στιβάδες και ο αριθμός των κυττάρων είναι μικρότερος. Advanced topical formulations (ATF) (20)

Το τρίτο και πιο λεπτό φράγμα είναι η μεμβράνη Rein, η οποία αποτελεί μία συνεκτική μεμβράνη στη βάση της κεράτινης στιβάδας (έσω κερατίνη). Στο σημείο αυτό η κερατίνη αποκτά την πιο σφικτή δομή και τη μέγιστη σταθερότητα. Αυτό οφείλεται στο ιδιαίτερα

χαμηλό pH της περιοχής που επηρεάζει αποτελεσματικά τη δομή των μόλις κερατινοποιημένων κυττάρων.

1.2.2.1 Νομος Διάχυσης του Fick

Αν και αρκετά αποτελεσματικός, ο φραγμός του δέρματος δεν είναι τέλειος, επιτρέποντας έτσι σε μεγάλο αριθμό ενώσεων να έρθει σε επαφή με τον οργανισμό. Η απορρόφηση των φαρμάκων από το δέρμα πιστεύεται ότι είναι μια παθητική διαδικασία και μπορεί να περιγραφεί από τους νόμους διάχυσης του Fick.

Ο νόμος του Fick ουσιαστικά περιγράφει μαθηματικά την ποσότητα φαρμάκου (γραμμομόρια ή γραμμάρια) που μεταφέρονται μέσω μιας μεμβράνης με την πάροδο του χρόνου (ώρες, λεπτά, δευτερόλεπτα). Στην περίπτωση των προϊόντων που εφαρμόζονται στο δέρμα, η μεμβράνη είναι το δέρμα μέσω του οποίου το φάρμακο πρέπει να διαχυθεί. Για την μαθηματική περιγραφή του φαινομένου η κεράτινη στιβάδα θεωρείται ως ομογενής φραγμός -homogenous model(διαφορετικά μπορεί να υποτεθεί ότι αποτελείται από πολλές στιβάδες):

Η ποσότητα του φαρμάκου **Q** που διέρχεται από το δέρμα επιφανείας **S**, στην μονάδα του χρόνου **t**, ονομάζεται ροή (flux) (**J**) και δίνεται από τη

$$\text{Steady state flux} = J = dQ/dt = D \cdot S \cdot K (C_v - C_r) / h$$

Εξίσωση 1

Όπου

J: η ποσότητα της ουσίας που απορροφήθηκε ανά μονάδα επιφανείας και χρόνου (moles/cm²sec)

D: ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας

K: είναι ο συντελεστής κατανομής της ουσίας μεταξύ του φορέα και της κεράτινης στιβάδας που εκφράζει τη σχετική συγγένεια της ουσίας για το φορέα και την κεράτινη στιβάδα

H: το πάχος της κεράτινης στιβάδας (cm)

C_v: η συγκέντρωση της ουσίας στο φορέα

C_r: η συγκέντρωση της ουσίας στην κεράτινη στιβάδα

Δηλαδή, (Cv-Cr) είναι η διαφορά συγκέντρωσης μιας ουσίας από την άνω και την κάτω πλευρά της κεράτινης στιβάδας.

Με την προϋπόθεση ότι ισχύουν συνθήκες δεξαμενής, η συγκέντρωση της ουσίας στην κεράτινη στιβάδα μπορεί να θεωρηθεί πως είναι κοντά στο μηδέν αφού το φάρμακο απομακρύνεται συνεχώς μετά την απορρόφηση του με την κυκλοφορία του αίματος. Έτσι η ροή δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$J = D \cdot S \cdot K \cdot C_v / h$$

Εξίσωση 2

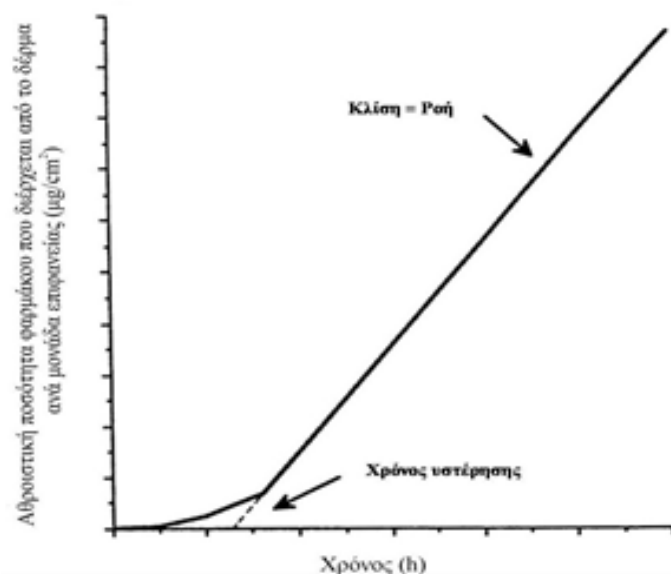
Η δυνατότητα μιας ουσίας που βρίσκεται σε συγκεκριμένο φορέα να διαπερνά λίγο ή πολύ την κεράτινη στιβάδα χαρακτηρίζεται από το συντελεστή διαπερατότητας Kp που λαμβάνει υπόψη του ταυτόχρονα τους συντελεστές διάχυσης (D) και κατανομής (K), όπως και το πάχος (H) της κεράτινης στιβάδας.

$$K_p = D \cdot K / h$$

Εξίσωση 3

Η μονάδα μέτρησης του Kp είναι το cm/sec.

Η αθροιστική ποσότητα του φαρμάκου που διέρχεται διαμέσου του δέρματος ανά μονάδα επιφανείας (μg/cm²) σε σχέση με το χρόνο, φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Μετά το λανθάνοντα χρόνο διάχυσης (lag time), εγκαθίσταται σταθερός ρυθμός διάχυσης που αντιστοιχεί στο γραμμικό μέρος του διαγράμματος. Η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης παρέχει την ροή σε σταθεροποιημένη κατάσταση (μg/cm²/h), ενώ η τομή με τον άξονα του χρόνου παρέχει τον χρόνο υστέρησης (lag time). (21) (22)



Εικόνα 8. Αθροιστική ποσότητα του φαρμάκου που διέρχεται διαμέσου του δέρματος ανά μονάδα επιφανείας (μg/cm²) σε σχέση με το χρόνο (23)

Ο λανθάνων χρόνος απορρόφησης L και ο συντελεστής διαχύσεως D συνδέονται με την εξίσωση :

$$L = H^2 / 6D$$

Εξίσωση 4

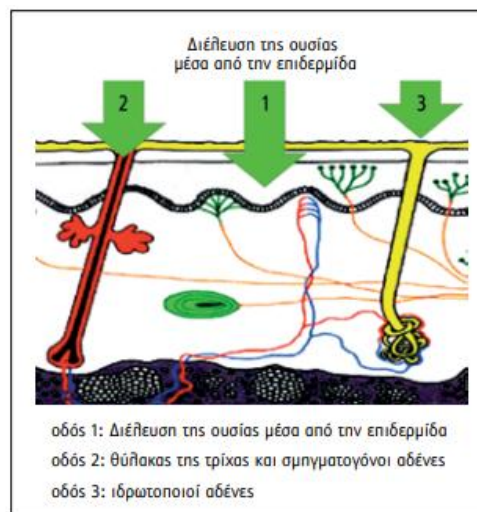
Όταν λοιπόν το πάχος της κεράτινης στιβάδας H είναι γνωστό, η μέτρηση του λανθάνοντος χρόνου επιτρέπει την εκτίμηση του συντελεστή διαχύσεως που για την κεράτινη στοιβάδα πολύ χαμηλός, της τάξεως των 10^{-10} cm²/sec, κατά μέσον όρο, ενώ για τις ζώσες δομές του δέρματος (επιδερμίδα, χόριο) είναι όσο περίπου και στο σκεύασμα (10^{-6} cm²/sec). Ακόμα το πιο σημαντικό είναι πως με την μέτρηση και σύγκριση του λανθάνοντος χρόνου κατά την διεξαγωγή πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας ουσιών μέσω του δέρματος κάτω από την επίδραση διαφόρων επιταχυντών διαβατότητας μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα το κατά πόσο ο επιταχυντής διαβατότητας τροποποιεί το συντελεστή διάχυσης της ουσίας που είναι ενδεικτικό του μηχανισμού δράσης του επιταχυντή διαβατότητας.

1.2.2.2 Οδοί διέλευσης ουσιών προς το δέρμα

Η απορρόφηση των φαρμάκων από το δέρμα, που χαρακτηρίζεται από διαδοχικές διαδικασίες διάχυσης και κατανομής των ουσιών, μπορεί να γίνει είτε μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος είτε μέσω της επιδερμίδας.

Διέλευση μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος

Στην πρώτη περίπτωση η διαπέραση των φαρμάκων γίνεται με μεταφορά μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος, δηλαδή των θυλάκων των τριχών και των εκκρινών αδένων - appendageal route (οδοί 2 και 3 στην εικόνα 9). Αυτά σχηματίζουν περίπλοκα διακλαδισμένα μονοπάτια μέσα στην επιδερμίδα, μέσω των οποίων μπορούν να διέλθουν μεγάλα ιονικά μόρια. Παρόλο που η διέλευση μιας ουσίας πραγματοποιείται ευκολότερα μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος, το ποσοστό της επιφάνειας που καλύπτουν αυτά σε σχέση με τη συνολική δερματική επιφάνεια είναι πάρα πολύ μικρό (~0,1%) κι έτσι η οδός της διέλευσης μέσα από την επιδερμίδα θεωρείται η σημαντικότερη. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των ιόντων ή μεγάλων πολικών μορίων που δεν μπορούν να διαπεράσουν μέσω της επιδερμίδας κι έτσι οι δρόμοι 2 και 3 (εικόνα 8) φαίνεται ότι αποκτούν μεγαλύτερη σημασία. (18)



Εικόνα 9. Οδοί διέλευσης προς το δέρμα. Οδός 1: Διέλευση της ουσίας μέσα από την επιδερμίδα. Οδός 2: Θύλακας της τρίχας και σμηγματογόνοι αδένες. Οδός 3: Ιδρωτοποιοί αδένες

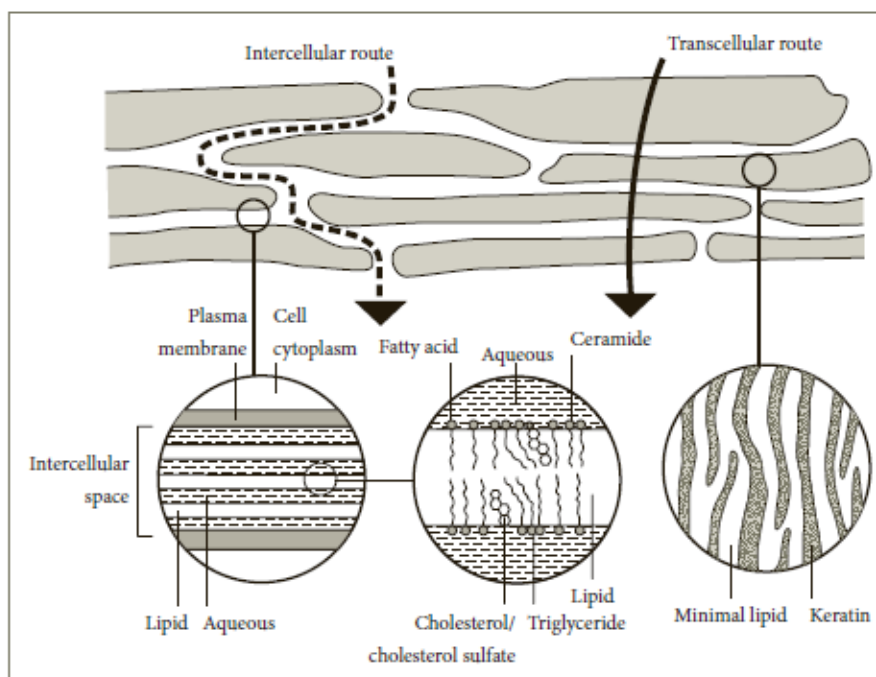
Διέλευση μέσω της επιδερμίδας

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύριος φραγμός στη διέλευση των ουσιών μέσω της επιδερμίδας είναι η κεράτινη στιβάδα. Οι αποφρακτικές ιδιότητες της κεράτινης στιβάδας είναι αποτέλεσμα στενά συνδεδεμένων κερατινοκυττάρων και συμπαγών λιπιδίων που καλύπτουν το χώρο μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων.

Η διέλευση μέσω της κεράτινης στιβάδας μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο πιθανών μικροοδών : «διαμέσου των κερατινοκυττάρων και των λιπιδικών στοιβάδων» (διακυτταρική οδός, transcellular route) και «διαμέσου των λιπιδικών περιοχών μεταξύ των κερατινοκυττάρων» (παρακυτταρική οδός, intercellular route)

Στην πρώτη περίπτωση (transcellular route) η διείσδυση των μορίων γίνεται διαμέσου των πεπλατυσμένων κυττάρων της κεράτινης στιβάδας και των λιπιδικών περιοχών που παρεμβάλλονται. Η αντίσταση που προβάλουν οι μεμβράνες των κυττάρων θεωρείται αμελητέα σε σχέση με την αντίσταση των κερατινοκυττάρων καθώς τα λιπίδια που βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων είναι περισσότερο λιπόφιλα και «πακετάρωνται» πιο συνεκτικά σε σχέση με τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών.

Στη δεύτερη περίπτωση η μεταφορά των ουσιών γίνεται διαμέσου των λιπιδικών στοιβάδων μεταξύ των κερατινοκυττάρων. Συγκεκριμένα, τα διακυτταρικά λιπίδια σχηματίζουν ελάσματα (lamellae) που παρέχουν ένα μονοπάτι για τη διάχυση λιπόφιλων φαρμάκων μέσω των αλυσίδων λιπαρών οξέων και ένα μονοπάτι για υδρόφιλα φάρμακα μεταξύ των πολικών κεφαλών των δύο λιπιδικών αλυσίδων (εικόνα 8). Αν και αυτή η οδός διαπέρασης είναι ένα αρκετά περίπλοκο μονοπάτι, πιστεύεται ότι αποτελεί την κύρια οδό διαπέρασης πολλών φαρμάκων. Αντίθετα η «διαμέσου των κυττάρων» οδός (transcellular route) συνεισφέρει ένα πολύ μικρό ποσοστό στη συνολική μεταφορά του φαρμάκου διαμέσου της κεράτινης στιβάδας.



Εικόνα 10. Ενδοκυτταρική και διακυτταρική διαδρομή διάχυσης στην κεράτινη στιβάδα

Τελικά τα μόρια της εισαγμένης ουσίας, αφού περάσουν το δερματοεπιδερμικό φραγμό προσλαμβάνονται από την ζώσα επιδερμίδα. Εκεί, η αντίσταση που προβάλλεται στην διείσδυσή τους είναι ασήμαντη. Κατά την παραμονή τους στη ζώσα επιδερμίδα οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορεί να υποστούν βιομετατροπή, οφειλόμενη στα ένζυμα της επιδερμίδας. Η έκταση και είδος της βιομετατροπής που θα υποστούν καθορίζεται κυρίως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε ουσίας. Οι στεροειδείς ουσίες σε μορφή εστέρα παρουσιάζουν εντονότερα το φαινόμενο του μεταβολισμού. Στη συνέχεια ακολουθεί η διάχυσή τους στο θηλώδες τμήμα του χορίου, όπου λόγω της μεγάλης διαβατότητάς του, τα μόρια της ουσίας φτάνουν στο αγγειακό δίκτυο. Το οριζόντιο αγγειακό πλέγμα του θηλώδους χορίου σχηματίζει το κατώτερο όριο του στρώματος, που πρέπει να διαβεί μια ουσία. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η αιματική ροή είναι επαρκής και η διαβατότητα στα τριχοειδή αρκετά υψηλή, ώστε και οι διαβαίνουσες ουσίες να εισάγονται ταχέως στην κυκλοφορία μόλις φτάσουν στο χόριο. (24)

Συνοπτικά τα στάδια απορρόφησης ενός φαρμάκου από το δέρμα είναι τα εξής:

- 1 Διαλυτοποίηση των μορίων του φαρμάκου εντός του φορέα.
- 2 Διάχυση των μορίων από το φορέα στην κεράτινη στιβάδα.
- 3 Κατανομή των μορίων μεταξύ φορέα και κεράτινης στιβάδας.

4 Διάχυση των μορίων εντός της κεράτινης στοιβάδας. Ποσότητα του φαρμάκου πιθανώς να δεσμευτεί και να σχηματιστεί μια δεξαμενή φαρμάκου συνθήκες που σε πολλές περιπτώσεις τις επιδιώκουμε ιδιαίτερα όταν θέλουμε να πετύχουμε ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκου ή θέλουμε να έχουμε μεγάλη διάρκεια δράσης χωρίς την χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων. Η υπόλοιπη ποσότητα εξακολουθεί να διαχέεται.

5 Κατανομή μεταξύ κεράτινης στοιβάδας και ζώσας επιδερμίδας.

6 Διάχυση εντός της ζώσας επιδερμίδας. Κάποια ποσότητα του φαρμάκου είναι δυνατόν να μεταβολιστεί από ένζυμα ή να δεσμευτεί σε κάποια θέση-υποδοχέα. Το φαινόμενο του μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα έντονο σε φάρμακα με μορφή εστέρων που έχουν στεροειδικό σκελετό.

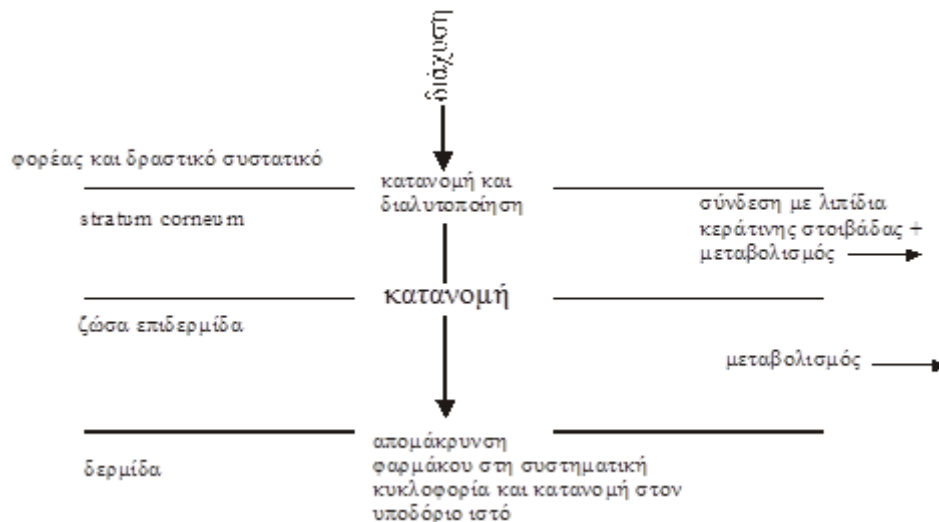
7 Κατανομή της ουσίας μεταξύ ζώσας επιδερμίδας και χορίου.

8 Διάχυση εντός του χορίου. Ποσότητα της ουσίας μπορεί να μεταβολιστεί, να σχηματίσει δεξαμενή, να κατανεμηθεί μεταξύ χορίου και τοιχώματος αιμοφόρου αγγείου ή και μεταξύ χορίου και υποδόριου ιστού.

9 Το φάρμακο που θα κατανεμηθεί μεταξύ χορίου και αιμοφόρου αγγείου θα παραληφθεί από το αίμα και θα οδηγηθεί στη συστηματική κυκλοφορία.

10 Το φάρμακο που θα κατανεμηθεί μεταξύ χορίου και υποδόριου ιστού θα σχηματίσει δεξαμενή εντός του υποδόριου λίπους.

11 Είναι εμφανές ότι στην αλληλουχία αυτή βασικό ρόλο παίζει ο μηχανισμός της διάχυσης. Η όλη διαδικασία επηρεάζεται από βιολογικούς και φυσικοχημικούς παράγοντες. (25) (26) (27)



Εικόνα 11. Στάδια απορρόφησης φαρμάκου από το δέρμα

1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση

1.2.3.1 Φυσιολογικοί παράγοντες

Κατάσταση του δέρματος

Η ακεραιότητα του δέρματος είναι σημαντική για την προστασία από τη διείσδυση χημικών ουσιών στο δέρμα. Λύση της συνέχειας του δέρματος από τραύματα, αμυχές, εγκαύματα ή ερεθισμούς δημιουργούν ζώνες ασυνέχειας της κεράτινης στιβάδας και επομένως μειώνουν την ικανότητα του δέρματος να δρα ως φραγμός. Παρόμοιες συνέπειες έχουν και παθήσεις του δέρματος, όπως ψωρίαση και δερματίτιδα. (28)

Ανατομική περιοχή

Η διαδερμική απορρόφηση ουσιών εξαρτάται άμεσα από το πάχος και τη φύση της κεράτινης στιβάδας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πάχος της κεράτινης στιβάδας, η δομή και η χημική της σύνθεση διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή του δέρματος. Συνεπώς, η απορρόφηση από το δέρμα διαφοροποιείται ανάλογα με την ανατομική περιοχή του σώματος. Σημαντική αιτία αύξησης της διαπερατότητας είναι επίσης η έντονη παρουσία τριχών και σμηγματογόνων και ιδρωτοποιών αδένων σε μία ανατομική περιοχή. Μία γενική κατάταξη κατά σειρά αύξησης της αντίστασης στην απορρόφηση είναι: (29)

-Βλεννογόνες μεμβράνες,

-Όσχεο

-Βλέφαρα

-Πρόσωπο

- Στήθος
- Ράχη
- Ανώτερη επιφάνεια άκρων
- Κατώτερη επιφάνεια άκρων
- Ραχιαία επιφάνεια άκρων
- Πέλμα, παλάμη
- Νύχια

Αιμάτωση του δέρματος

Συνήθως η αύξηση της ροής του αίματος στα δερματικά αγγεία προκαλεί αύξηση της διαδερμικής απορρόφησης, δεδομένου ότι αυξάνεται το εύρος ροής της ουσίας προς τα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας.

Ηλικία του δέρματος

Το ανθρώπινο δέρμα υφίσταται σημαντικές αλλαγές με την πάροδο του χρόνου. Μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές σημειώνονται σε αυτό, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση ουσιών. Συγκεκριμένα, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις μεταβολών του δέρματος κατά τη γήρανση, όπως ατροφία της επιδερμίδας και του δέρματος, μείωση της προσκόλλησης μεταξύ των κερατινοκυττάρων, μείωση του αριθμού των μελανοκυττάρων και των κυττάρων Langerhans και η αύξηση των ινών κολλαγόνου τύπου 3. Η γήρανση μπορεί να περιορίσει τη διείσδυση υδρόφιλων ενώσεων στο δέρμα γεγονός που αποδίδεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό του SC που επιβεβαιώνεται και από τη μείωση του φυσικού παράγοντα ενυδάτωσης (NMF). Κατά συνέπεια, η χαμηλότερη συγκέντρωση νερού στο SC οδηγεί στον περιορισμό της πολικής διαδρομής κατά μήκος των ελασμάτων λιπιδίων SC, η οποία στη συνέχεια εμποδίζει τη μεταφορά υδρόφιλων ενώσεων στο δέρμα. Έτσι παρατηρείται μικρότερη διαδερμική διαπερατότητα στους ηλικιωμένους. Αντίθετα τα βρέφη παρουσιάζουν αυξημένη διαπερατότητα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το δέρμα χρειάζεται 3-5 μήνες μετά τη γέννηση για να ωριμάσει και να επιτύχει παρόμοιο πάχος και τις δυνατότητες φραγμού όπως αυτές ενός ενήλικα. (29)

Επίπεδο υδάτωσης

Ένας από τους σπουδαιότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του δερματοεπιδερμικού φραγμού είναι το επίπεδο υδάτωσης της κεράτινης στιβάδας. Το νερό επηρεάζει την πλαστικότητα του δέρματος και παράλληλα δρα σαν ένας φυσικός επιταχυντής διαβατότητας. Έτσι, η ενυδάτωση της επιδερμίδας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της από όλες σχεδόν τις ουσίες. Το νερό διογκώνει τα κερατινοκύτταρα και παράλληλα κατακρατείται στα διαστήματα μεταξύ των ινιδίων της κεράτινης, διογκώνοντας έτσι και την μέσο-ινιδιακή αυτή δομή. Κατά αυτό τον τρόπο σχηματίζει ένα συνεχή υδάτινο δρόμο που διευκολύνει την απορρόφηση των υδρόφιλων αλλά και των λιπόφιλων μορίων, αφού αυτά βρίσκουν μεγαλύτερα κενά ανάμεσα στα κύτταρα και διεισδύουν για καθαρά μηχανικούς λόγους. Η αύξηση της υδάτωσης του δέρματος θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αύξηση της διαδερμικής απορρόφησης τοπικών σκευασμάτων που περιέχουν κορτικοστεροειδή. Μία τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η εμφύσηση του δέρματος για πέντε λεπτά σε νερό και κατόπιν η εφαρμογή της τοπικής θεραπείας κορτικοστεροειδούς. (29)

Θερμοκρασία

Η αύξηση της θερμοκρασίας του δέρματος έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος, κάτι που οδηγεί στην αύξηση της διαδερμικής απορρόφησης. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στα φαινόμενα της διαβατότητας, δεδομένου ότι ο συντελεστής διάχυσης της κεράτινης στιβάδας (diffusion coefficient) εξαρτάται από την θερμοκρασία. Σε φυσιολογικές συνθήκες *in vivo* η θετική επίδραση της θερμοκρασίας στην απορρόφηση είναι μικρή, καθώς οι μεταβολές είναι μικρές. Αντίθετα, *in vitro*, αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μεγάλη αύξηση της απορρόφησης. (29)

Διαφορές μεταξύ ατόμων

Η διαπερατότητα του δέρματος διαφέρει ανάμεσα στους ανθρώπους και οφείλεται σε διαφορές στη σύσταση και το πάχος του δέρματος. Διαφορές μπορεί να προκύψουν και ανάμεσα σε άτομα διαφορετικής φυλής. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι το δέρμα ατόμων της μαύρης φυλής παρουσιάζει μειωμένη διαπερατότητα. Σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα δεν έχουν σημειωθεί. (29)

Μεταβολισμός από το δέρμα

Το δέρμα είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο και η διέλευση από το δέρμα θα εκθέσει το φάρμακο σε μια ποικιλία ενζύμων που βρίσκονται στο δέρμα. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη φάση I (οξειδωση, αναγωγή και υδρόλυση) και αυτά που εμπλέκονται στις μεταβολικές διεργασίες φάσης II (μεθυλίωσης, γλυκουρονιδίωσης) έχουν απομονωθεί από το δέρμα. Η πλειοψηφία αυτών των ενζύμων έχει ανιχνευθεί στην επιδερμίδα και στα εξαστήματα της και έχει επίσης παρατηρηθεί ενzymική δραστηριότητα στο SC. Οι διαδικασίες μεταβολισμού του δέρματος επηρεάζουν σημαντικά τη διαδερμική απορρόφηση ξενοβιοτικών ουσιών. (29)

1.2.3.2 Φυσικοχημικοί παράγοντες

Φύση του φορέα

Ο φορέας της ουσίας επηρεάζει αισθητά την διείσδυση της δραστικής ουσίας μεταβάλλοντας τον ρυθμό απελευθέρωσης και την βιοδιαθεσιμότητα αυτής και/ή τροποποιώντας την δομή της κεράτινης στιβάδας. Η όλη σύνθεσή του πρέπει να διευκολύνει τη συγκεκριμένη δραστική ουσία να έρθει κατ' αρχήν σε επαφή με το δέρμα αλλά και να διευκολύνει την διείσδυση αυτής στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας, κατά τρόπο μη ερεθιστικό και πολύ περισσότερο τοξικό για το δέρμα ή άλλα όργανα και ιστούς. Μια ενδιαφέρουσα θεωρία που έχει αναπτυχθεί σχετικά με το πως η φύση του φορέα ενισχύει τη διαπερατότητα είναι η θεωρία Formulating For Efficacy , γνωστή και ως θεωρία Relative Polarity Index (RPI).

Θεωρία Relative Polarity Index (RPI).

Με τη θεωρία RPI δίνεται ένας τρόπος να συγκριθεί η πολικότητα μιας δραστικής ουσίας ταυτόχρονα με την πολικότητα του δέρματος η οποία είναι περίπου 0,8 και με την πολικότητα του φορέα στον οποίο διαλύεται η δραστική. Για την έκφραση της πολικότητας χρησιμοποιείται της δραστικής και του δέρματος χρησιμοποιείται η τιμή $\log P$. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή , για να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκλιντρωση της ουσίας στο SC σε σχέση με το φορέα θα πρέπει η πολικότητα του να είναι είτε μεγαλύτερη από το άθροισμα της πολικότητας της δραστικής ουσίας με το PPG (**Polarity of the formulation > Polarity of the**

penetrant + PPG) είτε μικρότερη από τη διαφορά της πολικότητας της δραστικής ουσίας με το PPG(**Polarity of the formulation < Polarity of the penetrant – PPG**).

Όπου PPG είναι η απόλυτη τιμή της διαφοράς της πολικότητας της δραστικής ουσίας και της πολικότητας του stratum corneum.(PPG =|Polarity penetrant – Polarity Stratum Corneum|).

Παραδείγμα για τη ρεσβερατρόλη

Εφόσον η ρεσβερατρόλη έχει log P 3,1 το PPG με βάση τα παραπάνω είναι:

PPG = |Polarity penetrant – Polarity Stratum Corneum| = 3.1 – 0.8 = 2,3. Άρα για ενισχυθεί η τάση της δραστικής να φύγει από το σκεύασμα το Log P του σκευάσματος πρέπει να είναι είτε μεγαλύτερο από 5,4 (=3,1+2,3) είτε μικρότερο από 0,8(=3,1-2,3). Όσο η τιμή του logP του σκευάσματος απομακρύνεται από αυτές τις τιμές τόσο μεγαλύτερη είναι η θερμοδυναμική ενεργότητα αλλά τόσο μειώνεται η διαλυτότητα της ουσίας στο σκεύασμα.

Συμπερασματικά ,για να επιτευχθεί η μέγιστη διαπερατότητα, θα πρέπει η πολικότητα του φορέα να είναι όσο το δυνατόν πιο μακριά από την πολικότητα του δραστικού συστατικού προκειμένου να αυξηθεί η δύναμη που οδηγεί το δραστικό συστατικό στο δέρμα αλλά Συγχρόνως, η πολικότητα του σκευάσματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερη προς εκείνη του δραστικού συστατικού για να εξασφαλίζει τις υψηλές συγκεντρώσεις που επιτρέπουν επαρκή διείσδυση της δραστικής .

Συμφωνα λοιπόν με τη θεωρία RPI για να επιτευχθεί αυτό χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μείγμα διαλυτών στο φορέα. Ενας διαλύτης με log P κοντά σε αυτό της δραστικής ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητα της δραστικής στο φορέα , και ένας διαλύτης με log P μακρινό από αυτό της ουσίας ώστε να αυξηθεί η θερμοδυναμική ενεργότητα. Όσον αφορά την αναλογία των διαλυτών μεταξύ τους , ο δεύτερος διαλύτης προστίθεται μέχρις ότου επιτευχθεί το 90% περίπου της μέγιστης διαλυτότητας. (30)

.

Φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου

- Σχήμα και μέγεθος του μορίου του φαρμάκου. Γενικά έχει διαπιστωθεί μέχρι τώρα ότι φάρμακα που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 500 Da έχουν πολύ μικρή ικανότητα διαπερατότητας και αυτό ισχύει για πολλά φάρμακα κυρίως αυτά που είναι πρωτεϊνικής φύσεως.
- Συντελεστής κατανομής του φαρμάκου στην κεράτινη στιβάδα. Γενικά οι αμφίφιλες ουσίες (π.χ. λεκιθίνη) διαπερνούν καλύτερα την κεράτινη στιβάδα. Ο αμφιφιλικός χαρακτήρας τους επιτρέπει την διέλευση τόσο μέσω των λιπιδίων, όσο και δια των υδατικών ζωνών αυτής.

Επιταχυντές διαπερατότητας

Οι επιταχυντές διαδερμικής διαπερατότητας αποτελούν χημικές ουσίες διάφορων κατηγοριών οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια. Προστίθενται στα διαδερμικά θεραπευτικά συστήματα και συμβάλλουν στη αύξηση της ποσότητας του φαρμάκου που φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία. Ο μηχανισμός δράσης τους διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Μεταβολή των ιδιοτήτων των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας
2. Αλληλεπίδραση με τις διακυτταρικές πρωτεΐνες
3. Αυξημένη διάλυση του φαρμάκου στο φορέα ή στην κεράτινη στιβάδα ⁱⁱ

pH

Το pH επηρεάζει το φαρμακευτικό μόριο, καθορίζοντας εάν αυτό θα βρίσκεται στην ιονισμένη ή μη ιονισμένη μορφή του, κάτι που επηρεάζει καθοριστικά την απορρόφηση από το δέρμα. Επίσης, ακραίες μορφές pH μπορούν να έχουν ερεθιστική δράση πάνω στο δέρμα, αυξάνοντας τη διαπερατότητα.

Θερμοδυναμική ενεργότητα

Ο όρος θερμοδυναμική ενεργότητα περιγράφει την τάση της δραστικής ουσίας να μετακινηθεί από τον φορέα στον οποίο έχει μορφοποιηθεί προς την κεράτινη στιβάδα. Ουσιαστικά είναι η κινητήρια δύναμη για τη διάχυση. Η θερμοδυναμική δραστηριότητα είναι μέγιστη όταν η δραστική ουσία βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού

στο φορέα. Έχειδειχθεί ότι σε όταν δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών του φορέα και του δέρματος, η ροή (Flux) μιας δεδομένης δραστικής ουσίας από διαφορετικούς φορείς (όπου όμως βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού) είναι η ίδια παρόλο που η συγκέντρωση της μπορεί να διαφέρει σημαντικά από φορέα σε φορέα.

Δίνεται από τη σχέση:

$$αν = γν * cv$$

Εξίσωση 2

όπου **αν**: η θερμοδυναμική ενεργότητα

γν: συντελεστής ενεργότητας της δραστικής ουσίας

cv: η συγκέντρωση της ουσίας στο φορέα

Η διαλυτότητα διαδραματίζει καθοριστική επίδραση στη θερμοδυναμική ενεργότητα. Κατά τη σύγκριση φορέων που περιέχουν την ίδια συγκέντρωση της ίδιας δραστικής ουσίας, η θερμοδυναμική ενεργότητα θα είναι μεγαλύτερη στο φορέα όπου η διαλυτότητα είναι μικρότερη. Αν η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας στο φορέα είναι γνωστή τότε η θερμοδυναμική ενεργότητα μπορεί να προβλεφθεί από το λόγο της συγκέντρωσης προς τη διαλυτότητα της δραστικής ουσίας στο φορέα και να συσχετισθεί με τη ροή. (31)

1.2.4 Βελτιστοποίηση Διαδερμικής Απορρόφησης

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να μειωθεί η λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας και να αυξηθεί η διαδερμική απορρόφηση των φαρμακευτικών μορίων. Οι σπουδαιότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω ανά κατηγορία και οι κυριότερες από αυτές θα αναλυθούν παρακάτω:

1.2.4.1 Ενυδάτωση κεράτινης στιβάδας

Το νερό είναι ο καλύτερος τρόπος για τη διείσδυση τόσο των υδρόφιλων όσο και των υδρόφοβων φαρμάκων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η συγκέντρωση νερού που υπάρχει στην κεράτινη στιβάδα είναι 10-20 %. Η ενυδάτωση της επιδερμίδας αποτελεί έναν τρόπο για τη βελτίωση της διείσδυσης ουσιών. Η παρουσία ύδατος στην λιπιδική διπλοστοιβάδα, προκαλεί διόγκωση των πολικών ομάδων των λιπιδίων και αυτό μπορεί οδηγήσει σε

χαλάρωση της δομής των διπλοστοιβάδων με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διέλευση των ουσιών. Επιπλέον, Το νερό μέσα στον ιστό μεταβάλλει τη διαλυτότητα των ουσιών στην κεράτινη στιβάδα και έτσι τροποποιεί κατανομή τους στο δέρμα. (32) (33)

Η περιεκτικότητα σε νερό της κεράτινης στοιβάδας μπορεί να αυξηθεί είτε με την παροχή νερού από τον φορέα στο δέρμα είτε με την πρόληψη της απώλειας νερού από το δέρμα όταν εφαρμόζονται μερικώς αποφρακτικές (occlusive formulas) συνθέσεις στο δέρμα.

Ο Παρακάτω πίνακας συνοψίζει την επίδραση διάφορων φορέων στην περιεκτικότητα του νερού της κεράτινης στιβάδας και στη διείσδυση των δραστικών συστατικών. (34)

Vehicle	Example/Constituents	Effect on skin hydration	Effect on skin permeability
Occlusive Dressings	Plastic film, unperforated waterproof patch	Prevent water loss; full hydration	Marked increase
Lipophilic vehicles	Paraffins, oils, fats, waxes, fatty acids, fatty alcohols, esters, silicones	Prevent water loss; may produce full hydration	Marked increase
Absorption bases	Unhydrous lipids plus w/o emulsifiers	Prevent water loss; marked hydration	Marked increase
Absorption bases	Unhydrous lipids plus o/w emulsifiers	Prevent water loss; marked hydration	Marked increase
W/O systems	W/O creams W/O emulsions	Retard water loss; raised hydration	Increase
O/W systems	O/W creams O/W emulsions	Can donate water; slight hydration increase	Slight increase
Humectants	Water-soluble vehicles; glycerol, glycols	Can withdraw water; decreased hydration	Possible decrease or act as chemical enhancer
Powder	Clays, shake lotions	Aid water evaporation; decreased excess hydration	Negligible effect on stratum corneum

Εικόνα 12. Επίδραση των διάφορων φορέων στην περιεκτικότητα του νερού της κεράτινης στιβάδας και στη διείσδυση των δραστικών συστατικών (3)

1.2.4.2 Επιταχυντές διαβατότητας

Το δέρμα αποτελεί φραγμό στη διαδερμική χορήγηση των φαρμάκων. Ειδικά η κεράτινη στοιβάδα, η εξωτερική στοιβάδα του δέρματος, σχηματίζει έναν ισχυρό λιπόφιλο φραγμό στη διάχυση των φαρμάκων. Ένας τρόπος για να παρακαμφθεί η αντίσταση του δέρματος στη διαπέραση των φαρμάκων είναι η ενσωμάτωση, στα ΔΘΣ, καταλλήλων χημικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές που μπορούν παροδικά να ελαχιστοποιήσουν τον φραγμό του δέρματος και να αυξήσουν τη ροή του φαρμάκου, ονομάζονται επιταχυντές διαβατότητας (penetration enhancers, accelerants ή absorption promoters). (35) (32) (33)

Ένας ιδανικός επιταχυντής διαβατότητας θα πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

1. Να μην είναι τοξικός και να μην προκαλεί αλλεργίες και φωτοτοξικότητα.
2. Θα πρέπει να έχει ταχεία δράση.
3. Η δράση του θα πρέπει να είναι προβλέψιμη.
4. Θα πρέπει να είναι συμβατός με μεγάλη ποικιλία φαρμάκων αλλά και με τα έκδοχα.
5. Να έχει χαμηλό κόστος
6. Να είναι φαρμακολογικά αδρανής
7. Να είναι άοσμος, άγευστος και άχρωμος
8. Να είναι καλός διαλύτης φαρμάκων.
9. Να έχει αναστρέψιμη επίδραση στις ιδιότητες του δέρματος (36)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι επιταχυντές διαδερμικής διαβατότητας δρουν με διάφορους μηχανισμούς δράσης. Το τελικό αποτέλεσμα της αυξημένης απορρόφησης μπορεί να προκληθεί και από συνέργεια περισσότερων από ενός μηχανισμών. Για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης έχουν γίνει αρκετές μελέτες, οι οποίες κατέληξαν στη διατύπωση αρκετών θεωριών. Η σπουδαιότερη θεωρία που έχει διατυπωθεί ως σήμερα για την ερμηνεία του τρόπου δράσης τους είναι η θεωρία Lipid-Protein-Partitioning (ή συνοπτικά θεωρία LPP). Ο πυρήνας της θεωρίας αυτής είναι ότι οι επιταχυντές διαβατότητας συνήθως λειτουργούν με έναν ή περισσότερους κύριους μηχανισμούς: (37)

- Προκαλούν αλλαγές στις λιπιδικές περιοχές (**Lipid**)
- Επιδρούν στις πρωτεΐνες της κεράτινης στοιβάδας (**Protein**)
- Αυξάνουν τον συντελεστή κατανομής στο δέρμα, του φαρμάκου ή άλλων επιταχυντών διαβατότητας (**Partitioning**)

Ειδικότερα, η θεωρία Lipid-Protein-Partitioning, που θεμελιώθηκε από τον B.W. Barry, περιγράφει τρεις πιθανές θέσεις στην επιδερμίδα, όπου ασκούν δράση οι επιταχυντές διαβατότητας. Οι θέσεις αυτές και οι πιθανοί μηχανισμοί αύξησης της διαδερμικής απορρόφησης σε αυτούς περιγράφονται παρακάτω (38)

Αλληλεπιδράσεις στη θέση A

Οι πολικές κεφαλές των λιπιδίων αλληλεπιδρούν συχνά με τους επιταχυντές διαβατότητας, με αποτέλεσμα την αλλαγή των δεσμών υδρογόνου και των ιοντικών δεσμών. Οι επιταχυντές διαταράσσουν τις υδάτινες σφαίρες των λιπιδίων και οι επακόλουθες αλλαγές

στις πολικές κεφαλές επιφέρουν αλλαγές και στη διάταξη της περιοχής. Έτσι, αυξάνεται η ρευστότητα και διευκολύνεται η διάχυση των πολικών φαρμάκων. Μία δεύτερη απόκριση που λαμβάνει χώρα είναι η αύξηση εισχώρησης ύδατος στην επιδερμίδα και η τελική αύξηση του υδατικού όγκου μεταξύ των λιπιδικών διπλοστιβάδων, επιτρέποντας πάλι την ευκολότερη διέλευση των πολικών φαρμάκων. Το ίδιο το νερό δρα σαν ένας αποτελεσματικός επιταχυντής διαβατότητας, καθώς η αυξημένη ενυδάτωση της επιδερμίδας τροποποιεί τη δομή της κεράτινης στιβάδας.

Άμεση επίδραση στην περιοχή Β

Ένας επιταχυντής διαβατότητας μπορεί να τροποποιήσει την υδατική περιοχή και συνεπώς να αυξήσει τον υδατικό όγκο με περισσότερους από τους παραπάνω τρόπους. Πιο συγκεκριμένα ορισμένοι διαλύτες μπορούν να επιδράσουν απ' ευθείας στην υδατική περιοχή, να μεταβάλλουν τη σύσταση της και να αυξήσουν την ικανότητα διάλυσης λιπόφιλων μορίων, όπως οιστραδιόλη ή υδροκορτιζόνη. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι αυξάνεται ο συντελεστής κατανομής του φαρμάκου στο δέρμα, με επακόλουθο τη συσσώρευσή υψηλών συγκεντρώσεων του στο δέρμα.

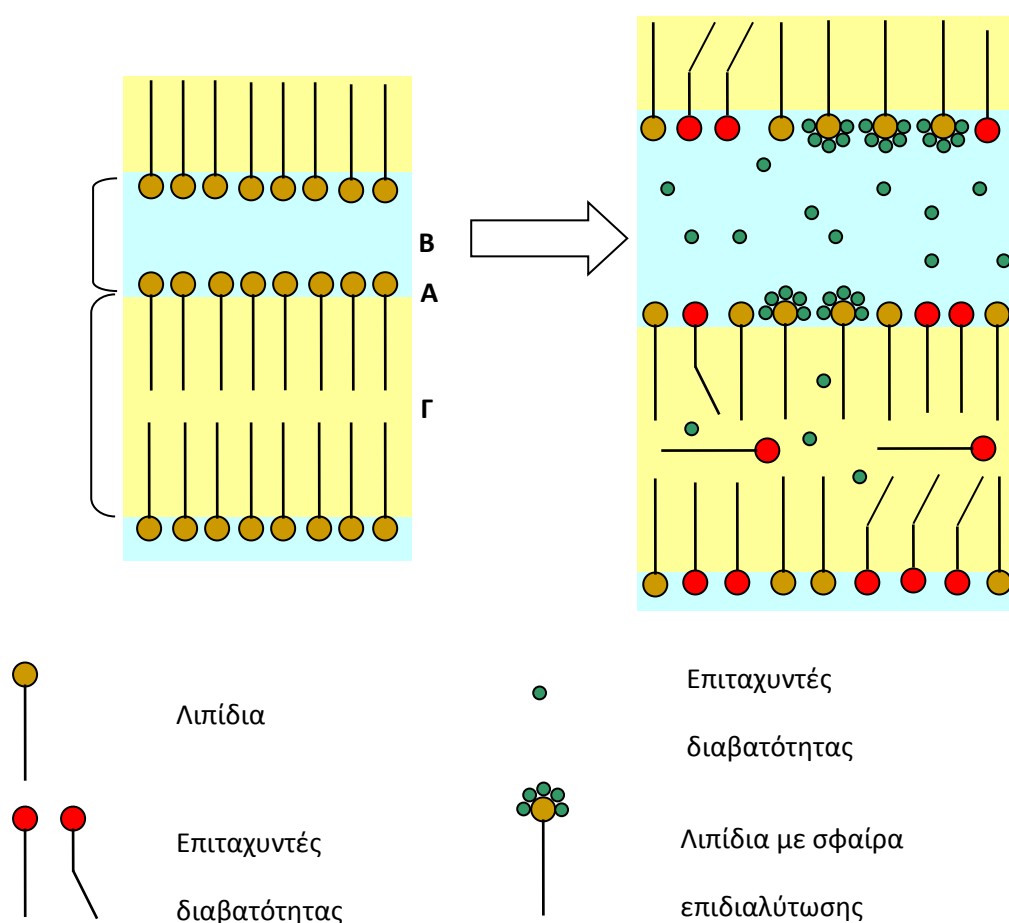
Ένα μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού δράσης είναι ότι η αύξηση της διαλυτοποίησης μειώνει προσωρινά το ρυθμό διάχυσης του φαρμάκου στην κεράτινη στιβάδα.

Επίδραση στην θέση Γ (στη λιπιδική περιοχή)

Πολλοί επιταχυντές διαβατότητας, εξαιτίας της δομής τους εισέρχονται μεταξύ των υδρόφοβων αλυσίδων των διπλοστιβάδων, διαταράσσουν τη δομή τους, αυξάνουν τη «ρευστότητα» τους και γίνεται ευκολότερη η διείσδυση των ουσιών. Οι επιδράσεις στις λιπιδικές δομές έχουν ως αποτέλεσμα και αλλαγές στις περιοχές των πολικών κεφαλών με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διαπέραση των πολικών ουσιών.

Οι ταυτόχρονες αλλαγές στις θέσεις Α και Γ χαρακτηριστικό των αμφιφιλικών επιταχυντών διαβατότητας. Αυτοί εισέρχονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα παρόμοια με τα λιπόφιλα μόρια και διαχέονται. Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας για τον τρόπο δράσης συγκεκριμένων επιταχυντών διαβατότητας είναι η σωστή επιλογή συνδιαλύτη. Για παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί η Azone, τα τερπένια και οι ακόρεστες ενώσεις με μακριές αλυσίδες, όπως το ελαϊκό οξύ και η ελαϊκή αλκοόλη. Για να καταφέρουν αυτές οι ουσίες να φτάσουν στη θέση Α (την πολική επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας),

απαιτείται η παρουσία κάποιου συνδιαλύτη, συνήθως προπυλενογλυκόλη ή αιθανόλη. Είναι πιθανό η δράση του συνδιαλύτη να σχετίζεται με τη μείωση της πολικότητας της υδατικής περιοχής, με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας διάλυσης λιπόφιλων ουσιών, όπως η Azone® και τα ελαϊκά παράγωγα. Ακόμα ο συνδιαλύτης μπορεί να αλλάξει την διάταξη των λιπιδικών πολικών κεφαλών, με αποτέλεσμα οι πολικές κεφαλές των επιταχυντών διαβατότητας να εισέρχονται ανάμεσα τους, ενώ οι λιπόφιλες ουρές τους παρεμβάλλονται μεταξύ των υδρόφοβων ομάδων των λιπιδίων της μεμβράνης και κατά συνέπεια αυξάνεται η ρευστότητα των λιπιδικών περιοχών των μεμβρανών. (37) (38)



Εικόνα 13. Θέσεις δράσεις των επιταχυντών διαβατότητας σύμφωνα με τη θεωρία L-P-P

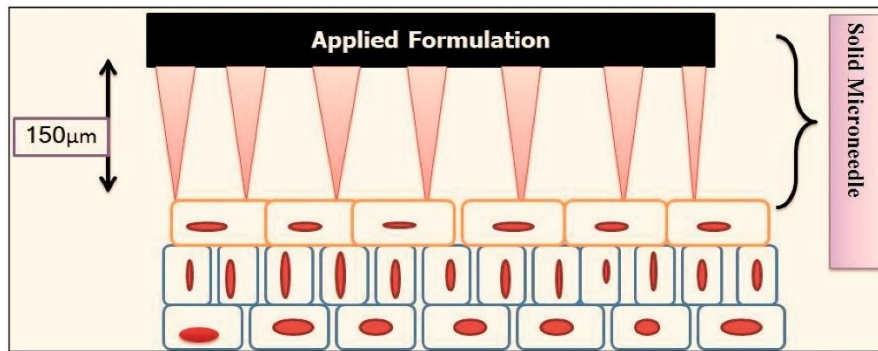
Αρκετοί τύποι επιταχυντών διαβατότητας είναι γνωστοί και μπορούν να χωριστούν σε διάφορες ομάδες με βάση τη χημική δομή τους. Οι περισσότεροι από αυτούς έχουν ποικίλους τρόπους δράσης, επομένως είναι δύσκολο να ταξινομηθούν σύμφωνα με αυτό το χαρακτηριστικό. Παραδείγματα κοινώς χρησιμοποιούμενων επιταχυντών διαβατότητας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Chemical classification	Enhancer
Alcohols	<i>Short chain alcohols</i> Ethanol, Isopropyl alcohol <i>Long chain alcohols</i> Decanol, Hexanol, Lauryl alcohol, Myristyl alcohol, Octanol, Octyl dodecanol, Oleyl alcohol
Amides	<i>Cyclic amides</i> Azone
Esters	<i>Alkyl esters</i> Ethyl acetate <i>Benzoic acid esters</i> Octyl salicylate, Padimate O <i>Fatty acid esters</i> Ethyl oleate, Glyceryl monoleate, Glyceryl monocaprate, Glyceryl tricaprilate Isopropyl myristate, Isopropyl palmitate, Propylene glycol monolaurate, Propylene glycol monocaprylate
Ether alcohols	Transcutol®
Fatty acids	Lauric acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Myristic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Isostearic acid
Glycols	Dipropylene glycol, Propylene glycol, 1,2-butylene glycol, 1,3- butylene glycol
Pyrrolidones	N-methyl-2-pyrrolidone, 2-pyrrolidone
Sulphoxides	Decylmethyl sulphoxide, Dimethyl sulphoxide
Surfactants	<i>Anionic surfactants</i> Sodium lauryl sulphate <i>Cationic surfactants</i> Alkyl dimethylbenzyl ammonium halides Alkyl trimethyl ammonium halides Alkyl pyridinium halides <i>Non-ionic surfactants</i> Brij 36T Tween 80
Terpenes	<i>Monoterpenes</i> Eugenol, D-Limonene, Menthol, Menthone <i>Sesquiterpenes</i> Farnesol, Neridol

Εικόνα 14. Παραδείγματα επιταχυντών διαβατότητας

1.2.4.3 Μικροβελόνες

Οι μικροβελόνες είναι συσκευές που δρουν ως υποδερμικές βελόνες και αποτελούν ένα καινοτόμο σύστημα για τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων. Αποτελούνται από μια δεξαμενή φαρμάκων και μια προεξοχή που ονομάζεται μικροβελόνα και επιτρέπει την διαπέραση της κεράτινης στιβάδας και την απελευθέρωση του φαρμάκου, αλλά λόγω του μικρού μεγέθους τους δεν φτάνουν έως τις νευρικές απολήξεις, ώστε να προκαλέσουν πόνο. Συνεπώς δεν υπάρχει περιορισμός όσον αφορά την πολικότητα και το μοριακό βάρος των μορίων που απελευθερώνονται. Η κατασκευή τέτοιων μικροσκοπικών δομών κατέστη δυνατή χάρις την τεχνολογία micromachining η οποία αποτελεί βασική τεχνολογία για την μικροηλεκτρονική βιομηχανία. Οι συσκευές μικροβελόνας μπορούν εύκολα να συνδυαστούν με μικροηλεκτρονικά συστήματα που μπορούν να ελέγξουν πλήρως τον ρυθμό παράδοσης των φαρμάκων για αυτό και αποτελεί μια πολύ ελπιδοφόρα τεχνική για την βελτίωση της διαδερμικής διαπερατότητας.



Εικόνα 15. Μικροβελόνες (32)

1.2.4.4 Ιοντοφόρηση

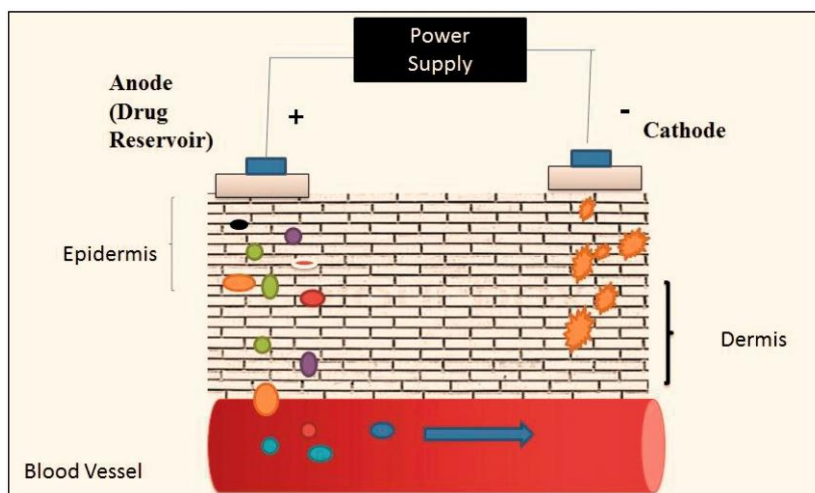
Η ιοντοφόρηση είναι η διαδικασία ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας των φαρμάκων με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Το φάρμακο εφαρμόζεται κάτω από ένα ηλεκτρόδιο που έχει το ίδιο ηλεκτρικό φορτίο με αυτό, επιπλέον ένα άλλο ηλεκτρόδιο αντίθετου ηλεκτρικού φορτίου τοποθετείται σε ένα άλλο σημείο του σώματος για τη δημιουργία κλειστού κυκλώματος. Τα φορτισμένα μόρια ωθούνται υπό την επίδραση της διαφοράς δυναμικού, διαμέσου της μεμβράνης. Αυτή η ηλεκτρική ώθηση θεωρείται ο κύριος μηχανισμός αύξησης της διαδερμικής διαπερατότητας στην ιοντοφόρηση. Ένας άλλος μηχανισμός είναι ότι το ηλεκτρικό ρεύμα ενισχύει τη διείσδυση των φαρμάκων εμποδίζοντας την ικανότητα του δέρματος να εκτελέσει τη λειτουργία του προστατευτικού φραγμού. Τέλος η ιοντοφόρηση προκαλεί την είσοδο του νερού, ενός πολύ αποτελεσματικού ενισχυτή διαβατότητας, στην κεράτινη στιβάδα (SC) με ηλεκτρισμό. (36) (33) (34)

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ιοντοφόρησης, συμπεριλαμβανομένου του pH του διαλύματος, του τύπου ηλεκτροδίου, της συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος, της ισχύος του ρεύματος και του τύπου του χρησιμοποιούμενου ρεύματος. Το μοριακό βάρος της διαλυμένης ουσίας / φαρμάκου είναι ένας σημαντικός παράγοντας της για επιτυχή ιοντοφορητική απελευθέρωση. Η ροή μικρότερων και πιο υδρόφιλων ιόντων είναι ταχύτερη από τα μεγαλύτερα ιόντα. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου. (34)

Advantage	Limitations
Improved polarised drug permeation	Cannot permeate drug of molecular weight >7000 Da
Improved transport for proteins	Time consuming process
Donot produce skin erythema	Irreversible damage to skin properties
Delivery of drug depends on electric current nor skin properties	Bad functioning of microprocessor
Improved transport for oleigonucleotide	Limitation to use current in human skin



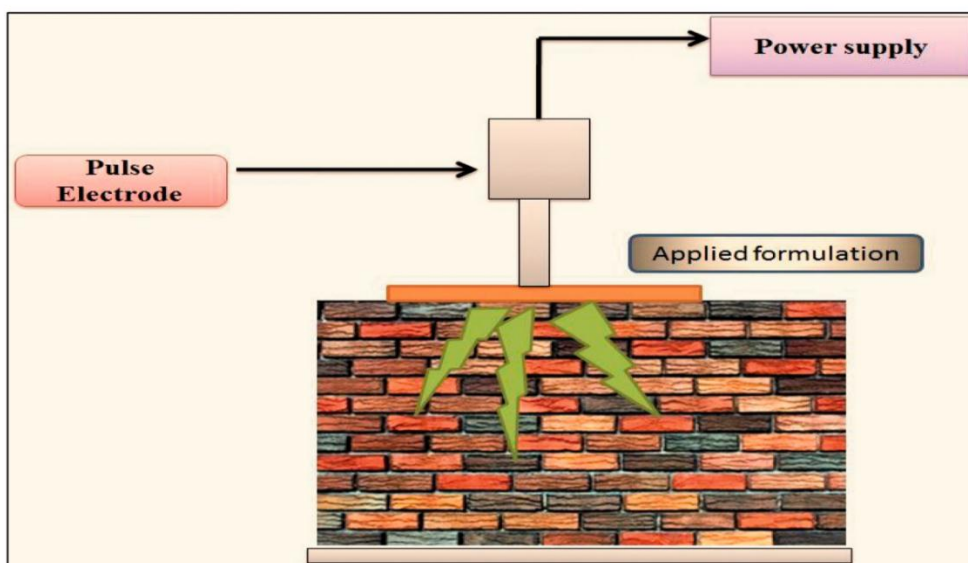
Εικόνα 16. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Ιοντοφόρησης (32)



Εικόνα 17. Συσκευή Ιοντοφόρησης (32)

1.2.4.5 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται επίσης στην εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στο δέρμα. Σε αντίθεση με την ιοντοφόρηση όπου εφαρμόζεται χαμηλή τάση, η ηλεκτροφόρηση απαιτεί εφαρμογή αρκετά υψηλότερης τάσης για σύντομη περίοδο 10 μ s έως 100 ms. Η ηλεκτροφόρηση παράγει παροδικούς υδρόφιλους πόρους (υδατικές διαδρομές) κατά μήκος του φραγμού του δέρματος. Αυτοί οι πόροι επιτρέπουν τη διέλευση των μακρομορίων μέσω ενός συνδυασμού διάχυσης, ηλεκτροφόρησης και ηλεκτροόσμωσης. (34)



Εικόνα 18. Συσκευή Ηλεκτροφόρησης (32)

1.2.4.6 Υπέρηχοι

Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η κίνηση των φαρμακευτικών μορίων διαμέσου του ακεραίου δέρματος υπό την επίδραση υπερήχων. Η τεχνική αυτή προϋποθέτει την εφαρμογή ενός παρασκευάσματος τοπικά και ακολούθως μαλάξεις στην περιοχή εφαρμογής με μια πηγή υπερήχων. Θεωρείται ότι η ενέργεια των υπερήχων, σε χαμηλή συχνότητα (~20 KHz), διαταράσσει την διάταξη των λιπιδίων στην κεράτινη στοιβάδα, λόγω θερμικών, χημικών και φυσικών αλλαγών, και αυξάνει την διέλευση των μορίων από το δέρμα.

Διάφορες μελέτες σχετικά με την χρήση υπερήχων έδειξαν ότι μπορεί να επιτευχθεί η χορήγηση φαρμάκων, όπως φαιντανύλη, καφεΐνη, οιστραδιόλη, αλδοστερόνη, λιδοκαΐνη, τεστοστερόνη, 5-φθοροουρακίλη, αλλά και μεγάλων μορίων, όπως ηπαρίνη και ινσουλίνη. Ωστόσο απομένει να εξετασθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια για τους ασθενείς.

Μέχρι σήμερα για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής απαιτείται νοσοκομειακή περίθαλψη. (39) (40) (41)

1.2.5 Μέθοδοι μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης

Για την εκτίμηση της δερματικής απορρόφησης φαρμάκων έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης νέων σκευασμάτων που πρόκειται να χορηγηθούν μέσω του δέρματος. Αυτές οι μέθοδοι είναι σημαντικά εργαλεία για την

αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ποιότητας των τοπικών και των διαδερμικών σκευασμάτων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της διαδερμικής διαπερατότητας διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις *in vivo* και τις *in vitro* μεθόδους οι οποίες αναλύονται λεπτομερώς παρακάτω.

1.2.5.1 In vivo μέθοδοι εκτίμησης της διαδερμικής διαπερατότητας

Ανάκτηση της ουσίας από την επιφάνεια του δέρματος

Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση για την εύρεση της διαδερμικής απορρόφησης *in vivo* προσδιορίζεται η απώλεια της ουσίας από την επιφάνεια του δέρματος καθώς αυτό διεισδύει στο δέρμα. Η ανάκτηση της δραστικής ουσίας από το δέρμα μετά από εφαρμογή αλοιφής ή διαλύματος είναι πολύ δύσκολη διότι η ολική ανάκτηση της δραστικής από το δέρμα δεν είναι ποτέ σίγουρη. Με τοπική εφαρμογή μιας συσκευής διαδερμικής διαπερατότητας η συνολική ποσότητα (total unit) μπορεί να αφαιρεθεί από το δέρμα και να προσδιοριστεί η ποσότητα του φαρμάκου που παρέμεινε στη συσκευή (residual amount). Θεωρείται ότι η διαφορά μεταξύ της εφαρμοζόμενης δόσης. (42)

Βιολογική / Φαρμακολογική Απόκριση

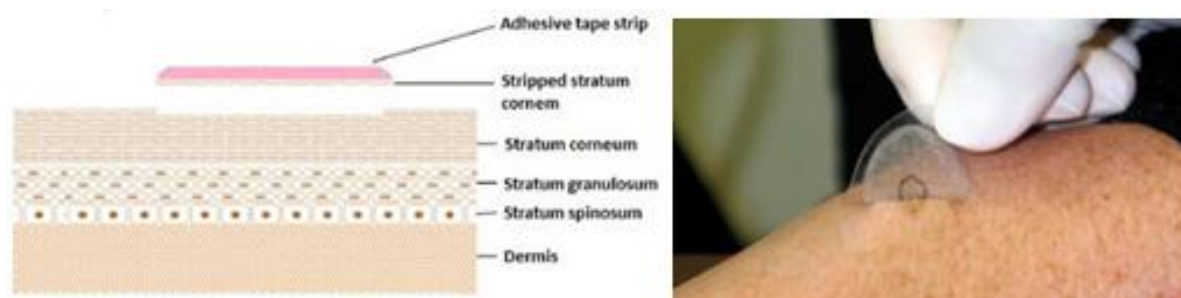
Μία άλλη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την *in vivo* εκτίμηση της διαδερμικής απορρόφησης είναι η παρατήρηση της εμφάνισης βιολογικής /φαρμακολογικής απόκρισης μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου. Ένα προφανές μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας ενώσεων που προκαλούν αποκρίσεις που μπορούν να μετρηθούν εύκολα και με ακρίβεια. Ένα παράδειγμα προσδιορισμού απορρόφησης που θα μπορούσε να γίνει με ακρίβεια χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βιολογικής απόκρισης θα ήταν η δοκιμασία έλεγχου αποτελεσματικότητας μιας αγγειοσυσταλτικής ουσίας όταν το φαινόμενο λεύκανσης που προκαλεί συγκρίνεται με το αντίστοιχο αποτέλεσμα ενός γνωστού αγγειοσυσταλτικού. Αυτή η μέθοδος είναι περισσότερο ποιοτική παρά ποσοτική. Άλλες ποιοτικές μέθοδοι εκτίμησης της διαδερμικής απορρόφησης *in vivo* περιλαμβάνουν αυτοραδιογραφία ολόκληρου του σώματος και φθορισμό. Η αυτοραδιογραφία ολόκληρου του σώματος παρέχει μια συνολική εικόνα της δερματικής απορρόφησης όπου συμμετέχουν και άλλοι ιστοί του σώματος.

Μέτρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε βιολογικά δείγματα

Μετά την εφαρμογή της ουσίας στην επιφάνεια του δέρματος και λαμβάνονται βιολογικά δείγματα και με κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους μετρούνται τα επίπεδά της στο αίμα (ή και σε ιστούς). Η έκταση της απορρόφησης συγκρίνεται με την απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της κατόπιν ενδοφλέβιας χορήγησης. Εναλλακτικά (έμμεση μέθοδος), μπορούν να μετρηθούν τα επίπεδα του φαρμάκου στις εκκρίσεις.

Τεχνική Tape Stripping

Η μέθοδος του tape stripping πραγματοποιείται με διαδοχική αφαίρεση των κυτταρικών στρωμάτων της κεράτινης στιβάδας με εφαρμογή τμημάτων κολλητικής ταινίας. Τα υπολείμματα του σκεύασματος έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί από την επιφάνεια του δέρματος και η ταινία εφαρμόζεται με έντονη πίεση προκειμένου να εξασφαλιστεί η πρόσφυση της στο δέρμα. Αφού προσκολληθεί καλά, αφαιρείται τραβώντας απότομα. Όταν αφαιρεθεί η ταινία, τμήμα της κεράτινης στιβάδας επίσης απομακρύνεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, περίπου 16, για την απομάκρυνση του δέρματος από την περιοχή όπου χορηγήθηκε το σκεύασμα. Η πίεση και η ταχύτητα εφαρμογής θα πρέπει να είναι η ίδια καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας για να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια της ποσότητας της κεράτινης στιβάδας που αποκολλάται. Στη συνέχεια συλλέγονται όλες οι ταινίες από τις ξεχωριστές εφαρμογές και η εκχύλιση του φαρμάκου πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας διαλύτες. Οι διαλύτες επιλέγονται με βάση τη διαλυτότητα του φαρμάκου σε αυτούς. Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρούνται, και το φάρμακο ανακτάται από το υπερκείμενο υγρό. Ακολούθως πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός του φαρμάκου με κάποια αναλυτική τεχνική, συνήθως HPLC. Η τεχνική του tape stripping μπορεί να εφαρμοστεί in vivo σε ζώα ή σε εθελοντές, καθώς είναι ελάχιστα επεμβατική. Ωστόσο εφαρμόζεται και in vitro για αναλύσεις διείσδυσης του φαρμάκου στην κεράτινη στιβάδα (43)



Εικόνα 19. Τεχνική Tape Stripping

Φαρμακοκινητική αξιολόγηση

Σκοπός αυτών των ερευνών είναι να προσδιοριστεί αν επιτυγχάνεται η θεραπευτική δόση του φαρμάκου στο πλάσμα και αν παραμένει σε θεραπευτικά επίπεδα για παρατεταμένο χρονικό διάστημα μετά τη διαδερμική χορήγηση του.

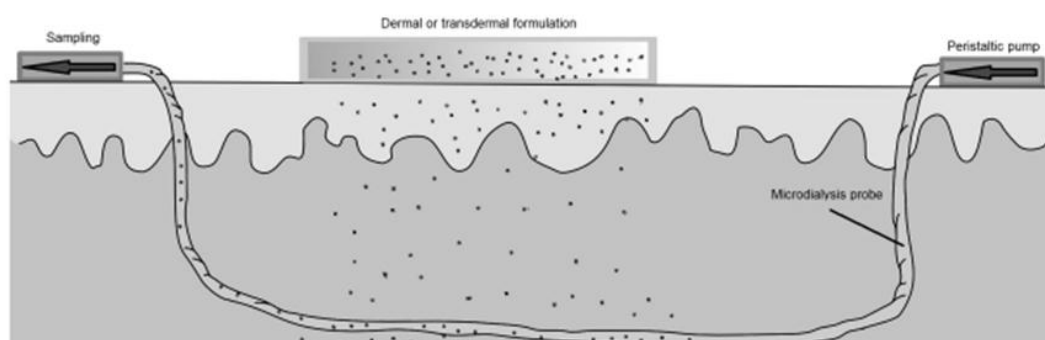
Στις περισσότερες περιπτώσεις η φαρμακοκινητική αξιολόγηση γίνεται με προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο πλάσμα. Για το σκοπό αυτό, δείγματα αίματος συλλέγονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά τη διαδερμική χορήγηση του φαρμάκου. Το πλάσμα διαχωρίζεται αμέσως με φυγοκέντρηση και το φάρμακο εκχυλίζεται και αναλύεται χρησιμοποιώντας κάποια αναλυτική μέθοδο, όπως η HPLC ή η αέρια χρωματογραφία.

Σε πολλές περιπτώσεις, είναι απαραίτητη και η χρήση φασματοφωτομετρίας μάζας σε συνδυασμό με τις χρωματογραφικές τεχνικές. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι προσδιορίζονται από τη γραφική παράσταση των συγκεντρώσεων φαρμάκου στο πλάσμα έναντι του χρόνου. Οι παράμετροι που πρέπει να υπολογιστούν είναι η περιοχή κάτω από την καμπύλη, η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα και ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωση στο μέγιστο. (43)

Μικροδιάλυση

Η μικροδιάλυση μπορεί να θεωρηθεί ως μια ημι-επεμβατική τεχνική κατά την οποία ένας μικρός καθετήρας κατασκευασμένος από ημιπερατή μεμβράνη διαπερνά επιφανειακά το δέρμα και εισάγεται σε καθορισμένα στρώματα δέρματος (επιδερμίδα ή δερμίδα), απευθείας κάτω από το σκεύασμα που περιέχει την ουσία (Εικόνα 10). Το φυσιολογικό διάλυμα (αλατούχο ή διάλυμα Ringer) διοχετεύεται σιγά-σιγά με τη χρήση αντλίας (1-10 μL / λεπτό). Η ουσία που περνά στο υγρό των ιστών διαχέεται προς τον καθετήρα. Τα δείγματα είναι απαλλαγμένα από πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια που δεν μπορούν να περάσουν

την ημιπερατή μεμβράνη λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους. Τελικά, το προϊόν της διαπίδυσης συλλέγεται σε διαφορετικούς χρόνους και το φάρμακο προσδιορίζεται ποσοτικά απευθείας με κάποια αναλυτική μέθοδο, για παράδειγμα, με HPLC. Έτσι, με βάση την αναλογία των συγκεντρώσεων της χορηγούμενης ουσίας στο εσωτερικό και εξωτερικό του καθετήρα και αφού αναλύσουμε το διάλυμα που εξέρχεται από τον καθετήρα ως προς την περιεκτικότητά του σε δραστική ουσία, μπορούμε να λάβουμε ένα μέτρο της διαδερμικής διαπερατότητας ως προς την ουσία αυτή. (43)



Εικόνα 20. Μικροδιάλυση. Το φυσιολογικό διάλυμα που διοχετεύεται στο εσωτερικό του καθετήρα βρίσκεται σε ισορροπία με τα διαχεόμενα μόρια των γύρω ιστών.

Ιστολογικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στον εντοπισμό των οδών διαπέρασης με τη λήψη μικροσκοπικών τομών δέρματος. Αυτό γίνεται με ραδιοεπισήμανση των ουσιών των οποίων μελετούμε την διαπερατότητα. Αυτό επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό και την κατανομή των ουσιών τοπικά, δηλ στην κεράτινη στοιβάδα, στην επιδερμίδα στο κυρίως δέρμα ή στο υποδόριο λίπος. Παρόλα αυτά η χρήση χρωστικών, φθορίζουσών ή ραδιοεπισημασμένων ουσιών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της απορρόφησης εκτός αν τα ίδια τα μόρια είναι χρωστικές ή φθορίζουν, εξαιτίας της συχνής αποσπάσεως των χρωστικών από την εξεταζόμενη ουσία στο επίπεδο της ζώσας επιδερμίδας.

1.2.5.2 *In vitro* μέθοδοι εκτίμησης της διαδερμικής διαπερατότητας

Οι μέθοδοι *in vitro* επιτρέπουν τον ακριβή έλεγχο των πειραματικών μεταβλητών χρησιμοποιώντας τα απλούστερα πρωτόκολλα. Ωστόσο, οι δοκιμασίες *in vitro* δεν μπορούν να αναπαράγουν πλήρως την πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων και το βέλτιστο

θα ήταν να πραγματοποιούνται *in vivo* αξιολογήσεις για την επικύρωση των αποτελεσμάτων. Παρ'όλα αυτά, οι μέθοδοι *in vitro* είναι βασικά εργαλεία για την ανάπτυξη και τη διαλογή (screening) σκευασμάτων που πρόκειται να χορηγηθούν τοπικά ή διαδερμικά.

Κύτταρα διάχυσης

Τα κύτταρα διάχυσης είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες πειραματικές συσκευές για την εκτίμηση της απελευθέρωσης και της διείσδυσης στο δέρμα φαρμάκων ενσωματωμένων σε τοπικά και διαδερμικά συστήματα χορήγησης. Ο κύριος στόχος των πειραμάτων με κύτταρα διάχυσης έγκειται στον εντοπισμό των κύριων μεταβλητών που επηρεάζουν το σχεδιασμό της διαμόρφωσης (πχ επιλογή του φορέα, συγκέντρωση φαρμάκου) και μπορούν να μεταβάλουν την *in vivo* βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου.

Τα κύτταρα διάχυσης διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα στατικής και συνεχούς ροής κύτταρα. Τα στατικής ροής κύτταρα μπορούν να έχουν οριζόντιο ή κάθετο σχεδιασμό. Τα πλεονεκτήματα των στατικής ροής κυττάρων (στα οποία ανήκουν και τα κύτταρα Franz) είναι ότι επιτρέπουν τον καλό έλεγχο των συνθηκών του πειράματος και προσφέρουν καλή επαναληψιμότητα. Στα μειονεκτήματα ανήκει η τακτική ανανέωση του διαλύματος υποδοχέα από τον ερευνητή. Τα πλεονεκτήματα των συνεχούς ροής κυττάρων είναι η διεξαγωγή πειραμάτων άπειρης και πεπερασμένης δόσης, η αυτοματοποίηση συστήματος δειγματοληψίας, η ομοιομορφία των δειγμάτων και η ανανέωση του receptor phase αυτόματα μέσω αντλίας. Στα μειονεκτήματα ανήκει η αργή και ανομοιογενής ανάμιξη του receptor λόγω μεγάλου όγκου. Το κύτταρο διάχυσης του Franz αποτελεί τη συνηθέστερη μέθοδο μέτρησης της *in vitro* διαπερατότητας λόγω του χαμηλού κόστους και επειδή αποτελεί μη χρονοβόρα και επαναλήψιμη μέθοδο.

Τα κοινά χαρακτηριστικά τους είναι ότι όλα τα κύτταρα αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα δέκτη και το διαμέρισμα δότη, τα οποία διαχωρίζονται από μια μεμβράνη δέρματος. Επίσης, σε όλες τις μεθόδους διασφαλίζεται η διατήρηση σταθερών συνθηκών θερμοκρασίας, με τη βύθιση κατά το ήμισυ των κυττάρων σε θερμαινόμενα υδατόλουτρα.

Όπως αναφλερθηκε ,η βασική διαμόρφωση ενός κυττάρου διάχυσης αποτελείται από δύο διαμερίσματα:

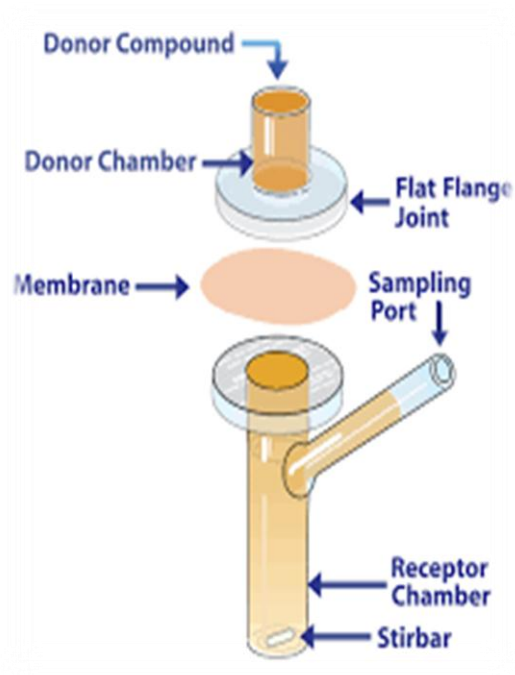
α) το διαμέρισμα του δότη, όπου εφαρμόζεται το σκεύασμα του υπο μελέτη φαρμάκου πάνω σε μια ημιδιαπερατή μεμβράνη

β) το διαμέρισμα του δέκτη, όπου συγκεντρώνεται το φάρμακο που διαπερνά τη μεμβράνη. Ανα τακτά χρονικά διαστήματα αφαιρούνται δείγματα από το διαμέρισμα του δέκτη για ποσοτική ανάλυση του φαρμάκου.

Πιο λεπτομεριακά, το σκευάσμα που εφαρμόζεται στο διαμέρισμα του δέκτη μπορεί να είναι διάλυμα, κάποια ημιστερεή φαρμακοτεχνική μορφή όπως γέλη ή κρέμα ή διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα. Η δόση του φαρμάκου μπορεί να είναι πεπερασμένη (finite dose) ή άπειρη (infinite dose). Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται στην τοπική χορήγηση φαρμάκων, όπου το φάρμακο εφαρμόζεται τοπικά.

Στο διαμέρισμα του δέκτη τοποθετείται το διάλυμα του υποδοχέα (receptor phase), το οποίο ουσιαστικά αντιπροσωπεύει τη συστηματική κυκλοφορία του σώματος. Για να πραγματοποιηθεί σωστά η πειραματική αξιολόγηση της δερματικής διαπερατότητας, το διάλυμα του υποδοχέα θα πρέπει να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία και υπό διαρκή μαγνητική ανάδευση, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ομοιογενής κατανομή του φαρμάκου, να αποφευχθεί η τοπικά αυξημένη συγκέντρωση και να διατηρούνται οι συνθήκες δεξαμενής. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού σημαντικό ρόλο παίζει και η σύνθεση του διαλύματος του υποδοχέα θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να εξασφαλίζονται οι συνθήκες δεξαμενής. Δηλαδή θα πρέπει να έχει αρκετά μεγάλη ικανότητα διάλυσης της διαχεόμενης δραστικής ουσίας ώστε η συγκέντρωσή της στο διάλυμα του υποδοχέα μετά από διάχυση να μην ξεπερνάει ποτέ το 10% της συγκέντρωσης κορεσμού της ουσίας στο εν λόγω διάλυμα. Η διατήρηση συνθηκών δεξαμενής είναι μια βασική προϋπόθεση που πρέπει να τηρείται ώστε να εξασφαλιστεί ότι η συγκέντρωση του φαρμάκου στο μέσο υποδοχέα δεν περιορίζει το ρυθμό διείσδυσης. Τα συνιστώμενα διαλύματα υποδοχέα είναι υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα διότι προσωμοιάζουν με το φυσιολογικό περιβάλλον του ανθρώπου.

Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η χρήση προσθέτων στο μέσο υποδοχέα για την αύξηση της διαλυτότητας του φαρμάκου, αλλά αυτά τα πρόσθετα δεν πρέπει να θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα της μεμβράνης ή να μεταβάλουν τη διαπερατότητα του φαρμάκου. Μερικά από τα πρόσθετα που μπορούν να ενσωματωθούν είναι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. Tween 80), λευκωματίνη βόειου ορού, πολυαιθυλένογλυκόλη και αιθανόλη. Επιπλέον, για την πρόληψη της μικροβιολογικής ανάπτυξης στο μέσο, μπορούν να προστεθούν συντηρητικά, όπως γενταμικίνη, αζίδιο του νατρίου (0,02% -0,05%), φορμαλδεΰδη (0,1%). (43)



Εικόνα 21. Τυπικό κύτταρο διάχυσης

Μεμβράνη

Μεταξύ των δύο διαμερισμών των κυττάρων διάχυσης τοποθετείται μια μεμβράνη η οποία ουσιαστικά αντιπροσωπεύει το φραγμό της κεράτινης στιβάδας του δέρματος κατά τη χορήγηση τοπικών ή διαδερμικών σκευασμάτων. Η μεμβράνη αυτή μπορεί να είναι δέρμα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης ή τεχνητή μεμβράνη. Το δέρμα αυτό μπορεί να είναι πλήρους πάχους (full thickness) δηλαδή επιδερμίδα και χόριο, ή διαιρεμένου πάχους (split thickness), που προέρχεται από πλήρες δέρμα με θερμική, χημική ή ενδημική επεξεργασία και περιλαμβάνει μόνο επιδερμικούς ιστούς. Η χρήση δέρματος διαιρεμένου πάχους πλεονεκτεί διότι τυποποιεί το πάχος του δέρματος και αυτό είναι σταθερό από πείραμα σε πείραμα ενώ ταυτόχρονα αντανάκλα ακριβώς το φραγμό από άποψη πάχους. Ωστόσο η χρήση του έχει συσχετιστεί με αυξημένες διαπερατότητες στο δέρμα μέσω της οδού των πόρων λόγω του ανοίγματος του πυθμένα των πόρων κατά την επεξεργασία του δέρματος. Από την άλλη πλευρά, όταν χρησιμοποιείται ολόκληρο το δέρμα, το στρώμα της δερμίδας μπορεί να πάρει νερό λόγω οιδήματος αυτού του στρώματος. Σε αυτή την περίπτωση, η διάχυση του φαρμάκου μειώνεται και μπορεί να αυξηθεί η κατακράτηση του φαρμάκου στη δερμίδα. Το πιο αντιπροσωπευτικό μοντέλο για την in vitro αξιολόγηση της δερματικής απορρόφησης των φαρμάκων είναι η χρήση ανθρώπινου δέρματος που προέρχεται από

πλαστικές χειρουργικές επεμβάσεις. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί δέρμα από πλάτη, κοιλιακή χώρα ή μηρούς. Ωστόσο, η διαθεσιμότητα του ανθρώπινου δέρματος είναι περιορισμένη και συχνά χρησιμοποιούνται ζωικά μοντέλα. Η χρήση ζωικού δέρματος συνιστάται για προκαταρκτικές αξιολογήσεις νέων συνθέσεων. Ζωα των οποίων το δέρμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αντικατάσταση του ανθρώπινου είναι οικιακοί χοίροι, αρουραίοι (άτριχοι), ποντικοί, ινδικά χοιρίδια και φίδια. Ωστόσο, η εκτίμηση της διαπερατότητας των ουσιών μέσω ζωικού δέρματος δεν αντιπροσωπεύει την απορρόφηση μέσω του ανθρώπινου. Ανατομικές διαφορές, όπως η τριχοφυΐα, η διαφορά στο πάχος, ο βαθμός κερατινοποίησης του δέρματος διαφοροποιούν κατά πολύ τα αποτελέσματα, καθώς το δέρμα των ζώων είναι πιο διαπερατό από το ανθρώπινο. Πλησιέστερο στο ανθρώπινο είναι το δέρμα του χοίρου, ιδίως το προερχόμενο από τα αυτιά. Μελέτες που εξετάζουν το πάχος των διαφόρων επιφανειών του δέρματος έχουν δείξει ότι το δέρμα αυτιού χοίρου έχει πάχος παρόμοιο με αυτό του ανθρώπινου δέρματος (κεράτινη στιβάδα και επιδερμίδα). Η δομή των πόρων, η αγγειακή ανατομία και τη διάταξη των ινών κολλαγόνου στο χόριο του αυτιού των χοίρων, φαίνεται πως είναι παρόμοια με εκείνα του ανθρώπινου δέρματος.

Πέρα από το ανθρώπινο και το ζωικό δέρμα, κατά την *in vitro* αξιολόγηση διαδερμικής διαπερατότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τεχνητές μεμβράνες. Οι τεχνητές μεμβράνες κατασκευάζονται από υλικά όπως οξική κυτταρίνη πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (Silastic®), πολυουρεθάνη, ή από μυριστικό ισοπροπυλεστέρα προσροφημένο σε μεμβρανώδη φίλτρα (υγρές μεμβράνες). Οι μεμβράνες αυτές είναι ομοιογενείς και δεν παρουσιάζουν ιστολογικά καμία ομοιότητα με το πολύστοιβο και ετερογενές ανθρώπινο δέρμα. Ωστόσο η χρήση τους πλεονεκτεί σε ό,τι αφορά την ομοιομορφία τους, σε αντίθεση με το ανθρώπινο δέρμα το οποίο διαφέρει από δότη σε δότη. Έτσι, ενώ τα αποτελέσματά με αυτές τις μεμβράνες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την ανάπτυξη κι αξιολόγηση ενός ΔΘΣ, είναι χρήσιμα για τον έλεγχο ομοιομορφίας από παρτίδα σε παρτίδα.

Μια άλλη κατηγορία τεχνητών μεμβρανών είναι τα ανάλογα ανθρωπίνου δέρματος. Πρόκειται για καλλιέργειες κερατινοκυττάρων με επαρκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Παραδείγματα είναι τα TestSkin®, EpiDerm® και Episkin®.

Το κύριο μειονέκτημα των παραπάνω μεμβρανών είναι ότι δεν έχουν καμία ιστολογική ομοιότητα με αυτή του ανθρωπίνου δέρματος. Σε αυτές τις μεμβράνες δεν υπάρχει η διπλοστιβάδα η οποία να βρίσκεται διαεσπαρμένη στην πρωτεϊνική περιοχή, όπως υπάρχει στο ανθρώπινο δέρμα. Από την άλλη, οι μεμβράνες αυτές είναι ιδιαίτερα αναπαραγωγίμες

και δεν κατέχουν την βιολογική ποικιλομορφία που συναντάται στις ζωϊκές και ανθρώπινες μεμβράνες (43) (44)

1.2.6 Κριτήρια επιλογής κατάλληλου φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση

Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η διαδερμική χορήγηση φαρμάκων σε σχέση με τις υπόλοιπες οδούς χορήγησης και παρά τις μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαπερατότητα φαρμάκων που προρίζονται να χορηγηθούν διαδερμικά, η διαδερμική οδός χορήγησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περιορισμένο αριθμό φαρμάκων.

Αυτό συμβαίνει διότι δεν πληρούν όλα τα φάρμακα τις κατάλληλες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες ώστε να διαπεράσουν το δέρμα σε ποσότητα τέτοια ώστε να επιφέρουν το επιθυμητό φαρμακολογικό αποτέλεσμα.

Έτσι τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός φαρμάκου που προορίζεται να μορφοποιηθεί σε σύστημα διαδερμικής χορήγησης είναι τα εξής :

1. Μικρή απαιτούμενη ημερήσια δόση (<40 mg)
2. Μικρός χρόνος ημιζωής (<10 ώρες)
3. Μικρό μοριακό βάρος (<500 Da)
4. Μικρό σημείο τήξεως (<200°C)
5. Ικανοποιητική διαλυτότητα τόσο στο νερό όσο και στα λίπη (συντελεστής κατανομής σε σύστημα οκτανόλης / νερού, δηλαδή $\log P_{o/w}$ μεταξύ 1 και 4)
6. Το pH του κορεσμένου υδατικού διαλύματος είναι καλό να είναι μεταξύ 5 και 9
7. Ο συντελεστής διαπερατότητας του δέρματος να είναι μεγαλύτερος από $0.5 \times 10^{-3} \text{ cm/h}$

Επιπλέον για να κριθεί η καταλληλότητα ενός φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και βιολογικοί παράγοντες όπως είναι ο ερεθισμός του δέρματος και η περιοχή εφαρμογής του εμπλάστρου. Είναι προφανές ότι το φάρμακο δεν πρέπει να προκαλεί ερεθισμό ή τοξικότητα στο δέρμα. Ακόμη όταν ένα φάρμακο

χορηγείται διαδερμικά με τη βοήθεια εμπλάστρου υπάρχει κίνδυνος να παρουσιαστούν αλλεργικές αντιδράσεις γι' αυτό και θα πρέπει να έχουν καθοριστεί όρια για την αποδοχή του ανεπιθύμητου αποτελέσματος

Τέλος ,οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες μιας δραστικής ουσίας αποτελούν έναν κρίσιμο παράγοντα που καθορίζει την καταλληλότητά της για χορήγηση μέσω της διαδερμικής οδού καθώς η οδός αυτή είναι κατάλληλη μόνο για φάρμακα των οποίων η ημερήσια δόση είναι λίγα χιλιοστόγραμμα. Η προκύπτουσα συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο πλάσμα εξαρτάται από την κάθαρση. Ωστόσο, αν υποθέσουμε έναν μικρό όγκο κατανομής και ένα σχετικά μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, η πιθανότητα να επιτευχθεί συγκέντρωση στο πλάσμα που υπερβαίνει τα λίγα μικρογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο είναι πολύ μικρή. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι ο χρόνος ημιζωής που παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη διάθεση ενός φαρμάκου στο σώμα. Άλλες παραμέτροι όπως η επίτευξη αποτελεσματικής συγκέντρωσης στο πλάσμα καθορίζουν επίσης εάν μία ουσία μπορεί να χορηγηθεί διαδερμικά. Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας με όλες τους παράγοντες που καθορίζουν την καταλληλότητα ενός φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση.

Φυσικοχημικοί Παράγοντες	Φαρμακοκινητικοί Παράγοντες	Βιολογικοί Παράγοντες
Διαλυτότητα	Χρόνος ημίσειας ζωής	Τοξικότητα στο δέρμα
Κρυσταλλικότητα	Όγκος κατανομής	Περιοχή εφαρμογής
Μοριακό Βάρος	Ολική κάθαρση	Αλλεργικές Αντιδράσεις
Πολικότητα	Θεραπευτική δόση στο πλάσμα	Μεταβολισμός στο δέρμα
Σημείο Τήξης	Βιοδιαθεσιμότητα	Διαδερμική διαπερατότητα

Πίνακας 2. παράγοντες που καθορίζουν την καταλληλότητα ενός φαρμάκου για διαδερμική χορήγηση.

1.3 Φλεγμονή Επαγόμενη από UV ακτινοβολία

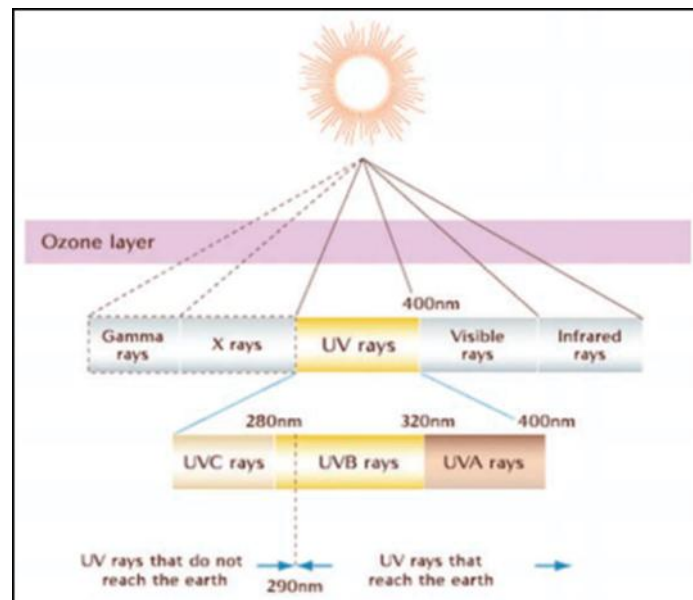
1.3.1 Υπεριώδης ακτινοβολία

Το ηλιακό φως αποτελείται από ένα συνεχές φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας το οποίο χωρίζεται σε τρεις κύριες περιοχές μήκους κύματος (Σχήμα 1): υπεριώδης (UV), ορατή και υπέρυθρη. Η ακτινοβολία UV περιλαμβάνει τα μήκη κύματος από 200 έως 400 nm και εύρος μήκους κύματος μόλις μικρότερο από αυτό του ορατού φωτός (400-700 nm). Η υπεριώδης ακτινοβολία διαιρείται περαιτέρω σε τρία τμήματα, καθένα από τα οποία έχει ξεχωριστές βιολογικές επιδράσεις: Τα τμήματα αυτά είναι τα εξής:

UVA (320-400 nm)

UVB (280-320 nm) και

UVC (200-280 nm).



Εικόνα 22. Φάσμα UV της Ηλιακής Ακτινοβολίας

Οι περιοχές αυτές έχουν πολύ διαφορετικές φυσικές ιδιότητες και πιθανότητες πρόκλησης βιολογικής ζημίας. Το UVC εμποδίζεται ουσιαστικά να φθάσει στην επιφάνεια της γης από τη στιβάδα στρατοσφαιρικού όζοντος, αν και μπορεί να προκύψει τυχαία έκθεση από τεχνητές πηγές, όπως μικροβιοκτόνες λάμπες. Τόσο η ακτινοβολία UVA όσο και η UVB φθάνουν στην επιφάνεια της Γης σε ποσότητες επαρκείς ώστε να έχουν σημαντικές βιολογικές συνέπειες για το δέρμα και τα μάτια.

1.3.2 Επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα

Όταν οι υπεριώδεις ακτίνες είναι σε μικρές ποσότητες, ασκούν ευεργετική επίδραση στο δέρμα συμβάλλοντας στην άμυνά του έναντι της ίδιας της υπεριώδους ακτινοβολίας, μέσω της πάχυνσης της κεράτινης στιβάδας και της μελάγχρωσης του δέρματος. Επιπλέον η UVB ακτινοβολία συμβάλλει στη μετατροπή των προβιταμινών της βιταμίνης D στην κύρια μορφή τους. Η βιταμίνη D συμβάλλει στην απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου από τον οργανισμό αλλά και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα η UV ακτινοβολία έχει θετική επίδραση στον οργανισμό καθώς συμβάλλει στην βελτίωση πολλών δερματικών παθήσεων όπως η ψωρίαση, η λέυκη, ο ομαλός λειχήνας κ.α (45)

Εντούτοις, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να έχει πολλαπλές αρνητικές συνέπειες για την υγεία και ιδιαιτέρως για το δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, η UVB αποτελεί το 0,1% της ηλιακής ακτινοβολίας, διαπερνά την κεράτινη στιβάδα και φθάνει μέχρι και την επιδερμίδα. Μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα, έγκαυμα, καταστροφή του DNA, έμμεση μελάγχρωση, πρόωρη γήρανση και καρκίνο του δέρματος. Επίσης είναι υπεύθυνη για ανοσοκαταστολή, φωτοδυναμικές αντιδράσεις, φωτοδερματίδες και υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων. (46)

Η UVB καταστρέφει απευθείας το DNA και το RNA με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών, οδηγώντας στο σχηματισμό μιτογόνων φωτοπροϊόντων όπως διμερή κυκλοπυριμιδινών (TT) και πυριμιδίνης-πυριμιδίνης. (46)

Η UVA αποτελεί το 4,9% της ηλιακής ακτινοβολίας και φθάνει μέχρι και το χόριο προκαλώντας πρόωρη γήρανση με καταστροφή του κολλαγόνου, απώλεια ελαστικότητας, άμεση μελάγχρωση και ανοσοκαταστολή. Επίσης είναι υπεύθυνη για φωτοκαρκινογένεση και φωτοδερματίδες Η UVA έχει κατά 1000 φορές λιγότερο μιτογόνο δράση από τη UVB και οι βλάβες που προκαλεί στο DNA δεν είναι τόσο άμεσες όσο έμμεσες μέσω φωτο-οξειδωτικού στρες, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου- ROS. (47).

Από τις βλαπτικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας που αναφέρθηκαν προηγουμένως , άλλες εμφανίζονται ευθύς αμέσως μετά την έκθεση στον ήλιο, και άλλες είναι αποτέλεσμα της αθροιστικής επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας, και εμφανίζονται έπειτα από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αυτήν. Έτσι ανάλογα με τον χρόνο εμφάνισης τους διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. (48) (49)

1.3.2.1 Οξείες

Οι κύριες οξείες κλινικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας σε φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα περιλαμβάνουν το ηλιακό έγκαυμα (ερύθημα), φωτοδερματοποάθειες και την φωτοευαισθησία.

Ηλιακό Ερύθημα

Το ερύθημα που προκαλείται από την έκθεση του δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία είναι η πιο εμφανής και καλά αναγνωρισμένη οξεία δερματική απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε άτομα με λευκό δέρμα. Η ερυθρότητα του δέρματος που είναι χαρακτηριστική του ερυθήματος οφείλεται σε αυξημένη περιεκτικότητα αίματος λόγω διαστολής των επιφανειακών αιμοφόρων αγγείων και κυρίως των υποαπορροφητικών φλεβιδίων (Rothman 1954). Εν γένει, η απόκριση του δέρματος του κάθε ατόμου στην εμφάνιση ερυθήματος ποικίλει και μπορεί να προσδιοριστεί γενετικά. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ένας πολυμορφισμός στον υποδοχέα της ορμόνης διέγερσης μελανοκυττάρων (MSM) (Valverde et al., 1995), αν και είναι πιθανό να εμπλέκονται και άλλα γονίδια. Υπεύθυνη για την εμφάνιση ερυθήματος είναι κυρίως η UVB ακτινοβολία. (49) (48)

Ηλιακό Έγκαυμα

Όταν συνεχιστεί η έκθεση στον ήλιο, το ερύθημα εξελίσσεται σε έγκαυμα. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερες δόσεις UVB ακτινοβολίας μπορεί να οδηγήσουν σε οίδημα, πόνο και φλύκταινες (Magnus 1976). Το φυσικό ηλιακό έγκαυμα έχει λανθάνουσα περίοδο μερικών ωρών και εφόσον εμφανιστεί, μπορεί να παραμείνει για αρκετές ώρες ή ακόμα και για μέρες. Η έκταση του εγκαύματος που προκαλείται από τεχνητές πηγές εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Στα 300 nm η ελάχιστη ερυθματώδης δόση (MED) σε λευκό δέρμα βρίσκεται περίπου στα 10-20 mJ /cm² ενώ για την UVA ακτινοβολία το MED είναι περίπου χίλιες φορές υψηλότερο.

Φωτοδερματοπάθειες

Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί σε ορισμένα άτομα την εμφάνιση φωτοδερματοπαθειών. Πρόκειται για παθήσεις του δέρματος που οφείλονται σε φωτοχημικές ή φωτοβιολογικές αντιδράσεις στα κύτταρα που προκαλούνται από τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα του φωτός. Οι φωτοδερματοπάθειες διακρίνονται σε

ανοσοδιαμεσολαβούμενες (ιδιοπαθείς) όπως είναι το πολύμορφο εξάνθημα (PLE), η ηλιακή κνίδωση, η χρόνια ακτινική δερματίτιδα και σε προκαλούμενες από φάρμακα ή χημικές ουσίες όπως είναι η φωτοτοξικότητα και η φωτοαλλεργία. Επιπλέον το φως μπορεί να επιδεινώσει άλλα νοσήματα όπως είναι ο ερυθηματώδης λύκος, η ατοπική δερματίτιδα, το πολύμορφο ερύθημα κ.α

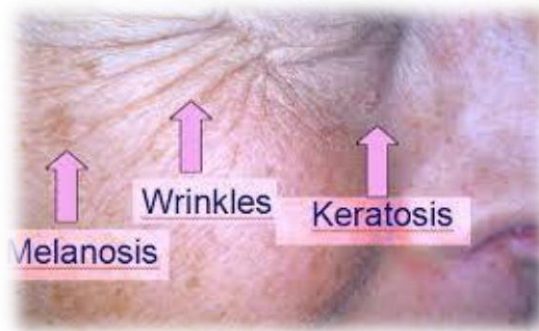
Φωτοευαισθητοποίηση

Η ηλιακή ακτινοβολία ενοχοποιείται για την πρόκληση φωτοδερματίτιδας σε άτομα που παίρνουν συγχρόνως ορισμένα φάρμακα. Φωτοδερματίτιδες είναι οι δερματίτιδες που προκαλούνται από την συνδυαστική επίδραση στο δέρμα εξωγενώς χορηγούμενων φαρμάκων / χημικών ουσιών και της ηλιακής ακτινοβολίας. Τέτοια φάρμακα είναι οι τετρακυκλίνες, η ιμιπραμίνη, η γκριζεοφουλβίνη κ.α

1.3.2.2 Χρόνιες

Φωτογήρανση

Η φωτογήρανση του δέρματος είναι μια από τις κυριότερες εκδηλώσεις της χρόνιας έκθεσης στον ήλιο. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ξηρότητα, τραχύτητα, ακανόνιστη χρώση [(φακίδες, επίπεδες επιφάνειες αυξημένου χρωματισμού (πανάδες)], ρυτίδωση, ελάττωση και τελαγγειεκτασία που είναι η διαστολή προϋπάρχοντων αιμοφόρων αγγείων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών εστιακών ερυθρών βλαβών. Αυτά τα χαρακτηριστικά παρατηρούνται κατά κύριο λόγο σε λευκά δέρματα με ιστορικό εκτεταμένης παρελθοντικής έκθεσης στον ήλιο και συνήθως περιλαμβάνουν το πρόσωπο, το λαιμό ή την εξωτερική επιφάνεια των άνω άκρων. Αν και τα φωτόνια UVB είναι πολύ πιο ενεργητικά από τα φωτόνια UVA και είναι ως επί το πλείστον υπεύθυνα για το ηλιακό έγκαυμα και τη φωτοκαρκινογένεση, η UVA φαίνεται πως επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φωτογήρανση. Η UVA επάγει το σχηματισμό αντιδραστικών ειδών οξυγόνου που αντιδρούν εύκολα με τα μεμβρανικά λιπίδια και αμινοξέα και τα καταστρέφουν. Η επίδραση αυτή της UVA ακτινοβολίας υποδεικνύει ότι η συχνή περιστασιακή έκθεση στο ηλιακό φως, με αντηλιακό που απορροφά μόνο UVB, μπορεί τελικά να οδηγήσει σε βλάβη στο δερματικό κολλαγόνο και την ελαστίνη με τρόπους που αναμένεται να προκαλέσουν φωτογήρανση. (48)



Εικόνα 23. Σημεία Φωτογήρανσης

Φωτοκαρκινογένεση

Η καρκινογένεση θεωρείται συνήθως ως διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει την έναρξη, την προώθηση και την εξέλιξη. Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί μεταλλάξεις και αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι επομένως σε θέση να προκαλέσει καρκίνο του δέρματος χωρίς να υπάρχουν επιπρόσθετοι εκκινητές ή προαγωγοί και επομένως ονομάζεται «πλήρης καρκινογόνος ουσία». Τόσο η UVA όσο και η UVB ακτινοβολία δρουν ως καρκινογόνοι παράγοντες, όμως η πρώτη είναι πιο ασθενής αφού δεν αποτελεί τόσο δραστικό παράγοντα έναρξης. Η UV προκαλεί βλάβες στο DNA, αφού με τη παραγωγή φωτοπροϊόντων του δημιουργείται καταρράκτης σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα φωτοπροϊόντα αλλάζουν τη δομή του DNA που ενεργοποιούν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA. Οι βιολογικές βλάβες λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλούνται όταν θα δημιουργηθούν λάθη στην επιδιόρθωση του DNA με αποτέλεσμα ογκογόνες μεταλλάξεις. Με την επίδραση της UV ακτινοβολίας σχηματίζονται διμερή θυμίνης και διμερή κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης (CPD) που είναι το πρώτο βήμα για την επαγωγή ανοσοκαταστολής και την έναρξη της φωτοκαρκινογένεσης.

Οφθαλμικές βλάβες

Η υπεριώδης ακτινοβολία δύναται να προκαλέσει βλάβη στους οφθαλμούς, η οποία είναι αθροιστική. Το ανθρώπινο μάτι δεν έχει την ικανότητα να αφομοιώσει την υπεριώδη ακτινοβολία παράγοντας μελανίνη, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ευπαθές. Μπορεί να προκληθεί φωτοκερατίτιδα, που είναι έγκαυμα του οφθαλμού και προδιαθέτει σε επιπλοκές αργότερα στη ζωή. Στις χρόνιες συνέπειες περιλαμβάνονται ο καταρράκτης, το πτερύγιο και η κερατοπάθεια

1.3.3 . Φλεγμονή από UV ακτινοβολία

Η φλεγμονή είναι η κυριότερη οξεία κλινική επίδραση της UV ακτινοβολίας στο φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα. Κατά την πρόσπτωσή της πάνω στον δέρμα, η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να σκεδαστεί, να ανακλαστεί ή να απορροφηθεί. Μόνο το απορροφούμενο φως μπορεί να προκαλέσει κάποια χημική μεταβολή στα απορροφόντα μόρια τα οποία ονομάζονται χρωμοφόρα. Το άθροισμα των φωτοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν όταν φως αλληλεπιδρά με τα χρωμοφόρα που υπάρχουν στο δέρμα προκαλεί μία σειρά από βιοχημικές και ανοσολογικές διαταραχές που προκαλούν φλεγμονή. Επειδή διαφορετικά μήκη κύματος φωτός μπορεί να απορροφώνται από διαφορετικά χρωμοφόρα, η έκταση της φλεγμονής που εμφανίζεται μετά την έκθεση σε ακτινοβολία διαφορετικών μηκών κύματος αλλάζει. Πιο συγκεκριμένα τα μικρότερα μήκη κύματος (μικρότερα από 300 nm) δρουν στα νουκλεϊνικά οξέα, αμινοξέα και στο ουροκανικό οξύ ενώ η μελανίνη είναι το χρωμοφόρο που επηρεάζεται από σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (350-1200 nm). Επιπλέον, η ποσότητα και η θέση των χρωμοφώρων στο δέρμα, καθώς και οι μεταβολές του επιδερμικού πάχους, καθορίζουν το βαθμό απορρόφησης της UV ακτινοβολίας

Όπως προαναφέρθηκε, η απορροφόμενη υπεριώδης ακτινοβολία εκκινεί και ενεργοποιεί μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων στο ανθρώπινο δέρμα.

Σε κυτταρικό επίπεδο η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί την παραγωγή φλεγμονώδων κυτοκινών, προσταγλανδινών και ενισχύει την παραγωγή μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος που είναι οι κυριότεροι παράγοντες που συμμετέχουν στη φλεγμονή.

Ακόμη η UV ακτινοβολία διεγείρει την παραγωγή μορίων προσκόλλησης και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως ισταμίνη και λευκοτριένια καθώς και την επιφανειακή έκφραση μορίων προσκόλλησης. Οι προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές αυξάνουν τη διαπερατότητα των τριχοειδών που οδηγούν σε διείσδυση και ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και άλλων φαγοκυτταρικών κυττάρων στο δέρμα. Το καθαρό αποτέλεσμα όλων αυτών των επιδράσεων είναι η φλεγμονή.

Επίσης η UV ακτινοβολία διεγείρει την πρόκληση φλεγμονής μέσω της φωτοχημικής παραγωγής ενεργοποιημένων μορφών οξυγόνου. Πιο αναλυτικά η UV ακτινοβολία δημιουργεί ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν αποδιοργάνωση των κυτταρικών διεργασιών, υπεροξειδωση των λιπιδίων, διάσπαση του

DNA, αλλοίωση της ενζυμικής δραστηριότητας πολλών ενζύμων, πολυμερισμό πολυσακχαριτών και τέλος κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση της μεμβράνης που συμβάλλει στην αύξηση της φωσφολιπάσης A2,δραστηριότητα που οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη παραγωγή προσταγλανδινών. Επειδή τα προϊόντα αυτά, δηλαδή οι ενεργές μορφές οξυγόνου παράγονται επίσης φυσιολογικά σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες το κύτταρο έχει αρκετούς μηχανισμούς για την απομάκρυνσή τους. Ωστόσο, σε περιπτώσεις εκτεταμένης έκθεσης σε UV ακτινοβολία προκαλείται φλεγμονή λόγω της εξάντλησης των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων και της περιορισμένης κυτταρικής ικανότητας να καταστείλει τις ρίζες οξυγόνου. (50)

Οι ιστολογικές μεταβολές μετά από οξεία έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία περιλαμβάνουν πάχυνση της κεράτινης στιβάδας, της επιδερμίδας και της δερμίδας , διακυτταρικό και περιαγγειακό οίδημα (edema) στο χόριο, ενδοθηλιακή διόγκωση, αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων καθώς επίσης και κυτταρική διήθηση από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα τόσο στην επιδερμίδα όσο και στη δερμίδα. Επιπλέον παρατηρείται βλάβη των επιδερμικών κερατινοκυττάρων, εξάντληση των κυττάρων Langerhans. (49) (48) (51)

1.3.4 Καταπολέμηση φλεγμονής επαγόμενης από UV ακτινοβολία

Για την αντιμετώπιση της οξείας φλεγμονής που προκαλείται μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία ,μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε αντιοξειδωτικοί είτε αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η θεραπευτική επίδραση των παραγόντων αυτών αναλύεται εκτενώς παρακάτω:

Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Τα τοπικά αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και συνεπώς και τις επακόλουθες φλεγμονώδεις αντιδράσεις στις οποίες αυτά εμπλέκονται. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να παραχθούν είτε κατά τη φυσιολογική διαδικασία του μεταβολισμού,είτε από τη μη-ενζυματική μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου που προκαλείται από την επίδραση της UV ακτινοβολίας . Ενδογενώς ο οργανισμός είναι εφοδιασμένος με ένα ειδικό δίκτυο ενζύμων που είναι υπεύθυνο για την καταστολή των ROS και τη μετατροπή τους σε αβλαβές νερό και μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο με την πάροδο των ετών η ενδογενής αντιοξειδωτική δράση του οργανισμού εξασθενεί τόσο λόγω της μείωσης των

αντιοξειδωτικών ενζύμων όσο και λόγω της μείωσης των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών.

Έτσι προτάθηκε ότι η προσθήκη εξωγενών αντιοξειδωτικών παραγόντων θα μπορούσε να μειώσει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις που προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία. Η τοπική εφαρμογή αρκετών βιολογικά σημαντικών αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη Ε, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή έχουν αποδειχθεί ότι παρέχουν φωτοπροστασία από τη UV επαγόμενη φλεγμονή. Επιπλέον, μια ποικιλία αντιοξειδωτικών φυτικής προέλευσης φαίνεται πως δρουν αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση βλαβών προκαλούμενων από UV ακτινοβολία καθώς δεσμεύουν τα ελεύθερα ηλεκτρόνια και εμποδίζουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου.

Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες

Τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, στεροειδή και μη, έχουν αποδεδειγμένα καλή δράση έναντι της φωτοεπαγόμενης φλεγμονής. Αυτά δρουν κυρίως καταστέλλοντας την παραγωγή διαμεσολαβητών της φλεγμονής, όπως των κυτοκινών και των προσταγλανδινών. Τα τοπικά ρετινοειδή είναι ανάμεσα στα δημοφιλέστερα, όπως επίσης τοπικά κορτικοστεροειδή, η βιταμίνη D και νέοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες (tacrolimus, pimecrolimus), που πέραν της βασικής τους χρήσης σε φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην οξεία φλεγμονή του δέρματος λόγω υπερϊώδους ακτινοβολίας (51)

1.4 Οξειδωτικό Στρες και δέρμα

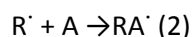
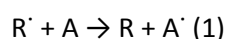
1.4.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Στην ατμόσφαιρα, το οξυγόνο καταλαμβάνει το 21% του αέρα που αναπνέουμε και βρίσκεται με τη μορφή του διατομικού οξυγόνου, O₂. Στη θεμελιώδη κατάστασή του το O₂, αποτελείται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα, τα οποία έχουν ίδια περιστροφή (παράλληλο spin). Αυτή του η ιδιαιτερότητα, καθιστά την κατανάλωση του οξυγόνου πολύ πιο πολύπλοκη από άλλων στοιχείων. Σύμφωνα με την απαγορευτική αρχή του Pauli, η μείωση του οξυγόνου γίνεται σταδιακά, καθώς μπορεί να απομακρύνεται μόνο ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά. Αυτή η σταδιακή μείωση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ισχυρής ενδιάμεσης ουσίας, της ελεύθερης ρίζας .. (52)

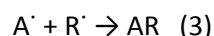
Η χημεία της οξειδωσης των κυττάρων, βασίζεται στη χημεία των ελευθέρων ριζών, και το γεγονός ότι πολλά από τα δραστικά είδη οξυγόνου είναι ελεύθερες ρίζες, δημιουργεί ένα ολόκληρο νέο πεδίο ενδιαφέροντος των ελευθέρων ριζών τόσο στη βιολογία όσο και την ιατρική . (53)

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται, οποιοδήποτε είδος έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ένα εκ των οποίων καταλαμβάνει μόνο του ένα τροχιακό. Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει το άτομο του υδρογόνου, τα περισσότερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, και το μόριο του οξυγόνου. Ο αυστηρός ορισμός των ελευθέρων ριζών θέλει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε τροχιακό της εξωτερικής στοιβάδας των ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να αποκλείει πολλά ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Ωστόσο, δεδομένου του βιολογικού ρόλου των εν λόγω ιόντων, ο οποίος συχνά σχετίζεται με την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, προτιμάται ο λιγότερο περιοριστικός ορισμός (52)

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια με πολλούς τρόπους. Μια ρίζα μπορεί, είτε να «δωρίσει» ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε ένα μόριο και να υποστεί ριζική μείωση, είτε να πάρει ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο, ώστε να σχηματιστεί ένα ζεύγος που ονομάζεται οξειδωτική ρίζα.



Όποιο από αυτά τα είδη της αντίδρασης και να συμβεί, το αποτέλεσμα θα είναι το μόριο να μετατραπεί σε ελεύθερη ρίζα. Αυτό είναι και το σημαντικό χαρακτηριστικό των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με μόρια, δηλαδή το ότι ευνοούν την αλυσιδωτή αντίδραση όπου μια ρίζα γεννά μια άλλη. Η αλυσιδωτή αντίδραση όμως σταματάει όταν μια ρίζα ενώνεται με μία άλλη. Τότε λαμβάνει χώρα η αντίδραση τερματισμού και οι δύο ρίζες «απενεργοποιούνται»:



Επίσης, μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών τερματίζεται όταν η ρίζα συναντάει ένα αντιοξειδωτικό μόριο (52).

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν με πολλές διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αερόβια αναπνοή. Οι αερόβιοι οργανισμοί όπως τα σπονδυλωτά, αλλά ειδικότερα ο άνθρωπος, παράγουν την ενέργειά τους από την οξείδωση των οργανικών υποστρωμάτων με μοριακό οξυγόνο. Η πλήρης μείωση των τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου προς παραγωγή νερού, συμβαίνει μέσα στα μιτοχόνδρια, στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας. Μερικές φορές όμως, μειώνεται εν μέρει, με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων οξειδωτικών παραγώγων, που οδηγούν σε δευτερογενείς οξειδώσεις .

1.4.2 Οξειδωτικό στρες στο δέρμα προκαλούμενο από UV ακτινοβολία

Το δέρμα εκτίθεται διαρκώς σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες από ένα ευρύ φάσμα πηγών, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Οξεία ή χρόνια έκθεση του δέρματος σε UV ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονής, οξειδωτικού στρες και βλάβες στο DNA που οδηγούν σε διάφορες δερματικές διαταραχές, όπως υπερμελάγχρωση, φωτογήρανση ή πρόωγη γήρανση του δέρματος και διάφορες μορφές καρκίνου του δέρματος. Σε όλες αυτές τις διαταραχές που προκαλούνται από UV ακτινοβολία , πρωτεύοντα ρόλο διαδραματίζει η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες. Τα δημιουργούμενα από υν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) ή το οξειδωτικό στρες είναι ικανά να οξειδώνουν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, οδηγώντας στο σχηματισμό οξειδωμένων προϊόντων όπως λιπιδικά υδροϋπεροξειδία, πρωτεϊνικά καρβονύλια ή 8-υδροξυδεοξυγουανασίνη, τα οποία έχουν εμπλακεί στην εμφάνιση πολλων δερματικών παθήσεων. Βέβαια, ο οργανισμός διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική άμυνα αποτελούμενη από ενδογενή ενζυματικά και μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά τα οποία προστατεύουν το δέρμα από τις επαγόμενες από UV οξειδωτικές βλάβες. Ωστόσο οι δημιουργούμενες από την UV ακτινοβολία δραστικές μορφές οξυγόνου ανταγωνίζονται και περιορίζουν τη δράση του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος. Έτσι εάν η αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού κατακλυστεί από την παρουσία των ROS, αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτική καταστροφή των συστατικών του δέρματος (54) Το δέρμα είναι πολύ ευάλωτο στα ROS που παράγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία καθώς είναι πλούσιο σε πολυακορεστα λιπαρά οξέα και λιπίδια που αποτελούν κύριο στόχο των ROS. Συγκεκριμένα οι δραστικές μορφές οξυγόνου επιδρούν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και προκαλούν λιπιδική υπεροξείδωση. Βλάβη στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη, διαρροή κυτταρικών συστατικών και τελικά θάνατο κυττάρων.

Οι αλδεϋδες λιπιδίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσης μπορούν επίσης να αντιδράσουν με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων και νουκλεϊκά οξέα για να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβες. Επιπλέον, κατά τη φλεγμονή που προκαλείται μετά από έκθεση σε UV ακτινοβολία, παράγονται τοπικά υψηλά επίπεδα υπεροξειδίου και απελευθερώνονται καταλυτικά ιόντα από φερριτίνη. Ο σίδηρος σε συνδυασμό με τα ROS μπορεί να προκαλέσει πρόσθετη βλάβη στο δέρμα. Τέλος τα ROS και ιδιαίτερα η ρίζα υδροξυλίου, προκαλούν βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, υδατάνθρακες, λιπίδια και πρωτεΐνες. (55)

1.4.3 Αντιοξειδωτικά στο δέρμα

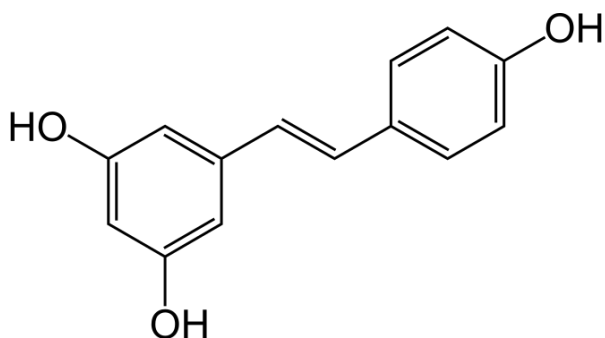
Τα αντιοξειδωτικά μόρια στο δέρμα αλληλοεπιδρούν με τα ROS ή με τα προϊόντα τους ώστε είτε να ελαχιστοποιήσουν είτε απλά να μειώσουν τις βλαβερές τους επιδράσεις. Διακρίνονται στα αντιοξειδωτικά ένζυμα και σε αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους. Αυτά τα αντιοξειδωτικά μόρια είναι η γλουταθειόνη (GSH), α-τοκοφερόλη ή βιταμίνη E, το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C, και τα ένζυμα : η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, (GSTs), η υπεροξειδική δισμουτάση (SODs), η καταλάση (CAT), και η αναγωγάση της κινόνης. Η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ ανήκουν στα υδατο-διαλυτά μόρια ενώ η βιταμίνη E συνδέεται με τις μεμβράνες και μπορεί να διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να δράσουν με έμμεσο μηχανισμό μέσω σχηματισμού χηλικών παραγόντων με μέταλλα και άμεσα ως δότες ηλεκτρονίων στις ρίζες. Με αυτούς του τρόπους βρίσκουν τις ελεύθερες ρίζες και τις προλαβαίνουν από το να επιτεθούν σε βιολογικούς στόχους. Αν και τα αντιοξειδωτικά μόρια για να δράσουν πρέπει να είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους οξειδωτικούς παράγοντες, έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι στα αντιοξειδωτικά ένζυμα λόγω μεγαλύτερης ικανότητας διείσδυσης, ευρύως φάσματος δράσης καθώς και λόγω της ικανότητας αναγέννησης των κυττάρων.

(56), (57), (58)

1.5 Ρεσβερατρόλη

Χημική ονομασία: 1,3-Benzenediol, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-

Συντακτικός τύπος:



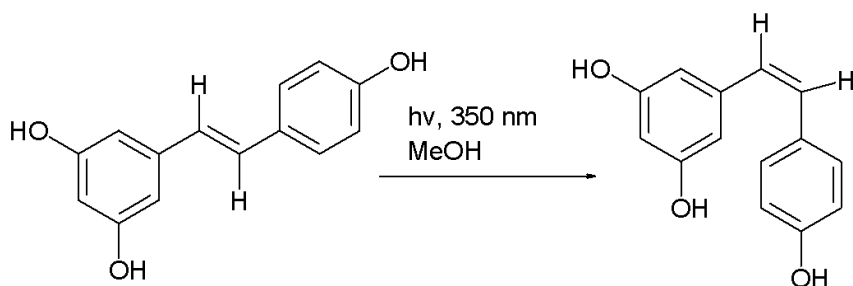
CAS Registry: 501-36-0

Η Ρεσβερατρόλη βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα (skin) των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (mulberries, blueberries, cranberries, bilberries) και σε μικρότερες ποσότητες έχει βρεθεί σε 70 ακόμη φυτικά προϊόντα. Η περιεκτικότητα των φρέσκων στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών σε RVT είναι 50- 100 μg/g, ενώ στο κόκκινο κρασί μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις 1,5-3 mg/L. Η Ρεσβερατρόλη, όπως και άλλες φυτο-αντιοξειδωτικές ουσίες, αποτελεί φυσικό συστατικό των φυτών και όπως και άλλες πολυφαινόλες (φλαβόνες, ισοφλαβόνες,), προστατεύει τα φυτά από εξωτερικούς εχθρούς (έντομα, μύκητες), επιβλαβείς οξειδώσεις και χαμηλές θερμοκρασίες.

1.5.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η ένωση ρεσβερατρόλη (resveratrol, RVT) είναι μια φυσική ουσία της κατηγορίας των φυτοαλεξινών (phytoalexins) με βασική δομή των στιλβενίων και που παράγεται σε φυτά με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση του στιλβενίου. Πρόκειται για μια ουσία που οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα και για το λόγο αυτό οι κρύσταλλοί της από λευκοί αποκτούν ένα υποκίτρινο ή ακόμα πιο σκούρο χρώμα. Η ρεσβερατρόλη έχει μοριακό βάρος 228.25 g/mol και pKa=8.49. Το μόριο είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό αλλά είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη αλλά και στην προπυλενογλυκόλη.

Η δομή της Ρεσβερατρόλης είναι αρκετά απλή, έχει τρία υδροξύλια σε διαμετρικές θέσεις των δύο βενζολικών δακτυλίων. Οι δακτύλιοι βρίσκονται σε trans- δομή της αιθυλενικής ομάδας που τους ενώνει. Υπάρχει επίσης και η cis-ρεσβερατρόλη. Και τα δύο ισομερή μπορεί να είναι είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα στην γλυκόζη. Η trans-ρεσβερατρόλη μπορεί να μετατραπεί σε cis-ρεσβερατρόλη όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, μια διαδικασία που ονομάζεται φωτοϊσομερισμός.



Εικόνα 24. Φωτοϊσομερισμός της Ρεσβερατρόλης

Η Trans-RSV είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και είναι σχετικά σταθερή εάν προστατεύεται από το υψηλό pH και το φως. Η απορρόφηση του trans-ισομερούς εντοπίζεται στα 307 nm και εκείνη του cis-ισομερούς στα 288 nm, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ανίχνευση των δύο ισομερών με HPLC. (59)

1.5.2 Φαρμακοκινητική

Μετά την από στόματος χορήγηση της ρεσβερατρόλης, το 75 % της ουσίας μπορεί να απορροφηθεί, ενδεχόμενος μέσω διάχυσης, αλλά η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα του ελεύθερου trans-ισομερούς βρέθηκε ότι είναι χαμηλή (<1%), γεγονός που πιθανόν να είναι αποτέλεσμα γρήγορου και εκτεταμένου μεταβολισμού στο έντερο και το ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα, trans -ρεσβερατρόλη γρήγορα συνδέεται με το γλυκουρονικό οξύ και θειικά, και έτσι παράγονται γλυκουρονίδια και θειικές ενώσεις που συσσωρεύονται στο πλάσμα και στα ούρα. Έτσι λοιπόν, λόγω του έντονου φαινομένου πρώτης διόδου που παρατηρείται έχουν αναζητηθεί εναλλακτικές οδοί χορήγησης για την ρεσβερατρόλη, με την τοπική χορήγηση να παρουσιάζει καλά αποτελέσματα.

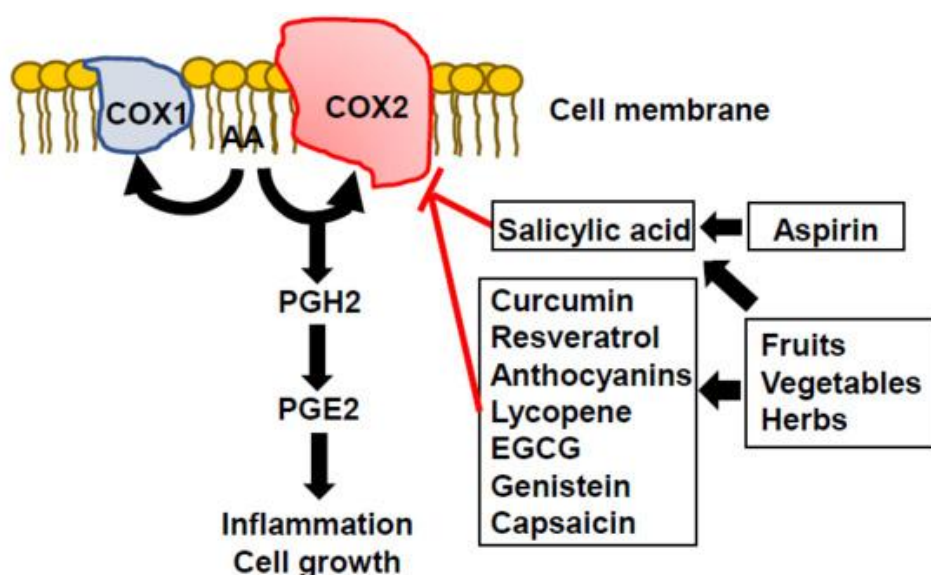
1.5.3 Φαρμακοδυναμική

Η ρεσβερατρόλη είναι μια μη φλαβονοειδής πολυφαινόλη με εκτεταμένη βιολογική δράση που έχει ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία. Έχει βρεθεί πως η

ρεσβερατρόλη ασκεί καρδιοπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και αγγειοδιασταλτική δράση. Αρκετές από τις δράσεις αυτές σχετίζονται με την σημαντική αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης, δηλαδή την ικανότητά της να εξουδετερώνει ποικίλες ελεύθερες ρίζες όπως τις υπεροξυ-ρίζες των λιπιδίων ή οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος. Επιπλέον η ρεσβερατρόλη αποτρέπει την οξείδωση των μετάλλων στο σώμα.

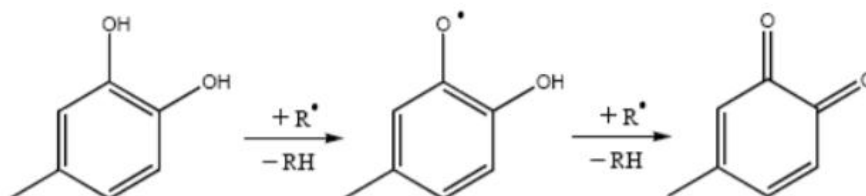
Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η ρεσβερατρόλη έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση δρώντας σε διαφορετικές φάσεις φλεγμονής. Η προστασία στην προ-φλεγμονώδη φάση φαίνεται να είναι πολύ σημαντική, καθώς μειώνει την φλεγμονή γρήγορα και αποτελεσματικά. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την έκφραση του μακροφάγου EMMPRIN ενεργοποιώντας τον υποδοχέα PPR-γ. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη καταστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα TNF-α όπως επίσης και την ενεργοποίηση των ιντερλευκινών IL-1, IL-6 και IL-8, παραγόντων που διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή. Υπάρχουν δύο διαφορετικά συστήματα ενζύμων που εμπλέκονται στην σύνθεση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως είναι η κυκλοοξυγενάση (COX) και λιποξυγενάση. Φαίνεται ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της ρεσβερατρόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της αναστολής τόσο της COX-1 όσο και της COX-2 προ-φλεγμονώδους σηματοδότησης, την καταστολή παραγωγής προφλεγμονωδών μεσολαβητών αλλά και μέσω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης της.

(60)



Εικόνα 25. Μηχανισμός Αντιφλεγμονώδους δράσης της Ρεσβερατρόλης

Όπως προαναφέρθηκε η RVT παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει οξυγονούχες ρίζες και οξειδωτικές ενώσεις. Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως στην εξουδετέρωση δραστικών ριζών (απόσπαση υδρογόνου) και δημιουργία μη δραστικών ριζών, λόγω δομής, συντονισμού, σχηματισμού κινονών ή συμπλοκοποίησης μετάλλων, με τα δύο υδροξύλια σε ο- ή p-θέση



Σχήμα 7. Αντιοξειδωτική δράση των ο-διυδροξυπαραγώγων και σταθεροποίηση της παραγόμενης ρίζας μέσω δομών που είναι λιγότερο δραστικές ή σταθερές κινόνες.

Η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης είναι δόσοεξαρώμενη. Πρόσφατες μελέτες με τη χρήση του μοντέλου επίπεδης λιπιδικής διπλοστοιβάδας έδειξαν πως με χαμηλή δόση της ουσίας η ρεσβερατρόλη δρα σε πολικές ομάδες στην επιφάνεια της διπλοστοιβάδας. Αντίθετα με υψηλές δόσεις του μορίου, αυτό διανέμεται εκτός της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον ότι η κατανομή της RVT έχει στενή σχέση με την αντιοξειδωτική της δράση καθώς η πολυφαινόλη που βρίσκεται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα μπορεί να αποτρέψει αποτελεσματικά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η RV μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια αντιδρά με το πρωτόθεμα, το οποίο μπορεί να προστατεύσει τις πρωτεΐνες από τη βλάβη της υπεροξείδωσης. (61) Έτσι όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η RV αποτελεί μια φαινόξυ ρίζα η οποία εξαλείφει τις ελεύθερες ρίζες (παροχή υδρογόνου), σχηματίζει σταθερό συντονισμό και στη συνέχεια καταστρέφει την αλυσίδα υπεροξείδωσης λιπιδίων. (61)

Λόγω της παραπάνω ευεργετικής δράσης της ρεσβερατρόλης αλλά της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας της από την από του στόματος χορήγηση εκτεταμένες μελέτες έχουν γίνει για τη τοπική της χορήγηση. Σε πειράματα που έγιναν In vitro (Franz-type diffusion cells) το μεγαλύτερο ποσοστό της ρεσβερατρόλης φαίνεται να παραμένει στην κεράτινη στοιβάδα όπου υπάρχει μεγάλη έκθεση σε ελεύθερες ρίζες (ROS) έτσι δικαιολογείται η εκτεταμένη τοπική της χρήση καθώς δρα στο δέρμα σαν αντιοξειδωτικό, κατά της φωτογήρανσης και της υπερμελάγχρωσης ενώ ταυτόχρονα έχει και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες.

Η UVB ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή, ερύθημα, οίδημα, υπερπλασία καθώς επίσης εμπλέκεται και στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Πειράματα έχουν δείξει πως η ρεσβερατρόλη μπορεί να βελτιώσει παθήσεις που προκαλούνται από την μικρής διάρκειας έκθεση σε UVB ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να δρα ανασταλτικά κατά του NF-ΚαρραΒ, παράγοντα που διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Επιπλέον, χορήγηση ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινα επιδερμικά κερατινοκύτταρα (NHEK) οδήγησε στην αναστολή της, προκαλούμενης από την UVB ακτινοβολία, φωσφορίωσης και αποικοδόμησης του IκΒα και στην ενεργοποίηση του IKΚα παράγοντες πολύ σημαντικοί στην φωτοκαρκινογένεση.

1.6 Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός (experimental design) είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στον εντοπισμό των παραγόντων εκείνων που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού προϊόντος ή της διαδικασίας που μελετάμε και θέλουμε να έχουμε κάτω από στατιστικό έλεγχο. Αν ήταν να δώσουμε έναν ορισμό στη διαδικασία του πειραματικού σχεδιασμού, θα οριζόταν ως μια προσέγγιση σύμφωνα με την οποία μεταβάλλοντας με κατάλληλο τρόπο τις τιμές των παραγόντων που επηρεάζουν τη διαδικασία ή το αποτέλεσμα της, μπορούμε να καθορίσουμε κατά πόσο οι τιμές αυτών των μεταβλητών και με ποιο τρόπο επηρεάζουν την απόκριση.

Με λίγα λόγια ο πειραματικός σχεδιασμός μας βοηθάει στην σχεδίαση των κατάλληλων πειραμάτων, ώστε να βρούμε τις μεταβλητές εκείνες που επηρεάζουν την ποιότητα του προϊόντος σε σημαντικό βαθμό και με ποιον τρόπο η μεταβολή των τιμών αυτών των μεταβλητών αντανακλά σε μεταβολή της ποιότητας του τελικού προϊόντος, καταναλώνοντας συγχρόνως τους ελάχιστους δυνατούς πόρους τόσο σε άψυχο όσο και σε έμψυχο δυναμικό.

Τα βασικά πλεονεκτήματά του πειραματικού σχεδιασμού είναι :

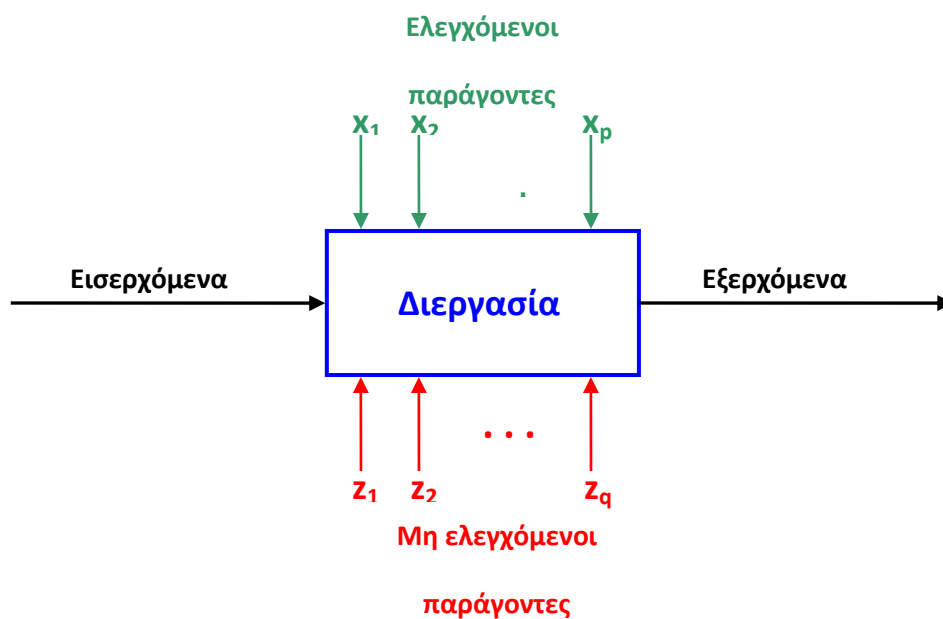
1. Η εκτίμηση τόσο των μεμονωμένων επιδράσεων των παραγόντων επί του συστήματος όσο και των αλληλεπιδράσεων αυτών.
2. Η επίδραση κάθε παράγοντα στην υπό μελέτη απόκριση εκτιμάται με μεγαλύτερη ακρίβεια, ως συνέπεια της ελαχιστοποίησης του τυπικού σφάλματος της εκτίμησης και του περιορισμού των διαφόρων πηγών μεταβλητότητας.
3. Δυνατότητα προσδιορισμού του κόστους πριν την εκτέλεση των πειραμάτων, γεγονός που διαφοροποιεί τον πειραματικό σχεδιασμό από την κοινή πρακτική της “δοκιμής και λάθους”.
4. Εξοικονόμηση χρόνου και μείωση κόστους ως αποτέλεσμα του περιορισμένου αριθμού παρατηρήσεων που απαιτούνται για την κατανόηση των υπό μελέτη καταστάσεων.

Η γενική προσέγγιση στο σχεδιασμό και διεξαγωγή του πειράματος, ονομάζεται στρατηγική του πειράματος (strategy of experimentation) ή σχεδιασμός του. Τα σπουδαιότερα βήματα που ακολουθούνται κατά τον σχεδιασμό ενός πειράματος είναι:

- Περιγραφή του προβλήματος και του στόχου του πειράματος
- Ανάλυση και επεξεργασία των υπαρχόντων δεδομένων πάνω στο συγκεκριμένο θέμα
- Επιλογή των παραγόντων που θα μελετηθούν, καθώς και των επιπέδων τους
- Επιλογή της εξαρτημένης μεταβλητής
- Επιλογή κατάλληλης τακτικής πειραματικού σχεδιασμού
- Διεξαγωγή του πειράματος
- Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος
- Τελικά συμπεράσματα

Ως πείραμα (experiment) ορίζεται μια συγκροτημένη σειρά δοκιμασιών (test) κατά τις οποίες οι παράγοντες (factors), δηλαδή οι μεταβλητές που επηρεάζουν τη διεργασία μεταβάλλονται, με σκοπό να διαπιστωθούν και να αναγνωρισθούν οι λόγοι της αλλαγής των μετρούμενων γνωρισμάτων του τελικού αποτελέσματος. Παράγοντας ή ανεξάρτητη μεταβλητή (factor or independent variable) είναι η ελεγχόμενη ή μη μεταβλητή της οποίας η επίδραση επί της απόκρισης μελετάται. Ο παράγοντας μπορεί να έχει ποσοτικό ή ποιοτικό χαρακτήρα. Ως επίπεδα (levels) ορίζονται οι διάφορες τιμές του παράγοντα που τίθεται σε εξέταση και ως απόκριση ή εξαρτημένη μεταβλητή (response) το μέγεθος το οποίο μετράται για να χαρακτηρίσει μια διαδικασία. Αλληλεπιδράσεις (interactions) καλούνται οι συνδυασμοί μεταξύ των παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν, είτε θετικά είτε αρνητικά την τελική απόκριση της πειραματικής διεργασίας.

Τα πειράματα πραγματοποιούνται προκειμένου να μελετηθούν διεργασίες ή συστήματα. Γενικά ως διεργασία μπορεί να θεωρηθεί η πορεία μέσω της οποίας τα «εισερχόμενα» δεδομένα μετατρέπονται σε «εξερχόμενα». Η μετατροπή αυτή συμβαίνει υπό την επίδραση ελεγχόμενων (controllable) και μη (uncontrollable) παραγόντων.



Εικόνα 27. Σχηματική παράσταση διεργασίας ή συστήματος

Παράγοντες, όπως η φύση του υπό μελέτη προβλήματος καθώς και ο αριθμός των παραγόντων που τίθενται υπό διερεύνηση, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού. Διακρίνονται διάφοροι τύποι σχεδιασμών ανάλογα με το αντικείμενο που καλύπτουν, η συνοπτική περιγραφή των οποίων παρουσιάζεται στη συνέχεια.

Παραγοντικός Σχεδιασμός : Ένας σημαντικό παράδειγμα πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί η τεχνική του παραγοντικού σχεδιασμού, η οποία είναι αυτή που χρησιμοποιείται συχνότερα, διότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταβολή των παραγόντων της διεργασίας. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της κύριας επίδρασης (main effect) ενός παράγοντα στην απόκριση, αλλά και η πιθανή αλληλεπίδραση (interaction) των παραγόντων μεταξύ τους. Τα πειράματα αυτά αποτελούνται από όλους τους δυνατούς συνδυασμούς όλων των επιπέδων όλων των παραγόντων (runs ή trials). Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, οι επιμέρους τιμές των παρατηρήσεων διαφέρουν, με αποτέλεσμα να υπάρχει διακύμανση (variation) ή θόρυβος (noise) στα αποτελέσματα. Ο θόρυβος, που συχνά καλείται πειραματικό σφάλμα (experimental error) ή απλά σφάλμα (error), είναι αναπόφευκτος και μη ελεγχόμενος. Συχνά, προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια των μετρήσεων, το πείραμα επαναλαμβάνεται κάποιες φορές (replication of an experiment).

Screening designs: Μία ιδιαίτερη κατηγορία πειραμάτων παραγοντικού σχεδιασμού είναι τα *πειράματα διαχωρισμού παραγόντων (screening experiments)*, με τα οποία γίνεται επιλογή των παραγόντων που έχουν πραγματική επίδραση στη διεργασία και που η επίδραση τους είναι αναμφίβολα διακριτή από το *θόρυβο υποβάθρου (background noise)*. Οι παράγοντες από τους οποίους μπορεί να εξηγηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της μεταβλητότητας της υπό μελέτη διεργασίας ονομάζονται *σημαντικοί (significant)* σε αντίθεση με τους *μη σημαντικούς* παράγοντες. Όταν τα δεδομένα δεν είναι επαρκή για τον έλεγχο της σημαντικότητας με στατιστικά κριτήρια, προτιμώνται οι όροι «ενεργός» και «μη ενεργός παράγοντας» (active και non-active factor). Η επιλογή των παραγόντων που θα μελετηθούν βασίζεται στην εμπειρία, σε θεωρητική ή πρακτική γνώση της διεργασίας ή αναλόγων συστημάτων, ή σε προηγούμενα πειράματα. Εξίσου χρήσιμες είναι επίσης βιβλιογραφικές αναφορές για τους υπό μελέτη παράγοντες

Σχεδιασμός Μιγμάτων (Mixture designs): Όταν οι μεταβλητές του πειράματος αντιστοιχούν σε αναλογίες συστατικών ενός μίγματος, η βελτιστοποίηση της απόκρισης γίνεται με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού μιγμάτων.

1.7 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης *in vitro* σε κύτταρα διάχυσης Franz καθώς και η εκτίμηση της πιθανής τοπικής αντιφλεγμονώδους δράσης της *in vivo* σε άτριχους μύες τύπου SKH-1.

Πιο συγκεκριμένα, σκοπός είναι να μελετηθεί η επίδραση ορισμένων παραγόντων όπως η σύσταση του φορέα, η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, η θερμοδυναμική ενεργότητα καθώς και η παρουσία και η συγκέντρωση του επιταχυντή διαβατότητας στη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης. Περαιτέρω, στόχος είναι να εκτιμηθεί τόσο η προληπτική όσο και η κατασταλτική δράση της ρεσβερατρόλης σε φλεγμονή προκαλούμενη στο δέρμα μυών από UV ακτινοβολία. Παράλληλα θα εκτιμηθεί και το κατά πόσο οι παραγόντες που επηρεάζουν τη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης (συγκέντρωση, θερμοδυναμική δραστηριότητα, παρουσία ενισχυτή) μπορούν να επηρεάσουν εξίσου και την δράση της κατά της φλεγμονής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2 IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ

2.1 Υλικά, όργανα και συσκευές

Υλικά

Όλα τα υλικά χρησιμοποιήθηκαν αυτούσια, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία:

Δραστική ουσία: Ρεσβερατρόλη (Batch no. 16JO7-B05-PPR1714943 FAGRON, Greece)

Έκδοχα:

- Γλυκερίνη (FAGRON, Greece)
- Προπυλενογλυκόλη (FAGRON, Greece)
- PEG 400 (Λάμδα, Greece)
- Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex® AVC, CHEMCO,Greece)
- Ethoxydiglycol (Transcutol ® CG, FAGRON,Greece.)
- Απιονισμένο νερό

Διαλύτες και αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη βαθμού HPLC (Sigma Aldrich)
- Νερό βαθμού HPLC
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο NaH_2PO_4 , Batch No:PP/2011/00057
- Υδροξείδιο του νατρίου NaOH
- Ρυθμιστικά διαλύματα βαθμονόμησης πεχάμετρου

Μεμβράνη:

- STRAT-M, Lot No:K5KA9541
- πλήρες δέρμα, Section: RPL skin bank 240118 και 220917

Όργανα και συσκευές

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ηλεκτρονικός ζυγός: Mettler Toledo AT 261, Delta Range® (Mettler, Switzerland)
- Υδατόλουτρο υπερήχων: Branson Sonicator 5200 (Branson, U.S.A.)
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού βαθμού HPLC:
- Μαγνητικοί αναδευτήρες: Nuova II stir Plate (Barnstead, Thermolyne, U.S.A.) και Cimarec 3, (Thermolyne, U.S.A.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό: Millipore
- Φίλτρα για τη συσκευή διήθησης υπό κενό Millipore: Durapore® Membrane filters, 0.45 µm HV
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), που περιλαμβάνει:
- Αντλία υψηλής πιέσεως Spectra System P1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)
- Αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler) Spectra System AS1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)
- Στήλη 150 cm x 4,6 mm, 5µ, Hypersil® BDS C18 (ThermoQuest Hypersil Division, U.K.).
- Ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού Spectra System 2000 (Thermo Separation Products, U.S.A.) ρυθμισμένο σε $\lambda_{max} = 278$ nm.
- Μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή (Thermo Quest, Inc., U.S.A.) με λογισμικό Chromquest®, Version 5.1 (ThermoQuest, U.K.).
- Κλίβανος: WT binder (Germany)
- Περιστρεφόμενος δίσκος: Fischer Scientific, U.S.A.
- Φυγόκεντρος: Sigma 202 MK (Sigma, Germany)
- Περιστρεφόμενος αναδευτήρας: SBS - Roller (SBS, Spain)
- Τροποποιημένα κύτταρα του Franz (Crown Glass, Somerville, U.S.A.), με εμβαδόν ανοίγματος 0.636 cm² και όγκο διαμερίσματος δέκτη 6.275 ml.
- Δακτύλιοι από τεφλόν με εμβαδό ανοίγματος περίπου ίσο με 0.636 cm
- Θερμορρυθμιστής: Edmund Bühler 7400 (Tübingen, Germany).
- Υδατόλουτρο: Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany).
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης Cimarec 3, (Thermolyne, U.S.A.)
- Μεταλλικοί σφικτήρες(Thomas scientific™)

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για τη εύρεση των κατάλληλων αναλογιών διαλυτών των φορέων των σκευασμάτων της ρεσβερατρόλης που μελετήθηκαν για την εκτίμηση της *in vitro* διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκε παραγοντικός σχεδιασμός. Οι παράγοντες που επιλέχθηκε ήταν η συγκέντρωση των συστατικών του φορέα και ως απόκριση ορίστηκε η διαλυτότητα κορεσμού. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design Expert 10.0.3.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, US

2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

2.2.2.1 Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης

Για την ανάλυση των προτύπων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τροποποίηση δημοσιευμένης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Οι συνθήκες ανάλυσης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

Στατική φάση (στήλη)	Hypersil® BDS C18, 5 μ m, 100 cm x 4.6 mm
Κινητή φάση	Ρυθμιστικό διάλυμα NaH ₂ PO ₄ (50%) – Μεθανόλη (50%)
Ροή	1 ml/min
Μήκος κύματος ανιχνευτή	306 nm
Όγκος δείγματος (loop)	50 μ l
Θερμοκρασία	Περιβάλλοντος ($\approx$ 25 $^{\circ}$ C)

Πίνακας 3. Συνθήκες ανάλυσης της ρεσβερατρόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

2.2.2.2 Παρασκευή κινητής φάσεως

Για την παρασκευή της κινητής φάσης ζυγίζονται αρχικά 7,8 gr NaH₂PO₄·H₂O, μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 1000ml και συμπληρώνεται H₂O βαθμού HPLC μέχρι τα 800 ml. Ακολουθεί ανάδευση μέχρι διάλυσης του άλατος. Κατόπιν γίνεται ρύθμιση του pH στα 6,8 με την προσθήκη σταγόνων καυστικού Νατρίου (NaOH). Ακολουθεί μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml και προσθήκη H₂O HPLC μέχρι τη χαραγή και ανάδευση του διαλύματος. Στη συνέχεια αναμιγνύονται 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος με 500 ml

μεθανόλης βαθμού HPLC. Ακολουθεί καλή ανακίνηση και τοποθέτηση στο λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η απαέρωση της κινητής φάσης. Τέλος, η κινητή φάση διηθείται υπό κενό στη συσκευή Millipore χρησιμοποιώντας φίλτρα Durapore® Membrane filters, 0.45 μ m HV για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων.

2.2.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων ρεσβερατρόλης αρχικά παρασκευάζεται το μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης 100 μ g/ml με ζύγιση 0.01 gr ρεσβερατρόλης και αραίωση με μεθανόλη καθαρότητας βαθμού HPLC μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη 100 ml. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκε amber ογκομετρική φιάλη λόγω της φωτοευαισθησίας της δραστικής ουσίας. Από αυτό το μητρικό διάλυμα φτιάχνουμε τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1,3,5,7,10 αντίστοιχα. Αναλυτικά τα παραπάνω φαίνονται στον Πίνακα.

Συγκέντρωση μ g/ml	Ληφθείς όγκος (μ l)	Αραίωση
1	100	Αραίωση με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml έως τη χαραγή
3	300	
5	500	
7	700	
10	1000	

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων

2.2.2.4 Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου ανάλυσης

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης, τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα ρεσβερατρόλης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Κάθε πρότυπο αναλύθηκε τρεις φορές ($n=3$). Τα αποτελέσματα (εμβαδά) που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης και υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2).

Οι έλεγχοι γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα εντός κινητής φάσης πριν από τη διεξαγωγή πειραμάτων προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού και ποσοτικού προσδιορισμού των γελών καθώς και εντός του διαλύματος υποδοχέα πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας.

2.2.2.5 Λήψη φάσματος υπεριώδους-ορατού

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας ($\lambda_{\max}$). Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους: α) Για την επίτευξη της μέγιστης ευαισθησίας και β) για την ελαχιστοποίηση της μεταβολής των απορροφήσεων κατά τη διάρκεια των μετρήσεων εξαιτίας μικρών μεταβολών του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Για το λόγο αυτό διεξήχθη πείραμα λήψης φάσματος απορρόφησης της ρεσβερατρόλης. Ζυγίστηκαν 100 mg ρεσβερατρόλης, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώθηκαν με μεθανόλη μέχρι τη χαραγή (μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ml). Από το μητρικό διάλυμα ελήφθησαν 500 μ l, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και αραιώθηκαν με κινητή φάση που αποτελείτο από μεθανόλη (50%) - ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(50%). Το διάλυμα συγκέντρωσης 10mg/ml που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φάσματος.

Μετά από μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (Shimazu UV/VIS Spectrophotometer) με κινητή φάση, ελήφθη το φάσμα απορρόφησης της ουσίας σε κυψελίδα από χαλαζία πάχους 1 cm (No 6030-UV, Helma, Γερμανία).

2.2.2.6 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές

Το υγρό πλήρωσης του διαμερίσματος δέκτη στα κύτταρα διάχυσης Franz (υγρό του υποδοχέα) είναι μείγμα προπυλενογλυκόλης-νερού(καθαρότητας HPLC) σε αναλογία 50-50 v/v. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το διάλυμα πλήρωσης του διαμερίσματος δέκτη που χρησιμοποιήθηκε παρεμποδίζει την εμφάνιση του χρωματογραφήματος της ρεσβερατρόλης, ελήφθησαν χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος ουσίας. Τα τελευταία παρασκευάστηκαν με τη συνήθη διαδικασία αραιώσης μητρικού διαλύματος και παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων. Η διαφορά στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν ότι για την αραιώση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υποδοχέα αντί της κινητής φάσης. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν δεν παρουσίαζαν παρεμπόδιση στην εμφάνιση της κορυφής της ρεσβερατρόλης.

Προκειμένου να καταλήξουμε στην συνταγή με τη βέλτιστη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκαν 2 πειραματικές διαδερμικές μελέτες.

2.3 Προκαταρκτικά πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας

2.3.1 Επιλογή κατάλληλου φορέα

Για την παρασκευή των φορέων της δραστικής ουσίας προηγήθηκε στάδιο εκτίμησης κατάλληλου φορέα. Σκοπός του πειράματος ήταν να βρεθεί ο φορέας που δίνει τη μέγιστη διαπερατότητα αλλά και να μελετηθεί το κατά πόσο η μεγαλύτερη διαλυτότητα (άρα η μεγαλύτερη συγκέντρωση κορεσμού) επηρεάζει τη διαπερατότητα. Έτσι λοιπόν στόχος ήταν να δημιουργηθούν συνταγές με αύξουσες συγκεντρώσεις κορεσμού οι οποίες είναι οι εξής : 1% , 2,5%, 5%. Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν διότι αυτό είναι και το εύρος συγκεντρώσεων που έχει χρησιμοποιηθεί για τη ρεσβερατρόλη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία σε αντίστοιχα πειράματα μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας. Προκειμένου να επιτευχθούν οι συγκεντρώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν φορείς αποτελούμενοι από 3 διαφορετικούς διαλύτες σε διαφορετικές αναλογίες. Οι διαλύτες ήταν οι εξής : Peg-400, Γλυκερίνη και νερό. Η επιλογή των διαλυτών έγινε με σκοπό να επιτευχθεί βέλτιστη ισορροπία μεταξύ μέγιστη θερμοδυναμικής ενεργότητας και μέγιστης διαλυτότητας. Σύμφωνα με τη θεωρία Formulating for efficacy η βέλτιστη ισορροπία επιτυγχάνεται όταν ο φορέας της δραστικής αποτελείται από ένα διαλύτη που έχει μεγάλη ικανότητα διάλυσης της δραστικής (διότι έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση της δραστικής) και από ένα διαλύτη με μικρή ικανότητα διάλυσης (διότι έτσι αυξάνεται η τάση της δραστικής να μετακινηθεί από το φορέα προς την κεράτινη στιβάδα). (31) Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο διαλύτης μεγάλης ικανότητας διάλυσης της ρεσβερατρόλης είναι ο PEG 400 ενώ το νερό έχει μικρή ικανότητα διάλυσης. Ωστόσο επειδή το PEG400 είναι εξαιρετικός διαλύτης της ουσίας, τα μείγματα με το νερό έδιναν φορείς με πολύ μεγάλη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης με αποτέλεσμα κατασπατάληση της ουσίας. Έτσι ως καλός διαλύτης δεν χρησιμοποιήθηκε μόνο το PEG400 αλλά μείγμα με γλυκερίνη σε αναλογία 50-50 v/v καθώς η γλυκερίνη είναι ένας μέτρος διαλύτης της ρεσβερατρόλης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η διαλυτότητα της ρεσβερατρόλης σε κάθε έναν από τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των φορέων.

ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ (mg/ml)
PEG 400	373.85
ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ	9,47
ΝΕΡΟ	0,03

Πίνακας 5. Διαλυτότητα Ρεσβερατρόλης στους διαλύτες

Κατόπιν καταλήξεως των συστατικών που θα αποτελούσαν τον φορέα (PEG 400, νερό και γλυκερίνη), ακολούθησε η διαδικασία επιλογής της ποσοτικής σύστασης των επιμέρους συστατικών του. Η αναλογία αυτή των διαλυτών που απαιτείται για να επιτευχθούν συγκεντρώσεις κορεσμού 1%, 2,5%, 5% βρέθηκε με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού. Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό δημιουργήθηκαν 6 συνταγες με διαφορετικές αναλογίες διαλυτών και ορίστηκε μία απόκριση, η διαλυτότητα του φαρμακού. Αναλυτικότερα, οι συνταγές που παρασκευάστηκαν (εκφρασμένες σε αναλογίες συστατικών) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Στο 100% αντιστοιχούν τα 5 ml διαλύματος, που είναι η συνολική ποσότητα διαλύματος που παρασκευάστηκε.

No συνταγής	Peg400- Γλυκερίνη 50-50(v/v)	Νερό
1	30%	70%
2	40%	60%
3	50%	50%
4	55%	45%
5	60%	40%
6	65%	35%

Πίνακας 6. Σύσταση Φορέων

Τα παραπάνω συστατικά τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια και αναδεύτηκαν με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Κατόπιν, προστέθηκε περίσσεια ρεσβερατρόλης και τα φιαλίδια παρέμειναν υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 25°C για 24 ώρες. Κάθε συνταγή παρασκευάστηκε και αναλύθηκε εις τριπλούν.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση των υπέρκορων διαλυμάτων με ταχύτητα 5.000 στροφών το λεπτό για 15 λεπτά στους 25°C και διήθηση με ηθμούς διαμέτρου πόρων 0.45 μ. Από τα διηθήματα ελήφθη όγκος 100ml και ακολούθησε αραιώση με κινητή φάση έως τη χαραγή σε ογκομετρικές φιάλες 100 ml. Ακολούθησε και δεύτερη αραιώση 1:20 ή 1:40 λόγω μεγάλης συγκέντρωσης σε ρεσβερατρόλη

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού βρέθηκε ποιες είναι οι αναλογίες που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις 1, 2,5 και 5%.

2.3.2 Παρασκευή των γελών

Οι γέλες παρασκευάστηκαν με ανάμιξη των συστατικών του κάθε φορέα εντός φιαλιδίων. Τα μίγματα αναδεύτηκαν με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Ακολούθησε προσθήκη της δραστικής ουσίας σε συγκέντρωση 1, 2,5 και 5% στον κάθε φορέα αντίστοιχα και τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 25°C όπου παρέμειναν 24 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε ο παράγοντας σχηματισμού γέλης (Aristoflex® AVC) στα φιαλίδια τα οποία αφέθηκαν για επιπλέον ανάδευση για 24 ώρες προκειμένου να διασπαρεί πλήρως ο παράγοντας σχηματισμού γέλης και να δημιουργηθούν τα τελικά σκευάσματα-γέλες. Η σύσταση των γελών φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα.

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Σκεύασμα 1	Σκεύασμα 2	Σκεύασμα 3
PEG 400-Γλυκερίνη	44% v/v	56% v/v	62% v/v
Νερό	56% v/v	46% v/v	38% v/v
Aristoflex® AVC	0.5% w/v	0.5% w/v	0.5% w/v
Ρεσβερατρόλη	1% w/v	2,5% w/v	5% w/v

Πίνακας 7. Τελικές συνταγές

2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι στα τελικά σκευάσματα έχει προστεθεί η σωστή ποσότητα της δραστικής ουσίας αλλά και ότι η δραστική διατηρείται σταθερή και δεν διασπάται ούτε επηρεάζεται από το φορέα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών. Πιο συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Από κάθε γέλη ελήφθησαν 100μl με ειδική πιπέτα, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Στη συνέχεια αφέθηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 24 ώρες προκειμένου να διαλυθεί η γέλη. Ακολούθησαν δεύτερες αραιώσεις 1:20 ή 1:40 με κινητή φάση. Τα διαλύματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης. Κάθε προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών έναν μήνα μετά την παρασκευή τους προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα των σκευασμάτων. Στο διάστημα που μεσολάβησε μέχρι το δεύτερο ποσοτικό προσδιορισμό οι γέλες διατηρήθηκαν σε ψυγείο (~4°C).

2.3.4 Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ορθά το πείραμα διάχυσης είναι απαραίτητο να διατηρούνται διαρκώς συνθήκες δεξαμενής στο διάλυμα του υποδοχέα. Για να επιτευχθεί αυτό αφενός το διάλυμα του διαμερίσματος του υποδοχέα διατηρείται σε συνεχή ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτηρά και αφετέρου πρέπει να ισχύει η παρακάτω συνθήκη:

Η συγκέντρωση κορεσμού της δραστικής ουσίας στο διάλυμα του υποδοχέα πρέπει να είναι 10 φορές μεγαλύτερη από το 10% της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας που περνάει από το διαμέρισμα του δότη στο διαμέρισμα του δέκτη.

Πιο αναλυτικά, έστω ότι από τα 100 μl γέλης περιεκτικότητας C που τοποθετούνται στο διαμέρισμα δότη θα διαπεράσει το 10% της περιεχόμενης σε αυτά δραστικής ουσίας, ποσό που αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό διαπέρασης. Η συγκέντρωση της ουσίας στο διαμέρισμα-δέκτη θα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με το 10% της διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα για να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής.

Το διάλυμα του υποδοχέα για το πείραμα διάχυσης επιλέχτηκε βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (62) (63) και είναι μείγμα προπυλενογλυκόλης-νερού(καθαρότητας HPLC) σε αναλογία 50-50 v/v. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τηρείται η παραπάνω συνθήκη κι έτσι θα διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής κατά τη διάρκεια του πειράματος διάχυσης σε κύτταρα Franz, πραγματοποιήθηκε πείραμα υπολογισμού της διαλυτότητας κορεσμού του φαρμάκου στο επιλεγμένο διάλυμα του υποδοχέα.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε 3 φιαλίδια (vial) των 20ml μεταφέρθηκαν 10ml από το διάλυμα του υποδοχέα καθώς η ανάλυση έγινε εις τριπλούν. Σε κάθε φιαλίδιο προστέθηκαν σταδιακά και υπό συνεχή ανάδευση ποσότητες ρεσβερατρόλης έως τη δημιουργία ιζήματος. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 25°C για 24 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των υπέρκορων διαλυμάτων με ταχύτητα 5.000 στροφών / λεπτό για 15 λεπτά στους 25°C και διήθηση με ηθμούς διαμέτρου πόρων 0.45 μ. Από τα διηθήματα ελήφθη όγκος 100μl και ακολούθησε αραιώση με κινητή φάση έως τη χαραγή σε ογκομετρικές φιάλες 100 ml. Ακολούθησε και δεύτερη αραιώση 1:2. Τα διαλύματα που

προέκυψαν αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων ρεσβερατρόλης σε κινητή φάση.

2.3.5 In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας

Για την in vitro μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκαν πείραμα διάχυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα διάχυσης του Franz, με επιφάνεια διάχυσης $0,636 \text{ cm}^2$ και όγκο $6,275 \text{ ml}$. Τα κύτταρα είναι όλα κατασκευασμένα από σκοτεινόχρωμη ύαλο για την προστασία από το φως καθώς η ρεσβερατρόλη είναι ουσία φωτοευαίσθητη. Αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα του δότη και το διαμέρισμα του δέκτη. Ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα υπάρχει η μεμβράνη, ένας δακτύλιος από teflon® και η προς εξέταση γέλη που περιέχει την δραστική ουσία. Το σύστημα συγκρατείται στη θέση του με την βοήθεια μεταλλικού σφικτήρα. (Thomas scientific™). Ο δακτύλιος από Teflon χρησιμοποιείται για να συγρατηθεί η γέλη σταθερή στη θέση της δηλαδή στην επιφάνεια διάχυσης. Το υλικό αυτό είναι σκληρό και αδρανές και επομένως κατάλληλο για το σκοπό που χρησιμοποιείται (64)

Κατά την πρώτη πειραματική μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα διάχυσης χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες συνταγές. Η διαφορά μεταξύ των δύο πειραμάτων είναι ότι στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε τεχνητή μεμβράνη STRAT-M ενώ στο δεύτερο ανθρώπινη επιδερμίδα. Λόγω του ότι η ανθρώπινη επιδερμίδα είναι δυσεύρετη και λόγω της περιορισμένης επαναληψιμότητας αποτελεσμάτων πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας σε ανθρώπινη επιδερμίδα, το πρώτο πείραμα διάχυσης πραγματοποιήθηκε στη συνθετική μεμβράνη STRAT-M προκειμένου να λάβουμε μια πρώτη εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης.

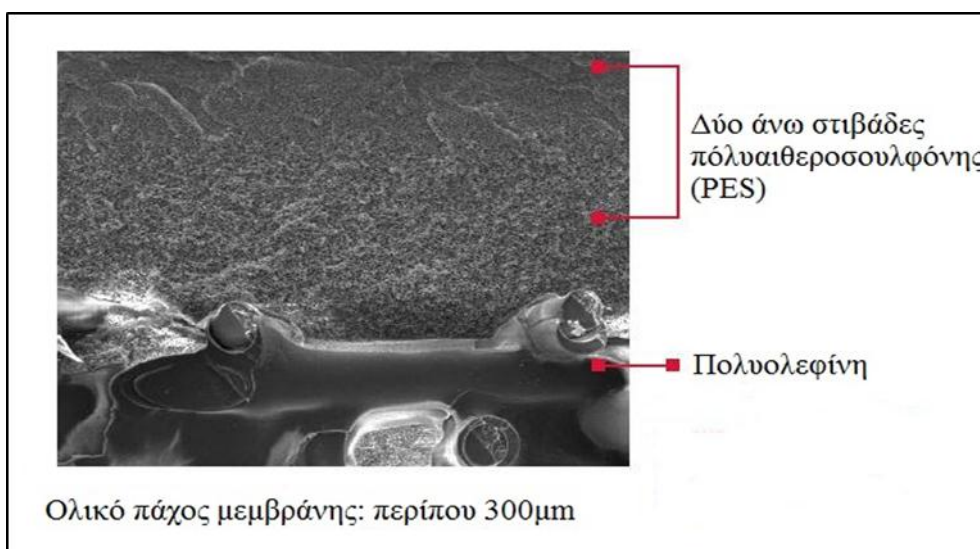
2.3.5.1 Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα

Το διάλυμα υποδοχέα παρασκευάστηκε ως εξής: 500ml νερού καθαρότητας HPLC μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml και προστέθηκαν επιπλέον 500ml προπυλενογλυκόλης μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα αναδέυτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 ώρες προκειμένου να εξασφαλιστεί η ομοιογένειά του και στη συνέχεια διατηρήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 36°C , μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.3.5.2 Πείραμα διάχυσης σε τεχνητή μεμβράνη Strat-M®

Μεμβράνη Strat-M®

Η μεμβράνη Strat-M® είναι μία συνθετική μεμβράνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για μελέτη διαδερμικής διάχυσης με σκοπό να προβλεφεί η διαπερατότητα μιας δραστικής ουσίας μέσω του δέρματος. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι δεν παρουσιάζει διαφορές από παρτίδα σε παρτίδα, περιορίζοντας έτσι όσο είναι δυνατόν τη μεταβλητότητα που χαρακτηρίζει τα πειράματα διάχυσης. Προσφέρει καλή προβλεψιμότητα σε σχέση με τις μετρήσεις που γίνονται σε δέρμα, χωρίς πολλές διακυμάνσεις μεταξύ των μετρήσεων και χωρίς περιορισμούς όσον αφορά την ασφάλεια και την αποθήκευσή της. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών, σε όλες τις διαθέσιμες τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές, με την παρουσία ή όχι ενισχυτών διαπερατότητας. Όπως, το ανθρώπινο δέρμα η STRAT-M® αποτελείται από πολλές στιβάδες με διαφορετικό βαθμό διάχυσης. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο στιβάδες πολυαιθεροσουλφόνης (με μεγαλύτερη αντίσταση στη διάχυση) πάνω σε μία στιβάδα πολυολεφίνης (μικρότερη αντίσταση στη διαπερατότητα) με διάσπαρτες δομές συνθετικών λιπιδίων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία πορώδης κατασκευή με παρόμοιες ιδιότητες με το δέρμα (65).



Εικόνα 28. Δομή Μεμβράνης STRAT-M

Πείραμα διάχυσης

Για την διεξαγωγή του πειράματος κόπηκαν κομμάτια, από την μεμβράνη, κατάλληλου μεγέθους και εφαρμόστηκαν πάνω στην επιφάνεια του διαμερίσματος-δέκτη, με την γυαλιστερή επιφάνεια προς το διαμέρισμα-δότη. Κατά την χρήση της η μεμβράνη δεν απαιτεί ενυδάτωση, γεγονός που διευκολύνει την χρήση της. Από επάνω τοποθετήθηκε δακτύλιος από τεφλόν για τη στήριξη της μεμβράνης και 100ml από κάθε γέλη η οποία τοποθετήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια της μεμβράνης και να δημιουργείται κατά το δυνατόν ένα ομοιόμορφο στρώμα γέλης. Μετά την προσθήκη των σκευασμάτων, τοποθετήθηκε το διαμέρισμα του δότη και ολόκληρη η διάταξη συγκρατήθηκε με μεταλλικό σφιγκτήρα. Για κάθε συνταγή χρησιμοποιήθηκαν 3 κύτταρα. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα από το πλευρικό άνοιγμα δειγματοληψίας μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 36°C πάνω σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης και παρέμειναν εκεί για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος. Η θερμοκρασία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της θερμοκρασίας της επιφάνειας του δέρματος.

Ακολούθησαν δειγματοληψίες στα χρονικά διαστήματα 3, 6, 12, και 24 ωρών. Σε κάθε δειγματοληψία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύματος υποδοχέα και αντικαταστάθηκε από νέα ποσότητα.

Τα διαλύματα αναλύθηκαν ανααίωτα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων ρεσβερατρόλης σε διάλυμα υποδοχέα.

2.3.5.3 Πείραμα διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα

Μεμβράνη

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινη επιδερμίδα η οποία ελήφθη από πλήρες δέρμα με την τεχνική του θερμικού διαχωρισμού όπως περιγράφηκε από τον Kligman (66). Πιο συγκεκριμένα, το δέρμα αφέθηκε εκτός ψύξης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30'. Σε ένα ποτήρι ζέσεως μεταφέρθηκαν περίπου 600 ml απιονισμένου νερού και το οποίο θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο 60°C. Το δέρμα εμβαπτίστηκε στο νερό για

1 λεπτό. Υπό αυτές τις συνθήκες (χαλαρώνουν) οι δεσμοί μεταξύ της επιδερμίδας και του χορίου και είναι ευκολότερος ο διαχωρισμός τους. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν οι υποκείμενες στιβάδες της επιδερμίδας με ειδικές λαβίδες. Μετά την απομόνωσή της, η επιδερμίδα απλώθηκε σε φύλλο αλουμινίου και διατηρήθηκε εντός καταψύκτη στους -10°C μέχρι τη χρησιμοποίησή της. 30' πριν την έναρξη των πειραμάτων αφέθηκε εκτός ψύξης, ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Πείραμα διάχυσης

Τεμάχια της μεμβράνης διαστάσεων περίπου $1.4 \times 1.4 \text{ cm}$ τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμέρισμα-δέκτη του κυττάρου Franz. Από επάνω τοποθετήθηκε δακτύλιος από τεφλόν για τη στήριξη της μεμβράνης και η διάταξη συγκρατήθηκε με μεταλλικό σφιγκτήρα. Για κάθε συνταγή χρησιμοποιήθηκαν 5 κύτταρα λόγω της μεγαλύτερης μεταβλητότητας του πειράματος διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα σε σχέση με τη STRAT-M. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα από το πλευρικό άνοιγμα δειγματοληψίας μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 36°C πάνω σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης και παρέμειναν εκεί για περίπου 20 ώρες. Η θερμοκρασία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της θερμοκρασίας της επιφάνειας του δέρματος.

Μετά το πέρας των 20 ωρών, από κάθε κύτταρο απομακρύνθηκε το διαμέρισμα δότης και με τη βοήθεια κατάλληλης πιπέτας μεταφέρθηκαν 100μl από κάθε γέλη και τοποθετήθηκαν πάνω στο τεμάχιο της μεμβράνης. Κατόπιν, επανατοποθετήθηκε ο σφιγκτήρας και κάθε κύτταρο επιστράφηκε στο υδατόλουτρο.

Ακολούθησαν δειγματοληψίες στα χρονικά διαστήματα 3,6, 12, 24, ωρών. Σε κάθε δειγματοληψία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύματος υποδοχέα και αντικαταστάθηκε από νέα ποσότητα όπως ακριβώς και στο πείραμα διάχυσης με STRAT-M.

Τα διαλύματα αναλύθηκαν αναραίωτα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων ρεοβεραιτρόλης σε διάλυμα υποδοχέα.

2.4 Πειραματική διαδερμική μελέτη με ενισχυτή διαπερατότητας

Μετά την ολοκλήρωση των προκαταρκτικών πειραμάτων μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας, κατόπιν επεξεργασίας των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί μία επόμενη μελέτη σε άμεση συσχέτιση και συνέχεια της πρώτης .

Στόχος της δεύτερης αυτής μελέτης ήταν να πραγματοποιηθεί μια προσπάθεια ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης . Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ενισχυτής διαπερατότητας σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις προκειμένου να συνεκτιμηθεί όχι μόνο η επίδραση της παρουσίας του ενισχυτή στη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης αλλά και η επίδραση της συγκέντρωσης του ενισχυτή.

2.4.1 Επιλογή κατάλληλου φορέα

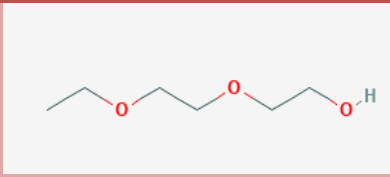
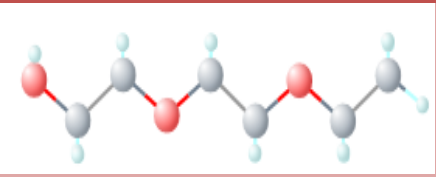
Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τη δεύτερη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης επιλέχθηκε με κριτήριο τη διαδερμική διαπερατότητα του φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα , επιλέχθηκε ο φορέας που έδωσε τη βέλτιστη διαπερατότητα ρεσβερατρόλης στο πείραμα διάχυσης που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινη επιδερμίδα και ήταν ο φορέας του σκευάσματος 2. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά η σύσταση του φορέα του σκευάσματος 2.

ΦΟΡΕΑΣ	
PEG 400-Γλυκερίνη	54%
Νερό	46%

Πίνακας 8. Σύσταση Φορέα

Η διαφορά στην περίπτωση αυτή είναι ότι στο συγκεκριμένο φορέα προστέθηκε και ενισχυτής διαπερατότητας.

Ως ενισχυτής επιλέχθηκε το Transcutol[®] (Diethylene glycol monoethyl ether) καθώς με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι (67) ένας ενισχυτής συμβατός με τη ρεσβερατρόλη χωρίς να προκαλεί διάσπαση του μορίου ή να προκαλεί προβλήματα αστάθειας, αυξάνει τη διαλυτότητα της, είναι κατάλληλος για χρήση στο δέρμα και επίσης δημιουργεί διαυγές διάλυμα με τα υπόλοιπα συστατικά του φορέα.

Transcutol ®	Χημική Δομή	Τρισδιάστατη Απεικόνιση
Diethylene glycol monoethyl ether		

Όπως προαναφέρθηκε εφαρμόστηκαν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις ενισχυτή διαπερατότητας με σκοπό να μελετηθεί τόσο η επίδραση της παρουσίας όσο και της συγκέντρωσης του ενισχυτή στη διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης. Το περιεχόμενο των φορέων σε επιταχυντή διαβατότητας επιλέχτηκε με βάση την πολυετή εμπειρία του εργαστηρίου και οι 2 συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν 5% v/v και 10% v/v αφαιρώντας πάντα την αντίστοιχη ποσότητα του ενισχυτή που προστέθηκε από την ποσότητα του νερού που εμπερέχεται στον φορέα. Πιο συγκεκριμένα, οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Φορέας	Peg 400- Γλυκερολη	Νερό	Ενισχυτής Διαπερατότητας Transcutol ®
1	54%	41%	5%
2	54%	36%	10%

Πίνακας 9. Σύσταση των τελικών φορέων με ενισχυτή διαπερατότητας

2.4.2 Πειράματα προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού

Για την παρασκευή των τελικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης ,τα οποία ήταν γέλες, προηγήθηκε ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού του φαρμάκου σε πρόδρομους φορείς οι οποίοι είχαν την ίδια σύσταση με τις γέλες αλλά δεν περιείχαν παράγοντα σχηματισμού γέλης (Aristoflex® AVC). Αυτό έγινε με σκοπό τα τελικά σκευάσματα να περιέχουν τη ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση κορεσμού καθώς έτσι θα επιτευχθεί η μέγιστη θερμοδυναμική ενεργότητα. Οι πρόδρομοι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτοί που αναφέρονται στο παραπάνω πίνακα 7

Τα παραπάνω συστατικά τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια και αναδεύτηκαν με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Κατόπιν, προστέθηκε περίσσεια ρεσβερατρόλης και τα φιαλίδια παρέμειναν υπό ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 25°C για 24 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των υπέρκορων διαλυμάτων με ταχύτητα 5.000 στροφών / λεπτό για 10 λεπτά στους 25°C και διήθηση με ηθμούς διαμέτρου πόρων 0.45 μ. Από τα διηθήματα ελήφθη όγκος 100μl και ακολούθησε αραίωση με κινητή φάση έως τη χαραγή σε ογκομετρικές φιάλες 100 ml. Απαιτήθηκε

δεύτερη αραιώση 1:20 ή 1:40 λόγω μεγάλης συγκέντρωσης σε ρεσβερατρόλη. Τα διαλύματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων ρεσβερατρόλης σε κινητή φάση. Κάθε πρόδρομος φορέας παρασκευάστηκε εις τριπλούν.

2.4.3 Παρασκευή των γελών

Οι γέλες που τελικά παρασκευάστηκαν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη ενίσχυσης διαδερμικής διαπερατότητας ήταν 3 και φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Συνταγή 1	Συνταγή 2	Συνταγή 3
PEG400-Γλυκερίνη	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)
Νερό	46% (v/v)	41% (v/v)	36% (v/v)
Transcutol	-	5%(v/v)	10% (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	2,5%(w/v)	5,3% (w/v)	8,09%(w/v)
PEG400-Γλυκερίνη	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)

Πίνακας 10. Τελικές συνταγές με ενισχυτή διαπερατότητας

Το σκεύασμα 1 είναι το μοναδικό που δεν περιέχει Transcutol[®] και είναι η συνταγή που στην προκαταρκτική μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας σε κεράτινη στιβάδα έδωσε τη βέλτιστη διαπερατότητα γι' αυτό κι έτσι όπως εξηγήθηκε στην αρχή της ενότητας ο φορέας του σκευάσματος αυτού επιλέχθηκε για τη 2^η μελέτη όπου προστέθηκε και ο ενισχυτής διαπερατότητας. Στην μελέτη ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκε ως control προκειμένου να διαπιστωθεί με μέγιστη ακρίβεια η επίδραση της παρουσίας του ενισχυτή.

Οι γέλες παρασκευάστηκαν, όπως και στην περίπτωση των προκαταρκτικών πειραμάτων, με ανάμιξη των συστατικών του κάθε φορέα εντός φιαλιδίων. Η διαδικασία περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 2.3.2

2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν να ελεγχθούν οι γέλες πριν από τη χρήση τους σε πείραμα διάχυσης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η δραστική ουσία έχει προστεθεί στη σωστή ποσότητα, αλλά και ότι διατηρείται σταθερή και δεν διασπάται ούτε επηρεάζεται από την προσθήκη του ενισχυτή. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών έναν μήνα μετά την παρασκευή τους προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα των σκευασμάτων. Στο διάστημα που μεσολάβησε μέχρι το δεύτερο ποσοτικό προσδιορισμό οι γέλες διατηρήθηκαν σε ψυγείο (~4oC).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γελών περιγράφηκε παραπάνω στην ενότητα 2.3.3

2.4.5 In vitro πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας

Σε αντιστοιχία με την 1^η πειραματική διαδερμική μελέτη της ρεσβερατρόλης, για την in vitro μελέτη της διαπερατότητας της δραστικής ουσίας μετά την προσθήκη του ενισχυτή, πραγματοποιήθηκε πείραμα διάχυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν και πάλι κύτταρα διάχυσης του Franz, κατασκευασμένα από σκοτεινόχρωμη ύαλο με επιφάνεια διάχυσης 0,636 cm² και όγκο 6,275 ml. Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα διάχυσης χρησιμοποιώντας απευθείας ανθρώπινη επιδερμίδα χωρίς να προηγηθεί πείραμα σε συνθετική μεμβράνη STRAT-M.

2.4.5.1 Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα

Το διάλυμα του υποδοχέα που είναι μείγμα προπυλενογλυκόλης- νερού σε αναλογία όγκων 50-50, είναι προφανώς το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην 1^η πειραματική μελέτη και η διαδικασία παρασκευής του περιγράφηκε προηγουμένως στην ενότητα. 2.3.5.1

Μεμβράνη

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανθρώπινη επιδερμίδα η οποία ελήφθη από πλήρες δέρμα με την τεχνική του θερμικού διαχωρισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε λεπτομερώς στην ενότητα.2.3.5.3

Πείραμα διάχυσης

Η διαδικασία ήταν ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε στο προηγούμενο πείραμα διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα και περιγράφεται λεπτομερώς στην ενότητα. 2.3.5.3

3 IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ- ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Μετά την ολοκλήρωση των in vitro πειραμάτων μελέτης της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης και λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την in vitro μελέτη, κρίθηκε πως θα ήταν σημαντικό να προχωρήσουμε σε in vivo πειράματα σε μύες προκειμένου να διερευνήσουμε την ισχύ της αντιφλεγμονώδους δράσης των σκευασμάτων που μας έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τη διαπερατότητα

3.1 Υλικά, Όργανα και Συσκευές

Υλικά

Δραστική ουσία: Ρεσβερατρόλη (Batch no.6900/04/05. FAGRON, Greece)

Σκευάσματα

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας στη μελέτη μας ήταν

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Σκεύασμα 1	Σκεύασμα 2	Σκεύασμα 3	Φορέας
PEG400- Γλυκερίνη	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)
Νερό	46% (v/v)	41% (v/v)	41% (v/v)	41% (v/v)
Transcutol	-	5%	5% (v/v)	-
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	2,5%(w/v)	2,5% (w/v)	5,3% (w/v)	-

Πίνακας 11. Σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην In Vivo μελέτη

Τα παραπάνω σκευάσματα έχουν επιλεγεί ώστε να μπορούμε να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα για το πως επηρεάζουν την κλινική αποτελεσματικότητα η παρουσία του ενισχυτή διαπερατότητας, καθώς και η μεγαλύτερη θερμοδυναμική ενεργότητα η οποία επιτυγχάνεται όταν η δραστική βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, το σκεύασμα 1 δεν περιλαμβάνει ενισχυτή διαπερατότητας, ενώ η ρεσβερατρατρόλη βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού. Το σκεύασμα 2 περιλαμβάνει ενισχυτή διαπερατότητας αλλά η ρεσβερατρόλη δεν βρίσκεται σ

συγκέντρωση κορεσμού και το σκεύασμα 3 περιλαμβάνει ενισχυτή διαπερατότητας και τη ρεοθεραπεία σε συγκέντρωση κορεσμού.

Όργανα και Συσκευές

- Universal Arc Lamp Housing 66021, Xenon Lamp 1000W, Oriel Instruments
- 68820 Universal Power Supply, Oriel Instruments
- TEWAMETER® TM 240 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)
- CORNEOMETER® CM 820 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany).
- Ερυθρόμετρο της Courage Khazaka
- Cutometer MPA 580 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany).
- Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF
- Ψηφιακό παχύμετρο
- Ζυγός

3.2 Ζωικό πειραματικό πρωτόκολλο και Πειραματική διαδικασία:

3.2.1 Ζωικό πειραματικό πρωτόκολλο

Τα πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας ήταν το εξής:

Τριανταδύο(32) άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-1 χωρίστηκαν σε 4 ομάδες των 8. Σε όλους τους μύες προκλήθηκε φλεγμονή με άπαξ ακτινοβολήση (2,5 MED). Σε κάθε μία από τις ομάδες εφαρμόστηκε κάποιο από τα σκευάσματα Ρεοθεραπείας που αναφέρονται στον πίνακα. 9 ενώ μία ομάδα έλαβε θεραπεία με το φορέα (Μάρτυρες). Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των μυών σε ομάδες φαίνεται παρακάτω:

- 1) **Ομάδα Μάρτυρες** : Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή του φορέα
- 2) **Ομάδα 1:** Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή τοπικού σκευάσματος 1
- 3) **Ομάδα 2:** Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή τοπικού σκευάσματος 2
- 4) **Ομάδα 3:** Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή τοπικού σκευάσματος 3

Προκειμένου να προκληθεί φλεγμονή, η ράχη των μυών (εμβαδό 4 cm²) ακτινοβολήθηκε άπαξ με υπεριώδη ακτινοβολία ισχύος στη UVA περιοχή του φάσματος ίση με 6 mW/cm² και στη UVB φάσματος ίση με 6,5 mW/cm². Ο χρόνος ακτινοβολήσης ήταν ίσος με 15s, έτσι ώστε τελικά η συνολική ενέργεια που δέχθηκε κάθε μυς ήταν ίση με 2,5 μέσες ερυθρηματώδης δόσεις (2,5 MED). Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε με ειδική για

δερματολογικές εφαρμογές λυχνία τύπου ξένον (Universal Arc Lamp Housing 66021, Xenon Lamp 1000W, Oriel Instruments) η οποία είναι συνδεδεμένη με κατάλληλο τροφοδοτικό (68820 Universal Power Supply, Oriel Instruments).

Το πρωτόκολλο διήρκησε συνολικά 19 ημέρες. Τις 4 πρώτες ημέρες γινόταν επάλειψη των ομάδων με σκοπό να διερευνηθεί πιθανή προληπτική δράση των σκευασμάτων. Η ακτινοβολήση πραγματοποιήθηκε το πρωί της πέμπτης ημέρας και έπειτα ακολούθησε η επάλειψη η οποία συνεχίστηκε μέχρι και την τελευταία ημέρα. Για να βεβαιωθεί ότι τα σκεύασματα θα παρέμεναν στην ακτινοβοληθείσα περιοχή, μετά από κάθε εφαρμογή, το σημείο επάλειψης καλυπτόταν με επίδεσμο επαρκούς μεγέθους. Στην αρχή(πριν την έναρξη των επαλείψεων), κατά τη διάρκεια του πειράματος(κάθε τρεις μέρες) και στο τέλος του πειράματος ελήφθησαν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- ✓ Μέτρηση του πάχους του δέρματος στην ακτινοβοληθείσα περιοχή με ψηφιακό παχύμετρο προκειμένου να μελετηθεί πιθανή υπερκεράτωση.
- ✓ Μέτρηση διαδερμικής άδηλης απώλειας νερού (TEWL) η οποία βοηθά στην εκτίμηση του φραγμού του δέρματος και της λειτουργίας αυτού.
- ✓ Μέτρηση της ενυδάτωσης του δέρματος.
- ✓ Μέτρηση της ερυθρότητας και τέλος
- ✓ Μέτρηση ελαστικότητας

Επιπλέον μετά την ακτινοβολήση, λαμβάνονταν ανά δύο ημέρες ψηφιακές εικόνες από τη ράχη των ζώων(ακτινοβοληθείσα περιοχή), οι οποίες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν μέσω ειδικού λογισμικού.

Τέλος, την τελευταία ημέρα του πειράματος, ελήφθησαν δείγματα της κεράτινης στιβάδας με τη διαδικασία του stripping. Σε ράχη άτριχου μυός 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 μυός. 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. Παράλληλα επιλέχθηκαν 2 μύες από κάθε ομάδα, με επίπεδο φλεγμονής όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερο της κάθε ομάδας, ώστε τμήμα του δέρματός τους να δοθεί για περαιτέρω ιστοπαθολογική εξέταση. Στον παρακάτω πίνακα γίνεται συνοπτική περιγραφή του πρωτόκολλου.

ΟΜΑΔΕΣ	ΑΡΙΘΜ. ΜΥΩΝ	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΕΠΑΛΕΙΨΗ	ΣΚΕΥΑΣΜΑ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ
Ομάδα Μάρτυρες	8	3-5 μηνών	Φλεγμονή	19 ημέρες (4 ημ. προληπτική επάλειψη +14 ημ. επάλειψη μετά την ακτινοβολήση)	1 φορά ημερησίως- κάλυψη με επίδεσμο	Φορέας	Ενυδάτωση, TEWL, Ευθρότητα, Πάχος δέρματος, Ελαστικότητα, Λήψη φωτογραφιών
Ομάδα 1						Σκεύασμα 1	
Ομάδα 2						Σκεύασμα 2	
Ομάδα 3						Σκεύασμα 3	

Πίνακας 12. Περιγραφή Ζωικού Πρωτοκόλλου

3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Πειραματόζωα:

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-1, ηλικίας 3-5 μηνών. 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 ξένον 1000W (Oriel)

Όπως εξηγήθηκε νωρίτερα κατά την περιγραφή του πρωτοκόλλου, κάθε μυς ακτινοβολήθηκε για 15sec (~2,5 M.E.D.) Η λάμπα ξένον 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).

Επάλειψη σκευασμάτων:

Η επάλειψη πραγματοποιούνταν καθημερινά μία φορά ημερησίως σε κάθε μυ με τη βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας στο άνω μέρος της ράχης τους όπου πραγματοποιήθηκε και η ακτινοβολήση. Μέτα από κάθε επάλειψη, η επαληφθείσα περιοχή καλυπτόταν με επίδεσμο κατάλληλου μεγέθους προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι το σκεύασμα θα παρέμενε στην

φλεγμαίνουσα περιοχή. Η ποσότητα του σκευάσματος που εφαρμόστηκε ήταν $0,5\text{mg}/\text{cm}^2$ ακτινοβοληθείσας περιοχής. Η περιοχή που ακτινοβολήθηκε ήταν περίπου 4 cm^2 άρα συνολικά η εφαρμοζόμενη ποσότητα ήταν 2 mg ημερισίως. Τα σκευάσματα φυλάσσονταν σε σκοτεινό συρτάρι λόγω της φωτοευαισθησίας της δραστικής ουσίας. Δεν διατηρήθηκαν σε ψυγείο διότι η δραστική ουσία βρισκόταν σε κάποια σκευάσματα σε συγκέντρωση κορεσμού κι έτσι υπήρχε κίνδυνος δημιουργίας ιζήματος.

3.3 Μέθοδοι εκτίμησης μετρήσιμων παραμέτρων

Για να γίνει σωστή εκτίμηση του βαθμού φλεγμονής των μυών αλλά και σωστή εκτίμηση της επίδρασης των σκευασμάτων ρεσβερατρόλης και του φορέα, πραγματοποιήθηκαν οι διαδερμικές μετρήσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως επίσης ελήφθησαν και φωτογραφίες στα σημεία των βλαβών στην αρχή, μέση και τέλος του πειράματος.

3.3.1 Μέτρηση Άδηλης Απώλειας νερού

Όργανο: TEWAMETER® TM 240

Η μέτρηση της άδηλης απώλεια ύδατος πραγματοποιήθηκε με το όργανο TEWAMETER® TM 240 (Courage-Khazaka, Germany). Η συγκεκριμένη παράμετρος μας δίνει την ικανότητα αξιολόγησης της λειτουργίας 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 $g/h/m^2$.

3.3.2 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.

3.3.3 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.

3.3.4 Μέτρηση ερυθρότητας του δέρματος :

Όργανο: MEXAMETER® MX 18

Η μέτρηση της ερυθρότητας πραγματοποιήθηκε με το όργανο MEXAMETER® MX 18 (Courage-Khazaka, Germany). η αρχή λειτουργίας του οργάνου βασίζεται στην απορρόφηση και στην ανάκλαση της ακτινοβολίας. Για τη μέτρηση της ερυθρότητας ο αισθητήρας εκπέμπει σε μήκη κύματος τα οποία αντιστοιχούν στις κορυφές απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης. Ένας δέκτης μετρά την ακτινοβολία που ανακλάται από την επιδερμίδα. Η ποσότητα της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι καθορισμένη, επομένως υπολογίζεται από το όργανο η ποσότητα που έχει απορροφηθεί.

3.3.5 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.

3.3.6 Φωτοτεκμηρίωση:

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

Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση φωτογραφικής μηχανής Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF, η οποία βρισκόταν σε απόσταση 30cm κάθετα από το αντικείμενο φωτογράφισης.

4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν τόσο από την in vitro όσο και από την in vivo πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικοί μέθοδοι ανάλυσης. Για την εύρεση του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Excel[®] (Microsoft Office 2007) ενώ για στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS για Windows (έκδοση 22.0; SPSS, Inc, an IBM Company, Chicago, IL). Παρακάτω επεξηγούνται λεπτομερώς τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

- **Έλεγχος κανονικότητας**

Κατά την έναρξη της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων προκειμένου να αποφασιστεί αν θα χρησιμοποιηθούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Ο έλεγχος κανονικότητας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov και το κριτήριο

Shapiro-Wilk τα οποία αποτελούν 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).

- ✓ **In Vitro Πείραμα:** Όσον αφορά το in vitro πείραμα στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωρίστα για τα Franz κύτταρα που αντιστοιχούν σε κάθε συνταγή και ξεχωριστά για κάθε μια από τις χρονικές στιγμές που ελήφθησαν τα δείγματα. Η παράμετρος που ελέγχθηκε για κανονικότητα είναι η αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης[Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)] που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο.
- ✓ **In Vivo Πείραμα:** Όσον αφορά το in vivo πείραμα στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωρίστα για καθεμία ομάδα των μυών, ξεχωριστά κάθε χρονική στιγμή και ξεχωριστά για κάθε μία από τις εκτιμώμενες παραμέτρους (πχ ενυδάτωση, TEWL).

▪ **ANOVA-Analysis of Variance**

Η ανάλυση διασποράς (ANOVA) εφαρμόστηκε προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των μέσων όρων περισσότερων από δύο ομάδων-δειγμάτων. Η κύρια αρχή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) είναι ότι η συνολική διασπορά που παρατηρείται σε μία μέτρηση, προέρχεται από δύο πηγές:

- Από τη διακύμανση μεταξύ των ομάδων (Μ.Ο.). Πιο συγκεκριμένα, για κάθε μία από τις ομάδες -δείγμα της μελέτης μας προκύπτει διαφορετικός μέσος όρος. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των μέσων όρων, δηλαδή όσο μεταβάλλονται οι μετρήσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, τόσο πιθανότερο είναι να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση.
- Από τη διακύμανση εντός των ομάδων (Ε.Ο.). Όπως είναι αναμενόμενο δεν λαμβάνεται η ίδια τιμή από όλα τα υποκείμενα-άτομα της ίδιας ομάδας. Αυτή η πηγή διαφοροποίησης των μετρήσεων αναφέρεται και ως σφάλμα. Όσο μικρότερο είναι το σφάλμα της μέτρησης, δηλαδή όσο μικρότερες οι διαφορές μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας τόσο πιθανότερο είναι να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ANOVA παρατηρήθηκε η τιμή σημαντικότητας αλλά εφαρμόστηκαν και κριτήρια post-hoc. Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν ήταν: το LSD (Least Significant Difference) και το Tukey. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p \leq 0,05$.

- **Paired t-test**

Το κριτήριο t εφαρμόζεται σε εξαρτημένα δείγματα και αποσκοπεί να ελέγξει 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). (68)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5 IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ

5.1 Πειράματα λήψεως φάσματος απορρόφησης υπεριώδους-ορατού της ρεσβερατρόλης

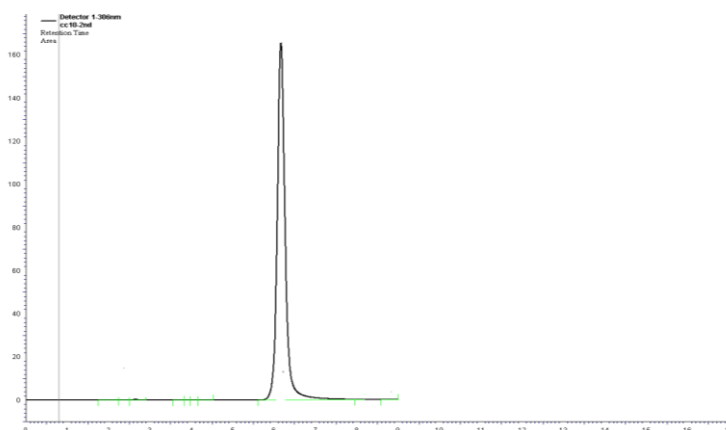
Η λήψη του φάσματος απορρόφησης της ρεσβερατρόλης έγινε με σκοπό να προσδιοριστεί το μήκος κύματος, όπου η δραστική ουσία παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας. Το φάσμα απορρόφησης της ρεσβερατρόλης ελήφθη σε διάλυμα κινητής φάσης η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του φαρμάκου με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Βρέθηκε ότι η ρεσβερατρόλη απορροφά επαρκώς στην χρησιμοποιούμενη περιοχή ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και δεν απαιτείται η μετατροπή της. Το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην μέγιστη απορρόφηση είναι τα 306nm.

5.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

5.2.1 Εμφάνιση χρωματογραφήματος

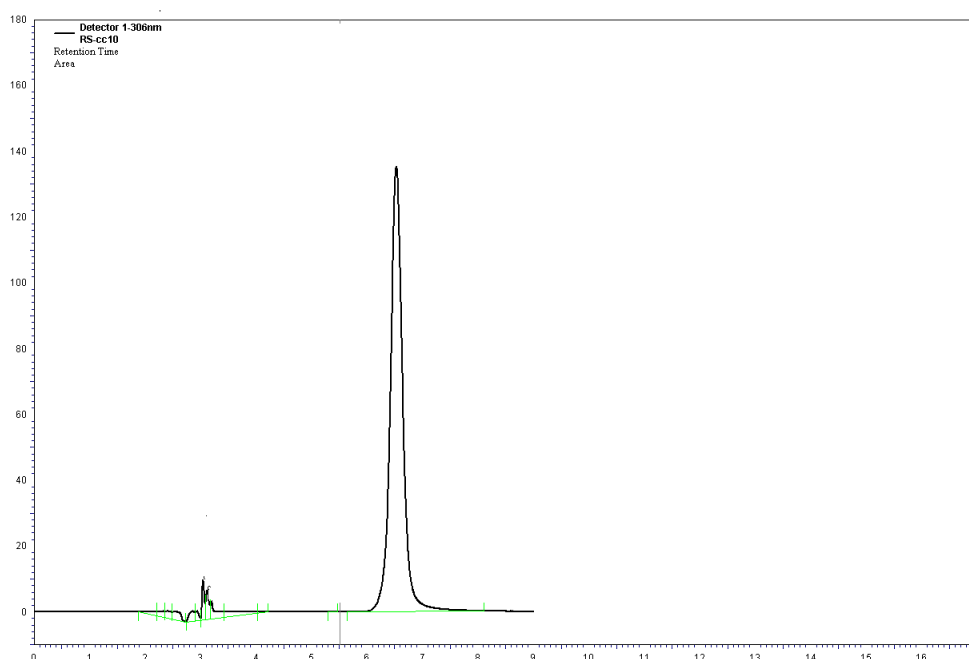
Η ανάλυση πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 10μg/ml εντός κινητής φάσης υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα 2.2.2.1 έδωσε το χρωματογράφημα που απεικονίζεται παρακάτω. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι στα ~ 6,5 min.



Εικόνα 29. . Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 10 μg/ml σε διάλυμα σε κινητή φάση

5.2.2 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων χρωματογραφικές κορυφές

Η ανάλυση των δειγμάτων πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα που ήταν μείγμα προπυλενογλυκόλης- νερού σε αναλογία όγκων 50-50 έδειξε ότι η παρουσία προπυλενογλυκόλης δεν επηρεάζει, ούτε παρεμποδίζει τη χρωματογραφική κορυφή. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης 10 $\mu\text{g/ml}$ σε διάλυμα υποδοχέα



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/ml}$ σε διάλυμα υποδοχέα PG/H₂O (50/50 v/v)

5.3 Προκαταρκτικά Πειράματα Διαδερμικής Διαπερατότητας

5.3.1 Επιλογή κατάλληλου φορέα φορέα

Κατόπιν καταλήξεως των συστατικών που θα αποτελούσαν τον φορέα (PEG 400, νερό και γλυκερίνη), ακολούθησε η διαδικασία επιλογής της ποσοτικής σύστασης των επιμέρους συστατικών του.

Κριτήριο για την επιλογή των τελικών αναλογιών PEG 400-νερού-γλυκερίνης στους φορείς ήταν η επίτευξη των συγκεντρώσεων κορεσμού 1%, 2,5%, 5%.

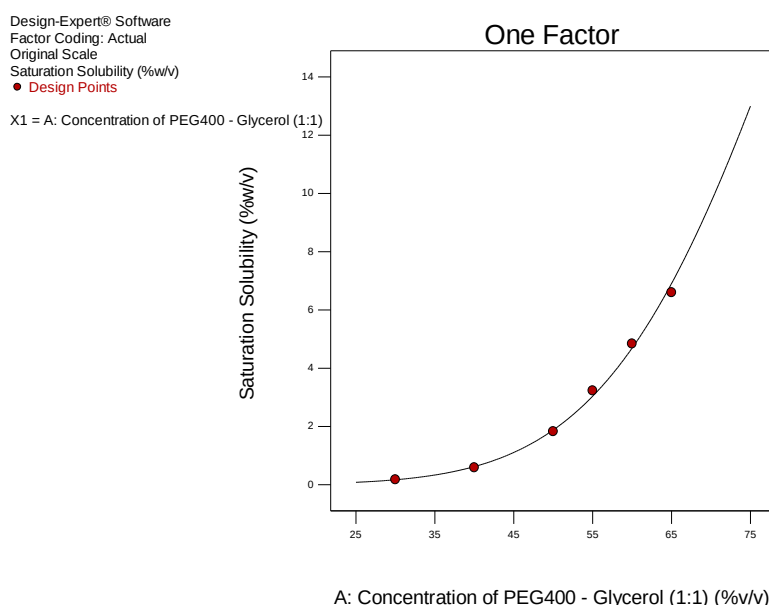
Οι αναλογίες αυτές βρέθηκαν με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού. Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό δημιουργήθηκαν 6 συνταγες με διαφορετικές αναλογίες διαλυτών και ορίστηκε μία απόκριση, η διαλυτότητα του φαρμακού.

Έπειτα λοιπόν από τη διεξαγωγή του πειράματος που περιγράφηκε στην ενότητα. 2.3.1 προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα. 13

Νο συνταγής	A. Peg400-Γλυκερίνη	B. Νερό	Διαλυτότητα κορεσμού (g/100ml)	Σχετική τυπική απόκλιση%
A	60%	40%	4,84	0,12
B	65%	35%	6,72	0,23
Δ	50%	50%	1,82	0,69
E	40%	60%	0,59	0,87
Z	30%	70%	0,175	0,26
H	55%	45%	3,23	1,18

Πίνακας 13. Σύσταση και διαλυτότητες κορεσμού στα προκαταρκτικά πειράματα προσδιορισμού του κατάλληλου φορέα

Η ανάλυση διασποράς που ακολούθησε την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Πίνακα έδειξε πως το μοντέλο μας Quadratic έχει τιμή F 1320.6 και αποδείχτηκε στατιστικά σημαντικό σε επίπεδο 0.05 με αντίστοιχες τιμές πιθανότητας (Prob>F) 0.0192. Η αύξηση PEG400-γλυκερίνης φαίνεται πως αυξάνει τη διαλυτότητα κορεσμού, ενώ η αύξηση του ποσοστού νερού τη μειώνει.



Εικόνα 31. Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης κορεσμού σε συνάρτηση με τη μεταβολή της συγκέντρωση PEG400-Γλυκερίνη

Στη συνέχεια από τα αποτελέσματα που προέκυψαν Διάγραμμα μεταβολής της συγκέντρωσης κορεσμού σε συνάρτηση με τη μεταβολή της συγκέντρωση PEG400-Γλυκερίνη και με τη βοήθεια του πειραματικού σχεδιασμού βρέθηκε ποιες είναι οι αναλογίες που πρέπει να χρησιμοποιηθούν ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις 1, 2,5 και 5%. Οι τελικές αναλογίες των φορέων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικά Φορέα	Φορέας 1	Φορέας 2	Φορέας 3
PEG 400- Γλυκερίνη	44% (v/v)	54% (v/v)	62 (v/v)
Νερό	56% (v/v)	46% (v/v)	38 (v/v)



Για επίτευξη
συγκέντρωσης **1%**
RSV



Για επίτευξη
συγκέντρωσης **2,5%**
RSV



Για επίτευξη
συγκέντρωσης **5%**
RSV

Πίνακας 14. Τελικές αναλογίες φορέων

5.3.2 Παρασκευή των γελών

Τα τελικά σκευάσματα -γέλες, οι οποίες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.6 περιείχαν τη δραστική ουσία σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού στο κάθε φορέα. Στον παρακάτω Πίνακα αναφέρεται η ακριβής σύνθεση κάθε συνταγής .

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Σκεύασμα 1	Σκεύασμα 2	Σκεύασμα 3
PEG 400-Γλυκερίνη	44 % (v/v)	54% (v/v)	62(v/v)
Νερό	56% (v/v)	46% (v/v)	38 (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	1% (w/v)	2,5%(w/v)	5% (w/v)

Πίνακας 15. Συνταγές Ρεσβερατόλης

5.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών

Όπως εξηγήθηκε στην ενότητα 2.3.3 πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής τους και πριν τη διεξαγωγή πειραμάτων διάχυσης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι στα τελικά σκευάσματα έχει προστεθεί η σωστή ποσότητα ρεσβερατρόλης .

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών έναν μήνα μετά την παρασκευή τους προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα των σκευασμάτων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.3 δίνονται στους παρακάτω πίνακες:

T=0

Κωδικός συνταγής	Συγκέντρωση RSV (g/100ml)	Σχετική Τυπική απόκλιση %	% περιεκτικότητα της πραγματικής τιμής ως προς τη θεωρητική
1	1,003	0,45	100,5
2	2,496	2,09	99,84
3	4,961	1,09	99,22

Πίνακας 16. Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των γελών για T=0

T=30 ημέρες

Κωδικός συνταγής	Συγκέντρωση RSV (g/100ml)	Σχετική Τυπική απόκλιση %	% περιεκτικότητα της πραγματικής τιμής ως προς τη θεωρητική
1	1,009	0,37	100,9
2	2,485	1,27	99,4
3	4,973	0,99	99,46

Πίνακας 17. Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των γελών για T=30 ημέρες

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων, βλέπουμε ότι η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης κυμαινόταν μεταξύ του 99% και του 101% της θεωρητικής τιμής. Τα

αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Φαρμακοποιίας που ορίζουν τα αντίστοιχα όρια μεταξύ 85 και 115% της πραγματικής τιμής. Επομένως κρίνονται ως κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας που θα ακολουθήσουν. Ταυτόχρονα τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό που πραγματοποιήθηκε έναν μήνα μετά την παρασκευή των σκευασμάτων αποδεικνύουν τη σταθερότητα της δραστικής στον επιλεγμένο φορέα.

5.3.4 Προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα που περιγράφηκε στην ενότητα 2.3.4 δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Διάλυμα υποδοχέα	Διαλυτότητα κορεσμού (g/100ml)	Σχετική Τυπική απόκλιση%
Προπυλενογλυκόλη-Νερό 50-50	0,58	2,04

Πίνακας 18. Διαλυτότητα κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο υπό εξέταση διάλυμα του υποδοχέα

Ο υπολογισμός της διαλυτότητας κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα αποσκοπεί στον θεωρητικό υπολογισμό του εάν τηρούνται συνθήκες δεξαμενής εντός του διαμερίσματος-δέκτη. Στόχος είναι η επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερης διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα, ώστε να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος διάχυσης.

Πιο συγκεκριμένα, για να επικρατούν συνθήκες δεξαμενής κατά τη διάρκεια του πειράματος διάχυσης, θα πρέπει, η συγκέντρωση της διαχεόμενης ουσίας εντός του διαλύματος του υποδοχέα να διατηρείται χαμηλή και κάτω του 10% της διαλυτότητας κορεσμού της ουσίας στο διάλυμα του υποδοχέα.

Έστω ότι από τα 100 μl γέλης περιεκτικότητας C που τοποθετούνται στο διαμέρισμα δότη θα διαπεράσει το 10% της περιεχόμενης σε αυτά δραστικής ουσίας, ποσό που αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό διαπέρασης. Για να τηρούνται συνθήκες δεξαμενής θα πρέπει η διαλυτότητα κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του δέκτη να είναι δέκα φορές

μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης που αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό διαπέρασης.

Πιο αναλυτικά, παρακάτω παρατίθενται λεπτομερώς οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τηρούνται οι συνθήκες δεξαμενης κατά τη διάρκεια του πειράματος διάχυσης.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Τα σκεύασματα που χρησιμοποιήσαμε έχουν συγκέντρωση ρεσβερατρόλης 1, 2,5 και 5 %. Οι υπολογισμοί που ακολουθούν γίνονται απ' ευθείας για το σκέυασμα ρεσβερατρόλης με συγκέντρωση 5% εφόσον αυτό έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα τρία σκεύασματα. Έτσι αν το διάλυμα του υποδοχέα είναι κατάλληλο για να διατηρήσει συνθήκες δεξαμενης για το σκέυασμα με συγκέντρωση 5%, προφανώς θα είναι κατάλληλο και για τα υπόλοιπα σκεύασματα.

Η ποσότητα γέλης που θα εφαρμόσουμε στα κύτταρα Franz είναι 100μl(0,1ml). Αρα η ποσότητα ρεσβερατρόλης που περιέχεται σε 100μl γέλης με συγκέντρωση 5% είναι:

5 g ρεσβερατρόλης →	σε 100ml σκευάσματος
X g ρεσβερατρόλης→	σε 0,1 ml σκευάσματος

$X=5 \times 0,1/100 \rightarrow X=0,005g$ ρεσβερατρόλης εμπεριέχονται μέσα σε 100μl γέλης με συγκέντρωση 5%.

Από αυτήν την ποσότητα , το μέγιστο ποσοστό που μπορεί να διαπεράσει το δέρμα και να φτάσει στο διάλυμα του υποδοχέα είναι το 10% . Δηλαδή $0,0005g (=0,005/10)$ ρεσβερατρόλης. Αφού το διαμέρισμα του δέκτη των κύτταρων Franz που χρησιμοποιήθηκαν έχει όγκο 6,275 ml, αυτός είναι και ο όγκος του διαλύματος του υποδοχέα. Έτσι αν περάσει στο διαμέρισμα του δέκτη , το 10% της ποσότητας ρεσβερατρόλης που υπάρχει μέσα στην γέλη που τοποθετείται στο διαμέρισμα του δότη(0,0005g), η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα του υποδοχέα θα είναι:

$$C = m/v \rightarrow C=0,0005/6,275 \rightarrow C=0, 00007968 \rightarrow C \sim 0,00008g/ ml \rightarrow C= 0,008g/ 100ml$$

Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς προέκυψε ότι για να ισχύουν συνθήκες δεξαμενής για κάθε συνταγή, η συγκέντρωση κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της διαχεόμενης δραστικής ουσίας. Δηλαδή θα πρέπει να είναι τουλάχιστον πάνω από 0,08 ($=10 \times 0,008$).

Η συγκέντρωση κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα υπολογίστηκε 0,58%. Επομένως το μείγμα προπυλενογλυκόλης-νερού σε αναλογία όγκων 50-50 είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα πλήρωσης του διαμερίσματος του υποδοχέα στα πειράματα μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης.

5.3.5 In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας

Όπως εξηγήθηκε νωρίτερα κατά την προκαταρκτική μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα διάχυσης. Ένα σε τεχνητή μεμβράνη STRAT –M που αποσκοπούσε στο να λάβουμε μια πρώτη εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης περιορίζοντας κατά το δυνατόν τους παραγόντες μεταβλητότητας που συμμετέχουν σε αντίστοιχα πειράματα που γίνονται χρησιμοποιώντας ανθρώπινη επιδερμίδα. Ωστόσο όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα που παρατίθενται παρακάτω, η συνθετική μεμβράνη STRAT-M δεν έδωσε αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα για τη διαδερμική διαπερατότητα ρεσβερατρόλης γι' αυτό και το πείραμα διάχυσης επαναλήφθηκε εξ' ολοκλήρου σε ανθρώπινη επιδερμίδα.

5.3.6 Πείραμα διάχυσης σε τεχνητή μεμβράνη STRAT-M

5.3.6.1 Αποτελέσματα-Στατιστική επεξεργασία

Όπως προαναφέρθηκε για την εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης πραγματοποιήθηκε πείραμα διάχυσης σε κύτταρα Franz. Το 1^ο πείραμα διάχυσης πραγματοποιήθηκε σε συνθετική μεμβράνη Strat-M. Κατά την πρώτη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης, χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές συνταγές, με διαφορετική αναλογία διαλυτών και αύξουσα συγκέντρωση ρεσβερατρόλης. Οι συνταγές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Συνταγή 1	Συνταγή 2	Συνταγή 3
----------	-----------	-----------	-----------

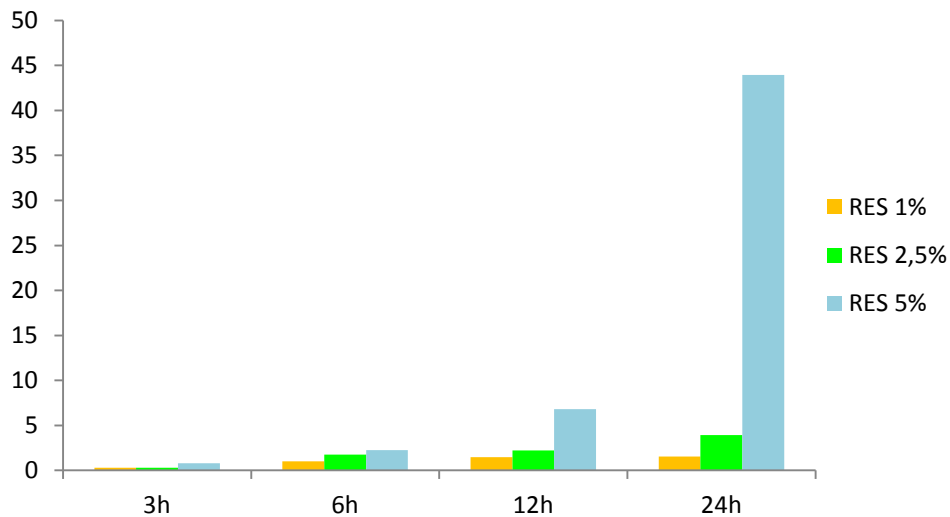
PEG 400- Γλυκερίνη	44 % (v/v)	54% (v/v)	62 (v/v)
Νερό	56% (v/v)	46% (v/v)	38 (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	1% (w/v)	2,5%(w/v)	5% (w/v)

Πίνακας 19. Συνταγές Ρεσβερατρόλης που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα διάχυσης σε Strat-M

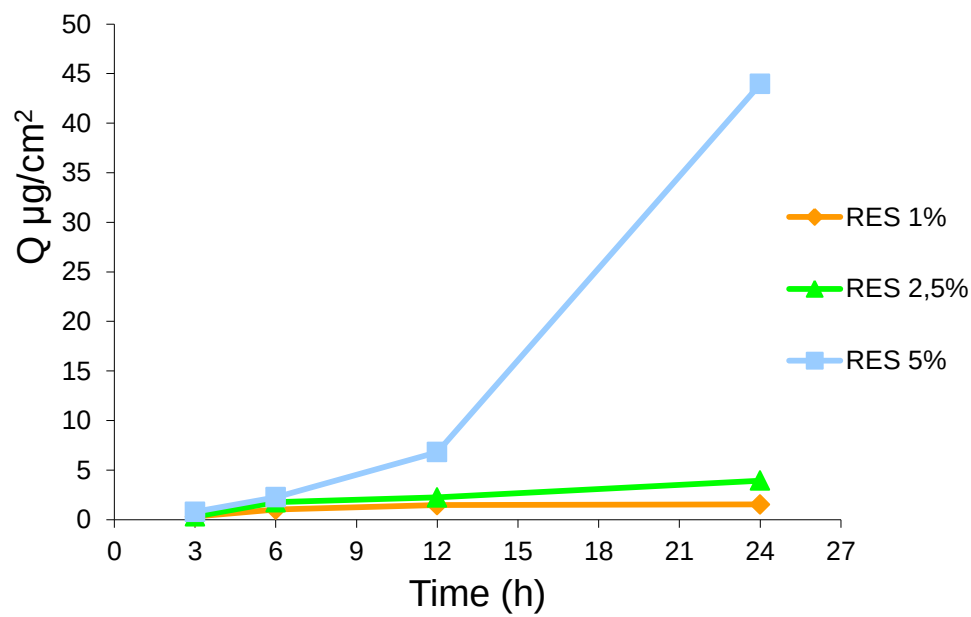
Προκειμένου να εκτιμηθεί η διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης, η εξαρτημένη μεταβλητή, που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος, ήταν η ποσότητα της ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας στις 3, 6, 12 και 24h από την έναρξη του πειράματος. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα για τη διαδερμική διαπερατότητα των τριών συνταγών. Συγκεκριμένα παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης [$Q = (C \cdot V) / A$ (μg/cm²)] που διαπέρασε την συνθετική μεμβράνη στις 3, 6, 12 και 24 ώρες και για τις 3 συνταγές :

Q μg/cm ²	Συνταγή 1 RES 1% ±SD	Συνταγή 2 RES 2,5%±SD	Συνταγή 3 RES 5% ±SD
Q-3h	0,30 (±0,05)	0,32 (±0,06)	0,78 (±0,11)
Q-6h	1,01 (±0,18)	1,75 (±0,27)	2,25 (±0,40)
Q-12h	1,47 (±0,38)	2,24 (±0,25)	6,80 (±1,62)
Q-24h	1,53 (±0,40)	3,94 (±0,37)	43,96 (±19,61)

Πίνακας 20. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm²) που διαπέρασε την συνθετική



Διάγραμμα 1. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη ανά μονάδα επιφάνειας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος



Διάγραμμα 2. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη σε συνάρτηση με το χρόνο.

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε τη μεμβράνη σε συνάρτηση με το χρόνο (3, 6, 12, 24 ώρες) ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Συνταγή 1- RES 1%	Συνταγή 2- RES 2,5%	Συνταγή 3- RES 5%
Q3h	0,203	0,834	0,282
Q6h	0,236	0,107	0,613
Q12h	0,117	0,758	0,617
Q24h	0,203	0,985	0,157

Πίνακας 21. Τιμές κριτηρίου κανονικότητας (W-S ή K-S) για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

ONE WAY ANOVA

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης από τα τρία σκευασμάτα προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διαπερατότητα μεταξύ των σκευασμάτων. Η σύγκριση των μετρήσεων γίνεται μεταξύ των σκευασμάτων ξεχωριστά για κάθε χρονική στιγμή κατά την οποία ελήφθησαν δείγματα (3, 6, 12, 24h). Η παράμετρος που χρησιμοποιούμε για τη σύγκριση της διαπερατότητας μεταξύ των σκευασμάτων είναι η αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24h αντίστοιχα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της σύγκρισης για κάθε χρονική στιγμή. Τα post hoc κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι το LSD και το Tukey. Ουσιαστικά η ANOVA μας δείχνει εάν οι ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους. Τα post-hoc κριτήρια είναι αυτά που δείχνουν ποιες ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνται σημαντικές όταν η τιμή σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 και άρα μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση ότι οι ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους.

Στον παρακάτω πίνακα 22 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη στις 3h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 2-RES 2,5%)	0,743	LSD
	0,938	Tukey
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey
(Συνταγή 2-RES 2,5%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,000	LSD
	0,001	Tukey

Πίνακας 22. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 3h.

Στον παρακάτω πίνακα 23 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 6h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 2-RES 2,5%)	0,027	LSD
	0,061	Tukey
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,003	LSD
	0,006	Tukey
(Συνταγή 2-RES 2,5%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,093	LSD
	0,194	Tukey

Πίνακας 23. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 6h.

Στον παρακάτω πίνακα 24 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 12h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 2-RES 2,5%)	0,376	LSD
	0,628	Tukey
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,001	LSD
	0,001	Tukey
(Συνταγή 2-RES 2,5%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,001	LSD
	0,003	Tukey

Πίνακας 24. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 12h.

Στον παρακάτω πίνακα 25 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 24h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 2-RES 2,5%)	0,806	LSD
	0,964	Tukey
(Συνταγή 1-RES 1%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,004	LSD
	0,009	Tukey
(Συνταγή 2-RES 2,5%)-(Συνταγή 3-RES 5%)	0,005	LSD
	0,012	Tukey

Πίνακας 25. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη στις 24h.

5.3.6.2 Συζήτηση

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 20 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24h καθώς και τα αντίστοιχα διάγραμμα, βλέπουμε το σκεύασμα 3-RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα που διαπέρασε την επιδερμίδα, δεύτερο σε σειρά είναι το σκεύασμα 2-RES-2,5% και τρίτο είναι το σκεύασμα 1-RES-1%. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει μία τάση να αυξάνεται η διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο σκεύασμα. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται μεταξύ των σκευασμάτων είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

3 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 21 βλέπουμε πως στις 3 ώρες το σκεύασμα 3- RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη συνθετική μεμβράνη και η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις τιμές Q των σκευασμάτων 1 και 2. Αυτό υποδεικνύει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης που υπάρχει στο σκεύασμα 3 ευνόησε σημαντικά τη διαπερατότητα από τη συνθετική μεμβράνη. Τη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή Q την παρουσιάζει το σκεύασμα 2-RES 2,5% και την τρίτη το σκεύασμα 1-RES 1%, ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

6 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 βλέπουμε πως και στις 6 ώρες διατηρείται ίδια η σειρά των σκευασμάτων ως προς τη διαπερατότητα. Συγκεκριμένα, το σκεύασμα 3- RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή Q. Η διαφορά αυτή φαίνεται πως είναι στατιστικά σημαντική κατά τη σύγκριση με το σκεύασμα 1 όχι όμως και κατά τη σύγκριση με το σκεύασμα 2. Επιπλέον το σκεύασμα 1 παρουσιάζει τη μικρότερη διαπερατότητα διαφέροντας σημαντικά από τα άλλα δύο σκευάσματα. Βλέπουμε λοιπόν πως και στις 6 ώρες υπάρχει μία τάση να αυξάνεται η διαπερατότητα της δραστικής ουσίας όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο σκεύασμα.

12 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 23 βλέπουμε πως και στις 12 ώρες διατηρείται η ίδια σειρά, με το σκεύασμα 3 να διαφέρει σημαντικά από τα άλλα δύο σκευάσματα 1 και 2. Ωστόσο τα σκευάσματα 1 και 2 δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους .

24 ώρες

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ακριβώς αντίστοιχα με αυτά στις 12 ώρες. Τα σκευάσματα 1 και 2 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μικρότερη διαπερατότητα από το σκεύασμα 3, ωστόσο δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Δηλαδή και πάλι στις 12 και στις 24 ώρες φαίνεται πως η επίδραση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης (5%) είχε σημαντική επίδραση στη διαπερατότητα.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από τη στατιστική επεξεργασία τους βλέπουμε πως υπάρχει μία ξεκάθαρη τάση να αυξάνεται η διαπερατότητα της ουσίας όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο σκεύασμα. Ωστόσο από τα διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη σε συνάρτηση με το χρόνο, βλέπουμε για τη συνταγή 3, μια πολύ απότομη αύξηση της διαπερατότητας μετά τις 12h, στοιχείο που δεν συνάδει με τη διαπερατότητα των άλλων δυο σκευασμάτων, ούτε με τη διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης που βρέθηκε σε άλλες διαδερμικές μελέτες της βιβλιογραφίας. (63), (62)Η τεχνητή μεμβράνη STRAT-M® που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα τεχνητό, μη βασισμένο σε ζώα μοντέλο για την μελέτη της διαπερατότητας φαρμακευτικών ουσιών μέσω του δέρματος. Έχει χρησιμοποιηθεί για πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών με καλή προβλεψιμότητα, όμως έχουν υπάρξει και περιπτώσεις δραστικών ουσιών που δεν αποτέλεσε αντιπροσωπευτικό μοντέλο της διαπερατότητας από το δέρμα. Επιπλέον καθώς δεν υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία στη βιβλιογραφία για τη διαπερατότητα της

ρεσβερατρόλης από συνθετική μεμβράνη STRAT-M και προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια πιο αντιπροσωπευτική μελέτη της διαπερατότητας της , το πείραμα επαναλήφθηκε εξ'ολοκλήρου σε ανθρώπινη κεράτινη στιβάδα.

5.3.7 Πείραμα διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα

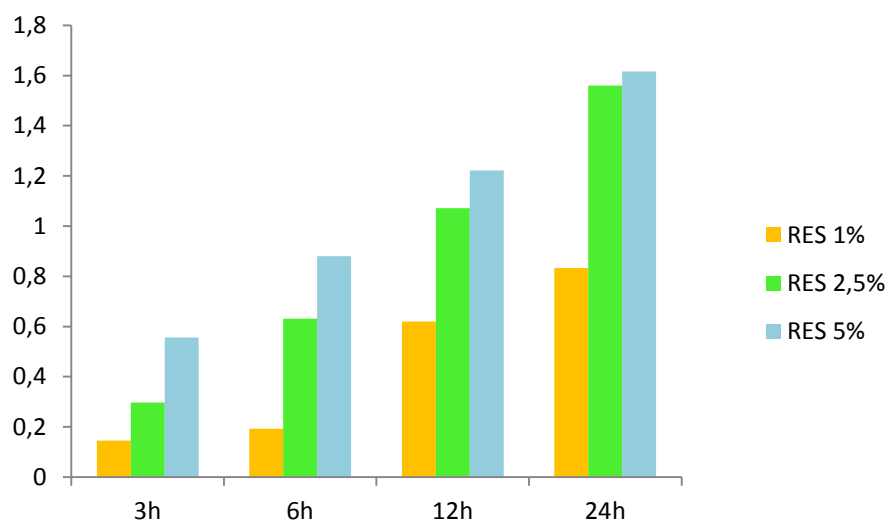
5.3.7.1 Αποτελέσματα –Στατιστική επεξεργασία

Κάθως από το πείραμα διάχυσης σε συνθετική μεμβράνη STRAT-M δεν καταφέραμε να βγάλουμε συμπεράσματα για τη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης, το πείραμα επαναλήφθηκε εξ'ολοκλήρου σε ανθρώπινη κεράτινη στιβάδα. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται ο μέσος όρος όρος και η τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης [$Q = (C \cdot V) / A$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)] που διαπέρασε την ανθρώπινη μεμβράνη στις 3, 6, 12 και 24 ώρες και για τις 3 συνταγές

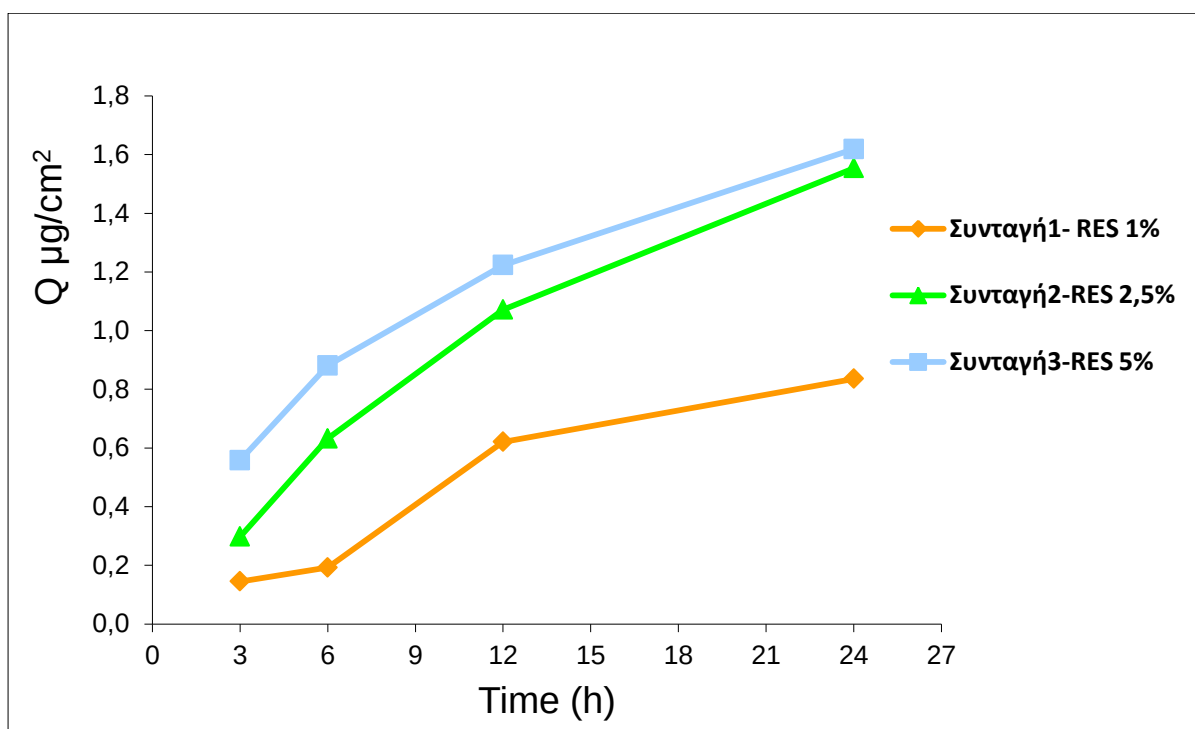
Q $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Συνταγή 1 RES 1% $\pm$ SD	Συνταγή 2 RES 2,5% $\pm$ SD	Συνταγή 3 RES 5% $\pm$ SD
Q-3h	0,15 ($\pm 0,01$)	0,30 ($\pm 0,08$)	0,56 ($\pm 0,18$)
Q-6h	0,19 ($\pm 0,02$)	0,63 ($\pm 0,1$)	0,88 ($\pm 0,14$)
Q-12h	0,62 ($\pm 0,04$)	1,07 ($\pm 0,16$)	1,22 ($\pm 0,16$)
Q-24h	0,84 ($\pm 0,06$)	1,55 ($\pm 0,22$)	1,62 ($\pm 0,18$)

Πίνακας 26. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές

Στα παρακάτω διαγράμματα παριστάνεται γραφικά η αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) σε συνάρτηση με τον χρόνο.



Διάγραμμα 3. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας Q (μg/cm²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος



Διάγραμμα 4. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο.

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο (3, 6, 12, 24 ώρες) ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Shapiro-wilk (S-W) ή Kolomgorov-Smirnov. Για το σκοπό τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 27**

Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Συνταγή 1- RES 1%	Συνταγή 2- RES 2,5%	Συνταγή 3- RES 5%
Q3h	0,972	0,18	0,179
Q6h	0,161	0,067	0,346
Q12h	0,207	0,200	0,263
Q24h	0,233	0,113	0,167
Κριτήριο Κανονικότητας	W-S	K-S	W-S

Πίνακας 27. Τιμές κριτηρίου κανονικότητας (W-S ή K-S) για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας των κριτηρίων K-S και S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές της Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ακολουθούν κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η ANOVA.

ONE WAY ANOVA

Στον παρακάτω πίνακα 28 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 2- RES 2,5%)	0,06	LSD
	0,137	Tukey
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,000	LSD
	0,00	Tukey
(Σκέυασμα 2-RES 2,5%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,001	LSD
	0,004	Tukey

Πίνακας 28 . One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h.

Στον παρακάτω πίνακα 29 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 2- RES 2,5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey
(Σκέυασμα 2-RES 2,5%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,001	LSD
	0,003	Tukey

Πίνακας 29. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h.

Στον παρακάτω πίνακα 30 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 2- RES 2,5%)	0,000	LSD
	0,001	Tukey
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey

(Σκέυασμα 2-RES 2,5%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,082	LSD
	0,184	Tukey

Πίνακας 30. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h.

Στον παρακάτω πίνακα 31 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 2-RES 2,5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey
(Σκέυασμα 1-RES 1%)-(Σκέυασμα 3-RES 5%)	0,000	LSD
	0,000	Tukey
(Σκέυασμα 2-RES 2,5%)-(Σκέυασμα 3- RES 5%)	0,588	LSD
	0,843	Tukey

Πίνακας 31. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h.

5.3.7.2 Συζήτηση

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 26 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 12h καθώς και τα αντίστοιχα διάγραμμα, παρατηρούμε ότι το σκέυασμα 3-RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα που διαπέρασε την επιδερμίδα, δεύτερο σε σειρά είναι το σκέυασμα 2-RES-2,5% και τρίτο είναι το σκέυασμα 1-RES-1%. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει μία τάση να αυξάνεται η διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή της στο σκέυασμα. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται μεταξύ των σκευασμάτων είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

3 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 28 βλέπουμε πως στις 3 ώρες το σκεύασμα 3- RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε και η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις τιμές Q των σκευασμάτων 1 και 2. Αυτό υποδεικνύει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης που υπάρχει στο σκεύασμα 3 ευνόησε σημαντικά και τη διαπερατότητα της από την κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας. Τη δεύτερη μεγαλύτερη τιμή Q την παρουσιάζει το σκεύασμα 2-RES 2,5% και την τρίτη το σκεύασμα 1-RES 1%, ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

6 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 29 βλέπουμε πως και στις 6 ώρες διατηρείται ίδια η σειρά των σκευασμάτων ως προς τη διαπερατότητα. Συγκεκριμένα, το σκεύασμα 3- RES 5% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή Q και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Δεύτερο σε διαπερατότητα είναι το σκεύασμα 2- RES 2,5% και η τιμή Q είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή Q του σκευάσματος 1. Βλέπουμε δηλαδή πως και στις 6 ώρες η επίδραση της αυξανόμενης συγκέντρωσης ενισχύει σημαντικά τη διαπερατότητα.

12 ώρες

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 30 βλέπουμε πως και στις 12 ώρες τα σκευάσματα 2 και 3 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης από το σκεύασμα 1, ωστόσο παρόλο που το σκεύασμα 3 παρουσιάζει μεγαλύτερη διαπερατότητα από το σκεύασμα 2, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

24 ώρες

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ακριβώς αντίστοιχα με αυτά στις 12 ώρες. Τα σκευάσματα 2 και 3 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη διαπερατότητα από το σκεύασμα 1, ωστόσο δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Δηλαδή στις 12 και στις 24 ώρες φαίνεται πως η επίδραση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης δεν είχε σημαντική επίδραση στη διαπερατότητα.

Έτσι λοιπόν από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, βλέπουμε πως μέχρι και τις 6 ώρες η διαπερατότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση και τα 3 σκευάσματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους με το σκεύασμα 1 να διαφέρει σημαντικά από το 2 και το 3 σημαντικά και από τα δύο. Ωστόσο από τις 6 ώρες και μετά τα σκευάσματα 2 και 3 δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους υποδεικνύοντας ότι η διαφορά

συγκέντρωσης δεν διαδραμάτισε ουσιαστικό ρόλο. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στη διαφρετική αναλογία μεταξύ των διαλυτών του φορέα. Πιο αναλυτικά, όπως εξηγήθηκε παραπάνω τα σκευάσματα αποτελούνταν από διαφορετικές αναλογίες των ίδιων διαλυτών.

- Το σκεύασμα 1 έχει αναλογία (PEG400-Γλυκερίνη)/Νερό →(44/56)
- Το σκεύασμα 2 έχει αναλογία (PEG400-Γλυκερίνη)/Νερό →(54/46)
- Το σκεύασμα 3 έχει αναλογία (PEG400-Γλυκερίνη)/Νερό →(62/38)

Δεδομένου ότι το μείγμα PEG 400-Γλυκερίνη είναι ο «καλός» διαλύτης της ρεσβερατρόλης και το νερό ο «κακός» φαίνεται πως η βέλτιστη αναλογία είναι 54-46. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι σε αυτήν την αναλογία έχουμε τη μέγιστη θερμοδυναμική ενεργότητα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σκευάσματα. Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με τους *Weichers et al.* η διαπερατότητα μιας ουσίας από ένα σκευάσματος είναι μέγιστη όταν χρησιμοποιούνται μείγματα ενός διαλύτη που διαλύει καλά την ουσία (διότι έτσι αυξάνεται η συγκεντρωση της ουσίας στο σκεύασμα) και ενός διαλύτη που δεν τη διαλύει καλά (διότι έτσι αυξάνεται η τάση της ουσίας να φύγει από το σκεύασμα). Φαίνεται λοιπόν ότι σ' αυτήν την αναλογία διαλυτών έχει επιτευχθεί η βέλτιστη ισορροπία μεταξύ της διαλυτότητας της ουσίας και της θερμοδυναμικής ενεργότητας του σκευάσματος.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί μία επόμενη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας ρεσβερατρόλης σε άμεση συνέχεια με την πρώτη με στόχο την ενίσχυση της διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης.

5.4 Πειραματική διαδερμική μελέτη με ενισχυτή διαπερατότητας

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να πραγματοποιηθεί μια προσπάθεια ενίσχυσης της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ενισχυτής διαπερατότητας σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις προκειμένου να συνεκτιμηθεί όχι μόνο η επίδραση της παρουσίας του ενισχυτή στη διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης αλλά και η επίδραση της συγκέντρωσης του και να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση ενισχυτή για την ουσία.

5.4.1 Επιλογή φορέα

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδερμική μελέτη με ενισχυτή διαπερατότητας επιλέχθηκε με κριτήριο τη διαδερμική διαπερατότητα του φαρμάκου. Πιο συγκεκριμένα , επιλέχθηκε ο φορέας που έδωσε τη βέλτιστη διαπερατότητα ρεσβερατρόλης στο πείραμα διάχυσης που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινη επιδερμίδα.

Η τιμή που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τριών φορέων ήταν το $Q = (C \cdot V)/A$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) στις 12h και στις 24h.

ΦΟΡΕΑΣ	Q-12h	Q-24h
Φορέας 1 (PEG 400-GLy)/Νερό 44%/56%	0,62 ($\pm 0,04$)	0,8325 ($\pm 0,05$)
Φορέας 2 (PEG 400-GLy)/Νερό 54%/46%	1,07 ($\pm 0,16$)	1,56 ($\pm 0,22$)
Φορέας 3 (PEG 400-GLy)/Νερό 62%/38%	1,22 ($\pm 0,16$)	1,62 ($\pm 0,18$)

Πίνακας 32. $Q=(C \cdot V)/A$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) στις 12 και 24 ώρες

Τόσο στις 12 όσο και στις 24 ώρες, η συνταγή (PEG 400-GLy-Νερό 22%-22%-56%) (φορέας 1- σκεύασμα 1) είχε μικρότερη τιμή Q από τις άλλες δύο συνταγές και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$). Επομένως, αποκλείστηκε ως επιλογή για τη δεύτερη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας λόγω της χαμηλής διαπερατότητας και εξετάστηκαν οι υπόλοιπες δύο συνταγές ως πιθανοί φορείς. Οι συνταγές (PEG 400-GLy-Νερό 27%-27%-46%)(φορέας 2-Σκεύασμα 2) και (PEG 400-GLy-Νερό 31%-31%-38%) (φορέας 3-Σκεύασμα 3) (δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών Q στις 12 και 24 ώρες. (Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης για τη σύγκριση των τιμών Q μεταξύ των σκευασμάτων στις 12 και στις 24 ώρες δίνονται στους αντίστοιχους πίνακες ,στην ενότητα 5.3.7.1.

Έτσι επιλέχθηκε ως βέλτιστος φορέας η συνταγή 2, δηλαδή η αναλογία (PEG 400-GLy-Νερό 27%-27%-46%) καθώς είχε μικρότερη τιμή διαλυτότητας κορεσμού του φαρμάκου από τη συνταγή 3 (2,5% ρεσβερατρόλη vs 5% ρεσβερατρόλη), οδηγώντας σε εξοικονόμηση δραστικής ουσίας.

Όπως προαναφέρθηκε,εφαρμόστηκαν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις ενισχυτή διαπερατότητας οι οποίες επιλέχθηκαν διότι για κάθε δραστική ουσία υπάρχει μία

βέλτιστη συγκέντρωση ενισχυτή διαπερατότητας .. Οι 2 αναλογίες που δοκιμάστηκαν ήταν 5% v/v και 10% v/v .

Η ποσότητα του ενισχυτή που προστέθηκε αφαιρέθηκε αντιστοίχως από την ποσότητα του νερού που εμπερέχεται στον φορέα. Πιο συγκεκριμένα, οι τελικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη δεύτερη διαδερμική μελέτη φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Φορέας	Peg 400- Γλυκερολη	Νερό	Ενισχυτής Διαπερατότητας Transcutol ®
1	54 %	41%	5%
2	54 %	36%	10%

Πίνακας 33. Σύσταση τελικών φορέων της δεύτερης πειραματικής μελέτης

5.4.2 Πειράματα υπολογισμού διαλυτότητας κορεσμού στους τελικούς φορείς

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες ενότητες , ένας τρόπος ενίσχυσης της διαπερατότητας μιας δραστικής ουσίας μέσω του δέρματος είναι η ενσωμάτωσή της εντός φορέων κορεσμένων σε αυτή καθώς έτσι ενισχύεται η θερμοδυναμική ενεργότητα. Το γεγονός αυτό, το οποίο απορρέει από το νόμο του Fick, καθιστά απαραίτητη την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης σε συγκέντρωση κορεσμού στους τελικούς φορείς που παρουσιάζονται παραπάνω στον πίνακα 33.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού είναι απαραίτητο να προηγηθεί ο υπολογισμός της διαλυτότητας κορεσμού της ουσίας εντός των προαναφερθέντων φορέων.

Μετά τη διεξαγωγή του πειράματος προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.4 προέκυψαν τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον παρακάτω Πίνακα 34.

Σύσταση Φορέα	% αναλογία του επιταχυντή διαβατότητας	Διαλυτότητα Κορεσμού % (g/100ml)	Σχετική Τυπική Απόκλιση %
Φορέας 1 (PEG 400-GLy)/Νερό 54%-41%	5%	5,9	0,47

Φορέας 2 (PEG 400-GLy-Νερό) 54%/36%	10%	8,99	1,75
--	-----	------	------

Πίνακας 34. Διαλυτότητες κορεσμού της ρεσβερατρόλης στους πρόδρομους φορείς (n=3)

5.4.3 Παρασκευή των γελών

Τα τελικά σκευάσματα -γέλες, οι οποίες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.6 και χρησιμοποιήθηκαν στη δεύτερη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας ήταν 3 και φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Σκεύασμα 1	Σκεύασμα 2	Σκεύασμα 3
PEG400-Γλυκερίνη	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)
Νερό	46% (v/v)	41% (v/v)	36% (v/v)
Transcutol ®	-	5% (v/v)	10% (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	2,5%(w/v)	5,3% (w/v)	8,09%(w/v)

Πίνακας 35. Τελικές Συνταγές Ρεσβερατρόλης με επιταχυντή Transcutol ®

5.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των γελών

Όπως επεξηγήθηκε στην ενότητα 2.4.4 πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών μετά την ολοκλήρωση της παρασκευής τους και πριν τη διεξαγωγή πειραμάτων διάχυσης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι στα τελικά σκευάσματα έχει προστεθεί η σωστή ποσότητα ρεσβερατρόλης καθώς και ότι η δραστική ουσία δεν επηρεάζεται από την προσθήκη του ενισχυτή.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των γελών έναν μήνα μετά την παρασκευή τους προκειμένου να διαπιστωθεί η σταθερότητα των σκευασμάτων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας δίνονται στους παρακάτω πίνακες:

T=0

Κωδικός συνταγής	Συγκέντρωση RSV (g/100ml)	Σχετική Τυπική απόκλιση %	% περιεκτικότητα της πραγματικής τιμής ως προς τη θεωρητική
Σκεύασμα 1	2,54	0,83	101,6
Σκεύασμα 2	2,502	0,89	100,08
Σκεύασμα 3	5,155	1,61	103,1
Σκεύασμα 4	2,49	1,12	99,6
Σκεύασμα 5	8,03	1,17	99,25

Πίνακας 36. Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των τελικών γελών για T=0

T=30 ημέρες

Κωδικός συνταγής	Συγκέντρωση RSV (g/100ml)	Σχετική Τυπική απόκλιση %	% περιεκτικότητα της πραγματικής τιμής ως προς τη θεωρητική
Σκεύασμα 1	2,55	0,37	102
Σκεύασμα 2	2,52	1,27	100,8
Σκεύασμα 3	5,092	0,99	103,8
Σκεύασμα 4	2,43	2,02	97,2
Σκεύασμα 5	8,01	0,92	99,01

Πίνακας 37. Αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των τελικών γελών για T=30 ημέρες

Όπως φαίνεται στους παραπάνω πίνακες η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης κυμαινόταν μεταξύ του 97,2 και του 103,8 της θεωρητικής τιμής της. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Φαρμακοποιίας που ορίζουν τα αντίστοιχα όρια μεταξύ 85 και 115% της πραγματικής τιμής. Επομένως κρίνονται ως κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν στα in vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας. Ταυτόχρονα από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται πως η ρεσβερατρόλη διατηρείται σταθερή μέσα στο φορέα και δεν επηρεάζεται από την παρουσία του ενισχυτή διαπερατότητας –Transcutol®. Η δραστική ουσία διατηρεί τη συγκέντρωσή της και ένα μήνα μετά την ημέρα παρασκευής γεγονός που αποδεικνύει τη σταθερότητα των σκευασμάτων. Στο διάστημα που μεσολάβησε (=30 ημέρες) τα σκευάσματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο.

5.4.5 Επιβεβαίωση καταλληλότητας διαλύματος υποδοχέα

Όπως εξηγήθηκε στην ενότητα 2.3.4 προκειμένου να πραγματοποιηθεί ορθά το πείραμα διάχυσης είναι απαραίτητο να διατηρούνται διαρκώς συνθήκες δεξαμενής στο διάλυμα του υποδοχέα. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να ισχύει η παρακάτω συνθήκη:

Η συγκέντρωση κορεσμού της δραστικής ουσίας στο διάλυμα του υποδοχέα πρέπει να είναι 10 φορές μεγαλύτερη από το 10% της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας που περνάει από το διαμέρισμα του δότη στο διαμέρισμα του δέκτη.

Εφόσον στη δεύτερη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν σκευάσματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης (5,3 και 8,09%) , επαναλήφθηκαν οι υπολογισμοί που εξηγήθηκαν στην ενότητα 5.3.4 προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το διάλυμα του υποδοχέα που έχει επιλεγεί είναι κατάλληλο για τη διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής .

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήσαμε έχουν συγκέντρωση ρεσβερατρόλης 2,5 5,3 και 8,09 %. Οι υπολογισμοί που ακολουθούν γίνονται απ'ευθείας για το σκεύασμα ρεσβερατρόλης με συγκέντρωση 8,09% εφόσον αυτό έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα τρία σκευάσματα. Έτσι αν το διάλυμα του υποδοχέα είναι κατάλληλο για να διατηρήσει συνθήκες δεξαμενής για το σκεύασμα με συγκέντρωση 8,09 % προφανώς θα είναι κατάλληλο και για τα υπόλοιπα σκευάσματα.

Η ποσότητα γέλης που θα εφαρμόσουμε στα κύτταρα Franz είναι 100μl(0,1ml). Αρα η ποσότητα ρεσβερατρόλης που περιέχεται σε 100μl γέλης με συγκέντρωση 8,09% είναι:

8,09 g ρεσβερατρόλης →	σε 100ml σκευάσματος
X g ρεσβερατρόλης→	σε 0,1 ml σκευάσματος

$X=8,09 \times 0,1/100 \rightarrow X=0,00809$ g ρεσβερατρόλης εμπεριέχονται μέσα σε 100μl γέλης με συγκέντρωση 8,09%.

Από αυτήν την ποσότητα , το μέγιστο ποσοστό που μπορεί να διαπεράσει το δέρμα και να φτάσει στο διάλυμα του υποδοχέα είναι το 10% . Δηλαδή 0,000809g (=0,00809/10) ρεσβερατρόλης. Αφού το διαμέρισμα του δέκτη των κύτταρων Franz που χρησιμοποιήθηκαν έχει όγκο 6,275 ml, αυτός είναι και ο όγκος του διαλύματος του υποδοχέα. Έτσι αν περάσει στο διαμέρισμα του δέκτη , το 10% της ποσότητας ρεσβερατρόλης που υπάρχει μέσα στην γέλη που τοποθετείται στο διαμέρισμα του δότη(0,0005g), η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα του υποδοχέα θα είναι:

$$C = m/v \rightarrow C=0,000809/6,275 \rightarrow C=0,0001289 \rightarrow C \sim 0,00013g/ml \rightarrow C= 0,013g/100ml$$

Με βάση τους παραπάνω υπολογισμούς προέκυψε ότι για να ισχύουν συνθήκες δεξαμενής για κάθε συνταγή, η συγκέντρωση κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της διαχεόμενης δραστικής ουσίας. Δηλαδή θα πρέπει να είναι τουλάχιστον πάνω από 0,13 (=10X 0,013).

Η συγκέντρωση κορεσμού της ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα όπως φαίνεται στην ενότητα 5.3.4 υπολογίστηκε 0,58% ,επομένως το μείγμα προπυλενογλυκόλης-νερού σε αναλογία όγκων 50-50 είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα πλήρωσης του διαμερίσματος του υποδοχέα στη δεύτερη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης.

5.4.6 In vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας

5.4.6.1 Αποτελέσματα- Στατιστική Επεξεργασία

Κατά τη μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης με ενισχυτή , για την εκτίμηση της διαπερατότητας της δραστικής πραγματοποιήθηκε και πάλι πείραμα διάχυσης σε κύτταρα Franz χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στιβάδα . Οι συνταγές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Συνταγή 1	Συνταγή 2	Συνταγή 3
PEG 400-Γλυκερίνη	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)
Νερό	46% (v/v)	41% (v/v)	36% (v/v)

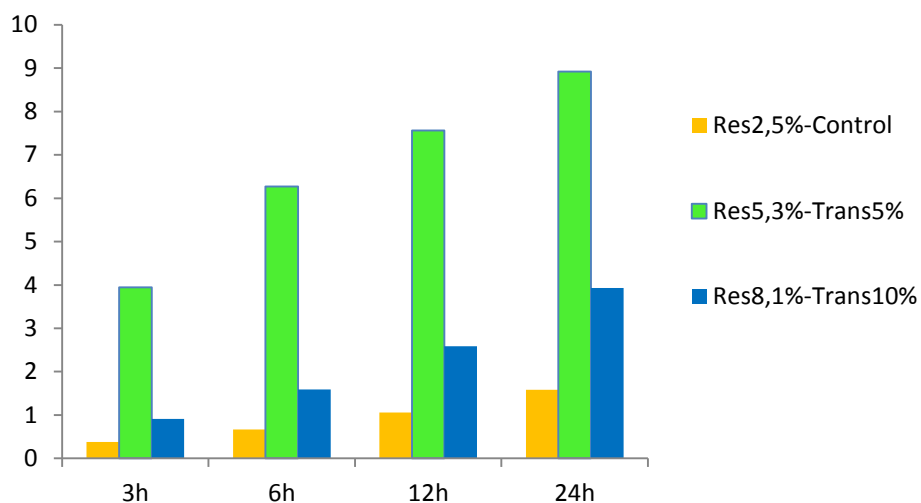
Transcutol ®	-	5% (v/v)	10% (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	2,5%(w/v)	5,3% (w/v)	8,09%(w/v)

Πίνακας 38. Συνταγές ρεσβερατρόλης με ενισχυτή διαπερατότητας

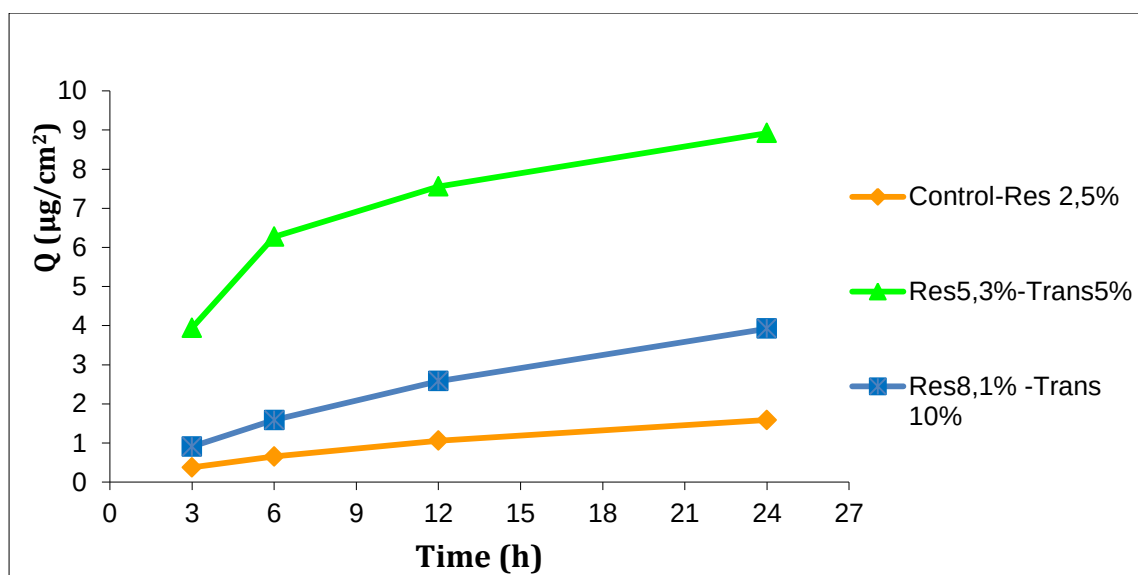
Προκειμένου να εκτιμηθεί η διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης, η εξαρτημένη μεταβλητή, που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος, ήταν η ποσότητα της ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας στις 3, 6, 12 και 24h από την έναρξη του πειράματος. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα για τη διαδερμική διαπερατότητα των παραπάνω συνταγών. Συγκεκριμένα παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης [$Q = (C \cdot V) / A$ (μg/cm²)] που διαπέρασε την συνθετική μεμβράνη στις 3, 6, 12 και 24 ώρες και για τις 3 συνταγές.

Q μg/cm²	Συνταγή 1 RES 2,5%-Control	Συνταγή 2 RES 5,3%-5%Trans	Συνταγή 3 RES 8,1%-10%Trans
3h	0,38 (±0,07)	3,94 (±0,18)	0,91 (± 0,20)
6h	0,65 (±0,08)	6,27 (±0,32)	1,59 (± 0,25)
12h	1,06 (±0,33)	7,56 (±0,50)	2,58 (± 0,36)
24h	1,59 (±0,44)	8,92 (±0,33)	3,93 (± 0,69)

Πίνακας 39. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές



Διάγραμμα 5. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος



Διάγραμμα 6. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) σε συνάρτηση με το χρόνο

Συνταγή	FLUX (μg/cm ² /hr)
Συνταγή 1	0,066 (±0,44)
Συνταγή 2	0,37 (±0,33)
Συνταγή 3	0,166 (±0,69)

Πίνακας 40. Ροή (J) (μg/cm²/h) συνταγών με ενισχυτή 5 και 10% ανά 24 ώρες του πειράματος

Ισχύει:

$$J_{0-24} = Q_{24}/24.$$

Εξίσωση 3

Επίσης με βάση την σχέση:

$$\Delta.E = \frac{J_{\text{Γέλης}}}{J_{\text{Γέλης αναφοράς}}}$$

Εξίσωση 4

όπου $J_{\text{Γέλης}}$ και $J_{\text{Γέλης αναφοράς}}$ η ροή της ρεσβερατρόλης (μg/cm²/h) σε σταθεροποιημένη κατάσταση από την προς εξέταση γέλη και τη γέλη αναφοράς αντίστοιχα, υπολογίστηκε ο δείκτης επιτάχυνσης (Δ.Ε.). Όταν η τιμή του δείκτη είναι άνω της μονάδας, η προσθήκη επιταχυντή έχει επιφέρει θετικά αποτελέσματα στην αύξηση της διαπέρασης της ουσίας, ενώ όπου η τιμή είναι αρνητική συμβαίνει το αντίθετο. Οι τιμές για τους δείκτες φαίνονται στον Πίνακα 43. Παρατηρείται ότι ο δείκτης επιτάχυνσης παίρνει τιμή πάνω από τη μονάδα για όλες τις συνταγές πράγμα το οποίο δείχνει ότι σε όλες τις περιπτώσεις και σε όλες τις συγκεντρώσεις το Transcutol ευνόησε τη διαδερμική διαπερατότητα.

Συνταγή	ER ₀₋₂₄
Συνταγή 2	3,5
Συνταγή 3	2,3

Πίνακας 41. Δείκτης επιτάχυνσης για τη ρεσβερατρόλη

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο (3, 6, 12, 24 ώρες) ακολουθούν

κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 44**

Q $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Συνταγή 1 RES 2,5% Control	Συνταγή 2 RES 5,3% +Trans5%	Συνταγή 3 RES 8,1% +Trans10%
3h	0,603	0,532	0,329
6h	0,406	0,337	0,741
12h	0,456	0,804	0,168
24h	0,058	0,720	0,329
Κριτήριο Κανονικότητας	S-W	S-W	S-W

Πίνακας 42. Τιμές κριτηρίου WS για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του κριτηρίου S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές της Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ακολουθούν κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η ANOVA.

ONE WAY ANOVA

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα της διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης από τα 3 σκευασμάτα προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διαπερατότητα μεταξύ των σκευασμάτων.

Η σύγκριση των μετρήσεων γίνεται μεταξύ των σκευασμάτων ξεχωριστά για κάθε χρονική στιγμή κατά την οποία ελήφθησαν δείγματα (3, 6, 12, 24h). Η παράμετρος που χρησιμοποιούμε για τη σύγκριση της διαπερατότητας μεταξύ των σκευασμάτων είναι η αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24h αντίστοιχα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της σύγκρισης για κάθε χρονική στιγμή. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι το LSD και το Tukey's. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνται

σημαντικές όταν η τιμή σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 και άρα μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση ότι οι ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους .

Στους παρακάτω πίνακες 45,46,47,48 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3,6,12 και 24h αντίστοιχα.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2 (Res2,5%)-(Res5,3%-Trans5%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,023	LSD
	0,136	Tukey
Συνταγή 2-Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 43. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2 (Res2,5%)-(Res5,3%-Trans5%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,023	LSD
	0,139	Tukey
Συνταγή 2-Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 44. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2 (Res2,5%)-(Res5,3%-Trans5%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,003	LSD
	0,024	Tukey
Συνταγή 2-Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 45. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2 (Res2,5%)-(Res5,3%-Trans5%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,001	LSD
	0,005	Tukey
Συνταγή 2-Συνταγή 3 (Res2,5%)-(Res8,01%-Trans10%)	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 46. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h

5.4.6.2 Συζήτηση

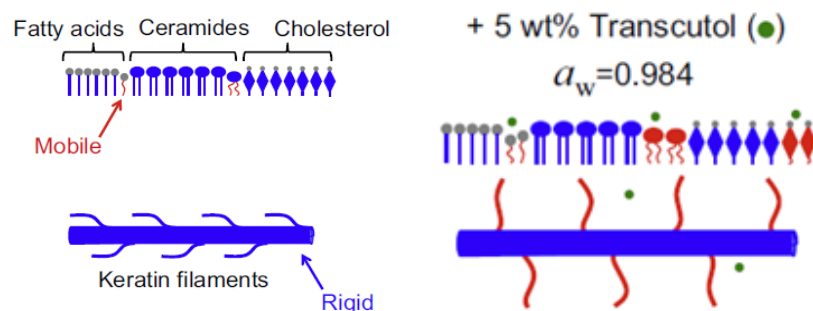
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το εξωτερικό στρώμα του δέρματος ονομάζεται κεράτινη στιβάδα και αποτελεί το κυριότερο εμπόδιο τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο των ουσιών. Η λειτουργία φραγμού της κεράτινης στοιβάδας εξασφαλίζεται με την πολύ ισχυρά διατεταγμένη οργάνωση των νεκρών κερατινοκυττάρων, των κορνεοκυττάρων, όπως επίσης και άλλων λιπιδίων και πρωτεϊνών που δημιουργούν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να μειωθεί αυτή η λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας και να αυξηθεί η διαδερμική απορρόφηση των φαρμακευτικών μορίων με μια από τις σημαντικότερες να αποτελεί η χρήση επιταχυντών διαβατότητας.

Το Transcutol[®] (diethylene glycol monoethyl ether) είναι ένας συνηθισμένος παράγοντας διαλυτοποίησης και χρησιμοποιείται ευρέως ως ενισχυτής διαδερμικής διαπερατότητας σε πολλά τοπικά σκευάσματα διότι δεν παρουσιάζει τοξικότητα, αναμειγνύεται εύκολα τόσο με πολικούς όσο και με μη πολικούς διαλύτες αλλά επιπλέον παρουσιάζει βιοσυμβατότητα με το δέρμα.

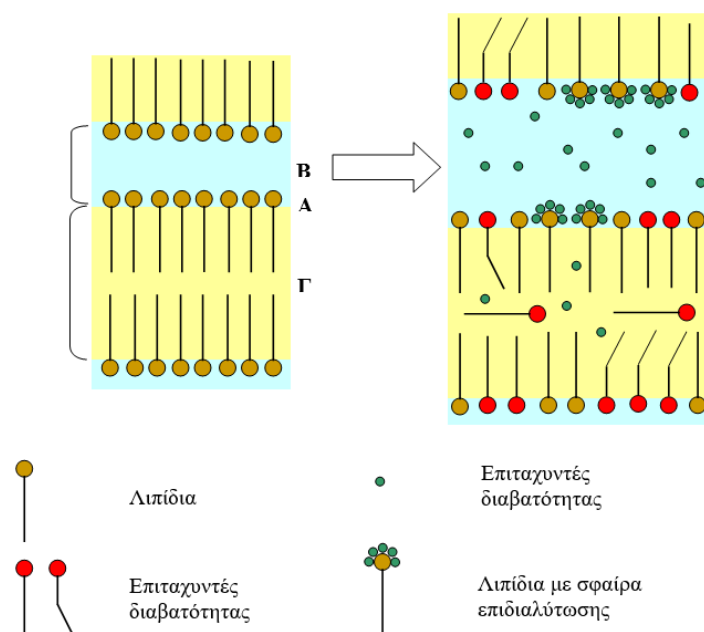
Στη δικιά μας μελέτη, το Transcutol[®], ενίσχυσε την διαλυτότητα κατά 3,24 φορές όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10% και 2,5 φορές όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5%. Η διαπερατότητα επιπλέον ενισχύθηκε 5,61 φορές όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 5% και 3,28 φορές όταν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10%. Η ενίσχυση που προσέφερε φαίνεται πως ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.005$).

Η ενίσχυση στη διαπερατότητα που επιφέρει το Transcutol[®] πιθανόν να οφείλεται στο ότι το Transcutol[®], λόγω της δομής του, έχει την ικανότητα να αυξάνει τη μοριακή κινητικότητα τόσο των λιπιδίων όσο και των πρωτεϊνών της κεράτινης στοιβάδας. Πιο συγκεκριμένα το Transcutol[®] φαίνεται να διαταράσσει τις υδάτινες σφαίρες των λιπιδίων και οι επακόλουθες αλλαγές στις πολικές κεφαλές επιφέρουν αλλαγές και στη διάταξη της περιοχής. Έτσι, αυξάνεται η ρευστότητα και διευκολύνεται η διάχυση της Ρεσβερατρόλης. Η πεποίθηση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι το Transcutol[®] έχει $\log P = -0.42$, στοιχείο που υποδεικνύει ότι προτιμά να κατανέμεται σε πιο πολικό περιβάλλον όπως η περιοχή των πολικών κεφαλών της λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των S. Bjorklund et.al. (69) όπου βρέθηκε ότι κατά την μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας της μετρονιδαζόλης με την χρήση του Transcutol[®] ως ενισχυτή διαπερατότητας, το τελευταίο φαίνεται να αύξησε την κινητικότητα των πολικών κεφαλών των κεραμιδίων που βρίσκονται στην υδρόφιλη περιοχή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Παράκατω φαίνεται μία εικόνα του πως το Transcutol[®] επηρεάζει την κινητικότητα των λιπιδίων. Πιο συγκεκριμένα αριστερά βλέπουμε τα λιπίδια της διπλοστοιβάδας είναι σταθερά(το μπλε χρώμα στην εικόνα υποδεικνύει την ακαμψία) ενώ δεξιά με την επίδραση του Transcutol[®] αποκτούν κινητικότητα(το κοκκίνο χρώμα στην εικόνα υποδεικνύει την κινητικότητα).



Εικόνα 32. Επίδραση του Transcutol® στη λιπιδική διπλοστιβάδα της κεράτινης στιβάδας (69)



Εικόνα 33. Μηχανισμός δράσης επιταχυντων διαβατότητας στη λιπιδική διπλοστιβάδα της κερατινης.

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα και συγκεκριμένα τον Πίνακα 38 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 12h καθώς και τα αντίστοιχα διάγραμμα φαίνεται ότι το Transcutol® ενίσχυσε την διαδερμική διαπερατότητα σε σχέση με το control και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε, ωστόσο όταν χρησιμοποιήκε σε συγκέντρωση 5% επετεύχθη σημαντικά μεγαλύτερη διαπερατότητα σε σχέση με τη συγκέντρωση 10%. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό μπορεί να είναι η τάση του Transcutol® σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να ευνοεί περισσότερο τη

διαπέραση υδρόφιλων μορίων όπως στην περίπτωση των *D.Psaranthi et al.* , (70) όπου βρέθηκε πως αύξηση της συγκέντρωσης του Transcutol[®] ενίσχυσε τη διαπερατότητα της αλφασοζίνης που είναι υδρόφιλο μόριο (log p1.7). Επιπλέον η μεγαλύτερη ενίσχυση που παρατηρήθηκε σε ποσοστό 5% σε σχέση με το 10% μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι αμφιφίλες ουσίες όπως το Transcutol[®] είναι ικανές να δημιουργούν μικκύλια σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την κρίσιμη συγκέντρωση μυκκυλίου(cmc) στο σχετικό μέσο. Τα μικκύλια των αμφιφίλων ουσιών μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια του φαρμάκου και να αυξήσουν τη διαλυτότητα του. Η διαλυτοποίηση αυτή του φαρμάκου από τα μικκύλια μειώνει τη θερμοδυναμική δραστικότητα του φαρμάκου και κατά συνέπεια μειώνει την κινητήρια δύναμη της διαπερατότητας του φαρμάκου. Τα ευρήματα μας φαίνεται να συμφωνούν με αυτά των *Mura et al.*, όπου μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του Transcutol[®] στη διαδερμική διαπερατότητα της κλοναζεπάμης. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή δημιουργήθηκαν μείγματα νερού-(Transcutol[®] -PG) όπου νερού-(Transcutol[®] -PG) παράμενε σταθερή και μεταβαλλόταν η αναλογία Transcutol-PG. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του Transcutol[®] σε βάρος της προπυλενογλυκόλης , τόσο αυξανόταν η διαλυτότητα της κλοναζεπάμης στο σκέυασμα αλλά ελαττωνόταν η διαπερατότητα. (71)

5.4.7 Επιβεβαίωση αποτελεσματικότητας επιταχυντή διαβατότητας σε συγκέντρωση 5%

Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης με ενισχυτή διαπερατότητας , και αφού παρατηρήθηκε ότι το Transcutol[®] σε συγκέντρωση 5% έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα , αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί ένα ακόμα πείραμα διάχυσης προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας οφείλεται εξ'ολοκλήρου στην παρουσία του ενισχυτή και όχι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι 2 συνταγές που χρησιμοποιήθηκαν και στο προηγούμενο πείραμα διαπερατότητας με ενισχυτή(control και σκέυασμα2-Res5,3%-5%) και επιπλέον μία συνταγή όπου χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος φορέας με τη συνταγή 2 αλλά η ρεσβερατρόλη δεν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση κορεσμού. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 2,5 προκειμένου να είναι δυνατή και η σύγκριση με το control. Οι συνταγές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

ΣΥΝΤΑΓΕΣ	Συνταγή 1	Συνταγή 2	Συνταγή 3
PEG 400-	54% (v/v)	54% (v/v)	54% (v/v)

Γλυκερίνη			
Νερό	46% (v/v)	41% (v/v)	41% (v/v)
Transcutol ®	-	5% (v/v)	% (v/v)
Aristoflex® AVC	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
Ρεσβερατρόλη	2,5%(w/v)	5,3% (w/v)	2,5%(w/v)

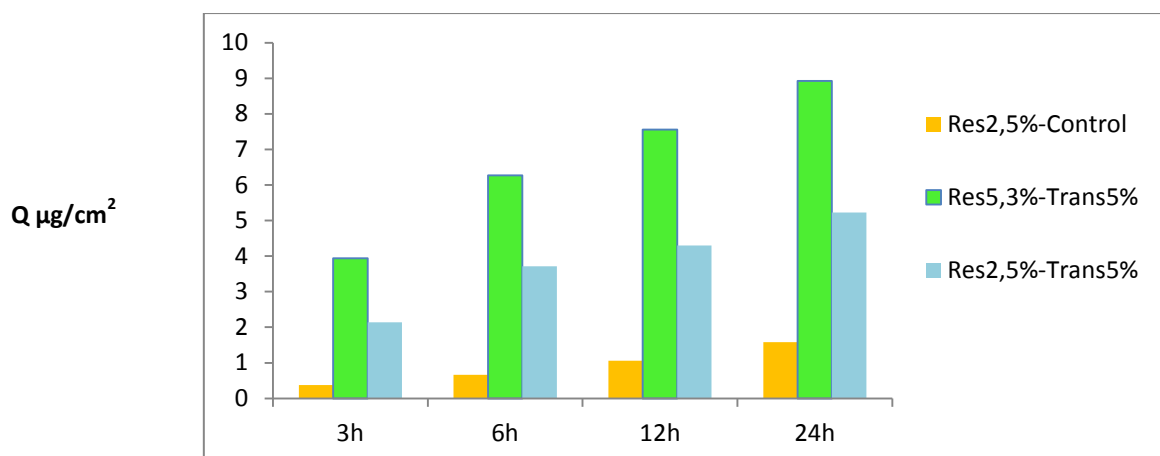
Πίνακας 47. Συνταγές ρεσβερατρόλης με ενισχυτή διαπερατότητας 5%

5.4.7.1 Αποτελέσματα-Στατιστική επεξεργασία

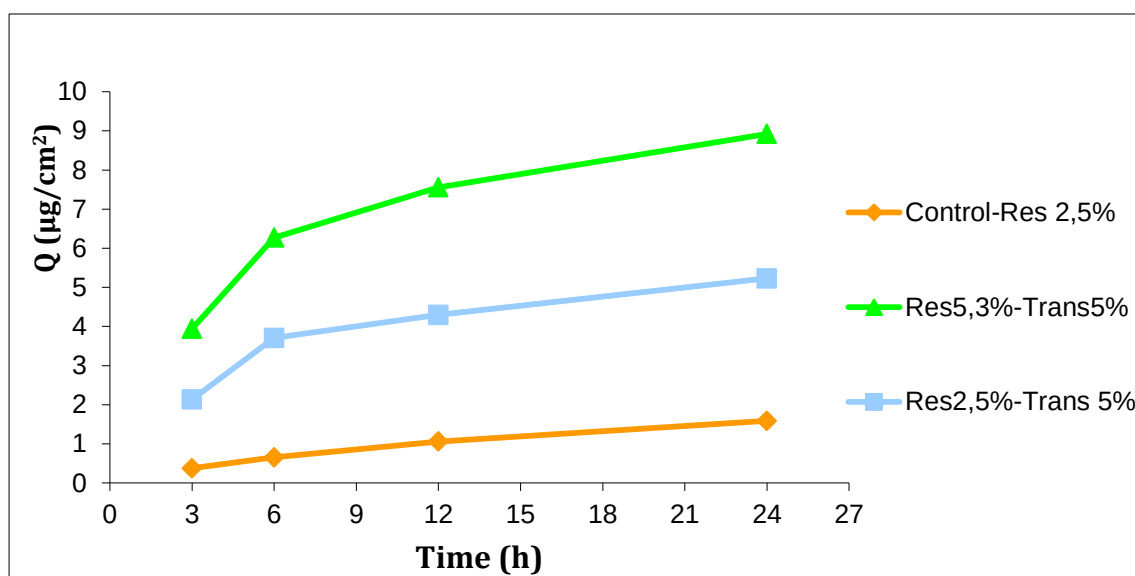
Προκειμένου να εκτιμηθεί η διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρόλης, η εξαρτημένη μεταβλητή, που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος, ήταν η ποσότητα της ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας στις 3, 6, 12 και 24h από την έναρξη του πειράματος. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα για τη διαδερμική διαπερατότητα των παραπάνω συνταγών. Συγκεκριμένα παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης [$Q = (C \cdot V) / A$ (μg/cm²)] που διαπέρασε την συνθετική μεμβράνη στις 3, 6, 12 και 24 ώρες και για τις 3 συνταγές.

Q μg/cm²	Συνταγή 1 RES 2,5%-Control	Συνταγή 2 RES 5,3%-5%Trans	Συνταγή 3 RES 2,5% - 5% Trans
3h	0,38 (±0,07)	3,94 (±0,18)	2,14 (±0,54)
6h	0,65 (±0,08)	6,27 (±0,32)	3,71 (±1,22)
12h	1,06 (±0,33)	7,56 (±0,50)	4,30 (±1,27)
24h	1,59 (±0,44)	8,92 (±0,33)	5,23 (±1,58)

Πίνακας 48. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας Q (μg/cm²) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος για τις 3 συνταγές



Διάγραμμα 7. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα στις 3,6,12 και 24 h από την έναρξη του πειράματος



Διάγραμμα 8. Αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την ανθρώπινη επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) σε συνάρτηση με το χρόνο

Συνταγή	FLUX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)
Συνταγή 1	0,066 ($\pm 0,44$)
Συνταγή 2	0,37 ($\pm 0,33$)
Συνταγή 3	0,22 ($\pm 1,58$)

Πίνακας 49. Ροή (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) ανά 24 ώρες του πειράματος

Οι τιμές για τους δείκτες επιτάχυνσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Παρατηρείται ότι ο δείκτης επιτάχυνσης παίρνει και πάλι τιμή πάνω από τη μονάδα πράγμα το οποίο δείχνει ότι Transcutol ευνόησε τη διαδερμική διαπερατότητα ακόμα και όταν η ρεσβερατρόλη δεν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση κορεσμού.

Συνταγή	ER ₀₋₂₄
Συνταγή 2	3,5
Συνταγή 3	2,17

Πίνακας 50. Δείκτης επιτάχυνσης για τη ρεσβερατρόλη

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο (3, 6, 12, 24 ώρες) ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Q μg/cm ²	Συνταγή 1 RES 2,5% Control	Συνταγή 2 RES 5,3% +Trans5%	Συνταγή 3 RES 2,5 % +Trans5%
3h	0,603	0,532	0,631
6h	0,406	0,337	0,707
12h	0,456	0,804	0,643
24h	0,058	0,720	0,563
Κριτήριο Κανονικότητας	S-W	S-W	S-W

Πίνακας 51. Τιμές κριτηρίου SW για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) που διαπέρασε το δέρμα σε συνάρτηση με το χρόνο σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του κριτηρίου S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές της Q (μg/cm²) ακολουθούν κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν

παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η ANOVA.

ONE WAY ANOVA

Στους παρακάτω πίνακες , 56, 57,58,59 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για την αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3,6,12,24h αντίστοιχα.Υπενθυμίζεται ότι οι διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων είναι σημαντικές όταν η τιμή P είναι μικρότερη του 0,05.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3	0,000	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 2 –Συνταγή 3	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 52. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3	0,000	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 2 –Συνταγή 3	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 53. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 6h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3	0,000	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 2 -Συνταγή 3	0,00	LSD
	0,00	Tukey

Πίνακας 54. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 12h .

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P	Κριτήριο
Συνταγή 1- Συνταγή 2	0,00	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 1- Συνταγή 3	0,000	LSD
	0,00	Tukey
Συνταγή 2 -Συνταγή 3	0,00	LSD
	0,00	Tukey
	0,663	Tukey

Πίνακας 55. One way-ANOVA για σύγκριση της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 24h

5.4.7.2 Συζήτηση

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 50 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών της αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την επιδερμίδα στις 3, 6, 12 και στις 24h καθώς και τα αντίστοιχα διάγραμμα παρατηρούμε ότι το σκέυασμα 2 που περιείχε ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση κορεσμού και 5% Transcutol[®] , παρουσίασε και πάλι τη μεγαλύτερη διαπερατότητα . Δεύτερο σε σειρά ήταν το σκέυασμα με 5% Transcutol[®] και ρεσβερατρόλη 2,5% ενώ τη μικρότερη διαπερατότητα παρουσίασε το control. Από την ανάλυση Anova παρατηρούμε ότι οι διαφορές αυτές μεταξύ των σκευασμάτων ήταν σημαντικές σε όλες τις χρονικές στιγμές(3,6,12,24h)

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο επιταχυντής αύξησε σημαντικά τη διαπερατότητα ακόμα και όταν η ρεσβερατρόλη δεν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση

κορεσμού. Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των σκευασμάτων 2(5%Transcutol[®]-5,3% Res) και 3(5%Transcutol[®]-2,5% Res), είναι προφανές ότι η μεγαλύτερη διαπερατότητα του σκευασματος 2 οφείλεται στη μεγαλύτερη θερμοδυναμική ενεργότητα που επιτυγχάνεται επειδή η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού.

6 IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ- ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

Όπως επεξηγήθηκε και νωρίτερα, δεδομένων των αποτελεσμάτων διαδερμικής διαπερατότητας της ρεσβερατρόλης που ελήφθησαν από τα in vitro πειράματα διάχυσης αλλά και δεδομένων των ευρυμάτων στη βιβλιογραφία όπου γίνεται αναφορά για ικανοποιητική αντιφλεγμονώδη δράση ρεσβερατρόλης , αποφασίστηκε να προχωρήσουμε σε in vivo μελέτη για την εκτίμηση της αντιφλεγμονώδους δράσης της δραστικής ουσίας .

Όπως έχει ήδη αναλυθεί στην ενότητα 3.2..1, το πειραματικό πρωτόκολλο συνολικά διήρκησε 19 ημέρες. Τις πρώτες 4 ημέρες πραγματοποιήθηκε προληπτική επάλειψη προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή προληπτική δράση της ρεσβερατρόλης ενώ το πρωί της πέμπτης έγινε πρόκληση φλεγμονής με ακτινοβολία.

Η αξιολόγηση της φλεγμονής που προκλήθηκε στο δέρμα των μυών αλλά και της θεραπευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης έγινε με βάση:

1. Την ιστοπαθολογική εξέταση από έμπειρο ιστοπαθολόγο
2. Την κλινική εικόνα
3. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στην αρχή, κατά τη διάρκεια και στο τέλος του πειράματος.

Για την εκτίμηση του επιπέδου φλεγμονής αλλά της αντιφλεγμονώδους δράσης της ρεσβερατρόλης μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι: Η ενυδάτωση, η ερυθρότητα, η άδηλη απώλεια νερού, η ελαστικότητα και το πάχος της επιδερμίδας. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν τις ακόλουθες ημέρες :

Ημέρα 0-baseline: Είναι η ημέρα έναρξης των επαλείψεων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν πριν την εφαρμογή των σκευασμάτων.

Ημέρα 1-Πρόκληση Φλεγμονής : Ως 1^η ημέρα ορίζεται η ημέρα πρόκλησης φλεγμονής που έγινε 4 ημέρες μετά την προληπτική επάλειψη . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά την ακτινοβολήση των μυών. Η ημέρα 1 αντιστοιχεί σε πολύ πρώιμο στάδιο της φλεγμονής.

Ημέρα 4: Είναι η 4^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση και αντιστοιχεί στην αρχή της εμφάνισης της φλεγμονής

Ημέρα 8: Είναι η 8^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση και αντιστοιχεί στην κορύφωση της φλεγμονής

Ημέρα 11: Είναι η 11^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση όπου αρχίζει η φάση της επούλωσης .

Ημερα 15-Λήξη του πειράματος : Είναι η 15^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση και είναι και η τελευταία μέρα του πειράματος καθώς το μεγαλύτερο μέρος των μυων παρουσίασε πλήρη επούλωση.

Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων.

6.1.1 Αποτελέσματα –Συζήτηση άδηλης απώλειας νερού TEWL

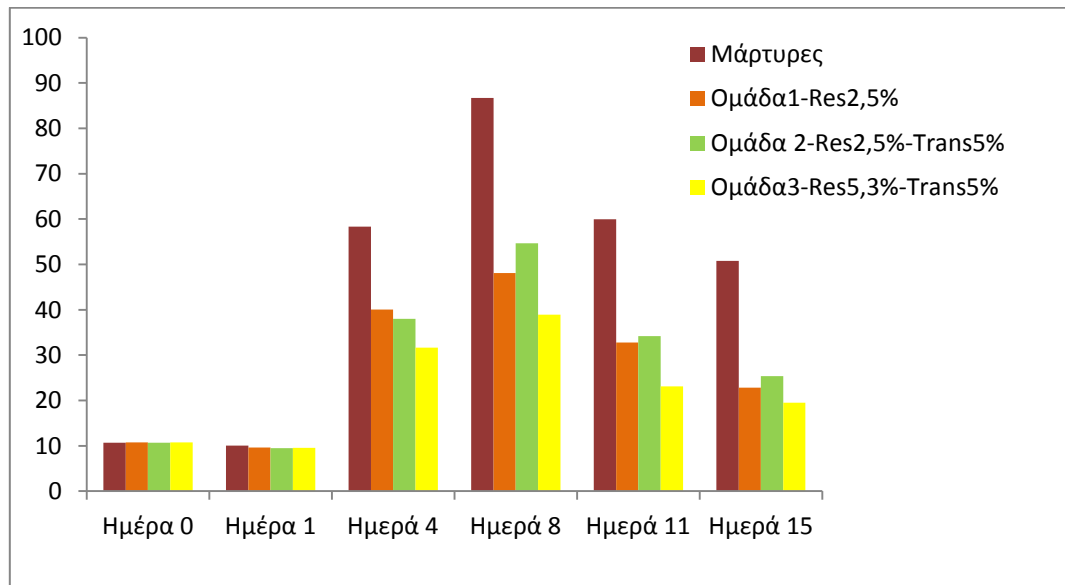
6.1.1.1 Αποτελέσματα TEWL-Στατιστική Ανάλυση

Η μέτρηση της άδηλης απώλειας νερού αποτελεί μια από τις κυριότερες μεθόδους για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της λειτουργίας του δερματικού φραγμού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει πάντα μια καθορισμένη εξάτμιση ύδατος από την επιδερμίδα, ως τμήμα του φυσιολογικού δερματικού μεταβολισμού, αλλά σε περίπτωση βλάβης του φραγμού του δέρματος η τιμή της εξάτμισης αυξάνεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της εξάτμισης, τόσο μεγαλύτερη είναι η βλάβη που έχει προκληθεί. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της TEWL για όλες τις ημέρες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 8, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15)

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	10,68 (±0,505)	10,0025 (±0,44)	58,325 (±20,4)	86,72 (±19,01)	59,975 (±14,31)	50,76 (10,62)
Ομάδα 1	10,75	9,625	40,03	48,08	32,77	22,85

	(±0,62)	(±0,71)	(±10,08)	(±7,86)	(±11,13)	(±5,10)
Ομάδα 2	10,65 (±0,87)	9,48 (±0,7)	38,01 (±12,09)	54,66 (±7,43)	34,16 (±9,15)	25,37 (±6,91)
Ομάδα 3	10,77 (±0,99)	9,575 (±0,85)	31,675 (±7,24)	38,95 (±4,85)	23,0875 (±4,84)	19,475 (±5,17)

Πίνακας 56. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της TEWL



Διάγραμμα 9. Μεταβολή της TEWL του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Ποσοστιαία μεταβολή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική μεταβολή στην άδηλη απώλεια νερού των μυών των διαφορετικών ομάδων από την ημέρα 0 (baseline) μέχρι την τελευταία ημέρα της φλεγμονής (τη 15^η ημέρα) προσδιορίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή της TEWL. Η ποσοστιαία μεταβολή υπολογιστήκε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Ποσοστιαία μεταβολή} = [(T.P \text{ την ημέρα } 0 - T. P. \text{ την τελευταία ημέρα}) / T. P. \text{ την ημέρα } 0] * 100$$

Εξίσωση 5

Όπου Τ.Π: Τιμή της εξεταζόμενης παραμέτρου, πχ στη συγκεκριμένη περίπτωση η TEWL

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ομάδα	Ποσοστιαία μεταβολή
Μάρτυρες	-374,97%
Ομάδα 1	-112,55%
Ομάδα 2	-138,26%
Ομάδα 3	-80,74%

Πίνακας 57. Ποσοστιαία μεταβολή της TEWL σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της TEWL που ελήφθησαν από κάθε ημέρα μέτρησης ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S) και Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους Πίνακες 58 και 59 αντίστοιχα.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,200	0,139	0,200	0,189	0,200	0,200
Ομάδα 1	0,200	0,200	0,063	0,056	0,200	0,200
Ομάδα 2	0,200	0,200	0,077	0,107	0,099	0,120
Ομάδα 3	0,200	0,058	0,115	0,200	0,200	0,055

Πίνακας 58. Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής TEWL σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,281	0,384	0,14	0,061	0,641	0,437
Ομάδα 1	0,885	0,242	0,053	0,189	0,093	0,282
Ομάδα 2	0,997	0,495	0,159	0,053	0,059	0,061
Ομάδα 3	0,370	0,059	0,127	0,638	0,599	0,075

Πίνακας 59. Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής TEWL σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του τόσο του ελέγχου K-S όσο και το S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι η μεταβλητή της άδηλης απώλειας νερού ακολουθεί κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Paired t-test και η ANOVA

ONE WAY ANOVA

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα όλων των ομάδων ανά παράμετρο(πχ TEWL στη συγκεκριμένη περίπτωση) προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η σύγκριση των μετρήσεων γίνεται μεταξύ των ομάδων ανα δύο και ξεχωριστά για κάθε ημέρα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για τις ημέρες 0(baseline),1,4, 8 (έξαρση φλεγμονής) ,11 και 15(τέλος φλεγμονής). Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι το LSD. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνται σημαντικές όταν η τιμή σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 και άρα μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση ότι οι ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 0.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,873
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,923
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,822
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,797
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,949
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,748

Πίνακας 60. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 0 μεταξύ των ομάδων.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 1:

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,258
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,132
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,205
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,695
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,886
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,346

Πίνακας 61. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 1 μεταξύ των ομάδων.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 4:

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,011
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,005
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,765
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,222
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,352

Πίνακας 62. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 4 μεταξύ των ομάδων.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 8:

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,25
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,114
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,009

Πίνακας 63. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 8 μεταξύ των ομάδων.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,792
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,074
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,043

Πίνακας 64. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 8 μεταξύ των ομάδων.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της TEWL την ημέρα 15.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,499
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,367
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,121

Πίνακας 65. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της TEWL την ημέρα 15 μεταξύ των ομάδων.

Paired t-test

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος ξεχωριστά σε κάθε παράμετρο (πχ TEWL στη συγκεκριμένη περίπτωση) στην εξέλιξη της φλεγμονής. Σκοπός μας ουσιαστικά είναι να εκτιμήσουμε τη βελτίωση ή μη που επιφέρει το κάθε σκεύασμα σε κάθε μετρούμενη παράμετρο της φλεγμονής προϊόντων των ημερών προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ημερών. Η ανάλυση πραγματοποιείται ξεχωριστά για κάθε ένα από τα σκευάσματα. Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-

test) απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι ημέρες 0 (baseline), 8(έξαρση φλεγμονής) και 15(τέλος φλεγμονής).

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες	0-8	-91,83807	-60,23693	0,000
	8-15	23,54332	48,38168	0,000
	0-15	-48,96817	-31,18183	0,000
Ομάδα 1	0-8	-49,81781	-27,35719	0,000
	8-15	19,1987	34,17623	0,000
	0-15	-19,29543	-4,50457	0,007
Ομάδα 2	0-8	-54,45676	-34,06824	0,000
	8-15	18,15048	40,42452	0,000
	0-15	-23,27753	-6,67247	0,004
Ομάδα 3	0-8	-37,90841	-21,56659	0,000
	8-15	13,66085	28,16415	0,000
	0-15	-13,91694	-3,73306	0,005

Πίνακας 66. Paired t-test για τη σύγκριση του TEWL μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.

6.1.1.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων TEWL

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 56 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος των τιμών της TEWL και η τυπική απόκλιση καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα 9 βλέπουμε ότι η άδηλη απώλεια νερού αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 8^η ημέρα όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής. Την ημέρα αυτή συναντάμε τη μέγιστη άδηλη απώλεια νερού σε όλες τις ομάδες όπως είναι λογικό καθώς η προκαλούμενη φλεγμονή από την UV ακτινοβολία πλήττει τη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού. Μετά την 8^η ημέρα η TEWL αρχίζει να μειώνεται σταδιακά μέχρι την 15^η ημέρα , κάτι που είναι λογικό αφού όσο περνάνε οι ημέρες προχωράμε προς την ύφεση της φλεγμονής. Ωστόσο οι μεταβολές της άδηλης απώλειας νερού των μυών δεν είναι οι ίδιες μεταξύ των ομάδων γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση κάποιων από τα σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι για όλες τις ημέρες με εξαίρεση την ημέρα 0 και την ημέρα 1 όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει να εμφανίζεται η φλεγμονή η άδηλη απώλεια νερού είναι μεγαλύτερη για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερη για την

ομάδα 3. (διάγραμμα 9) Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές , προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

Όπως επεξηγήθηκε παραπάνω η ανάλυση αυτή έγινε με σκοπό την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην άδηλη απώλεια νερού του δέρματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων μυών από μέρα σε μέρα.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 όπως βλέπουμε στον πίνακα 60 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό , καθώς την ημέρα 0 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόκληση της φλεγμονής κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος είναι οι φυσιολογικές (baseline) που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες. Το συμπέρασμα λοιπόν που μπορούμε να εξαγάγουμε είναι ότι κατά την έναρξη του πειράματος όλοι οι μύες έχουν την ίδια άδηλη απώλεια νερού, δηλαδή ο φραγμός του δέρματος είναι εξίσου λειτουργικός και δεν υπάρχουν ανομοιομορφίες μεταξύ των ομάδων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στη συνέχεια του πειράματος καθώς εάν εξαρχής υπήρχαν διαφορές στη λειτουργία του φραγμού μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μυων δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε σωστά την επίδραση των διαφορετικών σκευασμάτων.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1 δηλαδή την πρώτη ημέρα της φλεγμονής , η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη TEWL και η ομάδα των μαρτύρων τη μεγαλύτερη. Ωστόσο όπως βλέπουμε στον πίνακα 60 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό , καθώς την 1η ημέρα της φλεγμονής δεν έχουν αρχίσει ακόμα να επιδρούν οι φλεγμονώδεις παράγοντες κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος τείνουν να είναι οι φυσιολογικές δηλαδή κοντά σε αυτές που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες.

Ημέρα 4

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 61 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην TEWL μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 4η ημέρα φαίνεται πως η TEWL του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι τα σκευάσματα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στην καταστροφή του επιδερμικού φραγμού που προκαλεί η φλεγμονή. Ωστόσο, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων ομάδων.

Ημέρα 8

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 62 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην άδηλη απώλεια νερού μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 8η ημέρα φαίνεται πως η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη άδηλη απώλεια νερού σε σχέση με κάθε μια από τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Δηλαδή ο φραγμός του δέρματος των μαρτύρων έχει υποστεί τη μεγαλύτερη βλάβη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες που ακολουθούν θεραπεία με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Έτσι, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με ρεσβερατρόλη. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει .οπως και την ημέρα 4 ότι τα σκευάσματα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στην πλήξη του φραγμού του δέρματος που προκαλεί η φλεγμονή. Επιπλέον την ημέρα 8, φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας 3 και της ομάδας 2. Αυτό υποδεικνύει πως το σκεύασμα ρεσβερατρόλης που δόθηκε στην ομάδα 3 λειτούργησε περισσότερο προστατευτικά σε σχέση με το σκεύασμα 2. Το σκεύασμα 3 έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης η οποία επιπλέον βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού και επιπλέον ενισχυτή διαπερατότητας . Το σκεύασμα 2 έχει ενισχυτή διαπερατότητας αλλά η ρεσβερατόλη είναι σε μικρότερη συγκέντρωση και αυτή δεν είναι η συγκέντρωση κορεσμού .Άρα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης

βοηθά στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία της φλεγμονής , όπως επίσης και η μεγαλύτερη θερμοδυναμική ενεργότητα του σκευάσματος Τέλος , δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων 1 και 2 ούτε μεταξύ των ομάδων 1 και 3.

Ημέρα 11

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι ακριβώς ανάλογα με τα αποτελέσματα της ημέρας 8. Πιο αναλυτικά, όπως βλέπουμε στον πίνακα 63, οι μάρτυρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη TEWL σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Και πάλι λοιπόν διαπιστώνουμε πως η ρεσβερατρόλη λειτουργεί προστατευτικά και κατασταλτικά στη φλεγμονή. Επίσης φαίνεται πως η ομάδα 3 παρουσιάζει και πάλι σημαντικά μικρότερη TEWL από την ομάδα 2 υποδεικνύοντας πως το σκέυμασμα που δίνεται στην ομάδα 3 είναι αποτελεσματικότερο από αυτό της ομάδας 2

Ημέρα 15

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 64 βλέπουμε πως όπως και την ημέρα 8 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην άδηλη απώλεια νερού μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Και πάλι δηλαδή βλέπουμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν την μεγαλύτερη άδηλη απώλεια νερού και όλα τα σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στη βλάβη του επιδερμικού φραγμού που προκαλεί η φλεγμονή. Ωστόσο την 15η ημέρα δεν μπορούμε να διακρίνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα ρεσβερατρόλης.

Paired- T Test

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός της αυτής της στατιστικής ανάλυσης είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος στην εξέλιξη της φλεγμονής με την πάροδο των ημερών. Ουσιαστικά πραγματοποιεί μία σύγκριση της προόδου της φλεγμονής από μέρα σε μέρα. Στη ανάλυση που κάναμε συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών 0,8 και 15. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 65 η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις που γίνονται μεταξύ όλων των ημερών. Συγκεκριμένα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της της ημέρας 8 γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρή φλεγμονή την ημέρα 8. Ταυτόχρονα φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 15 και 0, στοιχείο το οποίο μας δείχνει ότι η λειτουργία του επιδερμικού φραγμού δεν έχει επανέλθει. Τέλος φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 8 και 15, στοιχείο

το οποίο δείχνει ότι η υπερπλασία τη 15^η μέρα διατηρείται αλλά είναι αρκετά μικρότερη από την 8^η ημέρα στοιχείο λογικό αφού έχουμε ύφεση της φλεγμονής καθώς περνάνε οι ημέρες.

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τις υπόλοιπες ομάδες . Συγκεκριμένα, σε όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τη 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση της άδηλης απώλειας νερού σε σύγκριση με την 8η ημέρα αλλά ο φραγμός δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0)

6.1.1.3 Συνοπτικά Σχόλια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα(Διάγραμμα 9 και αντίστοιχοι πίνακες) διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η άδηλη απώλεια νερού, ακολουθεί μία σταθερή ανοδική πορεία μέχρι την 8^η ημέρα της φλεγμονής όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής και μετά από τη μέρα αυτή αρχίζει σταδιακά να μειώνεται καθώς η φλεγμονή βρίσκεται σε ύφεση όσο προχωράνε οι μέρες.
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή στο πάχος του δέρματος σε βάθος 14 ημερών (374,97%). Ακολουθεί η ομάδα 2 με 140% στη συνέχεια η ομάδα 1 με 110% ενώ τη μικρότερη μεταβολή την παρουσιάζει η ομάδα 3 με 81,98%.
- ✓ Για όλες τις ημέρες που ελήφθησαν μετρήσεις (με εξαίρεση την ημέρα 0 και την ημέρα 1 όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει να εμφανίζεται η φλεγμονή) η TEWL είναι μεγαλύτερη για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερη για την ομάδα 3 . Πίνακας 57
- ✓ Την 4η ημέρα οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη TEWL από όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική . Ετσι θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονη την 4η σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Δηλαδή φαίνεται πως και τα Τρία σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι της προκαλούμενης φλεγμονής. Ωστόσο δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων παρόλο που η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη άδηλη απώλεια νερού.
- ✓ Την ημέρα 8 δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη TEWL σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική.Τη δεύτερη μεγαλύτερη άδηλη απώλεια νερού την

παρουσιάζει η ομάδα 2 , Τρίτη σε σειρά είναι η ομάδα 1 ενώ η μικρότερη TEWL παρατηρείται στην ομάδα 3. Φαίνεται επιπλέον πως η ομάδα 3 παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη TEWL σε σχέση με την ομάδα 2. Ωστόσο οι ομάδες (1-2 και 1-3) που ακολουθούν θεραπεία με σκεύασμα ρεσβερατρόλης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους . Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν δύο πράγματα: 1) Τα σκευάσματα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στην καταστροφή του φραγμού του δέρματος που προκαλεί η φλεγμονή σε σχέση με τον φορέα που δεν περιέχει ρεσβερατρόλη. 2) Φαίνεται πως το σκεύασμα που έλαβε η ομάδα 3 (ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 5,3% μαζί με ενισχυτή διαπερατότητας) έχει σημαντικά καλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση σε σχέση με το σκεύασμα που έλαβε η ομάδα 2 (ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 2,5% μαζί με ενισχυτή διαπερατότητας)

- ✓ Την ημέρα 11 ελήφθησαν ανάλογα αποτελέσματα με την ημέρα 15.
- ✓ Την ημέρα 15 η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη άδηλη απώλεια νερού και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Δηλαδή όλες οι ομάδες που ακολουθούν θεραπεία με σκεύασμα ρεσβερατρόλης φαίνεται πως βελτιώνονται σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων.
- ✓ Για όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 4η και η 14η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι την 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση της άδηλης απώλειας νερού σε σύγκριση με την 8η ημέρα παρόλο που ο φραγμός δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0). Βέβαια η τιμή TEWL που παρουσιάζουν οι μάρτυρες είναι η μεγαλύτερη και στατιστικά μεγαλύτερη.
- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη βλάβη στη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού την εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων

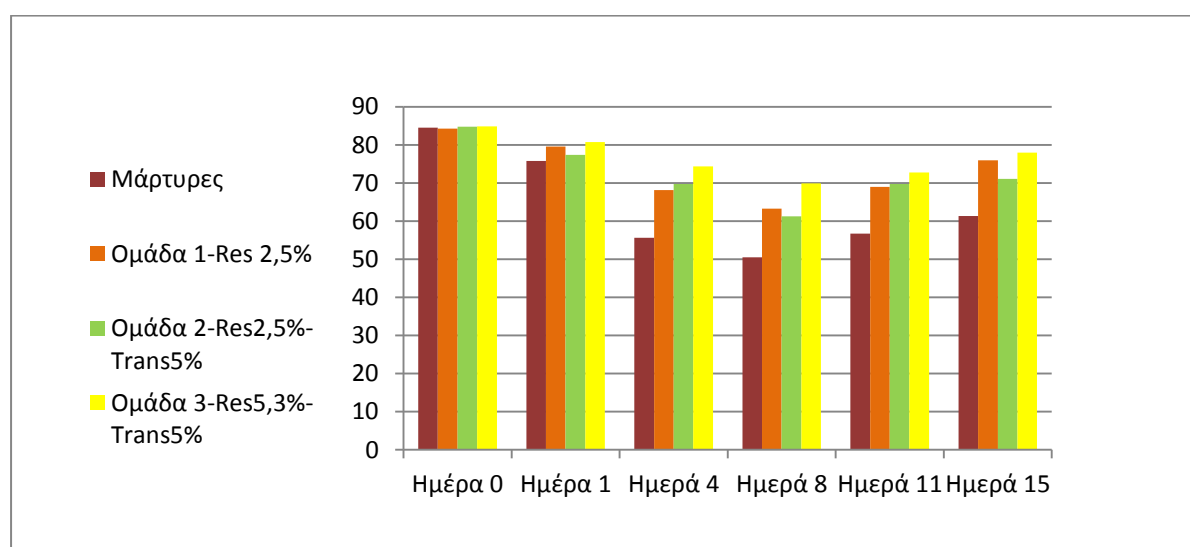
6.1.2 Αποτελέσματα -Συζήτηση Ενυδάτωσης

6.1.2.1 Αποτελέσματα Ενυδάτωσης –Στατιστική Ανάλυση

Μία από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν προκειμένου να εκτιμηθεί η έκταση της φλεγμονής των μυών, είναι η ενυδάτωση του δέρματος στην περιοχή που έγινε η ακτινοβολή. Στη φλεγμόνη που προκαλείται από έγκαυμα από UV ακτινοβολία παρατηρείται μείωση της ενυδάτωσης καθώς έχουμε διατραχή του επιδερμικού φραγμού και αύξηση της άδηλης απώλειας νερού. Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της ενυδάτωσης στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4,8, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15) δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 67 και το αντίστοιχο Διάγραμμα 10.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	84,49 ($\pm 4,7$)	75,74 ($\pm 2,57$)	55,65 ($\pm 5,06$)	50,53 ($\pm 3,74$)	56,7 ($\pm 5,1$)	61,32 ($\pm 2,18$)
Ομάδα 1	84,24 ($\pm 4,69$)	79,58 ($\pm 6,9$)	68,12 ($\pm 6,23$)	63,24 ($\pm 5,56$)	68,95 ($\pm 12,12$)	75,95 ($\pm 8,51$)
Ομάδα 2	84,78 ($\pm 2,97$)	77,37 ($\pm 5,79$)	69,7 ($\pm 13,89$)	61,24 ($\pm 7,01$)	69,75 ($\pm 14,12$)	71,07 ($\pm 6,58$)
Ομάδα 3	84,87 ($\pm 4,83$)	80,74 ($\pm 3,69$)	74,33 ($\pm 7,98$)	69,91 ($\pm 5,72$)	72,78 ($\pm 7,56$)	77,91 ($\pm 5,45$)

Πίνακας 67. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της ενυδάτωσης



Διάγραμμα 10. Μεταβολή της ενυδάτωσης του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Ποσοστιαία μεταβολή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική μεταβολή που υπέστη η ενυδάτωση των μυών των διαφορετικών ομάδων από την ημέρα 0 (baseline) μέχρι την τελευταία ημέρα της φλεγμονής (τη 15^η ημέρα) προσδιορίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή του της ενυδάτωσης. Η ποσοστιαία μεταβολή υπολογιστήκε με βάση την εξίσωση 5:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ομάδα	Ποσοστιαία μεταβολή
Μάρτυρες	27,42%
Ομάδα 1	9,84%
Ομάδα 2	16,16%
Ομάδα 3	8,1%

Πίνακας 68. Ποσοστιαία μεταβολή της ενυδάτωσης σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ενυδάτωσης που ελήφθησαν καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος, ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τη διερεύνηση χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια Kolmogorov –Smirnov (K-S) και Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες Πίνακα 69 και 70 αντίστοιχα.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Ομάδα 1	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Ομάδα 2	0,200	0,200	0,200	0,146	0,200	0,200
Ομάδα 3	0,200	0,058	0,200	0,177	0,200	0,200

Πίνακας 69. Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ενυδάτωσης σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,799	0,493	0,809	0,540	0,604	0,799
Ομάδα 1	0,270	0,226	0,551	0,368	0,123	0,361
Ομάδα 2	0,839	0,947	0,872	0,146	0,998	0,242
Ομάδα 3	0,057	0,749	0,621	0,057	0,062	0,893

Πίνακας 70. Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ενυδάτωσης σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του τόσο του ελέγχου K-S όσο και το S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές της ενυδάτωσης ακολουθούν κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Paired t-test και η ANOVA.

ONE WAY ANOVA

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα όλων των ομάδων ανά παράμετρο(πχ ενυδάτωση στη συγκεκριμένη περίπτωση) προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η σύγκριση των μετρήσεων γίνεται μεταξύ των ομάδων ανα δύο και ξεχωριστά για κάθε ημέρα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για τις ημέρες 0(baseline),1,4, 8 (έξαρση φλεγμονής) 11 και 15(τέλος φλεγμονής). Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι το LSD. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνται σημαντικές όταν η τιμή σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 και άρα μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση ότι οι ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους .

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 0.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,911
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,894
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,864
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,807
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,778
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,97

Πίνακας 71. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 0.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 1.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,139
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,523
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,057
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,388
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,647
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,191

Πίνακας 72. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 1.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 4

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,01
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,004
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,727
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,177
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,311

Πίνακας 73. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 8.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,483
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,025
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,005

Πίνακας 74. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 8.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,025
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,018
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,004
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,88
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,466
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,562

Πίνακας 75. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 11.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 15.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,003
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,119
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,523
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,032

Πίνακας 76. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 15.

Paired t-test

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης , όπως επεξηγήθηκε και νωρίτερα χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος ξεχωριστά σε κάθε παράμετρο (πχ ενυδάτωση στη συγκεκριμένη περίπτωση) καθώς προχωράνε οι ημέρες (από την πρώτη έως την τελευταία ημέρα της φλεγμονής).Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον Πίνακα

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες	0-8	30,94782	36,98218	0,000
	8-15	-14,12914	-7,45411	0,000
	0-15	18,50192	27,84483	0,000
Ομάδα 1	0-8	14,35381	27,65119	0,000
	8-15	-21,33667	-4,08083	0,01
	0-15	0,37575	16,21175	0,042
Ομάδα 2	0-8	17,28172	29,80078	0,000
	8-15	-19,01821	-0,64679	0,039
	0-15	9,69094	17,72656	0,000
Ομάδα 3	0-8	9,99267	19,92233	0,000
	8-15	-14,81092	-1,18908	0,027
	0-15	1,23988	12,67512	0,024

Πίνακας 77. Paired t-test για τη σύγκριση της ενυδάτωσης μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.

6.1.2.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων ενυδάτωσης

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 67 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος των τιμών της ενυδάτωσης και η τυπική απόκλιση καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα 10 βλέπουμε ότι η ενυδάτωση του δέρματος μειώνεται σταδιακά μέχρι την 8^η ημέρα όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής. Την ημέρα αυτή συναντάμε τη μικρότερη ενυδάτωση στο δέρμα των μυών όλων των ομάδων. Μετά την 8^η ημέρα η ενυδάτωση αρχίζει να αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 15^η ημέρα, κάτι που είναι λογικό αφού όσο περνάνε οι ημέρες προχωράμε προς την ύφεση της φλεγμονής. Ωστόσο οι μεταβολές της ενυδάτωσης του δέρματος των μυών από μέρα σε μέρα δεν είναι οι ίδιες μεταξύ των ομάδων γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση κάποιων από τα σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι για όλες τις ημέρες με εξαίρεση την ημέρα 0 και την ημέρα 1 όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει να εμφανίζεται η φλεγμονή, η τιμή της είναι μικρότερη για την ομάδα των μαρτύρων και μεγαλύτερη για την ομάδα 3. (διάγραμμα 10) Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω η ανάλυση αυτή έγινε με σκοπό την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην ενυδάτωση του δέρματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων από μέρα σε μέρα.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 όπως βλέπουμε στον πίνακα 71 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς την ημέρα 0 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόκληση της φλεγμονής κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος είναι οι φυσιολογικές (baseline) που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες. Το συμπέρασμα λοιπόν που μπορούμε να εξαγάγουμε είναι ότι κατά την έναρξη του πειράματος όλοι οι μύες έχουν την ίδια ενυδάτωση και δεν υπάρχουν ανομοιομορφίες μεταξύ των ομάδων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στη συνέχεια του πειράματος καθώς εάν εξαρχής

υπήρχαν διαφορές στο μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μυων δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε σωστά την επίδραση των διαφορετικών σκευασμάτων στην ενυδάτωση.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1 δηλαδή την πρώτη ημέρα της φλεγμονής , η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση και η ομάδα των μαρτύρων τη μικρότερη. Ωστόσο όπως βλέπουμε στον πίνακα 72 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό , καθώς την 1^η ημέρα της φλεγμονής δεν έχουν αρχίσει ακόμα να επιδρούν οι φλεγμονώδεις παράγοντες κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος τείνουν να είναι οι φυσιολογικές δηλαδή κοντά σε αυτές που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες.

Ημέρα 4

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 73 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενυδάτωση μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 4η ημέρα φαίνεται πως η ενυδάτωση του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την ενυδάτωση των υπόλοιπων ομάδων μυών.

Ημέρα 8

Σε αναλογία με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν την ημέρα 4 , παρατηρώντας τον Πίνακα 74 βλέπουμε ότι υπάρχουν και την ημέρα 8 στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενυδάτωση μεταξύ των μαρτύρων σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα την ημέρα 8. Συγκεκριμένα την 8η ημέρα φαίνεται πως η ομάδα των μαρτύρων διατηρεί τη χαμηλότερη τιμή της ενυδάτωσης σε σχέση με κάθε μια από τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με ρεσβερατρόλη. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι τα σκεύασμα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά στην φλεγμονή που προκαλείται από τη UV ακτινοβολία . Επιπλέον την 8η ημέρα, φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας 3 και των ομάδων 1 και 2. Συγκεκριμένα, η ομάδα 3 παρουσιάζει μεγαλύτερη ενυδάτωση σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες .Αυτό υποδεικνύει πως το σκεύασμα ρεσβερατρόλης που δόθηκε στην ομάδα 3 λειτούργησε περισσότερο προστατευτικά σε σχέση με τα σκεύασμα 1 και 2. Υπενθυμίζεται ότι το σκεύασμα 3

έχει τη μεγαλύτερη συγκεντρωση ρεσβερατρόλης η οποία επιπλέον βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού και επιπλέον ενισχυτή διαπερατότητας . Το σκεύασμα 2 έχει ενισχυτή διαπερατότητας αλλά η ρεσβερατόλη είναι σε μικρότερη συγκέντρωση και αυτή δεν είναι η συγκέντρωση κορεσμού και τέλος το σκεύασμα 1 έχει την ίδια συγκέντρωση με το σκεύασμα 2 αλλά δεν διαθέτει ενισχυτή διαπερατότητας . Άρα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης βοηθά στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία της φλεγμονής , όπως επίσης και η μεγαλύτερη θερμοδυναμική ενεργότητα του σκευάσματος.

Τέλος , δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων 1 και 2 γεγονός που υποδεικνύει ότι έχουν την ίδια περίπου δράση κατά της φλεγμονής

Ημέρα 11

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι ακριβώς ανάλογα με τα αποτελέσματα της ημέρας 4. Πιο αναλυτικά, όπως βλέπουμε στον πίνακα 75, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενυδάτωση μεταξύ μαρτύρων και των υπόλοιπων ομάδων, με τους μάρτυρες να έχουν μικρότερες τιμές ενυδάτωσης. Και πάλι λοιπόν διαπιστώνουμε πως η ρεσβερατρόλη λειτουργεί προστατευτικά και κατασταλτικά στη φλεγμονή. Ωστόσο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μυών που ακολουθούν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα.

Ημέρα 15

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 76 βλέπουμε πως όπως και τις ημέρες 4, 8 και 11 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενυδάτωση μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Ωστόσο και πάλι δεν μπορούμε να διακρίνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα ρεσβερατρόλης.

Paired- T Test

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός της αυτής της στατιστικής ανάλυσης είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος στην εξέλιξη της φλεγμονής με την πάροδο των ημερών. Ουσιαστικά πραγματοποιεί μία σύγκριση της προόδου της φλεγμονής από μέρα σε μέρα. Στη ανάλυση που κάναμε συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών 0,8 και 15.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 77η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις που γίνονται μεταξύ όλων των ημερών. Συγκεκριμένα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της της ημέρας 8 γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρή φλεγμονή την ημέρα 8. Ταυτόχρονα φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 15 και 0, στοιχείο το οποίο μας δείχνει ότι το δέρμα δεν έχει επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση. Τέλος φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 8 και 15, στοιχείο το οποίο δείχνει ότι τη 15η μέρα η ενυδάτωση είναι ακόμα χαμηλή αλλά είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την 8η ημέρα στοιχείο λογικό αφού έχουμε ύφεση της φλεγμονής καθώς περνάνε οι ημέρες.

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τις υπόλοιπες ομάδες . Συγκεκριμένα, σε όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τη 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση της ενυδάτωσης σε σύγκριση με την 8η ημέρα αλλά δεν επανέρχεται πλήρως στα φυσιολογικά επίπεδα (τιμές ημέρας 0)

6.1.2.3 Συνοπτικά Σχόλια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η ενυδάτωση του δέρματος των μυών όλων των ομάδων μειώνεται σταθερά μέχρι την 8^η ημέρα της φλεγμονής όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής και στη συνέχεια μετά από την 8^η μέρα αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται καθώς η φλεγμονή βρίσκεται σε ύφεση όσο προχωράνε οι μέρες. (διάγραμμα 10)
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή στην ενυδάτωση του δέρματος σε βάθος 14 ημερών (27,42%). Ακολουθούν η ομάδα 2 με 16,16% και η ομάδα 1 με 9,84% .Τη μικρότερη μεταβολή στην ενυδάτωση σε βάθος 14 ημερών την παρουσιάζει η ομάδα 3 με 8,1%. Δηλαδή η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση της ενυδάτωσης και η ομάδα 3 τη μικρότερη.
- ✓ Για όλες τις ημέρες που ελήφθησαν μετρήσεις (με εξαίρεση την ημέρα 0-baseline) η ενυδάτωση του δέρματος είναι μικρότερη για την ομάδα των μαρτύρων και μεγαλύτερη για την ομάδα 3. (διάγραμμα 10)
- ✓ Την 4η ημέρα οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μικρότερη ενυδάτωση από όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Τη δεύτερη μικρότερη ενυδάτωση παρουσιάζει η ομάδα 1 και τρίτη σε σειρά είναι η ομάδα 2. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση από όλες τις υπόλοιπες ομάδες .Ωστόσο από τις διαφορές αυτές μόνο η ενυδάτωση

του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την ενυδάτωση όλων των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή την 4^η σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Δηλαδή φαίνεται πως και τα ρία σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι της προκαλούμενης φλεγμονής.

- ✓ Την ημέρα 8 δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής οι μάρτυρες παρουσιάζουν και πάλι τη μικρότερη ενυδάτωση δέρματος σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική (Πίνακας). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως όλα τα σκευάσματα ρεσβερατρόλης δρουν προστατευτικά και κατασταλτικά κατά της φλεγμονής σε σύγκριση με το φορέα. Επιπλέον την 8η ημέρα, φαίνεται πως η ομάδα 3 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ενυδάτωση τόσο σε σύγκριση με την ομάδα 1 όσο και σε σύγκριση με την ομάδα 2. Αυτό υποδεικνύει πως το σκεύασμα ρεσβερατρόλης που δόθηκε στην ομάδα 3 λειτούργησε περισσότερο προστατευτικά σε σχέση με τα σκευάσματα 1 και 2.
- ✓ Την ημέρα 11 παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα με την ημέρα 4. Οι μάρτυρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ενυδάτωση από όλες τις άλλες ομάδες. Τη δεύτερη μικρότερη ενυδάτωση παρουσιάζει η ομάδα 1 και την τρίτη η ομάδα 2. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση, ωστόσο αυτές οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές .
- ✓ Την ημέρα 15 προκύπτουν ανάλογα αποτελέσματα. Πιο αναλυτικά η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μικρότερη ενυδάτωση και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Ωστόσο δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων. παρόλο που και πάλι η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενυδάτωση.
- ✓ Για όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι την 8η παρατηρείται έντονη φλεγμονή σε σχέση με την ημέρα 0 και την 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση της ενυδάτωσης του δέρματος σε σύγκριση με την 8η ημέρα παρόλο που δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0) .Βέβαια η μεταβολή που παρουσιάζουν οι μάρτυρες είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις αρχικές μετρήσεις, και στατιστικά μεγαλύτερη επίσης σε σχέση με τα υπόλοιπα σκευάσματα.

- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μικρότερη ενυδάτωση την εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων καθ'όλη τη διάρκεια της φλεγμονής και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η ομάδα 3 παρουσιάζει την καλύτερη ενυδάτωση.

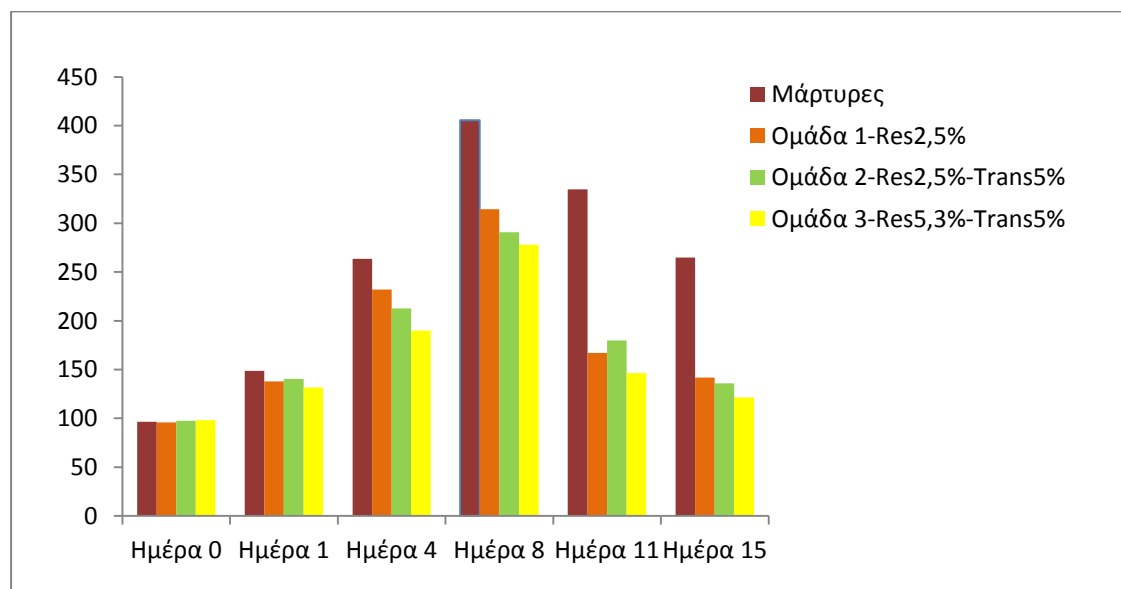
6.1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση Ερυθρότητας

6.1.3.1 Αποτελέσματα ερυθρότητας –Στατιστική Ανάλυση

Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της ερυθρότητας στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4,8, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15) δίνονται στον παρακάτω Πίνακα 71 και το αντίστοιχο Διάγραμμα 7.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	396,375 (±4,47)	148,75 (±18,02)	263,5 (±34,33)	405,625 (±25,78)	334,75 (±46,1)	264,75 (±37,8)
Ομάδα 1	96 (±4,95)	137,75 (±21,65)	232,125 (±17,5)	314,5 (±49,85)	167 (±46,55)	141,75 (±38,35)
Ομάδα 2	97,625 (±5,26)	140,625 (±20,58)	212,75 (±25,24)	290,625 (±69,39)	179,75 (±50,79)	135,875 (±35,01)
Ομάδα 3	98,25 (±6,29)	131,5 (±18,44)	190,125 (±23,6)	277,875 (±63,53)	146,5 (±46,87)	121,5 (±26,88)

Πίνακας 78. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών της ερυθρότητας



Διάγραμμα 11. Μεταβολή της TEWL του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Ποσοστιαία μεταβολή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική μεταβολή της ερυθρότητας των μυών των διαφορετικών ομάδων από την ημέρα 0 (baseline) μέχρι την τελευταία ημέρα της φλεγμονής (τη 15^η ημέρα) προσδιορίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή του πάχους. Η ποσοστιαία μεταβολή υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 5:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα 72:

Ομάδα	Ποσοστιαία μεταβολή
Μάρτυρες	-174,7%
Ομάδα 1	-47,66%
Ομάδα 2	-39,18%
Ομάδα 3	-23,66%

Πίνακας 79. Ποσοστιαία μεταβολή της ερυθρότητας σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ερυθρότητας που ελήφθησαν τις ημέρες των μετρήσεων ακολουθούν κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο Kolmogorov –Smirnov (K-S) και Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους πίνακες 80 και 81, αντίστοιχα.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,200	0,200	0,200	0,200	0,130	0,057
Ομάδα 1	0,200	0,200	0,200	0,112	0,066	0,062
Ομάδα 2	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
Ομάδα 3	0,200	0,058	0,085	0,200	0,200	0,200

Πίνακας 80. Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ερυθρότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,526	0,120	0,0061	0,454	0,423	0,074
Ομάδα 1	0,733	0,131	0,796	0,064	0,056	0,097
Ομάδα 2	0,721	0,505	0,741	0,136	0,186	0,075
Ομάδα 3	0,635	0,056	0,196	0,134	0,052	0,056

Πίνακας 81. Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ερυθρότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

ONE WAY ANOVA

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθούν τα αποτελέσματα όλων των ομάδων ανά παράμετρο(πχ ερυθρότητας στη συγκεκριμένη περίπτωση) προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η σύγκριση των μετρήσεων γίνεται μεταξύ των ομάδων ανα δύο και ξεχωριστά για κάθε ημέρα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για τις ημέρες 0(baseline),1,4, 8 (έξαρση φλεγμονής) ,11 και 15(τέλος φλεγμονής). Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών είναι το LSD. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρούνται σημαντικές όταν η τιμή σημαντικότητας είναι μικρότερη του 0,05 και άρα μπορεί να απορριφθεί η αρχική υπόθεση ότι οι ομάδες δεν διαφέρουν μεταξύ τους .

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ερυθρότητας την ημέρα 0.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,888
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,64
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,484
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,544
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,402
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,815

Πίνακας 82. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 0.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ερυθρότητας την ημέρα 1.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,274
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,417
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,091
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,773
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,532
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,363

Πίνακας 83. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 1.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ερυθρότητας την ημέρα 4

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,022
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,146
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,003
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,091

Πίνακας 84. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ενυδάτωσης την ημέρα 4.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ερυθρότητας την ημέρα 8.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,002
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,391
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,192

Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,645
------------------------	-------

Πίνακας 85. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 8.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ερυθρότητας την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,732
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,243
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,132

Πίνακας 86. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 11.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ενυδάτωσης την ημέρα 15.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,000
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,732
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,243
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,404

Πίνακας 87. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ερυθρότητας την ημέρα 15.

Paired t-test

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος ξεχωριστά σε κάθε παράμετρο της φλεγμονής (πχ ερυθρότητα στη συγκεκριμένη περίπτωση) καθώς περνούν οι μέρες προκειμένου να ανιχνευτούν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ημερών. Η ανάλυση πραγματοποιείται ξεχωριστά για

κάθε μία από τις ομάδες . Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον Πίνακα 88

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες	0-8	-329,71	-288,78	0,000
	8-15	110,76	170,98	0,000
	0-15	-199,71	-137,033	0,000
Ομάδα 1	0-8	-259,90	-177,09	0,000
	8-15	141,87	203,62	0,000
	0-15	-75,97	-15,52	0,009
Ομάδα 2	0-8	-247,97	-138,022	0,000
	8-15	111,09	198,40	0,000
	0-15	-66,786	-9,713	0,016
Ομάδα 3	0-8	-232,522	-126,72	0,000
	8-15	111,667	201,082	0,000
	0-15	-44,431	-2,0683	0,036

Πίνακας 88. Paired t-test για τη σύγκριση της ερυθρότητας μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.

6.1.3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων ερυθρότητας

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 78 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος των τιμών της ερυθρότητας και η τυπική απόκλιση καθώς και το διάγραμμα 11 βλέπουμε ότι η ερυθρότητα του δέρματος αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 8^η ημέρα όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής. Την ημέρα αυτή συναντάμε τη μεγαλύτερη ερυθρότητα στο δέρμα των μυών όλων των ομάδων. Μετά την 8^η ημέρα η ερυθρότητα αρχίζει να μειώνεται σταδιακά μέχρι την 15^η ημέρα , κάτι που είναι λογικό αφού όσο περνάνε οι ημέρες προχωράμε προς την ύφεση της φλεγμονής και περιορίζεται το ερύθημα. Ωστόσο οι μεταβολές της ερυθρότητας του δέρματος των μυών από μέρα σε μέρα δεν είναι οι ίδιες μεταξύ των ομάδων γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση κάποιων από τα σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι για όλες τις ημέρες με εξαίρεση την ημέρα 0 όπου ακόμα δεν έχει προκληθεί η φλεγμονή , η τιμή της ερυθρότητας είναι μεγαλύτερη για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερη για

την ομάδα 3. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω η ανάλυση αυτή έγινε με σκοπό την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην ερυθρότητα του δέρματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων από μέρα σε μέρα.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 όπως βλέπουμε στον πίνακα 82 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς την ημέρα 0 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόκληση της φλεγμονής κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος είναι οι φυσιολογικές (baseline) που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες. Το συμπέρασμα λοιπόν που μπορούμε να εξάγουμε είναι ότι κατά την έναρξη του πειράματος όλοι οι μύες έχουν την ίδια ερυθρότητα και δεν υπάρχουν ανομοιομορφίες μεταξύ των ομάδων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στη συνέχεια του πειράματος καθώς εάν εξαρχής υπήρχαν διαφορές στο μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μυων δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε σωστά την επίδραση των διαφορετικών σκευασμάτων στην ερυθρότητα που προκαλείται από τη φλεγμονή.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1 δηλαδή την πρώτη ημέρα της φλεγμονής, η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη ερυθρότητα και η ομάδα των μαρτύρων τη μεγαλύτερη. Ωστόσο όπως βλέπουμε στον πίνακα 83 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς την 1^η ημέρα της φλεγμονής δεν έχουν αρχίσει ακόμα να επιδρούν οι φλεγμονώδεις παράγοντες κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος τείνουν να είναι οι φυσιολογικές δηλαδή κοντά σε αυτές που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες.

Ημέρα 4

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 84 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενρυθρότητα μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 4η ημέρα φαίνεται πως η ενρυθρότητα του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Επιπλέον βλέπουμε πως η ομάδα 3 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μικρότερη ενρυθρότητα σε σχέση με την ομάδα 1. Ωστόσο, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων 1 και 2 και μεταξύ των ομάδων 2 και 3.

Ημέρα 8

Την 8η ημέρα (πίνακας 85) παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενρυθρότητα των μαρτύρων σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Συγκεκριμένα την 8η ημέρα οι μάρτυρες έχουν τη μεγαλύτερη ενρυθρότητα σε σύγκριση με κάθε μια από τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με ρεσβερατρόλη. Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων ομάδων.

Ημέρα 11

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι ακριβώς ανάλογα με τα αποτελέσματα της ημέρας 8. Πιο αναλυτικά, όπως βλέπουμε στον πίνακα 86, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενρυθρότητα μεταξύ μαρτύρων και των υπόλοιπων ομάδων, με τους μάρτυρες να έχουν τη μεγαλύτερη ενρυθρότητα. Και πάλι λοιπόν διαπιστώνουμε πως η ρεσβερατρόλη λειτουργεί προστατευτικά και κατασταλτικά στη φλεγμονή. Ωστόσο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μυών που ακολουθούν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα.

Ημέρα 15

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα βλέπουμε πως όπως και τις ημέρες 4, 8 και 11 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενρυθρότητα μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Και πάλι οι

μάρτυρες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ερυθρότητα. Ωστόσο και πάλι δεν μπορούμε να διακρίνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα ρεσβερατρώλης.

Paired- T Test

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός της αυτής της στατιστικής ανάλυσης είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος στην εξέλιξη της φλεγμονής με την πάροδο των ημερών. Ουσιαστικά πραγματοποιεί μία σύγκριση της προόδου της φλεγμονής από μέρα σε μέρα. Στην ανάλυση που κάναμε συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών 0,8 και 15. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στι συγκρίσεις που γίνονται μεταξύ όλων των ημερών. Συγκεκριμένα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της της ημέρας 8 γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρή φλεγμονή την ημέρα 8. Ταυτόχρονα φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 15 και 0, στοιχείο το οποίο μας δείχνει ότι το δέρμα δεν έχει επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση. Τέλος φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 8 και 15, στοιχείο το οποίο δείχνει ότι τη 15η μέρα η ερυθρότητα είναι ακόμα υψηλή αλλά είναι μικρότερη σε σχέση με την 8η ημέρα στοιχείο λογικό αφού έχουμε ύφεση της φλεγμονής καθώς περνάνε οι ημέρες.

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τις υπόλοιπες ομάδες . Συγκεκριμένα, σε όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τη 15η ημέρα υπάρχει μείωση της ερυθρότητας σε σύγκριση με την 8η ημέρα αλλά δεν επανέρχεται πλήρως στα φυσιολογικά επίπεδα (τιμές ημέρας 0) Η ερυθρότητα ωστόσο των μαρτύρων είναι αρκετά μεγαλύτερη.

6.1.3.3 Συνοπτικά σχόλια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η ερυθρότητα του δέρματος των μυών όλων των ομάδων, αυξάνεται σταθερά μέχρι την 8^η ημέρα της φλεγμονής όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής και στη συνέχεια μετά από την 8^η μέρα αρχίζει σταδιακά να μειώνεται καθώς η φλεγμονή βρίσκεται σε ύφεση όσο προχωράνε οι μέρες. (διάγραμμα 11)
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή στην ερυθρότητα του δέρματος σε βάθος 14 ημερών (-174,7%). Ακολουθούν η ομάδα 1

με -47,66% και η ομάδα 2 με 39,18%. Τη μικρότερη μεταβολή στην ερυθρότητα σε βάθος 14 ημερών την παρουσιάζει η ομάδα 3 με -23,66%. Δηλαδή η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση της ερυθρότητας και η ομάδα 3 τη μικρότερη. Πίνακας 79

- ✓ Για όλες τις ημέρες που ελήφθησαν μετρήσεις (με εξαίρεση την ημέρα 0-baseline) η ερυθρότητα του δέρματος είναι μεγαλύτερη για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερη για την ομάδα 3.
- ✓ Την 1^η ημέρα οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ερυθρότητα και η ομάδα 3 τη μικρότερη. Ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, στοιχείο λογικό αφού την πρώτη ημέρα πρόκλησης της φλεγμονής, δεν έχουν αρχίσει να επιδρούν ακόμη οι φλεγμονώδεις παράγοντες και οι μετρήσεις είναι κοντά σε αυτές του baseline.
- ✓ Την 4η ημέρα οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ερυθρότητα από όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή την 4η σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Δηλαδή φαίνεται πως και τα τρία σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι της προκαλούμενης φλεγμονής σε σύγκριση με το φορέα. Η ομάδα 1 παρουσιάζει τη δεύτερη μεγαλύτερη ερυθρότητα και η ομάδα 2 είναι τρίτη σε σειρά. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη ερυθρότητα ενυδάτωση από όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Ωστόσο από τις διαφορές αυτές μεταξύ των ομάδων 1-3 στατιστικά σημαντική είναι μόνο η διαφορά μεταξύ της ομάδας 1 και 3. Δηλαδή το ερυθρότητα που παροσιάζουν οι μύες της ομάδας 3 είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό της ομάδας 1. Αυτό υποδεικνύει ότι το σκεύσμα ρεσβερατρόλης που έλαβε η ομάδα 3 δρα αποτελεσματικότερα σε σχέση με αυτό της ομάδας 1. Υπενθυμίζεται ότι το σκεύασμα της ομάδας 3 περιέχει ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 5,3% η οποία βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού και επιπλέον περιέχει ενισχυτή διαπερατότητας ενώ το σκεύσμα που χορηγείται στην ομάδα 1 περιέχει ρεσβερατρόλη σε ποσοστό 2,5% επίσης σε συγκέντρωση κορεσμού αλλά δεν περιέχει ενισχυτή διαπερατότητας. Φαίνεται λοιπόν πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης λειτουργεί αποτελεσματικότερα εναντίον της φλεγμονής.
- ✓ Την ημέρα 8 δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής οι μάρτυρες παρουσιάζουν και πάλι τη μεγαλύτερη ερυθρότητα δέρματος σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει πως όλα τα σκευάσματα ρεσβερατρώλης δρουν προστατευτικά και κατασταλτικά κατά της φλεγμονής σε σύγκριση με το φορέα. Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπόλοιπων ομάδων.

- ✓ Την ημέρα 11 παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα με την ημέρα 8. Οι μάρτυρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ερυθρότητα από όλες τις άλλες ομάδες. Τη δεύτερη μεγαλύτερη ερυθρότητα παρουσιάζει η ομάδα 2 και την τρίτη η ομάδα 1. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη ερυθρότητα, ωστόσο αυτές οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές.
- ✓ Την ημέρα 15 προκύπτουν ανάλογα αποτελέσματα. Πιο αναλυτικά η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ερυθρότητα και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Ωστόσο δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων. παρόλο που και πάλι η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μικρότερη ερυθρότητα.
- ✓ Για όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι την 8η παρατηρείται έντονη φλεγμονή σε σχέση με την ημέρα 0 και την 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση της ερυθρότητας του δέρματος σε σύγκριση με την 8η ημέρα παρόλο που δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0) Βέβαια η ερυθρότητα που παρουσιάζουν οι μάρτυρες είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις αρχικές μετρήσεις, και στατιστικά μεγαλύτερη επίσης σε σχέση με τα υπόλοιπα σκευάσματα.
- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη ερυθρότητα την εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων καθ'όλη τη διάρκεια της φλεγμονής και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η ομάδα 3 παρουσιάζει την μικρότερη ερυθρότητα απ'όλες τις ομάδες όλες τις ημέρες.

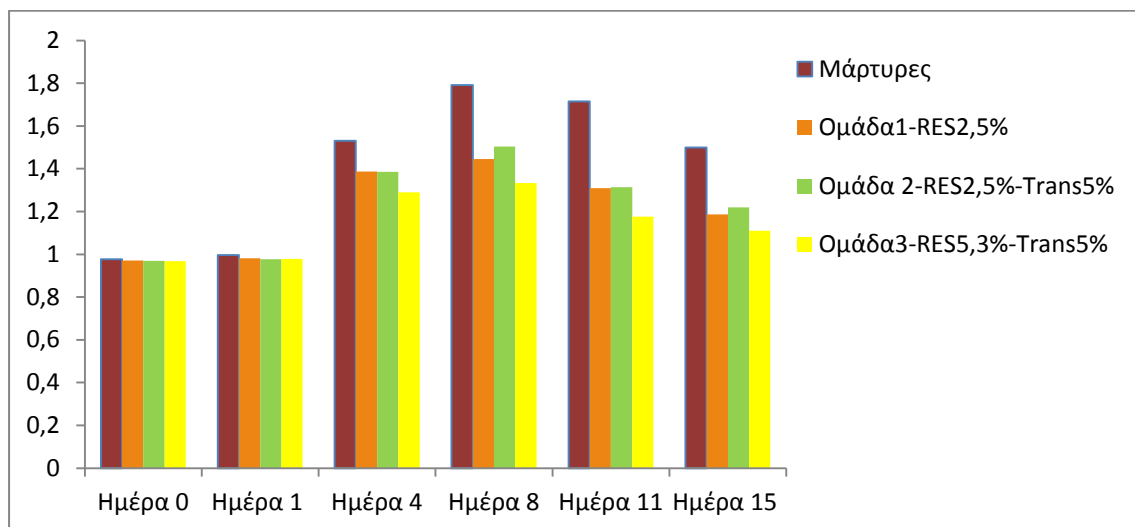
6.1.4 Αποτελέσματα-Συζήτηση Πάχους

6.1.4.1 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 4,8, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15) δίνονται στον παρακάτω Πίνακα και το αντίστοιχο Διάγραμμα 12

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,98 ($\pm 0,04$)	0,996 ($\pm 0,04$)	1,53 ($\pm 0,1$)	1,79 ($\pm 0,08$)	1,72 ($\pm 0,14$)	1,5 ($\pm 0,16$)
Ομάδα 1	0,97 ($\pm 0,04$)	0,98 ($\pm 0,04$)	1,39 ($\pm 0,11$)	1,45 ($\pm 0,21$)	1,31 ($\pm 0,26$)	1,18 ($\pm 0,16$)
Ομάδα 2	0,97 ($\pm 0,04$)	0,977 ($\pm 0,03$)	1,38 ($\pm 0,16$)	1,50 ($\pm 0,18$)	1,31 ($\pm 0,25$)	1,22 ($\pm 0,21$)
Ομάδα 3	0,97 ($\pm 0,02$)	0,98 ($\pm 0,03$)	1,29 ($\pm 0,06$)	1,33 ($\pm 0,06$)	1,18 ($\pm 0,16$)	1,11 ($\pm 0,14$)

Πίνακας 89 Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών του πάχους



Διάγραμμα 12. Μεταβολή του πάχους του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών:

Ποσοστιαία μεταβολή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική μεταβολή που υπέστη το πάχος των μυών των διαφορετικών ομάδων από την ημέρα 0 (baseline) μέχρι την τελευταία ημέρα της φλεγμονής (τη 15^η ημέρα) προσδιορίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή του πάχους. Η ποσοσοστιαία μεταβολή υπολογιστήκε με βάση την εξίσωση 5:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ομάδα	Ποσοστιαία μεταβολή
Μάρτυρες	-53,06%
Ομάδα 1	-21,64%
Ομάδα 2	-25,77%
Ομάδα 3	-14,43%

Πίνακας 90. Ποσοστιαία μεταβολή του πάχους σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Έλεγχος κανονικότητας

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) και Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους πίνακες 91 και 92 , αντίστοιχα.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,200	0,200	0,147	0,059	0,200	0,200
Ομάδα 1	0,200	0,200	0,200	0,057	0,200	0,200
Ομάδα 2	0,062	0,200	0,200	0,174	0,200	0,200
Ομάδα 3	0,200	0,200	0,200	0,200	0,061	0,083

Πίνακας 91. Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής του πάχους σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,482	0,547	0,591	0,443	0,628	0,529
Ομάδα 1	0,450	0,159	0,056	0,092	0,269	0,650
Ομάδα 2	0,335	0,128	0,132	0,158	0,516	0,506
Ομάδα 3	0,252	0,608	0,739	0,357	0,065	0,070

Πίνακας 92. Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής του πάχους σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του τόσο του ελέγχου K-S όσο και το S-W 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. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Paired t-test και η ANOVA

ONE WAY ANOVA

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα του πάχους την ημέρα 0.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,347
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,222
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,325
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,742
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,784
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,1859

Πίνακας 93. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 0

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα του πάχους την ημέρα 1.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,427
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,322
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,355
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,842
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,894
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,947

Πίνακας 94. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 1

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα του πάχους την ημέρα 4.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,018
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,017
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,966
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,101
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,109

Πίνακας 95. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 4

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα του πάχους την ημέρα 8.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,00
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,00
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,441
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,146
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,031

Πίνακας 96. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 8.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα του πάχους την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,963
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,220
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,204

Πίνακας 97. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 11

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,004
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,715
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,394
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,227

Πίνακας 98. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών του πάχους την ημέρα 15.

Paired t-test

Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον Πίνακα 99

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες	0-8	-0,87369	-0,75381	0,000
	8-15	0,16597	0,41903	0,001
	0-15	-0,66067	-0,38183	0,000
Ομάδα 1	0-8	-0,62569	-0,30431	0,000
	8-15	0,18140	0,28110	0,000
	0-15	-0,39580	-0,07170	0,011
Ομάδα 2	0-8	-0,71351	-0,34899	0,000
	8-15	0,09995	0,46505	0,008
	0-15	-0,41658	-0,08092	0,01
Ομάδα 3	0-8	-0,26375	-7,354	0,000
	8-15	0,32323	5,517	0,001
	0-15	-0,03581	-3,033	0,019

Πίνακας 99. Paired t-test για τη σύγκριση του πάχους μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.

6.1.4.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων πάχους δέρματος

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 89 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος των τιμών του πάχους και η τυπική απόκλιση καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα 12 βλέπουμε ότι το πάχος του δέρματος αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 8^η ημέρα όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής. Την ημέρα αυτή συναντάμε υπερπάχυνση της επιδερμίδας σε όλες τις ομάδες όπως είναι λογικό μετά από την έκθεση των μυών σε υπεριώδη ακτινοβολία καθώς η επιδερμική υπερπλασία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας ενάντια στην εισχώρηση της UVR στο δέρμα. Μετά την 8^η ημέρα το πάχος της επιδερμίδας αρχίζει να μειώνεται σταδιακά μέχρι την 15^η ημέρα, κάτι που είναι λογικό αφού όσο περνάνε οι ημέρες προχωράμε προς την ύφεση της φλεγμονής. Ωστόσο οι αυξομειώσεις στο πάχος του δέρματος των μυών δεν είναι οι ίδιες μεταξύ των ομάδων γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση κάποιων από τα σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι για όλες τις ημέρες με εξαίρεση την ημέρα 0 και την ημέρα 1 όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει να εμφανίζεται η φλεγμονή το πάχος του δέρματος είναι μεγαλύτερο για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερο για την ομάδα 3. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω η ανάλυση αυτή έγινε με σκοπό την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών στο πάχος του δέρματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων από μέρα σε μέρα.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 όπως βλέπουμε στον πίνακα 93 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς την ημέρα 0 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόκληση της φλεγμονής κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος είναι οι φυσιολογικές (baseline) που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες. Το συμπέρασμα λοιπόν που μπορούμε να εξαγάγουμε είναι ότι κατά την έναρξη του πειράματος όλοι οι μύες έχουν το ίδιο πάχος και δεν υπάρχουν ανομοιομορφίες μεταξύ των ομάδων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στη συνέχεια του πειράματος καθώς εάν εξαρχής υπήρχαν διαφορές στο μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μυών δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε σωστά την επίδραση των διαφορετικών σκευασμάτων.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1 δηλαδή την πρώτη ημέρα της φλεγμονής , η ομάδα 3 παρουσιάζει το μικρότερο πάχος και η ομάδα των μαρτύρων το μεγαλύτερο. Ωστόσο όπως βλέπουμε στον πίνακα 94 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό , καθώς την 1η ημέρα της φλεγμονής δεν έχουν αρχίσει ακόμα να επιδρούν οι φλεγμονώδεις παράγοντες κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος τείνουν να είναι οι φυσιολογικές δηλαδή κοντά σε αυτές που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες.

Ημέρα 4

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 94 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο πάχος μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 4η ημέρα φαίνεται πως το πάχος δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης.

Ημέρα 8

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 95 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο πάχος μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 8η ημέρα φαίνεται πως το πάχος του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με ρεσβερατρόλη. Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης.

Ημέρα 11

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι ακριβώς ανάλογα με τα αποτελέσματα της ημέρας 4. Πιο αναλυτικά, όπως βλέπουμε στον πίνακα 96, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο πάχος μεταξύ μαρτύρων και των υπόλοιπων ομάδων, με τους μάρτυρες να έχουν τη μεγαλύτερο πάχος. Και πάλι λοιπόν διαπιστώνουμε πως η ρεσβερατρόλη λειτουργεί προστατευτικά και κατασταλτικά στη φλεγμονή. Ωστόσο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μυών που ακολουθούν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα.

Ημέρα 15

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 97 βλέπουμε πως όπως και την ημέρα 8 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο πάχος μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Και πάλι δηλαδή βλέπουμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν την μεγαλύτερη υπερπλασία και όλα τα σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στην υπερπλασία του δέρματος που προκαλεί η φλεγμονή. Ωστόσο και πάλι δεν μπορούμε να διακρίνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία με διαφορετικά σκευάσματα ρεσβερατρόλης.

Paired- T Test

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός της αυτής της στατιστικής ανάλυσης είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος στην εξέλιξη της φλεγμονής με την πάροδο των ημερών. Ουσιαστικά πραγματοποιεί μία σύγκριση της προόδου της φλεγμονής από μέρα σε μέρα. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα 99 η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις που γίνονται μεταξύ όλων των ημερών. Συγκεκριμένα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της της ημέρας 8 γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρή φλεγμονή την ημέρα 8. Ταυτόχρονα φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 15 και 0, στοιχείο το οποίο μας δείχνει ότι η υπερπλασία του δέρματος διατηρείται και το δέρμα δεν έχει επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση. Τέλος φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 8 και 15, στοιχείο το οποίο δείχνει ότι η υπερπλασία

τη 15^η μέρα διατηρείται αλλά είναι αρκετά μικρότερη από την 8^η ημέρα στοιχείο λογικό αφού έχουμε ύφεση της φλεγμονής καθώς περνάνε οι ημέρες.

Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για τις υπόλοιπες ομάδες . Συγκεκριμένα, σε όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 8η και η 15η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τη 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση του πάχους σε σύγκριση με την 8η ημέρα αλλά δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0)

6.1.4.3 Συνοπτικά Σχόλια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι :

- ✓ Το πάχος του δέρματος, ακολουθεί μία σταθερή ανοδική πορεία μέχρι την 8^η ημέρα της φλεγμονής όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής και μετά από τη μέρα αυτή αρχίζει σταδιακά να μειώνεται καθώς η φλεγμονή βρίσκεται σε ύφεση όσο προχωράνε οι μέρες. (διάγραμμα 12)
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή στο πάχος του δέρματος σε βάθος 14 ημερών (53,32%). Ακολουθούν η ομάδα 1 και η ομάδα 2 με 24% και 24,74% αντίστοιχα ενώ τη μικρότερη μεταβολή την παρουσιάζει η ομάδα 3 με 16,8%.
- ✓ Για όλες τις ημέρες που ελήφθησαν μετρήσεις (με εξαίρεση την ημέρα 0 και την ημέρα 1 όπου ακόμα δεν έχει αρχίσει να εμφανίζεται η φλεγμονή) το πάχος του δέρματος είναι μεγαλύτερο για την ομάδα των μαρτύρων και μικρότερο για την ομάδα 3.
- ✓ Την ημέρα 8 δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής οι μάρτυρες παρουσιάζουν το μεγαλύτερο πάχος δέρματος σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική Δεύτερη σε σειρά αναφορικά με το πάχος του δέρματος είναι η ομάδα 2 ενώ το μικρότερο πάχος παρατηρείται στην ομάδα 3. Ωστόσο οι ομάδες (1,2 και 3) που ακολουθούν θεραπεία με σκεύασμα ρεσβερατρόλης δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους . Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι τα σκευάσματα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά έναντι στην υπερπλασία του δέρματος που προκαλεί η φλεγμονή σε σχέση με τον φορέα που δεν περιέχει ρεσβερατρόλη.

- ✓ Την ημέρα 15 προκύπτουν ανάλογα αποτελέσματα με την ημέρα 8. Πιο αναλυτικά η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει το μεγαλύτερο πάχος δέρματος και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Δηλαδή όλες οι ομάδες που ακολουθούν θεραπεία με σκέυασμα ρεσβερατρώλης φαίνεται πως βελτιώνονται σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων.
- ✓ Για όλες τις ομάδες, η 0 ημέρα (πριν την ακτινοβολήση), η 4η και η 14η (τέλος πειράματος) διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι την 15η ημέρα υπάρχει βελτίωση του πάχους σε σύγκριση με την 8η ημέρα παρόλο που δεν επανέρχεται πλήρως στη φυσιολογική του κατάσταση (τιμές ημέρας 0) Βέβαια η μεταβολή που παρουσιάζουν οι μάρτυρες είναι η μεγαλύτερη.
- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μεγαλύτερη βλάβη στο πάχος την εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων

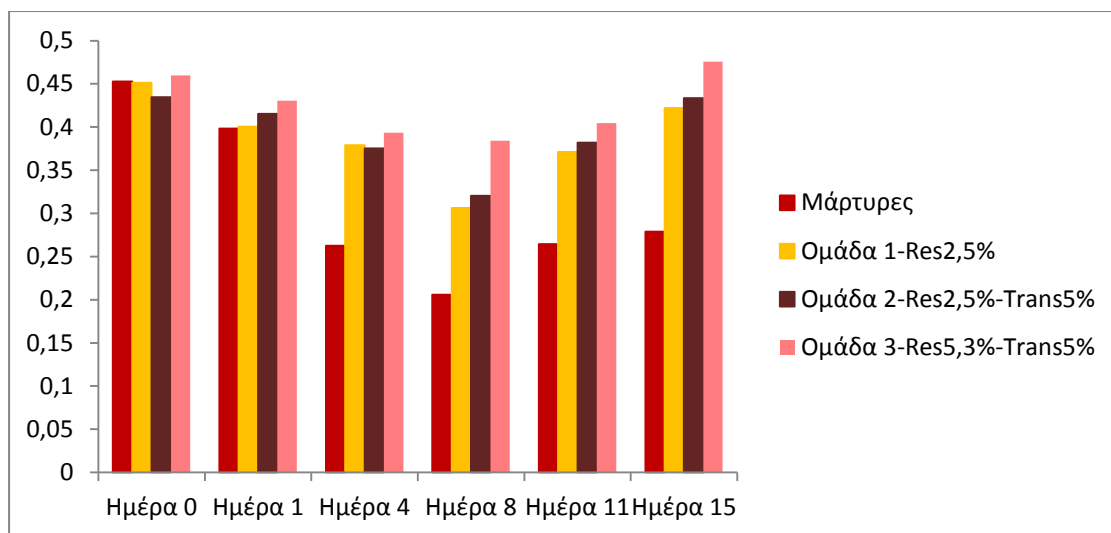
6.1.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση Ελαστικότητας

6.1.5.1 Αποτελέσματα Ελαστικότητας- Στατιστική Ανάλυση

Ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (STDEV) των μετρήσεων της ελαστικότητας στην αρχή (ημέρα 0-φυσιολογικοί μύες, ημέρα 1-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4,8, 11) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15) δίνονται στον παρακάτω πίνακα και το αντίστοιχο Διάγραμμα 13

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,453 (±0,044)	0,398 (±0,122)	0,262 (±0,08)	0,205 (±0,05)	0,264 (±0,04)	0,278 (±0,05)
Ομάδα 1	0,451 (±0,076)	0,4003 (±0,158)	0,378 (±0,11)	0,306 (±0,06)	0,371 (±0,108)	0,422 (±0,07)
Ομάδα 2	0,435 (±0,085)	0,415 (±0,13)	0,375 (±0,077)	0,3205 (±0,043)	0,382 (±0,155)	0,433 (±0,096)
Ομάδα 3	0,459 (±0,081)	0,431 (±0,061)	0,393 (±0,066)	0,384 (±0,088)	0,404 (±0,096)	0,475 (±0,082)

Πίνακας 100. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών του ελαστικότητας



Διάγραμμα 13. Μεταβολή της ελαστικότητας του δέρματος σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Ποσοστιαία μεταβολή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική μεταβολή που υπέστη η ελαστικότητα των μυών των διαφορετικών ομάδων από την ημέρα 0 (baseline) μέχρι την τελευταία ημέρα της φλεγμονής (τη 15^η ημέρα) προσδιορίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή της ελαστικότητας. Η ποσοσοστιαία μεταβολή υπολογιστήκε με βάση την εξίσωση 5:

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ομάδα	Ποσοστιαία μεταβολή
Μάρτυρες	38,44%
Ομάδα 1	6,50%
Ομάδα 2	0,276%
Ομάδα 3	-3,43%

Πίνακας 101. Ποσοστιαία μεταβολή της ελαστικότητας σε βάθος χρόνου 14 ημερών

Έλεγχος κανονικότητας

Διερευνήθηκε κατά πόσο οι τιμές της ελαστικότητας που ελήφθησαν καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος, ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τη διερεύνηση χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια Kolmogorov-Smirnov (K-S) και Shapiro-wilk (S-W). Τα αποτελέσματα αυτής της διερεύνησης παρουσιάζονται στους πίνακες 101 και 102, αντίστοιχα.

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,200	0,073	0,200	0,200	0,200	0,200
Ομάδα 1	0,200	0,065	0,145	0,181	0,128	0,200
Ομάδα 2	0,168	0,200	0,200	0,200	0,200	0,171
Ομάδα 3	0,200	0,200	0,189	0,058	0,200	0,200

Πίνακας 102. Τιμές κριτηρίου K-S για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ελαστικότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Ομάδες	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 11	Ημέρα 15
Μάρτυρες	0,744	0,055	0,711	0,282	0,774	0,294
Ομάδα 1	0,211	0,015	0,170	0,417	0,628	0,135
Ομάδα 2	0,213	0,245	0,228	0,693	0,566	0,167
Ομάδα 3	0,586	0,350	0,493	0,151	0,603	0,586

Πίνακας 103. Τιμές κριτηρίου S-W για τον έλεγχο κανονικότητας των τιμών της μεταβλητής της ελαστικότητας σε επίπεδο σημαντικότητας 95%

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή της σημαντικότητας του τόσο του ελέγχου K-S όσο και το S-W είναι μεγαλύτερη του 0,05, συνεπώς δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση της κανονικότητας των δεδομένων και μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τιμές της ελαστικότητας ακολουθούν κανονική κατανομή. Έτσι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Paired t-test και η ANOVA

ONE WAY ANOVA

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 0.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,971
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,628
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,847
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,653
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,82
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,499

Πίνακας 104. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 0.

Στον παρακάτω πίνακα 98 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 1.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,974
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,801
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,637
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,827
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,661
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,826

Πίνακας 105. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 1.

Στον παρακάτω πίνακα 99 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 4

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,012
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,014
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,005
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,937
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,741
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,682

Πίνακας 106. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 4.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 8.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,004
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,001
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,000
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,66
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,021
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,054

Πίνακας 107. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 8.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 11.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,059
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,039
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,015
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,843
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,543
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,68

Πίνακας 108. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 11.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς για τον παράγοντα της ελαστικότητας την ημέρα 15.

ΟΜΑΔΕΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες- Ομάδα 1	0,033
Μάρτυρες- Ομάδα 2	0,021
Μάρτυρες- Ομάδα 3	0,001
Ομάδα 1-Ομάδα 2	0,778
Ομάδα 1-Ομάδα 3	0,189
Ομάδα 2-Ομάδα 3	0,298

Πίνακας 109. One way-ANOVA για σύγκριση των τιμών της ελαστικότητας την ημέρα 15.

Paired t-test

Αυτή η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης , όπως επεξηγήθηκε και νωρίτερα χρησιμοποιείται με σκοπό να συγκριθεί η επίδραση του κάθε σκευάσματος ξεχωριστά σε κάθε παράμετρο (πχ ελαστικότητα στη συγκεκριμένη περίπτωση) καθώς προχωράνε οι ημέρες (από την πρώτη έως την τελευταία ημέρα της φλεγμονής).Τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών παραμετρικών ελέγχων t-test (paired t-test) απεικονίζονται στον Πίνακα 110:

ΟΜΑΔΑ	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΗΜΕΡΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΟ	ΜΕΓΙΣΤΟ	ΤΙΜΗ P
Μάρτυρες	0-8	0,1902059	0,3037441	0,000
	8-15	-0,124171	-0,021679	0,012
	0-15	0,1132529	0,2348471	0,000
Ομάδα 1	0-8	0,0467763	0,2433237	0,01
	8-15	-0,2121983	-0,0192017	0,025
	0-15	-0,0773021	0,1360021	0,536
Ομάδα 2	0-8	0,0505972	0,1776528	0,004
	8-15	-0,2016738	-0,0241762	0,02
	0-15	-0,1391836	0,1415836	0,984
Ομάδα 3	0-8	-0,0382865	0,1894615	0,16
	8-15	-0,177597	-0,005163	0,041
	0-15	-0,1276784	0,0960934	0,748

Πίνακας 110. Paired t-test για τη σύγκριση της ελαστικότητας μεταξύ των ημερών 0, 8 και 15 σε κάθε ομάδα.

6.1.5.2 *Συζήτηση αποτελεσμάτων ελαστικότητας*

Παρατηρώντας προσεκτικά τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκεκριμένα τον Πίνακα 100 όπου παρατίθενται ο μέσος όρος των τιμών της ελαστικότητας και η τυπική απόκλιση καθώς και το αντίστοιχο διάγραμμα βλέπουμε ότι η ελαστικότητα του δέρματος μειώνεται σταδιακά μέχρι την 8η ημέρα όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής. Την ημέρα αυτή συναντάμε τη μικρότερη ελαστικότητα στο δέρμα των μυών όλων των ομάδων. Μετά την 8η ημέρα η ελαστικότητα αρχίζει να αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 15η ημέρα, κάτι που είναι λογικό αφού όσο περνάνε οι ημέρες προχωράμε προς την ύφεση της φλεγμονής. Ωστόσο οι μεταβολές της ελαστικότητας του δέρματος των μυών από μέρα σε μέρα δεν είναι οι ίδιες μεταξύ των ομάδων γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση κάποιων από τα σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παρατηρούμε ότι για όλες τις ημέρες με εξαίρεση την ημέρα 0, η τιμή της είναι μικρότερη για την ομάδα των μαρτύρων και μεγαλύτερη για την ομάδα 3. (διάγραμμα 12). Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές, προχωρήσαμε σε ανάλυση με στατιστικές μεθόδους.

Ανάλυση ANOVA

Όπως εξηγήθηκε παραπάνω η ανάλυση αυτή έγινε με σκοπό την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην ελαστικότητα του δέρματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων από μέρα σε μέρα.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 όπως βλέπουμε στον πίνακα 104 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό, καθώς την ημέρα 0 δεν έχει πραγματοποιηθεί η πρόκληση της φλεγμονής κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος είναι οι φυσιολογικές (baseline) που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες. Το συμπέρασμα λοιπόν που μπορούμε να εξάγουμε είναι ότι κατά την έναρξη του πειράματος όλοι οι μύες έχουν την ίδια ελαστικότητα και δεν υπάρχουν ανομοιομορφίες μεταξύ των ομάδων. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα στη συνέχεια του πειράματος καθώς εάν εξαρχής υπήρχαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των μυών δεν θα μπορούσαμε να εκτιμήσουμε σωστά την επίδραση των διαφορετικών σκευασμάτων στην ελαστικότητα.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1 δηλαδή την πρώτη ημέρα της φλεγμονής , η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελαστικότητα και η ομάδα των μαρτύρων τη μικρότερη. Ωστόσο όπως βλέπουμε στον πίνακα 105 δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων καθώς η τιμή P είναι σε όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μεγαλύτερη του 0,05. Αυτό είναι απόλυτα λογικό , καθώς την 1η ημέρα της φλεγμονής δεν έχουν αρχίσει ακόμα να επιδρούν οι φλεγμονώδεις παράγοντες κι έτσι οι μετρήσεις του δέρματος τείνουν να είναι οι φυσιολογικές δηλαδή κοντά σε αυτές που αντιστοιχούν σε υγιείς μύες.

Ημέρα 4

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 106 βλέπουμε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Συγκεκριμένα την 4η ημέρα φαίνεται πως η ελαστικότητα του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την ελαστικότητα των υπόλοιπων ομάδων μυών. Με άλλα λόγια θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με κάποιο σκεύασμα ρεσβερατρόλης. Ωστόσο δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης.

Ημέρα 8

Σε αναλογία με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν την ημέρα 4 , παρατηρώντας τον Πίνακα 107 βλέπουμε ότι υπάρχουν και την ημέρα 8 στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα μεταξύ των μαρτύρων σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα .Συγκεκριμένα την 8η ημέρα φαίνεται πως η ομάδα των μαρτύρων διατηρεί τη χαμηλότερη τιμή της ελαστικότητας σε σχέση με κάθε μια από τις υπόλοιπες ομάδες. Και πάλι δηλαδή θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μάρτυρες παρουσιάζουν εντονότερη φλεγμονή σε σχέση με τους μύες που ακολουθούν αγωγή με ρεσβερατρόλη. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι τα σκευάσματα που περιέχουν ρεσβερατρόλη λειτούργησαν προστατευτικά και κατασταλτικά στην φλεγμονή που προκαλείται από τη UV ακτινοβολία . Επιπλέον την 8η ημέρα, φαίνεται πως υπάρχει η ομάδα 3 παρουσιάζει στατιστικά

μεγαλύτερη ελαστικότητα σε σχέση με την ομάδα 1. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το σκεύασμα ρεσβερατρόλης που δόθηκε στην ομάδα 3 λειτούργησε περισσότερο προστατευτικά σε σχέση με το σκεύασμα που δόθηκε στην ομάδα 1. Ωστόσο παρόλο που η ελαστικότητα της ομάδας 3 είναι μεγαλύτερη και από αυτή της ομάδας 2, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Υπενθυμίζεται ότι το σκεύασμα 3 έχει τη μεγαλύτερη συγκεντρωση ρεσβερατρόλης (5,3%) η οποία επιπλέον βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού και επιπλέον έχει ενισχυτή διαπερατότητας. Τέλος, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων 1 και 2 γεγονός που υποδεικνύει ότι έχουν την ίδια περίπου δράση κατά της φλεγμονής.

Ημέρα 11

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν είναι ακριβώς ανάλογα με τα αποτελέσματα της ημέρας 4. Πιο αναλυτικά, όπως βλέπουμε στον πίνακα, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα μεταξύ μαρτύρων και των υπόλοιπων ομάδων, με τους μάρτυρες να έχουν τη μικρότερη τιμή ελαστικότητας. Και πάλι λοιπόν διαπιστώνουμε πως τα σκεύασμα ρεσβερατρόλης λειτουργούν προστατευτικά και κατασταλτικά στη φλεγμονή. Ωστόσο, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μυών που ακολουθούν θεραπεία με διαφορετικά σκεύασμα.

Ημέρα 15

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 109 βλέπουμε πως όπως και τις ημέρες 4 και 11 υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ελαστικότητα μεταξύ των μαρτύρων που λαμβάνουν μόνο το φορέα σε σχέση με όλες τις ομάδες που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα. Ωστόσο και πάλι δεν μπορούμε να διακρίνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία με διαφορετικά σκεύασμα ρεσβερατρόλης.

Paired- T Test

Όπως αναφέρθηκε, σκοπός της αυτής της στατιστικής ανάλυσης είναι να εκτιμηθεί η επίδραση του κάθε σκεύασματος στην εξέλιξη της φλεγμονής με την πάροδο των ημερών. Ουσιαστικά πραγματοποιεί μία σύγκριση της προόδου της φλεγμονής από μέρα σε μέρα. Στη ανάλυση που κάναμε συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα μεταξύ των ημερών 0,8 και 15. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις που γίνονται μεταξύ όλων των ημερών.

Συγκεκριμένα παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της της ημέρας 8 (την 8^η ημέρα η ελαστικότητα είναι μικρότερη) γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρή φλεγμονή την ημέρα 8. Ταυτόχρονα φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 15 και 0, στοιχείο το οποίο μας δείχνει ότι το δέρμα δεν έχει επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση(τη 15^η ημέρα η ελαστικότητα είναι μικρότερη). Τέλος φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 8 και 15(τη 15^η ημέρα η ελαστικότητα είναι μεγαλύτερη), στοιχείο το οποίο δείχνει ότι τη 15η μέρα η ελαστικότητα είναι ακόμα χαμηλή αλλά είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την 8η ημέρα στοιχείο λογικό αφού έχουμε ύφεση της φλεγμονής καθώς περνάνε οι ημέρες.

Για τις ομάδες 1 και 2, με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 110 βλέπουμε ότι υπάρχει επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών 0-8 (μικρότερη ελαστικότητα την 8^η ημέρα) γεγονός που υποδεικνύει ότι την 8^η ημέρα , στην έξαρση της φλεγμονής έχουμε σημαντική επίδραση σην ελαστικότητα του δέρματος. Επιπλέον, τη 15^η ημέρα η ελαστικότητα για τις ομάδες αυτές είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή της ελαστικότητας την ημέρα 8 γεγονός που δείχνει ότι έχουμε σημαντική βελτίωση στην ελαστικότητα του δέρματος τη 15^η ημέρα. Τέλος δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ημερών 0-15 γεγονός που δείχνει ότι η ελαστικότητα του δέρματος έχει επανέλθει στην αρχική της κατάσταση.

Τέλος, η ομάδα 3 δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 8. Το στοιχείο αυτό μας δείχνει ότι την ημέρα 8, δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής η τιμή της ελαστικότητας δεν έχει επηρεαστεί σημαντικά σε σχέση με την αρχική τιμή(baseline). Ωστόσο φαίνεται να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ της 8^{ης} και της 15^{ης} ημέρας , δηλαδή η ελαστικότητα τη 15^η ημέρα (στο τέλος της φλεγμονής) έχει βελτιωθεί σημαντικά σε σχέση με την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής. Τέλος , δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ημέρας 0 και της ημέρας 15, στοιχείο που δείχνει ότι το δέρμα των μυών έχει επανέλθει πλήρως όσον αφορά την ελαστικότητα.

6.1.5.3 Συνοπτικά Σχόλια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι:

- ✓ Η ελαστικότητα του δέρματος των μυών όλων των ομάδων, μειώνεται σταθερά μέχρι την 8^η ημέρα της φλεγμονής όπου παρατηρείται και η έξαρση της φλεγμονής και στη

- συνέχεια μετά από την 8^η μέρα αρχίζει σταδιακά να αυξάνεται καθώς η φλεγμονή βρίσκεται σε ύφεση όσο προχωράνε οι μέρες. (διάγραμμα 12)
- ✓ Η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή στην ελαστικότητα του δέρματος σε βάθος 14 ημερών (38,44%). Ακολουθεί η ομάδα 1 με 6,50% και η ομάδα 3 με (-3,43%) .Τη μικρότερη μεταβολή στην ελαστικότητα σε βάθος 14 ημερών την παρουσιάζει η ομάδα 2 με 0,27%. Παρατηρούμε όμως από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η μεταβολή της ομάδας 3 έχει αρνητικό πρόσημο γεγονός που υποδεικνύει ότι η ελαστικότητα την 15^η ημέρα έχει αυξηθεί σε αντίθεση με τις άλλες ομάδες όπου η ελαστικότητα του δέρματος την 15^η ημέρα είναι μικρότερη από την πρώτη. Ωστόσο η αύξηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.
 - ✓ Για όλες τις ημέρες που ελήφθησαν μετρήσεις (με εξαίρεση την ημέρα 0-baseline) η ελαστικότητα του δέρματος είναι μικρότερη για την ομάδα των μαρτύρων και μεγαλύτερη για την ομάδα 3.
 - ✓ Την 4η ημέρα οι μάρτυρες παρουσιάζουν τη μικρότερη ελαστικότητα από όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Τη δεύτερη μικρότερη ελαστικότητα παρουσιάζει η ομάδα 2 και τρίτη σε σειρά είναι η ομάδα 1. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελαστικότητα από όλες τις υπόλοιπες ομάδες .Ωστόσο από τις διαφορές αυτές μόνο η ελαστικότητα του δέρματος της ομάδας των μαρτύρων είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από αυτήν όλων των υπόλοιπων ομάδων μυών. Δηλαδή φαίνεται πως και τα τρία σκευάσματα ρεσβερατρόλης λειτούργησαν προστατευτικά έναντι της προκαλούμενης φλεγμονής. Ωστόσο δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων.
 - ✓ Την ημέρα 8 δηλαδή την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής οι μάρτυρες παρουσιάζουν και πάλι τη μικρότερη ελαστικότητα δέρματος σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως όλα τα σκευάσματα ρεσβερατρόλης δρουν προστατευτικά και κατασταλτικά κατά της φλεγμονής σε σύγκριση με το φορέα. Επιπλέον την 8η ημέρα, φαίνεται πως η ομάδα 3 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ελαστικότητα σε σύγκριση με την ομάδα 1. Αυτό υποδεικνύει πως το σκεύασμα ρεσβερατρόλης που δόθηκε στην ομάδα 3 λειτούργησε περισσότερο προστατευτικά σε σχέση με τα σκευάσματα 1. Ωστόσο παρόλο που η ελαστικότητα της ομάδας 3 είναι μεγαλύτερη και από αυτή της ομάδας 2, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

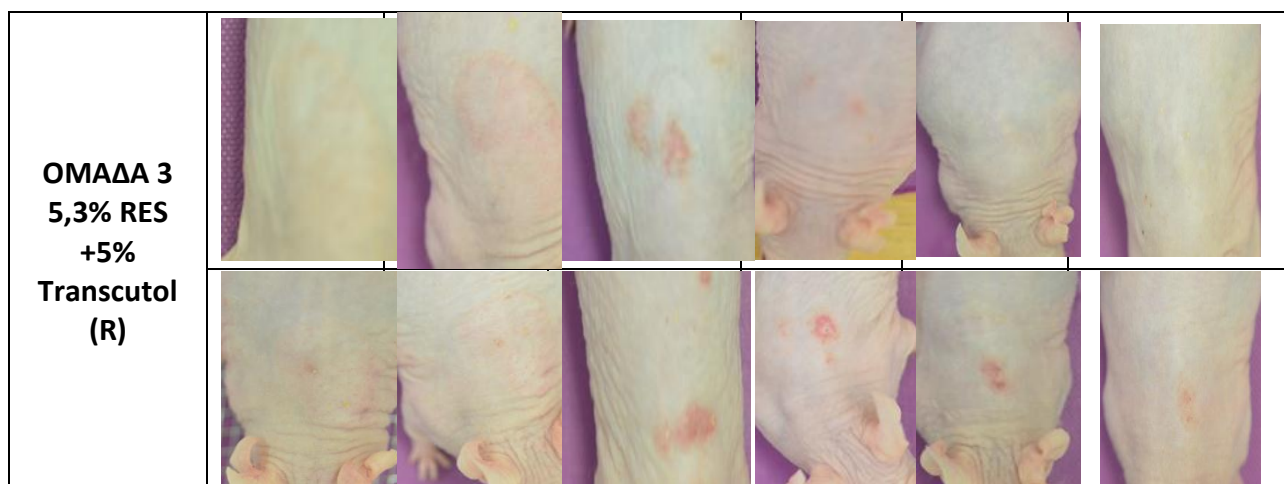
- ✓ Την ημέρα 11 παρατηρούνται ανάλογα αποτελέσματα με την ημέρα 4. Οι μάρτυρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ελαστικότητα από όλες τις άλλες ομάδες. Τη δεύτερη μικρότερη ελαστικότητα παρουσιάζει η ομάδα 1 και την τρίτη η ομάδα 2. Η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελαστικότητα, ωστόσο αυτές οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές .
- ✓ Την ημέρα 15 προκύπτουν ανάλογα αποτελέσματα. Πιο αναλυτικά η ομάδα των μαρτύρων παρουσιάζει το μικρότερη ελαστικότητα και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Ωστόσο δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων. παρόλο που και πάλι η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελαστικότητα.
- ✓ Από το διάγραμμα 12 και τον πίνακα 110 γίνεται σαφές πως οι 3 από τις 4 ομάδες πειραματισμού και συγκεκριμένα οι μάρτυρες, η ομάδα 1 και η ομάδα 2 εμφανίζουν μεγάλη και στατιστικά σημαντική μείωση της ελαστικότητας τους στο διάστημα των ημερών 0-8, σε αντίθεση με την ομάδα 3, της οποίας η μείωση δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό υποδεικνύει ότι το σκεύασμα της ομάδας 3 είναι αποτελεσματικότερο στην καταστολή της φλεγμονής σε σύγκριση με αυτά των ομάδων 1 και 2.
- ✓ Από την ημέρα 8 έως τη 15, όλες οι ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της ελαστικότητας τους γεγονός που υποδεικνύει ότι την 15^η ημέρα έχουμε σημαντική βελτίωση στην ελαστικότητα του δέρματος σε σχέση με την ημέρα έξαρσης της φλεγμονής (8^η). Ωστόσο η ομάδα των μαρτύρων έχει σημαντικά χαμηλότερη ελαστικότητα από όλες τις υπόλοιπες ομάδες και η ομάδα 3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ελαστικότητα από όλες τις ομάδες
- ✓ Τέλος, στο διάστημα ημερών 0-15, η ομάδα μαρτύρων εμφανίζει συνολικά μεγάλη και στατιστικά σημαντική μείωση της ελαστικότητας της (38,44%) , οι ομάδα 1 και 2 παρουσιάζουν μία μη σημαντική μείωση της ελαστικότητας τους (6,5 και 0,27% αντίστοιχα) ενώ η ομάδα 3 φαίνεται να έχει αυξήσει την ελαστικότητα της κατά 3,43%, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Συνολικά η ελαστικότητα του δέρματος όλων των ομάδων με εξαίρεση τους μάρτυρες έχει επανέλθει στις φυσιολογικές τιμές (τιμές ημέρας 0-baseline).
- ✓ Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τη μικρότερη ελαστικότητα την εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων καθ'όλη τη διάρκεια της φλεγμονής και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η ομάδα 3 παρουσιάζει την καλύτερη ελαστικότητα

6.1.6 Φωτοτεκμηρίωση

6.1.6.1 Αποτελέσματα

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 2-ακτινοβολημένοι μύες), στη μέση (ημέρα 4, 8, 10, 12) και στο τέλος του πειράματος (ημέρα 15) παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

ΟΜΑΔΑ	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 10	Ημέρα 12	Ημερα 15
Μάρτυρες Φορέας						
ΟΜΑΔΑ 1 2,5% RES						
ΟΜΑΔΑ 2 2,5% RES +5% Transcutol (R)						



Πίνακας 111. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες μυών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος

6.1.6.2 Συζήτηση

Από τη μελέτη της κατάστασης του δέρματος (ερύθημα, οίδημα, ξηροδερμία) των αντίστοιχων πειραματοζώων (ενδεικτικές φωτογραφίες στον πίνακα 104) μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής :

- ✓ Την ημέρα 2 μετά την ακτινοβολήση, δεν φαίνονται ακόμη έντονα στοιχεία φλεγμονής ούτε ξεκάθαρες διαφορές μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο, παρατηρείται ότι έχει αρχίσει να εμφανίζεται ερυθρότητα στην περιοχή που έχει ακτινοβοληθεί, και η ερυθρότητα αυτή είναι έντονότερη στην ομάδα των μαρτύρων (Control).
- ✓ Την 4η ημέρα παρατηρείται εμφάνιση διάχυτης ερυθρότητας και ξηροδερμίας ενώ παρατηρείται και οίδημα στην ομάδα των μαρτύρων και πολύ ελαφρώς στην ομάδα 1. Καλύτερη κλινική εικόνα παρουσιάζει η ομάδα 3 η οποία εμφανίζει τη μικρότερη ερυθρότητα και δεν ενώ οι μάρτυρες (Control) τη χειρότερη.
- ✓ Την 8η (ημέρα έξαρσης της φλεγμονής) όλες οι ομάδες εμφανίζουν τις μεγαλύτερες βλάβες από όλες τις υπόλοιπες ημέρες . Οι μάρτυρες εμφανίζουν πολύ έντονη ερυθρότητα , μεγαλύτερου εμβαδού πληγές από όλες τις υπόλοιπες ομάδες , οίδημα και επιπλέον οι πληγές φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο βάθος.Επίσης φαίνεται πως έχουν αρχίσει έντονα να «ξεφλουδίζουν». Μετά τους μάρτυρες η ομάδα 1 φαίνεται να παρουσιάζει μικρότερη φλεγμονή από αυτή των μαρτύρων αλλά εντονότερη από τις ομάδες 2 και 3. Οι πληγές φαίνονται μεγαλύτερες και ερυθρότερες. Την καλύτερη εικόνα παρουσιάζει η ομάδα 3.
- ✓ Την 10η ημέρα η φλεγμονή φαίνεται να υποχωρεί σημαντικά σε όλες τις ομάδες με εξαίρεση τους μάρτυρες όπου ακόμα η εικόνα της φλεγμονής είναι πολύ έντονη και

προσομοιάζει με αυτή της ημέρας 8. Στις υπόλοιπες ομάδες βλέπουμε πως έχει μειωθεί τόσο το ερύθημα όσο και το μέγεθος των πληγών. Και πάλι η ομάδα 3 παρουσιάζει την καλύτερη εικόνα αφού οι πληγές έχουν σχεδόν κλείσει ολοκληρωτικά

- ✓ Την 12^η ημέρα τα αποτελέσματα προσωμοιάζουν με αυτά της 10^{ης}. Οι πληγές των μαρτύρων έχουν βελτιωθεί σε σχέση με την ημέρα έναρξης της φλεγμονής αρκετά αλλά και πάλι είναι μεγάλες , με έντονη ερυθρότητα και οίδημα. Στις υπόλοιπες ομάδες η ερυθρότητα και το μέγεθος των πληγών είναι ακόμα μικρότερο από την ημέρα 10 και την καλύτερη εικόνα παρουσιάζει και πάλι η ομάδα 3.
- ✓ Τη 14η ημέρα οι μάρτυρες εξακολουθούν να παρουσιάζουν την εντονότερη φλεγμονή ακόμα κι αν παρουσιάζουν βελτίωση σε σχέση με την 8^η ημέρα. Ακόμα παρουσιάζουν πληγές και ερύθημα στην περιοχή της ακτινοβολήσης. Οι υπόλοιπες ομάδες παρουσιάζουν πολύ καλύτερη εικόνα καθώς οι πληγές τους ή έχουν κλείσει ή είναι πολύ μικρές . Την καλύτερη εικόνα παρουσιάζει η ομάδα 3 όπου το δέρμα των μυών έχει σχεδόν επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση
- ✓ Συνολικά, την καλύτερη κλινική εικόνα επέδειξε η ομάδα 3 ενώ τη μεγαλύτερη επιδείνωση κατά τη διάρκεια του πειράματος εμφάνισε η ομάδα των μαρτύρων.

6.1.7 Ιστοπαθολογική εξέταση

Την τελευταία μέρα του περιράματος επιλέχθηκαν μύες από κάθε ομάδα, με επίπεδο φλεγμονής όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερο της κάθε ομάδας, ώστε τμήμα του δέρματός τους να δοθεί για περαιτέρω ιστοπαθολογική εξέταση. Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες που ελήφθησαν κατά την ιστοπαθολογική εξέταση. Οι φωτογραφίες που παρουσιάζονται είναι αυτές που είναι οι αντιπροσωπευτικότερες της κάθε ομάδας.

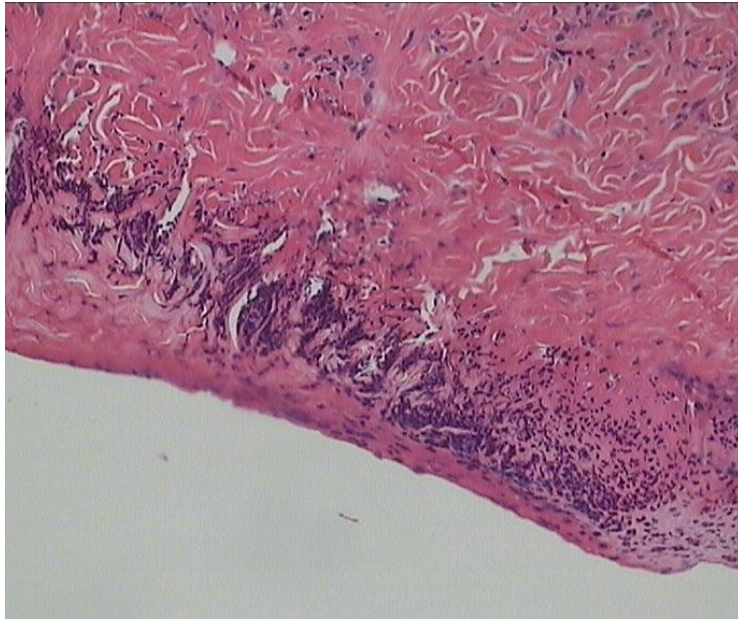
6.1.7.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση

MARTYRES

Μάρτυρας 1



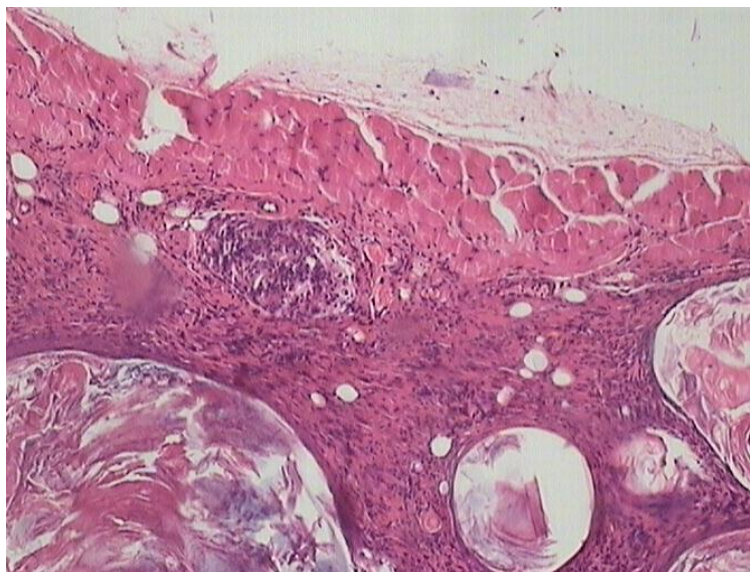
**Εικόνα 34. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 1 την 15^η ημέρα του πειράματος
(εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)**



**Εικόνα 35. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 1 την 15η ημέρα του πειράματος
(εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X200)**

Σχόλια: Στις παραπάνω εικόνες βλέπουμε πολύ μεγάλη εξέλκωση. Πρατηρούμε δηλαδή ιδιαίτερα στην πρώτη εικόνα ότι υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος. Επίσης βλέπουμε έντονα στοιχεία φλεγμονής. Συγκεκριμένα βλέπουμε αύξηση λεμφοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων(τα μωβ) στην περιοχή της βλάβης.

Μάρτυρας 2

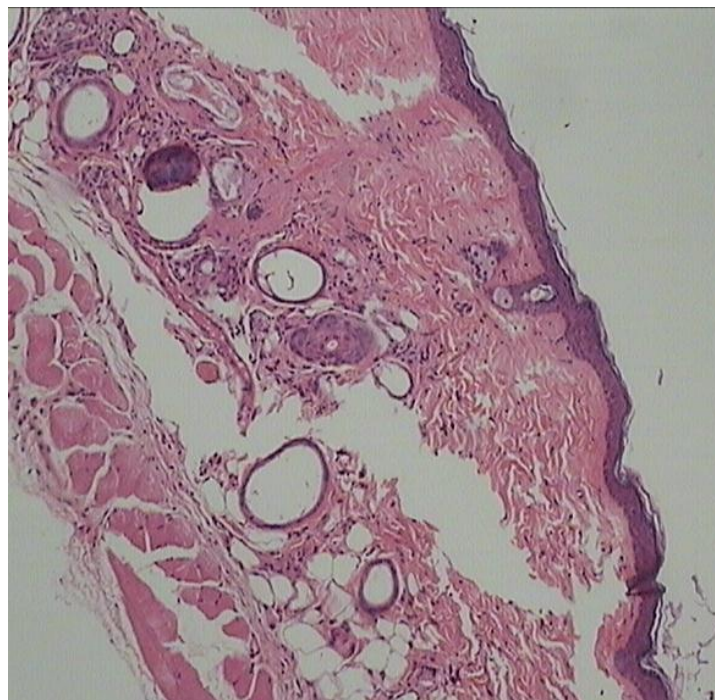


**Εικόνα 36. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος μάρτυρα 2 την 15η ημέρα του πειράματος
(εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)**

Σχόλια: Στην παραπάνω εικόνα του δεύτερου μάρτυρα και πάλι παρατηρούμε ότι υπάρχει πληγή εξέλκωση, καθώς και συγκέντρωση πολυμορφοπύρηνων, στοιχεία που αποδεικνύουν την παρουσία φλεγμονής.

ΟΜΑΔΑ 1

Ομάδα 1- 1^{ος} μυς



Εικόνα 37. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 1 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)

Σχόλια: Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι η επιδερμίδα έχει επανέλθει σχεδόν εξολοκλήρου στη φυσιολογική της κατάσταση. Δεν υπάρχει εξέλκωση. Η φλεγμονή είναι αισθητά μικρότερη σε σύγκριση με αυτή των μαρτύρων, σχεδόν δεν υφίσταται.

Ομάδα 1-2^{ος} Μυς



Εικόνα 38. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μύος από την Ομάδα 1 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)

Σχόλια: Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται να υπάρχουν κάποια στοιχεία φλεγμονής ωστόσο πολύ λιγότερο σε σχέση με την εικόνα που παρουσιάζουν οι μάρτυρες. Δεν παρατηρείται εξέλκωση και η επιδερμίδα φαίνεται να έχει σχεδόν επανέλθει.

ΟΜΑΔΑ 2

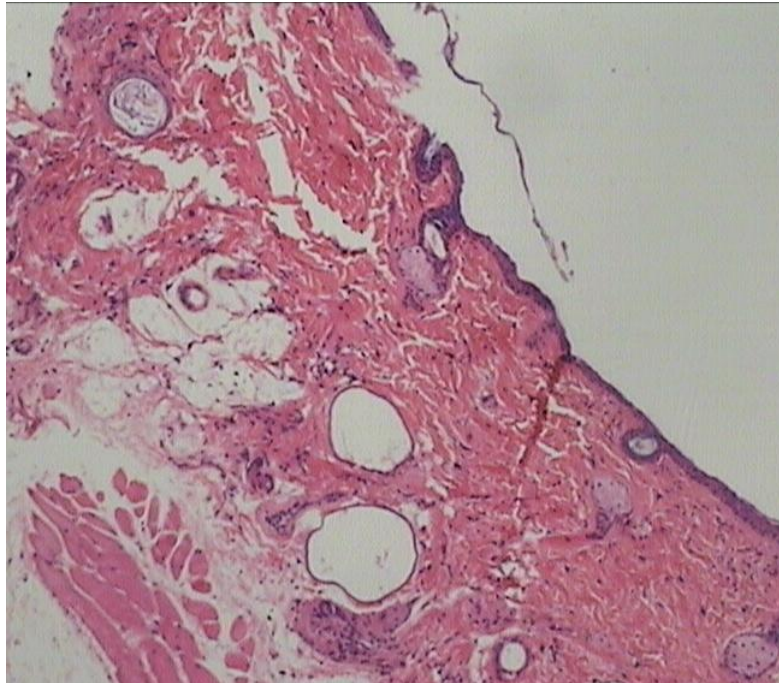
Ομάδα 2-1^{ος} Μυς



Εικόνα 39. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 2 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)

Σχόλια: Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι η επιδερμίδα του μυός έχει επανέλθει σχεδόν ολοκληρωτικά. Δεν παρατηρείται πληγή ή λύση της επιδερμίδας και σχεδόν κανένα σημάδι φλεγμονής.

Ομάδα 2 - 2^{ος} Μυς

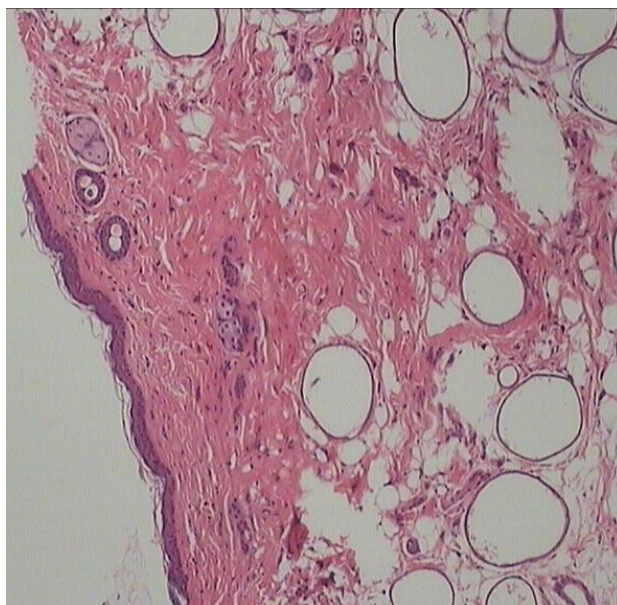


Εικόνα 40. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 2 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)

Σχόλια: Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται σε γενικές γραμμές ότι η επιδερμίδα έχει επανέλθει. Ωστόσο βλέπουμε και σημεία φλεγμονής, όπως αυξημένη συγκέντρωση πολυμορφοπύρηνων αλλά σε βαθμό σημαντικά μικρότερο από τη φλεγμονή των μαρτύρων.

ΟΜΑΔΑ 3

Ομάδα 3-1^{ος} Μυς



Εικόνα 41. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)



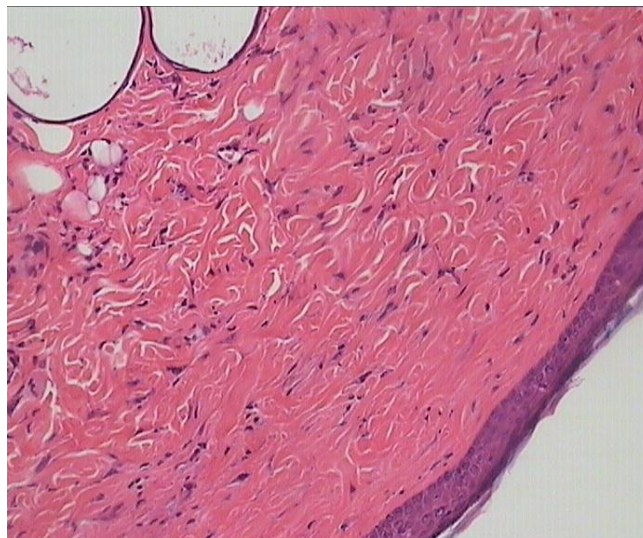
Εικόνα 42. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του πρώτου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X200)

Σχόλια: Από τις παραπάνω εικόνες διαπιστώνουμε πως η επιδερμίδα του μυός έχει επανέλθει πλήρως στη φυσιολογική της κατάσταση. Δεν παρατηρείται κανένα στοιχείο φλεγμονής και ο μυς φαίνεται πως έχει ιαθεί πλήρως.

Ομάδα 3-2^{ος} Μυς



Εικόνα 43. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X100)



Εικόνα 44. Ιστοπαθολογική εξέταση τομής δέρματος του δεύτερου μυός από την Ομάδα 3 την 15η ημέρα του πειράματος (εικόνα από μικροσκόπιο σε μεγέθυνση X200)

Σχόλια: Στις παραπάνω εικόνες βλέπουμε πως ο μυς έχει πλήρως ιαθεί. Η επιδερμίδα είναι σε άριστη κατάσταση και δεν παρατηρείται κανένα απολύτως σημάδι φλεγμονής.

6.1.7.2 Συνοπτικά σχόλια

Σύμφωνα με τα ευρήματα της ιστοπαθολογικής εξέτασης , βλέπουμε πως η ομάδα των μαρτύρων είναι αυτή που παρουσιάζει την εντονότερη εικόνα φλεγμονής με αισθητή διαφορά από τις υπόλοιπες ομάδες. Συγκεκριμένα βλέπουμε πως υπάρχει εξέλκωση και έντονη εικόνα φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη συγκέντρωση πολυμορφοπύρηνων και λεμφοκυττάρων .Η ομάδα 1 και η ομάδα 2 παρουσιάζουν σαφώς καλύτερη εικόνα σε σχέση με τους μάρτυρες. Η επιδερμίδα έχει στις περισσότερες περιπτώσεις επανέλθει και παρατηρούνται περιορισμένα στοιχεία φλεγμονής. Την καλύτερη εικόνα παρουσιάζουν με διαφορά οι μύες της ομάδας 3. Έχουν τελείως ιαθεί και δεν παρουσιάζουν κανένα απολύτως σημάδι φλεγμονής. Παρακάτω παρατίθεται η κατάταξη των ομάδων με σειρά μειούμενης φλεγμονής.

Ομάδα 3> Ομάδα 2~ Ομάδα 1>> Μάρτυρες

7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε *in vitro* σε κύτταρα διάχυσης Franz, η διαδερμική διαπερατότητα της ρεσβερατρολής από γέλες που μορφοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει μια προσπάθεια ενίσχυσης της διαπερατότητας της. Στη συνέχεια, ορμώμενοι από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το *in vitro* πείραμα προχωρήσαμε σε *in vivo* μελέτη σε άτριχους μύες SKH-1 προκειμένου να αξιολογήσουμε την αντιφλεγμονώδη δράση της ρεσβερατρολής και να διερευνήσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της *in vitro* διαπερατότητας και της *in vivo* δράσης. Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ

- Στην πρώτη μελέτη διαδερμική μελέτη κατά το πείραμα διάχυσης σε STRAT-M διαπιστώσαμε ότι η συνθετική μεμβράνη STRAT-M δεν αποτέλεσε κατάλληλο και αντιπροσωπευτικό μοντέλο για την διαπερατότητα της ρεσβερατρολής. Ωστόσο φάνηκε πως η διαπερατότητα ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο σκεύασμα. Συγκεκριμένα, με βάση την αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρολής Q που διαπερνά τη συνθετική μεμβράνη τα σκευάσματα μπορούν να καταταχθούν με σειρά ελαττούμενης διαπερατότητας ως εξής: σκεύασμα 3-res 5% > σκεύασμα 2-res 2,5% > σκεύασμα 1-res 1%. Η σειρά αυτή διατηρείται σε όλα τα χρονικά διαστήματα, ωστόσο οι διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων δεν είναι σε όλα τα χρονικά διαστήματα στατιστικά σημαντικές.
- Κατά το πείραμα διάχυσης σε ανθρώπινη επιδερμίδα και πάλι διαπιστώθηκε πως η διαπερατότητα ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο σκεύασμα μέχρι τις 6 ώρες. Με βάση την αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρολής Q που διαπερνά την επιδερμίδα τα σκευάσματα μπορούν να καταταχθούν με σειρά ελαττούμενης διαπερατότητας ως εξής: σκεύασμα 3-res 5% > σκεύασμα 2-res 2,5% > σκεύασμα 1-res 1%. Οι διαφορές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές μέχρι τις 6 ώρες με το σκεύασμα 2 να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη διαπερατότητα από το 1 και το 3 στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη διαπερατότητα από το 2. Στις 12 και στις 24^h, με βάση την αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρολής Q που διαπερνά την επιδερμίδα διατηρείται η ίδια σειρά στα σκευάσματα όσον αφορά τη διαπερατότητα, αλλά το σκεύασμα 2 δεν διαφέρει από

το 3. Φαίνεται λοιπόν, πως η σύσταση του φορέα είχε μεγαλύτερη επίδραση στη διαπερατότητα σε σχέση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

- Με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων βλέπουμε ότι η ρεσβερατρόλη διαπερνά την ανθρώπινη επιδερμίδα στις *in vitro* συνθήκες του πειράματος.
- Από τα αποτελέσματα της διαδερμικής μελέτης με ενισχυτή διαπερατότητας φαίνεται πως τόσο η παρουσία όσο και η συγκέντρωση του ενισχυτή διαπερατότητας Transcutol (R) επηρέασε σημαντικά τη διαπέραση της ρεσβερατρόλης, τόσο το 5% όσο και το 10% ενίσχυσε σημαντικά τη διαπερατότητα.
- Με βάση την αθροιστική ποσότητα της ρεσβερατρόλης Q που διαπερνά την ανθρώπινη επιδερμίδα το Transcutol (R) σε συγκέντρωση 5% φαίνεται πως είχε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τη συγκέντρωση 10%.
- Το 5% Transcutol παρουσίασε σημαντική επίδραση στη διαπερατότητα ακόμα και όταν η ρεσβερατρόλη δεν χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση κορεσμού.

IN VIVO ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

- Η ρεσβερατρόλη παρουσίασε ικανοποιητική αντιφλεγμονώδη δράση σε όλες τις συνταγές-συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, και συγκεκριμένα TEWL, ενυδάτωση, ερυθρότητα και πάχος δέρματος τα σκεύασμα που περιείχαν ρεσβερατρόλη έδωσαν στατιστικά σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τους μάρτυρες που ακολουθούσαν αγωγή μόνο με το φορέα. Επιπλέον οι ομάδες που ακολούθησαν θεραπεία με κάποιο σκεύασμα παρουσίασαν και αισθητά καλύτερη κλινική εικόνα σε σχέση με τους μάρτυρες καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (φωτοτεκμηρίωση). Τέλος, η καλύτερη ίαση των ομάδων που λάμβαναν ρεσβερατρόλη σε σχέση με τους μάρτυρες επιβεβαιώθηκε και ιστοπαθολογικά. Συγκεκριμένα, τα ιστοπαθολογικά ευρήματα για τους μάρτυρες έδειξαν εξέλκωση και έντονη διήθηση από

πολυμορφοπύρηννα στην περιοχή της φλεγμονής ,σε αντίθεση με τις ομάδες που ακολούθησαν θεραπεία , όπου τα ιστοπαθολογικά ευρήματα έδειξαν καταστολή της φλεγμονής και σε ορισμένες περιπτώσεις πλήρη ίαση.

- Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης, φαίνεται πως το σκεύασμα 3 που περιείχε ρεσβερατρόλη σε συγκέντρωση 5,3% και ενισχυτή διαπερατότητας είναι αυτό που έδωσε την ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση καθώς εμφάνισε την καλύτερη ενυδάτωση,μειωμένη TEWL, μικρότερη ερυθρότητα, μεγαλύτερη ελαστικότητα και μικρότερο πάχος σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Βέβαια, οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλες τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των ημερών, ωστόσο ήταν στατιστικά σημαντικές σε ένα ποσοστό τέτοιο που μας επιτρέπει να κατατάξουμε το σκεύασμα 3 ως το ισχυρότερο όσον αφορά τη δράση. Επιπλέον από την κλινική εικόνα(φωτοτεκμηρίωση) επιβεβαιώνεται πως το σκεύασμα 3 παρουσίασε καλύτερη δράση καθώς η εικόνα της φλεγμονής είναι καθαρά ηπιότερη. Τέλος, σύμφωνα με την ιστοπαθολογική εξέταση, η ομάδα που έλαβε θεραπεία με το σκεύασμα δεν παρουσίασε κανένα σημείο φλεγμονής και η επιδερμίδα είχε πλήρως επανέλθει.
- Κατά τη σύγκριση μεταξύ των σκευσμάτων 1(RES2,5%) και 2 (RES 2,5%-Trans5%), φαίνεται πως το σκεύασμα 1 παρουσιάζει ελαφρώς καλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση σε σχέση με το 2 καθώς παρουσιάζει ελαφρώς καλύτερη ενυδάτωση, μικρότερη άδηλη απώλεια νερού μικρότερο πάχος αλλά μεγαλύτερη ερυθρότητα και μικρότερη ελαστικότητα. Ωστόσο δεν καμία από αυτές τις διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Από την κλινική εξέταση (φωτοτεκμηρίωση) φαίνεται πως η ομάδα 2 παρουσιάζει ελαφρώς μικρότερη ερυθρότητα και μικρότερου μεγέθους πληγές αλλά. Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική εξέταση οι δύο ομάδες παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο φλεγμονής με την ομάδα 1 να παρουσιάζει στοιχειωδώς μικρότερη φλεγμονή. Σε κάθε περίπτωση πάντως οι δυο ομάδες παρουσίασαν αισθητά καλύτερη εικόνα από τους μάρτυρες και χειρότερη εικόνα από την ομάδα 3.
- Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του in Vitro πειράματος με αυτά του in vivo , πράγματι παρατηρούμε ότι φαίνεται να υπάρχει να υπάρχει συσχέτιση της διαπερατότητας με το φαρμακολογικό αποτέλεσμα σε κάποια σημεία. Συγκεκριμένα βλέπουμε πως το σκεύασμα που έδωσε τη μεγαλύτερη διαπερατότητα (RES 5,3%-Trans5%) είναι αυτό που έδωσε και τη μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση. Τα

σκεύασμα 1(RES2,5%) και 2 (RES 2,5%-Trans5%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη διαδερμική διαπερατότητα από το σκεύασμα 3 και αντιστοιχη συμπεριφορά βλέπουμε στο in vivo πείραμα, με στατιστικά σημαντικά μικρότερη επίδραση κατά της φλεγμονής . Ωστόσο παρόλο που μεταξύ των δύο σκευασμάτων παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με τη διαπερατότητα, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση τους.

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Burns DA, Breathnach SM, Cox N, Griffiths CE. *Rook's Text-book of Dermatology*. New York : s.n. 8.
2. Αντωνίου Χ., Κατσάμπας Α.,. “Δερματολογία-Αφροδισιολογία”. [επιμ.] Broken Hill Publishers Ltd. Αθήνα : s.n., 2015. σσ. 25-30.
3. Γεώργιος Θ. Παπαϊωάννου, *Κοσμητολογία* (Συστατικά- Παρασκευή- Χρήση καλλυντικών), Αθήνα 2010
4. N. Y. Schuerer, G. Plewig, P. M. Elias,. Stratum corneum Lipid Function. *Journ. Of Invest. Derm.* 183, 1991, 77-94.
5. Takanori Igarashi, Ko Nishino, Shree K. Nayar. The Appearance of Human Skin. Technical Report: CUCS-024-05. *Department of Computer Science, Columbia University*,. 2015.
6. Wertz, P.W. et al. Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* . 92, 1989, Τόμ. 109-111.
7. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin". 84 (3): 539–49. *Photochemistry and Photobiology*. 3, 2008, Τόμ. 84, 539-549.
8. Meredith P, Riesz J. Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochemistry and Photobiology*. 2, 2004, Τόμ. 79, 211-216.
9. Di Lullo, Gloria A., και συν., και συν. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen". *J. Biol. Chem.* 6, 2002, Τόμ. 277.
10. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *Journal of Cell Science*. 14, 2002, Τόμ. 115, 2817-28.
11. Dirk Roosterman, Tobias Goerge, Stefan Schneider, Nigel Bunnett, Martin Steinhof,. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ . 1997, Τόμ. 86, 1309-1379.
12. C., Prost Squarcioni. Histology of skin and hair follicle. *Med Sci (Paris)*. 2006, Τόμ. 22, 131-137.
13. James, William D., Berger, Timothy και Elston, Dirk M. Andrews' diseases of the skin. *Clinical dermatology*. 2006, σ. 7.
14. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 12, 2008, Τόμ. 17, σσ. 1063-1072.

15. **KC, Madison.** Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2, 2003, Τόμ. 121, σσ. 231-234.
16. **D'Orazio, John et al.** UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences.* 6, 2013, Τόμ. 14, σσ. 12222-12248.
17. **André Luís Morais et al,** *Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations.* al,. 2016, Braz. J. Pharm. Sci. [online], σσ. 527-544.
18. **E., Frangou.** Τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκου. *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ.* 1, 2007, Τόμ. 4, σσ. 41-53.
19. **Mohammed Elmowafy, Abdelraouf Elrehaily, Adel Elharby, Tarek Ali, Ahmed Elelian, Adel Elsemahy and Naif Elgabry.** Transdermal Drug Delivery Systems; Review Article . *Pharmaceutics.*
20. **Jonathan Hadgraft Majella E. Lane.** *Percutaneous Penetration paradigms: The contribution of jonathan Hadgraft, Skin pharmacol physiol, 2013*
21. **Chambers Fox, Shelley.** Drug delivery to the skin. *Pharmaceutics.* 1. 2014.
22. **Roy, S.D.** Preformulation aspects of transdermal drug delivery systems. [συγγρ. βιβλίου] Pfister, W.R., Yum, S.I. Eds Ghosh T.K. *Transdermal and topical drug delivery systems;* Illinois : s.n., 1997.
23. **G., Cevc.** Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996, Τόμ. 13, σσ. 257-388.
24. **F., Zachariou.** *Χημικά Κανονικά.* 2009. Τόμ. 18.
25. **K., Toto.** The prediction of transdermal permeation: mathematical models, ins, edited by., . [συγγρ. βιβλίου] Pfister W.R, Yum S. I Ghosh T.K. *Transdermal and Topical Drug Delivery System.* Illinois : s.n., 1997.
26. **R.J.Martin, S.P.Denyer and J.Hadgraft,.** Skin metabolism of topically applied compounds. *Int.J.PHarm,.* 1987, Τόμ. 39, σσ. 23-32.
27. **J.Hadraft, J.** Theoretical aspects of metabolism in the epidermis. *Int.J.PHarm ,.* 1980, Τόμ. 4, σσ. 229-239.
28. **Mazzulli FN,** *Barriers to skin penetration, J. invest Dermatol, 39:387-393, 1965.*
29. **Inderjeet Singh, Andrew Phillip Morris.** Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. *International Journal of pharmaceutical investigation.* Jan-Mar 2011, doi: 10.4103/2230-973X.76721.
30. **Weichers.** *Optimising Skin Delivery of active ingredients from emulsions in Delivery System Handbook for personal care and cosmetic products, 425-428.* s.l. : Meyer R. Rosen.

31. **A. Otto, J. du Plessis, J.W. Wiechers.** *Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery.* 1-19, s.l. : International Journal of Cosmetic Science, 2009, Τόμ. 31.
32. **Harneet Marwah, Tarun Garg, Amit K. Goyal & Goutam Rath.** Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Delivery.* 2014.
33. **Ahlam Zaid Alkilani, Maelíosa T.C. McCrudden and Ryan F. Donnelly.** Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics.* 2015, Τόμ. 7.
34. **Daniels, Rolf.** Strategies for Skin Penetration Enhancement.
35. **Lane, Majella E.** Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013, Τόμ. 447, 12-21.
36. **Bharkatiya M, Nema RK.** Skin Penetration Enhancement Techniques. *Department of Pharmaceutics, B.N. College of Pharmacy, Udaipur, India.*
37. **Barry B. W.** Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release.* 199, Τόμ. 15, σσ. 237-248.
38. **Goodman M., Barry B. W.,.** Lipid-Protein-Partitining (LPP) theory of skin enhancer activity: finite dose technique,, 57:29-40, 1989. *Intern. Journ. of Pharm.* 1989, Τόμ. 57, σσ. 29-40.
39. **Tachibana, K.** Transdermal delivery of insulin to alloxan-diabetic rabbits by ultrasound exposure. *Pharm. Res.* 1992, Τόμ. 9, σσ. 295-954.
40. **Mitragotri, S. και Kost, J.** Transdermal delivery of heparin and low-molecular weight heparin using low-frequency ultrasound. 2001, 18 (8), 1151-1156. *Pharm. Res.* 8, 2001, Τόμ. 18, σσ. 1151-1156.
41. **Robert L. Bronaugh, Howard I. Maibach,.** *Topical Absorption of Dermatological Products.* New York : s.n., 2001.
42. **I., Ronald C. Wester & Howard.** ,In vivo methods for percutaneous absorption measurements, . 2002, σσ. 411-422.
43. **André Luís Morais Ruela, Aline Gravinez Perissinato, Mônica Esselin de Sousa Lino, Paula Silva Mudrik3 , Gislaine Ribeiro Pereira,.** Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutic Sciences.* Τόμ. 53, σ. 3.
44. **L., Bronaugh R.** Preparation of biological membranes, in Methods for skin absorption. 1990.
45. **MD, Εμμανουήλ Γ. Δασκαλάκης.** *Καρκίνος δέρματος-προκαρκινοματώδεις καταστάσεις του δέρματος.*

46. **Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H.** "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis". 2, 2002, Τόμ. 511, σσ. 145-178.
47. **Halliday GM, Byrne SN, Damian DL.** "Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis". . *Semin Cutan Med Surg.* 4, 2011, Τόμ. 30, σσ. 214-221.
48. **Matsumura Y, Ananthaswamy N.** Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 3, 2004, Τόμ. 195, σσ. 298-308.
49. **BL., Diffey.** Ultraviolet radiation physics and the skin. *Phys. Med. Biol.* 3, 1980, Τόμ. 25.
50. **Hruza L., Pentland A., (1993).** , "Mechanisms of UV-induced inflammation", *The Journal of Investigative Dermatology*, 93, 35-41.
51. **Pillai S., Oresajo C., Hayward J., (2005).** , "Ultraviolet radiation and skin aging: role of reactive oxygen species, inflammation and protease activation and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review", *International Jou.*
52. **Close L., Ashton T., Mc Ardle A., Mac Laren D., (2005),.** "The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 142, 257-266.
53. **Halliwell B., (1991),.** "Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease", *The American Journal of Medicine*, 91, 14-22.
54. **Sudheer K. Mantena a, Santosh K. Katiyar.** Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-κB signaling in human epidermal keratinocytes. *Department of Dermatology, University of Alabama.* 2005.
55. **S. Pillai, C. Oresajo and J. Hayward.** 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. 2015.
56. **Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I et al.** The balance between Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. . *Biochemistry.* 9, 1991, Τόμ. 30, σσ. 305-313.
57. **Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A., Rotilio, G.** An attempt to evaluate the rate of the Haber–Weiss reaction by using OH radical scavengers. . *FEBS Lett.* 1977, Τόμ. 80, σσ. 130-132.
58. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,.** Free Radical . *Biology and Medicine.* 1989.
59. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resveratrol>.
60. **Švajger U, Jeras.** Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use. *Int. Rev. Immunol.* 2012.

61. **Wenzhe Dong, Yan Zhou, Zhifang Yang.** Research Progress of Mechanism of Action. *Pharmacology & Pharmacy*,. 2016, σσ. 170-175.
62. **hi-Feng HUNG, Yin-Ku LIN , Zih-Rou HUANG, and Jia-You FANG,** *Delivery of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, from Solutions and Hydrogels via the Skin.* C. 952-965, s.l. : Biol. Pharm. Bull., 2008, Τόμ. 31.
63. **Banga, M. J. Abla ,***Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity.* 1-8, s.l. : International Journal of Cosmetic Science, 2012.
64. **Kemppainen, B.W., Reifenrath, W.G,** *Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In Methods for skin absorption.* 35-59, Florida : s.n., 1990.
65. **Merckmillipore.** STRAT-M. 2018.
http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-Transdermal-Diffusion-Test-Model-25mm,MM_NF-SKBM02560#anchor_BRO.
66. **T Klingman, Christophers.** *Preparation of isolated sheets of human stratum corneum.* 702, s.l. : Arch. Dermatol. , 1963, Τόμ. 88.
67. **Prasanthi D, Lakshmi PK.** *Effect of chemical enhancers in transdermal permeation of alfuzosin hydrochloride.* s.l. : ISRN Pharmaceuticals, 2012.
68. **Ρέππας,** Σημειώσεις Μαθήματος Βιοστατιστικής. 2017.
69. **Sebastian Björklund, Quoc Dat Pham, Louise Bastholm Jensen, Nina stergaard Knudsen,** The effects of polar excipients Transcutol (R) and dexpanthenol on molecular mobility, permeability, and electrical impedance of the skin barrier. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2016, 49.
71. **P. Muraa, M.T. Fuccia, G. Bramantia, P. Corti,** *Evaluation of Transcutol (R) as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations.* s.l. : European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000, Τόμ. 9, issue 4.
72. **Mohammed Elmowafy, Abdelraouf Elrehaily, Adel Elharby, Tarek Ali, Ahmed Elelian, Adel Elsemaih and Naif Elgabry.** Transdermal Drug Delivery Systems; Review Article . *Pharmaceutics.*
