



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ- ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

**Πρόκληση Ακανθοκυτταρικού
Καρκινώματος με την Επίδραση
Υπεριώδους Φως σε Μύες με
Διαβήτη τύπου I και II**



ΕΛΕΝΑ ΣΤΙΓΚΑ

Αθήνα 2019

Αφιερώνεται στον αγαπημένο μου φίλο & αδελφό,

Σταμάτη Κιζλάρη

Τριμελής Επιτροπή

Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Νικόλαος Τεντολούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Υπεύθυνος Διαβητολογικής Μονάδας και του Ερευνητικού Διαβητολογικού Εργαστηρίου, Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό»

Παντερή Ειρήνη, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού «Κοσμητολογίας-Δερματοφαρμακολογίας» του τμήματος Φαρμακευτικής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η πραγματοποίησή της έγινε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019 από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών: Στίγκα Ελένη με θέμα: «Πρόκληση ακανθοκυτταρικού καρκινώματος με την επίδραση υπεριώδους φως σε μύες με διαβήτη τύπου I και II».

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που ήταν και είναι δίπλα μου και με στήριξαν και συνεχίζουν, ιδίως τους φίλους και τα αγαπημένα πρόσωπα της ζωής μου και που συνέβαλαν στην περάτωσή της.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω βαθύτατα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Ράλλη Μιχαήλ για την συνεργασία που είχαμε, τις συμβουλές και γνώσεις που μου προσέφερε και κυρίως τη στήριξη και την υπομονή που μου έδειξε.

Την κυρία Παντερή Ειρήνη και τον κύριο Τεντολούρη Νικόλαο που αποτελούν τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Επιπλέον, ευχαριστώ την κυρία Δανιά Φωτεινή για την πολύτιμη παρέμβασή της στο πρωταρχικό στάδιο του πειράματος, τον κύριο Σφηνιαδάκη Ιωάννη, ΠΝ-Παθολογοανατόμος, για την αξιοσημείωτη δουλειά του και τον Ταλιαδούρο Αντώνιο για την μοναδική βοήθεια που προσέφερε στην στατιστική επεξεργασία των δεδομένων ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία με αγάπη. Την κυρία Ιφιγένεια που φρόντιζε το εργαστήριο του πειραματισμού και ήταν δίπλα μας κάθε ημέρα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τα παιδιά του εργαστηρίου για τη βοήθεια και την ευδιάθετη ατμόσφαιρα που κρατούσαμε πάντα, ακόμη και τις πιο ‘δύσκολες’ μας ημέρες εκεί, ιδίως τη Τούντα Στυλιανή, τη Δρακοπούλου Βασιλική και την Κωστάκη Μαρία, που συνεργαστήκαμε με αισιοδοξία, αγάπη και χιούμορ. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη Μπάρδα Χριστίνα για τις ώρες και την πολύτιμη βοήθεια που μας αφιέρωσε, καθώς και τη θετική ενέργεια συνοδευόμενη από χαμόγελο και λύσεις.

Τέλος, θα δώσω το πιο δυνατό Ευχαριστώ στην Οικογένεια μου, Δημήτρη-Εμμανουέλα-Ιφιγένεια, που χωρίς εκείνη δεν θα έγραφα αυτές τις ευχαριστίες σήμερα.

Περίληψη

Η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην καρκινογένεση του δέρματος φυσιολογικού μυός έχει εκτενώς μελετηθεί. Αντίθετα σχετικά στοιχεία ελλείπουν ως προς το δέρμα διαβητικών μυών.

Σκοπός του πειράματος ήταν η πρόκληση ακανθοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος σε διαβητικούς μύες, με διαβήτη τύπου I και II.

Η πρόκληση του διαβήτη τύπου I έγινε με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης. Για πρώτη φορά, δοκιμάστηκε σε τέσσερα διαφορετικά είδη άτριχων αρσενικών μυών (SKH-hr-1 άσπρα, SKH-hr-2, SKH-hr-2 καφέ και SKH-hr-2+APOE) η λήψη πειραματικού διαβήτη τύπου II με δύο είδη πρωτοκόλλων. Το πρώτο πρωτόκολλο περιελάμβανε χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης ενδοπεριτοναϊκώς σε συνδυασμό με ειδική διατροφή υψηλή σε λιπαρά και σάκχαρα για τη δημιουργία αντίστασης στην ινσουλίνη μέσω του μεταβολικού συνδρόμου, ενώ το δεύτερο χορήγηση νικοτιναμιδίου και στρεπτοζοτοκίνης ενδοπεριτοναϊκώς για μερική απώλεια των β παγκρεατικών κυττάρων. Η αξιολόγηση των πρωτοκόλλων έγινε με μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα των μυών.

Με βάσει τα αποτελέσματα από την πρόκληση διαβήτη τύπου II επελέγη ως κατάλληλο μοντέλο για την καρκινογένεση σε φυσιολογικούς και διαβητικούς μύες, ο τύπος SKH-hr-2 με το πρωτόκολλο του νικοτιναμιδίου και στρεπτοζοτοκίνης. Η φωτοκαρκινογένεση επιτεύχθηκε με υψηλή δόση υπεριώδους ακτινοβολίας (3,5 M.E.D.) επί 6 μήνες 3 φορές την εβδομάδα. Μετρήθηκαν η γλυκόζη αίματος, η ενυδάτωση, η άδηλη απώλεια νερού, η ελαστικότητα, το πάχος του δέρματος, το βάρος του σώματος, το σμήγμα, το ερύθημα και η μελανίνη. Αξιολογήθηκε η κλινική εικόνα, ελήφθησαν φωτογραφίες με επαγγελματική κάμερα, δερματοσκόπιο και με χρήση ειδικής δερματολογικής κάμερας (Antera3D) και πραγματοποιήθηκε ιστοπαθολογική μελέτη. Επίσης, με την τεχνική των strippings εκτιμήθηκαν τα επίπεδα των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών μορίων (ουρικό και ασκορβικό οξύ) στην κεράτινη στιβάδα.

Οι φυσιολογικοί ακτινοβολημένοι μύες απέκτησαν όλοι ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα *in situ*, και μερικοί και εξελκώσεις και ακτινική κεράτωση, ενώ οι διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες δεν έδωσαν κανένα στοιχείο ακανθοκυτταρικού καρκίνου ή ατυπία κυττάρων και δυσπλασία. Το ακτινοβολημένο φυσιολογικό δέρμα βρέθηκε περισσότερο αφυδατωμένο, με μεγαλύτερη πάχυνση, σε σχέση με το αντίστοιχο διαβητικό. Η υπεριώδης ακτινοβολία μείωσε σημαντικά τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά της επιδερμίδας ακτινοβολημένου φυσιολογικού δέρματος, σε σχέση με τα αντίστοιχα των διαβητικών.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε η προστασία που παρέχει ο διαβήτης έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπλέον χρειάζονται μελέτες για την προσέγγιση των μηχανισμών στους οποίους οφείλονται οι ανωτέρω παρατηρήσεις.

Abstract

The effect of ultraviolet radiation on normal skin and carcinogenic activity has been extensively studied, while there is no corresponding studies for diabetic skin.

The purpose of the experiment was to cause squamous cell carcinoma in diabetic mice with diabetes type I and type II.

The induction of type I diabetes was mediated by streptozotocin. For the first time, four types of hairless male mice (SKH-hr-1 white, SKH-hr-2, SKH-hr-2 coffee and SKH-hr-2 + APOE) were tested to induce diabetes type II with two different protocols. The first protocol included administration of streptozotocin intraperitoneally in combination with a high-fat diet and sugars to create insulin resistance through metabolic syndrome, while the second one, administration of nicotinamide and streptozotocin intraperitoneally for partial loss of β -pancreatic cells. Protocols were evaluated by measuring the levels of glucose and insulin in the blood of the mice.

Based on the results of inducing diabetes type II, the SKH-hr-2 type with the nicotinamide and streptozotocin protocol was selected as a suitable model for carcinogenesis in normal and diabetic mice. Photocarcinogenesis was achieved with a high dose of ultraviolet radiation (3.5 M.E.D.) for 6 months 3 times a week. Blood glucose, hydration, loss of water, elasticity, skin thickness, body weight, sebum, erythema and melanin were measured. The clinical picture was evaluated, photographs were taken with professional camera, with dermatoscope and by using a special dermatological camera (Antera3D) and histopathological study was also performed. In addition, the levels of hydrophilic antioxidant molecules (uric and ascorbic acid) in the stratum corneum was evaluated by using the technique of strippings.

Normal irradiated mice all acquired squamous cell carcinoma in situ, and some ulcers and actinic keratoses, while diabetic irradiated mice did not give any evidence of squamous cell carcinoma or cell atypia and dysplasia. The irradiated normal skin was found to be more dehydrated, more fattened than the corresponding diabetic. Ultraviolet radiation significantly reduced the hydrophilic antioxidants in the skin of irradiated normal skin, compared to those of diabetics.

The results showed the protection of diabetes against ultraviolet radiation. Moreover, studies are needed to approach and verify the mechanisms to which the above observations are based.

Περιεχόμενα

ΚΕΦ. 1ο Εισαγωγή.....	10
1.1 Ανατομία και Φυσιολογία Δέρματος.....	10
1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	10
1.1.2 Μορφολογία Δέρματος.....	10
1.1.2.1 Επιδερμίδα.....	11
1.1.2.2 Χόριο ή Δερμίδα ή Κυρίως δέρμα.....	17
1.1.2.3 Το Υπόδερμα – Υποδόρια στρώματα λίπους.....	18
1.1.3 Αιμάτωση του δέρματος	19
1.1.4 Νεύρα και αισθητήρια όργανα.....	19
1.1.5 Εξαρτήματα του δέρματος	20
1.1.6 Φυσιολογία Δέρματος.....	20
1.2 Υπεριώδης ακτινοβολία και Δέρμα.....	24
1.2.1 Μελανίνη.....	24
1.2.2 Χρωματισμός του Δέρματος.....	26
1.2.3 Υπεριώδης ακτινοβολία.....	27
1.2.3.1 Τύποι ακτινοβολίας UV	28
1.2.4 Δερματικές αποκρίσεις σε UV.....	32
1.2.5 Μηχανισμοί φωτογήρανσης και φωτοκαρκινογένεσης.....	46
1.3. Δερματικοί Καρκίνοι.....	48
1.3.1 Αίτια.....	48
1.3.2 Επιπτώσεις UVR σε NMSC.....	51
1.3.3 Παθοφυσιολογία.....	53
1.3.4 Διάδοση.....	54
1.3.5 Κλινική και Ιστοπαθολογική Διάγνωση.....	54
1.3.6 Θεραπεία.....	55
1.3.7 Παράγοντες που συνδέονται με Τοπική Επίδραση και Μετάσταση.....	56
1.4 Διαβήτης.....	57
1.4.1 Ινσουλίνη.....	57
1.4.1.1 Μεταβολισμός της γλυκόζης.....	57
1.4.1.2 Η έκκριση ινσουλίνης και η ρύθμισή της.....	58
1.4.1.3 Σηματοδότηση ινσουλίνης.....	59
1.4.2 Ταξινόμηση και παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη.....	60
1.4.3 Παθοφυσιολογία του διαβήτη.....	63

1.4.4 Επιπλοκές του διαβήτη.....	64
1.4.5 Είδη Διαβήτη.....	64
1.4.5.1 Διαβήτη Τύπου 1.....	64
1.4.5.2 Διαβήτη Τύπου 2.....	69
1.4.6 Δερματικές αλλαγές.....	72
1.4.6.1 Αλλαγές του επιδερμικού φραγμού.....	72
1.4.6.2 Δερματικές λοιμώξεις.....	74
1.4.6.3 Διαταραχές του δέρματος λόγω διαβητικής αγγειοπάθειας και νευροπάθειας.....	74
1.5 Οξειδωτικό στρες και δέρμα.....	75
1.5.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	75
1.5.2 Οξειδωτικοί παράγοντες στο δέρμα.....	77
1.5.3 Αντιοξειδωτικά στο δέρμα.....	78
1.5.4 Ο ρόλος των οξειδωτικών παραγόντων στον Καρκίνο	79
1.5.5 Ο ρόλος των οξειδωτικών παραγόντων στο Διαβήτη.....	80
1.5.5.1 Οξειδωτικό στρες στον σακχαρώδη διαβήτη.....	80
1.5.5.2 Παθοφυσιολογία του οξειδωτικού στρες στον διαβήτη.....	81
1.5.5.3 Οξειδωτικό στρες και διαβητικές επιπλοκές.....	81
1.5.5.4 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες στο σακχαρώδη διαβήτη	82
1.6 Λιπιδική Υπεροξείδωση	86
1.6.1 Επισκόπηση των βιολογικών λειτουργιών των λιπιδίων	86
1.6.2 Υπεροξείδωση λιπιδίων και ανοσοποιητικό σύστημα.....	89
1.6.3 Οξείδωση λιπιδίων σε διαβήτη.....	90
1.6.4 Οξείδωση λιπιδίων σε καρκινικό δέρμα.....	93
 ΚΕΦ. 2ο : Πειραματικό Μέρος.....	 95
2.1 Εισαγωγή.....	95
2.2 Υλικά & Μέθοδοι.....	98
2.2.1 Στρεπτοζοτοκίνη (STZ)	99
2.2.2 Νικοτιναμίδιο (NAD)	100
2.2.3 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΗ.....	100
2.2.4 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	111
2.3 Πρωτόκολλα-Όργανα μετρήσεων.....	112
2.3.1 Λήψη stripping από το δέρμα μυών.....	112
2.3.2 Μέθοδος εκχύλισης stripping για οξειδωτικό στρες & αντιοξειδωτικά.....	113

2.3.3 HPLC (HighPerformanceLiquidChromatography).....	114
2.3.4 Συγκέντρωση ινσουλίνης πλάσματος σε διαβητικό μοντέλο μυών (Elisakit).....	122
2.3.5 Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.....	131
2.3.6 Επίδραση UV ακτινοβολίας στο δέρμα.....	132
2.3.7 Μέτρηση μελανίνης-ερυθρότητας.....	133
2.3.8 Μέτρηση Άδηλης Απώλειας νερού.....	133
2.3.9 Μέτρηση της ενυδάτωσης.....	134
2.3.10 Μέτρηση της ελαστικότητας.....	135
2.3.11 Μέτρηση του πάχους του δέρματος.....	136
2.3.12 Μελέτη του δέρματος-Φωτοτεκμηρίωση.....	136
2.3.13 ANTERA 3D® CS (Miravex).....	137
2.3.14 Δερματοσκόπιο DTS(DermaToScope).....	138
2.3.15 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	138
ΚΕΦ. 3ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	140
3.1 Στατιστική επεξεργασία και αποτελέσματα του 1ου μέρους του πειράματος (Πρόκληση Διαβήτη Τύπου II).....	140
3.2 Στατιστική επεξεργασία και αποτελέσματα του 2ου μέρους του πειράματος (Πρόκληση Ακανθοκυτταρικού καρκίνου με υπεριώδες φως σε διαβητικούς μύες τύπου I και II).....	175
3.3 HPLCΑνάλυση.....	239
3.4Φωτογραφίες με Φωτογραφική κάμερα.....	247
3.5Δερματοσκόπιο.....	257
3.6ANTERA.....	260
3.7ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	265
ΚΕΦ. 4 ^ο Συζήτηση-Συμπεράσματα	269
ΚΕΦ. 5 ^ο Βιβλιογραφία.....	280

Κεφ. 1ο| Εισαγωγή

1.1 Ανατομία και Φυσιολογία Δέρματος

1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

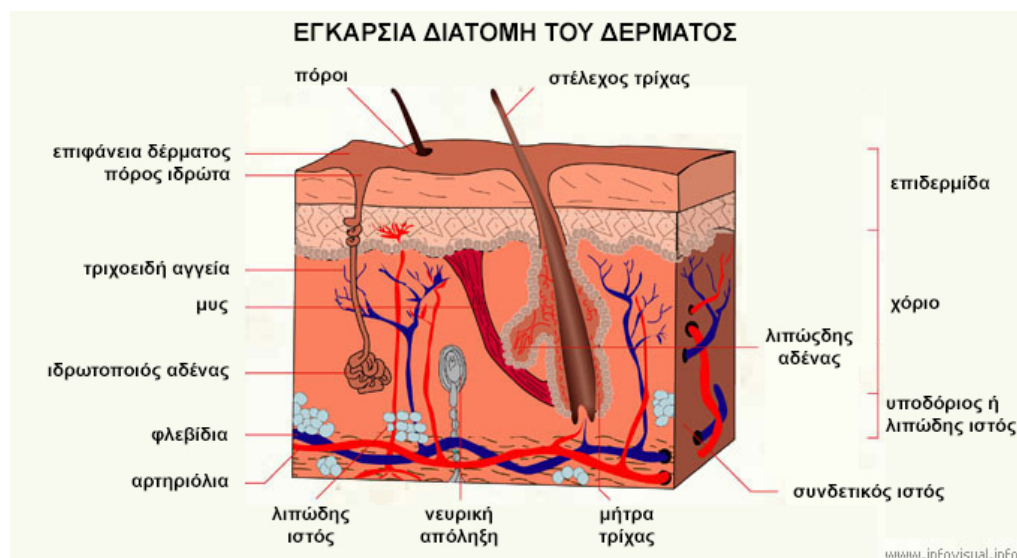
Το ανθρώπινο δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο επικοινωνίας μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος, αποτελώντας το 16% του ολικού του βάρους. Η συνολική επιφάνεια του δέρματος κυμαίνεται από 2500cm² στα νεογνά, μέχρι 18000cm² στους ενήλικες.[1] Το πάχος του ποικίλει από άτομο σε άτομο ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή. Επίσης, στις παλάμες και στα πέλματα κυμαίνεται από 0,5 mm έως και 5 mm. 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 5^η δεκαετία που αρχίζει και λεπταίνει. Το χρώμα του επίσης, ποικίλει από άτομο σε άτομο ανάλογα με τη φυλή και την ανατομική περιοχή και εξαρτάται από τη ποσότητα της μελανίνης (της φυσιολογικής χρωστικής του δέρματος). [2,3,4]

Διαθέτει πολλές λειτουργίες, σημαντικότερη εκ των οποίων είναι ο ρόλος του ως φραγμός για την προστασία του οργανισμού από φυσικούς, βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιόστασής του.[5]

1.1.2 Μορφολογία Δέρματος

Το δέρμα αποτελείται από έξω προς τα έσω από τα ακόλουθα στρώματα: επιδερμίδα, χόριο και τον υποδόριο ιστό ή υπόδερμα (υποδόρια στρώματα λίπους).[3] Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανά περιοχή ως προς το σχετικό πάχος των στρωμάτων αυτών. Η επιδερμίδα είναι παχύτερη στις παλάμες και τα πέλματα, με πάχος περίπου 1,5mm. Είναι πολύ λεπτή στα βλέφαρα, όπου έχει πάχος λιγότερο από 0,1mm. Το χόριο είναι παχύτερο στη ράχη, όπου είναι 30 έως 40 φορές παχύτερο της υπερκείμενης επιδερμίδας. Το ποσό του υποδόριου λίπους είναι άφθονο στην

κοιλιά και τους γλουτούς, σε σύγκριση με τη μύτη και το στήρνο, όπου είναι πενιχρό.[6]



Εικόνα 1| Δομή του δέρματος – Στιβάδες

1.1.2.1 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα είναι η εξωτερική επιφανειακή επιθηλιακή στιβάδα του δέρματος και αποτελείται από ένα στρωματοποιημένο κερατοποιημένο πλακώδες επιθήλιο με πάχος που κυμαίνεται από 0,1 χιλιοστά μέχρι 0,8-1,4 χιλιοστά (στις παλάμες και τα πέλματα αντίστοιχα) [1] 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 την περιοχή του σώματος. [3] (Εικόνα1)

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

Συντίθεται από τρεις βασικούς τύπους κυττάρων: τα κερατινοκύτταρα (σε ποσοστό περίπου 95%), τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα Langerhans. Ένα επιπλέον κύτταρο, το κύτταρο Merkel, μπορεί να βρεθεί στη βασική στιβάδα στις παλάμες και τα

πέλματα, στο βλεννογόνο του στόματος και των γεννητικών οργάνων, στην κοίτη του όνυχας και στο ακροκόλπωμα του θυλάκου. [6]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 του κερατινοκυττάρου, η οποία ξεκινάει από τη βασική στιβάδα, υφίσταται αριθμό μεταβολών και τελικά καταλήγει στη κεράτινη στιβάδα σαν απύρηνο, αποπλατυσμένο πετάλιο, λέγεται κερατινοποίηση και διαρκεί 28 μέρες. Έτσι η επιδερμίδα υφίσταται διαρκή ανανέωση. Η επιδερμίδα μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε επιμέρους στιβάδες που αντιπροσωπεύουν τα στάδια ωρίμανσης της κερατίνης στα κύτταρα αυτά.[1]

Οι 5 στιβάδες των κυττάρων της επιδερμίδας από έσω προς τα έξω είναι:

Βασική ή μητρική στιβάδα (Stratumbasale ή stratumgerminativum):

Είναι το βαθύτερο στρώμα της επιδερμίδας. Η στιβάδα όπου αρχίζει η ανανέωση του δέρματος. Η βασική στιβάδα έρχεται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη (που συνδέει το χόριο με την επιδερμίδα) και αποτελείται από επιμήκη κυλινδρικά βασικά κύτταρα, που είναι τα μητρικά ή πρόδρομα κύτταρα των κερατινοκυττάρων, τα οποία διαιρούνται συνεχώς, δημιουργώντας νέα κερατινοκύτταρα, αντικαθιστώντας τα παλιά που έχουν απομακρυνθεί από την επιφάνεια του δέρματος. Σε αυτή τη στιβάδα, επίσης, εντοπίζονται τα μελανοκύτταρα που αποτελούν το 5-10% του πληθυσμού των βασικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά συνθέτουν τη μελανίνη και συμβάλλουν στη μεταφορά της στα γειτονικά κερατινοκύτταρα μέσω δενδριτικών αποφυάδων. Επίσης, στη βασική στιβάδα εντοπίζονται και τα κύτταρα Merkel, που λειτουργούν ως αισθητήριοι υποδοχείς της αφής. Συνεπώς, η βασική στιβάδα είναι πολύ σημαντική αφού από αυτή παράγονται όλες οι άλλες στιβάδες της επιδερμίδας.[1,2,3]

Ακανθωτή ή Μαλπιγιανή στιβάδα (Stratumspinosum):

Αποτελείται από 8-10 στοίχους κυττάρων, τα οποία ανεβαίνουν προς την επιφάνεια του δέρματος και σχηματίζουν την κοκκιώδη στιβάδα, και είναι η παχύτερη στιβάδα της επιδερμίδας. Σε αυτό το στρώμα, τα κερατινοκύτταρα αρχίζουν να γίνονται κάπως αποπλατυσμένα. Στα ανώτερα στρώματα εμφανίζονται τα σωματίδια του Odland ή

πεταλιώδη σωμάτια τα οποία περιέχουν λιπίδια. Τα λιπίδια αυτά εκλύονται από τα κύτταρα στο μεσοκυττάριο χώρο με τη λειτουργία της εξωκυττάρωσης.[2,3]

Κοκκιώδης στιβάδα (Stratum granulosum):

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 οποία καθώς τα κύτταρα μεταπίπτουν σταδιακά στα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας, μετατρέπεται σε φιλαγγρίνη. Η φιλαγγρίνη κρατάει συνδεδεμένα τα μόρια κερατινών στα κατώτερα στρώματα της κεράτινης στιβάδας. Οι κερατίνες είναι οι πρωτεΐνες των κερατινοκυττάρων. Η στιβάδα αυτή δεν υπάρχει στους βλεννογόνους.[2,3] Επίσης, και στην κοκκιώδη στιβάδα παράγεται η κερατίνη.[7]

Διαυγής στιβάδα (Stratum lucidum):

Διαυγές, ωχρό, ρόδινο στρώμα. Βρίσκεται ακριβώς πάνω από την κοκκιώδη στιβάδα.[6] Εμφανίζεται αποκλειστικά στις παλάμες και στα πέλματα. Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής περιέχουν μια ουσία που ονομάζεται ελαιοειδίνη.[2,3]

Κεράτινη στιβάδα:

Είναι το πιο επιφανειακό στρώμα της επιδερμίδας και αποτελείται από σκληρά κερατινοκύτταρα που το κυτταρόπλασμά τους γεμίζει από μία νηματοειδή πρωτεΐνη, την κερατίνη. Τα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας, συνενώνονται σταθερά μεταξύ τους και δημιουργούν φραγμό προς το περιβάλλον προσδίδοντας στο δέρμα μία σημαντική ιδιότητα, την αδιαπερατότητα. 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, απύρρηνα (νεκρά) κύτταρα και αποπύπτουν συνεχώς και αντικαθίστανται από κύτταρα προερχόμενα από τις κάτω στιβάδες. 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.[1,2,3,7]

Τα κύτταρα της επιδερμίδας

Κερατινοκύτταρα:

Τα κερατινοκύτταρα αποτελούν τον κύριο πληθυσμό κυττάρων της επιδερμίδας. Έχουν εξωδερμική προέλευση και έχουν ως εξειδικευμένη λειτουργία την παραγωγή κερατίνης, μιας σύνθετης νηματοειδούς πρωτεΐνης που δεν σχηματίζει μόνο την επιφανειακή επίστρωση (κεράτινη στιβάδα) της επιδερμίδας, αλλά αποτελεί επίσης τη δομική πρωτεΐνη των τριχών και των νυχιών.[6] Η κερατίνη, συμβάλλει ακόμη 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. Πολλαπλασιάζονται έντονα και χάρη στη λειτουργία της κερατινοποίησης, καθώς ωριμάζουν ανερχόμενα προς τις εξωτερικές στιβάδες (μετανάστευση), σε κάθε μια από τις οποίες υφίστανται διάφορες μεταβολικές διεργασίες (μεταβάλλουν το σχήμα τους σε κυβοειδές) με διάρκεια περίπου 28 ημέρες και τέλος αποπλύνονται, χάνοντας τους μεσοκυττάριους δεσμούς (διαφοροποίηση) για να καταλήξουν νεκρά, στην κεράτινη στιβάδα.[10]

Μελανοκύτταρα:

Τα μελανοκύτταρα είναι τα κύτταρα που παράγουν τη χρωστική της επιδερμίδας. Κατοικούν στη βασική στιβάδα σε συχνότητα περίπου 1 ανά 10 κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας.[6] Υπάρχουν γενικά 1000 έως 2000 μελανοκύτταρα σε 1 mm² δέρματος.[11] Ρόλος τους είναι να παράγουν και να μεταφέρουν μελανίνη, μία από τις κύριες χρωστικές ουσίες του δέρματος που απορροφούν το φως. Περιέχουν εξειδικευμένα οργανίδια, τα μελανοσώματα. Όταν το δέρμα εκτίθεται στο ηλιακό φως, τα μελανοσώματα ενεργοποιούνται και παράγουν μελανίνη.[11] 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. Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα ανευρογενούς προέλευσης και φέρουν δενδρίτες που διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Τα μελανοσώματα που βρίσκονται στους δενδρίτες των μελανοκυττάρων, φαγοκυτταρώνονται από τα κερατινοκύτταρα

(επιθηλιακάκύτταρα), περιβάλουν τον πυρήνα τους και τα προστατεύουν από την υπερϊώδηακτινοβολία.

Κύτταρα Langerhans:

Τα κύτταρα Langerhans φυσιολογικά βρίσκονται διάσπαρτα ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα της ακανθωτής στιβάδας. Αποτελούν το 3% έως 5% των κυττάρων σε αυτή τη στιβάδα. Είναι επίσης δένδριτικάκύτταρα. Στην πλήρως ανεπτυγμένη τους μορφή, τα οργανίδια έχουν ραβδοειδές σχήμα με ένα κενοτόπιο στο ένα άκρο. Λειτουργικά, τα κύτταρα Langerhans ανήκουν στα μονοκύτταρα μακροφάγα και προέρχονται από το μυελό των οστών.[6] Ακόμα, ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα και συμμετέχουν στην ανοσολογικήαπάντηση έναντι διάφορων παθογόνων ερεθισμάτων, με την αναγνώριση καιπαρουσίαση των αντιγόνων.[2,3,8]Εάν στο δέρμα μειωθούν τα κύτταρα αυτά, λόγω της έκθεσης στην υπερϊώδη ακτινοβολία, αυτό χάνει την ικανότητα ευαισθητοποίησης μέχρι ο πληθυσμός των κυττάρων Langerhans να αναπληρωθεί.[6]

Κύτταρα Merkel:

Τα κύτταρα Merkel προέρχονται από τη νευρική ακρολοφίακαι είναι εξειδικευμένα στην αντίληψη της αφής. Ανευρίσκονται στη βασικήστιβάδα της επιδερμίδας σε άλλοτε άλλο αριθμό ανάλογα με την ανατομικήπεριοχή. Ο αριθμός τους είναι μεγαλύτερος στις ράγες των δακτύλων, στα χείλη καιστις ρίζες των τριχών. Συνέχονται στενά με ελεύθερες νευρικές απολήξεις καιευρίσκονται είτε μόνα τους είτε σε συμπλέγματα που ονομάζονται δίσκοι τουMerkel ή τριχοειδείς δίσκοι.[2,3,9]

1.1.2.2 Χόριο ή Δερμίδα ή Κυρίως δέρμα

Το χόριο είναι ένας ινώδης ιστός με μεγάλη σταθερότητα και ελαστικότητα,ο οποίος συγκρατεί και υποστηρίζει την επιδερμίδα. Το πάχος του χόριου ποικίλλειανάλογα με την ανατομική περιοχή από 0,5 έως 4 mm. Η δομή του είναι πιοπολύπλοκη και υποδιαιρείται σε δύο υποστρώματα, το ανώτερο ή θηλώδες στρώμα, πουονομάζεται έτσι από τον τρόπο που διεισδύει υπό μορφή θηλών στην επιδερμίδα, και το κατώτερο ή δικτυωτό στρώμα, που ονομάζεται έτσι λόγω της δικτυωτήςμορφής που παρουσιάζει.[2,3,15](Εικόνα 1) Το πρώτο στρώμα αποτελείται από χαλαρό συνδετικό

ιστό και ίνες κολλαγόνου τύπου II και περιλαμβάνει αισθητικές νευρικές απολήξεις και δομές που ονομάζονται Meissner. Το δεύτερο στρώμα βρίσκεται κάτω από το θηλώδες και αποτελείται από ακανόνιστο πυκνό συνδετικό ιστό και ίνες κολλαγόνου τύπου I. 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.

Το χόριο είναι πολύ πλούσιο σε αιμάτωση, και περιέχει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Το αγγειακό σύστημα του χορίου είναι ιδιαίτερος αναπτυγμένος στις θέσεις των εξαρτηματικών δομών. Με το αγγειακό πλέγμα συσχετίζονται τα λεμφαγγεία και τα νεύρα του χορίου. 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. Οι νευρικές δεσμίδες ανευρίσκονται μαζί με τα αρτηρίδια και τα φλεβίδια, ως μέρος των νευροαγγειακών δεσμίδων. Επίσης παρόντα είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι ξένων εισβολέων που διέρχονται από την επιδερμίδα. Ο κυτταρικός πληθυσμός του χορίου απαρτίζεται κυρίως από κολλαγόνο, ελαστίνη, ρετικουλίνη, ινοβλάστες, μαστοκύτταρα και τα ιστοκύτταρα. [1,3,6,16,17,18,19]

1.1.2.3 Το Υπόδερμα – Υποδόρια στρώματα λίπους

Κάτω από το χόριο βρίσκεται το υπόδερμα ή υποδόριος ιστός (λίπος). Αποτελείται από λοβία λιποκυττάρων ή λιποκύτταρα που διαχωρίζονται από ινώδη διαφράγματα αποτελούμενα από κολλαγόνο και μεγάλα αιμοφόρα αγγεία [6] και νεύρα, που διέρχονται προς το υπερκείμενο χόριο και σε ορισμένες περιοχές τα κατώτερα τμήματα εξαρτημάτων του δέρματος. [2] Είναι το βαθύτερο στρώμα του δέρματος. 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 μύς. Ο υποδόριος ιστός αποτελεί τη μακροσκοπικά παρατηρούμενη επιπολής περιτονία. [2,3] (Εικόνα 1)

Ακριβώς όπως η επιδερμίδα και το χόριο ποικίλλουν σε πάχος ανάλογα με την περιοχή του δέρματος, το ίδιο συμβαίνει και με τον υποδόριο ιστό. Συγκεκριμένα, 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. 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] Επιπροσθέτως, το υποδόριο λίπος παρέχει πλευστότητα και λειτουργεί ως αποθήκη ενέργειας και ενδοκρινικό όργανο. Το υποδόριο λίπος είναι μια καλή θέση ορμονικών μετατροπών. Η λεπτίνη, μια ορμόνη που ρυθμίζει το σωματικό βάρος μέσω του υποθαλάμου, παράγεται στα λιποκύτταρα. Αυτή επηρεάζει επίσης τον τρόπο που αντιδρούμε στις γεύσεις του φαγητού. Σε παχύσαρκα παιδιά και εφήβους που εμφανίζουν διαβήτη, η σοβαρή περιφερειακή αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με συσσώρευση λιπιδίων στα ενδομυοκυτταρικά και ενδοκοιλιακά λιποκύτταρα.[6]

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 καταρχάς το μεταβολισμό του, αλλά επίσης παίζει ουσιαστικό ρόλο στη θερμορύθμιση του οργανισμού. Προέρχεται από αγγεία που διέρχονται από το υποδόριο λίπος. Στην επιδερμίδα δεν υπάρχουν αγγεία, ενώ στο χόριο ανευρίσκεται πλούσιο δίκτυο αρτηριών, φλεβών και λεμφαγγείων.[2,3]

1.1.4 Νεύρα και αισθητήρια όργανα

Το δέρμα είναι εφοδιασμένο με ένα εκατομμύριο περίπου απολήξεις νευρικών ινών. Οι περισσότερες καταλήγουν στο πρόσωπο και τα άκρα και λίγες βρίσκονται στην άκρη. 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.[4]

1.1.5 Εξαρτήματα του δέρματος

Οι εκκρινείς και αποκρινείς αδένες, οι πόροι και οι τριχο-σμηγματογόνοι αδένες και τα νύχια αποτελούν τα εξαρτήματα του δέρματος.[6] 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.

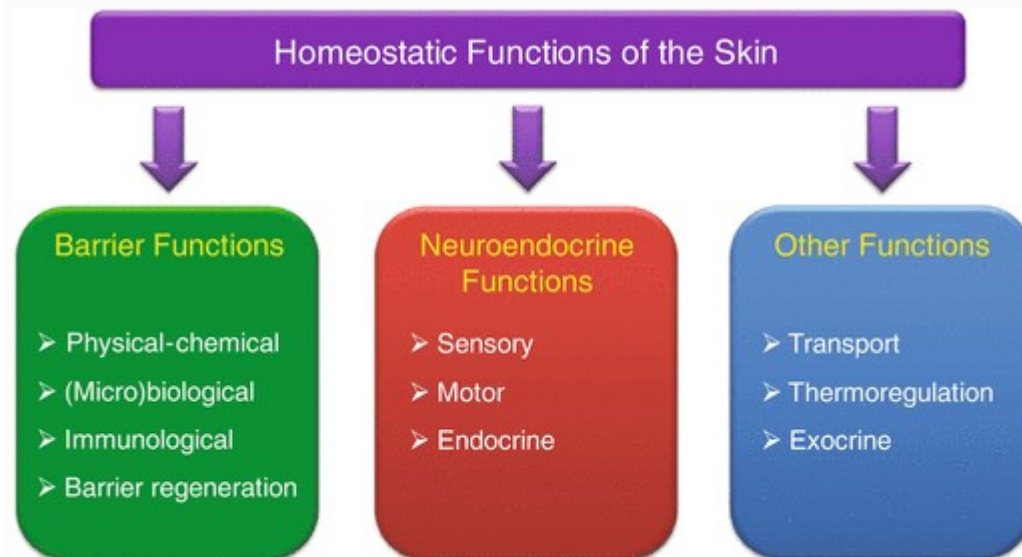
1.1.6 Φυσιολογία Δέρματος

Το όργανο του δέρματος είναι πραγματικά ένα βιολογικό σύμπαν, καθώς ενσωματώνει όλα τα σημαντικά συστήματα στήριξης του σώματος, του αίματος, της εννέρωσης, των μυών, καθώς και της ανοσολογικής ικανότητάς του, της αντιδραστικότητας των ψυχο-συναισθημάτων, της αντίληψης της υπερύλης ακτινοβολίας, των ενδοκρινικών λειτουργιών. Μαζί, αυτές συμμετέχουν στην ομοιοστασία του δέρματος και των προσαρτημάτων του, και με αυτόν τον τρόπο είναι σημαντικά για την ομοίωση ολόκληρου του σώματος των θηλαστικών. Το δέρμα είναι η κύρια διεπαφή μας με το εξωτερικό περιβάλλον, καταλαμβάνοντας στρατηγική θέση μεταξύ των επιβλαβών εξωτερικών και βιοχημικώς ενεργών εσωτερικών περιβαλλόντων.[22]

Το δέρμα κατοικείται από μια ποικιλόμορφη κοινότητα των μικροοργανισμών που ονομάζεται μικροβίωμα (microbiome). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, παρεμποδίζουν την εισβολή περισσότερων παθογόνων ειδών, επιτρέπουν αλληλεπιδράσεις επιφανειακών μικροβίων του ξενιστή και παρέχουν ζωτικές λειτουργίες στη συνολική υγεία του δέρματος. Η σύνθεση του μικροβιώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του δέρματος και τη χημική του σύνθεση, τα προσαρτήματα (αδένες ή θυλάκια), και τις τοπογραφικές μεταβλητότητες του δέρματος (π.χ. υγρές ή ξηρές περιοχές).[23,24]

1.1.6.1 Βασικές λειτουργίες του δέρματος

Οι διάφοροι τύποι κυττάρων των στρώσεων του δέρματος σχηματίζουν σύνθετα, πολυκύτταρα δίκτυα επικοινωνίας, η σωστή λειτουργία των οποίων καθιερώνει τη φυσιολογική ομοιόσταση του δέρματος. Οι ομοιοστατικοί αυτοί μηχανισμοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες. Συγκεκριμένα, στις λειτουργίες φραγής, στις νευροενδοκρινικές λειτουργίες και σε άλλες λειτουργίες (Εικόνα 2).[27]

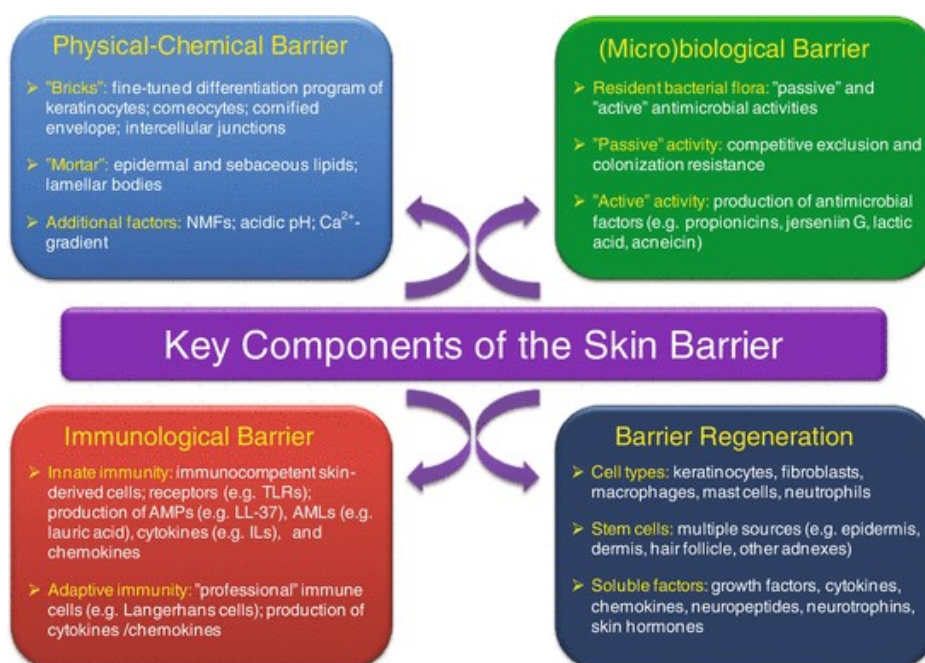


Εικόνα 2 |Βασικές λειτουργίες του δέρματος. Οι πολλαπλές ομοιοστατικές λειτουργίες του δέρματος μπορούν να ταξινομηθούν στις ομάδες φραγμών, νευροενδοκρινών και άλλων λειτουργιών. [27]

Φραγμός δέρματος

Ενδεχομένως η πιο σημαντική λειτουργία του δέρματος είναι ο σχηματισμός του φραγμού. Το μικροβίωμα του ανθρώπινου δέρματος δρα ως ένας σημαντικός φραγμός που προστατεύει το σώμα μας από παθογόνους παράγοντες και άλλες περιβαλλοντικές επιδράσεις.[26]οι μη παθογόνοι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά συστατικά και τις θέσεις εγκατάστασης τους παθογόνους οργανισμούς, εκκρίνοντας αντιμικροβιακά μόρια που σκοτώνουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων ή/και μεταβάλλοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση. Επιπρόσθετα, το δέρμα αντιμετωπίζει τους παθογόνους παράγοντες χρησιμοποιώντας χημικές άμυνες, όπως οι ιδρωτοποιοί αδένες που

παράγουν ένα επίπεδο Ph που καθιστά το δέρμα ακατοίκητο για πολλά μικρόβια. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει γίνει ολοένα και πιο εμφανές ότι τα κερατινοκύτταρα και άλλα κύτταρα του δέρματος παράγουν μια σειρά αντιμικροβιακών μορίων σημαντικών για τη διατήρηση της ομοιόστασης[25,29] Κύριος ρόλος του φραγμού είναι η παρεμπόδιση της απώλειας ύδατος και ταυτόχρονα η 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, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Επίσης, περιέχει και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.[20,21]



Εικόνα 3 |Βασικά συστατικά του πολύπλοκου φραγμού του δέρματος. Ο εξαιρετικά περίπλοκος φραγμός του δέρματος παρέχει πολλαπλά επίπεδα προστασίας για τον οργανισμό. Αυτές περιλαμβάνουν τον φυσικοχημικό φραγμό, τον (μικρο)βιολογικό φραγμό και τον ανοσολογικό φραγμό καθώς και τη διαρκή αναγέννηση αυτών των συστατικών.[21]

Χημική άμυνα – ανοσολογική απάντηση

Ως το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και η πρώτη γραμμή άμυνας κατά του περιβάλλοντος, το δέρμα παίζει ζωτικό ρόλο στην ανοσιακή άμυνα του ξενιστή.

Εκτός από τη λειτουργία του ως ένα φυσικό εμπόδιο, το δέρμα περιέχει ένα ενεργό ανοσοποιητικό δίκτυο επιτήρησης και διαθέτει πολύ εξειδικευμένες απαντήσεις για την παρεμπόδιση της εισόδου των μικροβίων.[28]

Η δερματική συντροφική χλωρίδα φαίνεται επίσης να ασκεί μια συνεχή και δυναμική δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα του δέρματος. Πράγματι, τα βακτήρια της επιδερμίδας αποδείχτηκε ότι ρυθμίζουν την παραγωγή κερατινοκυττάρων AMP καθώς και την παραγωγή κυτοκίνης άλλων ανοσοκατασταλτικών κυττάρων του δέρματος.[34] Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η συνεχής φυσιολογική απομάκρυνση των "νεκρών" κερατοειδών όχι μόνο ενισχύει τους φυσικούς και βιολογικούς φραγμούς αλλά δυσχεραίνει επίσης τους παθογόνους μικροοργανισμούς να δημιουργήσουν μόνιμες αποικίες.[27]

Ως ανοσοκύτταρα, τα φυσικά κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα που διεισδύουν, μαστοκύτταρα, κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (π.χ. επιδερμικό κύτταρο Langerhans, δερμικό δενδριτικό κύτταρο) καθώς και T και B λεμφοκύτταρα εντοπίζονται σε διάφορα διαμερίσματα του δέρματος. Επιπλέον, μια πληθώρα κυτοκινών, χημειοκινών και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών, καθώς και των προαναφερθέντων AMP και AMI συντίθενται και επομένως απελευθερώνονται από σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους του δέρματος. Επομένως, μετά από λοιμώξεις, έκθεση σε αλλεργιογόνο ή ρήξη φραγμού, αυτά τα έμφυτα και προσαρμοστικά συστατικά ανοσίας συνενεργοποιούνται για να προκαλέσουν μια ενορχηστρωμένη φλεγμονώδη και ανοσολογική αντίδραση.[30,31,32]

Εξάλλου, τα κερατινοκύτταρα και τα σμηγματογόνα που προέρχονται από σμηγματογόνες αδένες - τα οποία, όπως φαίνεται παραπάνω, διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στην καθιέρωση του φυσικοχημικού φραγμού - εισήχθησαν ως πρόσθετοι δείκτες του ανοσοποιητικού συστήματος του δέρματος. Αυτός ο ανοσολογικός ρόλος αποδίδεται όχι μόνο στην παραγωγή των AMPs και AMLs και στο αντιμικροβιακό σμήγμα, αλλά και στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν εξωτερικά παθογόνα μέσω της λειτουργικής έκφρασης όλων των ειδών υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων. Μελέτες των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPS) σε πολλά συστήματα οργάνων έχουν δείξει ότι συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της άμεσης θανάτωσης μικροβίων, της χημειοταξίας, της τροποποίησης των φλεγμονωδών αντιδράσεων, της αγγειογένεσης

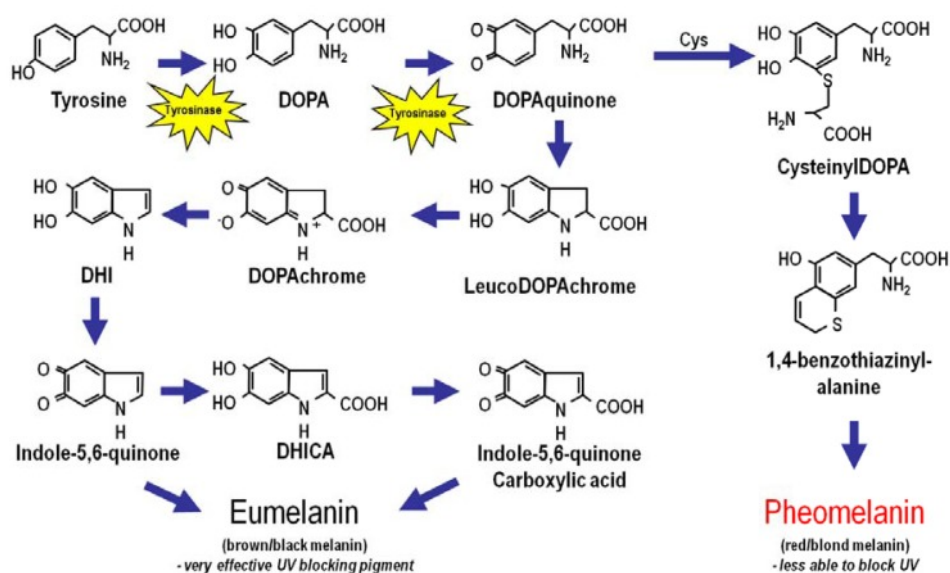
και της επούλωσης τραυμάτων.[25] Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς, μέσω της απελευθέρωσης πολυάριθμων προ-φλεγμονωδών παραγόντων, οδηγεί στην έναρξη ενεργών μηχανισμών άμυνας και ως αποτέλεσμα, ξεκινούν τα προσαρμοστικά και έμφυτα ανοσολογικά γεγονότα.[27]

1.2 Υπεριώδης ακτινοβολία και δέρμα

1.2.1 Μελανίνη

Η ποσότητα και ο τύπος της επιδερμικής μελανίνης είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την επιδερμίδα και την ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η μελανίνη είναι ένα μεγάλο βιοσυσσωρευτικό που αποτελείται από υπομονάδες διαφορετικών χρωστικών που σχηματίζονται με οξείδωση και κυκλοποίηση του αμινοξέος τυροσίνης.[36,37,38] (Εικόνα4) Περιέργως, τα ενδιάμεσα της μελανογένεσεως μπορεί να έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στο δέρμα [38-40]. Η μελανίνη υπάρχει σε δύο κύριες χημικές μορφές: (1) ευμελανίνη, μια σκούρα χρωστική ουσία που εκφράζεται άφθονα στο δέρμα σε βαριά χρωματισμένα άτομα, και (2) φαιομελανίνη, μία ανοικτού χρώματος θειωμένη χρωστική που προκύπτει από την ενσωμάτωση των κυστεϊνών σε προδρόμους μελανίνης [41]. Η ευμελανίνη είναι πολύ πιο αποτελεσματική στην παρεμπόδιση των υπεριωδών ακτίνων από την φαιομελανίνη, οπότε όσο περισσότερη ευμελανίνη στο δέρμα, τόσο λιγότερο διαπερατή από την υπεριώδη ακτινοβολία είναι η επιδερμίδα [42]. Οι άνθρωποι με ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα που είναι σχεδόν πάντα ευαίσθητοι στην υπεριώδη ακτινοβολία και έχουν υψηλό κίνδυνο καρκίνου του δέρματος έχουν μικρή επιδερμική εμμελανίνη και επομένως «απορροφούν» πολύ περισσότερο UV από ό, τι τα άτομα με σκουρόχρωμα δέρματα. Επομένως, όσο πιο ανοιχτόχρωμο είναι το δέρμα, τόσο πιο επιζήμια θα είναι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Στην πραγματικότητα, τα επίπεδα φαιομελανίνης είναι παρόμοια μεταξύ των ατόμων με σκουρόχρωμο δέρμα και των ανοιχτόχρωμων δερμάτων και η ποσότητα της επιδερμικής εμμελανίνης καθορίζει την επιδερμίδα, την ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία και τον κίνδυνο καρκίνου. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η

φαιομελανίνη μπορεί να προάγει οξειδωτική βλάβη στο DNA και δημιουργία μελανώματος με σχηματισμό ελευθέρων ριζών στα μελανοκύτταρα.[43-48].



Εικόνα 4|Βιοσύνθεση μελανίνης. Η μελανίνη, ένα μεγάλο βιοσυσσωρευτικό υλικό που αποτελείται από χρωματισμένα χημικά είδη, βρίσκεται σε δύο μεγάλες μορφές: το καφέ / μαύρο υψηλά UV προστατευτικό "ευμελανίνη" χρωστική ουσία και η κόκκινη / ξανθή UV-διαπερατή "φαιομελανίνη". Τόσο η ευμελανίνη όσο και η φαιομελανίνη παράγονται από την αμινοξική τυροσίνη. Η τυροσινάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη συνθετική αντίδραση που περιορίζει την ταχύτητα και για τα δύο είδη μελανίνης και όταν το ελαττωματικό προκαλεί τον αλβινισμό. Η ενσωμάτωση της κυστεΐνης στη φαιομελανίνη έχει σαν αποτέλεσμα τη συγκράτηση θείου στο χρωστικό, το οποίο αποδίδει ένα ελαφρύ χρώμα στο τελικό προϊόν μελανίνης και μπορεί να συμβάλει στην οξειδωτική βλάβη στο δέρμα. Ο άξονας σηματοδότησης του υποδοχέα μελανοκυττάρου διεγέρσεως (MSH) - μελανοκορτίνης 1 (MC1R) είναι ένας κύριος καθοριστής του τύπου και της ποσότητας μελανίνης που παράγεται από μελανοκύτταρα στο δέρμα.[47]

1.2.2 Χρωματισμός του δέρματος

Το δέρμα περιλαμβάνει διάφορους τύπους χημικών ενώσεων που απορροφούν το φως και ονομάζονται χρωμοφόρα-χρωστικές. Μεταξύ αυτών των χρωμοφόρων, η μελανίνη και η αιμοσφαιρίνη είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κατανόηση της εμφάνισης κανονικού δέρματος αφού απορροφούν το φως ιδιαίτερα στην ορατή περιοχή μήκους κύματος [14]. Το δέρμα οφείλει ένα μέρος του χρώματός του στην αιμοσφαιρίνη των αιμοφόρων αγγείων και στα καροτενοειδή του υποδερμικού λίπους, όμως ο κύριος καθοριστικός παράγοντας του χρώματος είναι η μελανίνη. 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.[13]

Η δερματική χροιά είναι ένας από τους σημαντικότερους καθοριστικούς παράγοντες της ευαισθησίας στην υπεριώδη ακτινοβολία και του καρκίνου του δέρματος. Η κλίμακα "Fitzpatrick" είναι μία ημι-ποσοτική κλίμακα αποτελούμενη από έξι φωτοτύπους που περιγράφουν το χρώμα του δέρματος από τη βασική επιδερμίδα, το επίπεδο μελανίνης, τη φλεγμονώδη απόκριση στη UV και τον κίνδυνο καρκίνου [49] (Εικόνα 5). Η ελάχιστη ερυθματώδης δόση (MED) είναι μια ποσοτική μέθοδος για την αναφορά της ποσότητας UV (ιδιαίτερα UVB) που απαιτείται για να προκαλέσει ηλιακό έγκαυμα στο δέρμα 24-48 ώρες μετά την έκθεση, προσδιορίζοντας ως τελικά σημεία το ερύθημα (ερυθρότητα) και το οίδημα (πρήξιμο). Όσο πιο ανοιχτόχρωμο είναι το δέρμα, τόσο πιο εύκολο είναι να προκαλέσει φλεγμονή στο φως (ηλιακό έγκαυμα). [50-52 Ο χαμηλός φωτότυπος Fitzpatrick συσχετίζεται τόσο με το MED όσο και με το μελάνωμα και τον κίνδυνο καρκίνου του δέρματος [53].

Fitzpatrick phototype	Phenotype	Epidermal eumelanin	Cutaneous response to UV	MED (mJ/cm ²) *	Cancer risk
I	Unexposed skin is bright white Blue/green eyes typical Freckling frequent Northern European/British	+/-	Always burns Peels Never tans	15-30	++++
II	Unexposed skin is white Blue, hazel or brown eyes Red, blonde or brown hair European/Scandinavian	+	Burns easily Peels Tans minimally	25-40	+++ /++++
III	Unexposed skin is fair Brown eyes Dark hair Southern or Central European	++	Burns moderately Average tanning ability	30-50	+++
IV	Unexposed skin is light brown Dark eyes Dark hair Mediterranean, Asian or Latino	+++	Burns minimally Tans easily	40-60	++
V	Unexposed skin is brown Dark eyes Dark hair East Indian, Native American, Latino or African	++++	Rarely burns Tans easily and substantially	60-90	+
VI	Unexposed skin is black Dark eyes Dark hair African or Aboriginal ancestry	+++++	Almost never burns Tans readily and profusely	90-150	+/-

Minimal erythematous dose (MED) is defined as the least amount of UVB radiation that causes reddening and inflammation of the skin 24-48 h after exposure (*i.e.*, the lowest UV dose that causes sunburn). The more UV sensitive an individual is, the lower the MED of his/her skin.

Εικόνα 5|Κλίμακα Fitzpatrick για τον προσδιορισμό του φωτοτύπου του δέρματος.
[49]

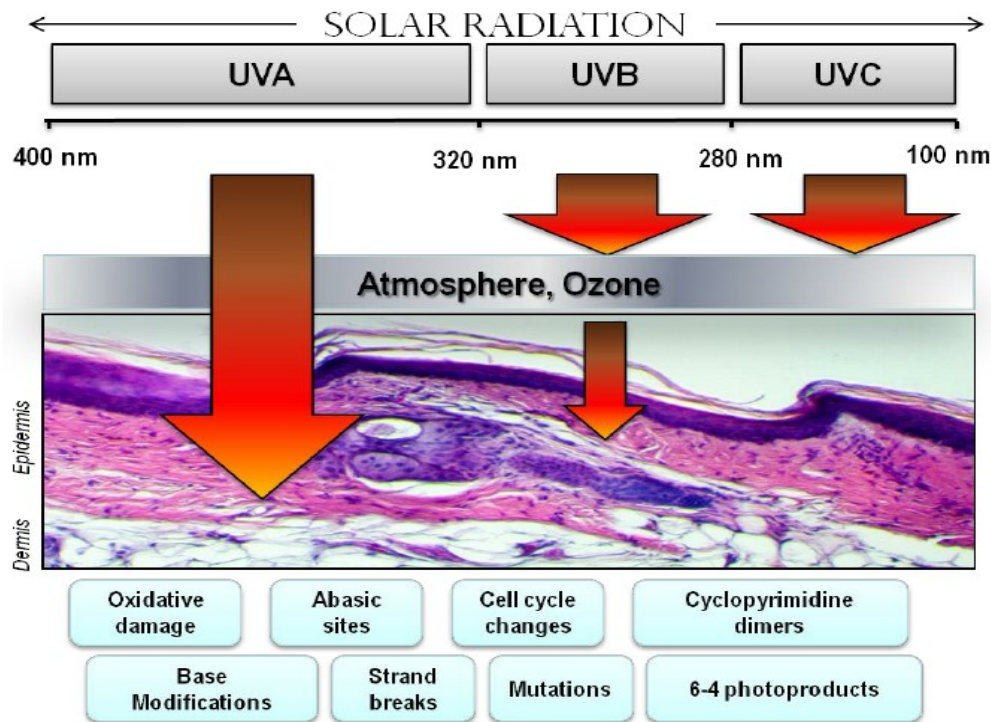
1.2.3 Υπεριώδης ακτινοβολία

Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) ταξινομείται ως "πλήρης καρκινογόνος" επειδή είναι ταυτόχρονα ένα μεταλλαξιογόνο και ένας μη ειδικός παράγοντας βλάβης και έχει ιδιότητες τόσο ενός εκκινητή όγκου όσο και ενός προαγωγού όγκου. Σε περιβαλλοντική αφθονία, η UV είναι ο σημαντικότερος τροποποιητικός παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του δέρματος και πολλές άλλες περιβαλλοντικά επηρεασμένες δερματικές διαταραχές. Ωστόσο, η υπεριώδης ακτινοβολία ωφελεί επίσης την ανθρώπινη υγεία με τη μεσολάβηση της φυσικής σύνθεσης της βιταμίνης D και των ενδορφινών στο δέρμα, επομένως η υπεριώδης ακτινοβολία έχει πολύπλοκα και μικτά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία. Παρ' όλα αυτά, η

υπερβολική έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία συνεπάγεται βαθιούς κινδύνους για την υγεία, όπως ατροφία, αλλαγές χρωματισμού, ρυτίδες και κακοήθεια. Η υπεριώδης ακτινοβολία συνδέεται επιδημιολογικά και μοριακά με τους τρεις πιο συνήθεις τύπους καρκίνου του δέρματος, καρκίνωμα των βασικών κυττάρων, καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων και κακοήθες μελάνωμα. Οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης της δερματικής νόσου. Ως εκ τούτου, μια ευρεία ποικιλία φυσικών παραγόντων έχει μελετηθεί για τη συμβολή τους στη φωτοπροστασία του δέρματος.[35] Κάθε συστατικό της υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να ασκήσει ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα, τους ιστούς και τα μόρια.

1.2.3.1 Τύποι ακτινοβολίας UV

Όντας ένα συστατικό του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, τα φωτόνια UV πέφτουν μεταξύ των μηκών κύματος του ορατού φωτός και της ακτινοβολίας γάμμα. Η ενέργεια της υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να υποδιαιρεθεί σε συστατικά UV-A, -B και -C βασισμένα σε ηλεκτρικές φυσικές ιδιότητες, με φωτόνια UV-C που έχουν τα μικρότερα μήκη κύματος (100-280 nm) και υψηλότερη ενέργεια, το UV-A που έχει το μακρύτερο (315-400 nm) αλλά λιγότερο ενεργητικά φωτόνια και UV-B που πέφτουν μεταξύ τους (Εικόνα 6). Κάθε συστατικό της υπεριώδους ακτινοβολίας μπορεί να ασκήσει ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα, τους ιστούς και τα μόρια. [35]



Εικόνα 6|Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας και βιολογικές επιδράσεις στο δέρμα. Η ηλιακή ακτινοβολία UV μπορεί να υποδιαιρεθεί σε UVA, UVB και UVC συστατικά, ωστόσο λόγω του όζοντος που απορροφά UVC, το ηλιακό φως του περιβάλλοντος είναι κατά κύριο λόγο UVA (90% -95%) και UVB (5% -10%). Η UV διεισδύει στο δέρμα με τρόπο εξαρτώμενο από το μήκος κύματος. Η UVA έχοντας το μεγαλύτερο μήκος κύματος, διεισδύει βαθιά στο χόριο φτάνοντας στο χόριο. Αντίθετα, η UVB φτάνει μέχρι και την επιδερμίδα. Η UVA είναι αποτελεσματική στη δημιουργία αντιδραστικών μορφών οξυγόνου που μπορούν να βλάψουν το DNA μέσω έμμεσων αντιδράσεων φωτοευαισθητοποίησης. Η UVB απορροφάται απευθείας από το DNA το οποίο προκαλεί μοριακές αναδιατάξεις που σχηματίζουν τα ειδικά φωτοπροϊόντα όπως διμερή κυκλοβουτανίου και 6-4 φωτοπροϊόντα.[35]

Ένα ιστολογικό τμήμα δέρματος (κηλίδωση αιματοξυλίνης και ηωσίνης, μεγέθυνση X 40) απεικονίζεται στα αριστερά και η αντίστοιχη διείσδυση βάθους των διαφορετικών μηκών κύματος UV στα δεξιά. Η UVC, αν και είναι πολύ μεταλλαξιογόνα στο DNA, φτάνει μόνο στο κερατοειδικό στρώμα που αποτελείται από νεκρά κερατινοκύτταρα. Η UVB φθάνει στο βασικό στρώμα της επιδερμίδας, δηλαδή στο στρώμα των επιδερμικών βλαστοκυττάρων. Λόγω του μικρότερου

μήκους κύματος, υψηλότερης ενέργειας και μικρότερου βάθους διείσδυσης, η απόθεση ενέργειας ανά κυτταρικό όγκο και επομένως η μεταλλαξιογένεση της UVB είναι η υψηλότερη. ΗUVA μπορεί να φτάσει στο δέρμα συμπεριλαμβανομένων των ελαστικών ινών και των ινών κολλαγόνου και οδηγεί σε γήρανση του δέρματος, καθώς και βλάβες του DNA.[127]

UVA (320-400 nm)

Η ακτινοβολία υπεριώδους Α (UVA) ($\lambda = 320-400 \text{ nm}$) είναι το κύριο συστατικό της υπεριώδους ακτινοβολίας που φθάνει στην επιφάνεια της Γης και κατά συνέπεια στο δέρμα. [104] Η UVA αποτελεί το 4,9% της ηλιακής ακτινοβολίας και φθάνει μέχρι και το χόριο (μπορεί να διαπεράσει το δέρμα σε βάθος περίπου 1000 μικρομέτρων) προκαλώντας πρόωρη γήρανση με καταστροφή του κολλαγόνου, απώλεια ελαστικότητας, άμεση μελάγχρωση και ανοσοκαταστολή. Επίσης είναι υπεύθυνη για φωτοκαρκινογένεση και φωτοδερματίτιδες.[105] Οι κύριες κυτταροτοξικές επιδράσεις της ακτινοβολίας UVA οφείλονται στην παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) με φωτοευαισθητοποίηση. Αυτή η διεργασία εκκινείται από την απορρόφηση των φωτονίων UVA από διάφορους ενδογενείς ($e.G$ ή εξωγενή φλαβινών, πορφυρίνες, μελανίνη.) (E . Ζφωτοευαισθητοποιητές [μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα.]).[104]Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ηUVAαναστέλλει την απόκριση βλάβης του DNA, η οποία μπορεί να αποκαταστήσει διμερή που προκαλούνται από UVA περισσότερο μεταλλαξιογόνο από τα επαγόμενα από UVB διμερή.[127]

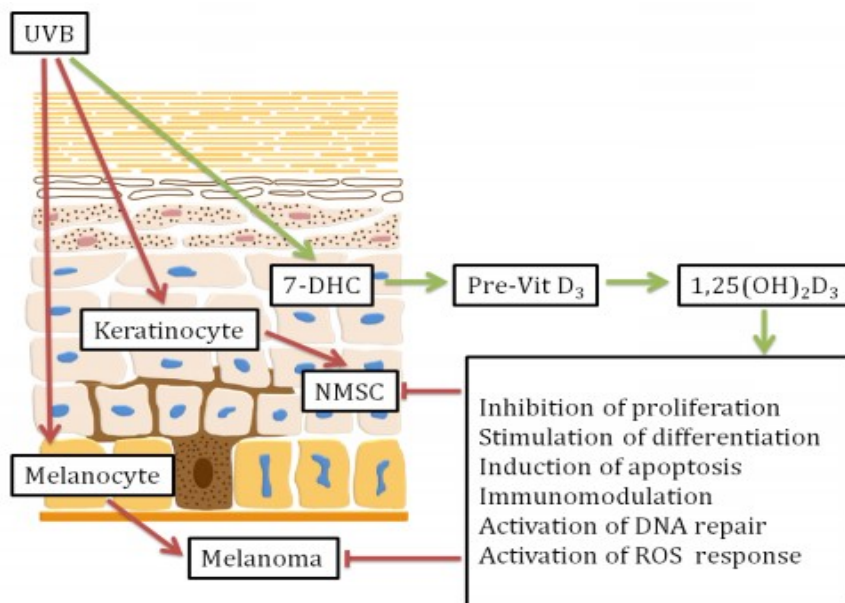
UVB (290-320 nm)

Η UVB αποτελεί το 0,1% της ηλιακής ακτινοβολίας, διαπερνά την κεράτινη στιβάδα και φθάνει μέχρι και την επιδερμίδα. Θεωρείται ως η πιο καταστρεπτική φυσική ακτινοβολία λόγω της ενέργειάς της, η οποία είναι αρκετά υψηλή ώστε να προκαλέσει πολλές φωτοχημικές αντιδράσεις.[106] Αποτελεί την πρωταρχική αιτία πρόκλησης εγκαυμάτων από τον ήλιο αλλά και διάφορων μορφών καρκίνου (προκαλεί άμεσα βλάβες στο DNA). Μπορεί να διαπεράσει το δέρμα σε βάθος περίπου 160 έως 180 μικρόμετρα., [108] Γενικά, μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα,

έγκαυμα, καταστροφή του DNA, έμμεση μελάγχρωση, πρόωρη γήρανση και καρκίνο του δέρματος. Επίσης είναι υπεύθυνη για ανοσοκαταστολή, φωτοδυναμικές αντιδράσεις, φωτοδερματίτιδες και υπεροξειδωσιτών λιπαρών οξέων.[107] Η ακτινοβολία UVB απορροφάται απευθείας από το DNA, οδηγώντας στην σχηματισμό φωτοπροϊόντων RNA, όπως κυκλοβουτανίου διμερών πυριμιδίνης (CPD) και 6-πυριμιдино-4-πυριμιδόνη φωτοπροϊόντα (6-4 PPs), τα οποία έχουν πρωταρχική σημασία για το καρκινογόνο αποτέλεσμα της UVB. Τα CPDs είναι (T) ή κυτοσίνης (C) υπολείμματα που σχηματίζουν ένα δακτύλιο κυκλοβουτανίου, ενώ 6-4 PPs είναι που παράγεται από έναν μόνο μη κυκλικό δεσμό μεταξύ του άνθρακα 6 του 5' πυριμιδίνης και άνθρακα 4 των καταλοίπων 3' πυριμιδίνης. Οι CPD σχηματίζονται σε υψηλότερες αναλογίες (66%) σε σύγκριση με 6-4 PPs (33%) και οι δύο βλάβες προκαλούν ογκώδη παραμόρφωση της ραχοκοκαλιάς του DNA. Αυτές οι παραμορφώσεις παρεμποδίζουν πολυμεράσες κατά τη διάρκεια της μεταγραφής ή του DNA αναδιπλασιασμού κατά τη διάρκεια κυτταρικής διαίρεσης επειδή δεν μπορούν να περάσουν αυτές τις αλλοιώσεις. Συχνά, αυτές οι αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε χαρακτηριστικές μεταλλάξεις

Αλληλουχίες DNA, συγκεκριμένα μεταβολές βάσεων C έως T και CC σε TT μεταλλάξεις με τη σειρά τους, τις λεγόμενες μεταλλάξεις υπογραφών UV ως ουσιαστικά κανένα άλλο μεταλλαξιογόνο δεν επάγει τέτοιες μεταλλάξεις.

Συγκεκριμένα, τώρα αναγνωρίζεται γενικά ότι η UVA ακτινοβολία μπορεί επίσης να προκαλέσει CPD σε παρόμοια έκταση, οξειδωτική βλάβη DNA, όπως υποδείχθηκε ανωτέρω.[127]



Εικόνα 7 | Επίδραση της UVB ακτινοβολίας στο δέρμα[127]

UVC (200-290 nm)

Η UVC είναι η πιο επικίνδυνη καθώς είναι έντονα μεταλλαξιογόνος και καρκινογόνος για το δέρμα, όμως δεν φθάνει την επιφάνεια της Γης καθώς απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από το ατμοσφαιρικό στρώμα του όζοντος.

Συμπερασματικά, όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος, τόσο μεγαλύτεροι οι κίνδυνοι από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία

1.2.4 Δερματικές αποκρίσεις σε UV

Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει πολλές επιπτώσεις στην φυσιολογία του δέρματος, με κάποιες συνέπειες να εμφανίζονται έντονα και άλλες με καθυστέρηση. Μια από τις πιο εμφανείς οξείες επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα είναι η επαγωγή της φλεγμονής. Η UVB προκαλεί έναν καταρράκτη κυτταροκινών, αγγειοδραστικών και νευροενεργούς μεσολαβητές στο δέρμα που μαζί οδηγούν σε μια φλεγμονώδη απόκριση και προκαλεί «ηλιακά εγκαύματα» [54,55,56, 67-70]. Εάν η

δόση της υπεριώδους ακτινοβολίας υπερβαίνει την απόκριση φθοράς κατωφλίου, τα κερατινοκύτταρα ενεργοποιούν αποπτωτικές οδούς και πεθαίνουν. Τέτοια αποπτωτικά κερατινοκύτταρα μπορούν να ταυτοποιηθούν από τους πυκνωτικούς πυρήνες τους και είναι γνωστά ως "κύτταρα ηλιακού εγκαύματος" [71]. Η UV επίσης οδηγεί σε υπερκεράτωση, δηλαδή αύξηση του επιδερμικού πάχους. Με την πρόκληση κυτταρικού τραυματισμού, η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί μονοπάτια απόκρισης βλαβών στα κερατινοκύτταρα. Τα σήματα βλάβης, όπως η ενεργοποίηση του p53, μεταβάλλουν βαθιά τη φυσιολογία των κερατινοκυττάρων, προκαλώντας διακοπή κυτταρικού κύκλου, ενεργοποιώντας την επισκευή του DNA και προκαλώντας απόπτωση εάν η ζημία είναι αρκετά μεγάλη. Ωστόσο, αρκετές ώρες μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και τα σήματα απόκρισης ζημιών μειώνονται, τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται δυνατά [72], με τη μεσολάβηση μιας ποικιλίας επιδερμικών αυξητικών παραγόντων. Η αυξημένη διαίρεση κυττάρων μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία οδηγεί σε συσσώρευση επιδερμικών κερατινοκυττάρων που αυξάνει το επιδερμικό πάχος. Η επιδερμική υπερπλασία προστατεύει καλύτερα το δέρμα από τη διείσδυση των UV [73].

Η επιδερμική υπερκεράτωση συνδέεται με τον χρωματισμό του δέρματος, γνωστό ως μαύρισμα[55,57, 74-77]. Η UV ρυθμίζει την παραγωγή και την επιδερμική συσσώρευση της μελανίνης στο δέρμα [78- 82]. Αυτή η σημαντική φυσιολογική απόκριση προστατεύει το δέρμα από την επακόλουθη βλάβη από την υπεριώδη ακτινοβολία και τα ελαττώματα σε αυτή την οδό συνδέονται με την ευαισθησία στον καρκίνο. Η μεσολαβούμενη από UV υπερθέρμανση του δέρματος είναι στην πραγματικότητα διφασική, με αρχικό σκούρο δέρμα που προκύπτει από ανακατανομή και / ή μοριακές μεταβολές σε υπάρχουσες χρωστικές της επιδερμικής μελανίνης. Οι καθυστερημένες αυξήσεις στο σκούρο δέρμα, με τη μεσολάβηση της πραγματικής αυξανόμενης ρύθμισης της σύνθεσης μελανίνης και της μεταφοράς στα κερατινοκύτταρα, αρχίζουν αρκετές ώρες έως ημέρες μετά την έκθεση σε UV[83 , 84]. Η προσαρμοστική μελανοποίηση είναι μια πολύπλοκη φυσιολογική απόκριση [55, 57 ,74, 76] που περιλαμβάνει πολλαπλούς τύπους κυττάρων του δέρματος που αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους [77 , 85, 86]. Η UV έχει πολλές άλλες επιδράσεις στο δέρμα, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής μιας ανοσολογικής-ανεκτικής ή ανοσοκατασταλτικής κατάστασης[87-94] και η παραγωγή της βιταμίνης D από άμεση μετατροπή 7-διϋδροχοληστερόλη σε βιταμίνη

D₃ (χοληκαλσιφερόλη) [58-66]. Το φως του ήλιου στο περιβάλλον, ως επί το πλείστον, είναι ένα μείγμα UVA και UVB, όμως κάθε συστατικό UV μπορεί να ασκεί διαφορετικά και διακριτά αποτελέσματα στο δέρμα [95, 96]. Η UVB, για παράδειγμα, είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της φλεγμονής και ο σχηματισμός διμερών DNA (όπως διμερή μεταλλαξιογόνα θυμίνης) [96, 97], ενώ η UVA είναι πολύ λιγότερο δραστική στα εν λόγω μέτρα, αλλά αντι αυτού είναι ένας ισχυρός οδηγός της οξειδωτικής βλάβης των ελεύθερων ριζών στο DNA και άλλων μακρομορίων [98 -100]. Έτσι, το καθένα μπορεί να συμβάλει στην καρκινογένεση μέσω διαφόρων μηχανισμών [101-102]. Η επίδραση των UVA και UVB στην φυσιολογία του δέρματος είναι μια ενεργός περιοχή έρευνας.

Θετικές επιδράσεις της υπερϊώδους ακτινοβολίας

1) Παραγωγή βιταμίνης D

Η ακτινοβολία του ανθρώπινου δέρματος με UVB ξεκινά τη φωτοχημική μετατροπή της 7-δεϋδροχοληστερόλης (7-DHC), που ονομάζεται εναλλακτικά η προ-βιταμίνη D₃ (πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D λιποδιαλυτή βιταμίνη), σε προ-βιταμίνη D₃ και στη συνέχεια σε βιταμίνη D₃. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι μπορεί να σχηματιστεί και μια μικρή ποσότητα προ-βιταμίνης D₃ από UVA ακτινοβολία, παρόλα αυτά ο ρόλος της UVA στην πρόκληση ή τη μείωση της βιταμίνης D είναι εξαιρετικά αμφιλεγόμενος. Η πλειονότητα της δερματικής σύνθεσης εμφανίζεται στην επιδερμίδα όπου περίπου 65% 7-DHC είναι παρόν, έχοντας τη μεγαλύτερη UVB διείσδυση. Μικρότερο ποσό παράγεται στο χόριο, περίπου 35%, με 20%. Εντός των πρώτων 10 λεπτών έκθεσης, το 10-15% των 7-DHC μετατρέπεται σε προ-βιταμίνη D₃ με απορρόφηση UVR και αυτό εμφανίζεται σε υπο-ερυθρογονικές δόσεις UVB. Υψηλότερες δόσεις μπορούν να οδηγούν σε ισομερισμό σε άλλες στερόλες όπως ταχυστερόλη ή λουμιστερόλη που επηρεάζουν την αποτελεσματική μετατροπή σε προ-βιταμίνη D₃ και στη συνέχεια σε βιταμίνη D₃. [110]

Η βιταμίνη D έχει κανονιστικό ρόλο:[111]

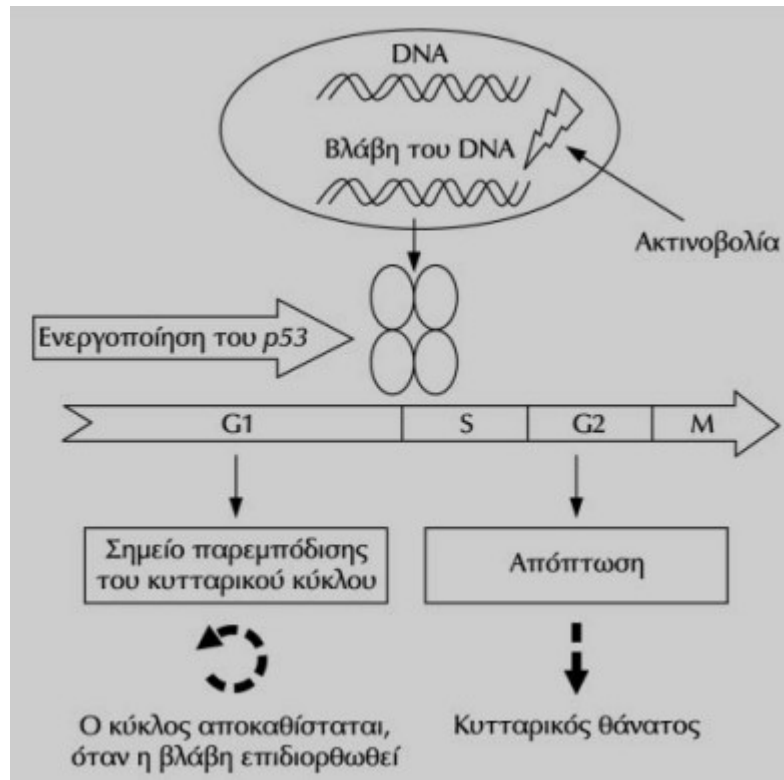
- Στο μεταβολισμό του ασβεστίου (ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος, την ανάπτυξη των οστών και τη διατήρηση της οστικής πυκνότητας)
- Στην έκκριση ινσουλίνης και μείωση της πιθανότητας εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου I
- Στο ανοσοποιητικό μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών πεπτιδίων – ιδιαίτερα των cathelicidin
- Στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων
- Στο αίμα, στην αναπνευστική οδό, στο δέρμα και στην υγεία του εντέρου

Ένας αριθμός αυτοάνοσων νόσων, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, ο διαβήτης τύπου I, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, σχετίζονται με ανεπάρκεια βιταμίνης D. [112]

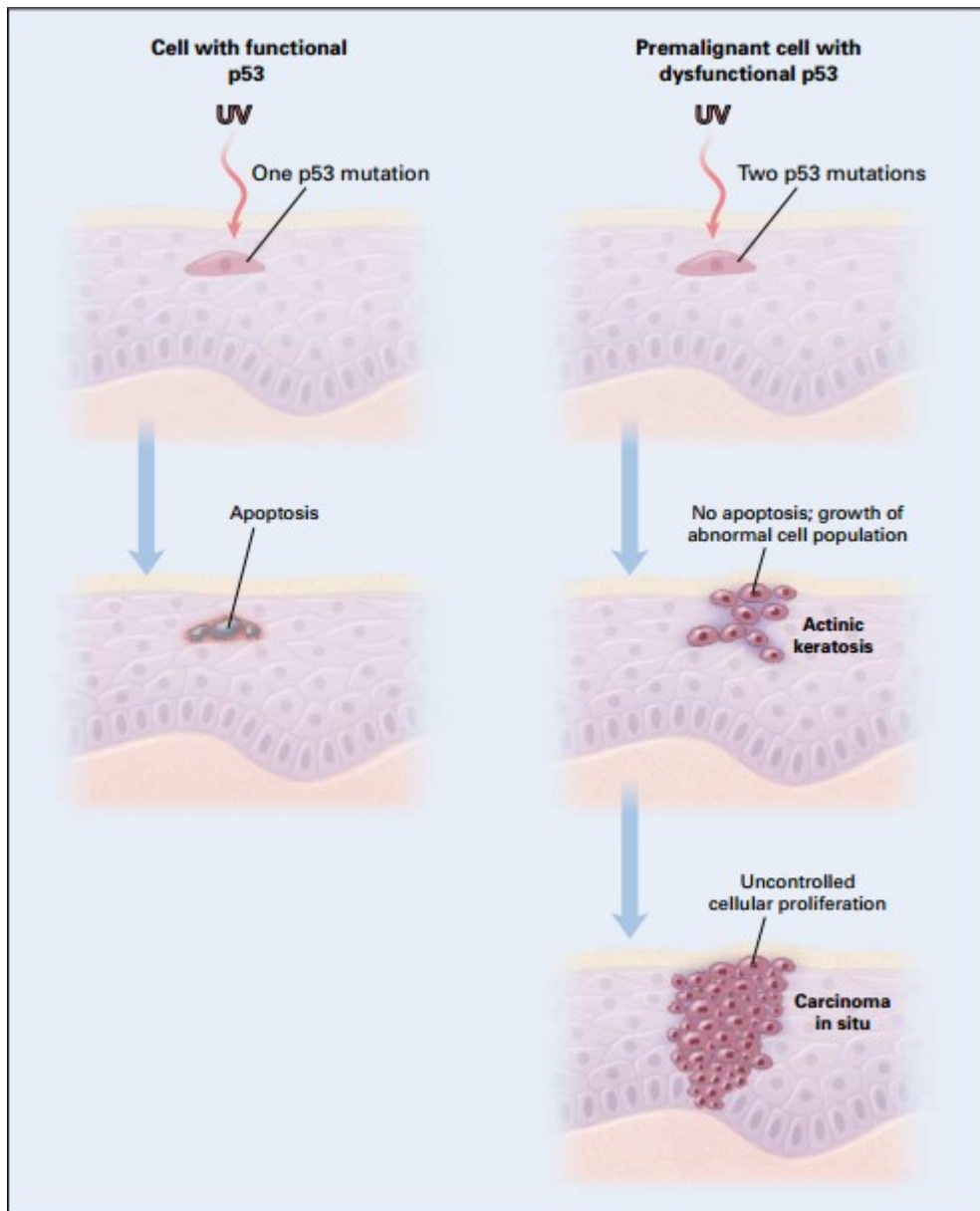
2) Επιδιόρθωση DNA – μεταγραφή της p53 πρωτεΐνης

Η P53 είναι μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ως κεντρικός καταστολέας όγκου, το p53 προστατεύει το γονιδίωμα προκαλώντας μια ποικιλία μηχανισμών αντίδρασης DNA-βλάβης (DDR). Το γονίδιο p53 χαρακτηρίζεται από διάφορους ερευνητές ως “μοριακός φύλακας του γονιδιώματος”. Συμμετέχει ενεργά τόσο στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, όσο και στην απόπτωση(δηλ. προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) των κυττάρων με αλλοιωμένο DNA, ώστε να δοθεί χρόνος στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης για την αποκατάσταση της σταθερότητας του γονιδιώματος. Η ενεργοποίηση του γονιδίου p53 εμφανίζεται μετά από έκθεση του κυττάρου σε ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία, τοξικές ουσίες, έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, και άλλα, καταστάσεις οι οποίες δημιουργούν βλάβες στο DNA του κυττάρου. Με την παρουσία βλάβης στο DNA λοιπόν, το γονίδιο p53 ενεργοποιείται και ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Προκαλεί δηλαδή παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA, με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του, είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση. Η αποτυχία πρόκλησης απόπτωσης είναι πιθανό να οδηγήσει σε ογκογένεση. [113, 114]

Πάνω από το 50% όλων των ανθρώπινων όγκων περιέχουν μεταλλάξεις του *p53* και η απενεργοποίηση αυτού του γονιδίου παίζει καθοριστικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό. Ως παράγοντας μεταγραφής, το *p53* ρυθμίζει την έκφραση πολλών καθοδικών γονιδίων σε κύτταρα που υφίστανται διάφορους τύπους στρες και η δέσμευση DNA είναι κρίσιμη για τη λειτουργία του. [115]



Εικόνα 8 | Ενεργοποίηση του γονιδίου *p53* και προσπάθεια για επιδιόρθωση ή κυτταρικό θάνατο



Εικόνα 9 | Η ακολουθία των γεγονότων που πιστεύεται ότι συμβαίνει μετά από ακτινοβολία υπεριώδων ακτίνων (υπεριώδους ακτινοβολίας) του δέρματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία παράγει ειδικές μεταλλάξεις (τον σχηματισμό διμερών θυμιδίνης) στο γονίδιο καταστολής όγκων p53. Οι μεταβατικές μεταβολές C-to-T σε θέσεις πυριμιδίνης, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών διπλής βάσης CC-to-TT, είναι η πιο συχνή μορφή υποκατάστασης νουκλεοτιδικής βάσης σε αλληλουχίες DNA που έχουν καταστραφεί με υπεριώδη B. Τα κερατινοκύτταρα με μια μετάλλαξη στην p53 μετά την υπεριώδη ακτινοβολία υφίστανται απόπτωση. Αντίθετα, τα κερατινοκύτταρα με δυσλειτουργική p53 και μια επιπλέον μετάλλαξη p53 ως αποτέλεσμα της ακτινοβολίας δεν μπορούν να υποβληθούν σε απόπτωση και να υποστούν κλωνική επέκταση, η οποία εκδηλώνεται κλινικά ως ανάπτυξη ακτινικής

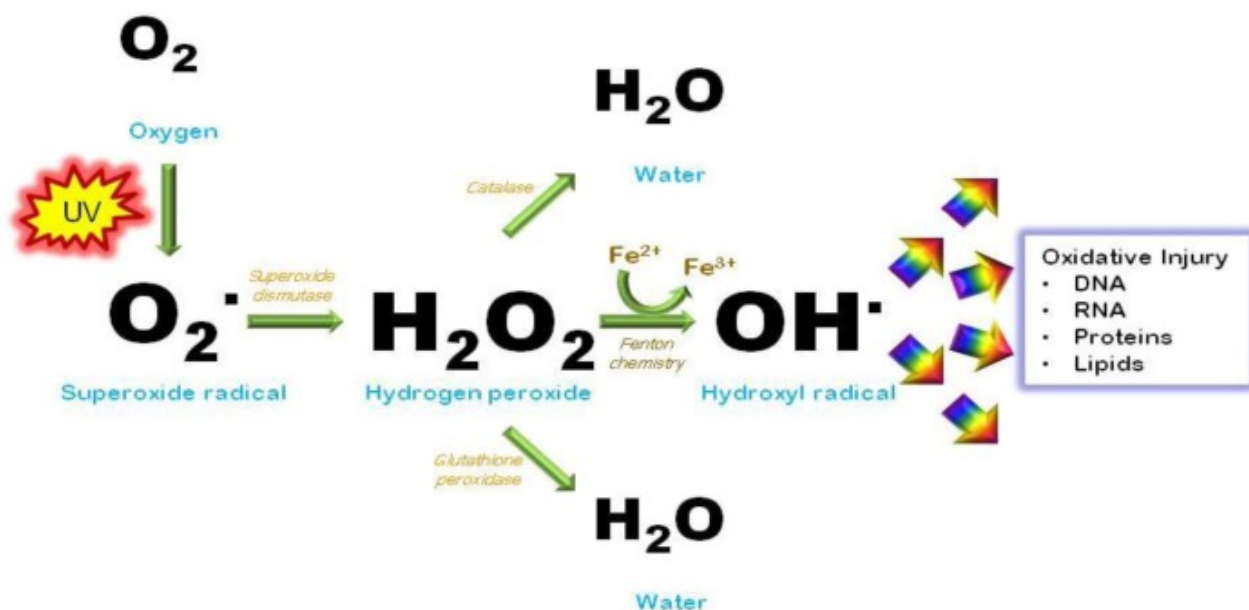
κεράτωσης. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μη φυσιολογικών κυττάρων οδηγεί σε καρκινικό στάδιο πλακώδους-κυττάρου *insitu* και διηθητικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων. [128]

Επιβλαβείς επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας

1) Οξειδωτικός Τραυματισμός

Η ακτινοβολία UV είναι ένας σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που μπορεί να ασκήσει τη βλαπτική δράση της στους ζωντανούς οργανισμούς μέσω απορρόφησης των φωτονίων UV από ενδογενείς ή εξωγενείς φωτοευαίσθητοποιητές. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που με τη σειρά τους μπορούν να τροποποιήσουν αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά βιομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. [116]

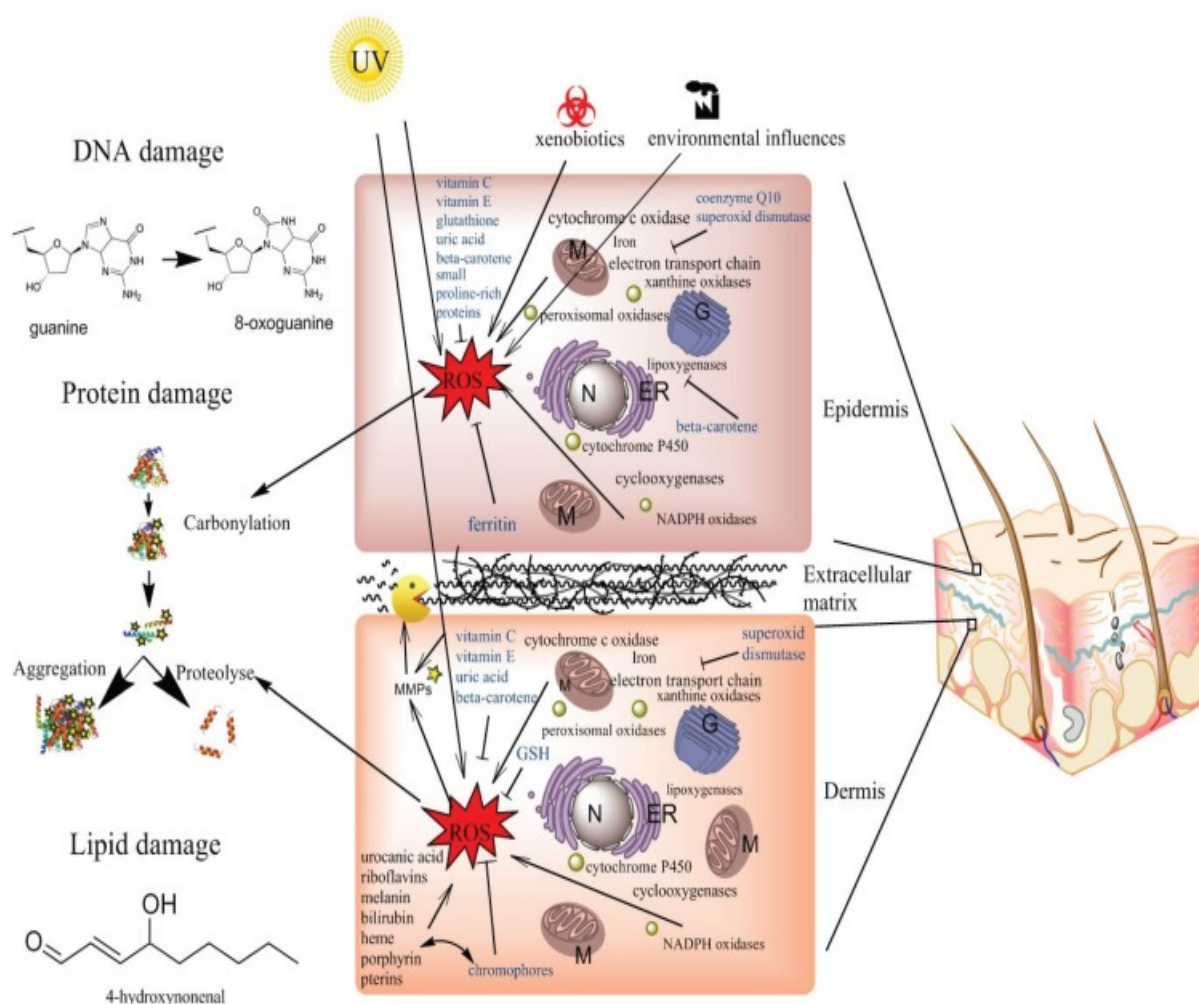
Το οξειδωτικό στρες παίζει κεντρικό ρόλο στην εκκίνηση της κυτταρικής απόκρισης μετά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Το υπεριώδες φως επάγει την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου, υπεροξείδιο (H_2O_2) και ρίζες υδροξυλίου (OH) εντός 15 λεπτών έκθεσης. Αυτά τα βραχύβια μόρια έχουν την ικανότητα να βλάπτουν το DNA, τις πρωτεΐνες και την κυτταρική μεμβράνη μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων που εμφανίζονται στην επιδερμίδα και το χόριο. Επιπλέον, οι ROS ενεργοποιούν τη μήτρα μεταλλοπρωτεϊνών και απελευθερώνουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οδηγώντας τελικά σε υποβάθμιση της κανονικής αρχιτεκτονικής του δέρματος και μειωμένη δερματική λειτουργία. (Εικόνα 10). [109]



Εικόνα 10| Η UV παράγει οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες. Τα υπεριώδη φωτόνια αλληλεπιδρούν με το ατομικό οξυγόνο για να προωθήσουν το σχηματισμό παραγώγων ελευθέρων ριζών, όπως το υπεροξείδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το εξαιρετικά δραστικό υδροξύλιο. Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν με οξύ τρόπο τα μακρομόρια όπως η πρωτεΐνη, τα λιπίδια, το RNA και το DNA, αλλάζοντας τη δομή τους και παρεμβαίνοντας στη λειτουργία τους. Τα αποτοξινωτικά και προστατευτικά ένζυμα όπως δισμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης αποτοξινώνουν και μειώνουν τα επίπεδα των οξειδωτικών ειδών στο κύτταρο.[109]

Τα κύτταρα έχουν επίσης ένα περίπλοκο και εύρωστο δίκτυο αντιοξειδωτικών μορίων που αποτοξινώνουν δραστικά είδη για να αποτρέψουν τις αλλαγές ελευθέρων ριζών στο DNA και σε άλλα μακρομόρια. Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα ολιγοπεπτίδιο αποτελούμενο από τρία αμινοξέα - κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμίνη και είναι από τα πιο σημαντικά κυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια. Δίνοντας ηλεκτρόνια σε άλλα αντιδραστικά μόρια, η GSH λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας για να εξουδετερώσει την αντιδραστικότητα των ελευθέρων ριζών. Στη διαδικασία, η γλουταθειόνη καθίσταται οξειδωμένη αλλά μπορεί να αναχθεί στην βασική της κατάσταση με αναγωγή γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας NADPH ως δότη ηλεκτρονίων και να ανακυκλωθεί. Σε οποιοδήποτε κύτταρο, επομένως, η γλουταθειόνη μπορεί να βρεθεί τόσο σε μειωμένη όσο και σε οξειδωμένη μορφή και

οι ανωμαλίες στην αναλογία μειωμένης σε οξειδωμένη γλουταθειόνη μπορεί να υποδηλώνουν οξειδωτικό στρες, ενώ οι δισμουτάσες υπεροξειδίου (SOD's) απενεργοποιούν τα ανιόντα υπεροξειδίου. Η ρύθμιση αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι μια σημαντική περιοχή έρευνας, καθώς είναι κρίσιμη για τον προσδιορισμό των δερματικών αποκρίσεων στην υπεριώδη ακτινοβολία.[117]



Εικόνα 11 | Αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών πηγών ROS και των αντιοξειδωτικών συστημάτων στο δέρμα. Όλες οι πηγές ROS που αναφέρονται σε αυτό το χειρόγραφο παρουσιάζονται με μαύρα γράμματα: κυτοχρώμα c οξειδάση, ETC (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων), ιόντα σιδήρου, οξειδάση ξανθίνης, υπεροξεισωματικές οξειδάσες, λιποξυγενάσες, κυτοχρώμα P450, κυκλοοξυγενάσες, NADPH οξειδάσες, ακτινοβολία UV, ξενοβιοτικά πολλά χρωμοφόρα που οδηγούν στην ROS. Παραδείγματα αντιοξειδωτικών συστημάτων δίνονται με μπλε γράμματα: βιταμίνη C και E, GSH (γλουταθειόνη), υπεροξειδάσες GSH, ουρικό οξύ, β-καροτένιο, SOD (δισμουτάση υπεροξειδίου),

CoQ10 συνένζυμο Q) και φερριτίνη. Γενικά, πρέπει να αναφερθεί ότι μόνο οι πρωτεΐνες SPRR2 είναι ειδικές για την επιδερμίδα, αλλά η συγκέντρωση των περισσότερων αντιοξειδωτικών είναι πολύ μεγαλύτερη στην επιδερμίδα απ'ότι στο χόριο. Πιθανά αποτελέσματα οξειδωτικής βλάβης στα κύτταρα (βλάβη στο DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια) φαίνονται στην αριστερή πλευρά του σχήματος. (M) σημαίνει μιτοχόνδρια, (ER) για ενδοπλασματικό δίκτυο, (N) για τον πυρήνα και (G) για τη συσκευή Golgi.[117]

2) Βλάβες στο DNA

Εκτός από το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, η υπεριώδης ακτινοβολία επηρεάζει άμεσα το ζευγάρι των νουκλεοτιδικών βάσεων στο DNA. Οι βάσεις πυριμιδίνης είναι ιδιαίτερα ευάλωτες σε χημικές αλλοιώσεις με απορρόφηση της UV ενέργειας. Τα φωτόνια υπεριώδους μήκους κύματος, ιδιαίτερα τα UV-B και UV-C, διασπούν εσωτερικούς 5-6 διπλούς δεσμούς πυριμιδινών. [35] Αυτά τα φωτοχημικά οι αντιδράσεις καταλήγουν κατά κύριο λόγο στην παραγωγή διμερή όπως τα διμερή κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης (CPDs) και (6-4) φωτοπροϊόντα. Και οι δύο τύποι βλαβών συμβαίνουν σε τρεξίματα βάσεων πυριμιδίνης τοποθετημένων στο ίδιο επίπεδο, οι οποίες θεωρούνται "θερμά σημεία" για την επαγόμενη από UVB βλάβη του DNA. Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η ακτινοβολία UVA για το ενδεχόμενο έμμεσης βλάβης του DNA. Φως UVA προκαλεί το σχηματισμό αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) ότι διασυνδέεται το DNA με τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την μονόκλωνη διαλείμματα και αλλοιώσεις βάσεων DNA.[109]

Εκτιμάται ότι αξίζει μιας ημέρας από την έκθεση στον ήλιο οδηγεί σε έως και 10^5 UV που προκαλείται από photolesions σε κάθε κύτταρο του δέρματος. Οι επαγόμενες από υπεριώδες φωτοβολίδες εξασθενίζουν τη μεταγραφή, αναστέλλουν την αναπαραγωγή του DNA και το ζεύγος βάσεων ασυνήθιστα. Προκαλούν χαρακτηριστικές μεταβατικές μεταλλάξεις γνωστές ως "μεταλλάξεις υπογραφής UV", για παράδειγμα, TT → CC. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μηχανισμοί επισκευής DNA ανιχνεύουν και αντικαταστούν αυτά τα διμερή, εμποδίζοντας έτσι τη μετάλλαξη του DNA. Εάν οι βλάβες αυτές δεν επισκευαστούν, προκύπτουν σε μεταβάσεις C → T και CC → TT, οι οποίες αναγνωρίζονται ως "Μεταλλαγές υπογραφής

UVB".[109] Η αφθονία των μεταλλάξεων ρυθμιστικών γονιδίων οφείλεται κυρίως στη UV ακτινοβολία.[35]

3) Φωτογήρανση

Καθώς ο άνθρωπος μεγαλώνει συμβαίνουν όλο και περισσότερες αλλαγές στο δέρμα του, συμπεριλαμβανομένων των μειωμένης επαναφορά, χημική κάθαρση, πάχος επιδερμίδας, θερμορύθμιση, μηχανική προστασία, ανοσολογική απάντηση, παραγωγή σμήγματος και ιδρώτα.[118, 119] Οι αλλαγές αυτές φανερώσουν μία γενική ατροφία με λίγες δομικές αλλαγές μέχρι την ηλικία των 50. Σε αντίθεση η ηλιακή έκθεση στην UV ακτινοβολία συντελεί στην έναρξη ενός καταρράκτη μοριακών και κυτταρικών αντιδράσεων που καταλήγουν σε μία γρήγορη και δυναμική διαταραχή. [120]

Η επίδραση του ηλιακού φωτός στο δέρμα είναι προφανής και υπολογίζεται ότι αποτελεί πάνω από το 90% της ορατής φωτο-γήρανσης, ειδικά στην ομάδα των ανθρώπων που έχουν χαμηλή φωτο-προστασία της επιδερμίδας. [121]

Το ηλιακό φως προκαλεί βλάβες στο δέρμα μέσω φυσιολογικών διαδικασιών. Η UV ακτινοβολία στη δερμίδα προκαλεί μοριακές αλυσιδωτές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της μήτρας των μεταλλοπρωτεϊνών που διεγείρουν τη παραγωγή κολλαγενασών, γελατινισών και στρωμελυσίνης-1 στα κερατινοκύτταρα και στους ινοβλάστες. Με την επαναλαμβανόμενη έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία αυξάνονται οι αποτυχημένες προσπάθειες για τη διόρθωση της δερματικής μήτρας με αθροιστικά αποτελέσματα στη δομή και στην οργάνωση του κολλαγόνου. Μετά από επαναλαμβανόμενες εκθέσεις στη UV, οι αόρατες βλάβες στην επιδιορθωμένη μήτρα της δερμίδας γίνονται ορατές ως δυσχρωμία και ρυτίδες.[122, 123]

4) Κακοήθεις βλάβες

Καρκίνος του δέρματος (θα αναλυθεί παρακάτω)

5) Φλεγμονώδη φαινόμενα και μελάγχρωση

Οι κύριες οξείες κλινικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας στο φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα είναι η φλεγμονή (κόκκινο δέρμα, ερύθημα) και η μελάγχρωση (αυξημένη μελανογένεση). Οι ιστολογικές αλλαγές που ακολουθούν την έκθεση σε UV περιλαμβάνουν την πάχυνση της κεράτινης στιβάδας, της επιδερμίδας και του χορίου, καθώς και ενδοκυττάριο και περιαγγειακό οίδημα στο χόριο και περιαγγειακή διήθηση. Το ηλιακό ερύθημα (έγκαυμα) ποικίλλει από ένα ήπιο κοκκίνισμα έως την εμφάνιση φυσαλίδων. Η βαρύτητά του εξαρτάται από την ένταση και τον χρόνο έκθεσης στον ήλιο καθώς και από τον φωτότυπο του δέρματος. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι αρνητικές συνέπειες των εγκαυμάτων είναι αθροιστικές.

6) Αγγειακές διαταραχές

Η UV ακτινοβολία έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για παθολογική αγγειογένεση.

7) Επίδραση στο Ανοσοποιητικό σύστημα

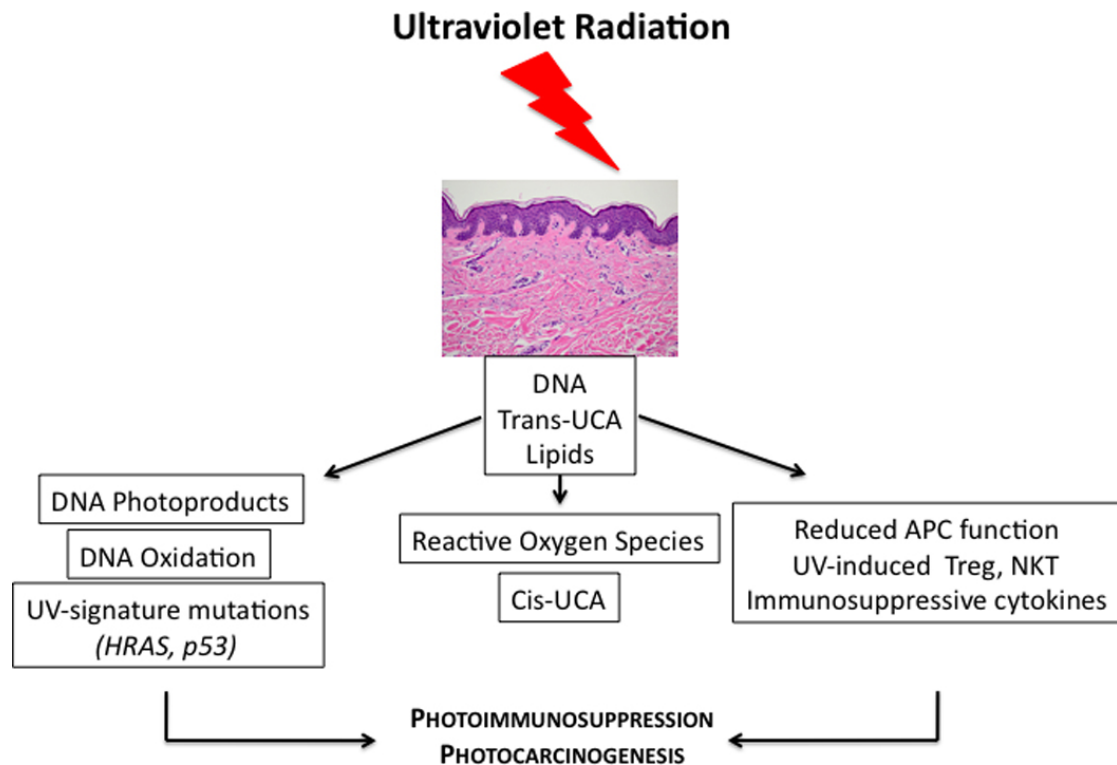
Μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, τα χρωμοφόρα ξεκινούν έναν καταρράκτη που οδηγεί σε ανοσοκαταστολή μέσω διαταραχής της ικανότητας παρουσίασης αντιγόνου των κυττάρων Langerhans. Τα ακτινοβολημένα με UV κύτταρα Langerhans παρουσιάζουν αντιγόνα σε κύτταρα Th2, αλλά αποτυγχάνουν να διεγείρουν Th1 κύτταρα. Ένα υποσύνολο ρυθμιστικών κυττάρων T, ειδικό για το αντιγόνο που παρουσιάζεται μετά από UVR, διεγείρεται επίσης και πολλαπλασιάζεται. Γενικά, η ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό T ρυθμιστικών κυττάρων και λιγότερα τελεστικά T κύτταρα στο δέρμα, αλλάζοντας την ισορροπία από ανοσία που προκαλείται από κύτταρα T με ανοσοκαταστολή. Αυτές και πολλές άλλες αλλαγές στην τοπική ανοσία οδηγούν σε καταστολή της ανοσοποιητικής κατάστασης, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Η καρκινογένεση περιλαμβάνει πολλαπλούς μηχανισμούς που διαταράσσουν την γονιδιωματική ακεραιότητα και ενθαρρύνουν τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό.

Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει έναν αναπόσπαστο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να σταματούν ή να ενισχύουν τη δυσπλασία.[124]

Επιπλέον, αν και ο οργανισμός διαθέτει ένα αμυντικό σύστημα που επιτίθεται στα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, στο οποίο περιλαμβάνονται και τα Τ-λεμφοκύτταρα, αλλά και εξειδικευμένα κύτταρα του χορίου (Langerhans), όταν η υπεριώδης ακτινοβολία επιδράσει στο δέρμα, απελευθερώνονται ειδικές χημικές ουσίες που καταστέλλουν τα κύτταρα αυτά με αποτέλεσμα να υπόκεινται σε πολλές λειτουργικές και μορφολογικές αλλοιώσεις, συνεπάγοντας τη λειτουργική τους ανεπάρκεια.

Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία διεγείρει επίσης τα κερατινοκύτταρα και τα μακροφάγα να παράγουν κυτοκίνες όπως η IL-10, η οποία είναι σημαντική για τη συστηματική ανοσοκαταστολή και χημειοκίνες, που ενεργοποιούν και προσλαμβάνουν λευκοκύτταρα στο δέρμα. Σε μερικά άτομα οι UV προκαλούμενες χημικές αντιδράσεις μπορούν να συνθέσουν νέα αντιγόνα με αποτέλεσμα την πρόκληση φωτοαλλεργίας. Εναλλακτικά, φωτοευαίσθητα μόρια μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα προκαλώντας φωτοτοξικές αντιδράσεις που ομοιάζουν στο ηλιακό έγκαυμα.[125]

Τα χρωμοφόρα που πιστεύεται ότι είναι πιο σημαντικά για την υπεριώδη ακτινοβολία είναι το DNA, τα μεμβρανικά λιπίδια και το τρανς-ουροκανικό οξύ (trans-UCA) που ισομερίζεται σε cis-UCA. Ο προκύπτων συνδυασμός της βλάβης του DNA, την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, και κυτοκίνες συνωμοτεί να μεταλλάξει επιδερμικά κύτταρα και να δημιουργήσει ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που ευνοεί τον σχηματισμό του όγκου και της εξέλιξής του. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12|Μηχανισμοί Ανοσοδιαμόρφωσης και καρκινογένεσης που προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Η υπεριώδης ακτινοβολία απορροφάται από το DNA, το trans-UCA και τα μεμβρανικά λιπίδια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολλαπλές επιδράσεις στο DNA (αριστερή στήλη), παραγωγή διαφόρων χημικών ειδών (μεσαία στήλη) και αλλαγές σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα (δεξιά στήλη). Η παραγωγή φωτοπροϊόντων DNA, cis-UCA, δραστικά είδη οξυγόνου και δραστική βιταμίνη D παράγει μια σειρά πρόσθετων βιολογικών μεσολαβητών που τελικά οδηγούν σε αυξημένη βλάβη του DNA, μεταλλαξογένεση DNA, μειωμένη αποκατάσταση DNA και ανοσοκαταστολή. Αυτοί οι παράγοντες συνηγορούν για την πρόκληση καρκινογένεσης.[125]

Ο αυξημένος κίνδυνος δερματικών καρκίνων σε θεραπευτικά ανοσοκατεσταλμένα άτομα είναι καλά εδραιωμένος, αλλά πρόσφατες ανακαλύψεις υποδεικνύουν άμεσες δράσεις προαγωγής όγκων ορισμένων φαρμάκων, όπως η κυκλοσπορίνη στην ανάπτυξη SCC. Η υπεριώδης ακτινοβολία φαίνεται να έχει διπλά αποτελέσματα στη μεταλλαξογένεση και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.[126]

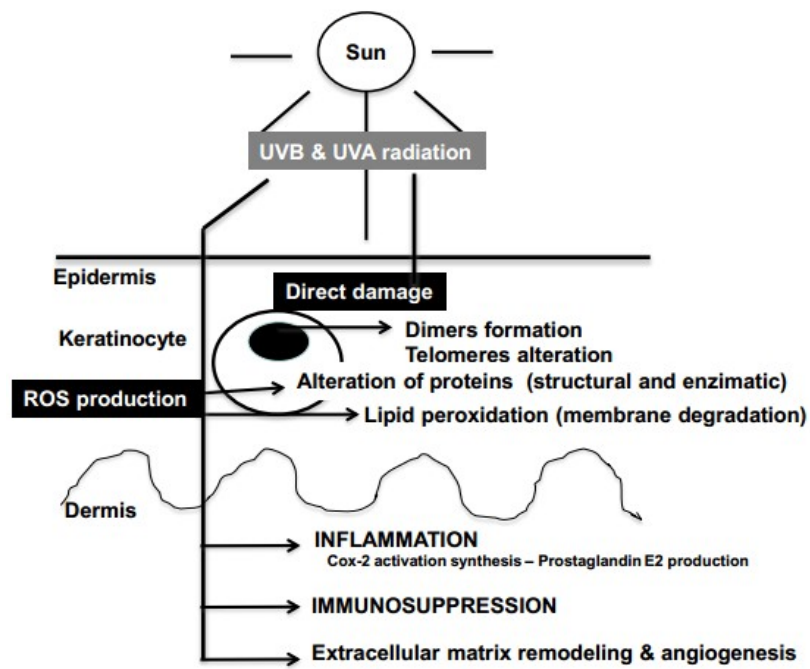
8) Αλλεργικές αντιδράσεις και αντιδράσεις φωτοευαισθησίας

1.2.5 Μηχανισμοί φωτογήρανσης και φωτοκαρκινογένεσης

Η γήρανση είναι μια φυσική διαδικασία που οδηγεί στην προοδευτική φθορά των οργάνων και σε κλινικές και ιστολογικές αλλαγές. Πρωταρχική αιτία είναι η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS και της εξουδετέρωσής τους με φυσικά αντιοξειδωτικά συστήματα, που παράγουν οξειδωτικό στρες. Οι ROS προωθούν την υπεροξείδωση των λιπιδικών συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης, αλλάζουν τη δομή και τη λειτουργία πολλών ενζυματικών συστημάτων και την προώθηση της οξείδωσης των υδατανθράκων. Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι η κυρίαρχη αιτία του οξειδωτικού στρες στο δέρμα και τις ιστολογικές διαφορές μεταξύ της εκτεθειμένης υπεριώδους ακτινοβολίας και μη εκτεθειμένες περιοχές του δέρματος. Το σύνολο των αλλαγών που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία στο εκτεθειμένο δέρμα ονομάζεται φωτογήρανση, ενώ οι αλλαγές από άλλους παράγοντες που συμβάλλουν στη γήρανση, όπως οι μεταβολικές ή ορμονικές, ονομάζονται "χρονολογική" ή "εγγενής" γήρανση [150].

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που προκαλείται από την αλλοίωση ορισμένων γονιδίων, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απώλεια ελέγχου των φυσιολογικών μηχανισμών για την αναστολή αυτής της ανάπτυξης. Η ανάπτυξή του αρχίζει από τις διασταυρώσεις μεταξύ της γενετικής και του περιβάλλοντος, οι οποίες είναι πιο σημαντικές σε ορισμένους τύπους καρκίνου, π.χ. όγκους του δέρματος. Ο κύριος υποστηρικτής του καρκίνου του δέρματος, ο οποίος στηρίζεται στη χρήση του όρου φωτο-καρκινογένεση, είναι η ηλιακή ακτινοβολία, αν και μπορούν να συμβάλουν και άλλοι παράγοντες, όπως ιοί ή χημικά.

Οι μηχανισμοί φωτογήρανσης και φωτοκαρκινογένεσης μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας προκάλεσαν ROS και βλάβη του DNA και προκύπτουσα κυτταρική βλάβη, φλεγμονή, ανοσοκαταστολή και ECM η αναδιαμόρφωση / η αγγειογένεση απεικονίζονται στην Εικόνα 13..

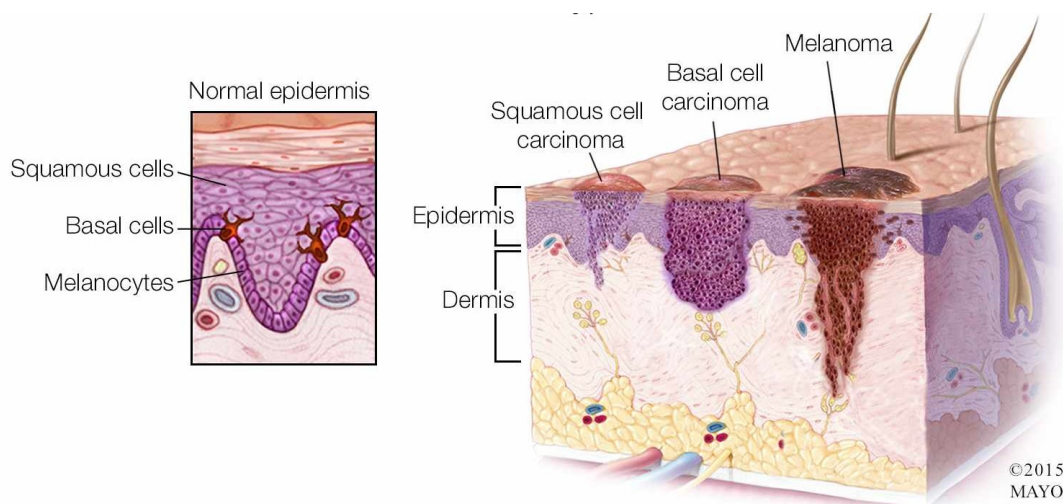


Εικόνα 13| Περίληψη των κυριότερων επιβλαβών επιδράσεων της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα.[150]

1.3 Δερματικοί Καρκίνοι

Η ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει την έναρξη του όγκου, την προώθηση του όγκου και την πρόοδο του όγκου, καταλήγοντας τελικά σε ορατό καρκίνο του δέρματος.

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι καρκίνου του δέρματος: μελάνωμα ή αλλιώς μελανωματικός καρκίνος του δέρματος (MSC), καρκίνωμα βασικών κυττάρων ή βασικοκυτταρικός καρκίνος (BCC) και καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων ή ακανθοκυτταρικός καρκίνος (SCC). Οι BCC και SCC συχνά αναφέρονται ως μη μελανωματικοί καρκίνοι του δέρματος (NMSC). Οι NMSCs είναι σχετικά μη θανατηφόροι και υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση. Το μελάνωμα είναι ο πιο θανατηφόρος καρκίνος του δέρματος. Το ποσοστό επίπτωσής του (αριθμός υποθέσεων) είναι περίπου 1/10 του ποσοστού για το NMSC, αλλά το ποσοστό των νεκρών είναι περίπου 8 φορές υψηλότερο από το NMSC.

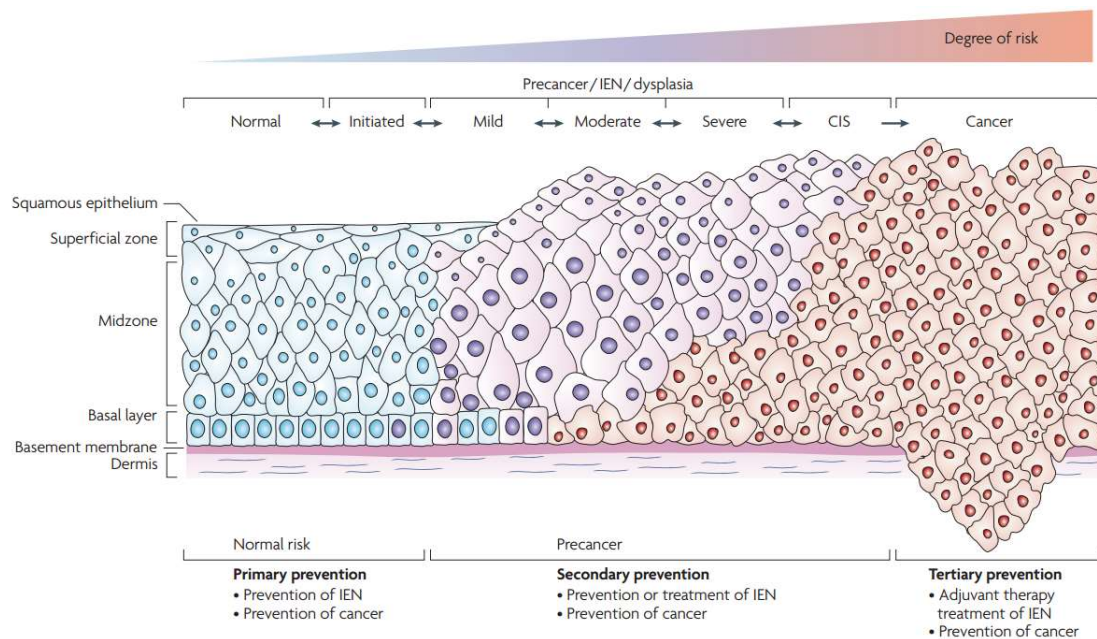


Εικόνα 14 | Τύποι δερματικών καρκίνων

Τα μελανώματα προκύπτουν από μελανοκύτταρα τα οποία βρίσκονται συνήθως στη βασική μεμβράνη με δενδρίτες που εκτείνονται στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα. Μία σημαντική λειτουργία των μελανοκυττάρων είναι η παραγωγή χρωστικών ουσιών. Τα μελανοκύτταρα που περικλείονται από λιπιδική μεμβράνη, ονομάζονται μελανοσώματα, και κατανέμονται σε κερατινοκύτταρα, δίνοντας έτσι διαφορετική απόχρωση των χρωμάτων του δέρματος.

Οι BCCs προκύπτουν από τα βασικά κύτταρα, που βρίσκονται στο βαθύτερο μέρος της επιδερμίδας. Τα βασικά κύτταρα θεωρούνται βλαστοκύτταρα του δέρματος διότι συνεχώς πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν κερατινοκύτταρα τα οποία ωθούνται συνεχώς στην επιφάνεια και τελικά γίνονται το νεκρό στρώμα της κεράτινης στιβάδας. Τα σκουμαρά κύτταρα είναι τα κερατινοκύτταρα, δηλαδή αυτά που ξεκινούν από τα βασικά κύτταρα και διαφοροποιούνται σε πλακώδη κύτταρα. Τόσο τα βασικά κύτταρα όσο και τα πλακώδη κύτταρα ανήκουν στα κερατινοκύτταρα, επομένως μερικές φορές τα BCC και SCC ονομάζονται κερατινοκύτταρα. [143]

Αυτοί οι τρεις τύποι καρκίνου μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά, όμως είναι πολύ διαφορετική από την αιτιολογία έως την εξέλιξη.



Εικόνα 15 |Στάδια σχηματισμού φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά.

1.3.1 Αίτια

Παρόλο που ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκινωμάτων εξαρτάται από γονοτυπικούς, φαινοτυπικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, έχει αποδειχθεί ότι η υπεριώδης (UV) ηλιακή ακτινοβολία είναι ο μεγαλύτερος μεμονωμένος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη τους. [144]

Η χρόνια έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία αποτελεί την κύρια αιτία για τις περισσότερες περιπτώσεις ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Η συχνή χρήση του τεχνητού μαυρίσματος (tanning beds, solarium) επίσης διπλασιάζει τον κίνδυνο του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Οι άνθρωποι οι οποίοι τα χρησιμοποιούν έχουν κατά 2,5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα(SCC), απ' ότι εκείνοι οι οποίοι δεν κάνουν χρήση. Τα τραύματα στο δέρμα αποτελούν επιπλέον πηγή. Ο καρκίνος δύναται να παρουσιασθεί σε εγκαύματα, ουλές, έλκη, χρονίζουσες πληγές και σημεία του δέρματος τα οποία έχουν εκτεθεί είτε σε ακτινοβολία είτε σε συγκεκριμένα χημικά όπως π.χ. αρσενικό και υπο-προϊόντα πετρελαίου.

Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα δύναται να προκληθεί σε χρονίζουσες μολύνσεις όπως και σε ερεθισμένο δέρμα. Επιπλέον, η λοίμωξη από τον ανθρώπινο ιό της ανοσοανεπάρκειας (HIV) και άλλες ασθένειες του ανοσοποιητικού, η χημειοθεραπεία, τα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται στην μεταμόσχευση οργάνων για την αποφυγή απόρριψης ακόμη και η υπερβολική έκθεση στον ήλιο αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα, καθιστώντας το αδύναμο να καταπολεμήσει ασθένειες. Αυτό έχει σαν συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ακανθοκυτταρικών και άλλων καρκίνων του δέρματος.

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται ξαφνικά σε φυσιολογικό, υγιές δέρμα. Μερικοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η προδιάθεση ανάπτυξης αυτών των καρκίνων είναι κληρονομικοί. [144]

1.3.2 Επιπτώσεις UVR σε NMSC

Οι NMSC αναφέρονται σε κακοήθεις μη-μελανωματικές αναπτύξεις που περιλαμβάνουν το δέρμα και τα εξαρτήματά του, και αναφέρονται στα καρκινώματα βασικών κυττάρων (BCC) και πλακωδών κυττάρων (SCC). Η εμφάνισή τους ποικίλλει ανάλογα με τη φυλή και την γεωγραφική περιοχή και εμφανίζεται κυρίως στο κεφάλι, στον αυχένα και σε σημεία που εκτίθενται περισσότερο στη UV ακτινοβολία. Λαμβάνουμε UVR κάθε μέρα και μακροπρόθεσμα η έκθεση σε UV θα οδηγήσει σε φωτογήρανση του δέρματος και ακόμη στην εμφάνιση καλοηθών ή κακοηθών όγκων.

Η προκαλούμενη από UV καρκινογένεση του δέρματος είναι πολύπλοκη και αποτελεί μια συνεχή βιολογική διαδικασία, που προκαλείται από τα διαφορετικά μήκη κύματος της UV. Όπως δηλώθηκε παραπάνω, η UVB μπορεί να απορροφηθεί άμεσα από το DNA και έτσι προκαλεί βλάβη στο DNA και μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση με μεταγωγή ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, που προκαλεί καρκίνο του δέρματος. Με την ακτινοβολία της UVA μπορεί να παραχθούν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες προκαλούν δευτερογενή βλάβη στο DNA και έτσι προκαλούν καρκίνο του δέρματος και συχνά απαιτούν χρόνια σωρευτική έκθεση. Τα κύτταρα είναι σε θέση επιδιόρθωσης, αλλά το DNA μπορεί να επισκευαστεί λάθος λόγω γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων, επομένως, να οδηγήσει σε μεταλλάξεις σε πρωτοογκογονίδια και ακόμη μπορεί να εμφανιστούν γονίδια καταστολής όγκων, τα οποία οδηγούν σε σχηματισμό του όγκου. Η διαφορετική ανοσολογική αντίδραση, που συχνά μειώνεται μετά την έκθεση σε UV και οδηγεί σε ανοσοκαταστολή, η αντιοξειδωτική προστασία, ο ιός ή η γενετική προδιάθεση μπορούν όλοι να συμμετέχουν στον κανονισμό της αποτελεσματικότητας της επισκευής του DNA, επηρεάζοντας έτσι την ογκογένεση σε NMSC.[143]

Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκινώματος κερατινοκυττάρων: [145]

- UV ακτινοβολία (έκθεση στον ήλιο, κρεβάτια μαυρίσματος)
- Ιοντίζουσα ακτινοβολία
- Ανοσοκαταστολή
- Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων

- Κάπνισμα
- Χρόνιες ουλές / φλεγμονή
- Έκθεση σε πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες
- Φωτοθεραπεία με ψωραλένιο (PUVA)
- Φωτοευαισθητοποιητικά φάρμακα (π.χ. φθοροκινολόνες)
- Η κατάποση αρσενικού
- Σύνδρομα
- Xeroderma pigmentosum
- Ο οφθαλμικός αλλογενισμός
- Εξάνθημα σύνδρομο BCC / σύνδρομο Gorlin / βασικό κυττάρου
- Epidermodysplasia verruciformis
- Διατροφική φυσαλιδώδης επιδερμόλυση
- Σύνδρομο Muir-Torre
- KID (κεράτωση, ιχθύωση, κώφωση)
- Αναιμία Fanconi
- Σύνδρομο Rothmund-Thompson
- Σύνδρομο Werner

Κοινά κλινικά χαρακτηριστικά των κερατινοκυττάρων σε καρκίνωμα: [146]

- Μια νέα ταχέως αναπτυσσόμενη βλάβη
- Μια αλλοίωση που αλλάζει σε μέγεθος ή σχήμα
- Μια πληγή μη θεραπευτική

Μη ειδικά χαρακτηριστικά που μπορεί να παρατηρηθούν στην KC:

- Οζώδης ανάπτυξη
- Παράτυπη σύνορα
- Ανύψωση
- Διάβρωση, εξέλκωση, κρούστα
- Αιμορραγία
- Ερύθημα με αιχμηρά περιγράμματα

Χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν την BCC:

- Διαφανής (μαργαριταρένια ή κηρώδη) εμφάνιση
- Telangiectasias (ωραία, στρεβλωμένα σκάφη ορατά κοντά στην επιφάνεια)
- Αυξημένα ("τυλιγμένα") σύνορα
- Χρωστική ουσία χωρίς καθαρό σχέδιο
- Παρουσίαση με ουλές
- Ερύθημα με επιφανειακή διάβρωση

Χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν SCC:[146]

- Προσκολλημένη κλίμακα ή κρούστα
- Δερματικό κέρατο
- Εκτεταμένη διάβρωση του ιστού

1.3.3 Παθοφυσιολογία

Η διαλείπουσα, αναπνευστική έκθεση στον ήλιο, περισσότερο από τη σωρευτική ακτινοβολία UV, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκινώματος βασικών κυττάρων. Το γονίδιο που μεταβάλλεται συχνότερα στο καρκίνωμα των βασικών κυττάρων είναι το γονίδιο PTCH και η δεύτερη πιο κοινή αλλαγή είναι οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο p53.[148] Η πρωτεΐνη p53 σταματά τα κύτταρα με το μεταλλαγμένο ή κατεστραμμένο DNA από την αναπαραγωγή. Εάν το γονίδιο p53 μεταλλαχθεί, τότε η πρωτεΐνη p53 καθίσταται μη λειτουργική και τα κύτταρα με κατεστραμμένο DNA, μπορούν να αναπαράγονται οδηγώντας σε πλακώδες καρκίνωμα. [149] Σε αντίθεση με τη σύνθετη σχέση μεταξύ καρκινώματος βασικών κυττάρων και υπερϊώδους ακτινοβολίας, το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων σχετίζεται με τη σωρευτική δόση της υπερϊώδους ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια ζωής. Η τρέχουσα άποψη ευνοεί την κλωνική επέκταση των κερατινοκυττάρων με μετάλλαξη p53 που προκαλεί προκαρκινικές ακτινικές βλάβες κερατότητας με ελαφρά δυσπλασία που προηγείται περαιτέρω σοβαρής δυσπλασίας και μετασχηματισμού σε διηθητικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων.[148]

1.3.4 Διάδοση

Σε αντίθεση με το καρκίνωμα των βασικών κυττάρων (BCC), το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (SCC) παρουσιάζει σημαντικό κίνδυνο μετάστασης. Ο κίνδυνος μετάστασης είναι υψηλότερος στην SCC που προκύπτει σε ουλές, στα κάτω χείλη ή στο βλεννογόνο και εμφανίζεται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

1.3.5 Κλινική και Ιστοπαθολογική Διάγνωση

Βασικά σημεία

Ιστοπαθολογικοί υπότυποι του καρκίνου του δέρματος των πλακωδών κυττάρων που είναι ευρέως διαφοροποιημένοι με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό περιλαμβάνουν κερατοακάνθη. [147]

Η κλινική εικόνα του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος είναι με μορφή έλκωμένου ογκιδίου. Το ογκίδιο (ή όγκος) αυτό εξέχει από την επιφάνεια του δέρματος, εμφανίζει επιφάνεια ανώμαλη και βλαστική, ερυθρά, είναι σκληρό, ανώδυνο ή ελαφρώς επώδυνο και αιμορραγεί εύκολα. Η βάση του όγκου εμφανίζεται σκληρή λόγω διήθησης. Η σανιδώδης αυτή σκλήρυνση συνήθως ξεπερνά και τα όρια του όγκου.[174]

Αναπτυσσόμενο σχετικά ταχέως, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται συνήθως σαν έλκωση, σχετικώς βαθιά, ακανόνιστη, εμφανίζει πυθμένα ρυπαρό που περιέχει ευκόλως αιμορραγούσες θηλωματώδεις εκβλαστήσεις ή συνηθέστερα λευκά στίγματα. Μετά την πίεση τους εξέρχονται κοκκία ή νημάτια λευκοκίτρινου χρώματος. Αντιστοιχούν σε εστίες κερατινοποίησης του καρκίνου. Τα χείλη που περιβάλλουν την έλκωση είναι σκληρά και διηθημένα, ανεστραμμένα και εμφανίζουν θηλωματώδεις προεκβολές. Συχνά η έλκωση καλύπτεται από εφελκίδα και κάτω από αυτή παρατηρείται ερυθρά και κοκκιωματώδης βάση. Άλλοτε το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζεται σαν υπερυψωμένος εξωφυτικός μυρμηκιάδης όγκος χωρίς τάση να έλκωθεί. Πολλές θεραπευτικές μέθοδοι και τεχνικές έχουν θέση στη θεραπεία των καρκινωμάτων του δέρματος. Η στρατηγική της θεραπείας είναι η εκλογή της πιο ενδεδειγμένης για κάθε περίπτωση.

Τελικός σκοπός πάντοτε είναι η ολοκληρωτική αφαίρεση και καταστροφή του όγκου. Εκτός του πρωταρχικού και κύριου αυτού σκοπού λαμβάνονται υπόψη και άλλες παράμετροι, αυτού καθ' εαυτού του καρκίνου, αλλά και του πάσχοντα, πιθανές επιπλοκές, συνολικό κόστος της θεραπείας, αλλά και το αισθητικό αποτέλεσμα, που δεν πρέπει να θεωρείται αμελητέο.[175]

1.3.6 Θεραπεία

Οι συχνότερες θεραπείες που χρησιμοποιούνται είναι:

1. Χειρουργική αφαίρεση και ιστολογική εξέταση
2. Η τεχνική MOHS και οι τροποποιήσεις της
3. Ακτινοθεραπεία
4. Κρυοθεραπεία
5. Δερμοαπόξεση και διαθερμοπηξία – Lasers
6. Κρυοχειρουργική (κρυοθεραπεία)

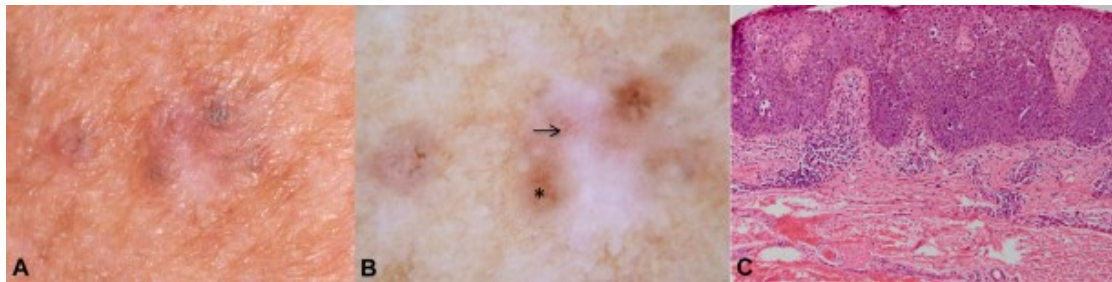
Εκτός από τις κλασικές αυτές θεραπείες υπάρχουν και εναλλακτικά ή πειραματικά θεραπευτικά σχήματα για τους δερματικούς καρκίνους, όπως:

1. Τοπικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες με βεβαίως κάποια όρια στην αποτελεσματικότητα και ασφάλεια των αποτελεσμάτων τους. Έτσι για τη θεραπεία μικρών και επιφανειακών βασικοκυτταρικών καρκίνων έχουν χρησιμοποιηθεί η ποδοφυλλίνη, μεθοτρεξάτη, 5-φλουοουρακίλη και ανάλογα κολχικίνης αλλά και ιντερφερόνης.
2. Φωτοδυναμική θεραπεία
3. Ρετινοειδή
4. Ιμικοϊμόδη
5. Συστηματική χημειοθεραπεία (κυρίως επί μεταστάσεως)

1.3.7 Παράγοντες που συνδέονται με Τοπική Επίδραση και Μετάσταση[147]

Βασικά σημεία

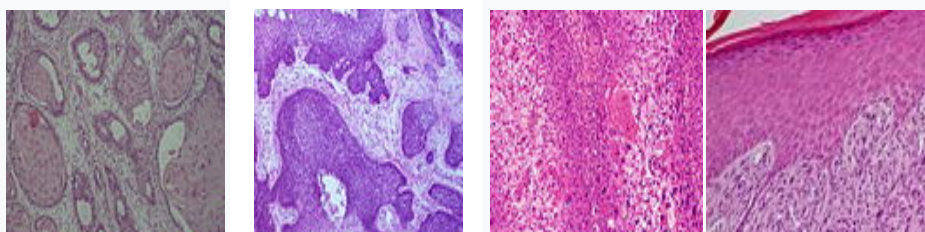
Η διάμετρος του όγκου [2 cm] είναι ο παράγοντας κινδύνου που σχετίζεται περισσότερο με το θάνατο λόγω της ασθένειας.



Εικόνα 16 | Δερματικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων με διακεκομμένα και σπειραματικά αγγεία, Δερματικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων με φουρκέτα και σερπεντινά αγγεία. Φωτογραφίες ευγενική προσφορά του AshfaqA. Marghoob, MD.[151]

Μικροσκοπική εμφάνιση

Το SCC, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, είναι μια ιστολογικά ξεχωριστή μορφή καρκίνου. Προκύπτει από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του επιθηλίου ή από τα κύτταρα που παρουσιάζουν συγκεκριμένα κυτταρολογικά ή ιστοσυγκολλητικά χαρακτηριστικά της διαφοροποίησης των πλακωδών κυττάρων, όπως η παρουσία κερατινών, δεσμών τονοειδούς υλικού ή δεσμοσωμάτων, δομών που εμπλέκονται στην προσκόλληση κυττάρου προς κύτταρο.[151]



Adenoid squamous Basaloid squamous Clear-cell squamous Spindle-cell squamous

cell carcinoma

cell carcinoma

cell carcinoma

1.4 Διαβήτης

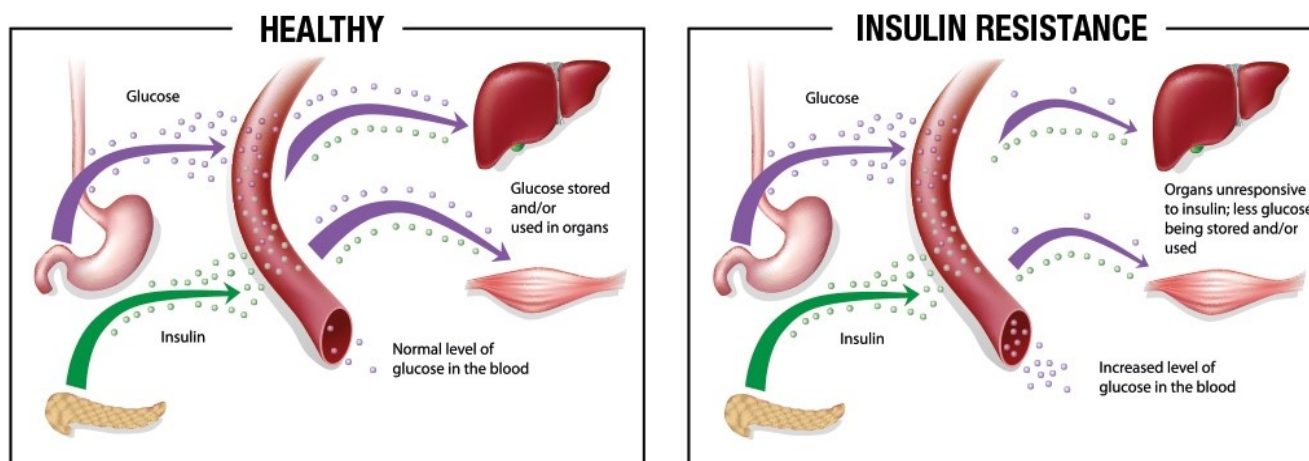
1.4.1 Ινσουλίνη

1.4.1.1 Μεταβολισμός της γλυκόζης

Η ινσουλίνη συντίθεται και εκκρίνεται από τα β κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans που αποτελούν το 65-80% όλων των κυτταρικών νησίδων. Μετά το γεύμα, η ινσουλίνη απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες από εκκριτικά κοκκία και διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης και το μεταβολισμό στο ήπαρ, τους σκελετικούς μύες και το λιπώδη ιστό. Στο ήπαρ, η ινσουλίνη διεγείρει τη γλυκόλυση καθώς και τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκογόνο. Στους σκελετικούς μύες, η ινσουλίνη διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης και το μεταβολισμό καθώς και την αποθήκευση γλυκογόνου ενώ στο λιπώδη ιστό η γλυκόζη μεταβολίζεται μερικώς στο λιπαρό και αποθηκεύεται σε τριγλυκερίδια. Μεταξύ των γευμάτων, όταν η γλυκόζη που προέρχεται από τα τρόφιμα έχει ήδη εξαντληθεί, είναι απαραίτητο να παρέχεται επαρκής ποσότητα γλυκόζης για τον συνεχή μεταβολισμό. Η γλυκόζη απελευθερώνεται από τα ηπατικά καταστήματα γλυκογόνου με τη διαδικασία που αναφέρεται ως γλυκογονόλυση η οποία διεγείρεται από γλυκαγόνο που παράγεται από κύτταρα α των παγκρεατικών νησιδίων. Στη συνέχεια, εάν η νηστεία παραταθεί, τα αποθέματα γλυκογόνου εξαντλούνται και γίνεται επιπλέον προσφορά γλυκόζης από τη γλυκονεογένεση (η παραγωγή γλυκόζης από υποστρώματα όπως γαλακτικό, γλυκερόλη και αμινοξέα). Στο διάστημα μεταξύ γεύματος και νηστείας, η έκκριση ινσουλίνης είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αμέσως μετά το γεύμα, αλλά αυτές οι μικρές ποσότητες ινσουλίνης αναστέλλουν τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ, καθώς και την καταστολή της καταστροφής τριγλυκεριδίων στο αίμα του λιπώδους ιστού. Έτσι, η ινσουλίνη διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της γλυκόζης στο αίμα. [152]

1.4.1.2 Η έκκριση ινσουλίνης και η ρύθμισή της

Η αύξηση της συγκέντρωσης εξωκυτταρικής γλυκόζης είναι το κύριο ερέθισμα για την απελευθέρωση ινσουλίνης. Η γλυκόζη μεταφέρεται στα παγκρεατικά β κύτταρα με ανεξάρτητο τρόπο από την ινσουλίνη και ο μεταβολισμός της έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου ATP / ADP που οδηγεί στην αναστολή των διαύλων καλίου ATP (KATP) στη μεμβράνη του πλάσματος. Η αναστολή των καναλιών KATP έχει ως αποτέλεσμα την αποπόλωση της μεμβράνης, το άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου εξαρτώμενων από τάση τύπου L (L-VDCC) και εισροή Ca^{2+} + η οποία πυροδοτεί τη συγχώνευση των εκκριτικών κοκκίων που περιέχουν ινσουλίνη με τη μεμβράνη πλάσματος [10]. Επιπλέον, πολλοί άλλοι μηχανισμοί ρυθμίζουν την έκκριση ινσουλίνης. Μετά την κατάποση του γεύματος, δύο γαστρεντερικές ορμόνες, GLP-1 και εξαρτώμενες από τη γλυκόζη με ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο (GIP), εκκρίνονται από τα κύτταρα εντεροχρωμαφίνης L και K, αντίστοιχα. Αυτά τα πεπτίδια, επίσης αναφερόμενα ως κρεατίνες, διεγείρουν τους GLP-1 και GIP υποδοχείς συζευγμένους με αδενυλική κυκλάση και αυξάνουν την έκκριση ινσουλίνης αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού cAMP στα β κύτταρα. Η έκκριση ινσουλίνης διεγείρεται επίσης από την μακρά αλυσίδα που προέρχεται από την τροφή με λιπαρά οξέα που δεσμεύονται σε συγκεκριμένους συζευγμένους υποδοχείς με πρωτεΐνη G στα β κύτταρα. Αυτονόμως, το νευρικό σύστημα το οποίο αναστέλλει τις παγκρεατικές νησίδες ρυθμίζει επίσης την έκκριση ινσουλίνης. Πιο συγκεκριμένα, η ακετυλοχολίνη που απελευθερώνεται από τις παρασυμπαθητικές απολήξεις, διεγείρει την απελευθέρωση της ινσουλίνης μέσω των μουσκαρινικών υποδοχέων M3 ενώ η νορεπινεφρίνη απελευθερώνεται από το συμπαθητικό όπου οι καταλήξεις καταστέλλουν την έκκριση ινσουλίνης ενεργοποιώντας τους α_2 αδρενεργικούς υποδοχείς, αν και αυτό το αποτέλεσμα αντισταθμίζεται εν μέρει από το αντίθετο διεγερτικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης β_2 αδρενεργικού υποδοχέα.[152]



Εικόνα 17|Σχηματική απεικόνιση δημιουργίας αντίστασης ινσουλίνης

1.4.1.3 Σηματοδότηση ινσουλίνης

Η επίδραση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους ξεκινά με σύνδεση με τη συγκεκριμένη μεμβράνη πλάσματος υποδοχέα ινσουλίνης (IR) που αποτελείται από δύο α -συνδέουσες ορμόνες και δύο β -υπομονάδες τελεστές. Η δέσμευση της ινσουλίνης με την α υπομονάδα επάγει αλλαγές διαμόρφωσης της β υπομονάδας και ενεργοποίηση της εγγενής περιοχής της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει επίσης τον ίδιο τον υποδοχέα ως οικογένεια υποστρωμάτων υποδοχέα ινσουλίνης (IRS) στα αντίστοιχα υπολείμματα τυροσίνης. Τα φωσφορυλιωμένα IRS-1 και / ή IRS-2 προσλαμβάνουν και ενεργοποιούν την 3-κινάση φωσφοϊνοσιτιδής (PI3K) που φωσφορυλιώνει 4,5-διφωσφορικό φωσφατιδυλινοσιτόλη σε φωσφατιδυλινοσιτόλη 3,4,5-τριφωσφορικό (PIP3). Η PIP3 ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίνη κινάση-1 και -2 η οποία φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν πρωτεϊνική κινάση Akt. Η φωσφορυλιωμένη Akt διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο διεγείροντας την ενσωμάτωση του μεταφορέα γλυκόζης-4 (GLUT4) στη μεμβράνη πλάσματος και πρόσληψη γλυκόζης από ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς. Επιπλέον, το Akt διεγείρει άλλα ένζυμα όπως γλυκογόνο κινάση συνθάσης-3 (GSK-3), στόχος θηλαστικών ραπαμκίνης (mTOR) καθώς και παράγοντες μεταγραφής όπως FOXO1 και πρωτεΐνη-1c που δεσμεύει ρυθμιστικό στοιχείο στερόλης (SREBP-1c) που είναι σημαντική για τη σηματοδότηση της ινσουλίνης.[152]

1.4.2 Ταξινόμηση και παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μία μεταβολική διαταραχή πολλαπλής αιτιολογίας, που χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης είτε ως αποτέλεσμα της ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη.

Ένας ασθενής χαρακτηρίζεται διαβητικός όταν έχει ένα από τα ακόλουθα αποτελέσματα εργαστηριακών εξετάσεων:

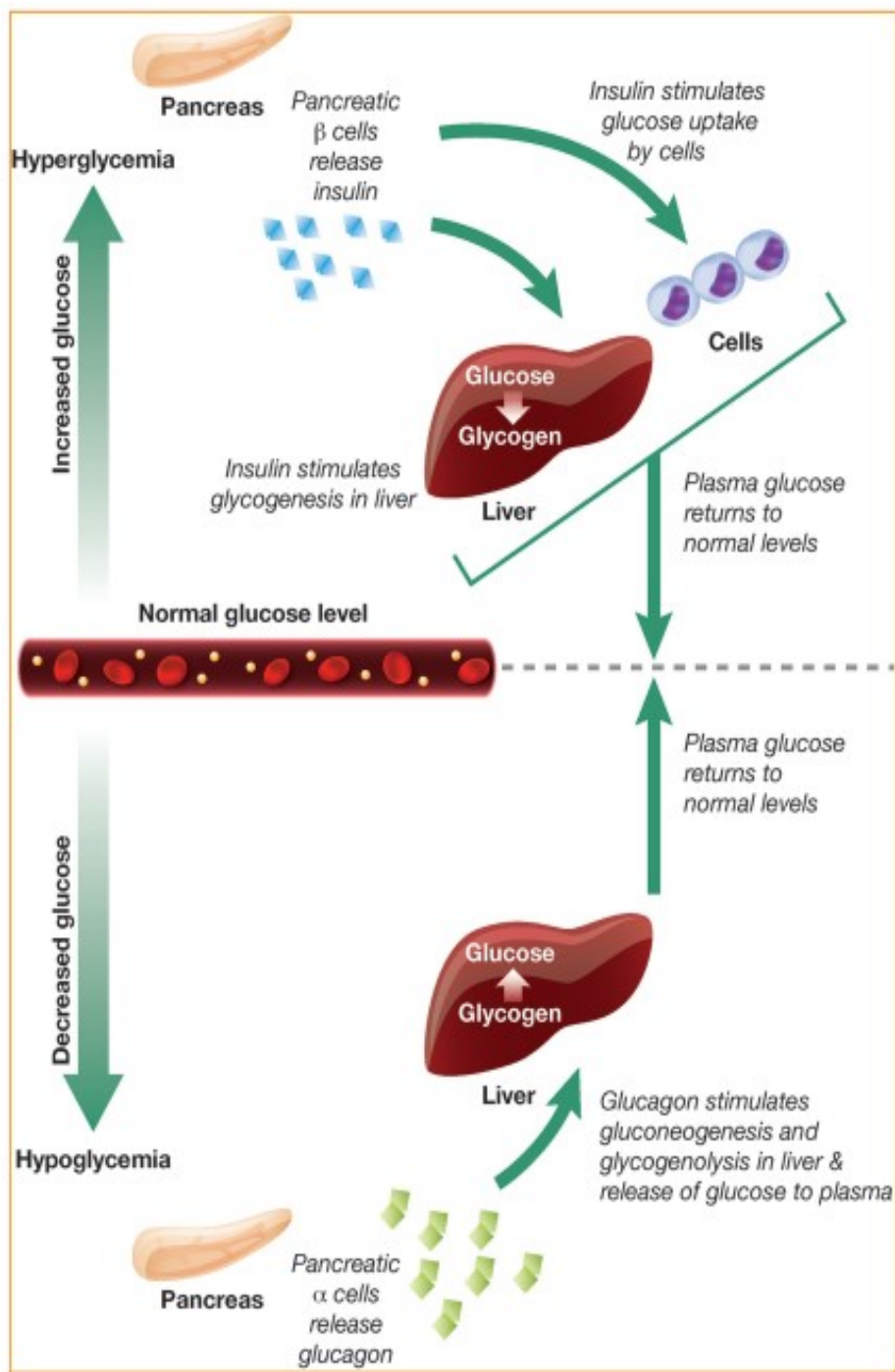
- Τιμή γλυκόζης νηστείας μετά από νηστεία 8-12 ωρών ≥ 126 mg/dL
- Τυχαία τιμή γλυκόζης ≥ 200 mg/dL και κλινικά συμπτώματα διαβήτη
- Τιμή γλυκόζης ≥ 200 mg/dL δύο ώρες μετά από χορήγηση γλυκόζης (καμπύλη γλυκόζης)
- Τιμή γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης $\geq 6,5\%$

Η πάθηση, κατά την οποία τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος είναι υψηλότερα από τα φυσιολογικά, αλλά όχι αρκετά υψηλά ώστε να διαγνωστεί διαβήτης, ονομάζεται προδιαβήτης. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος, μετά την κατανάλωση κάποιου γεύματος, οφείλονται σε διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη [ΔΑΓ], ενώ τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος, μετά την παρέλευση 8 ή περισσότερων ωρών από την τελευταία κατανάλωση τροφής, ονομάζονται διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας [ΔΓΝ]. Ο προδιαβήτης αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη Τύπου 2. Ο προδιαβήτης σχετίζεται με την παχυσαρκία (ιδιαίτερα γύρω από την κοιλιακή χώρα ή τα εσωτερικά όργανα), με μη φυσιολογική ποσότητα χοληστερόλης, και/ή λίπους στο αίμα (γνωστή ως δυσλιπιδαιμία), και με την υψηλή πίεση αίματος.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη, ο τύπου 1 και ο τύπου 2, που περιλαμβάνουν 10-15% και 85-90% του διαβητικού πληθυσμού, αντίστοιχα. Ο τύπος 1 (T1DM) ξεκινάει από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων που προκαλούνται από εξωγενή (ιική μόλυνση) ή ενδογενή (αντιδραστικό οξυγόνο είδη, κυτοκίνες) παράγοντα. Ο T1DM σχετίζεται με την ταχεία ανάπτυξη πλήρους ή σχεδόν πλήρους έλλειψης ινσουλίνης, που συχνά οδηγεί σε οξεία κετοξέωση ήδη στην αρχή της η ασθένειας. Εκτός από τη γενετική προδιάθεση, περιβαλλοντικοί παράγοντες

συμβάλλουν στο T1DM, κάτι που εξηγεί την αυξανόμενη επικράτηση της νόσου τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε αυτούς, την παχυσαρκία / αντίσταση στην ινσουλίνη σε παιδιά και εφήβους, αλλοιώσεις στο μικροβιακό έντερο, ανεπάρκεια βιταμίνης D, πρόωρη διακοπή σίτισης του μαστού, τις περιβαλλοντικές τοξίνες όπως τα νιτρικά, τα νιτρώδη και τις νιτροζαμίνες κ.α.

Σε αντίθεση με το T1DM, που είναι η νόσος που ξεκίνησε νωρίς, ο διαβήτης τύπου 2 εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 30 ετών και συχνά συνδέεται με την παχυσαρκία, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.[152]

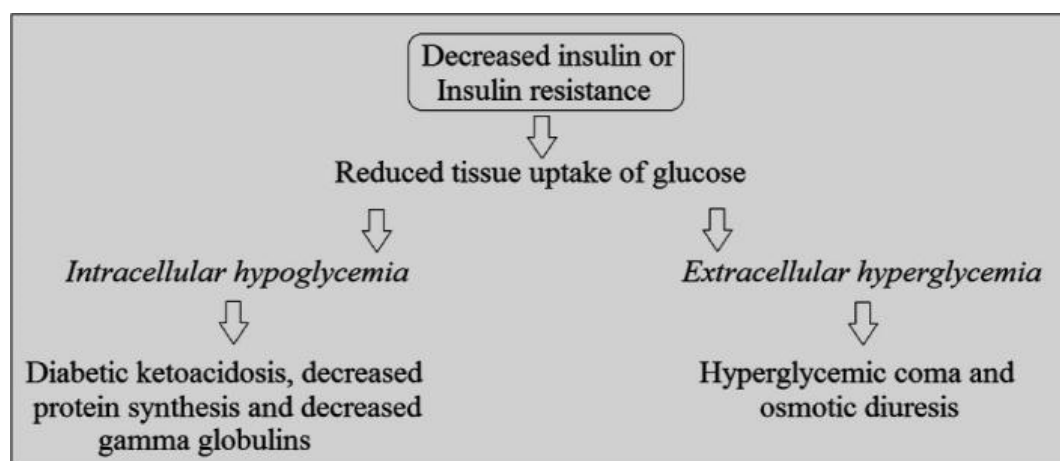


Εικόνα 18| Ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης αίματος από γλυκογόνο και ινσουλίνη σε υγιή άτομα. Σε υγιή άτομα, το γλυκογόνο και η ινσουλίνη συνεργάζονται για να διατηρήσουν τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα. Κατά τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας, τα παγκρεατικά βήτα (b) κύτταρα απελευθερώνουν ινσουλίνη, η οποία διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης από την κατανάλωση ενέργειας κυττάρων και το σχηματισμό γλυκογόνου στο ήπαρ. Κατά τη διάρκεια της υπογλυκαιμίας, τα παγκρεατικά άλφα (a) κύτταρα απελευθερώνουν γλυκογόνο, το οποίο διεγείρει τη

γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ και την απελευθέρωση της γλυκόζης στο πλάσμα.[153]

1.4.3 Παθοφυσιολογία του διαβήτη

Κάθε φορά που κάποιος παίρνει το γεύμα, υπάρχει αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα που διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταφοράς, τη βιομετατροπή και την αποθήκευση στους μυς και τους λιπώδεις ιστούς. Σε συνθήκες νηστείας, η γλυκόζη στο αίμα παρέχεται από το ήπαρ που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, χωρίς καμία εξάρτηση από την ινσουλίνη. Εκτός από την αποθήκευση γλυκόζης, η ινσουλίνη αναστέλλει επίσης την έκκριση της γλυκαγόνης και μειώνει τη συγκέντρωση λιπαρών οξέων στον ορό που οδηγεί σε μείωση της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ. Η ανεπαρκής ινσουλίνη ή η αντίσταση στην ινσουλίνη στο σώμα οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης στο ιστό που έχει ως αποτέλεσμα ενδοκυτταρική υπογλυκαιμία και εξωκυτταρική υπεργλυκαιμία. Η ενδοκυτταρική υπογλυκαιμία προκαλεί τη γλυκογένεση και τη γλυκονεογένεση που οδηγεί σε διάσπαση των λιπών (προκαλώντας διαβητική κετοξέωση) και μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση και τις γάμμα σφαιρίνες (προκαλώντας καχεξία, πολυφαγία και εξασθενισμένη επούλωση τραυμάτων), ενώ η εξωκυτταρική υπεργλυκαιμία οδηγεί σε υπεργλυκαιμικό κώμα και οσμωτική διάσταση (Εικόνα 19).[160]



Εικόνα 19 |Επιπτώσεις της μείωσης ή αντίστασης ινσουλίνης [160]

1.4.4 Επιπλοκές του διαβήτη

Ο διαβήτης είναι μια διαταραχή κατά την οποία οι ασθενείς βρίσκονται ανά πάσα στιγμή σε κίνδυνο επιπλοκών. Οι επιπλοκές μπορεί να είναι μακροαγγειακές (στεφανιαία καρδιακή νόσος, περιφερική αγγειακή νόσος και εγκεφαλικό επεισόδιο), μικροαγγειακές (νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια και νεφροπάθεια) και μικρο- και μακροαγγειακό (διαβητικό πόδι). Η θνησιμότητα και η νοσηρότητα του διαβήτη σχετίζονται περισσότερο με τον μακροαγγειακό εκφυλισμό σε σύγκριση με τους κινδύνους μικροαγγειακών επιπλοκών στους ηλικιωμένους. Γενικά, οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες:

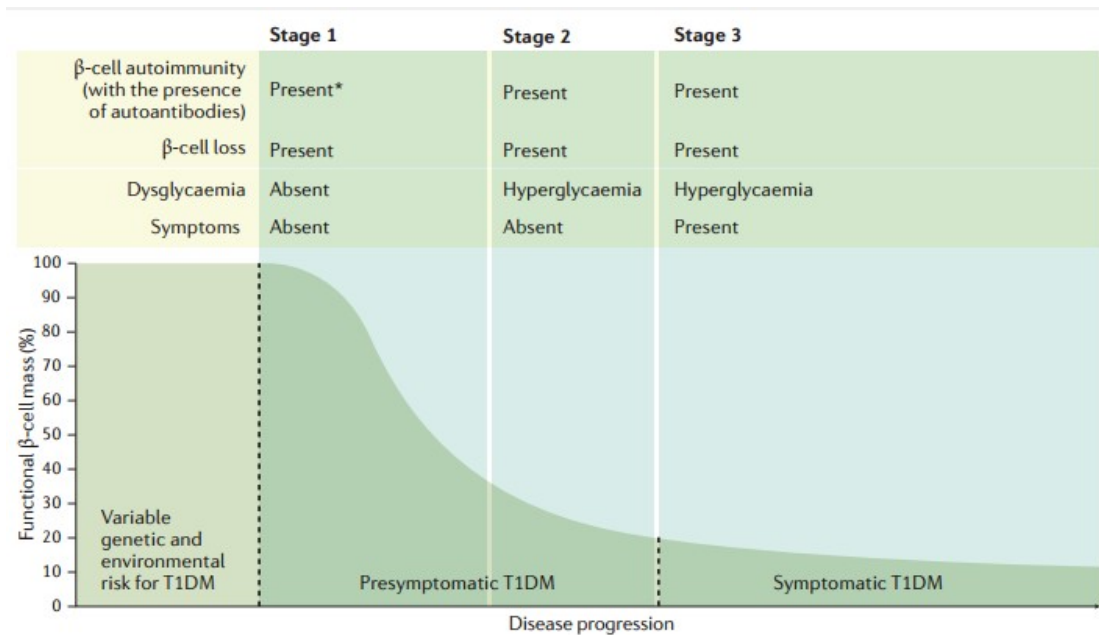
1)Μεταβολικές οξείες επιπλοκές: Αυτές είναι βραχυπρόθεσμες και περιλαμβάνουν υπογλυκαιμία, κετοξέωση και υπεροσμωτικό μη κετονικό κώμα.

2)Συστηματικές καθυστερημένες επιπλοκές: Πρόκειται για χρόνιες χρόνιες επιπλοκές που περιλαμβάνουν διαβητική νεφροπάθεια, μικροαγγειοπάθεια, διαβητική νευρο- και αμφιβληστροειδοπάθεια, αθηροσκλήρωση και λοιμώξεις. [160]

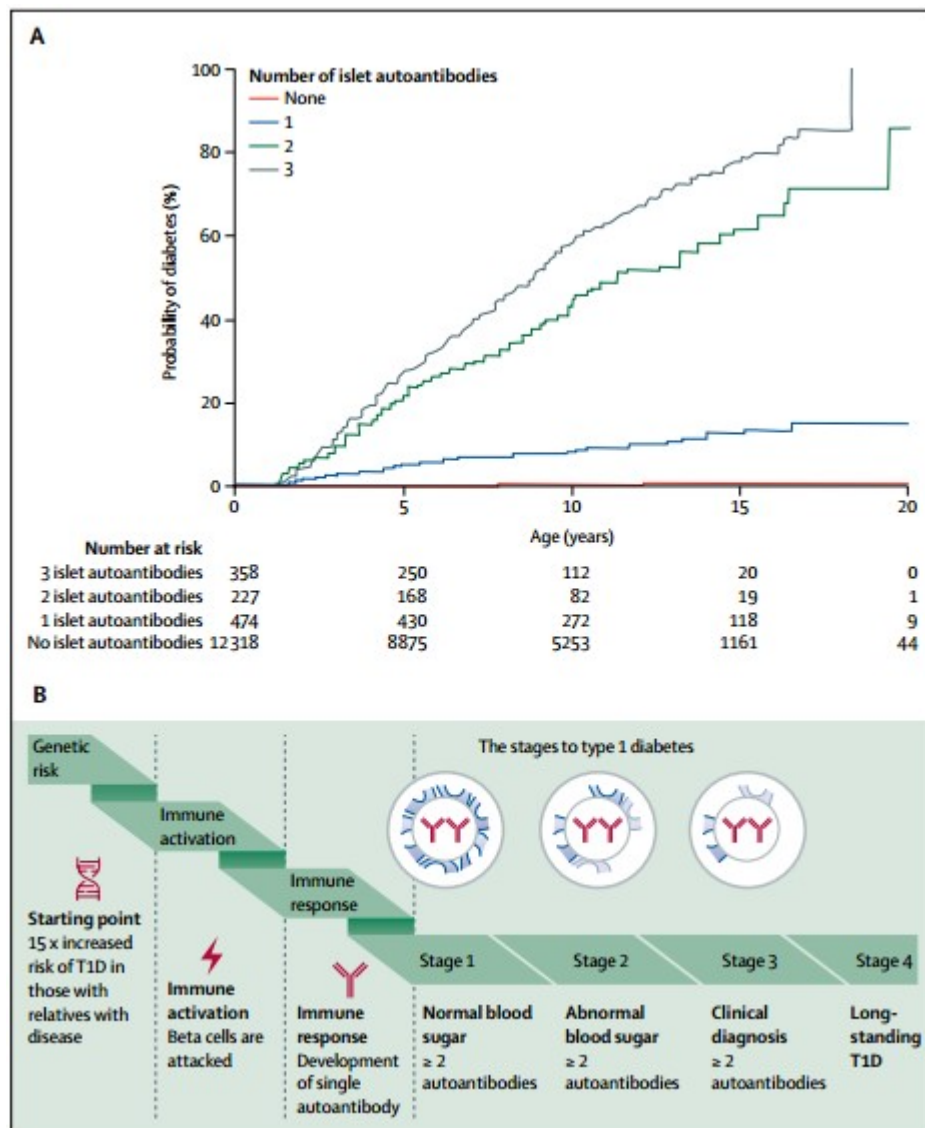
1.4.5 Είδη Διαβήτη

1.4.5.1 Διαβήτης Τύπου 1

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (T1DM) είναι μια χρόνια ασθένεια. Η παθογένεση του T1DM μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια ανάλογα με την απουσία ή παρουσία συμπτωμάτων υπεργλυκαιμίας (όπως πολυουρία και δίψα).[155]

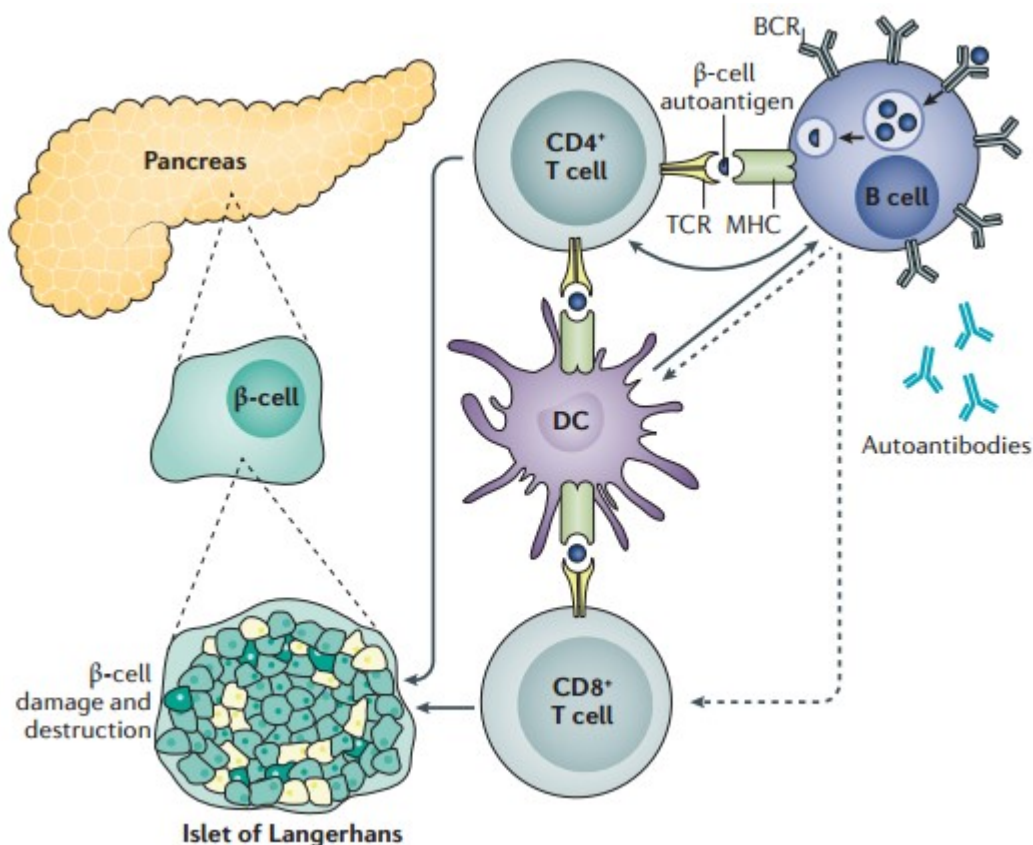


Εικόνα 20| Σταδιοποίηση του T1DM. Κλασικά, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (T1DM) ταξινομείται είτε ως προ-συστηματικός T1DM, η οποία χαρακτηρίζεται από μείωση της μάζας των β -κυττάρων χωρίς συμπτώματα ή συμπτωματικός T1DM, με βάση τα συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας (όπως η πολυουρία, η δίψα, η πείνα και η απώλεια βάρους). Εναλλακτικά, μπορεί να είναι το T1DM υποδιαιρείται σε τρία στάδια: το στάδιο 1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων και την απουσία δυσγλυκαιμίας. Το στάδιο 2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία τόσο αυτοαντισωμάτων όσο και δυσγλυκαιμίας. και τα συμπτώματα εμφανίζονται μόνο στο στάδιο 3, που αντιστοιχεί σε συμπτωματικό T1DM. Οι προσπάθειες κατάστασης του αυτοάνοσου T1DM είναι χρήσιμες κατά την εγγραφή ατόμων σε δοκιμές δευτερογενούς πρόληψης. Αυτοανοσία που κατευθύνεται από β -κύτταρα, χαρακτηριζόμενη από την παρουσία αυτοαντισωμάτων που στοχεύουν β -κύτταρα, υπάρχει συνήθως μήνες έως χρόνια πριν από την έναρξη της απώλειας των β -κυττάρων.[156]

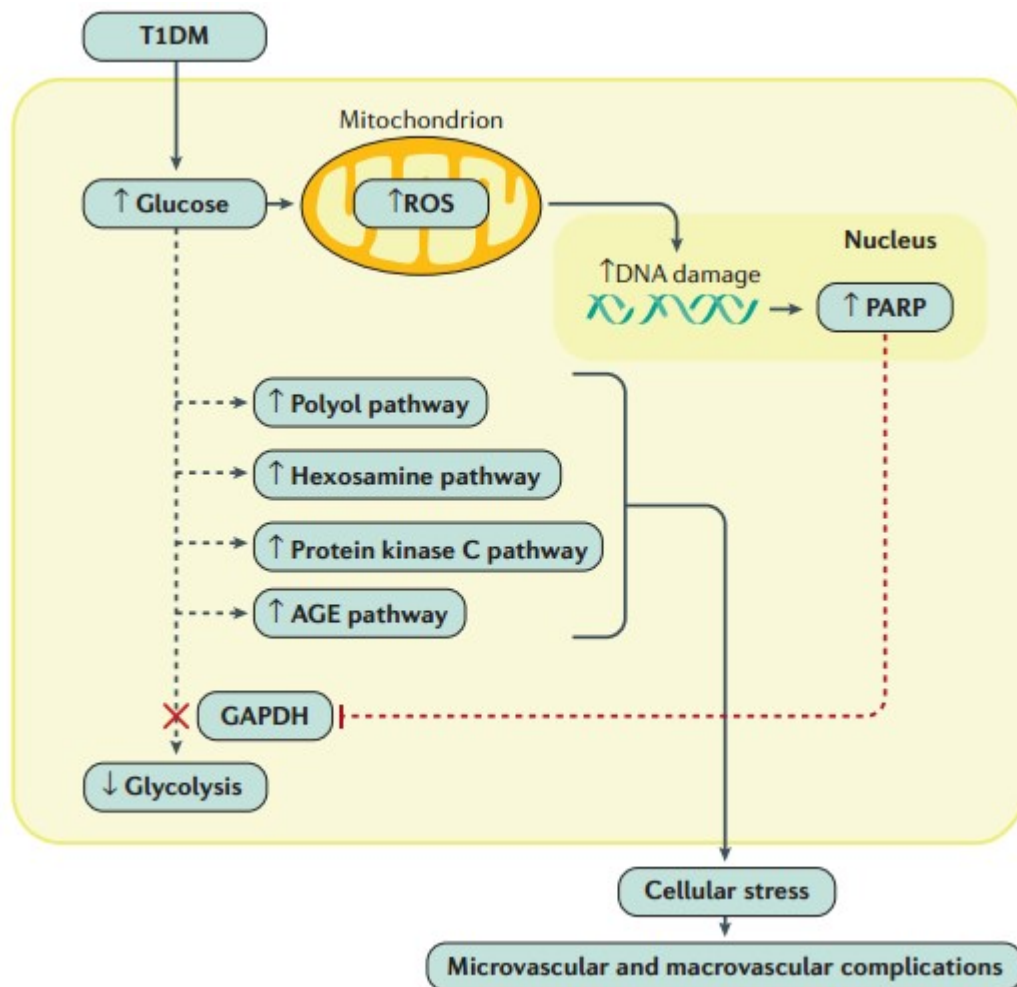


Εικόνα 21|Τα στάδια του διαβήτη τύπου Ι. [156]

Παθογένεια διαβήτη τύπου I



Εικόνα 22| Παθογένεση του T1DM. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (T1DM) είναι μια ασθένεια που δεν έχει υποστεί ανοσοποίηση. Τα ενεργοποιημένα B κύτταρα αλληλεπιδρούν με T κύτταρα CD4 + και CD8 +, καθώς επίσης δενδριτικά κύτταρα (DCs). Η παρουσία αντιγόνου από B κύτταρα και DCs καθοδηγεί την ενεργοποίηση των T κυττάρων που είναι ειδικά για β-κύτταρα. Επιπλέον, η έκθεση των B κυττάρων στα αυτοαντιγόνα β-κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων στόχευσης νησίδων, τα οποία χρησιμεύουν ως βιοδείκτες της ασυμπτωματικής νόσου. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων B και CD8 + T κύτταρα και μεταξύ B κυττάρων και DCs. BCR, υποδοχέα B κυττάρων. TCR, υποδοχέα κυττάρων T.[156]



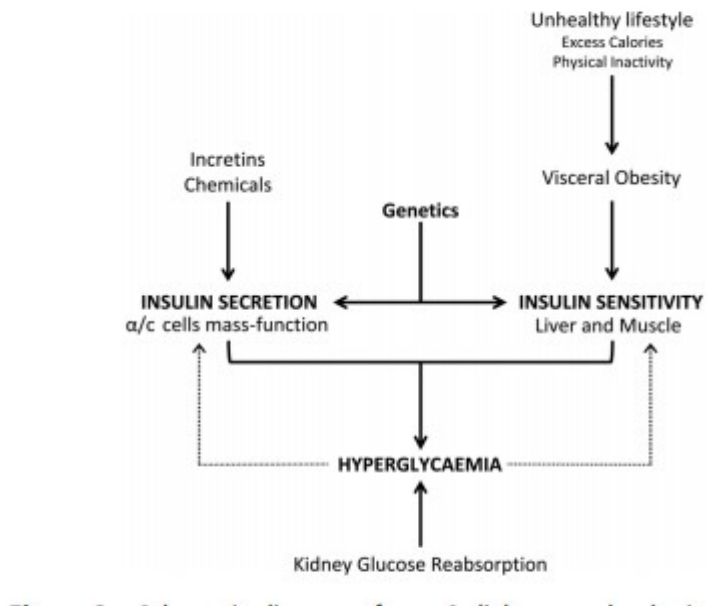
Εικόνα 23 | Μηχανισμοί της προκαλούμενης από υπεργλυκαιμία κυτταρικής βλάβης. Μια αύξηση στα ενδοκυτταρικά επίπεδα γλυκόζης οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και στην αυξημένη παραγωγή των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), τα οποία έχουν πολλά αποτελέσματα, όπως προκαλούν τον κλώνο DNA φρένα. Η βλάβη του DNA ενεργοποιεί την (ADP-ριβόζη) πολυμεράση (PARP), η οποία στη συνέχεια παράγει πολυμερή της ADP-ριβόζης. Αυτά τα πολυμερή προσκολλώνται και τροποποιούν τη δραστηριότητα του γλυκεραλδεϋδο-3-αφυδρογονάση (GAPDH). Η παρεμπόδιση του GAPDH οδηγεί σε συμφόρηση γλυκόλυση, έτσι ώστε τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα να εκτρέπονται σε παθογενετική σηματοδότηση μονοπάτια (διακεκομμένα βέλη). Η υπεργλυκαιμία παρεμποδίζει τη γλυκόλυση και την επακόλουθη η συσσώρευση γλυκολυτικών ενδιάμεσων αδρανοποιεί επίσης δύο ένζυμα που έχουν αντι-αθηροσκληρωτικά αποτελέσματα: συγκεκριμένα, η συνθετάση ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου και η προστακυκλίνη συνθάση. [156]

Συνοπτικά, σε ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (IDDM) υπάρχει ανεπάρκεια έκκρισης ινσουλίνης λόγω της αυτοάνοσης καταστροφής β-παγκρεατικών κυττάρων που οδηγεί σε μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με IDDM. Το τελικό στάδιο της καταστροφής των β-κυττάρων αντιπροσωπεύει την εμφάνιση κλινικής νόσου που οδηγεί σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 στον οποίο υπάρχουν διεισδυτικά μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και ένα μίγμα ψευδοατροφικών νησίδων με μερικά κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη, γλυκογόνο και παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Η αυτοανοσία, η γενετική σύνθεση και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για την καταστροφή κυττάρων νησιδίων. [160]

1.4.5.2 Διαβήτης Τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% των ασθενών με διαβήτη και οδηγεί σε μικροαγγειακές και μακροαγγειακές διαταραχές επιπλοκές που προκαλούν βαθιά ψυχολογική και σωματική δυσφορία τόσο στους ασθενείς όσο και στους φροντιστές και θέτουν ένα τεράστιο επιβάρυνση των συστημάτων υγειονομικής περίθαλψης. Η καρδιαγγειακή νόσος είναι η μεγαλύτερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας που συνδέονται με διαβήτη τύπου 2 και χρειάζεται εντατική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 τη συγκέντρωση γλυκόζης και λιπιδίων καθώς και την αρτηριακή πίεση για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου επιπλοκών και ασθενειών προχώρηση.

Οι μηχανισμοί για την ανάπτυξη μικροαγγείων και οι μακροαγγειακές επιπλοκές που προκαλούνται από την υπεργλυκαιμία είναι ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, προχωρημένη γλυκοζυλίωση, υπερπηκτικότητα, αυξημένη της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων. [157]



Εικόνα 24 | Σχηματικό διάγραμμα της παθοφυσιολογίας του διαβήτη τύπου 2[157]

Η παθογένεση του διαβήτη τύπου II

Σε μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη (NIDDM) υπάρχουν ορισμένοι μηχανισμοί που διασπώνται ώστε να διατηρείται η ρύθμιση μεταξύ της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη και συνεπώς οδηγεί σε εξασθενημένη έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά βήτα κύτταρα και εξασθενημένη δράση ινσουλίνης μέσω της αντίστασης στην ινσουλίνη. Σε αυτόν τον τύπο διαβήτη, πολλαπλά γενετικά ελαττώματα και ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, ιδιαίτερα η παχυσαρκία, είναι υπεύθυνοι για τα ελαττώματα των β-κυττάρων και την αντίσταση στην ινσουλίνη του περιφερικού ιστού αντίστοιχα. [160]

Σε αντίθεση με το T1DM, που είναι η νόσος που ξεκίνησε νωρίς, ο διαβήτης τύπου 2 εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 30 ετών και συχνά συνδέεται με την παχυσαρκία. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, δηλαδή η εξασθενημένη επίδραση της ινσουλίνης στον μεταβολισμό της γλυκόζης, παρατηρείται συνήθως στην παχυσαρκία και αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό του T2DM. Αρχικά, τα β κύτταρα παράγουν περισσότερη ινσουλίνη για να διατηρήσουν ευγλυκαιμία. Ωστόσο, η χρόνια υπερφόρτωση β κυττάρων οδηγεί στην προοδευτική εξάντλησή τους και τα

άτομα με προδιάθεση οδηγούνται τελικά σε ανεπάρκεια ινσουλίνης και υπεργλυκαιμία. Η δυτική διατροφή, η σωματική αδράνεια και η γήρανση αποτελούν τους κύριους παράγοντες κινδύνου του T2DM που εξηγούν τους ταχείς ρυθμούς αύξησης του επιπολασμού όχι μόνο στις αναπτυγμένες αλλά και στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Πολλοί μηχανισμοί αντίστασης στην ινσουλίνη έχουν περιγραφεί σε μοριακό επίπεδο. Η παρατεταμένη υπερινσουλιναιμία όπως παρατηρείται στην παχυσαρκία προκαλεί εσωτερικοποίηση και λυσοσωμική αποικοδόμηση του υποδοχέα ινσουλίνης. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση τυροσίνης της ινσουλίνης σε υποστρώματα υποδοχέων αναστέλλεται από τη φωσφορυλίωση τους από πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης. [152] Μεταξύ των διάφορων αιτιολογικών παραγόντων που εμπλέκονται αποφασιστικά για την παθογένεση του T2DM και την ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη, οι προ-φλεγμονώδεις και / ή οι μεσολαβητές οξειδωτικού στρες είναι οι περισσότεροι σημαντικοί. [154]

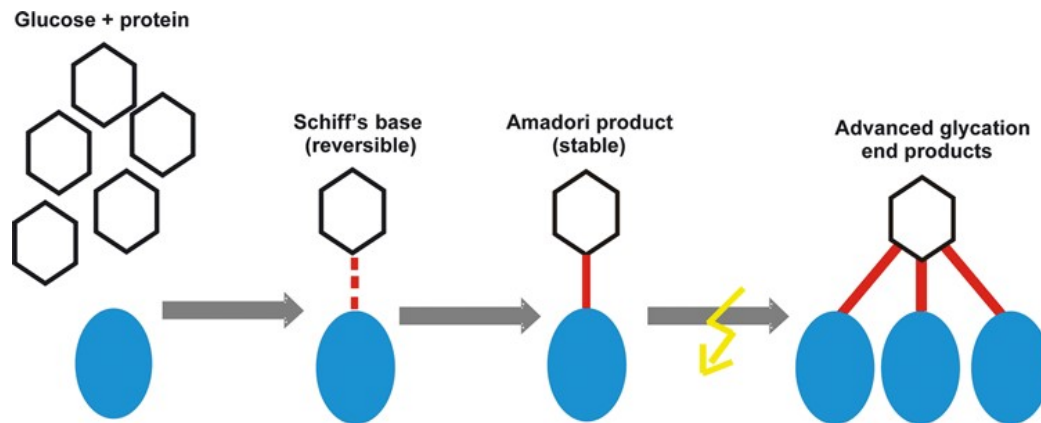
Stages Types	Normoglycemia	Hyperglycemia			
	Normal Glucose Regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Prediabetes)	Not insulin requiring	Insulin requiring for control	Insulin requiring for survival
Type 1*					
Type 2					
Other Specific Types**					
Gestational Diabetes**					

Εικόνα 25|Διαταραχές της γλυκαιμίας: αιτιολογικοί τύποι και στάδια. Ακόμη και μετά την εμφάνισή τους στην κετοξέωση, αυτοί οι ασθενείς μπορούν σύντομα να επιστρέψουν στην κανονική γλυκαιμία χωρίς να απαιτήσουν συνεχή θεραπεία. Σε σπάνιες περιπτώσεις, οι ασθενείς σε αυτές τις κατηγορίες (π.χ. τοξικότητα κατά των κενών, διαβήτη τύπου 1 που παρουσιάζεται κατά την εγκυμοσύνη) μπορούν να απαιτούν ινσουλίνη για επιβίωση.[158]

1.4.6 Δερματικές αλλαγές

1.4.6.1 Αλλαγές του επιδερμικού φραγμού

Ο σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις της ομοιόστασης του δέρματος είτε με πρωτογενείς μεταβολές του δέρματος που προκαλούνται από διαβήτη και με σχετιζόμενες επιπλοκές, όπως αγγειοπάθεια και νευροπάθεια. Η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η προκαλούμενη από υπεργλυκαιμία μη ενζυματική γλυκοζυλίωση δομικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση των διαβητικών επιπλοκών. Η υπερβολική παροχή γλυκόζης οδηγεί σε μη ενζυματικές χημικές αντιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων των πρωτεϊνών και της ομάδας καρβονυλίου των γλυκοζών, γνωστή ως αντίδραση Maillard. Το πρώτο στάδιο αυτής της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης αρχίζει με το σχηματισμό αναστρέψιμων βάσεων του Schiff, οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται σε σταθερά προϊόντα. Ειδικοί υποδοχείς για AGE (RAGE) βρέθηκαν σε πολλές κυτταρικές επιφάνειες. Η συσσώρευση των AGEs και η αλληλεπίδρασή τους με RAGEs ξεκινούν διαφορετικούς ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης, που θεωρείται ότι συμβάλλουν στην παθογένεση διαφόρων διαβητικών διαταραχών. Διαφορετικές διαβητικές διαταραχές θεωρείται ότι προκύπτουν από τη συσσώρευση AGE. Επιπροσθέτως, οι διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν συχνά τροποποιημένες λειτουργίες κερατινοκυττάρων λόγω της επίδρασης της ινσουλίνης στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση, με αποτέλεσμα π.χ. την εξασθενημένη λειτουργία επιδερμικού φραγμού και την καθυστερημένη επούλωση πληγών.[159]



Εικόνα 26| Η γλυκόζη αντιδρά μη ενζυμικά με αμινομάδες πρωτεϊνών μέσω διαφόρων αντιδράσεων που σχηματίζουν αναστρέψιμες βάσεις του Schiff και σταθερά προϊόντα (προϊόντα Amadori), με αποτέλεσμα το σχηματισμό και συσσώρευση τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs). Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως η αντίδραση Maillard. Η επίδραση του διαβήτη στην ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας εξακολουθεί να συζητείται αμφιλεγόμενα στη βιβλιογραφία. Οι Sakai έχουν ανιχνεύσει μια μειωμένη ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας, ένα χαμηλότερο επίπεδο λιπιδίου επιφάνειας του δέρματος και μειωμένη έκκριση σμήγματος σε διαβητικούς ποντικούς, ενώ οι Seirafi δεν έχουν βρει μια διαφορά στην ενυδάτωση κεράτινης στιβάδας μεταξύ διαβητικών και υγιών ασθενών. [159]

Επιπλέον, το pH της επιφάνειας του δέρματος παίζει καθοριστικό ρόλο στο φράγμα του δέρματος. Οι ανώμαλες υψηλές επιφανειακές τιμές του pH έχουν αποδειχθεί ότι ευνοούν τον αποικισμό βακτηρίων, ο οποίος παρατηρείται επίσης σε χρόνιες πληγές. Διαφορετικές ασθένειες όπως το ατοπικό έκζεμα ή δερματίτιδα, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το pH της επιφάνειας του δέρματος. Μέχρι σήμερα, οι Yosipovitch κ.ά. έχουν δείξει ότι το pH της επιφάνειας του δέρματος στις ενδοτοπυρτικές περιοχές των διαβητικών ασθενών είναι σημαντικά αυξημένο σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς ασθενείς. Επιπλέον, μια κανονική ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας, μειωμένη δραστηριότητα των σμηγματογόνων αδένων και να μεταβληθεί ελαστικότητα του δέρματος έχουν ανιχνευθεί σε διαβητικούς ασθενείς. Ωστόσο, η βιβλιογραφία είναι ακόμα φτωχή και απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να διασαφηνιστεί ο ρόλος του pH του δέρματος. [159]

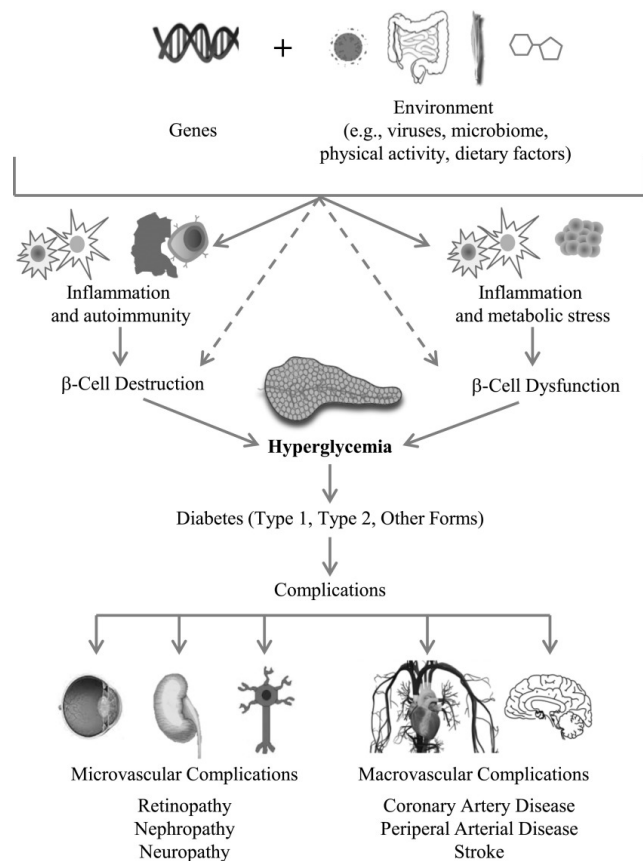
1.4.6.2 Δερματικές λοιμώξεις

Το διαταραγμένο φράγμα του δέρματος σε διαβητικούς ασθενείς έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία για βακτηριακές λοιμώξεις. Οι βακτηριακές και μυκητιακές λοιμώξεις του δέρματος παρατηρούνται συνήθως σε διαβητικούς ασθενείς και εμφανίζονται σε κάθε δεύτερο ασθενή. Επαναλαμβανόμενες βακτηριακές λοιμώξεις, όπως μολυσματικό λοιμώδες, αποστήματα, θυλακίτιδα, ερυσιπέλα ή σοβαρές μυκητιασικές λοιμώξεις, θα πρέπει να προειδοποιούν τους γιατρούς να εξετάσουν για τον σακχαρώδη διαβήτη. Μια σοβαρή και σπάνια βακτηριακή λοίμωξη, που συνήθως σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη, είναι η κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα η οποία προκαλείται κυρίως από *Pseudomonas aeruginosa* και συνεπάγεται υψηλή θνησιμότητα.

Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στην επιδερμίδα των διαβητικών είναι ένα ιδανικό περιβάλλον για σαπροφυτικούς οργανισμούς όπως η ζύμη *Candida*. Μέχρι τώρα, η αυξημένη επικράτηση των δερματόφυτων σε διαβητικούς ασθενείς εξακολουθεί να συζητείται αμφιλεγόμενα στη βιβλιογραφία. Μυκητιασικές λοιμώξεις έχουν αναφερθεί σε περίπου 30% των διαβητικών και μη διαβητικών ασθενών με το απομονωμένο *Trichophyton rubrum*. Οι λοιμώξεις από *Candida* έχουν παρατηρηθεί σε περίπου 15-28% των διαβητικών ασθενών. Ωστόσο, ο σακχαρώδης διαβήτης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για μολύνσεις από αιδοιοκολπίτιδα *Candida*. Έτσι, η χρόνια υποτροπιάζουσα αιδοιοκολπίτιδα μπορεί να είναι ένα σήμα για τον σακχαρώδη διαβήτη. [159]

1.4.6.3 Διαταραχές του δέρματος λόγω διαβητικής αγγειοπάθειας και νευροπάθειας

Η αγγειοπάθεια είναι μία από τις συνηθέστερες επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη που οδηγεί σε αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια, νευροπάθεια και δερματικές εκδηλώσεις. Ο παθομηχανισμός δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Ο σχηματισμός των AGEs έχει προταθεί για να συμβάλει στη μακρο- και μικροαγγειακή παχυσαρκία. [159]



Εικόνα 27|Μηχανισμός που οδηγεί σε διαταραχές μέσω του διαβήτη.

1.5 Οξειδωτικό στρες και δέρμα

1.5.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπου, παρέχοντας τη μέγιστη επιφάνεια επαφής μεταξύ του περιβάλλοντος και του σώματος, και εκτίθεται σε ποικιλία χημικών και φυσικών περιβαλλοντικών ρύπων. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός από ρύπους της διατροφής και από φάρμακα μπορούν να εκδηλώσουν τη τοξικότητά τους στο δέρμα. [129] Αυτοί οι τοξικοί παράγοντες και οι μεταβολίτες τους είναι οξειδωτικοί παράγοντες που άμεσα ή έμμεσα προκαλούν την αύξηση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν μικρό χρόνο ζωής και συνεχώς παράγονται σε μικρά επίπεδα κατά τη

διάρκεια του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού των κυττάρων. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν το μονήρες οξυγόνο ($1O_2$), το υπεροξειδικό ανιόν ($O_{2\cdot-}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , η ρίζα υδροξυλίου ($OH\cdot$). Το μονήρες οξυγόνο($1O_2$) σχηματίζεται κατά τη μεταφορά ενέργειας (φυσική ή χημική) στο διατομικό οξυγόνο (O_2), που σε θερμοκρασία περιβάλλοντος συμπεριφέρεται ως τριατομικό ή παραμαγνητικό. Το μονήρες οξυγόνο δεν έχει ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο και είναι πολύ ισχυρό οξειδωτικό. Η σταδιακή διαδοχική μείωση του O_2 οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος ($O_{2\cdot-}$), υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 και της ρίζας υδροξυλίου ($OH\cdot$). Οι αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών είναι συνήθως αλυσιδωτές αντιδράσεις, για παράδειγμα λειτουργώντας ως δότης ηλεκτρονίου το υπεροξειδικό ανιόν ($O_{2\cdot-}$) μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή ρίζας υδροξυλίου ($OH\cdot$) μέσω της αντίδρασης Fenton και με την αλληλεπίδραση με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) μπορεί να παράξει υψηλής δραστηριότητας νιτρικά προϊόντα ρίζα υπεροξυνιτριλίου ($ONOO\cdot$). Οι δέκτες ηλεκτρονίου όπως το μοριακό οξυγόνο αντιδρά άμεσα με τις ελεύθερες ρίζες και γίνεται και το ίδιο ελεύθερη ρίζα. Μία επιπλέον πηγή ρίζας οξυγόνου στο δέρμα όπως επίσης και σε άλλα όργανα, είναι τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα που έχουν άφθονα συστήματα παραγωγής οξειδωτικών παραγόντων. Ο βασικός σκοπός της απελευθέρωσης των μεγάλων ποσοτήτων ROS κατά τη φλεγμονή είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν εισέλθει ή η καταστροφή των ιστών που έχουν ήδη υποστεί βλάβη. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί και σε γειτονικά υγιή κύτταρα επειδή οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) μπορούν να αντιδράσουν με οποιοδήποτε μόριο. [130]Ο σίδηρος Fe^{2+} είναι ένας απαραίτητος καταλύτης για τη παραγωγή ελεύθερων ριζών λόγω της αντίδρασης Fenton.[131]Ο χαλκός Cu^+ είναι σχεδόν το ίδιο δραστικός όσο και ο σίδηρος ως καταλύτης αντιδράσεων αλλά είναι πιθανός μεταλλαξιογόνος παράγοντας λόγω της δυνατότητας αλληλεπίδρασης με τις βάσεις του DNA. Το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας εμπλέκεται επίσης στον αερόβιο μεταβολισμό και μετριάζει τις επιβλαβείς δράσεις των ελεύθερων ριζών, ώστε να μειωθεί η πιθανή πρόκληση βλάβης στον ιστό. Παρόλο από αυτούς τους μηχανισμούς άμυνας, οι βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και σε άλλα μακρομόρια συσσωρεύονται κατά της διάρκεια της ζωής των αερόβιων οργανισμών. Είναι γνωστό ότι πολλές ασθένειες που προκαλούνται σε ηλικιωμένους ανθρώπους όπως η αθηροσκλήρυνση, οστεοαρθρίτιδα, νεύρο-εκφυλιστικές διαταραχές και ο

καρκίνος, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε διάφορες φάσεις κατά τη πρόοδο των ασθενειών.[132]

1.5.2 Οξειδωτικοί παράγοντες στο δέρμα

Το δέρμα εκτίθεται σε ιονίζουσα και υπεριώδη (UV) ακτινοβολία και παράγονται ROS σε μεγάλες ποσότητες, που γρήγορα κατακλύζουν τα αντιοξειδωτικά του ιστού και άλλα οξειδωτικά μονοπάτια. Όταν ελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες χωρίς έλεγχο, εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένης και της δερματικής νεοπλασίας. Οι παράγοντες που ενισχύουν το οξειδωτικό στρες στο δέρμα είναι αέριοι ρυπαντές, περιβαλλοντικοί ρύποι που παράγονται από τα αυτοκίνητα και τις βιομηχανίες, υπεριώδης ακτινοβολία, φάρμακα, συντηρητικά τροφίμων κ.α. Το δέρμα διαθέτει ενζυματικό μηχανισμό που μετατρέπει τα υψηλά υδρόφοβα μόρια και άλλα ξеноβιοτικά μόρια όπως πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες σε ελεύθερες ρίζες με οξειδωτικό μεταβολισμό από μία μεγάλη κατηγορία ενζύμων που περιέχουν αίμα το κυτόχρωμα P450s. Επίσης, όταν το δέρμα εκτίθεται σε ένα μεγάλο αριθμό από χημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες προκαλείται οξειδωτικό στρες που οδηγεί σε υπεροξειδωση των λιπιδίων με συνακόλουθη μεταβολή του αντιοξειδωτικού συστήματος και των ενζύμων που μεταβολίζουν. Σε άλλες μελέτες, έδειξαν ότι οι ελεύθερες ρίζες επάγουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον AP-1 και το NF-κB και η UVA ακτινοβολία στους δερματικούς ινοβλάστες απελευθερώνει ασταθές σίδηρο που εμπλέκεται και αυτός στην ενεργοποίηση του NF-κB. Η UVB επάγει αλλαγές στο κυτταρικό κύκλο στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας, και παρόμοιες αλλαγές συμβαίνουν και κατά την επίδραση των ROS. Όμως η επίδραση διάφορων αντιοξειδωτικών μορίων μπορεί να αναστρέψει αυτές τις αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο. Και η UVB και οι δραστικές μορφές οξυγόνου επάγουν την απόπτωση στα κερατινοκύτταρα μέσω αλλαγών στη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Ένα άλλο σημαντικό μονοπάτι που οδηγεί στη δερματική φλεγμονή είναι ταεικοσανοειδή, τα οποία παράγονται από το αραχιδονικό οξύ από το ένζυμοσυνθετάση της προσταγλανδίνης που παράγει ενδο-υδροξυ υπεροξειδίο. Με τηδράση αυτού του ενζύμου μπορεί να συν- οξειδώσει μεγάλη

ποικιλίαυποστρωμάτων όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες που γίνονταιπολύ δραστικοί και μπορούν μετά να αντιδράσουν άμεσα με το DNA. Ταεικοσανοειδή, οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια είναι απαραίτητοιμεσολαβητές της φλεγμονής. Άλλα προ-οξειδωτικά ένζυμα που βρίσκονται στοδέρμα είναι η συνθετάση του νιτρικού οξέος που επάγει τα λευκά κύτταρα καιάλλα φαγοκύτταρα να παράξουν NO. Το μονοξείδιο του αζώτου NO αντιδρά με ταROS και παράγεται ONOO-, μία ασταθής δραστική μορφή που αλληλοεπιδρά με τοDNA προκαλώντας μεταλλάξεις. Το ουροκανικό οξύ είναι ένα άλλο μόριο πουβρίσκεται στο δέρμα και μετά την έκθεση της UVB ακτινοβολίας παθαίνειυσομερισμό cis-trans και εμπλέκεται στην ανοσοκαταστολή όπως επίσης και σεφαινόμενα φωτογήρανσης. Το φάσμα απορρόφησης του ουροκανικού οξέος ταιριάζει με το φάσμα δράσης της UVB και η παραγόμενη ανοσοκαταστολή συνδέεται με τη μείωση του αριθμού των κυττάρων του Langerhans. Επίσης μετά την επίδραση της UVA στο δέρμα το πλέον trans ουροκανικό οξύ επάγει τη παραγωγή ρίζας μονήρου οξυγόνου $1O_2$. Είναι επίσης γνωστό ότι το μονήρες οξυγόνο μπορεί να αρχίσει τη σηματοδότηση του JNK κίνησης η οποία οδηγεί στην επαγωγή της κολλαγενάσης όπως επίσης και στις προ φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως IL-1 και IL-6 μετά από ακτινοβολία UVA σε δερματικούς ινοβλάστες. Ωστόσο, αυτή η απάντηση μπορεί να περιοριστεί από ενδογενή παραγωγή χρωμοφόρωνμορίων όπως τρυπτοφάνης, ριβοφλαβίνης κ.α.

1.5.3 Αντιοξειδωτικά στο δέρμα

Τα αντιοξειδωτικά μόρια στο δέρμα αλληλεπιδρούν 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 αναγωγή της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, (GSTs), η υπεροξειδικήδισμουτάση (SODs), η καταλάση (CAT), και η αναγωγή της κινόνης.

H

γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ ανήκουν στα υδατοδιαλυτά μόρια ενώ η βιταμίνη Ε συνδέεται με τις μεμβράνες και μπορεί να διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. [161]Τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να δράσουν με έμμεσο μηχανισμό μέσω σχηματισμού χηλικών παραγόντων με μέταλλα και άμεσα ως δότες ηλεκτρονίων στις ρίζες. [162]Με αυτούς τους τρόπους βρίσκουν τις ελεύθερες ρίζες και τις προλαβαίνουν από το να επιτεθούν σε βιολογικούς στόχους.[163]Αν και τα αντιοξειδωτικά μόρια για να δράσουν πρέπει να είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους οξειδωτικούς παράγοντες, έχουν πολλάπλεονεκτήματα έναντι στα αντιοξειδωτικά ένζυμα λόγω μεγαλύτερης ικανότηταςδιδείσδυσης, ευρύ φάσμα δράσης και της ικανότητας αναγέννησης των κυττάρων.[164]

1.5.4 Ο ρόλος των οξειδωτικών παραγόντων στον Καρκίνο

Ο καρκίνος του δέρματος είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που εξελίσσεταισε τρία στάδια έναρξη, προώθηση και εξέλιξη, όπου μεσολαβούν διάφορεςκυτταρικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές. Οι ROS εμπλέκονται και στα 3 αυτάστάδια. Η έναρξη είναι το πρώτο στάδιο της καρκινογένεσης και σχετίζεται μεδομικές μεταβολές στο DNA που δημιουργούν μεταλλάξεις. Γενετικές αλλαγές σταπρωτο-ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορούν να επιφέρουναναστολή στα κύτταρα της επιδερμίδας στα σήματα για τερματισμό της διαφοροποίησης. Σε αυτό το στάδιο οι ROS μπορούν να επιφέρουν εκτενή βλάβηστο DNA, που περιλαμβάνει βλάβη στις βάσεις του, σπάσιμο είτε στη μία έλικα είτεκαι στις δύο, cross-linking μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών, ή μεταλλαξιογόνεςεκτροπές του DNA ή των χρωμοσωμάτων. [164]Οι ROS επίσης, εμπλέκονται και στην έναρξη του όγκου με ενεργοποίηση των προ-καρκινογόνων που παράγουνελεύθερες ρίζες που επιτίθενται στα πυρηνόφιλα.[165]Ένα από τα κύρια προϊόντα της οξειδωτικής βλάβης του DNA είναι η γλυκολική θυμίνη που είναι αποτέλεσμα είτεχημικής οξείδωσης είτε της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Έχει φανεί ότι χημικάκαρκινογόνα που είναι ικανά να παράγουν ελεύθερες ρίζες συχνά επάγουν τονσχηματισμό γλυκολικής θυμίνης.[166]Το οξειδωτικό στρες επάγει το σχηματισμό 8-υδρόξυ-γουανοσίνης και στο γενωμικό και στο μιτοχονδριακό DNA. Αυξημέναεπίπεδα αυτής της ουσίας στο

αίμα και στα ούρα είναι δείκτης οξειδωτικής βλάβης. Το δεύτερο στάδιο της καρκινογένεσης είναι η προώθηση του όγκου που εμπλέκει επέκταση των κλώνων των αρχικών κυττάρων. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών έχει συσχετιστεί στο ότι οι χημικές ουσίες που παράγουν ROS είναι προωθητές του όγκου και οι ROS μπορούν να μιμηθούν το ρόλο γνωστών τέτοιων ουσιών. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες επίσης, μπορούν να αναστείλουν τη προώθηση του όγκου.[168]

Το τρίτο στάδιο της καρκινογένεσης είναι γνωστό εξέλιξη του όγκου όπου τα θηλώματα μετατρέπονται σε κακοήγη νεοπλασμάτα. Έχειδειχθεί ότι οι ουσίες που παράγουν ελεύθερες ρίζες μπορούν να προωθήσουν αυτό το στάδιο. Επίσης, ο ρόλος του οξειδωτικού στρες σε αυτό το στάδιο έχει φανεί από το γεγονός ότι η ουσία diethylmaleate που μειώνει τα επίπεδα GSH γλουταθειόνης επάγει την κακοήθεια στους όγκους του δέρματος και η ίδια η γλουταθειόνη μειώνει το ρυθμό εξέλιξης των όγκων σε κακοήθειες. Το φυσιολογικό δέρμα παράγει ROS όπως το υπεροξειδικό ανιόν και τουπεροξειδίου του υδρογόνου ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού μεταβολισμού σε μικρές συγκεντρώσεις. Και οι δύο δραστικές μορφές οξυγόνου μετατρέπονται στην εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου από το σίδηρο (Fe^{2+}). Επίσης, οι δραστικές μορφές αζώτου που παράγονται ως αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης του νιτρικού οξειδίου με τη συνθετάση NOS προάγει τη μετατροπή της αργινίνης σε κιτρουλίνη. Σε αυτή την αντίδραση το NO παράγεται και αντιδρά με τη ρίζα υπεροξειδίου και παράγεται υπεροξυνιτρίλιο ($ONOO^-$). Επίσης και δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μπορούν να παραχθούν μετά από επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων όπως χημικών ουσιών, υπερύθρου ακτινοβολίας UVA, UVB.[167]

1.5.5 Ο ρόλος των οξειδωτικών παραγόντων στο Διαβήτη

1.5.5.1 Οξειδωτικό στρες στον σακχαρώδη διαβήτη

Πιστεύεται ότι το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αγγειακών επιπλοκών στον διαβήτη, ιδιαίτερα στον διαβήτη τύπου 2. Η αύξηση του επιπέδου ROS στο διαβήτη μπορεί να οφείλεται σε μείωση της καταστροφής ή/και αύξηση της παραγωγής από καταλύτες (CAT-ενζυματικές / μη ενζυμικές), υπεροξειδική

δισμουτάση (SOD) και αντιοξειδωτικά υπεροξειδάσης γλουταθειόνης (GSH-Px). Η μεταβολή των επιπέδων αυτών των ενζύμων καθιστά τους ιστούς επιρρεπείς σε οξειδωτικό στρες που οδηγούν στην ανάπτυξη διαβητικών επιπλοκών. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, η διαβητική θνησιμότητα μπορεί να εξηγηθεί κυρίως από την αύξηση των αγγειακών ασθενειών εκτός από την υπεργλυκαιμία.[169]

1.5.5.2 Παθοφυσιολογία του οξειδωτικού στρες στον διαβήτη

Σήμερα, έχουν αναφερθεί αποδεικτικά στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση τόσο του διαβήτη τύπου 1 όσο και του τύπου 2. Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών στον διαβήτη με μη ενζυματική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών, η οξείδωση της γλυκόζης και η αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων οδηγούν σε βλάβη των ενζύμων, κυτταρικών μηχανών και επίσης αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη λόγω του οξειδωτικού στρες. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, το λιπίδιο είναι το συστατικό της απολιποπρωτεΐνης της LDL που σχηματίζει οξειδωμένα αδιάλυτα συσσωματώματα λόγω της διασύνδεσης που προκαλείται από ρίζες υδροξυλίου μεταξύ των μονομερών apo-B που είναι υπεύθυνα για οξειδωτική βλάβη στις διαβητικές επιπλοκές. Στον σακχαρώδη διαβήτη, κύριες πηγές οξειδωτικού στρες είναι τα μιτοχόνδρια. Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού μεταβολισμού στα μιτοχόνδρια, ένα συστατικό του χρησιμοποιούμενου οξυγόνου μειώνεται στο νερό και το υπόλοιπο οξυγόνο μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα οξυγόνου ($O \bullet$), η οποία είναι ένα σημαντικό ROS που μετατρέπεται σε άλλα ROS όπως $ONOO^-$, OH και H_2O_2 . Η σηματοδότηση της ινσουλίνης ρυθμίζεται από το ROS / RNS με δύο τρόπους. Από τη μία πλευρά, ως ανταπόκριση στην ινσουλίνη, τα ROS / RNS παράγονται για να ασκήσουν την πλήρη φυσιολογική τους λειτουργία και από την άλλη πλευρά, τα ROS και RNS έχουν αρνητική ρύθμιση στην σηματοδότηση της ινσουλίνης, ερμηνεύοντας τα ώστε να αναπτύξουν αντίσταση στην ινσουλίνη, για διαβήτη τύπου 2.[169]

1.5.5.3 Οξειδωτικό στρες και διαβητικές επιπλοκές

Πολλά αποδεικτικά στοιχεία από πειράματα έδωσαν σχέση μεταξύ διαβήτη και οξειδωτικού στρες μετρώντας διάφορους βιοδείκτες που περιλαμβάνουν βιοδείκτες καταστροφής του DNA και προϊόντα υπεροξειδάσης λιπιδίων. Πιστεύεται ότι στην αρχή και την εξέλιξη της καθυστερημένης διαβητικής επιπλοκής, οι ελεύθερες ρίζες

έχουν σημαντικό ρόλο λόγω της ικανότητάς τους να βλάπτουν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA. Μια ποικιλία παθολογικών καταστάσεων προκαλείται από το οξειδωτικό στρες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης και ο καρκίνος. Οι επιπλοκές που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες από DM περιλαμβάνουν τη στεφανιαία νόσο, τη νευροπάθεια, τη νεφροπάθεια, την αμφιβληστροειδοπάθεια και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Οι μελέτες in-vivo υποστηρίζουν το ρόλο της υπεργλυκαιμίας στη δημιουργία οξειδωτικού στρες που οδηγεί σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στα αιμοφόρα αγγεία των διαβητικών ασθενών. Η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης μαζί με δυσλιπιδαιμία σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη αναπτύσσει μακροαγγειοπάθειες που προκαλούν οξειδωτικό στρες που οδηγεί σε αθηροσκλήρωση.[169]

1.5.5.4 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες στο σακχαρώδη διαβήτη[169]

Πρωτεΐνες

Το ROS αντιδρά με κάποιο αμινοξύ in vitro, παράγοντας οτιδήποτε από τροποποιημένες, μετουσιωμένες και μη λειτουργικές πρωτεΐνες που περαιτέρω ευθύνονται για το οξειδωτικό στρες. Η διαβητική υπεργλυκαιμία, μέσω της διαδικασίας παραγωγής ελεύθερων ριζών, προκαλεί πρωτεΐνη γλυκοζυλίωση και οξειδωτικό εκφυλισμό. Ο βαθμός της γλυκοζυλίωσης αυτής της πρωτεΐνης εκτιμάται χρησιμοποιώντας μερικούς βιοδείκτες όπως επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και φρουκτοζαμίνης. Η μεταβολή της λειτουργίας και της δομής των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνικών ενζύμων μπορεί επίσης να οφείλεται σε μη-ενζυματική γλυκοζυλίωση, έτσι ώστε η αποτοξίνωση των ελευθέρων ριζών να επιφέρει αύξηση του οξειδωτικού στρες στον διαβήτη. Σύμφωνα με in vitro μελέτες η μυελοϋπεροξειδάση καταλύει τη μετατροπή της 1-τυροσίνης σε 3,3-διτυροσίνη η οποία χρησιμεύει ως σταυροσύνδεση μεταξύ πολυπεπτιδικών αλυσίδων των ίδιων ή διαφορετικών πρωτεϊνών καθιστώντας το ένα βολικό βιοδείκτη για οξείδωση πρωτεΐνης.

Λιπίδια

Ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί διαταραχές στο λιπιδικό προφίλ του σώματος καθιστώντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στην κυτταρική

μεμβράνη είναι εξαιρετικά επιρρεπή σε προσβολή από ελεύθερες ρίζες λόγω της παρουσίας πολλαπλών δεσμών. Τα υπεροξειδωτικά λιπιδίων (LHP) μέσω ενδιάμεσων αντιδράσεων ριζών παράγουν τέτοια λιπαρά οξέα που παράγουν εξαιρετικά αντιδραστικές και τοξικές ρίζες λιπιδίων που σχηματίζουν νέο LHP. Ένας κρίσιμος βιοδείκτης οξειδωτικού στρες είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, η οποία είναι η πιο διερευνημένη περιοχή της έρευνας όταν πρόκειται για την ROS. Η μαλλονδιαλδεΐδη (MDA) σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσης λιπιδίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των υπεροξειδίων του λιπιδίου μετά την αντίδρασή της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι πολύ σημαντικό μέρος του βιολογικού συστήματος καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες. Ανάμεσα σε αυτές τις βιταμίνες, η βιταμίνη A, C και E δρουν ως αντιοξειδωτικά με την αποτοξίνωση των ελευθέρων ριζών. Οποιαδήποτε μεταβολή στα επίπεδά τους είναι σημαντικοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Αυτές οι βιταμίνες προάγουν επίσης την τοξικότητα με την παραγωγή προ-οξειδωτικών σε ορισμένες συνθήκες. Τα επίπεδα του σώματος της βιταμίνης E έχουν αναφερθεί είτε αυξημένα είτε μειωμένα με διαβήτη. Ωστόσο, οι αντικρουόμενες αναφορές παρουσιάζουν τις βλαβερές επιδράσεις της βιταμίνης E σε αγγειακές μεταβολές που προκαλούνται από διαβήτη.

Γλουταθειόνη

Ο διαβήτης προκαλεί μεταβολές στη δραστηριότητα των ενζύμων, υπεροξειδάση γλουταθειόνης και αναγωγάση γλουταθειόνης. Αυτά τα ένζυμα βρίσκονται σε κύτταρο που μεταβολίζει το υπεροξείδιο στο νερό και μετατρέπει το δισουλφιδιογλουταθειόνης πίσω σε γλουταθειόνη. Οποιαδήποτε μεταβολή των επιπέδων τους θα κάνει τα κύτταρα επιρρεπή σε οξειδωτικό στρες και συνεπώς κυτταρικό τραυματισμό.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ρυθμιστής του μεταβολισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου που μπορεί, υπερβολικά, να προκαλέσει σοβαρή βλάβη στα λιπίδια, στο RNA και στο DNA. Το CAT μετατρέπει το H_2O_2 καταλυτικά σε νερό και οξυγόνο και έτσι το εξουδετερώνει. Σε περίπτωση ανεπάρκειας της καταλάσης, τα β-κύτταρα του

παγκρέατος που περιέχουν μεγάλη ποσότητα μιτοχονδρίων, υφίστανται οξειδωτικό στρες προκαλώντας περίσσεια ROS που οδηγεί σε δυσλειτουργία β-κυττάρων και τελικά σε διαβήτη. Η υπεργλυκαιμία αυξάνει την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και την καθοριζόμενη προς τα κάτω ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων CAT, ενώ η διερεύνηση των επαγόμενων από υπεργλυκαιμία λειτουργικών αλλαγών, η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, η υπεροξείδωση, η πόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και τα δακτυλικά αποτυπώματα γονιδιακής έκφρασης των σχετικών ενζύμων σε ενδοθηλιακά κύτταρα .

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση παρέχει άμυνα πρώτης γραμμής κατά της κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από ROS, καταλύοντας την αναλογία υπεροξειδίου, πρωτεύοντος ROS σε μεταβολισμό οξυγόνου, σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο. Μπορούμε να πούμε ότι το υπεροξείδιο διασπάται σε άλλες ενώσεις που είναι λιγότερο τοξικές από SODs.

Ασκορβικό οξύ (Vitamin C)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά αλλά είναι αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα. Έχει όξινη γεύση με μέγιστη σταθερότητα σε pH 5.4 και σκουραίνει κατά την έκθεση στο φως. Οξειδώνεται γρήγορα παρουσία φωτός, αέρα, ιχνών χαλκού και σιδήρου κάτι το οποίο έχει βλαβερές συνέπειες.

Είναι φωτοπροστατευτική, μειώνει 52% το ερύθημα που προκαλεί η UVB ακτινοβολία και κατά 62% τη βλάβη που προκαλεί η UV στο DNA 8-υδροξύ-δεόξυ-γουανοσίνη (8-OHdG). Επιπλέον συμβάλει στην αντιστροφή εμφάνισης φωτογήρανσης, επιτρέποντας την φωτοπροστασία για πολλούς μήνες δίνοντας στο δέρμα τη δυνατότητα να διορθώσει προηγούμενες βλάβες της φωτογήρανσης. Λειτουργεί ως ασπίδα για το δέρμα, προστατεύοντας από τις ηλιακές ακτίνες, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ή σε συνδυασμό με τη βιταμίνη E, αντηλιακά και καταπραυντικά προϊόντα. Συμβάλλει έτσι στην πρόληψη της φωτογήρανσης και στη φωτοπροστασία. Η βιταμίνη C δεν απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά αντιδρά με τα ανιόντα του υπεροξειδίου, τις υδροξυλικές ρίζες και τα ανιόντα οξυγόνου, που

παράγονται κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η βιταμίνης C του δέρματος καταναλώνεται μετά την έκθεση σε UV, όπως έχουν αποδείξει τα μειωμένα επίπεδα που διαπιστώθηκαν στο δέρμα μετά από έκθεση σε UV.

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους και αποτελεί αντιοξειδωτικό που συναντάται στο πλάσμα του αίματος. Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα, το οποίο διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες. Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο $1O_2$, το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO- ή το όζον (O_3).

1.6 Λιπιδική Υπεροξείδωση

1.6.1 Επισκόπηση των βιολογικών λειτουργιών των λιπιδίων

Τα λιπίδια ταξινομούνται κλασικά σε δύο ομάδες: Απόλλωνα και Πολικά. Τα τριγλυκερίδια (απολικοί), που αποθηκεύονται σε διάφορα κύτταρα, αλλά κυρίως στον λιπώδη ιστό, είναι συνήθως η κύρια μορφή αποθήκευσης ενέργειας στα θηλαστικά. Τα πολικά λιπίδια είναι δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, όπου συμμετέχουν στον σχηματισμό του φραγμού διαπερατότητας των κυττάρων και των υποκυτταρικών οργανιδίων με τη μορφή λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Ο κύριος τύπος λιπιδίου που ορίζει αυτή τη διπλή στιβάδα σε όλες σχεδόν τις μεμβράνες είναι το φωσφολιπίδιο με βάση τη γλυκερόλη. Η σημασία της μεμβράνης του λιπιδίου αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τα λιπίδια μπορούν να ελέγχουν την φυσιολογική κατάσταση ενός οργανιδίου μεμβράνης τροποποιώντας βιοφυσικές πτυχές της, όπως η πολικότητα και διαπερατότητα. Τα λιπίδια έχουν επίσης βασικό ρόλο στη βιολογία ως σηματοδοτικά μόρια.[142]

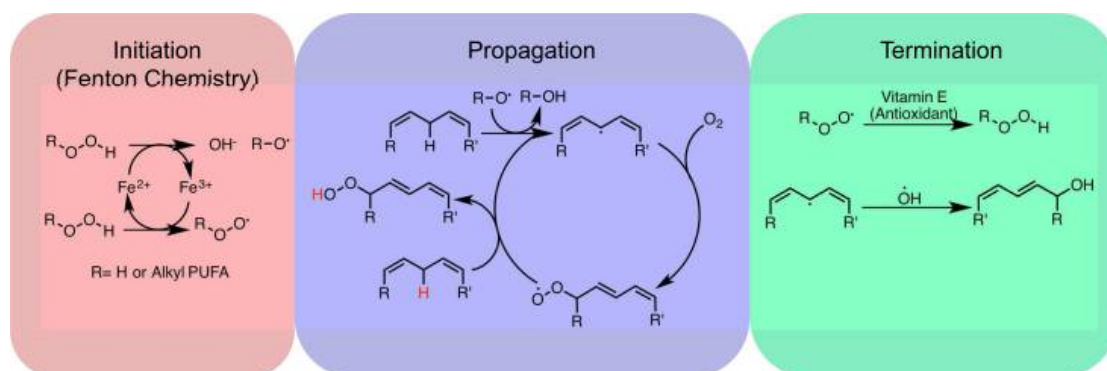
Η διακοπή της ομοιόστασης οξειδοαναγωγής αποτελεί βασικό φαινότυπο πολλών παθολογικών καταστάσεων. Αν και πολλαπλές οξειδωτικές ενώσεις όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου αναγνωρίζονται ευρέως ως μεσολαβητές και επαγωγείς του οξειδωτικού στρες, όλο και περισσότερο, η προσοχή εστιάζεται στον ρόλο των υδροϋπεροξειδικών λιπιδίων ως κρίσιμων μεσολαβητών του θανάτου και της νόσου. Ως κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, τα λιπίδια έχουν απαραίτητο ρόλο στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των κυττάρων. Η υπερβολική οξείδωση των λιπιδίων μεταβάλλει τις φυσικές ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών και μπορεί να προκαλέσει ομοιοπολική τροποποίηση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.[141]

Οι διαταραχές στην ομοιοστασία οξειδοαναγωγής προκαλούνται από τη συσσώρευση οξειδωτικών μορίων είτε με υπερπαραγωγή είτε με απώλεια κυτταρικής μειωτικής ικανότητας. Και στις δύο περιπτώσεις, οι συσσωρευμένοι οξειδωτικοί παράγοντες είναι σε θέση να οξειδώσουν το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, τροποποιώντας έτσι τη δομή, τη δραστηριότητα και τις φυσικές τους ιδιότητες. Δεδομένης της πιθανής σοβαρότητας μιας τέτοιας διαδεδομένης οξειδωτικής βλάβης, η διατάραξη της

οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές διαταραχές της βιολογικής ομοιόστασης, που ενδεχομένως οδηγούν σε ασθένεια ή θάνατο.[141]

Τα υπεροξείδια λιπιδίων ασκούν τα τοξικά τους αποτελέσματα μέσω δύο γενικών μηχανισμών. Δεδομένου ότι τα λιπίδια είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών, η εκτεταμένη υπεροξείδωση των λιπιδίων μεταβάλλει τη συναρμολόγηση, τη σύνθεση, τη δομή και τη δυναμική των λιπιδικών μεμβρανών. Ως εξαιρετικά δραστικές ενώσεις, τα υπεροξείδια λιπιδίων είναι επίσης ικανά να διαδίδουν περαιτέρω ROS ή να αποικοδομούνται σε δραστικές ενώσεις ικανές να διασυνδέουν DNA και πρωτεΐνες.[141]

Τα υπεροξείδια λιπιδίων είναι μια σημαντική κατηγορία βιομορίων που παράγονται από οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Αν και τα υπεροξείδια λιπιδίων έχουν παρατηρηθεί σε πολλαπλές ασθένειες, είναι συχνά ασαφές σε ποιο βαθμό ξεκινούν τη νόσο ή είναι τα προϊόντα άλλων παραγόντων που προάγουν την ασθένεια. [141]



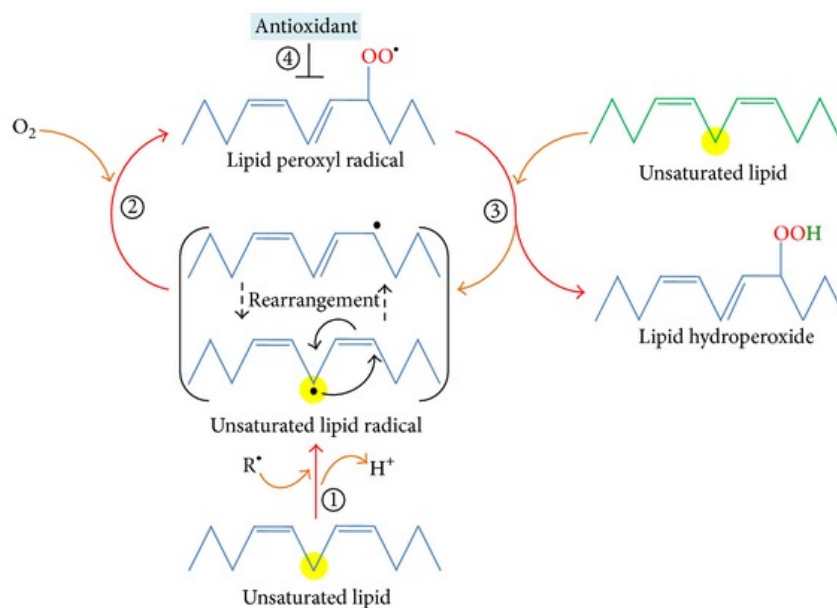
Εικόνα 28|Τα τρία στάδια της μη ενζυματικής υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Στο στάδιο έναρξης οι πρώτες ρίζες δημιουργούνται από ενεργό ασταθή σίδηρο οξειδοαναγωγής. Στο στάδιο της διάδοσης οι ριζοσπάστες είναι σε θέση να αντιδρούν με νέα υποστρώματα, δημιουργώντας νέες ρίζες. Το βήμα της διάδοσης επαναλαμβάνεται μέχρι το στάδιο τερματισμού, όπου οι ρίζες «σβήνουν» τα αντιοξειδωτικά ή αντιδρούν με μια άλλη ρίζα.[141]

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να περιγραφεί γενικά ως μια διαδικασία υπό την οποία οξειδωτικά όπως ελεύθερες ρίζες ή μη-ριζικά είδη προσβάλλουν λιπίδια

που περιέχουν διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα, ιδιαίτερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) που περιλαμβάνουν άντληση υδρογόνου από άνθρακα, σε ρίζες λιποειδούς υπεροξυλίου και υδροϋπεροξειδίου. Τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια (PLs) και η χοληστερόλη (Ch) είναι επίσης γνωστοί στόχοι βλαβερής και δυνητικά θανατηφόρας υπεροξειδωτικής τροποποίησης. Τα λιπίδια μπορούν επίσης να οξειδωθούν από ένζυμα όπως οι λιποξυγενάσες, οι κυκλοοξυγενάσες και το κυτόχρωμα P450.[142]

Διαδικασία

Η συνολική διαδικασία της υπεροξειδωσης λιπιδίων αποτελείται από τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό. Στο στάδιο της έναρξης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, τα προ-οξειδωτικά όπως η ρίζα υδροξυλίου αφηγούνται το αλλυλικό υδρογόνο που σχηματίζει την κεντρική ρίζα λιπιδίου στον άνθρακα ($L^{\bullet}$). Στην φάση πολλαπλασιασμού, η λιπιδική ρίζα ($L^{\bullet}$) αντιδρά ταχέως με οξυγόνο για να σχηματίσει μία ρίζα λιποειδούς υπεροξυ ($LOO^{\bullet}$) η οποία αφαιρεί ένα υδρογόνο από ένα άλλο μόριο λιπιδίου δημιουργώντας ένα νέο $L^{\bullet}$ (που συνεχίζει την αλυσιδωτή αντίδραση και υδροϋπεροξειδίου λιπιδίου). Στην αντίδραση τερματισμού, αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στο $LOO^{\bullet}$ και σχηματίζουν μια αντίστοιχη ρίζα βιταμίνης E η οποία αντιδρά με μια άλλη $LOO^{\bullet}$ που σχηματίζει μη ριζικά προϊόντα. Μόλις ξεκινήσει η υπεροξειδωση λιπιδίων, θα υπάρξει πολλαπλασιασμός των αλυσιδωτών αντιδράσεων έως ότου παραχθούν προϊόντα τερματισμού. Η ανασκόπηση με εκτεταμένες πληροφορίες σχετικά με τη χημεία που σχετίζεται με κάθε ένα από αυτά τα βήματα είναι διαθέσιμη.[142]

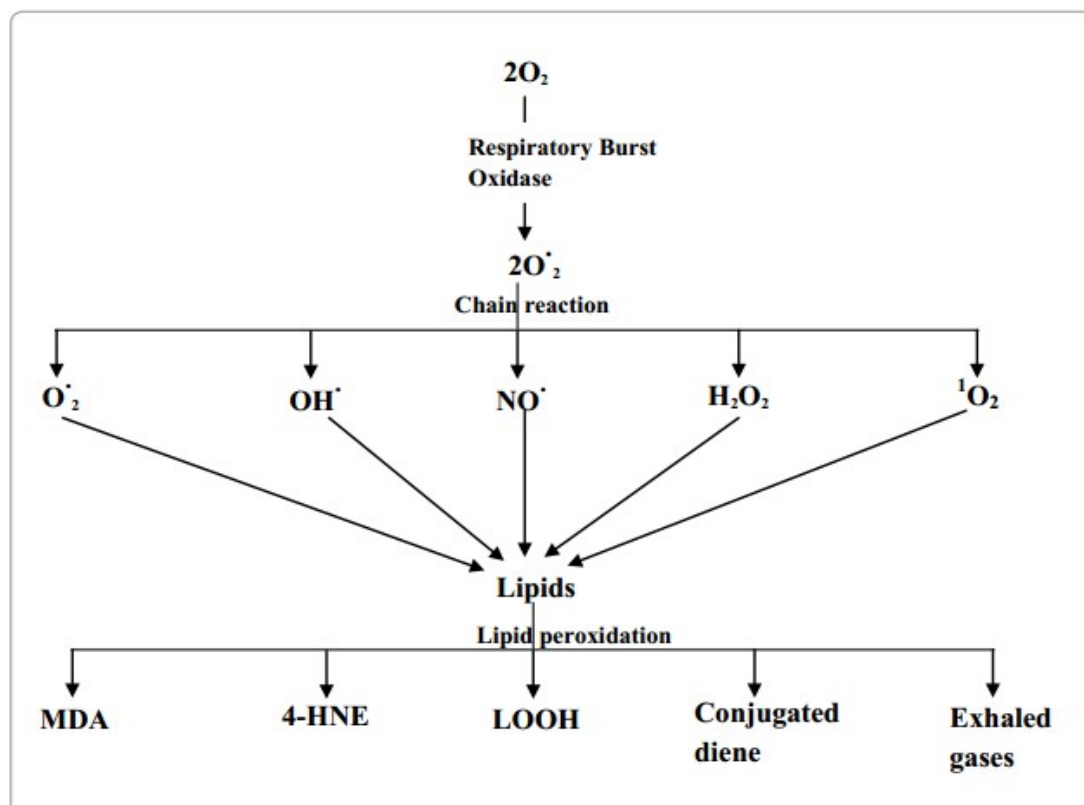


Εικόνα 29|Διαδικασία υπεροξειδωσής λιπιδίων. Στην αρχή, τα προ-οξειδωτικά αφηγούνται το αλλυλικό υδρογόνο σχηματίζοντας την ρίζα λιπιδίου που έχει κεντρική θέση στον άνθρακα. η ρίζα άνθρακα τείνει να σταθεροποιηθεί με μια μοριακή αναδιάταξη για να σχηματίσει ένα συζευγμένο διένιο (στάδιο 1). Στη φάση πολλαπλασιασμού, η λιπιδική ρίζα αντιδρά ταχέως με οξυγόνο για να σχηματίσει μία ρίζα λιποειδούς υπεροξυ (στάδιο 2) η οποία αφαιρεί ένα υδρογόνο από ένα άλλο μόριο λιπιδίου δημιουργώντας μια νέα ρίζα λιπιδίου και υδροϋπεροξειδίο λιπιδίου (στάδιο 3). Στην αντίδραση τερματισμού, τα αντιοξειδωτικά δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στο είδος του υπεροξυ-ριζικού λιπιδίου που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μη ριζικών προϊόντων (στάδιο 4).[142]

1.6.2 Υπεροξειδωση λιπιδίων και ανοσοποιητικό σύστημα[170]

Το υπεροξειδίο του λιπιδίου είναι μια πολύ σημαντική ένωση που σχηματίζεται από την αλυσιδωτή αντίδραση. Εδώ, τα μη ριζικά λιπίδια μετατρέπονται σε ρίζες από είδη όπως O_2 , $OH\cdot$, NO και άλλα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Τα λιπίδια έχουν ομάδα υδρογόνου συνδεδεμένη με αυτά, και αυτό το υδρογόνο έχει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Όταν η ελεύθερη ρίζα απομακρύνει αυτό το άτομο υδρογόνου, αφήνει πίσω του ένα μη ζευγαρωμένο ηλεκτρόνιο στα λιπίδια. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί

σε αλυσιδωτή αντίδραση, αντιδρώντας έτσι με άλλα βιομόρια. Η αντίδραση αναφέρεται παρακάτω:



Εικόνα 30 | Διαδικασία λιπιδικής υπεροξειδωσης.[170]

1.6.3 Οξείδωση λιπιδίων σε διαβήτη

Η υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων μεταβάλλει τη λιπιδική δομή με βιολογική μεμβράνη και η φυσιολογική διεργασία της μεμβράνης θα επηρεάσει αρνητικά την υπεροξειδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες s. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι οι κύριες ουσίες που πρέπει να τροποποιηθούν δομικά και με βάση την παραπάνω μεταβολή, η οποία προκαλείται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την τάση να επιτίθενται σε διαφορετικά είδη ακόρεστων λιπαρών οξέων και λιπίδια (χοληστερόλη και λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας) και οι παραγωγές τους

είναι ανεπιθύμητα οξειδωμένα προϊόντα που προκαλούν την έναρξη και ανάπτυξη της νόσου. [171]

Μηχανισμοί υπεροξειδωσης λιπιδίων στον σακχαρώδη διαβήτη

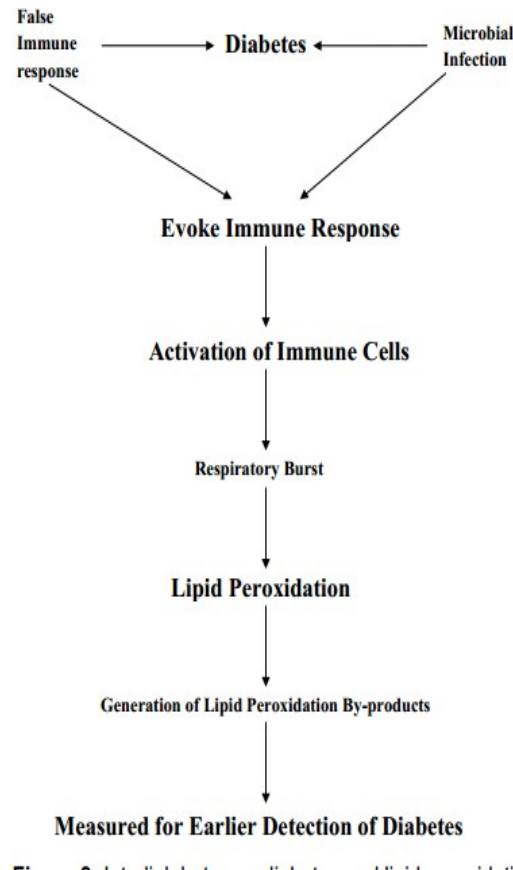
Η υπερινσουλιναμία στον διαβήτη αυξάνει τη δραστηριότητα του ενζύμου, λιπαρό ακυλο συνένζυμο Α οξειδάση, η οποία αρχίζει β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα υπεροξειδωση λιπιδίων. Η αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων καταστρέφει τη λειτουργία της μεμβράνης μειώνοντας τη ρευστότητα της μεμβράνης και μεταβάλλοντας τη δραστικότητα ενζύμων και υποδοχέων που δεσμεύονται με μεμβράνη. Τα προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων είναι επιβλαβή για τα περισσότερα κύτταρα του σώματος και σχετίζονται με διαφορετικά είδη ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση και η εγκεφαλική βλάβη. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να φορτώσει τα κύτταρα με περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι είναι αυξημένο στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και θα μπορούσε να προκαλέσει διαταραχή της παραγωγής, απελευθέρωσης ή λειτουργίας της ινσουλίνης στον διαβήτη τύπου 2.[171]

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί είτε με την ανεπαρκή είτε χωρίς την παραγωγή ινσουλίνης, την αντοχή στην ινσουλίνη και τη μικροβιακή μόλυνση. Έχει συζητηθεί επίσης ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τον άμεσο ή έμμεσο ρόλο στο διαβήτη. Δεδομένου ότι, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι υπεύθυνο άμεσα ή έμμεσα στο διαβήτη και στην ανοσολογική αντίδραση περιλαμβάνονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων. Διαβητικοί ασθενείς έδειξαν επίσης αυξημένη γήρανση, δηλαδή τις διαδικασίες ή τα χαρακτηριστικά και τα συμπτώματα που παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Η γήρανση είναι γενικά συνδεδεμένη με την υπεροξειδωση των λιπιδίων λόγω των ROS και επομένως οι διαβητικοί σχετίζονται με υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Οι ανοσολογικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν ROS, οι οποίες επίσης προκαλούν υπεροξειδωση λιπιδίων. Αν και πολλά/ες ένζυμα /ουσίες είναι διαθέσιμα στο σώμα, τα οποία έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τις ρίζες αυτές όπως η βιταμίνη C, η

δισμουτάση υπεροξειδίου και η υπεροξειδάση γλουταθειόνης κ.ά. Αλλά, παρ'όλα αυτά, πολλές αναφορές έχουν επίσης προτείνει τον ελαττωματικό μεταβολισμό της βιταμίνης C μαζί με τα αλλοιωμένα λευκοκύτταρα σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη. Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι διαβητικοί ασθενείς παρουσιάζουν μικρότερη ποσότητα α τοκοφερόλης, βιταμίνη C, ολική γλουταθειόνη και η ισοπροστασία (isoprostance) στο πλάσμα. Επιπλέον, πολλοί ερευνητές έχουν δείξει αυξημένο επίπεδο MDA (προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης) σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη. Αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα έχει βρεθεί στον πειραματικά διεγερμένο διαβήτη, παρά την αυξημένη συγκέντρωση βιταμίνης E. Επίσης έχει δειχθεί ότι οι ασθενείς που προμηθεύτηκαν αντιοξειδωτική προμπουκόλη και / ή υπεροξειδική δισμουτάση έδειξαν μειωμένες διαβητικές επιπλοκές και έτσι ήταν σαφής η σύνδεση μεταξύ των δύο. [170]

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δείχνουν σαφώς την παρουσία λιπιδικής υπεροξειδωσης κατά τη διάρκεια του διαβήτη. Ο διαβήτης προκαλείται από διάφορες αιτίες και κάθε μια από αυτές μπορεί άμεσα ή έμμεσα να συνδεθεί με το ανοσοποιητικό σύστημα. Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι μειωμένο στον διαβήτη και αυτό οδηγεί στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. (Εικόνα 30)



Εικόνα 31 | Διασύνδεση μεταξύ διαβήτη και λιπιδικής υπεροξειδωσης.

1.6.4 Οξείδωση λιπιδίων σε καρκινικό δέρμα

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την ακτινοβολία, η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η θραύση των κλώνων DNA αποτελούν σημαντικό παράγοντα για τις επιβλαβείς επιπτώσεις στην καρκινογένεση του δέρματος. Η ακτινοβολία UV διακόπτει τη σύνθεση και / ή την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), καθώς η ενεργοποίηση του οξυγόνου προκαλεί το σχηματισμό υπεροξειδίων και επηρεάζει κατά προτίμηση τα λιπιδικά συστατικά της υποκυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, οι αλδεϋδες μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με PUFA, αιμοπρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες και στεροειδή, προκαλώντας μεταλλαξιόγones και καρκινογόνες επιδράσεις.[172]

Ο μεταβολισμός των PUFAs είναι ιδιαίτερα δραστήσιος στην επιδερμίδα του δέρματος. Λόγω της ανικανότητας της φυσιολογικής δερματικής επιδερμίδας να αποκορεύει το LA σε γ-λινολεϊκό οξύ, η επιδερμική 15-λιποξυγενάση μετατρέπει αυτή κυρίως σε 13-υδροξυοκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-HODE) που ασκεί λειτουργικά αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες στον ιστό. Το αραχιδονικό οξύ (AA) μεταβολίζεται μέσω της κυκλοοξυγονάσης οδού στην προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών προσταγλανδίνες E_2 , $F_{2\alpha}$, και D_2 και λευκοτριένια (LTs). Το AA μεταβολίζεται επίσης μέσω της οδού 15-λιποξυγενάσης, κυρίως στο 15-υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (15-HETE), το οποίο έχει αντιφλεγμονώδη δράση. Έτσι, η ισορροπία μεταξύ προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών προϊόντων υπεροξειδωσής λιπιδίων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και στη ρύθμιση της φλεγμονής του δέρματος.[173]

Επιπρόσθετα, η υπεροξειδωση λιπιδίων προσβάλλει μεμβρανικά λιπίδια, κυρίως φωσφολιπίδια που περιέχουν PUFA, και μπορεί να προκαλέσει άμεσα φυσιολογικές μεταβολές στους οργανισμούς με την κατάρρευση της δομής της μεμβράνης και την επιδείνωση των πόρων που διαπερνούν τα διπλά στρώματα φωσφολιπιδίων, επηρεάζοντας τις λειτουργίες της ρευστότητας της μεμβράνης και της μεταφοράς ιόντων. Επίσης, τα λιπίδια διασταυρούμενης μεμβράνης και άλλα κυτταρικά συστατικά επηρεάζονται από φωτοχημικές αντιδράσεις που δημιουργούνται από οξειδωτική βλάβη. Από αυτές τις αντιδράσεις, η υπεροξειδωση λιπιδίων είναι αντιπροσωπευτική σε ακτινοβολημένους με υπεριώδη ακτινοβολία οργανισμούς. Η οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων συμβαίνει αφαιρώντας ηλεκτρόνια από τα λιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στη δομή και τη λειτουργία της μεμβράνης. [172]

Κεφ. 2ο| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Εισαγωγή

Ο διαβήτης, τύπου I και II, αποτελεί μία σοβαρή και επικίνδυνη νόσο, η οποία αφορά μεγάλο κομμάτι του πληθυσμού. Είναι μια ασθένεια που έχει σοβαρές επιπτώσεις στον οργανισμό και στο δέρμα και συχνά σχετίζεται και με άλλες ασθένειες. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες που έλαβαν μέρος σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ σακχαρώδους διαβήτη και καρκίνου, όμως όχι καρκίνου του δέρματος. Οι επιπλοκές του διαβήτη οφείλονται στα μη ρυθμισμένα επίπεδα γλυκόζης, και στα αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να αυξήσει την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες μειώνουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών, οδηγώντας σε βλάβες στο DNA και προάγοντας τον πολλαπλασιασμό κυττάρων. Επομένως, το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη διαβητικών επιπλοκών και καρκίνου του δέρματος. Υπάρχει δηλαδή συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων γλυκόζης, της παραγωγής του οξειδωτικού στρες και του δερματικού καρκίνου.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η πιθανή επιβλαβής δράση της UV ακτινοβολίας στο διαβητικό δέρμα και η πιθανότητα πρόκλησης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Μελετήθηκε η επίδραση της χρόνιας UV ακτινοβολίας σε φυσιολογικό και διαβητικό δέρμα (τύπου I και II), η πρόκληση ακανθοκυτταρικού καρκινώματος και τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μορίων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, ενώ η επίδραση της UV ακτινοβολίας στο υγιές δέρμα έχει μελετηθεί εκτενώς, η επίδραση της UV ακτινοβολίας στο διαβητικό δέρμα παραμένει ανεξερευνήτη, μολονότι την επίδραση του ηλίου τη δεχόμαστε όλοι και ένα πολύ μεγάλο κομμάτι του πληθυσμού πάσχει από διαβήτη.

Για το λόγο αυτό, έγινε προσπάθεια μελέτης συσχέτισης διαβήτη τύπου I και II και ακανθοκυτταρικού καρκινώματος μέσω UV ακτινοβολίας στο εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας και Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, από τη Μαρία Γιακουμάκη στα πλαίσια της διπλωματικής της έρευνας το έτος 2017. Τα αποτελέσματα που έλαβε, έδειξαν ότι το διαβητικό

δέρμα που δέχθηκε χρόνια υπεριώδη ακτινοβολία φάνηκε σε σύγκριση με το φυσιολογικό ακτινοβολημένο, αφυδατωμένο και με χαμηλή άδηλη απώλεια νερού. Η υπερκεράτωση που προκλήθηκε στην αρχή από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, μειώθηκε στο διαβητικό δέρμα. Τα λιπίδια του σμήγματος και η υπερμελάγχρωση της επιδερμίδας ήταν μειωμένα. Ακόμη, το οξειδωτικό στρες στην κεράτινη στιβάδα ήταν ενδεικτικά μειωμένο. Μετά το πέρας των 5 μηνών το ακτινοβολημένο φυσιολογικό δέρμα παρουσίασε προκαρκινικές εικόνες που μέχρι τον 8ο μήνα του πειράματος εξελίχθηκαν σε καρκινώματα (το πείραμα διήρκησε 8 μήνες). Σε αντίθεση με το ακτινοβολημένο διαβητικό δέρμα που δεν εμφανίστηκαν θηλώματα ή υπερκερατώσεις πόσο μάλλον καρκινώματα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποτέλεσαν κινητήρια δύναμη για την επανάληψη και έπειτα επιβεβαίωση του πειράματος, προκαλώντας ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα όχι μόνο σε μύες με διαβήτη τύπου I, αλλά και τύπου II. Για το λόγο αυτό, το πείραμα χωρίστηκε σε δύο στάδια.

Συνοπτικά για το πείραμα:

Αρχικά, το πρώτο στάδιο του πειράματος περιλάμβανε την πρόκληση διαβήτη τύπου II με δύο διαφορετικούς τρόπους, με βάση τη βιβλιογραφία. Και οι δύο τρόποι είχαν ήδη δοκιμαστεί σε μύες, όχι όμως στα πρότυπα μυών που δοκιμάστηκαν στο εργαστήριό μας, όπως περιγράφεται παρακάτω. Για να εφαρμοστούν οι δύο μέθοδοι στα πρότυπα αυτά, εγκρίθηκε πρωτόκολλο με αριθμό 5628/25-10-2018 και δόθηκε άδεια ώστε να ξεκινήσει το πείραμα.

Συγκεκριμένα, πήραμε 4 διαφορετικά πρότυπα άτριχων μυών, ηλικίας 4-6 μηνών. Τα πρότυπα αυτά ήταν SKH-hr-1 (λευκά), SKH-hr-2 (καφέ), SKH-hr-2 (μαύρα) και SKH-hr-2 + APOE (αποικία που δημιουργήθηκε στο εργαστήριό μας).

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να βρούμε την ιδανική μέθοδο πρόκλησης διαβήτη τύπου II (T2D), δηλαδή εκείνο που να προσομοιάζει καλύτερα τον ανθρώπινο διαβήτη, στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα και έπειτα να γίνει επιλογή εκείνου του πρότυπου μυός που θα ανταποκριθεί καλύτερα και θα δώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Έπειτα, αφού τελείωσε το πρώτο στάδιο και επιλέχθηκε η κατάλληλη μέθοδος και το πρότυπο μυός, ξεκίνησε το δεύτερο στάδιο του πειράματος που περιλάμβανε την πρόκληση ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σε φυσιολογικούς και διαβητικούς μύες με υπεριώδες φως.

Συγκεκριμένα, σε άτριχους φυσιολογικούς και διαβητικούς (τύπου I και II) αρσενικούς μύες τύπου SKH-hr-2(μαύροι) εφαρμόστηκε σχετικά υψηλή υπεριώδης ακτινοβολία (~3.5M.E.D.) για 6 μήνες 3 φορές την εβδομάδα και αξιολογήθηκαν βιοφυσικοί παράμετροι του δέρματος, το οξειδωτικό στρες και η συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μορίων σε αυτό και έγινε ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

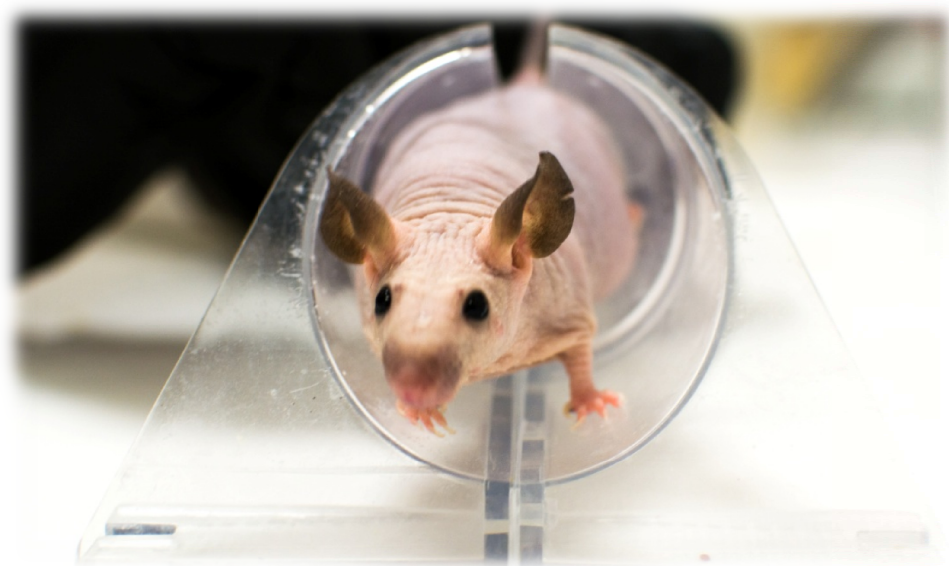
Για να ξεκινήσει το δεύτερο στάδιο εγκρίθηκε πρωτόκολλο με αριθμό 265/13-12-2018 και δόθηκε άδεια ώστε να ξεκινήσει το πείραμα.

Ο σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη του διαβητικού δέρματος αλλά και της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε αυτό με έμφαση στη πιθανότητα ανάπτυξης δερματικών καρκίνων στο διαβητικό δέρμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό και η μελέτη της οξειδωτικής κατάστασης και των λιπιδίων του δέρματος του ακτινοβολημένου διαβητικού και φυσιολογικού δέρματος. Με βάση το πείραμα αυτό επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της μελέτης της Μαρίας Γιακουμάκη.

2.2 |Υλικά&Μέθοδοι

Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-hr-2 (μαύροι), διαφόρων ηλικιών, από 3 μηνών μέχρι ενός έτους. Οι μύες εκτρέφονταν και στεγάζονταν στην Εγκατάσταση Πειραματισμού Μικρών Ζωικών Προτύπων (κωδικός εγκατάστασης: EL 25 BIO 06), στο εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας και Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου τηρούνται όλες οι προδιαγραφές του ΠΔ 56/2013 που αφορούν στη φροντίδα, την παρακολούθηση και τις εν γένει συνθήκες διαβίωσης των ζώων.



Εικόνα 32|Μυς τύπου SKH-hr-2 (μαύρο)

Κατά τη διάρκεια παραμονής των ζώων στη Μονάδα Μικρών Ζωικών Προτύπων της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, τα ζώα διαβίωναν σε ειδικούς κλωβούς (Tecniplast) διαστάσεων συμφώνων με την κείμενη Νομοθεσία, εντός των οποίων υπήρχε κατάλληλη καθαρή στρωμή και απρόσκοπτη πρόσβαση σε καθαρό νερό και τροφή 24 ώρες το εικοσιτετράωρο. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας είχαν επίσης επιλεγεί έτσι ώστε να δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης για τους συγκεκριμένους μύες όπως προβλέπεται από την αντίστοιχη ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία (θερμοκρασία: 22-25°C και υγρασία πάνω από 30%).

Όσον αφορά τα ζωικά πρότυπα, χρησιμοποιήσαμε, άτριχους μύες μόνο, οι οποίοι αποτελούν ικανοποιητικό πρότυπο (μοντέλο) για μελέτες στο δέρμα αλλά και για διαδερμική χορήγηση ουσιών.

Υλικά

2.2.1 Στρεπτοζοτοκίνη (STZ)

Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) είναι ένα αντινεοπλαστικό φάρμακο που καταστρέφει τα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων και χρησιμοποιείται ευρέως πειραματικά για την παραγωγή μοντέλου σακχαρώδους διαβήτη τύπου I (T1DM). Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) απομονώθηκε αρχικά από *Streptomyces achromogenes* το 1960, για τις διαβητογόνες ιδιότητες του, δείχνοντας ότι οι διαβητογόνες επιδράσεις οφείλονται στην επιλεκτική καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων. Ως αποτέλεσμα αυτής της δράσης, τα ζώα παρουσιάζουν ανεπάρκεια ινσουλίνης, υπεργλυκαιμία, πολυδιψία και πολυουρία, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I στον άνθρωπο.

Στο παρελθόν δοκιμάστηκε η χορήγησή της σε υψηλή δόση για να προκαλέσει μέσα σε 48 ώρες τη νέκρωση των β-κυττάρων. Ωστόσο, μετά τη χορήγηση πολλαπλών, χαμηλών δόσεων STZ σε μύες για 5 ημέρες, σημειώθηκε έναρξη της υπεργλυκαιμίας με καθυστέρηση. Αυτή η πολλαπλή προσέγγιση χαμηλής δόσης STZ βλάπτει τις παγκρεατικές νησίδες, προκαλώντας μια φλεγμονώδη διαδικασία που οδηγεί την περαιτέρω απώλεια β-κυτταρικής **δραστηριότητας που τελικά οδηγεί σε ανεπάρκεια** ινσουλίνης και υπεργλυκαιμία. Αυτή η απόκριση μοιάζει περισσότερο με τον T1DM στη παθογένεση και τις μορφολογικές αλλαγές, από ότι το πρωτόκολλο STZ μιας μεγάλης δόσης. Η πολλαπλή προσέγγιση STZ χαμηλής δόσης είναι που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για την παραγωγή ενός ζωικού μοντέλου T1DM.[181]

2.2.2 Νικοτιναμίδιο (NAD)

Το Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) είναι μια μορφή βιταμίνης B3 που βρίσκεται στα τρόφιμα και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής και για φαρμακευτική αγωγή. Το νικοτιναμίδιο χρησιμοποιείται πειραματικά σε μύες για μερική προστασία των β-κυττάρων έναντι της STZ. Αυτός ο συνδυασμός παράγει ένα μοντέλο ανεπαρκούς ινσουλίνης, αλλά όχι ανθεκτικού στην ινσουλίνη, T2D. Χαρακτηρίζεται από σταθερή, μέτρια υπεργλυκαιμία που σχετίζεται με απώλεια κατά περίπου 60% της λειτουργίας β-κυττάρων. [181, 182]

Μέθοδοι

Το πρωτόκολλο μελέτης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

2.2.3 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΗ

Τα δύο δυνητικώς χρήσιμα μοντέλα του T2D θα παρουσιαστούν στη συνέχεια με χρήση Στρεπτοζοτοκίνης (STZ).

Στο πρώτο μοντέλογίνεται ταυτόχρονη χορήγηση Νικοτιναμιδίου (NAD) για μερική προστασία των β-κυττάρων του παγκρέατος έναντι της STZ.[183] Αυτό το μοντέλο βασίζεται σε μια έρευνα,[185]στην οποία διαπιστώθηκε ότι το Νικοτιναμίδιο προστατεύει από το διαβητογόνο αποτέλεσμα της STZ, όπως σημειώθηκε παραπάνω. [184] Ωστόσο, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς με T2D εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, εκτός από την εξασθενημένη έκκριση ινσουλίνης, έχει αναπτυχθεί ένα άλλο μοντέλο για να μιμείται με ακρίβεια την ανθρώπινη κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση, τα ζώα εκτίθενται σε δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και σακχαρόζη για να παράγουν αντίσταση στην ινσουλίνη, ακολουθούμενη από χορήγηση μέτριας δόσης STZ για τη μείωση της ικανότητας β-κυττάρων για

παραγωγή ινσουλίνης.[186] Το αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου είναι η υπεργλυκαιμία, που σχετίζεται με την υπερινσουλιναιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Για την πρόκληση διαβήτη τύπου I έγινε ένεση Στρεπτοζοτοκίνης, για ολική καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος.

Χρησιμοποιήσαμε 4 τύπους άτριχων μυών ως κατωτέρω:

1. SKH-hr-1
2. SKH-hr-2 (μαύρα)
3. SKH-hr-2 (καφέ)
4. SKH-hr-2-APOE

Σε κάθε ζωικό πληθυσμό, εφαρμόσαμε τα 2 αναφερόμενα ανωτέρω πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη τύπου II (T2D). Συνολικά δηλαδή πραγματοποιήσαμε 8 πειράματα και για κάθε πείραμα χρησιμοποιήσαμε 7 μύες. Πιο αναλυτικά, είχαμε τις εξής ομάδες:

- | | | |
|---------------------|---|--|
| 1. SKH-hr-1 | } | THE STREPTOZOTOCIN-
NICOTINAMIDE MICE MODEL |
| 2. SKH-hr-2 (μαύρα) | | |
| 3. SKH-hr-2 (καφέ) | | |
| 4. SKH-hr-2-APOE | | |
| 5. SKH-hr-1 | } | THE HIGH FAT-DIET
STREPTOZOTOCIN MICE MODEL |
| 6. SKH-hr-2 (μαύρα) | | |
| 7. SKH-hr-2 (καφέ) | | |
| 8. SKH-hr-2-APOE | | |

8 ΟΜΑΔΕΣ
ΣΥΝΟΛΙΚΑ

Συνολικά χρησιμοποιήσαμε **56** άτριχους αρσενικούς μύες. **Επιλέγονται αρσενικοί** μύες καθώς οι θηλυκοί είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην στρεπτοζοτοκίνη και έτσι τα περισσότερα πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη διεξάγονται σε αρσενικούς μύες [187].

Μέθοδος 1| THE STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE MICE MODEL (2 εβδομάδες)

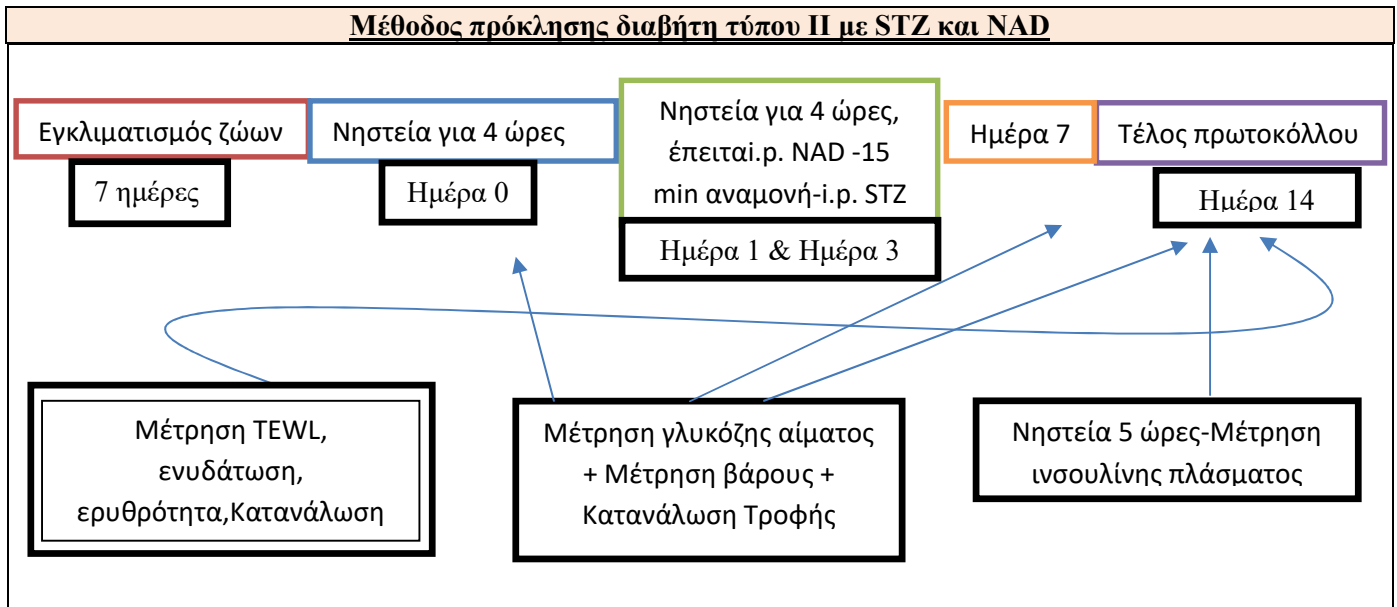
Προετοιμασία μυών:

1. 7 ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, εγκλιματίσαμε τους μύες σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος δηλαδή, στους $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και υγρασία $55\% \pm 5\%$, με 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους (αναμμένα φώτα από τις 8:00 και σβησμένα φώτα από τις 20:00). Κάθε κλωβός περιείχε 1 ομάδα, δηλαδή 7 αρσενικούς μύες οι οποίοι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.
2. Την ημέρα πριν την πρόκληση του διαβήτη (Ημέρα 0), όλοι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 5 ώρες (από τις 09:00 έως τις 14:00) και έγινε μέτρηση γλυκόζης - νηστείας. Η παροχή νερού γινόταν κανονικά.

Πρόκληση διαβήτη με STZ και NAD:

3. Ημέρα 1: Το NAD διαλύεται σε φυσιολογικό ορό και εγχέεται ενδοπεριτοναϊκώς (i.p.) σε δόση 120 mg/kg . **15 λεπτά πριν** από τη χορήγηση της STZ.
4. Ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) ένεση STZ , διαλυμένη (εκείνη τη στιγμή) σε 50 mmol/L ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού (pH 4,5) σε δόση 100 mg/kg σωματικού βάρους **15 λεπτά μετά** τη χορήγηση του NAD.
Οι μύες παρέμειναν νηστικοί 4 (από τις 09:00 έως τις 13:00) ώρες πριν τη χορήγηση ενέσεων
5. Ημέρα 3: Μετά από ένα διάστημα 1 ημέρας, το NAD και η STZ χορηγήθηκαν και πάλι με τον ίδιο τρόπο.
6. Η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος (BG), το σωματικό βάρος των μυών και η κατανάλωση τροφής μετρήθηκαν τις ημέρες 0, 7 και 14, του πειράματος σε μία καθορισμένη ώρα (09:00 π.μ.). Την τελευταία ημέρα (14^η) έγινε λήψη

αίματος για μέτρηση συγκέντρωσης ινσουλίνης στο πλάσμα. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.



Μέθοδος 2|THE HIGH FAT-DIET STREPTOZOTOCIN MICE MODEL (3+2 εβδομάδες)

Προετοιμασία μυών:

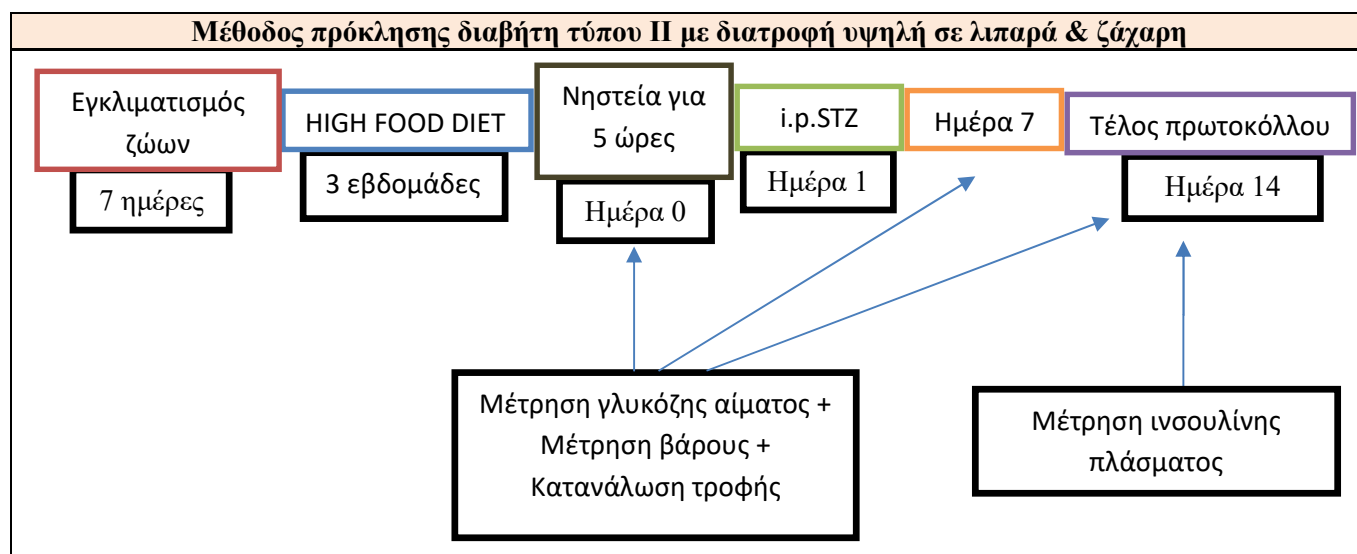
1. 7ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, εγκλιματίσαμε τους μύες σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος δηλαδή, στους $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και υγρασία $55\% \pm 5\%$, με 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους (αναμμένα φώτα από τις 8:00 και σβησμένα φώτα από τις 20:00). Κάθε κλωβός θα περιέχει 1 ομάδα, δηλαδή 7 αρσενικούς μύες οι οποίοι θα έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.
2. Μετά τον εγκλιματισμό ξεκινάμε στους μύες δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (HFD) για 3 εβδομάδες. Χρησιμοποιήσαμε την τροφή με την οποία εκτρέφονται οι μύες του εργαστηρίου (pellets 6mm) και προσθέσαμε ζωικό λίπος μέχρι να πάρουμε 60% kcal σε λίπη. Το ζωικό λίπος χρησιμοποιείται στη δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, καθώς είναι γνωστό ότι το

λίπος αυτού του είδους προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη [188]. Στους παρακάτω Πίνακες παρουσιάζεται η δίαιτα με τα συστατικά της.

3. Την ημέρα πριν την πρόκληση του διαβήτη (Ημέρα 0), όλοι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 5 ώρες (από τις 09:00 έως τις 14:00) και έγινε μέτρηση γλυκόζης - νηστείας. Η παροχή νερού γινόταν κανονικά.

Πρόκληση διαβήτη με χαμηλή δόση STZ (2 εβδομάδες):

4. Ημέρα 1: Ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) ένεση STZ, διαλυμένη (εκείνη τη στιγμή) σε 50 mmol / L ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού (pH 4,5) σε δόση 75 mg / kg σωματικού βάρους για την πρόκληση μερικής ανεπάρκειας ινσουλίνης.
5. Οι μύες παρέμειναν νηστικοί 4 (από τις 09:00 έως τις 13:00) ώρες πριν τη χορήγηση ενέσεων.
6. Ημέρα 14: Δυο εβδομάδες μετά την έγχυση STZ, οι περισσότεροι μύες που είχαν λάβει HFD / STZ εμφάνισαν υπεργλυκαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη δυσανεξία στη γλυκόζη.
7. Η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα (BG), το σωματικό βάρος των μυών και η κατανάλωση τροφής μετρήθηκαν τις ημέρες 0, 7 και 14 του πειράματος. Την τελευταία ημέρα (14^η) έγινε λήψη αίματος για μέτρηση συγκέντρωσης ινσουλίνης στο πλάσμα.



Υλικά

Ανάλυση συστατικών της τροφής που εκτρέφονται οι μύες στο εργαστήριο:

Πλήρης ζωοτροφή για μύες	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Αραβόσιτος
	Σιτάρι
	Σογιάλευρο
	Πίτυρα σίτου
	Γλουτένη αραβοσίτου
	Ιχθυάλευρο
	Φυτικά Έλαια
	Ανόργανα Άλατα
	Αμινοξέα
	Βιταμίνες
	Ιχνοστοιχεία

Χημική Ανάλυση	
Ολικές Πρωτεΐνες	18.0 %
Ολικές Λιπαρές Ουσίες	4.4 %
Ινώδεις Ουσίες	3.4 %
Ανόργανα Άλατα	5.6 %
Ασβέστιο	0.85 %
Φώσφορος	0.62 %

Βιταμίνες και Ιχνοστοιχεία (προσθήκη ανά κιλό τροφής)	
Βιταμίνη Α	13500 IU
Βιταμίνη D3	3500 IU
Βιταμίνη Ε	130 IU
Mn	55 mg
Fe	105 mg
Zn	70 mg
Se	300 mg
Ιο	400 mg

Προσθήκη συστατικών στην τροφή του εργαστηρίου με βάση τη βιβλιογραφία:

Προσθήκη Συστατικών
12,5 % Σουκρόζη
27,7 % Ζωικό Λίπος

Διαδικασία παρασκευής τροφής :

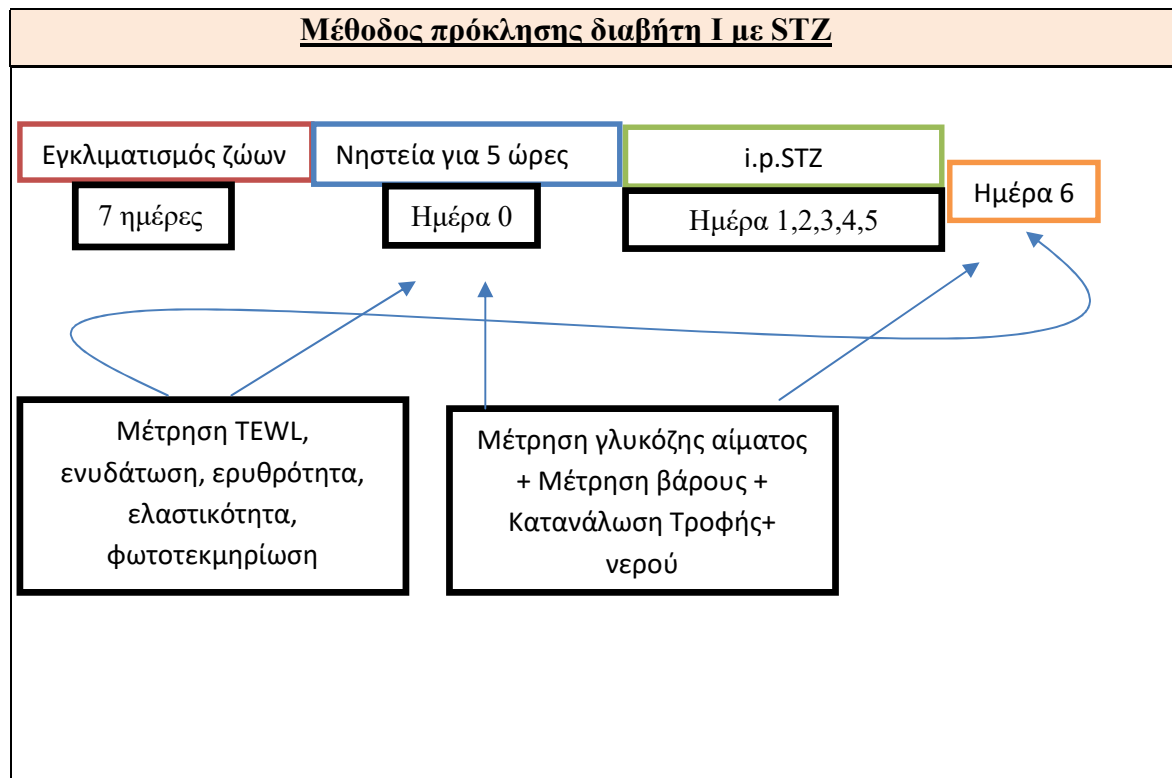
- Χρησιμοποιήσαμε 100gr από την τροφή με την οποία εκτρέφονται οι μύες του εργαστηρίου σε μορφή σκόνης.
- Μετά από θέρμανση του λίπους, ζυγίσαμε μέχρι να πάρουμε 40gr & το προσθέσαμε στην κονιοποιημένη τροφή.
- Ζυγίσαμε 20gr ζάχαρη διαλυμένη σε διπλάσια ποσότητα νερού & την προσθέσαμε στο μείγμα.
- Αναμείξαμε και τα 3 συστατικά και μορφοποιήσαμε σε κατάλληλο σχήμα.



Εικόνα33| Τροφή που παρασκευαζόταν για το δεύτερο πρωτόκολλο πειράματος

Πρόκληση διαβήτη τύπου I με STZ (5 ημέρες):

Ενίεται στρεπτοζοτοκίνη ενδοπεριτοναϊκώς (i.p.) σε διάλυμα κιτρικού οξέος για 5 συναπτές ημέρες σε δόση 30mg/kg. Οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 4 ώρες πριν τη στιγμή της ένεσης και το διάλυμα της στρεπτοζοτοκίνης παρασκευαζόταν καθημερινά πριν την ένεση.



1. Πρόκληση ακανθοκυτταρικού καρκίνου σε διαβητικούς μύες

Έπειτα ακολούθησε το πείραμα πρόκλησης ακανθοκυτταρικού καρκίνου σε διαβητικούς μύες.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 40 αρσενικοί άτριχοι μύες SKH-hr-2 (μαύροι), οι οποίοι στη συνέχεια χωρίστηκαν σε 4 ομάδες, αποτελούμενη η κάθε ομάδα από 10 άτριχους μύες. Οι ομάδες σχηματίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία των ζώων, ώστε να είναι ομοιόμορφες.

Πιο αναλυτικά, προτείνονται οι κάτωθι ομάδες:

- 1) Μύες Φυσιολογικοί (Μάρτυρες)
- 2) Μύες με διαβήτη τύπου I + υπεριώδες φως
- 3) Μύες με διαβήτη τύπου II + υπεριώδες φως
- 4) Μύες Φυσιολογικοί + υπεριώδες φως

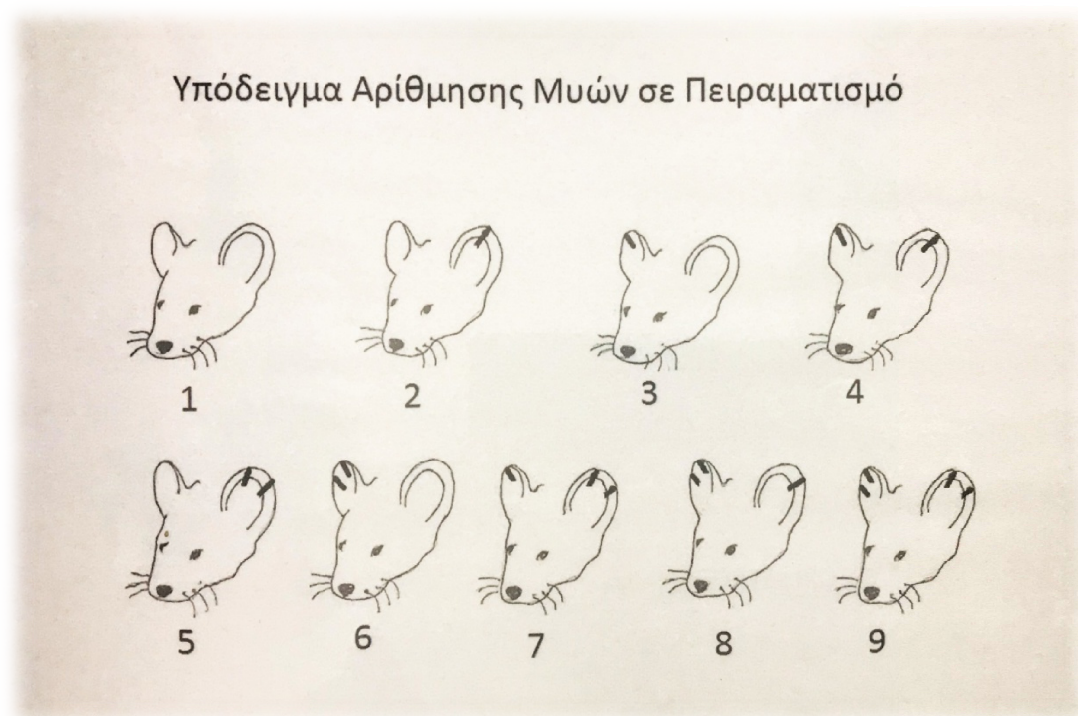
4 ΟΜΑΔΕΣ
ΣΥΝΟΛΙΚΑ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4
	Μύες Φυσιολογικοί (Μάρτυρες)	Μύες με διαβήτη τύπου I + υπεριώδες φως	Μύες με διαβήτη τύπου II + υπεριώδες φως	Μύες Φυσιολογικοί + υπεριώδες φως
Πρόκληση διαβήτη		Διαβήτης τύπου I με ένεσεις Στρεπτοζοτοκίνης	Διαβήτης τύπου II με ενέσεις Νικοτιναμιδίου & Στρεπτοζοτοκίνης	
Καρκινογένεση		UV	UV	UV

Πίνακας 1| Συνοπτικός πίνακας των ομάδων του πειράματος.

Αριθμήσαμε τους μύες με κόψιμο των αυτιών, έτσι ώστε κάθε μυς να αποκτήσει έναν αριθμό, σύμφωνα με την παρακάτω εικόνα:



Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος κάποια ζώα ανέβαζαν υψηλά επίπεδα γλυκόζης ($>300\text{mg/dl}$) και έτσι αυξήθηκε ο καθαρισμός των κλωβών, λόγω της πολυδιψίας και της πολυουρίας που εμφάνιζαν.

Πριν την έναρξη της ακτινοβολήσης των μυών, έγινε πρόκληση διαβήτη τύπου I σε 10 μύες και διαβήτη τύπου II σε 10 μύες εξίσου.

Η γλυκόζη μετρήθηκε μία ημέρα πριν την πρόκληση του διαβήτη σε όλους τους μύες και έπειτα γινόταν μετρήσεις κάθε εβδομάδα μετά το πέρας του πρωτοκόλλου αυτού και συνεχίστηκε και μετά την έναρξη του πρωτοκόλλου πρόκλησης ακανθοκυτταρικού καρκίνου μέχρι το τέλος του πειράματος.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, κάποιοι μύες δεν ανέβασαν τα επιθυμητά επίπεδα γλυκόζης ώστε να αποκτήσουν διαβήτη τύπου I και II. Συγκεκριμένα, οι 14 από τους 20 μύες παρουσίασαν αντίσταση και επομένως κρίθηκε απαραίτητη η επανάληψη χορήγησης των ενέσεων στις αρχικές τους δόσεις αλλάζοντας μόνο τη συχνότητα στο πρωτόκολλο του διαβήτη τύπου I. Συγκεκριμένα, έγινε χορήγηση μεγαλύτερης δόσης

στρεπτοζοτοκίνης των 50 mg/kg για 3 συνεχόμενες ημέρες και όχι για 5. Η πρόκληση του διαβήτη τύπου II ακολούθησε την αρχική διαδικασία χωρίς αλλαγές. Οι επαναληπτικές ενέσεις πραγματοποιήθηκαν ενάμιση μήνα μετά την αρχική πρόκληση διαβήτη. Οι μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης συνεχίστηκαν αλλά η αντίσταση των μυών παρέμενε. Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων, έγιναν επαναληπτικές ενέσεις τους επόμενους μήνες του πειράματος. Κατά την πορεία της διαδικασίας αυτής σχεδόν οι μισοί μύες ανέπτυξαν τον επιθυμητό διαβήτη, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους που παρέμειναν στα ίδια επίπεδα γλυκόζης. Μία πιθανή εξήγηση φαίνεται να είναι η μεγάλη ηλικία των περισσότερων μυών, γεγονός το οποίο φαίνεται να δημιουργεί αντίσταση στην εμφάνιση του διαβήτη.

Η έκθεση των μυών στην υπεριώδη ακτινοβολία ξεκίνησε κανονικά μετά την πρώτη χορήγηση των ενέσεων. Διαρκούσε 5sec την πρώτη εβδομάδα και κάθε επόμενη αυξανόταν κατά 3sec έως την έκτη που σταθεροποιήθηκε στα 20sec (3 M.E.D) μέχρι και τη λήξη του πειράματος. Επίσης, η ακτινοβολία ελεγχόταν μία φορά την εβδομάδα, ώστε η ισχύς της να είναι σταθερή ($UVA=6,5mW/cm^2$ και $UVB=6,5mW/cm^2$).

Πριν την έναρξη έκθεσης των μυών σε υπεριώδες φως και κατά τη διάρκεια του πειράματος μέχρι και τη λήξη του λαμβάνονταν φωτογραφίες κάθε εβδομάδα.

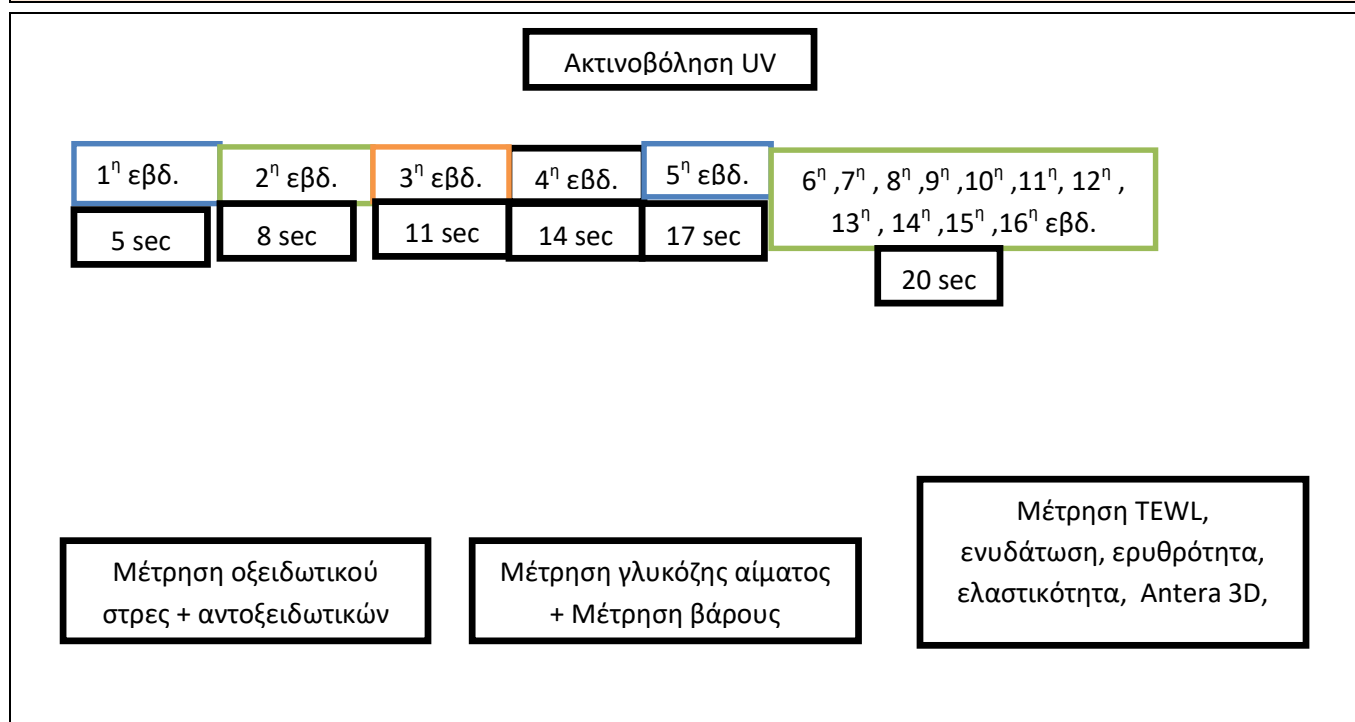
Οι μετρήσεις άδηλης απώλειας νερού, πάχους δέρματος, ελαστικότητας, ενυδάτωσης, σμήγματος, μελανίνης και ερυθρήματος πραγματοποιήθηκαν την ημέρα 0 και μετά κάθε μήνα, εκτός από τη μέτρηση του βάρους που γινόταν μαζί με τη γλυκόζη κάθε εβδομάδα. Τα strippings ελήφθησαν τον 1^ο και τον 6^ο μήνα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος πέθανε ένας μυς με διαβήτη τύπου I λόγω του υψηλού επιπέδου γλυκόζης στο αίμα, δύο υγιείς (μάρτυρες) και ένας υγιής μυς που λάμβανε μόνο UV ακτινοβολία, πιθανώς λόγω μεγάλης ηλικίας.

2.2.4 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

- Προκαλείται με έκθεση της πλάτης των μυών σε υπεριώδες φως (UVA, UVB).
- Η ακτινοβολήση γίνεται με ειδική για δερματολογικές εφαρμογές λυχνία ξένον (Universal Arc Lamp Housing 66021, Xenon Lamp 1000W, Oriel Instruments) η οποία είναι συνδεδεμένη με κατάλληλο τροφοδοτικό (68820 Universal Power Supply, Oriel Instruments).
- Η ισχύς της λάμπας είναι 5 mW/cm^2 UVA, $5,5 \text{ mW/cm}^2$ UVB
- Η αρχική δόση θα είναι στα 5s την πρώτη εβδομάδα και για κάθε επόμενη εβδομάδα θα γίνεται αύξηση της δόσης κατά 3s μέχρι να φτάσουν τα 20s τα οποία αντιστοιχούν σε 3 ελάχιστες ερυθρηματώδεις δόσεις(3MED).

Μέθοδος πρόκλησης ακανθοκυτταρικού καρκίνου



2.3 | Πρωτόκολλα- Όργανα μετρήσεων

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν:

2.3.3 Λήψη stripping από το δέρμα των μυών

Όργανα: χειρουργικό ψαλίδι, χειρουργική λαβίδα, κολλητική ταινία 3M, αναλυτικός ζυγός, αλουμινόχαρτο

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του stripping στους μύες. Με χειρουργικές λαβίδες και ψαλίδι λαμβανόταν τμήμα της κολλητικής ταινίας σε διαστάσεις 2cm × 2cm. Το κομμάτι κολλητικής ταινίας πρώτα ζυγιζόταν έπειτα πιεζόταν στη πλάτη των μυών 3 φορές και μετά ξανά ζυγιζόταν. Τα strippings τοποθετούνταν σε αριθμημένα ανάλογα με το ζώο κομμάτια αλουμινόχαρτου και φυλάσσονταν στους -80°C.

2.3.4 Μέθοδος εκχύλισης strippings για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών

Υλικά-Σκεύη

- ποτήρια ζέσεως για τα διαλύματα
- πιπέτες και τα αντίστοιχα tips (2-20μl, 20-100μl, 100-1000 μl)
- vortex
- σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια (στα ντουλαπάκια της HPLC)
- eppendorfs
- ανεξίτηλο μαρκαδοράκι
- λαβίδα με λεπτά άκρα
- μαύρο δοχείο με πάγο

A. Παρασκευή διαλυμάτων

1. $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$
2. $1\text{mMNa}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (στα ντουλάπια της HPLCSIGMA) ΣΕ 90% MeOH:
 H_2O .

πχ για 30mL δλμτος: Διαλύουμε το EDTA σε 3mL H_2O υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση (αν χρειαστεί) και όταν διαλυθεί προσθήκη 27mL MeOH.

$$\begin{aligned} **M_{\text{W Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}} &= 372.2 & 1000\text{mL} &\rightarrow 1\text{mmol Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \\ & & 30 \text{ ml} &\rightarrow (x \cdot M_{\text{W}}) \text{mg} \end{aligned}$$

3. 10mg/mL BHT (στα ντουλάπια της HPLC) σε ETOH.
πχ. για 10mL διαλύματος : $1\text{mL ETOH} \rightarrow 10\text{mg BHT}$
 $10\text{mL ETOH} \rightarrow x \text{ mg BHT}$

4. 10Mm Desferal (στην κατάψυξη) σε H_2O HPLC
πχ. για 10 mL : $1000\text{ml} \rightarrow 10\text{mmol}$
 $**M_{\text{W Desferal}} = 560.684$ $5\text{mL} \rightarrow (x \cdot M_{\text{W}}) \text{mg}$

***** τα H_2O , MeOH και ETOH που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι καθαρότητας HPLC**

B. Διαδικασία εκχύλισης

1. Τα 2 scotch τοποθετούνται αντιδιαμετρικά μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο και προστίθενται:
 - I. 0,5mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$
 - II. 75μl 10mg/mL BHT
 - III. 200μl 90% MeOH/1mM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - IV. 2μl 10Mm Desferal σε H_2O HPLC
2. Ανάδευση του φιαλιδίου στο vortex στις 2500 στροφές για 1λεπτό.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 7 λεπτά στις ≈ 9.500 στροφές στους 4°C (* 9500 στροφές αναγράφεται στο μηχάνημα. Τον διακόπτη του μηχανήματος τον γυρίζουμε μεταξύ 11-12000 στροφές μέχρι να πιάσει ουσιαστικά τις 9500)
4. 200μl του υπερκείμενου μεταφέρονται σε eppendorf (φύλαξη στους -80°C)

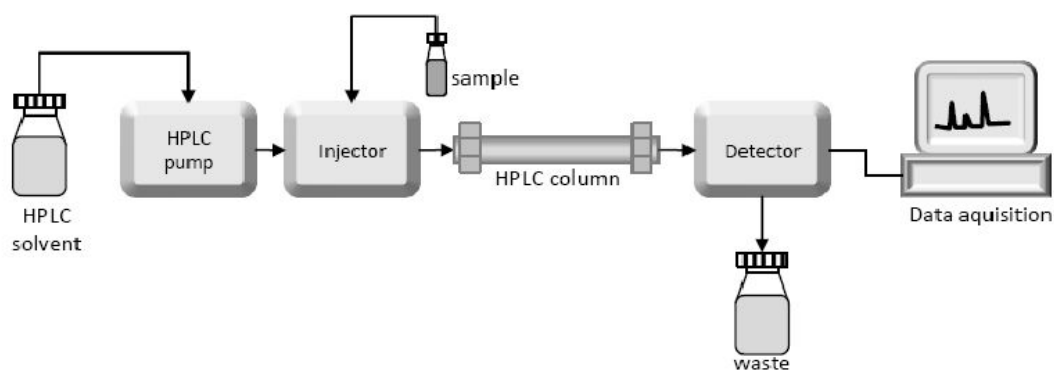
2.3.5 HPLC (High-performance liquid chromatography)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια τεχνική στην αναλυτική χημεία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε συστατικού σε ένα μείγμα. Στηρίζεται σε αντλίες για να περάσει υγρό διαλύτη υπό πίεση που περιέχει το μείγμα δείγματος μέσω στήλης γεμάτης με στερεό πληρωτικό υλικό. Κάθε συστατικό του δείγματος αλληλεπιδρά ελαφρώς διαφορετικά με το πληρωτικό υλικό, προκαλώντας διαφορετικές ταχύτητες ροής για τα διάφορα συστατικά και οδηγώντας στον διαχωρισμό των συστατικών καθώς ρέουν έξω από τη στήλη.

Το δραστικό συστατικό της στήλης, το πληρωτικό, είναι συνήθως ένα κοκκώδες υλικό κατασκευασμένο από στερεά σωματίδια (π.χ. σίλικα, πολυμερή κλπ.) Μεγέθους 2-50 μm . Τα συστατικά του μείγματος διαχωρίζονται μεταξύ τους λόγω των διαφορετικών βαθμών αλληλεπίδρασής τους με τα απορροφητικά σωματίδια. Το υπό πίεση υγρό είναι τυπικά ένα μίγμα διαλυτών (π.χ. νερό, ακετονιτρίλιο και / ή μεθανόλη) και αναφέρεται ως "κινητή φάση". Η σύνθεση και η θερμοκρασία του παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διαχωρισμού επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των συστατικών του δείγματος και του πληρωτικού. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι φυσικής φύσεως, όπως είναι το υδρόφοβο (διασπορά), διπολικό-διπόλιο και ιονικό, συννηθέστερα ένας συνδυασμός.[189, 190]

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- I. Σύστημα παροχής διαλυτών
- II. Αντλία
- III. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη
- IV. Χρωματογραφική στήλη
- V. Ανιχνευτή
- VI. Σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων



Εικόνα 34 |Το σχήμα ενός οργάνου HPLC τυπικά περιλαμβάνει έναν απαερωτήρα, έναν δειγματολήπτη, αντλίες και έναν ανιχνευτή. Ο δειγματολήπτης φέρνει το μείγμα δείγματος στο ρεύμα κινητής φάσης το οποίο το μεταφέρει στη στήλη. Οι αντλίες παρέχουν την επιθυμητή ροή και σύνθεση της κινητής φάσης μέσω της στήλης. Ο ανιχνευτής παράγει ένα σήμα ανάλογο της ποσότητας του συστατικού δείγματος που αναδύεται από τη στήλη, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος. Ένας ψηφιακός μικροεπεξεργαστής και λογισμικό χρήστη ελέγχουν το όργανο HPLC και παρέχουν ανάλυση δεδομένων.[189, 190]

Διαδικασία

Προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική προστασία του δέρματος μυών με τη μέτρηση των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών ασκορβικού και ουρικού οξέος (δια της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας υψηλήςπίεσης σε σύνδεση με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή) σε δέρμα υγιές και σε δέρμα που δέχτηκε μακροχρόνια UV ακτινοβολία. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν έπειτα από τη μέθοδο παραλαβήςstripping του δέρματος από την πλάτη μύος, δηλαδή τη διαδοχική εφαρμογή και αφαίρεση δύο scotch, τα οποία στη συνέχεια εκχυλίστηκαν ώστε να είναι έτοιμα για χρήση στη HPLC.

Προετοιμασία των Προτύπων Διαλυμάτων

Ουρικού & ασκορβικού οξέος

Ζυγίστηκαν 0,001761g ασκορβικού και 0,001681g ουρικού οξέος αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml σε κινητή φάση. Παρασκευάστηκαν έτσι μητρικά διαλύματα συγκέντρωσης των 100 μM . Από τα παραπάνω μητρικά με κατάλληλες αραιώσεις και διαλύτη αραιώσης την κινητή φάση παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ασκορβικού και ουρικού οξέος συγκεντρώσεων : 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0.5 μM , 0.05 μM .

$M_{\text{ascorbic acid}} = 176,1$ $M_{\text{uric acid}} = 168,1$

Παρασκευή κινητής φάσης

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κινητών φάσεων ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC της Fisher Chemical.

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

Η κινητή φάση αποτελείται από methanol:water 5:95 (v/v) και τα εξής άλατα:

- i. Οξικό νάτριο CH_3COONa 800 mM 5% της κινητής φάσης με ρύθμιση του $\text{pH}=4.75$
- ii. Tetraoctyl ammonium bromide 3,66 μM
- iii. Dodecyl trimethyl ammonium bromide 200 μM
- iv. $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,210g για 1 lt κινητής φάσης)

Οξικόνάτριο CH_3COONa

Χημικός τύπος: CH_3COONa

Μοριακό βάρος: 82.0338

Tetraoctylammoniumbromide

Χημικός τύπος: C₃₂H₆₈BrN

Μοριακό βάρος: 546.79

Dodecyltrimethylammoniumbromide

Χημικός τύπος: C₁₅H₃₄BrN

Μοριακό βάρος: 308.34

Η κινητή φάση παρασκευάστηκε με διάλυση των αλάτων Tetraoctyl ammonium bromide, Dodecyl trimethyl ammonium bromide και Na₂EDTA·2H₂O σε σύστημα διαλυτών methanol:water 5:95 (v/v). Τοποθετώ την κινητή φάση σε υπερήχους για 15 λεπτά. Στη συνέχεια υπολογίζεται το pH της κινητής φάσης. Το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίστηκε σε 4.57 με οξικό νάτριο. Η κινητή φάση τοποθετείται σε υπερήχους ξανά τουλάχιστον 5 λεπτά και τέλος την φιλτράρω.

Μέθοδος

Κινητή φάση

1. Επιλεγώ το κατάλληλο σύστημα διαλυτών
2. Διαλύω την απαραίτητη ποσότητα άλατος στο σύστημα διαλυτών.
ΠΡΟΣΟΧΗ πιθανά η παράμετρος αυτή να αλλάζει.
3. Α) Φιλτράρω τη κινητή φάση κάνοντας διήθηση υπό κενό με millipore (υάλινο σκεύος στο ντουλάπι της HPLC χωρίζεται σε 3 μέρη: [1] κωνική φάυλη, [2] σύνδεση μεταλλική, [3] ηθμός)
Β) τοποθετώ ανάμεσα στο [1] και [3] φιλτράκι διήθησης.
Υπάρχουν 2 είδη φίλτρων υδρόφοβο και υδρόφιλο ανάλογάμε τη πολικότητα του διαλυτή.
4. Τοποθετώ στους υπερήχους τη κινητή φάση για 15 με 30 λεπτά. Κάθε φορά πριν το χρησιμοποιήσω.

Αντλία

1. Ελέγχω το loop.
2. Ανοίγω την αντλία (κουμπί πίσω).
3. Συνδέω τη κινητή φάση που έχω ήδη βάλει στους υπερήχους.
4. Προσέχω το φιλτράκι της αντλίας να ακουμπά πάντα στον πάτο.
5. **Status**→Initialize→ 1→enter→ A:0.0, B: 100%, C: 0.0 + flow: 0.2→enter→Initialize→ 1→enter→run
6. Ρύθμιση ροής:**Status**και ρυθμίζω τη ροή (Πρέπει να ανεβαίνει σταδιακά κατά 0,2, ξεκινάμε από το 0,0 ως τη ροή που θέλουμε). Πατάω **enter**> και **run** ξεκινάει η ροή. **Stop** σταματάει. Πριν πατήσω **run**περιμένω να ανάψει το λαμπάκι READY.
7. Κάνω purge στη κινητή φάση.Ρυθμίζωροή 3ml/min, πατάω **Purge**→1→enterκαιμετά από περίπου 3minπατάω stop.
Όταν κάνω purge προσοχή ποτέ δεν έχω πάνω τη στήλη και ανιχνευτή!
8. Συνδέω στην αντλία τη στήλη (η ροή φαίνεται από το βελάκι) με τον ανιχνευτή (κλειστό).
9. Ρυθμίζω τη ροή (πχ. 1,2 ml/min), ελέγχοντας να τρέχει η κινητή φάση (μετά τα 0,4 ml/min) από το σωληνάκι του ED.
10. Ρυθμίζω τον φούρνο στους 25°C (Κρατώντας πατημένο το διακόπτη προς το SETαλλάζω την τιμή της θερμοκρασίας).
11. Αφήνω να τρέχει η κινητή φάση για 50 λεπτά.
12. Στα τελευταία 20 λεπτά ανοίγω τον ανιχνευτή για να σταθεροποιηθεί.

Ανιχνευτής

1. Ανοίγω τον ανιχνευτή (ροή 1.2ml/min).
2. Ορίζω τα επιθυμητά settings
3. Αφήνω τον ανιχνευτή να σταθεροποιηθεί, εφαρμόζοντας την κατάλληλη τάση π.χ. 600 mV ανεβάζοντας σταδιακά ανά 5mV. Η ένδειξη πρέπει να κινείται από 0 έως 10 nA. Όταν πέφτει στο 0nA, ανεβάζω ανά 5.
4. Όταν φτάσει στα 600 mV αφήνω για δυο ώρες.
5. Μηδενίζω με AUTOZERO όταν σταθεροποιηθεί στα 600 mV (και πριν από κάθε ένεση).

Settings	
Oxidation	πατημένο
Response	std
Range	Πατημένο μαύρο κουμπί (x10) και πατημένο το κουμπί 0.5

Ενέσεις

1. Ενώ πρώτα το διαλύτη μου (για να ξεπλένεται το loop, με 80μl) και μετά τα δείγματα (20 μl) !!
2. Πριν ενέσω το loop είναι στο load.
3. Η ένεση δεν πρέπει να έχει φυσαλίδες!!! Προσοχή!
4. Μόλις ενέσω γυρνάω το loop στο inject.
5. Όταν η ουσία μου βγει στο χρωματογράφημα στον επιθυμητό χρόνοέκλουσης πατάω stop και γυρνάω το loop στο load. Μόνο όταν γυρίσω το loop στο load αφαιρώ την ένεση.
6. Πριν ενέσω οτιδήποτε άλλο ενώ είμαι στο load ξεπλένω και τη σύριγγα και το loop (80 μl).

ClarityLite

1. Ανοίγω τον υπολογιστή και το πρόγραμμα ClarityLite.
2. Πατάω το DataAcquisition
3. Με το που κάνω την ένεση πατάω SingleAnalysis και δίνω το όνομα του δείγματος.
4. Όταν τελειώσει η ένεση πατάω stop (πχ 10 λεπτά). Τότε γυρνάω στο load και αφαιρώ την σύριγγα!!

Κλείσιμο και Καθάρισμα της Στήλης και του ανιχνευτή με H₂O_{HPLC}

1. Διηθώ (όπως στο βήμα 3 της προετοιμασίας της κινητής φάσης) και απαερώνω (όπως στο βήμα 4 της προετοιμασίας της κινητής φάσης) το μείγμα διαλυτών $\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ (Διατηρείται για μία εβδομάδα!)
2. Κατεβάζω σταδιακά (ανά 0.2) το flowrate έως το 0 και κλείνω τον ανιχνευτή.
3. Κλείνω από την HPLC το A (δεξιά)
4. Μεταθέτω τα 2 σωληνάκια από τη φιάλη της κινητής φάσης στη φιάλη με το H_2O .
5. Αποσυνδέω τον ED από την στήλη.
6. Κάνω purge (όπως στα βήματα της αντλίας).
7. Ρυθμίζω το flowrate στο 0.2 ml/min. Συνδέω την στήλη και τον ανιχνευτή (αλλά κλειστό!) και ρυθμίζω την ροή στο 1.2ml/min(όπως στα βήματα της αντλίας).
8. Αφήνω το σύστημα να ξεπλένεται για 45 λεπτά.
9. Κατεβάζω σταδιακά (ανά 0.2) το flowrate έως το 0.
10. Επανατοποθετώ τα 2 σωληνάκια στην αρχική τους φιάλη (κινητή φάση) .

Κλείσιμο και Καθάρισμα της Στήλης με $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20)

1. Διηθώ (όπως στο βήμα 3 της προετοιμασίας της κινητής φάσης) και απαερώνω (όπως στο βήμα 4 της προετοιμασίας της κινητής φάσης) το μείγμα διαλυτών $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20).
2. Κατεβάζω σταδιακά (ανά 0.2) το flowrate έως το 0 και κλείνω τον ανιχνευτή.
3. Κλείνω από την HPLC το A (δεξιά)
4. Μεταθέτω τα 2 σωληνάκια από τη φιάλη της κινητής φάσης στη φιάλη με το $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$.
5. Αποσυνδέω τον ED από την στήλη.
6. Κάνω purge(όπως στα βήματα της αντλίας).

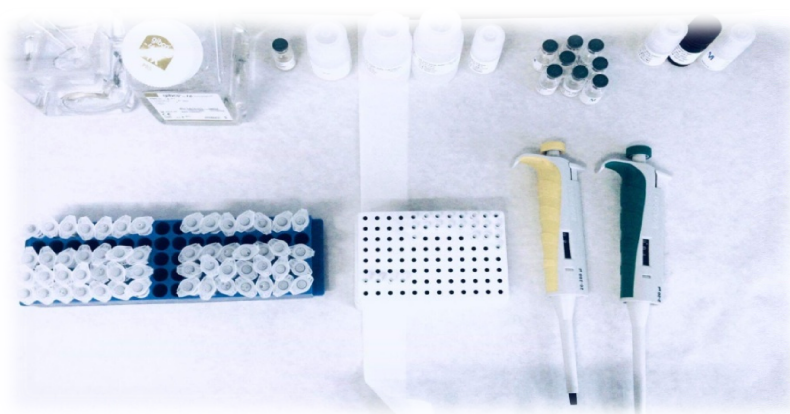
7. Ρυθμίζω το flowrate στο 0.2 ml/min. Συνδέω μόνο την στήλη και ρυθμίζω το flowrate (όπως στα βήματα της αντλίας).
8. Αφήνω το σύστημα να ξεπλένεται για 45λεπτά.
9. Κατεβάζω σταδιακά (ανά 0.2) το flowrate έως το 0.
10. Επανατοποθετώ τα 2 σωληνάκια στην αρχική τους φιάλη (κινητή φάση) .
11. Κλείνω το A, το flow και την HPLC.



Εικόνα35 | Η HPLC του εργαστηρίου ‘Κοσμητολογίας-Δερματοφαρμακολογίας’

2.3.6 Συγκέντρωση Ινσουλίνης πλάσματος σε διαβητικό μοντέλο μυών (ELISAKit)

Την ημέρα 14 μετά την έναρξη της επαγωγής του διαβήτη, οι μύες έμειναν νηστικοί για 5 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκε αίμα από την προσωπική φλέβα που βρίσκεται στην περιοχή της κάτω γνάθου του μυός. Έπειτα έγινε φυγοκέντρωση σε 9000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C ώστε να διαχωριστούν τα συστατικά του δείγματος. Αφού τελείωσε η φυγοκέντρωση, πήραμε 25 ml από το πλάσμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ινσουλίνης με ELISAKit (Insulin mouse ELISA Kit).



Εικόνα 36| Υλικά κατά τη διαδικασία Elisa

ELISA kit (Insulin mouse ELISA Kit)

Το σετ ELISA για ινσουλίνη αρουραίου/ποντικού χρησιμοποιείται για τη μη ραδιενεργό ποσοτικοποίηση της ινσουλίνης σε ορό ποντικού και αρουραίου. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δείγματα πλάσματος, αλλά η εφαρμογή σε δείγματα άλλων βιολογικών υγρών μπορεί να απαιτεί επικύρωση από τον χρήστη.

Αυτή η δοκιμασία είναι μια μέθοδος ELISA Sandwich που βασίζεται, διαδοχικά, σε:

1) σύλληψη μορίων ινσουλίνης από δείγματα στα φρεάτια μίας πλάκας μικροτιτλοδότησης επικαλυμμένης με προ-τετηγμένη ποσότητα ενός μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού έναντι ινσουλίνης αρουραίου και τη δέσμευση βιοτινυλιωμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων στο γονίδιο της σύλληψης της ινσουλίνης,

2) την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων υλικών από τα δείγματα,

3) τη δέσμευση υπεροξειδάσης στα ακινητοποιημένα βιοτινυλιωμένα αντισώματα,

4) έκπλυση ελεύθερου ενζύμου και

5) ποσοτικοποίηση ακινητοποιημένων συζευγμάτων αντισώματος-ενζύμου με παρακολούθηση των δραστηριοτήτων της υπεροξειδάσης αγριοραπανίου παρουσία του υποστρώματος 3,3', 5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη. Η δραστηριότητα του ενζύμου μετράται φασματοφωτομετρικά από την αυξημένη απορροφητικότητα στα 450 nm, διορθωμένη από την απορροφητικότητα στα 590 nm. Δεδομένου ότι η αύξηση της απορροφητικότητας είναι άμεσα ανάλογη προς την ποσότητα της σύλληψης της ινσουλίνης στο άγνωστο δείγμα, η τελευταία μπορεί να ληφθεί από την παρεμβολή από μια καμπύλη αναφοράς που παράγεται στην ίδια δοκιμασία με πρότυπα αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων ινσουλίνης ποντικού

Υλικά

1. Πιπέτες & τα αντίστοιχα tips (10 μ L - 100 μ L, 50 μ L ~ 300 μ L)
3. Δοχεία αντιδραστηρίων
4. Vortex - αναδευτήρας
5. Ψυγείο- Καταψύκτης
6. Απιονισμένο νερό
7. Αναγνώστης πλάκας μικροτιτλοδότησης ικανός να διαβάσει την απορροφητικότητα στα 450 nm και 590 nm
8. Τριπλός αναδευτήρας πλάκας μικροτιτλοδότησης
9. Διηθητικό χαρτί

Αντιδραστήρια

Κάθε κιτ είναι επαρκές για να τρέξει μία πλάκα 96 φρεατίων.

A. Πλάκα ELISA ινσουλίνης αρουραίου/ποντικού

Επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι ινσουλίνης αρουραίου/ποντικού.

Ποσότητα: 1 πλάκα

Σημείωση: Οι αχρησιμοποίητες λωρίδες πρέπει να σφραγιστούν εκ νέου στη θήκη με το αποξηραντικό που παρέχεται και αποθηκεύεται στους 2-8 ° C.

B. Βερνίκι συγκολλητικής πλάκας

Ποσότητα: 1 φύλλο

C. 10X HRP συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης

10X συμπύκνωμα 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris που περιέχει Tween-20.

Ποσότητα: Δύο φιαλίδια που περιέχουν 50 ml έκαστο

Προετοιμασία: Αραιώνουμε 10 φορές με απιονισμένο νερό. EZRMI-13K Rev. 8-May-17 EMD Millipore 3

D. Πρότυπα ινσουλίνης αρουραίου/ποντικού

Η ινσουλίνη αρουραίου στο ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού: 0,2, 0,5, 1, 2, 5 και 10 ng / mL.

Ποσότητα: 0,25 mL / φιαλίδιο

E. Έλεγχοι ποιότητας ινσουλίνης αρουραίου/ποντικού 1 και 2

Η ινσουλίνη αρουραίου στο ρυθμιστικό διάλυμα QC.

Ποσότητα: 0,25 mL / φιαλίδιο

F. Διάλυμα Matrix

Ποσότητα: 0,5 mL

G. Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού

0,05 M φωσφοσαλίνη, pH 7,4, που περιέχει 0,025 M EDTA, 0,08% οξίδιο νατρίου, και 1% BSA.

Ποσότητα: 20 mL

H. Αντίσωμα ανίχνευσης ινσουλίνης αρουραίου/ποντικού

Προ-τετηγμένο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα κατά της ινσουλίνης.

Ποσότητα: 10 mL

I. Διάλυμα ενζύμου

Συμπύκνωμα υπεροξειδάσης στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ποσότητα: 12 mL

J. Υπόστρωμα (Ευαίσθητο στο φως, αποφυγή περιττής έκθεσης στο φως)

3, 3', 5, 5'-τετραμεθυλβενζιδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Ποσότητα: 12 mL

Κ. Διακοπή διαλύματος

0,3 M HCl

Ποσότητα: 12 mL

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ & ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

- Η συνιστώμενη αποθήκευση για τα εξαρτήματα του κιτ είναι 2-8 ° C.
- Όλα τα εξαρτήματα αποστέλλονται και αποθηκεύονται στους 2-8 ° C. Ανασυσταθέντα πρότυπα και οι έλεγχοι μπορούν να καταψυχθούν για μελλοντική χρήση, αλλά οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης / απόψυξης πρέπει να αποφεύγονται.

ΔΕΙΓΜΑΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ & ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

A. Για να παρασκευαστεί ορός, το ολικό αίμα κατευθύνεται απευθείας σε σωλήνα φυγοκέντρησης που δεν περιέχει αντιπηκτικό. Αφήνουμε τον θρόμβο αίματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

B. Αμέσως φυγοκεντρούμε το θρομβωμένο αίμα στις 9000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C. Μεταφέρουμε και αποθηκεύουμε τα δείγματα ορού σε χωριστούς σωλήνες. Ημερομηνία και προσδιορισμός κάθε δείγματος.

Δ. Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -20 ± 5 °C για μεταγενέστερη χρήση. Για μακροχρόνια αποθήκευση, διατηρούμε στους -70 ° C. Αποφεύγουμε τους κύκλους ψύξης / απόψυξης.

E. Για την παρασκευή δείγματος πλάσματος, το πλήρες αίμα πρέπει να συλλέγεται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης που περιέχουν αρκετό K3EDTA για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 1.735 mg / mL και να φυγοκεντρηθούν αμέσως μετά τη συλλογή. Τηρούμε τις ίδιες συνθήκες προφύλαξης κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ορού.

ΣΤ. Εάν η ηπαρίνη πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό, πρέπει να προκαθορίζεται η επίδραση στην έκβαση της ανάλυσης στη δόση της χρησιμοποιούμενης ηπαρίνης.

Ζ. Αποφεύγουμε τη χρήση δειγμάτων με αιμόλυση ή λιπαιμία.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Προθερμαίνουμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της διαδικασίας.

1. Αραιώνουμε το συμπύκνωμα 10XBufferWash 10 φορές αναμειγνύοντας ολόκληρο το περιεχόμενο από κάθε μπουκάλι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 450mL απιονισμένο νερό (αραιώνουμε και τα δύο μπουκάλια με 900 mL απιονισμένο νερό).

2. Αφαιρούμε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών από την πλάκα δοκιμής μικροτιτλοδότησης. Οι αχρησιμοποίητες λωρίδες πρέπει να σφραγιστούν εκ νέου στη θήκη από φύλλο αλουμινίου και να αποθηκευτούν στους 2-8 ° C. Συγκροτούμε τις λωρίδες σε μια άδεια υποδοχή πλάκας και πλένουμε το κάθε πηγάδι 3 φορές με 300 μL αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύση ανά πλύση. Χύνουμε το Ρυθμιστικό Διάλυμα και αφαιρούμε την υπολειμματική ποσότητα από όλα τα πηγαδάκια αναστρέφοντας την πλάκα και χτυπώντας την ελαφρά σε διηθητικό χαρτί αρκετές φορές. Δεν αφήνουμε τα πηγαδάκια να στεγνώσουν πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα. Εάν χρησιμοποιούμε αυτοματοποιημένο μηχάνημα για δοκιμασία, ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή για όλα τα βήματα πλύσης που περιγράφονται σε αυτό το πρωτόκολλο.

3. Προσθέτουμε 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης σε κάθε ένα από τα κενά και τα πηγαδάκια δειγμάτων.

4. Εάν τα δείγματα που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμασία είναι ορός ή πλάσμα, προσθέτουμε 10 μL διαλύματος Matrix στο Blank, Standard και τα Controlwells (επιλογή A). Αν τα δείγματα είναι απαλλαγμένα από σημαντικά συστατικά του ορού, προσθέστε 10 μL ρυθμιστικό ανάλυσης (επιλογή B).

5. Προσθέτουμε εις διπλούν 10 μL πρότυπα ινσουλίνης μυός με τη σειρά ανόδου συγκέντρωσης στα κατάλληλα πηγαδάκια.
6. Προσθέτουμε 10 μLQC1 και 10 μLQC2 στα κατάλληλα πηγαδάκια.
7. Προσθέτουμε διαδοχικά 10 μL των άγνωστων δειγμάτων εις διπλούν προς τα υπόλοιπα πηγαδάκια.
8. Προσθέτουμε 80 μL ανίχνευσης σε όλα τα πηγαδάκια. Για καλύτερα αποτελέσματα, όλες οι προσθήκες θα πρέπει να ολοκληρωθούν εντός μίας ώρας. Καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστή και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες σε έναν αναδευτήρα πλάκας τροχιακού μικροτίτλου που έχει ρυθμιστεί να περιστρέφεται με μέτρια ταχύτητα, περίπου 400 έως 500 rpm.
9. Αφαιρούμε το σφραγιστικό πλακιδίων και τα διαλύματα απόσταξης από την πλάκα.
10. Πλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, 300 μL ανά πηγαδάκι ανά πλύση. Διαχωρίζουμε και πλένουμε μετά από κάθε πλύση για να αφαιρέσουμε το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα.
11. Προσθέτουμε 100 μl διαλύματος ενζύμου σε κάθε πηγαδάκι. Καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστικό και επωάζουμε με μέτρια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά στον αναδευτήρα πλάκας μικροτίτλου.
12. Αφαιρούμε τα σφραγιστικά από τα διαλύματα απόσταξης από την πλάκα και χτυπάμε ελαφρώς την πλάκα για να αφαιρέσουμε το υπολειμματικό υγρό.
13. Πλένουμε τα πηγαδάκια 6 φορές με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, 300 μL ανά πηγαδάκι ανά πλύση. Διαχωρίζουμε και πλένουμε μετά από κάθε πλύση για να αφαιρέσουμε το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα.
14. Προσθέτουμε 100 μL διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι, καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστικό και ανακινούμε στον αναδευτήρα πλάκας για περίπου 5 έως 20 λεπτά. Το μπλε χρώμα θα πρέπει να σχηματίζεται σε πηγάδια των προτύπων ινσουλίνης με ένταση ανάλογη προς τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Λαμβάνουμε υπόψη ότι το χρώμα μπορεί να αναπτυχθεί πιο γρήγορα ή πιο αργά από τον συνιστώμενο χρόνο επώασης ανάλογα με την τοπική θερμοκρασία δωματίου. Παρακολουθούμε οπτικά την ανάπτυξη χρώματος για να βελτιστοποιήσουμε τον χρόνο επώασης. Κάποιος μπορεί να μετρήσει την ανάπτυξη χρώματος χρησιμοποιώντας φίλτρο 370 nm, εάν είναι διαθέσιμο στο φασματοφωτόμετρο. Όταν η απορρόφηση είναι μεταξύ 1.2 και 1.8 στα 370 nm, μπορεί να προστεθεί το διάλυμα στάσης για να τερματιστεί η ανάπτυξη χρώματος.

15. Αφαιρούμε το σφραγιστικό και προσθέτουμε 100 μL Διαλύματος Διακοπής [ΠΡΟΣΟΧΗ: ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ] και ανακινούμε το πλακίδιο με το χέρι για να εξασφαλίσουμε την πλήρη ανάμιξη του διαλύματος σε όλα τα πηγαδάκια. Το μπλε χρώμα θα πρέπει να μετατραπεί σε κίτρινο μετά την οξίνιση. Σκουπίζουμε το κάτω μέρος της πλάκας μικροτιτλοδότησης για να αφαιρέσουμε τυχόν υπολείμματα πριν από την ανάγνωση στον αναγνώστη πλακών. Διαβάζουμε την απορρόφηση σε 450 nm και 590 nm σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μέσα σε 5 λεπτά και βεβαιωνόμαστε ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα σε κανένα πηγαδάκι. Καταγράφουμε τη διαφορά μονάδων απορρόφησης.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Η καμπύλη δόσης-απόκρισης αυτής της ανάλυσης ταιριάζει καλύτερα σε μια σιγμοειδής λογική εξίσωση 4 ή 5 παραμέτρων. Τα αποτελέσματα άγνωστων δειγμάτων μπορούν να υπολογιστούν με οποιοδήποτε πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή που έχει μια λογική λειτουργία 4 ή 5 παραμέτρων. Γράφουμε την καμπύλη αναφοράς για ερμηνεία δείγματος, σχεδιάζοντας τη μονάδα απορρόφησης 450 nm, μικρότερη από αυτή των 590 nm, στον άξονα Y έναντι της συγκέντρωσης των προτύπων ινσουλίνης αρουραίου στον άξονα X.

Σημείωση: Όταν οι δοκιμασμένοι όγκοι δειγμάτων διαφέρουν από 10 μL , πρέπει να γίνει μια κατάλληλη μαθηματική προσαρμογή για να ληφθεί υπόψη ο συντελεστής αραίωσης (π.χ., εάν χρησιμοποιούνται 5 μL δείγματος, τότε τα υπολογιζόμενα

δεδομένα πρέπει να πολλαπλασιαστούν επί 2). Όταν ο όγκος του δείγματος είναι μικρότερος από 10 μL , αντισταθμίστε το έλλειμμα όγκου είτε με διάλυμα μήτρας είτε με ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης, όποιο από τα δύο είναι κατάλληλο.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

A. Κριτήρια αποδοχής

1. Η ανάλυση θα θεωρείται αποδεκτή όταν όλες οι τιμές ελέγχου ποιότητας εμπίπτουν στο υπολογισμένο εύρος ποιοτικού ελέγχου. Αν κάποια QC πέσουν εκτός του πεδίου ελέγχου, ελέγχουμε τα αποτελέσματα με έναν επόπτη.
2. Εάν η διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων ενός δείγματος είναι $> 15\% \text{ CV}$, επαναλάβετε το δείγμα.
3. Το όριο ευαισθησίας αυτής της ανάλυσης είναι $0,1 \text{ ng / mL}$ ($17,5 \text{ }\mu\text{M}$) ινσουλίνης (μέγεθος δείγματος $10 \text{ }\mu\text{L}$).
4. Το κατάλληλο εύρος αυτής της ανάλυσης είναι $0,1 \text{ ng / mL}$ έως 10 ng / mL ινσουλίνης (μέγεθος δείγματος $10 \text{ }\mu\text{L}$). Οποιοδήποτε αποτέλεσμα μεγαλύτερο από 10 ng / mL σε ένα δείγμα $10 \text{ }\mu\text{L}$ που αναλύθηκε θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με αραιώση χρησιμοποιώντας είτε διάλυμα μήτρας είτε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης, όποιο είναι κατάλληλο, ως αραιωτικό μέχρι να πέσει στην περιοχή.

2.3.7 Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης στο αίμα

Όργανα: α) Χειρουργικό ψαλιδάκι

β) Μετρητής και ταινίες γλυκόζης (ABBOTT FreestylePrecision)

Ανοίγεται μια ταινία μέτρησης γλυκόζης και εισάγεται στην υποδοχή του μετρητή το άκρο της ταινίας που έχει 3 μαύρες γραμμές. Με το ψαλιδάκι κόβεται με προσοχή απειροελάχιστο κομμάτι από την ουρά του μυός, ώστε να σχηματιστεί μικρή σταγόνα αίματος. Τοποθετείται το αίμα στην άκρη της ταινίας (λευκή περιοχή). Η ταινία μέτρησης λειτουργεί ως σπόγγος, τραβώντας το αίμα στο εσωτερικό της. Η μέτρηση ξεκινάει αυτόματα όταν τοποθετηθεί επαρκής ποσότητα αίματος. Δεν πρέπει να απομακρυνθεί η ουρά από την ταινία μέχρι να αρχίσει η μέτρηση. Η μέτρηση ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα και το αποτέλεσμα εμφανίζεται αυτόματα στην οθόνη του μετρητή.



Εικόνα 37| Διαδικασία λήψης αίματος από μυ για μέτρηση γλυκόζης

2.3.8 Επίδραση UV ακτινοβολίας στο δέρμα

Όργανο: Λάμπα ξένου 1000W (Oriel)

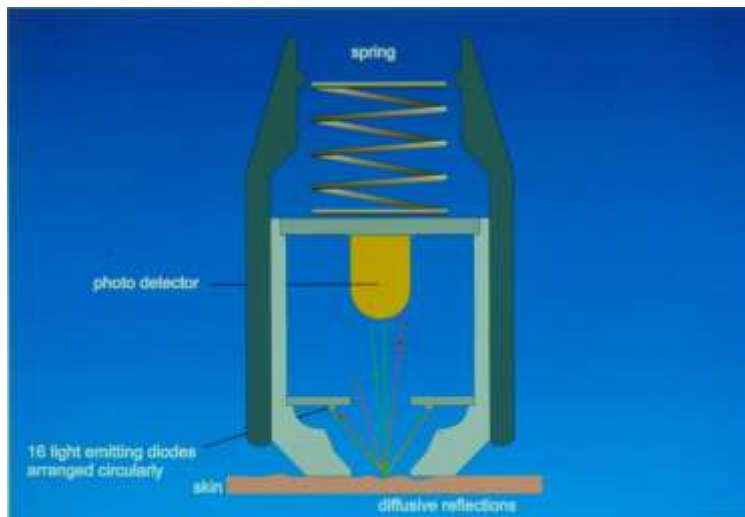
Κάθε μυς ακτινοβολήθηκε για 20sec (~3 M.E.D.) για 3 ημέρες (Δευτέρα-Τετάρτη-Παρασκευή) και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 8 μήνες. Την πρώτη εβδομάδα η δόση ήταν στα 5sec (-0,75 M.E.D) και κάθε επόμενη εβδομάδα αυξανόταν κατά 25% μέχρι την σταθεροποίηση στα 3 M.E.D. Οι μύες ακτινοβολήθηκαν με τρόπο ώστε να ακτινοβολείται μόνο η ράχη τους και όχι το κεφάλι και τα άκρα τους. 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 ελεγχόταν καθημερινά πριν την ακτινοβολήση με τους αντίστοιχους αισθητήρες.

2.3.9 Μέτρηση μελανίνης- ερυθρότητας

Όργανο: MEXAMETER® MX 18

Η μέτρηση της μελανίνης και 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 μετράει πόσο φως διαθλάσθηκε από το δέρμα και έτσι υπολογίζει πόσο απορροφήθηκε από το δέρμα. Η ποσότητα της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι καθορισμένη, επομένως υπολογίζεται από το όργανο η ποσότητα που έχει απορροφηθεί. Το εύρος

αβεβαιότητας των μετρήσεων είναι $\pm 5\%$, οι μονάδες μέτρησης είναι αυθαίρετες και η κλίμακα είναι από 0-999 για την μελανίνη και το ερύθημα.[178]



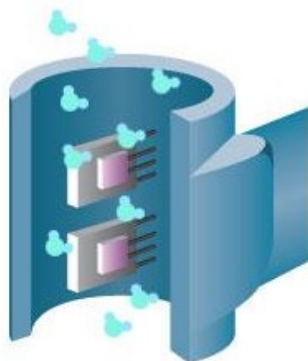
Εικόνα 38| Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής του Mexameter[178]

2.3.10 Μέτρηση Άδηλης Απώλειας νερού

Όργανο: TEWAMETER® TM 240

Για την άδηλη απώλεια ύδατος χρησιμοποιήθηκε το όργανο TEWAMETER® TM 240 (Courage-Khazaka, Germany). Η άδηλη απώλεια νερού (TEWL) είναι η απώλεια νερού από την υγιή κεράτινη στιβάδα και η μέτρηση της TEWL μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της λειτουργίας του δερματικού φραγμού. Ακόμα και η μικρότερη βλάβη, όπου δεν μπορεί να γίνει ορατή με γυμνό μάτι, μπορεί να καθοριστεί με αυτό το όργανο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει πάντα μια καθορισμένη εξάτμιση ύδατος από την επιδερμίδα, ως τμήμα του φυσιολογικού δερματικού μεταβολισμού. 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 ένας για τη μέτρηση της σχετικής υγρασίας). Ένας μικροεπεξεργαστής δίνει το ρυθμό εξάτμισης σε g/h/m². [180]



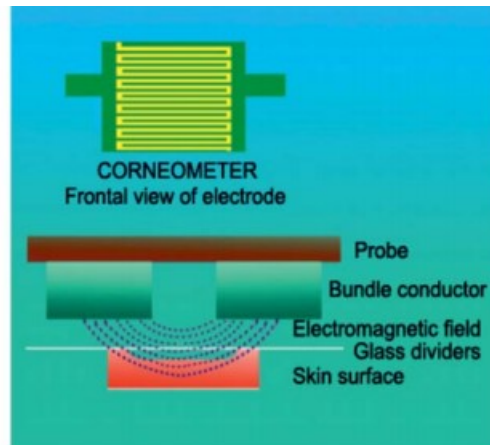
Εικόνα39|Σχηματική αναπαράσταση του αισθητήρα του Tewameter [180]

2.3.11 Μέτρηση της ενυδάτωσης

Όργανο: CORNEOMETER® CM 820

Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από ένα ποσοστό 10- 20% νερό. Η μείωση αυτού του νερού σε ποσοστό μικρότερο του 10% από το ανώτερο τμήμα της κεράτινης στοιβάδας συνοδεύεται από ξηρότητα, τραχύτητα, ευθραυστότητα, ενώ αντιθέτως η παρουσία του νερού σε ικανοποιητικά ποσοστά συνοδεύεται από μία επιφάνεια δέρματος, που είναι λεία και απαλή. Η λεπιώδης εμφάνιση, η οποία παρατηρείται σε πολλές δερματικές βλάβες στην κλινική πράξη, οφείλεται στην ελαττωματική λειτουργία της παθολογικής κεράτινης στοιβάδας, η οποία δε μπορεί να συγκρατήσει αρκετή υγρασία ακόμα και σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο υπολογισμός της ενυδάτωσης με το συγκεκριμένο μηχάνημα βασίζεται στη διηλεκτρική σταθερά του δέρματος. Οι συνθήκες μέτρησης είναι 20-22°C και η υγρασία 40-60%. Το εύρος αβεβαιότητας των μετρήσεων είναι $\pm 3\%$ και η κλίμακα είναι από 0 (καθόλου ενυδάτωση) έως 120 (αυθαίρετες μονάδες μέτρησης). 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. Οι μετρήσεις ενυδάτωσης, που χρησιμοποιήθηκαν στα αποτελέσματα, προέκυψαν από το μέσο όρο τριών διαδοχικών μετρήσεων κοντινών περιοχών και αυτό γιατί η μέτρηση στο ίδιο ακριβώς σημείο θα οδηγούσε σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω εγκλεισμού. [177]



Εικόνα40| Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής του Corneometer [176]

2.3.12 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:

- **RO**: Αυτή η παράμετρος δείχνει την παθητική αντίσταση του δέρματος στη δύναμη αναρρόφησης της συσκευής.

2.3.13 Μέτρηση του πάχους του δέρματος

Όργανο: ψηφιακό παχύμετρο

Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί φαινόμενα υπερκεράτωσης της επιδερμίδας. Με τη χρήση του ψηφιακού παχύμετρου μετρήθηκε το πάχος του δέρματος.

2.3.14 Μελέτη του δέρματος-Φωτοτεκμηρίωση

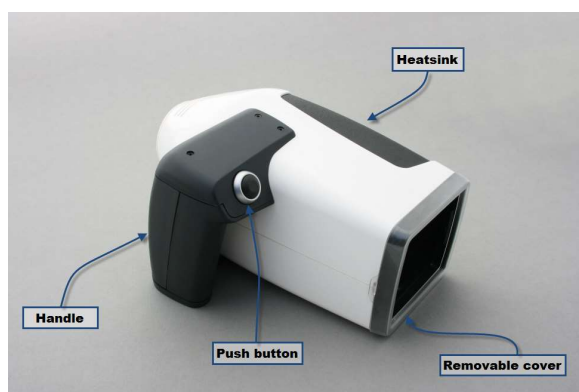
Όργανο: φωτογραφική μηχανή Nikon D5100 -Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF

Η μελέτη του δέρματος των μυών έγινε με τη λήψη φωτογραφιών με τη φωτογραφική μηχανή Nikon D5100 και φακό Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED,

SWMED IF Aspherical, η οποία βρισκόταν σε απόσταση 30cm κάθετα από το αντικείμενο φωτογράφισης.

2.3.15 ANTERA 3D[®] CS (Miravex)

Η Antera 3D[®] είναι μία κάμερα που αναπτύχθηκε από την εταιρία Miravex Limited και επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών υψηλής ανάλυσης. Χρησιμοποιεί μία πρωτοποριακή οπτική μέθοδο και ένα περίπλοκο σύστημα μαθηματικών αλγορίθμων που δίνουν τη δυνατότητα στις φωτογραφίες να αποκτούν μία τρισδιάστατη μορφή. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να προκύψουν πληροφορίες από τις εικόνες που σχετίζονται με το τρισδιάστατο σχήμα του δέρματος και έτσι να ποσοτικοποιηθεί η αποτελεσματικότητα μίας θεραπείας και τυχόν αλλαγές στο δέρμα με την πάροδο του χρόνου. [179]



Εικόνα 41| Antera 3D[®] [179]

Με τη συγκεκριμένη κάμερα είναι δυνατός ο υπολογισμός διαφόρων παραμέτρων. Για παράδειγμα, υπάρχει η δυνατότητα μέτρησης της υφής (texture) του δέρματος και των παραμέτρων ανυψώματα (κατάλληλο φίλτρο για μέτρηση ουλών), που αποκαλύπτει τυχόν ανυψώσεις στο δέρμα και βαθουλώματα (κατάλληλο φίλτρο για τις λεπτές γραμμές -fine lines- του δέρματος). Το λογισμικό επίσης της Antera επιτρέπει τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης (haemoglobin) και άρα τον υπολογισμό της ερυθρότητας του δέρματος.[179]

2.3.16 Δερματοσκόπιο DTS(DermaToScope)

Η κάμερα δερματοσκόπησης λέγεται DTS® (DermaToScope). Το πρωτότυπο δερματοσκόπιο DTS® σχεδιάστηκε σε λογισμικό βιομηχανικής σχεδίασης SolidWorks και για την κατασκευή του χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά πλαστικά εξαρτήματα από τρισδιάστατο εκτυπωτή (3DPrinter). Τα οπτο-ηλεκτρονικά μέρη απαρτίζονται από:

- Σύστημα φακών διαμέτρου 12mm και 6mm με διπλό αχρωματικό φακό.
- Πλακέτα με συνδυασμό λαμπτήρων διαφόρων μήκους κύματος.
- Πλακέτα οπτικού αισθητήρα.
- Πλακέτα μικρό-ελεγκτή.
- Μικροδιακόπτες επιλογής φωτισμού.
- Πλακέτα φίλτρων τροφοδοσίας.

2.3.17 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια δύο προγραμμάτων, του SPSS v.23 και του GraphPad Prism 8.0.1. Το GraphPad Prism 8.0.1 χρησιμοποιήθηκε στην επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων του πρώτου μέρους του πειράματος (πρόκληση διαβήτη τύπου II) και το SPSS για το δεύτερο.

Έλεγχος Κανονικότητας

Αρχικά για την κάθε μεταβλητή ελέγχου με αν τα δεδομένα μας για κάθε ομάδα (Ομάδα) και κάθε Μήνα ξεχωριστά ακολουθούν Κανονική Κατανομή. Ο κατάλληλος στατιστικός έλεγχος για τα δεδομένα μας αλλά και για το μέγεθος του δείγματος είναι ο Shapiro-Wilk, όπου θα εξετάσουμε σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$, την μηδενική υπόθεση αν τα δεδομένα μας ακολουθούν Κανονική Κατανομή, έναντι της εναλλακτικής.

H0 : Τα δεδομένα ακολουθούν Κανονική Κατανομή

H1: Τα δεδομένα δεν ακολουθούν Κανονική Κατανομή

- Αν $p\text{-value} > \alpha=0.05$ τότε , Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα δεδομένα ακολουθούν Κανονική Κατανομή σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.
- Αν $p\text{-value} < \alpha=0.05$ τότε , Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα δεδομένα δεν ακολουθούν Κανονική Κατανομή σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.

Στην συνέχεια για κάθε μεταβλητή θα παραθέσουμε:

α) Πίνακα με τα αποτελέσματα των Ελέγχων (**P-Value**) για κάθε Ομάδα σε κάθε Μήνα που έγιναν οι μετρήσεις και σχολιασμό των αποτελεσμάτων.

β) Πίνακα και Διαγράμματα για την Μέση τιμή και την Τυπική Απόκλιση των μετρήσεων για κάθε Ομάδα ξεχωριστά.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων (Ομάδα)

Αρχικά θα ελέγξουμε αν όλες οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων για κάθε μήνα ξεχωριστά είναι ίσες μεταξύ τους. Αν από τον έλεγχο προκύψει ότι τουλάχιστον μία διαφέρει τότε θα προχωρήσουμε σε περεταίρω ανάλυση και για να βρούμε μεταξύ ποιον ομάδων διαφέρει η μέση τιμή και ποιο μήνα. Στην περίπτωση που ο παρακάτω έλεγχος μας δείξει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων είναι ίσες δεν χρειάζεται να προβούμε σε περεταίρω Ανάλυση.

Ο ζητούμενος έλεγχος πραγματοποιείται από το Anova του SPSS και είναι ο εξής:

H0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

H1 : μ_i, μ_j για κάποιο (i, j), όπου i, j παίρνουν τιμές 1,2,3,4 (ανάλογα την Ομάδα)

- Αν $p\text{value} > \alpha=0.05$ τότε, Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τον ζητούμενο μήνα είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.

- Αν $p\text{-value} < \alpha=0.05$ τότε , Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων του ζητούμενου μήνα δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ και θα πρέπει να προβούμε σε περαιτέρω ανάλυση.

Αν παρατηρηθεί ότι ο Έλεγχος για τις Μέσες Τιμές απορρίπτεται σε κάποιες μεταβλητές τότε αν κριθεί απαραίτητο θα προβούμε σε περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιώντας είτε τα κριτήρια **Post- HocBonferonni, Tukey και LSD** αλλά και το **Paired t-test** ώστε να εντοπίσουμε που βρίσκονται οι διαφορές στην Μέση Τιμή και μεταξύ ποιόν Ομάδα και σε ποιο Μήνα, είτε **t-test**.

Τέλος να αναφέρουμε ότι στα διαγράμματα προσθέσαμε αστερίσκους (*) μαζί με κάποια υποσημείωση ώστε να δηλώσουμε τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Στατιστική επεξεργασία και αποτελέσματα του 1^{ου} μέρους του πειράματος (Πρόκληση Διαβήτη Τύπου ΙΙ)

Αποτελέσματα

Για λόγους διευκόλυνσης οι μύες θα παρουσιάζονται με πιο απλοποιημένα γράμματα για τη κατηγορία στην οποία ανήκουν.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ
NAD + STZ	SKH-1 ΑΣΠΡΑ	NAD-ΑΣΠΡΑ
NAD + STZ	SKH-2 ΚΑΦΕ	NAD-ΚΑΦΕ
NAD + STZ	SKH-2 ΜΑΥΡΑ	NAD-ΜΑΥΡΑ
NAD + STZ	SKH-2 + ΑΡΟΕ	NAD-ΑΡΟΕ
HFD + STZ	SKH-1 ΑΣΠΡΑ	HFD-ΑΣΠΡΑ
HFD + STZ	SKH-2 ΚΑΦΕ	HFD-ΚΑΦΕ
HFD + STZ	SKH-2 ΜΑΥΡΑ	HFD-ΜΑΥΡΑ
HFD + STZ	SKH-2 + ΑΡΟΕ	HFD-ΑΡΟΕ

Πίνακας 2| Ζωικά πρότυπα

Αποτελέσματα Επιπέδων Γλυκόζης

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των ομάδων για κάθε εβδομάδα μέτρησης της γλυκόζης. Δίνεται ο μέσος όρος (Μ.Ο.) και η τυπική απόκλιση (SD) για κάθε ομάδα, όπου n=7 μύες. Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα.

HFD												
Days	SKH-1 ΑΣΠΡΑ			SKH-2 ΚΑΦΕ			SKH-2 ΜΑΥΡΑ			SKH-2 +ΑΡΟΕ		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	87	5	7	123	19	7	114	14	7	105	16	7
7th day	93	13	7	93	6	7	108	14	7	125	20	7
14th day	118	28	7	135	32	7	121	22	7	130	20	7
21th day	116	11	7	121	22	7	116	17	7	113	23	7
35th day	131	30	7	138	22	5	124	34	6	116	39	6

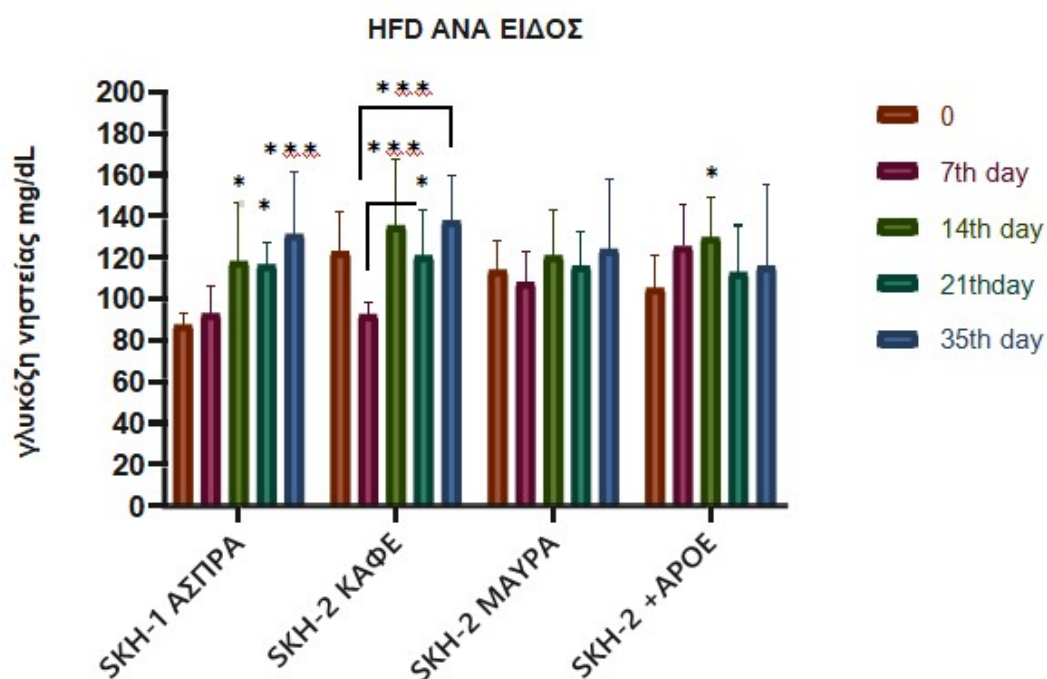
NAD												
Days	SKH-1 ΑΣΠΡΑ			SKH-2 ΚΑΦΕ			SKH-2 ΜΑΥΡΑ			SKH-2 +ΑΡΟΕ		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	94	6	7	97	9	7	84	15	7	79	13	7
7th day	108	7	7	113	14	7	122	23	7	88	39	7
14th day	131	22	7	164	30	7	155	33	7	106	57	7
21th day	123	16	7	157	13	7	161	33	7	102	50	7
35th day	157	29	7	207	37	7	179	61	7	136	44	7

Έλεγχος κανονικής κατανομής

HFD				
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test	SKH-1 ΑΣΠΡΑ	SKH-2 ΚΑΦΕ	SKH-2 ΜΑΥΡΑ	SKH-2 +ΑΡΟΕ
W	0,9144	0,8686	0,9797	0,9644
P value	0,4943	0,2608	0,933	0,8384
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5
NAD				
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test	SKH-1 ΑΣΠΡΑ	SKH-2 ΚΑΦΕ	SKH-2 ΜΑΥΡΑ	SKH-2 +ΑΡΟΕ
W	0,9815	0,9545	0,9335	0,9412
P value	0,9423	0,7694	0,6207	0,6742
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή. Άρα θα χρησιμοποιήσουμε παραμετρικές μεθόδους, για την ανάλυση διακύμανσης των τιμών γλυκόζης.

Διαγράμματα-Τιμές γλυκόζης ανά είδος μυών



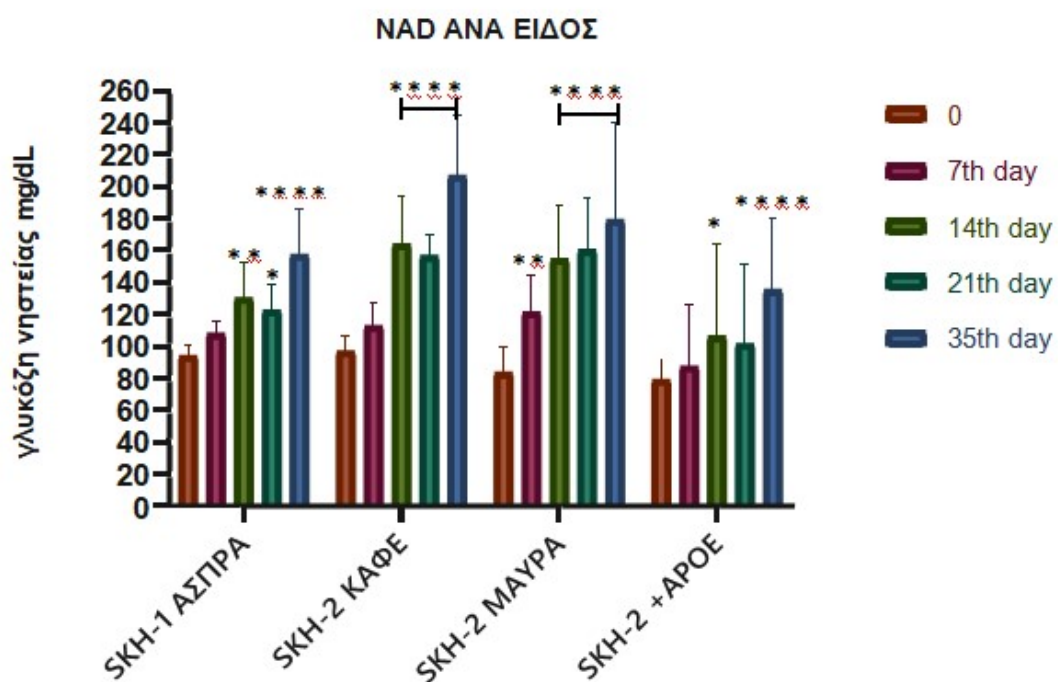
Διάγραμμα 1| Τιμές γλυκόζης HFD ανά είδος μυών

[ΑΣΠΡΑ: 0->14, 21, $p<0,05$ *, 0->35, $p<0,001$ ***, 7->14, 21, $p<0,05$ *, 7->35, $p<0,01$ **] [ΚΑΦΕ: 7->14, 35, $p<0,001$ ***, 7->21, $p<0,05$ *] [ΑΡΟΕ: 0->21, $p<0,05$ *]

2way ANOVA			
HFD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-1 ΑΣΠΡΑ			
0 vs. 14th day	Yes	*	0,01
0 vs. 21thday	Yes	*	0,0149
0 vs. 35th day	Yes	***	0,0003
7th day vs. 14th day	Yes	*	0,034
7th day vs. 21thday	Yes	*	0,0478
7th day vs. 35th day	Yes	**	0,0015
SKH-2 ΚΑΦΕ			
0 vs. 7th day	Yes	*	0,0111
7th day vs. 14th day	Yes	***	0,0004
7th day vs. 21thday	Yes	*	0,0174
7th day vs. 35th day	Yes	***	0,0006
SKH-2 +ΑΡΟΕ			
0 vs. 14th day	Yes	*	0,0393

Πίνακας 3| 2wayANOVA + post-hocFisher'sLSD ανά είδος μυών

Παρατηρούμε ότι στα HFD-ΑΣΠΡΑ υπάρχει στατιστική διαφορά στις τιμές γλυκόζης τις ημέρες 14, 21 και 35 από την ημέρα 0 και η διαφορά αυτή είναι πάρα πολύ σημαντική (***), την τελευταία ημέρα μέτρησης γλυκόζης. Στην ομάδα HFD-ΚΑΦΕ παρατηρείται πάρα πολύ στατιστική διαφορά τις ημέρες 14 και 35 από την ημέρα 7. Στα HFD-APOE η μόνη στατιστική διαφορά που παρατηρείται στις τιμές γλυκόζης είναι την 21η ημέρα σε σχέση με την ημέρα 0.



Διάγραμμα 2 | Τιμές γλυκόζης NAD ανά είδος μυών

ΑΣΠΡΑ: 0->14, $p < 0,01$ **, 0->21, $p < 0,05$ *, 0->35, $p < 0,0001$ ****]

[ΚΑΦΕ: 0->14, 21, 35, $p < 0,0001$ ****]

[ΜΑΥΡΑ: 0->7, $p < 0,01$ **, 0->14, 21, 35, $p < 0,0001$ ****]

[APOE: 0->14, $p < 0,05$ *, 0->35, $p < 0,0001$ ****]

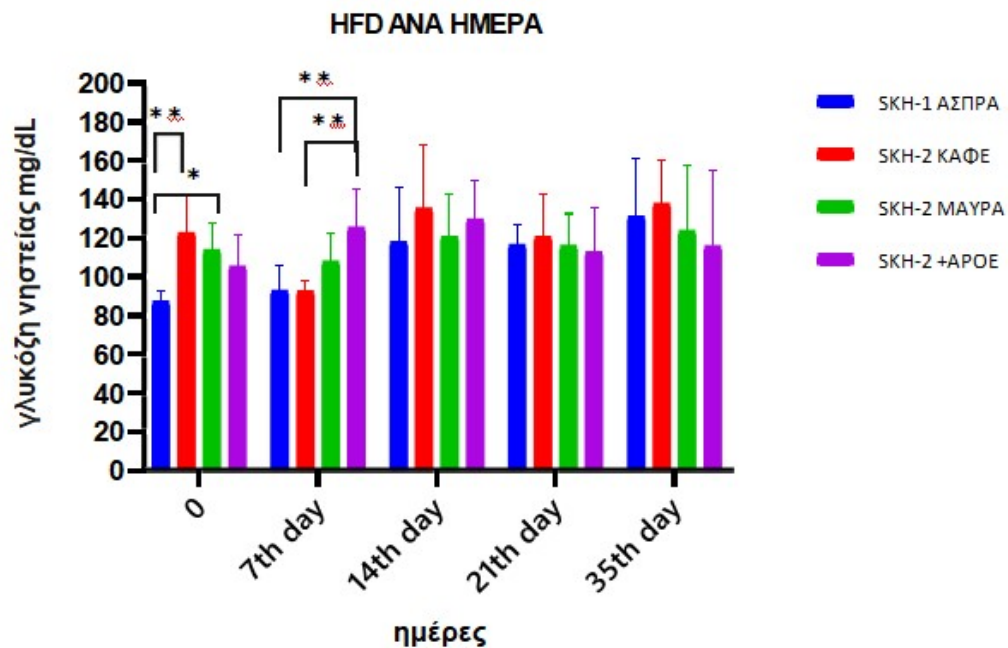
2way ANA ΕΙΔΟΣ			
NAD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-1 ΑΣΠΡΑ			
0 vs. 14th day	Yes	**	0,0092
0 vs. 21th day	Yes	*	0,0389
0 vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
7th day vs. 35th day	Yes	***	0,0005
21th day vs. 35th day	Yes	*	0,0129
SKH-2 ΚΑΦΕ			
0 vs. 14th day	Yes	****	<0,0001
0 vs. 21th day	Yes	****	<0,0001
0 vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
7th day vs. 14th day	Yes	***	0,0003
7th day vs. 21th day	Yes	**	0,0018
7th day vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
14th day vs. 35th day	Yes	**	0,0022
21th day vs. 35th day	Yes	***	0,0004
SKH-2 ΜΑΥΡΑ			
0 vs. 7th day	Yes	**	0,0068
0 vs. 14th day	Yes	****	<0,0001
0 vs. 21th day	Yes	****	<0,0001
0 vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
7th day vs. 14th day	Yes	*	0,0161
7th day vs. 21th day	Yes	**	0,0052
7th day vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
SKH-2 +APOE			
0 vs. 14th day	Yes	*	0,0495
0 vs. 35th day	Yes	****	<0,0001
7th day vs. 35th day	Yes	***	0,0007
14th day vs. 35th day	Yes	*	0,0352
21th day vs. 35th day	Yes	*	0,0148

Πίνακας 4| 2way ANOVA + post-hocFisher's LSD-NAD ανά είδος μυών

Στο παραπάνω διάγραμμα και πίνακα, παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα σε όλες τις ομάδες μυών. Συγκεκριμένα, στην ομάδα NAD-ΑΣΠΡΑ υπάρχει στατιστική διαφορά στις τιμές γλυκόζης τις ημέρες 14(**), 21(*) και 35(****). Στην ομάδα NAD-ΚΑΦΕ, υπάρχει στατιστική σημαντικότητα τις ίδιες ημέρες με την πρώτη ομάδα, αλλά η διαφορά αυτή στην αύξηση γλυκόζης είναι εξαιρετικά σημαντική (****) σε όλες τις ημέρες. Στην ομάδα των NAD-ΜΑΥΡΑ, παρατηρείται στατιστική διαφορά όλες τις ημέρες από την ημέρα 0 και μάλιστα τις ημέρες 14, 21, 35 η διαφορά αυτή είναι

εξαιρετικά σημαντική (****). Στην ομάδα των NAD-APOE σημειώνεται στατιστική σημαντικότητα τις ημέρες 14 και 35, και μάλιστα την τελευταία ημέρα η διαφορά αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική(****).

Διαγράμματα-Τιμές γλυκόζης ανά ημέρα



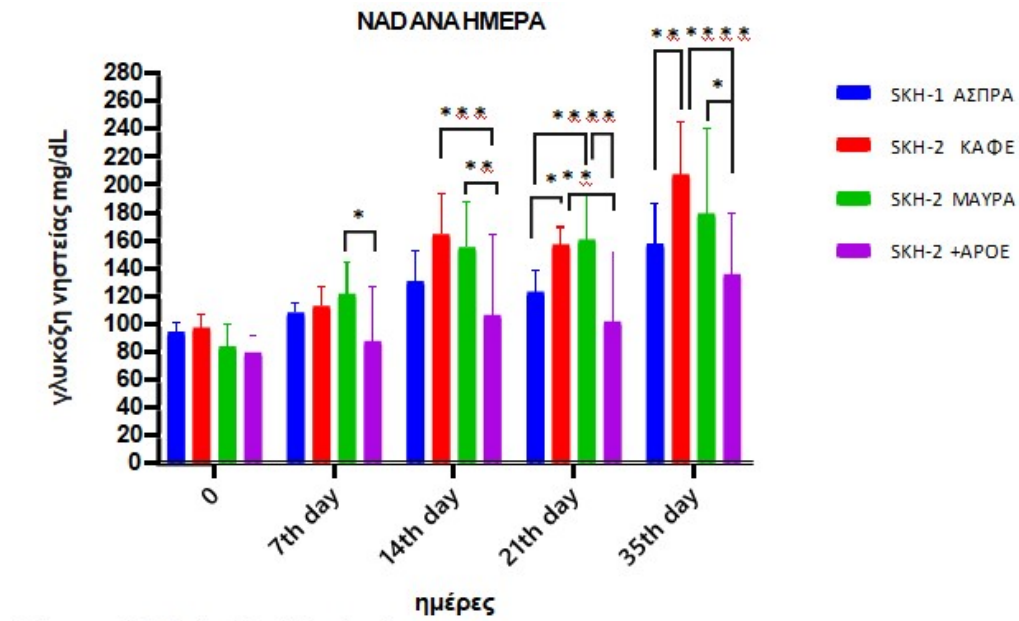
Διάγραμμα 3| Τιμές γλυκόζης HFD ανά ημέρα

[0: ΑΣΠΡΑ vs ΚΑΦΕ, $p < 0,01$ **, ΑΣΠΡΑ vs ΜΑΥΡΑ, $p < 0,05$ *] [7: ΑΣΠΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,01$ **, ΚΑΦΕ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,01$ **]

2way ANOVA			
HFD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
0			
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 ΚΑΦΕ	Yes	**	0,003
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 ΜΑΥΡΑ	Yes	*	0,0256
7th day			
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	**	0,0064
SKH-2 ΚΑΦΕ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	**	0,0058

Πίνακας5| 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD-HFD ανάημέρα

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται στατιστική διαφορά την 7η ημέρα μεταξύ των ομάδων HFD-ΑΣΠΡΑ + HFD-ΑΡΟΕ και HFD-ΚΑΦΕ + HFD-ΑΡΟΕ.



Διάγραμμα 4| Τιμές γλυκόζης NAD ανά ημέρα

[7: ΜΑΥΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,05$ *]

[14: ΚΑΦΕ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,001$ ***, ΜΑΥΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,01$ **]

[21: ΑΣΠΡΑ vs ΚΑΦΕ, $p < 0,05$ *, ΑΣΠΡΑ vs ΜΑΥΡΑ, $p < 0,05$ *, ΚΑΦΕ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,01$ **, ΜΑΥΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,001$ ***] [35: ΑΣΠΡΑ vs ΚΑΦΕ, $p < 0,01$ **, ΚΑΦΕ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,0001$ ****, ΜΑΥΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,05$ *]

2way ANOVA			
NAD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
7th day			
SKH-2 ΜΑΥΡΑ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	*	0,0488
14th day			
SKH-2 ΚΑΦΕ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	***	0,001
SKH-2 ΜΑΥΡΑ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	**	0,0052
21th day			
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 ΚΑΦΕ	Yes	*	0,0488
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 ΜΑΥΡΑ	Yes	*	0,0291
SKH-2 ΚΑΦΕ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	**	0,0016
SKH-2 ΜΑΥΡΑ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	***	0,0008
35th day			
SKH-1 ΑΣΠΡΑ vs. SKH-2 ΚΑΦΕ	Yes	**	0,0043
SKH-2 ΚΑΦΕ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	****	<0,0001
SKH-2 ΜΑΥΡΑ vs. SKH-2 +ΑΡΟΕ	Yes	*	0,0117

Πίνακας 6 | 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD-NAD ανάημέρα

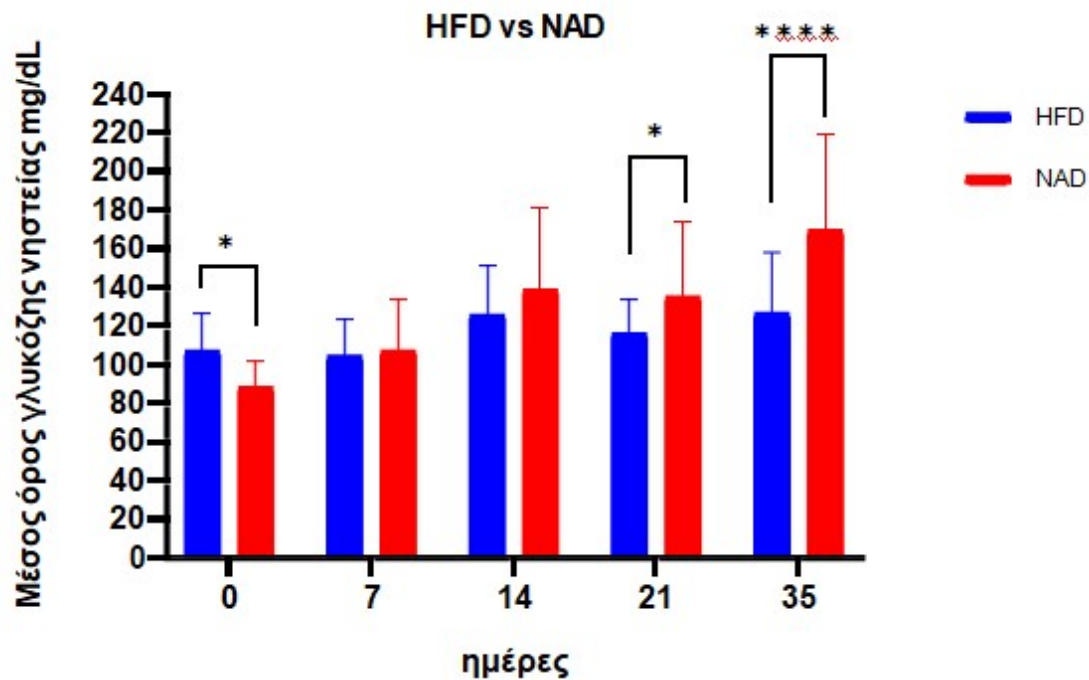
Στο διάγραμμα παρατηρείται στατιστική διαφορά την 7η ημέρα μεταξύ των ομάδων NAD- ΜΑΥΡΑ+NAD ΑΡΟΕ.Επίσης, την 14^η ημέρα υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των ζευγών ομάδων NAD-ΜΑΥΡΑ + NAD-ΑΡΟΕ (**) και NAD-ΚΑΦΕ + NAD-ΑΡΟΕ (***). Την 21η ημέρα σημειώθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων:

- SKH-hr-1 άσπρα και SKH-hr-2καφέ
- SKH-hr-1 άσπρα SKH-hr-2 μαύρα
- SKH-hr-1 μαύρα+ ΑΡΟΕ και SKH-hr-2καφέ
- SKH-hr-1 μαύρα+ ΑΡΟΕ και SKH-hr-2μαύρα

Την τελευταία ημέρα υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των:

- SKH-hr-1 άσπρα και SKH-hr-2καφέ
- SKH-hr-1 μαύρα+ ΑΡΟΕ και SKH-hr-2καφέ
- SKH-hr-1 μαύρα+ ΑΡΟΕ και SKH-hr-2μαύρα

Διαγράμματα-Μέσος όρος γλυκόζης HFD vs NAD



Διάγραμμα 5| Μέσος όρος γλυκόζης νηστείας ανά ημέρα-HFD vs NAD

[ημέρα 0: $p < 0,05$ *, ημέρα 21: $p < 0,05$ *, ημέρα 35: $p < 0,0001$ ****]

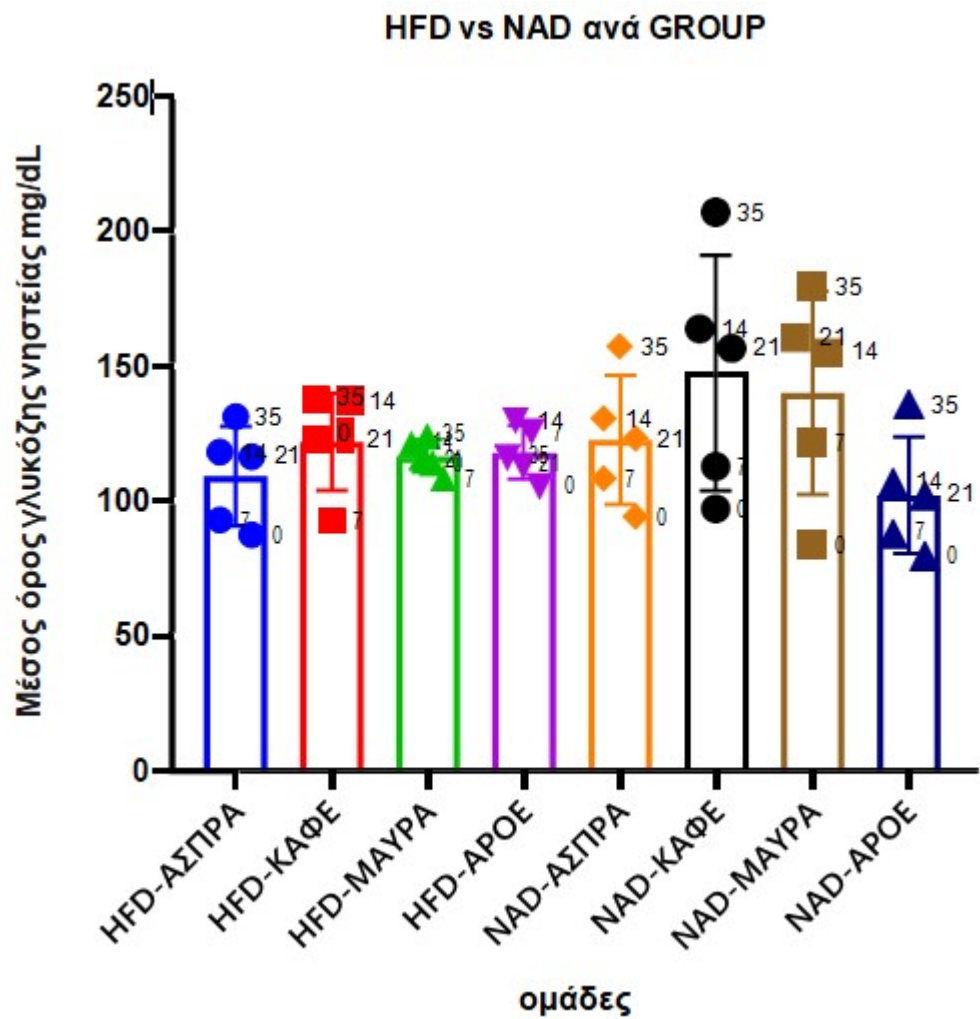
2way ANOVA			
HFD vs NAD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
0	Yes	*	0,0225
7	No	ns	0,7291
14	No	ns	0,1114
21	Yes	*	0,0205
35	Yes	****	<0,0001

Πίνακας 7| 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD-HFD vs NAD

Παρατηρούμε ότι η αύξηση της γλυκόζης στους μύες στους οποίους εφαρμόστηκε η μέθοδος NAD είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την αντίστοιχη αύξηση που πρωτοκόλλου HFD τις ημέρες 21 και 35. Αξίζει να σημειωθεί ότι η γλυκόζη στους μύες της μεθόδου NAD είχαν χαμηλότερες τιμές γλυκόζης σε σύγκριση με τους μύες

της μεθόδου HFD την ημέρα 0 και μάλιστα η διαφορά στη γλυκόζη τους κρίνεται στατιστικά σημαντική. Παρόλο που οι μύες της μεθόδου NAD ξεκίνησαν με χαμηλότερες τιμές γλυκόζης, κατά τη διάρκεια του πειράματος τα επίπεδα γλυκόζης τους αυξήθηκαν περισσότερο από αυτά των μυών της μεθόδου HFD.

Διαγράμματα-Μέσος όρος γλυκόζης ομάδων HFD vs NAD



Διάγραμμα 6 | HFD vs NAD ανά ομάδα

Στατιστική διαφορά HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ ($p < 0,05$ *)

και HFD-ΜΑΥΡΑ vs NAD-ΜΑΥΡΑ ($p < 0,05$ *)

2way ANOVA
ΟΜΑΔΕΣ HFD vs NAD

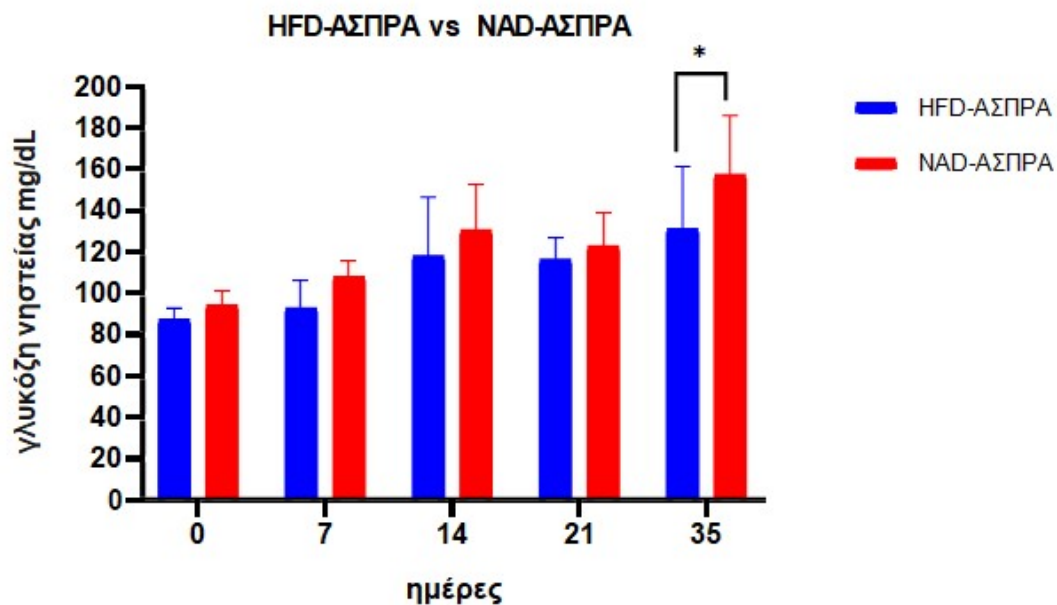
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	***	0,0009
HFD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-MAYPA	Yes	**	0,0057
HFD-ΚΑΦΕ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	*	0,0183
HFD-MAYPA vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	**	0,0052
HFD-MAYPA vs. NAD-MAYPA	Yes	*	0,0299
HFD-ΑΡΟΕ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	**	0,0072
HFD-ΑΡΟΕ vs. NAD-MAYPA	Yes	*	0,0395
NAD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	*	0,0217
NAD-ΚΑΦΕ vs. NAD-ΑΡΟΕ	Yes	***	0,0001
NAD-MAYPA vs. NAD-ΑΡΟΕ	Yes	***	0,001

Πίνακας 8 | 2way ANOVA+ post-hoc Fisher's LSD- ΟΜΑΔΕΣ HFD vs NAD

Συγκρίνοντας όλες τις ομάδες μεταξύ τους, ως προς το μέσο όρο επιπέδων γλυκόζης, παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες NAD-ΚΑΦΕ και NAD -MAYPA έχουν τις πιο υψηλές τιμές γλυκόζης.

Συμπεραίνουμε ότι οι μύες της μεθόδου NAD παρουσίασαν αυξητική τάση στις τιμές γλυκόζης η οποία με βάση το παραπάνω διάγραμμα προβλέπεται να συνεχιστεί και μετά την 35η ημέρα.

Διαγράμματα-HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ



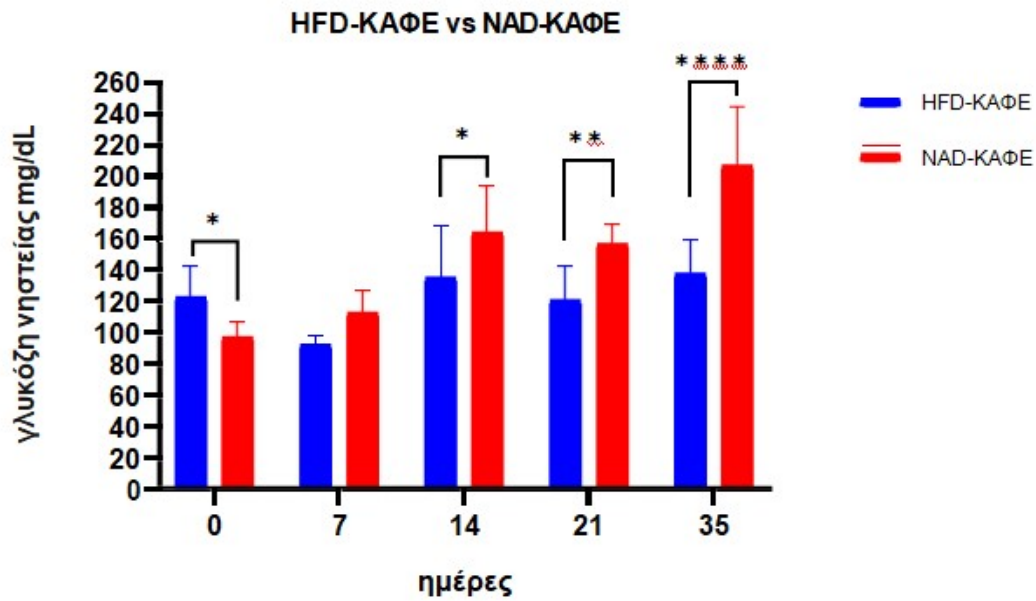
Διάγραμμα 7 | HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ [ημέρα 35: $p < 0,05$ *]

2way ANOVA			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-ΑΣΠΡΑ - NAD-ΑΣΠΡΑ			
0	No	ns	0,5053
7	No	ns	0,1441
14	No	ns	0,2292
21	No	ns	0,5322
35	Yes	*	0,0132

Πίνακας 9 | 2way ANOVA+post-hocFisher's LSD- HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ

Η στατιστική διαφορά που παρατηρείται στις τιμές γλυκόζης της ομάδας SKH-hr-1 ΑΣΠΡΑ μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων παρουσιάζεται την 35η ημέρα με την ομάδα του NAD να υπερέχει του HFD, που σημαίνει ότι το πρωτόκολλο NAD αναπτύσσει πιο γρήγορα Διαβήτη τύπου II.

Διαγράμματα-HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ



Διάγραμμα 8 HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ [ημέρα 0, 14: $p < 0,05$ *, ημέρα 21: $p < 0,01$ **, ημέρα 35: $p < 0,0001$ ****]

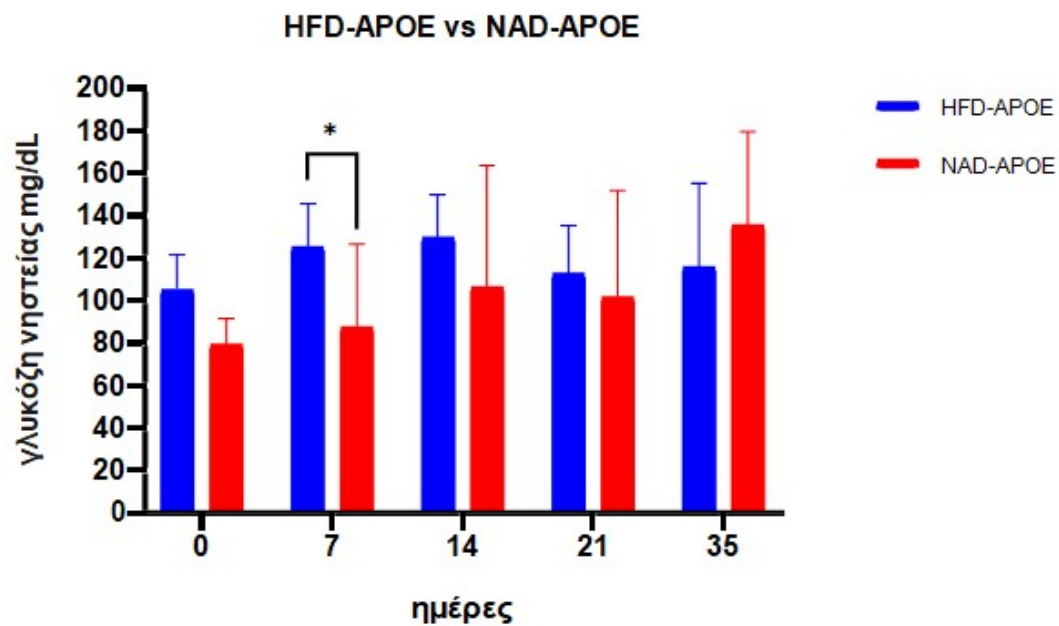
2way ANOVA			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-ΚΑΦΕ - NAD-ΚΑΦΕ			
0	Yes	*	0,0393
7	No	ns	0,0974
14	Yes	*	0,0212
21	Yes	**	0,0043
35	Yes	****	<0,0001

Πίνακας10 | 2wayANOVA+post-hocFisher'sLSD- HFD-ΚΑΦΕ vsNAD-ΚΑΦΕ

Παρατηρούμε ότι η αύξηση της γλυκόζης στους μύες στους οποίους εφαρμόστηκε η μέθοδος NAD στο πρότυπο μύος SKH-hr-2 ΚΑΦΕ είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την αντίστοιχη αύξηση που έδειξαν οι μύες του πρωτοκόλλου HFD τις ημέρες 14, 21 και 35.

Παρόλο που οι μύες της μεθόδου NAD ξεκίνησαν με χαμηλότερες τιμές γλυκόζης, κατά τη διάρκεια του πειράματος τα επίπεδα γλυκόζης τους αυξήθηκαν περισσότερο από αυτά των μυών της μεθόδου HFD.

Διαγράμματα-HFD-APOE vs NAD-APOE



Διάγραμμα 8 | HFD-APOE vs NAD-APOE [ημέρα 7: $p < 0,05$ *]

2way ANOVA			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-APOE - NAD-APOE			
0	No	ns	0,1724
7	Yes	*	0,0489
14	No	ns	0,2209
21	No	ns	0,5561
35	No	ns	0,3165

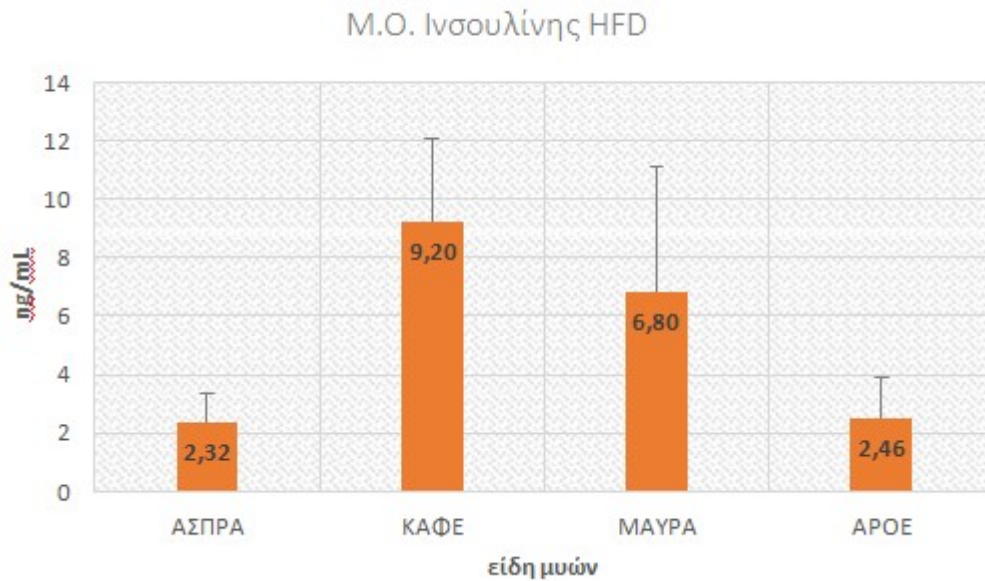
Πίνακας 11 | 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- HFD-APOE vs NAD-APOE

Μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων στην ομάδα SKH-hr-2+APOE παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα μόνο την 7η ημέρα, με το πρωτόκολλο του HFD να υπερέχει.

Από το διάγραμμα συμπεραίνουμε ότι η ομάδα NAD SKH-hr-2+APOE δεν

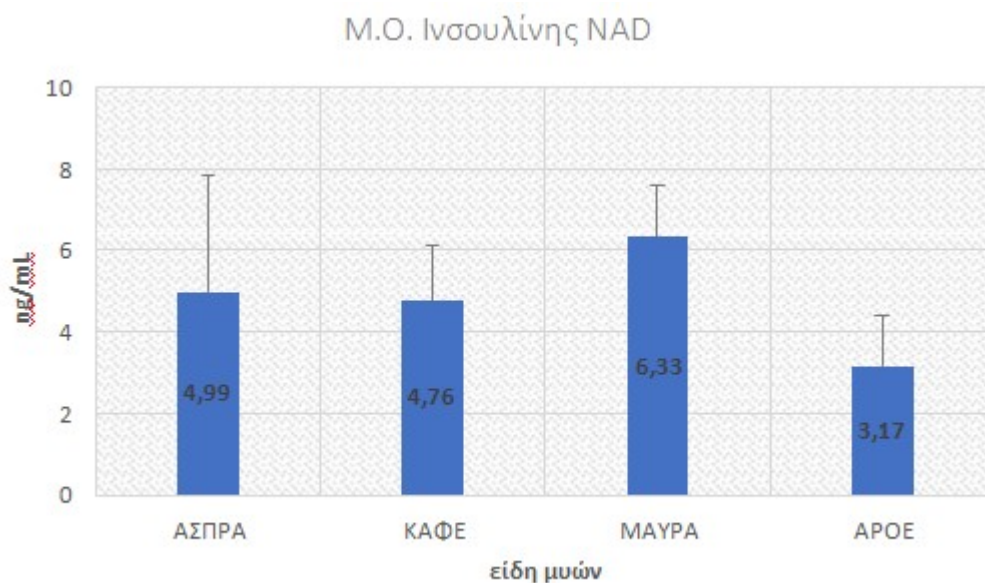
παρουσιάζει σημαντική αύξηση γλυκόζης μέχρι την 21η ημέρα και από την 35η σημειώνει άνοδο, ενώ στην ομάδα HFD δεν υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στις τιμές γλυκόζης μεταξύ των ημερών.

Μέτρηση Ινσουλίνης πλάσματος



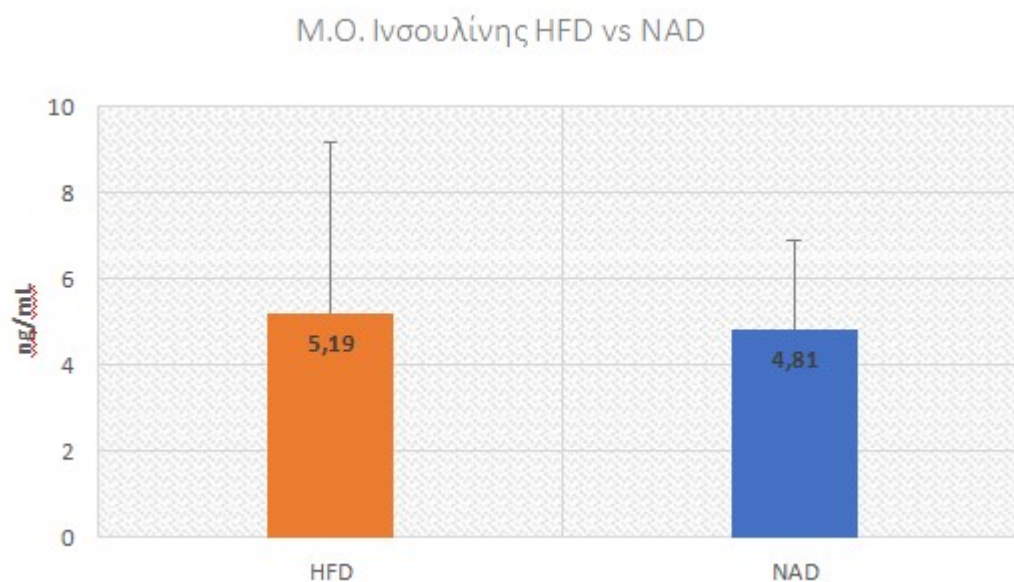
Διάγραμμα 9 | Μ.Ο. ινσουλίνης HFD

Στο πρωτόκολλο του HFD, παρατηρούμε ότι οι ομάδες των ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΩΝ μυών έχουν αυξημένη ινσουλίνη στο πλάσμα, σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες του πρωτοκόλλου αυτού. Αυτό σημαίνει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη, δηλαδή η εξασθενημένη επίδραση της ινσουλίνης στον μεταβολισμό της γλυκόζης, παρατηρείται συνήθως στην παχυσαρκία και αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό του T2DM. Αρχικά, τα β κύτταρα παράγουν περισσότερη ινσουλίνη για να αντισταθμίσουν την ευγλυκαιμία. Ωστόσο, η χρόνια υπερφόρτωση β κυττάρων οδηγεί στην προοδευτική εξάντλησή τους και τα άτομα με προδιάθεση οδηγούνται τελικά σε ανεπάρκεια ινσουλίνης και υπεργλυκαιμία.



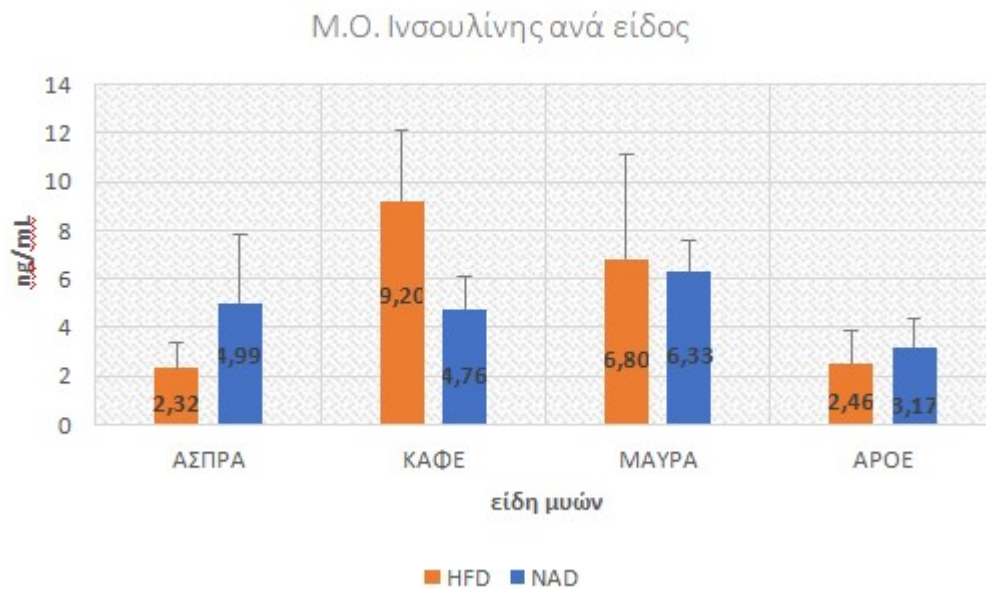
Διάγραμμα 10 | Μ.Ο. ινσουλίνης NAD

Στο πρωτόκολλο του NAD, παρατηρούμε μία μικρή διαφορά μεταξύ των ομάδων. Με βάση τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος σε φυσιολογικούς μύες κυμαίνονται γύρω 6-6,5 ng/mL, ενώ οι μύες που έχουν λάβει NAD+STZ έχουν τιμές γύρω 5 ng/mL[1].



Διάγραμμα 11 | Μ.Ο. ινσουλίνης HFD vs NAD

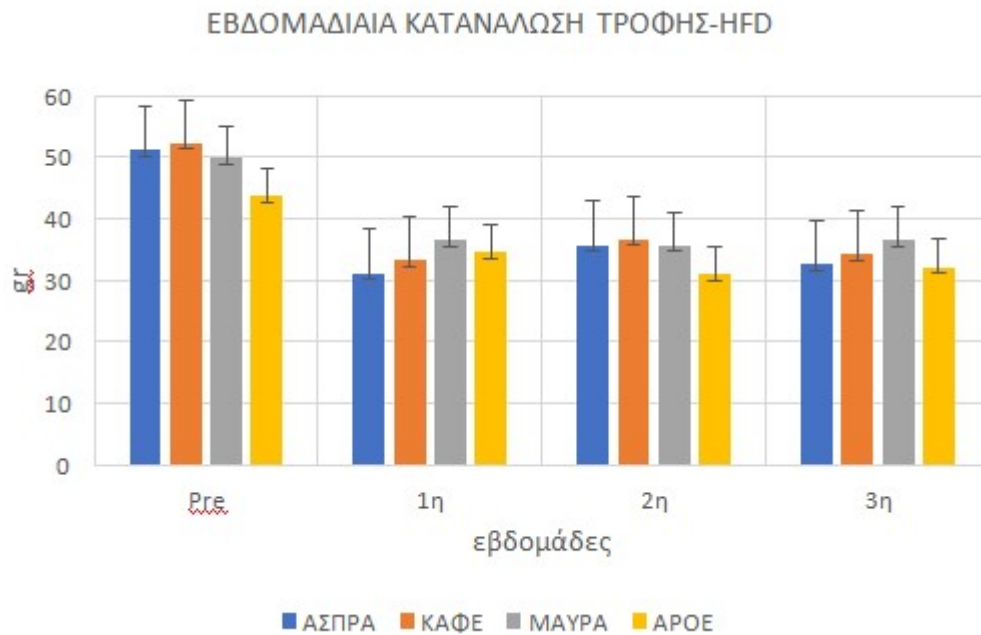
Στο παραπάνω διάγραμμα, ο μέσος όρος ινσουλίνης των δύο πρωτοκόλλων δεν διαφέρει σημαντικά, όμως δεν μπορούμε να πούμε ότι έχουν παρόμοιες τιμές ινσουλίνης διότι όταν μελετήθηκαν μεμονωμένα σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων κάτι που υποδηλώνεται και από την μεγάλη τυπική απόκλιση των ομάδων.



Διάγραμμα 12 | Μ.Ο. ινσουλίνης ανά είδος μυών

Από το παραπάνω διάγραμμα, δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές όταν συγκρίθηκαν τα ίδια είδη μυών των 2 πρωτοκόλλων, ως προς τον μέσο όρο της ινσουλίνης πλάσματος. Ωστόσο οι διαφορές στις τιμές ινσουλίνης, ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα, είναι εμφανείς και έχουν συζητηθεί αναλυτικά παραπάνω.

Κατανάλωση τροφής

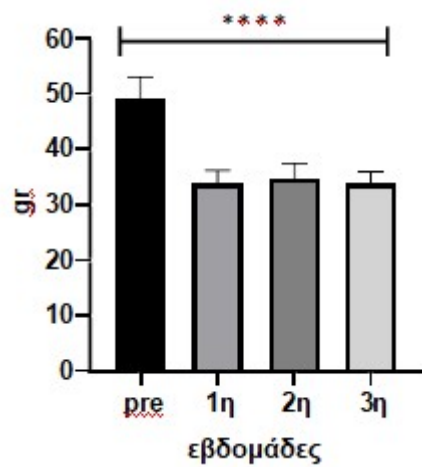


Διάγραμμα 13 | Κατανάλωση τροφής-HFD

2way ANOVA			
HFD- ΤΡΟΦΗ			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
pre vs. 1η	Yes	****	<0,0001
pre vs. 2η	Yes	****	<0,0001
pre vs. 3η	Yes	****	<0,0001
1η vs. 2η	No	ns	0,6078
1η vs. 3η	No	ns	0,9982
2η vs. 3η	No	ns	0,6093

Πίνακας 12 | 2way ANOVA+post-hocFisher's LSD- Κατανάλωση τροφής-NAD

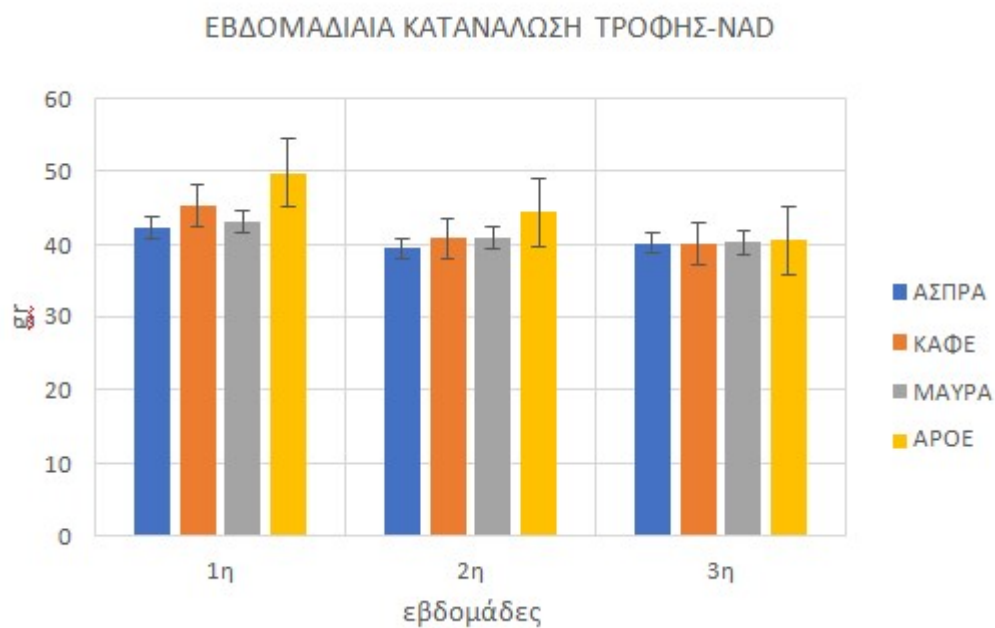
Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Τροφής-HFD



Διάγραμμα 14 | Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-HFD

[pre:p<0,0001 **** από 1η, 2η και 3η εβδομάδα]

Παρατηρούμε στο πρωτόκολλο HFD, στην αρχή του πειράματος, υψηλή κατανάλωση τροφής που σταδιακά μειωνόταν και έπειτα της ένεσης τάση προς σταθεροποίηση με μικρές μεταβολές. Το αποτέλεσμα που προκύπτει, είναι πιθανό, καθώς δημιουργείται κορεσμός του οργανισμού στην κατανάλωση τροφής.

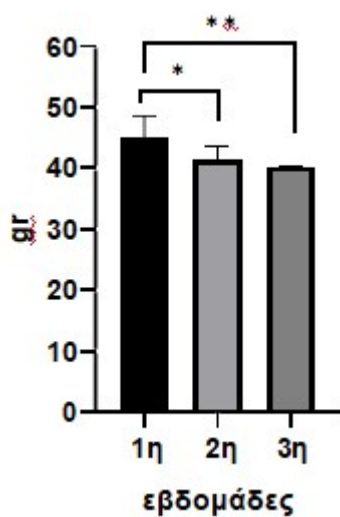


Διάγραμμα 15 | Κατανάλωση τροφής-NAD

2way ANOVA			
NAD- ΤΡΟΦΗ			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
1η vs. 2η	Yes	*	0,0192
1η vs. 3η	Yes	**	0,0061
2η vs. 3η	No	ns	0,3729

Πίνακας 13 | 2way ANOVA+post-hocFisher's LSD-Κατανάλωση τροφής-NAD

Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Τροφής-NAD

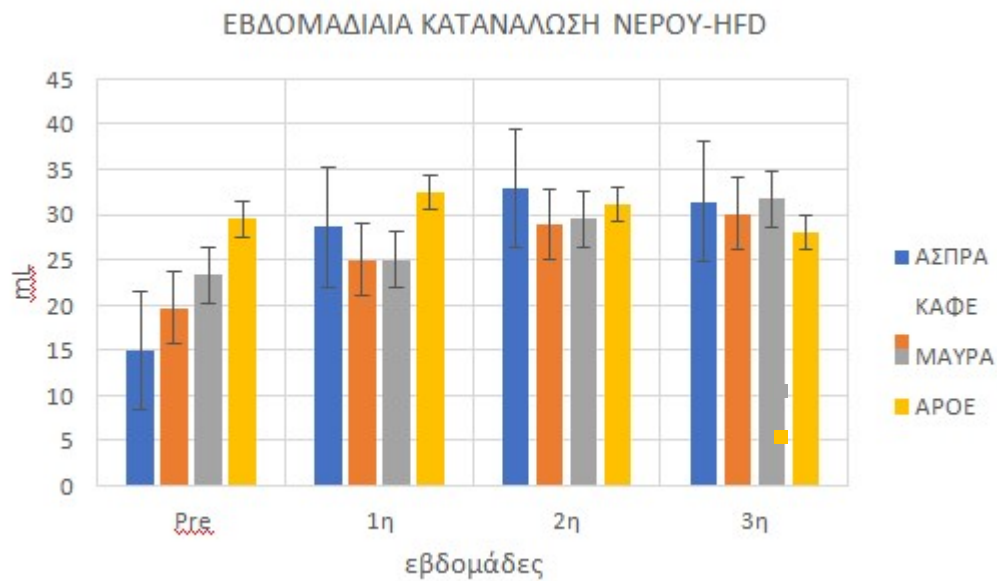


Διάγραμμα 16 | Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-NAD

[1η:p<0,05 * από την 2η, p<0,01 ** από την 3η]

Στο πρωτόκολλο NAD, παρατηρούμε μείωση κατανάλωσης τροφής των μυών μετά τη χορήγηση των ενέσεων.

Κατανάλωση νερού

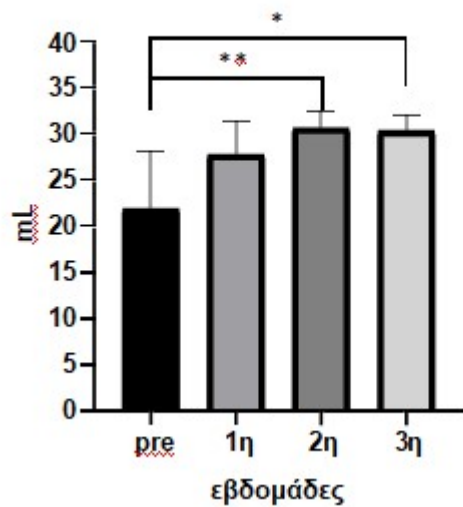


Διάγραμμα17 | Κατανάλωση νερού-HFD

2way ANOVA			
HFD-NEPO			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
pre vs. 1η	No	ns	0,0529
pre vs. 2η	Yes	**	0,0091
pre vs. 3η	Yes	*	0,0109
1η vs. 2η	No	ns	0,3084
1η vs. 3η	No	ns	0,3589
2η vs. 3η	No	ns	0,9126

Πίνακας 14 | 2way ANOVA+ post-hocFisher's LSD -Κατανάλωση νερού-HFD

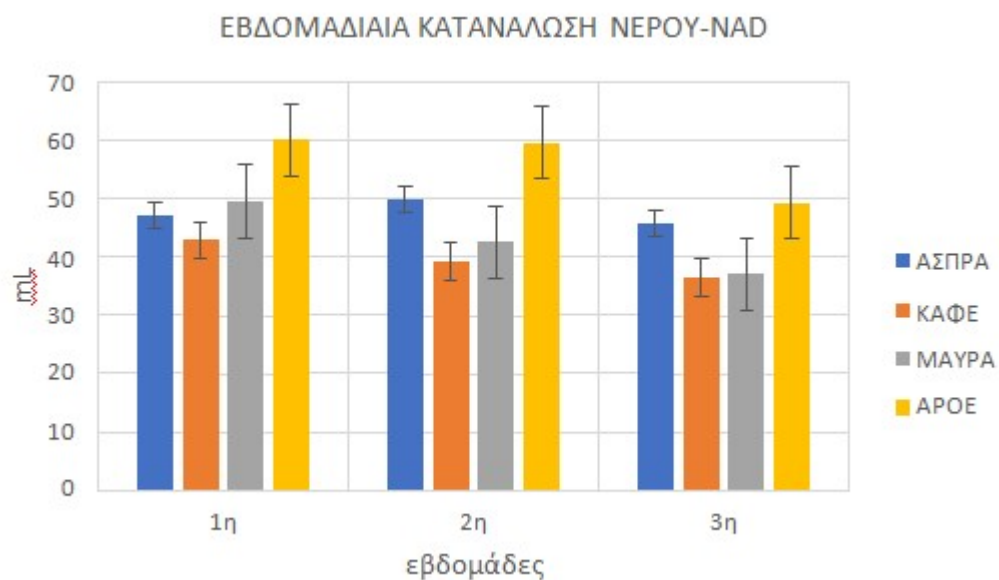
Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Νερού-HFD



Διάγραμμα 18 | Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-HFD

[2η:p<0,01 ** από την pre, 3η:p<0,05 * από την pre]

Η εβδομαδιαία κατανάλωση νερού στο πρωτόκολλο HFD, αυξάνεται σταδιακά στις ομάδες μυών, κάτι που δικαιολογείται από το γεγονός ότι τρέφονταν με πολλά λιπαρά και σάκχαρη οπότε παρατηρήθηκε πολυδιψία.

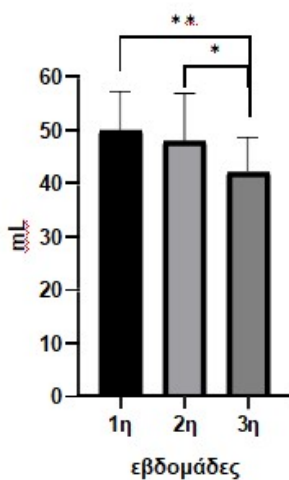


Διάγραμμα 19 | Κατανάλωση νερού-NAD

2way ANOVA			
NAD-NEPO			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
1η vs. 2η	No	ns	0,3675
1η vs. 3η	Yes	**	0,0098
2η vs. 3η	Yes	*	0,0334

Πίνακας 15 | 2way ANOVA+post-hocFisher's LSD -Κατανάλωση νερού-NAD

Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Νερού-NAD

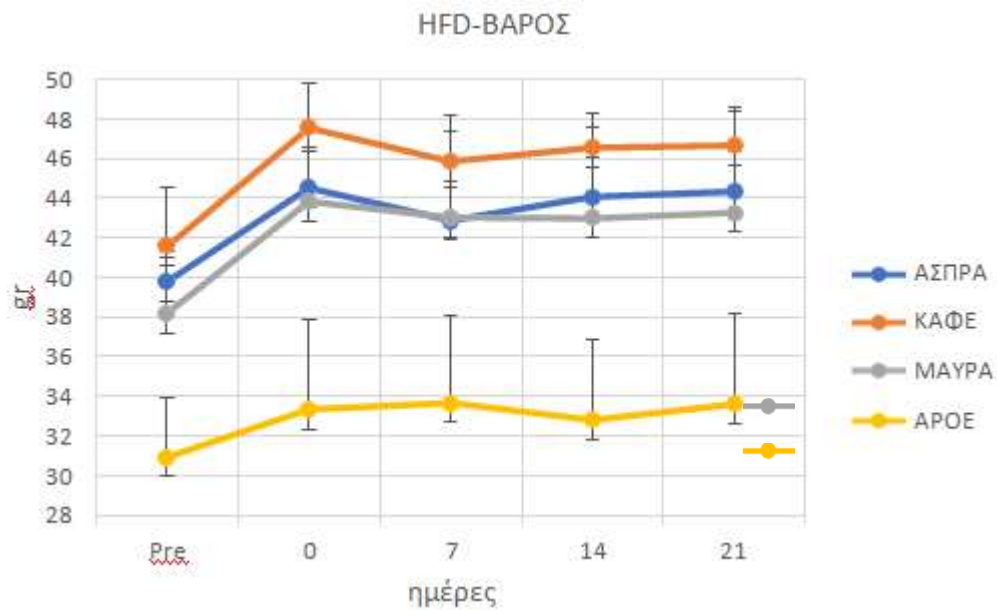


Διάγραμμα 20 | Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-NAD

[1η:p<0,01 ** από την 3η, 2η:p<0,05 * από την 3η]

Παρατηρείται σταθερότητα στην κατανάλωση νερού την 1η και 2η εβδομάδα, ενώ την 3η εβδομάδα, μικρή μείωση κατανάλωσης νερού σε όλες τις ομάδες. Δεν μπορούμε να εξάγουμε τελικό συμπέρασμα από τα παραπάνω δεδομένα, καθώς η ανάπτυξη του διαβήτη συνεχίστηκε μέχρι την 5^η εβδομάδα, όπου πάρθηκαν οι τελευταίες μετρήσεις γλυκόζης (35η ημέρα).

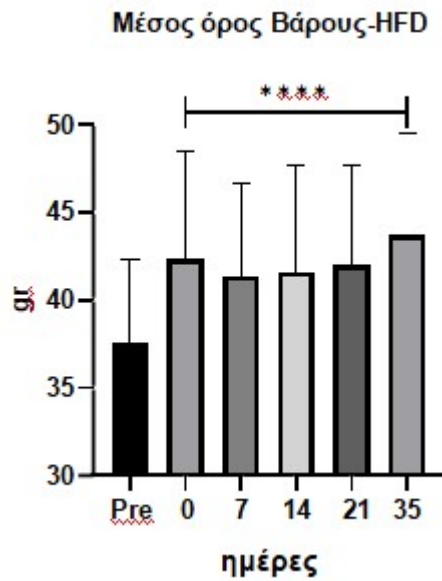
Μέτρηση βάρους



Διάγραμμα 21 | HFD-Βάρος

2way ANOVA			
HFD-BAPOS			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
Pre vs. 0	Yes	****	<0,0001
Pre vs. 7	Yes	****	<0,0001
Pre vs. 14	Yes	****	<0,0001
Pre vs. 21	Yes	****	<0,0001
Pre vs. 35	Yes	****	<0,0001
0 vs. 7	Yes	*	0,0402
0 vs. 35	Yes	*	0,0275
7 vs. 35	Yes	****	<0,0001
14 vs. 35	Yes	***	0,0003
21 vs. 35	Yes	**	0,0039

Πίνακας 16 | 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -HFD-BAPOS



Διάγραμμα 22 | Μέσος όρος Βάρους-HFD

[ημέρες 0, 7, 14, 21, 35: $p < 0,0001$ **** από την pre]

Παρατηρείται ότι όλες τις μέρες υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση όλων των ομάδων σε σχέση με την περίοδο του εγκλιματισμού των μυών (3 εβδομάδες).

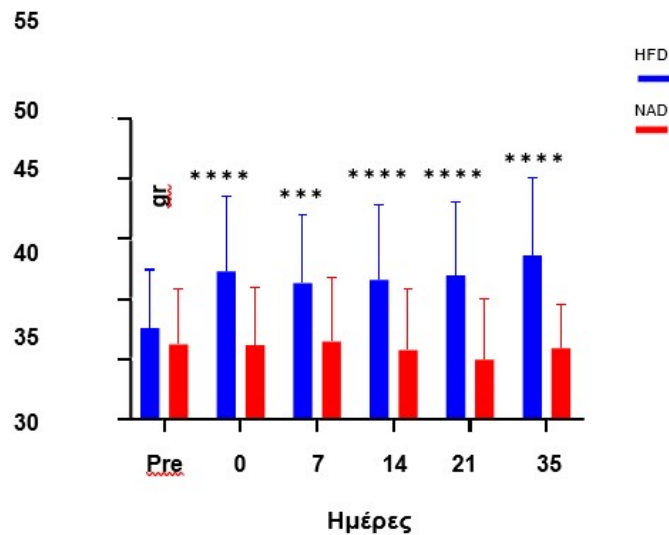
- NAD

2way ANOVA			
NAD-BAΠΟΣ			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
pre vs. 21	Yes	***	0,0002
0 vs. 21	Yes	***	0,0003
7 vs. 14	Yes	*	0,025
7 vs. 21	Yes	****	<0,0001
14 vs. 21	Yes	*	0,0195
21 vs. 35	Yes	**	0,0046

Πίνακας 17 | 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -NAD-BAΠΟΣ

Παρατηρούμε μικρή μείωση βάρους σε όλες τις ομάδες κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ωστόσο υπάρχει στατιστική σημαντικότητα στη μείωση βάρους κατά μέσο όρο όλων των ομάδων, την ημέρα 21 από την περίοδο εγκλιματισμού.

Μέσος όρος Βάρους HFD vs NAD

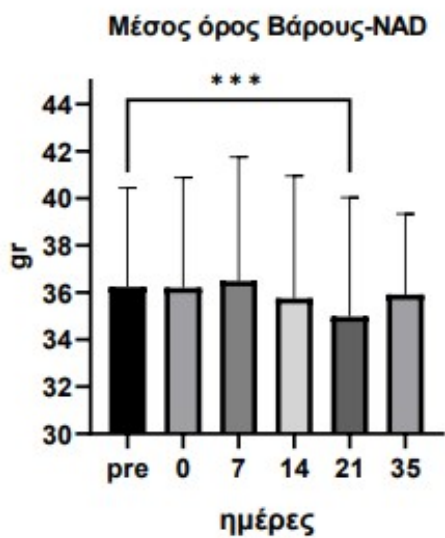


Διάγραμμα 23 | Μέσος όρος Βάρους- HFD vs NAD

[0, 14, 21, 35: $p < 0,0001$ ****, 7: $p < 0,001$ ***]

2way ANOVA				
Uncorrected	Significant?	Summary	Individual	P
Fisher's LSD			Value	
HFD vs NAD BAPOS				
0	Yes	****		<0,0001
7	Yes	***		0,0008
14	Yes	****		<0,0001
21	Yes	****		<0,0001
35	Yes	****		<0,0001

Πίνακας 18 | 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -HFD vs NAD-BAPOS



Διάγραμμα 24 | Μέσος όρος Βάρους-NAD

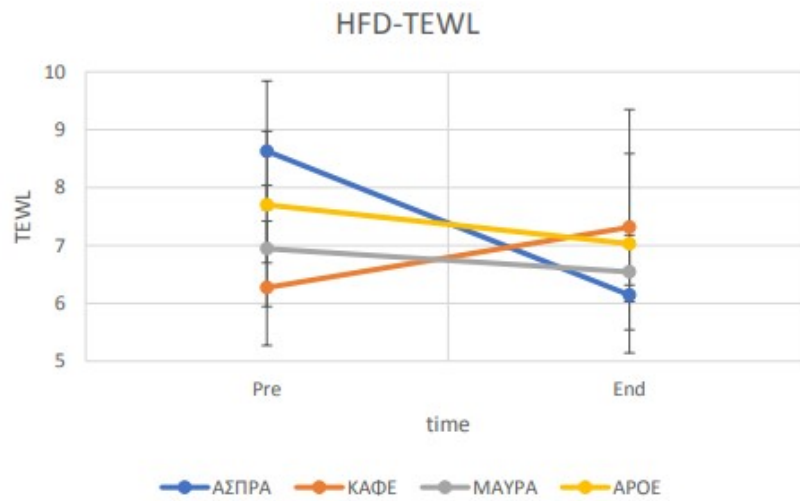
[pre->21: $p < 0,001$ ***]

Συγκρίνοντας τα δύο πρωτόκολλα ως προς το μέσο όρο βάρους των μυών, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ τους, τις ημέρες 0, 7, 14, 21 και 35.

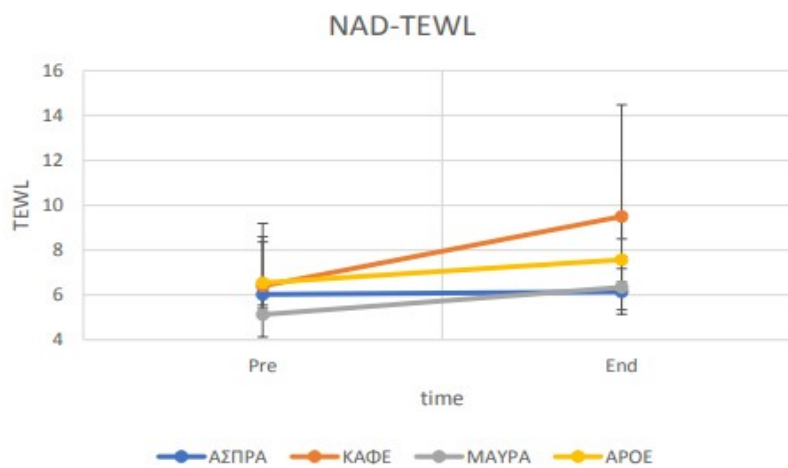
Παρατηρούμε στο πρωτόκολλο HFD, σε αντίθεση με το πρωτόκολλο NAD, ότι μετά την περίοδο εγκλιματισμού, αυξήθηκε σημαντικά το βάρος των μυών και έπειτα σταθεροποιήθηκε.

Βιοφυσικές μετρήσεις

Άδηλη απώλεια νερού (TEWL)



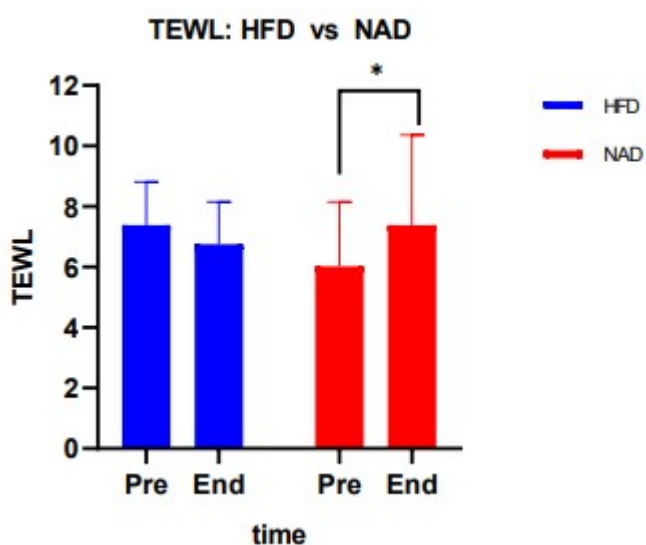
Διάγραμμα 25 |HFD-TEWL



Διάγραμμα 26 | NAD-TEWL

2way ANOVA			
TEWL			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
Pre - End			
HFD	No	ns	0,2435
NAD	Yes	*	0,0133

Πίνακας 19 | 2 way ANOVA + post hoc Fisher 's LSD -Tewl HFD vs NAD



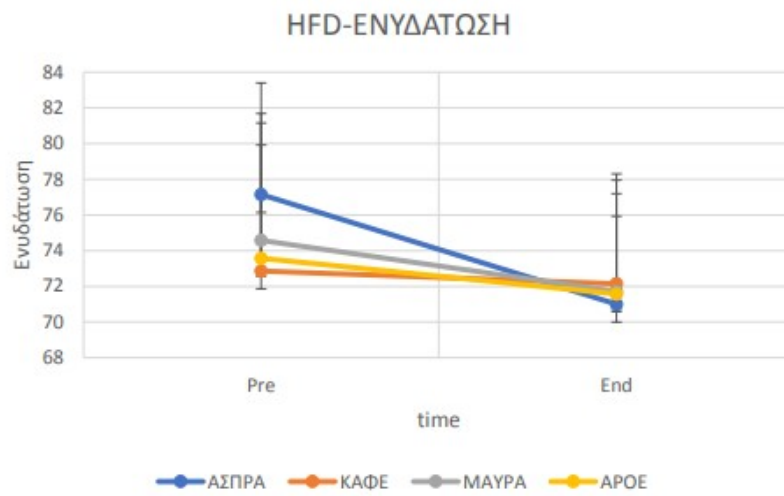
Διάγραμμα 27 | Μέσος όρος TEWL HFD vs NAD

Παρατηρήσεις:

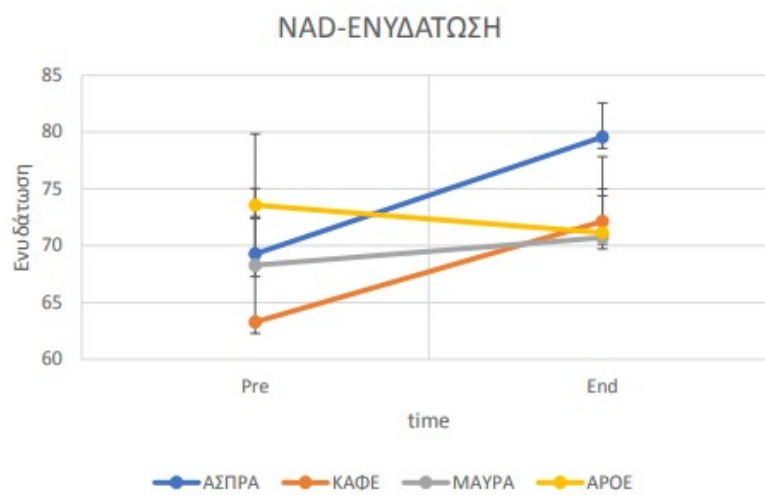
- HFD: μείωση TEWL σε όλες τις ομάδες πλην της ΚΑΦΕ
- NAD: αύξηση σε όλες τις ομάδες πλην των ΑΣΠΡΩΝ που παρέμεινε σταθερή η Tewl

Συγκρίνοντας τον μέσο όρο της TEWL και στα δύο πρωτόκολλα, διακρίνουμε μία στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0,05$, *) της άδηλης απώλειας νερού στους μύες του πρωτοκόλλου NAD, στις τελικές μετρήσεις. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ο επιδερμικός φραγμός έχει αρχίσει να αλλοιώνεται και δεν είναι πλέον τόσο αδιαπέραστος. Σε αυτό σαφώς μπορεί να έχει συμβάλει η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2.

Ενυδάτωση



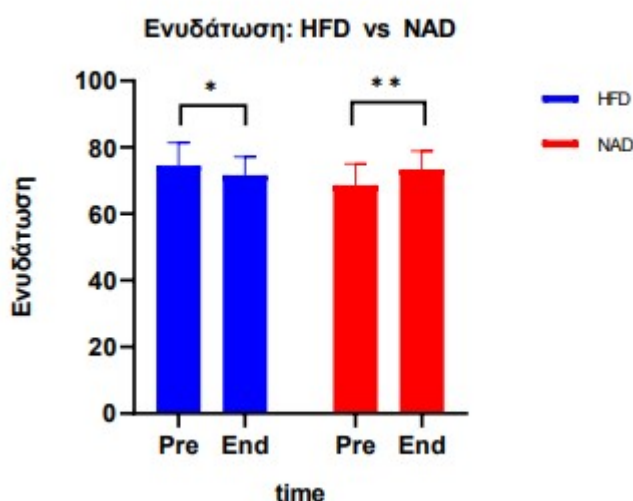
Διάγραμμα 28 | HFD- Ενυδάτωση



Διάγραμμα 29 |NAD- Ενυδάτωση

2way ANOVA				
ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ				
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value	
Pre - End				
HFD	Yes	*	0,0392	
NAD	Yes	**	0,0011	

Πίνακας20 | 2way ANOVA + post Hoc Fisher 's LSD ΕΝΥΔΑΤΩΣΗHFD vs NAD



Διάγραμμα29 | Μέσος όρος Ενυδάτωσης-HFDvsNAD

[HFDpre-end: $p < 0,05$ *, NADpre-end: $p < 0,01$ **]

Παρατηρήσεις:

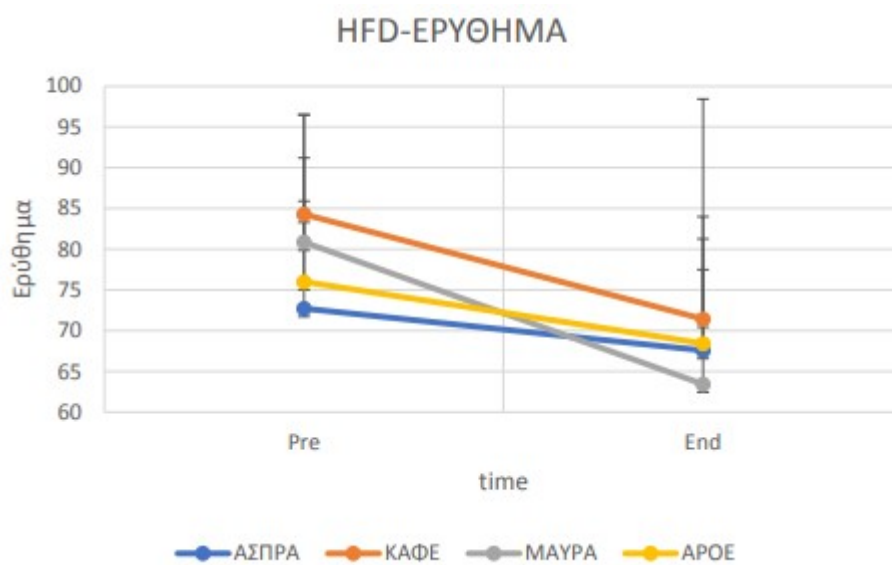
- HFD: παρατηρείται μείωση ενυδάτωσης σε όλες τις ομάδες.
- NAD: παρατηρείται αύξηση ενυδάτωσης στα ΑΣΠΡΑ, ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, ενώ μειώνεται η ενυδάτωση στα ΑΡΟΕ.

Συγκρίνοντας τον μέσο όρο της ενυδάτωσης των αρχικών και των τελικών μετρήσεων και στα δύο πρωτόκολλα, παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$ *) της ενυδάτωσης στους μύες HFD στις τελικές μετρήσεις, ενώ στους μύες NAD, η ενυδάτωση αυξάνεται στις τελικές μετρήσεις και μάλιστα στατιστικά πολύ

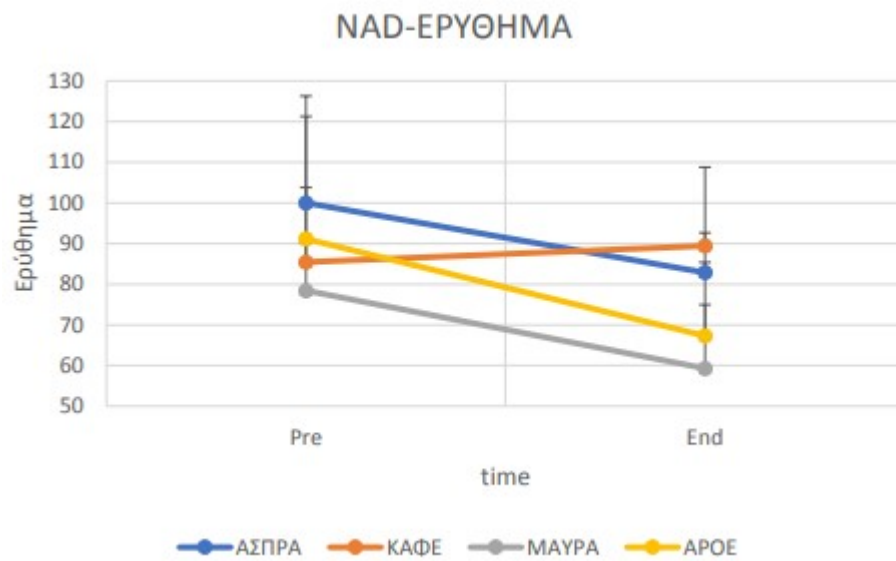
σημαντικά ($p < 0,01$ **) από τις αρχικές μετρήσεις.

Αυτές οι παρατηρήσεις δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα για το αν οι αλλαγές που παρουσίασαν οι μύες στην ενυδάτωση, οφείλονται στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

Ερύθημα



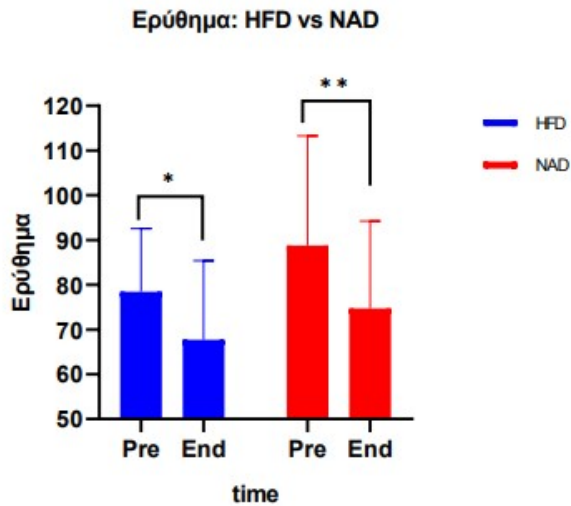
Διάγραμμα 30 | HFD - Ερύθημα



Διάγραμμα 31 |NAD – Ερύθημα

2way ANOVA				
ΕΡΥΘΗΜΑ				
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value	P
Pre - End				
HFD	Yes	*	0,0102	
NAD	Yes	**	0,001	

Πίνακας 21 | 2way ANOVA + post Hoc Fisher 's LSD ΕΝΥΔΑΤΩΣΗHFD vs NAD



Διάγραμμα 32 | Μέσος όρος Ερυθήματος-HFD vs NAD

[HFD pre-end: $p < 0.001^{**}$]

Παρατηρήσεις:

- HFD: παρατηρείται σταδιακή μείωση σε όλες τις ομάδες.
- NAD: παρατηρείται μείωση ερυθήματος σε όλες τις ομάδες εκτός από τα ΚΑΦΕ.
- Συγκρίνοντας τον μέσο όρο του ερυθήματος των αρχικών και των τελικών μετρήσεων και στα δύο πρωτόκολλα, παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση του ερυθήματος στους μύες HFD ($p < 0,05$ *) και NAD ($p < 0,01$ **) στις τελικές μετρήσεις.
- Αυτές οι παρατηρήσεις δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα για το αν η μείωση που παρουσίασαν οι μύες στο ερύθημα, οφείλεται στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

3.2 Στατιστική επεξεργασία και αποτελέσματα του 2^{ου} μέρους του πειράματος (Πρόκληση Ακανθοκυτταρικού καρκίνου με υπεριώδες φως σε διαβητικούς μύες τύπου I και II)

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Γλυκόζη

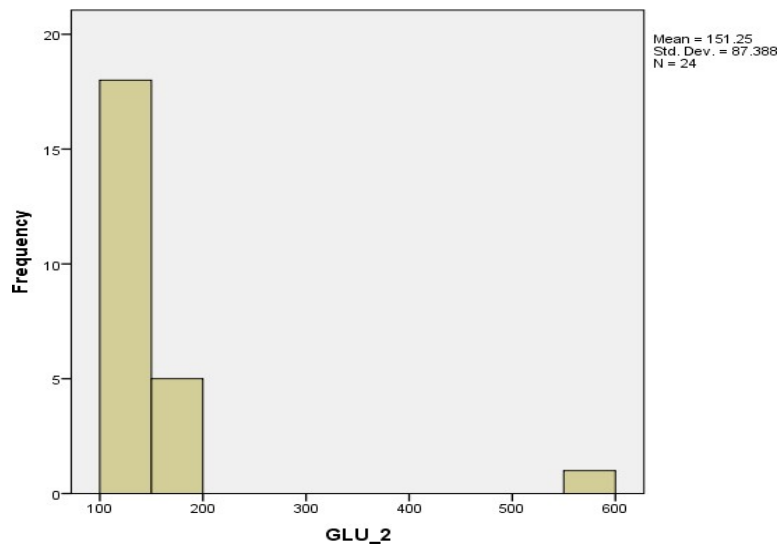
Έλεγχος Κανονικότητας

	Ημέρα 0	1ος Μηνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.240	0.323	0.125	0.475	0.220	0.232	0.899
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.603	0.292	0.055	0.949	0.486	0.057	0.10
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.784	0.468	0.037	0.684	0.051	0.059	0,151
Μόνο UV	0.952	0.246	0.475	0.215	0.941	0.377	0.382

Πίνακας 22 | Test Κανονικότητας Shapiro-Wilk

Στον παραπάνω πίνακα 1 παρουσιάζονται τα **P-Value** του ελέγχου Κανονικότητας. Το επίπεδο σημαντικότητας του ελέγχου είναι **0.05** . Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι:

- Στις περισσότερες ομάδες ισχύει ότι **p-value > 0.05** τότε , δηλαδή **Δεν απορρίπτουμε**την Μηδενική Υπόθεση. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα δεδομένα ακολουθούν Κανονική Κατανομή σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.
- Παρατηρούμε όμως ότι για τα ποντίκια που ανήκουν στην Ομάδα 3 (Διαβήτης Τύπου II και UV) τον 2^ο, ισχύει ότι **p-value < 0.05** , δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα δεδομένα δεν ακολουθούν Κανονική Κατανομή σε επίπεδο σημαντικότητας 5% . Για το λόγο αυτό θα παραθέσουμε το Ιστόγραμμα ώστε να εντοπίσουμε το λόγο που τα δεδομένα της ομάδας 3 τον 2^ο Μήνα δεν παρουσιάζουν Κανονικότητα.

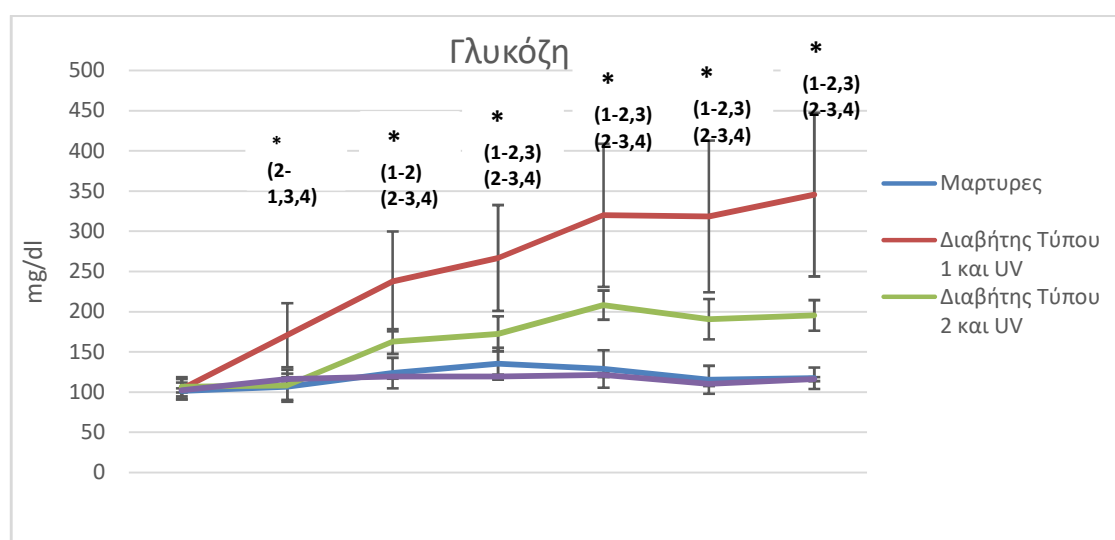


Διάγραμμα 33 |Ιστόγραμμα Γλυκόζης Ομάδας 3 τον 2^ο Μήνα

Στο παραπάνω Ιστόγραμμα παρατηρούμε την κατανομή στους μύες της ομάδας 3, τον 2^ο μήνα. Σκοπός μας ήταν να τους προκαλέσουμε Διαβήτη Τύπου II. Παρατηρούμε ότι σε ορισμένους μύες παρά την χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης, τα επίπεδα γλυκόζης δεν ανέβηκαν. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι οι μύες έχουν διαφορετική ηλικία μεταξύ τους και ότι ο κάθε οργανισμός είναι ξεχωριστός από τους υπόλοιπους. Η ποσοτική εξήγηση είναι ότι ενώ σε ορισμένους μύες η γλυκόζη παρέμεινε σταθερή, σε άλλα μεταβλήθηκε και είχε σαν αποτέλεσμα οι μύες να χωριστούν σε δύο διαφορετικές ομάδες μέσα στον ίδιο πληθυσμό. Ακόμα παρατηρούμε ότι ένας μύς ενώ θα έπρεπε με την χορηγούμενη δόση να έχει διαβήτη τύπου II έχει διαβήτη τύπου I, γεγονός που σίγουρα επηρεάζει την κατανομή μας.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	101,40	130,80	106,70	102,2
	SD	10,65	12,53	12,35	12,04
1ος	M.O	106,70	170,70	108,1	116,02
	SD	16,32	39,84	16,20	39,80
2ος	M.O	123,83	237,67	162,97	119,10
	SD	18,99	65,123	40,20	15,458
3ος	M.O	135,37	263,87	172,50	119,20
	SD	19,70	75,78	65,07	21,791
4ος	M.O	144,94	320,00	208,25	121,25
	SD	23,35	88,98	71,12	18,06
5ος	M.O	115,38	318,53	190,75	110,05
	SD	17,47	94,25	66,01	25,039
6ος	M.O	111,88	345,63	195,50	116,22
	SD	13,336	101,72	159,47	18,96

Πίνακας 23 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων Γλυκόζης



Διάγραμμα 34| Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων Γλυκόζης

Στο παραπάνω διάγραμμα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της γλυκόζης στο αίμα παραμένουν σταθερά καθ 'όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτη Τύπου 1 και UV:** Παρατηρούμε ότι η Μέση Τιμή στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μετά την χορήγηση της στρεπτοζοτοκίνης παρουσιάζει ανοδική τάση με την πάροδο του πειράματος το οποίο μας δείχνει ότι προκλήθηκε Διαβήτη τύπου 1 στους περισσότερους μύες.

- iii) **Διαβήτης Τύπου II και UV :** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή παρουσιάζει μέχρι τον 4^ο μήνα μία ανοδική τάση και στην συνέχεια μία σταθερότητα η οποία μαζί με τις τιμές από τους μέσους όρους μας αποδεικνύει ότι προκαλέσαμε Διαβήτη τύπου II στους περισσότερους μύς.
- v) **Μόνο UV:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της γλυκόζης στο αίμα παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων

ANOVA						
		SumofSquares	df	MeanSquare	F	Sig.
GLU_0	BetweenGroups	342.468	3	114.156	.854	.474
	WithinGroups	4677.122	35	133.632		
	Total	5019.590	38			
GLU_1	BetweenGroups	23786.072	3	7928.691	5.429	.002
	WithinGroups	163568.928	112	1460.437		
	Total	187355.000	115			
GLU_2	BetweenGroups	149011.347	3	49670.449	6.102	.001
	WithinGroups	911735.687	112	8140.497		
	Total	1060747.034	115			
GLU_3	BetweenGroups	190885.843	3	63628.614	8.934	.000
	WithinGroups	797661.079	112	7121.974		
	Total	988546.922	115			
GLU_4	BetweenGroups	325959.978	3	108653.326	11.510	.000
	WithinGroups	651348.132	69	9439.828		
	Total	977308.110	72			
GLU_5	BetweenGroups	250821.837	3	83607.279	8.707	.000
	WithinGroups	633749.434	66	9602.264		
	Total	884571.271	69			
GLU_6	BetweenGroups	223383.335	3	74461.112	6.666	.001
	WithinGroups	323918.181	29	11169.592		
	Total	547301.515	32			

Πίνακας 24 | Έλεγχος Ισότητας Μέσης Τιμής Ανάμεσα στις Ομάδες

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 **p-value > 0.05**, δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%**.
- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value<0.05**, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από τον 1^ο έως και 6^ο **δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%**.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1	2	0.004	0.001	0.004
	3	0.999	0.886	0.999
	4	0.997	0.848	0.999
2	3	0.006	0.001	0.006
	4	0.007	0.001	0.007
3	4	0.998	0.962	0.999

Πίνακας 25 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 1^ο Μήνα

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ για τον 1^ο Μήνα του πειράματος. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Μεταξύ των υγιών μυών και αυτών που τους προκλήθηκε Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των ποντικών είναι διαφορετικά σαν αποτέλεσμα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV και αυτών που τους προκλήθηκε Διαβήτης Τύπου II και έλαβαν UV παρατηρείται

στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικού τύπου διαβήτη στις δυο ομάδες.

- Μεταξύ των ποντικών που τους προκλήθηκε Διαβήτης Τύπου Ι και έλαβαν UV και αυτών που έλαβαν μόνο UV παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών.
- Στις υπόλοιπες συγκρίσεις που δεν απορρίφθηκε ο έλεγχος σημαίνει ότι το μέσο επίπεδο γλυκόζης παρέμεινε το ίδιο, το οποίο είναι λογικό μεταξύ των Μαρτύρων και αυτών που έλαβαν μόνο UV καθώς δεν έγινε πρόκληση διαβήτη.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1	2	0.004	0.003	0.004
	3	0.383	0.486	0.586
	4	0.997	0.878	0.903
2	3	0.03	0.03	0.049
	4	0.02	0.01	0.02
3	4	0.282	0.262	0.239

Πίνακας 26 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 2^ο Μήνα

Στον Πίνακα παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 για τον 2^ο Μήνα του πειράματος. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Μεταξύ των **Υγείων** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου Ι και έλαβαν UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των μυών είναι διαφορετικά σαν αποτέλεσμα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης.

- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II και έλαβαν UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικού τύπου διαβήτη στις δυο ομάδες
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών που τους χορηγήθηκε.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1	2	0.001	0.001	0.004
	3	0.920	0.880	0.939
	4	0.992	0.888	0.959
2	3	0.001	0.001	0.001
	4	0.001	0.001	0.001
3	4	0.967	0.922	0.990

Πίνακας 27 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 3^ο Μήνα

Στον Πίνακα παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ για τον 3^ο Μήνα του πειράματος. Παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα.

- Μεταξύ των **Υγείων** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών είναι διαφορετικά.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II και UV** παρατηρείται στατιστικά

σημαντική διαφορά. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικού τύπου διαβήτη στις δυο ομάδες.

- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και έλαβαν UV** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των ποντικών που τους χορηγήθηκε.
- Στις υπόλοιπες συγκρίσεις που δεν απορρίφθηκε ο έλεγχος σημαίνει ότι το μέσο επίπεδο γλυκόζης παρέμεινε το ίδιο. Το οποίο είναι λογικό μεταξύ των **Μαρτύρων** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** καθώς και στις δύο ομάδες δεν έγινε χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης. Ακόμη παρατηρούμε ότι η μέση τιμή στα επίπεδα γλυκόζης στους μύες προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II και έλαβαν UV** δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτών των **Μαρτύρων** και αυτών που τους χορηγήθηκε **μόνο UV**. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δεν έχουν νοσήσει όλα τα ποντίκια πιθανότατα λόγω της διαφορετικής ηλικίας.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1	2	0.001	0.003	0.004
	3	0.043	0.004	0.034
	4	0.880	0.478	0.983
2	3	0.043	0.009	0.049
	4	0.001	0.001	0.002
3	4	0.029	0.036	0.042

Πίνακας 28 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 4^ο Μήνα

Στον Πίνακα παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova

σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 για τον 4^ο Μήνα του πειράματος. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Μεταξύ των **Υγιών** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I** και ακτινοβολήθηκαν με **UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης των ποντικών είναι διαφορετικά.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II και UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικό τύπο διαβήτη στις δυο ομάδες.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I και ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών που τους χορηγήθηκε.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II και ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρούμε ότι η μέση τιμή στα επίπεδα γλυκόζης στους πλέον διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτών των **Μαρτύρων** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV**. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι πλέον οι περισσότεροι μύες της ομάδας 3 έχουν νοσήσει με διαβήτη Τύπου II.
- Στις υπόλοιπες συγκρίσεις που δεν απορρίφθηκε ο έλεγχος σημαίνει ότι το μέσο επίπεδο γλυκόζης στο αίμα παρέμεινε το ίδιο. Το οποίο είναι λογικό μεταξύ των **Μαρτύρων** και αυτών που **ακτινοβολήθηκαν με UV**.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
--------------------------	--	-----------	-----	------------

1	2	0.003	0.023	0.045
	3	0.039	0.024	0.044
	4	0.345	0.401	0.753
2	3	0.032	0.039	0.041
	4	0.001	0.001	0.001
3	4	0.042	0.035	0.048

Πίνακας 29 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 5^ο Μήνα

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ για τον 5^ο Μήνα του πειράματος. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Μεταξύ των **Υγιών** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου Ι και χορήγηση UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των ποντικών είναι διαφορετικά σαν αποτέλεσμα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου Ι και ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου ΙΙ και έλαβαν UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικού τύπου διαβήτη στις δυο ομάδες
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου Ι και ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών που τους χορηγήθηκε.

- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II** και **ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρούμε ότι η μέση τιμή στα επίπεδα γλυκόζης τους πλέον διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτών των **Μαρτύρων** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV**. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι πλέον οι περισσότεροι μύες της ομάδας 3 έχουν νοσήσει με διαβήτη Τύπου II.
- Στις υπόλοιπες συγκρίσεις που δεν απορρίφθηκε ο έλεγχος σημαίνει ότι το μέσο επίπεδο γλυκόζης στο αίμα παρέμεινε το ίδιο. Το οποίο είναι λογικό μεταξύ των **Μαρτύρων** και αυτών που έλαβαν **μόνο UV** καθώς και στις δύο ομάδες δεν έγινε χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonfer-roni
1	2	0.001	0.001	0.001
	3	0.033	0.017	0.024
	4	0.345	0.401	0.753
2	3	0.012	0.028	0.040
	4	0.001	0.001	0.001
3	4	0.039	0.026	0.012

Πίνακας 30 | Στατιστική Ανάλυση επιπέδων Γλυκόζης για τον 6^ο Μήνα

Στον Πίνακα παρουσιάζονται οι αναλύσεις με τα κριτήρια Post-Hoc του Anova

σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$ για τον 6^ο Μήνα του πειράματος. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα P-Value του ελέγχου για την ισότητα των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων. Από αυτά βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Μεταξύ των **Υγειών** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I** και **ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι τα μέσα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των μυών είναι διαφορετικά σαν αποτέλεσμα της χορήγησης στρεπτοζοτοκίνης.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου I** και **ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου II** και **ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι η διαφορετική ποσότητα της χορήγησης

στρεπτοζοτοκίνης λειτούργησε έτσι ώστε να προκαλέσει διαφορετικού τύπου διαβήτη στις δυο ομάδες.

- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου Ι και ακτινοβολήθηκαν με UV** και αυτών που **ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης προκάλεσε αύξηση στα μέσα επίπεδα γλυκόζης των μυών που τους χορηγήθηκε.
- Μεταξύ των μυών που τους προκλήθηκε **Διαβήτης Τύπου ΙΙ και ακτινοβολήθηκαν με UV** παρατηρούμε ότι η μέση τιμή στα επίπεδα γλυκόζης στους πλέον διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτών των **Μαρτύρων** και αυτών που **ακτινοβολήθηκαν με UV**. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι πλέον τα περισσότερα ποντίκια της ομάδας 3 έχουν διαβήτη Τύπου ΙΙ.
- Στις υπόλοιπες συγκρίσεις που δεν απορρίφθηκε ο έλεγχος, που σημαίνει ότι το μέσο επίπεδο γλυκόζης παρέμεινε το ίδιο. Το οποίο είναι λογικό μεταξύ των **Μαρτύρων** και αυτών που **ακτινοβολήθηκαν με UV** καθώς και στις δύο ομάδες δεν έγινε χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης

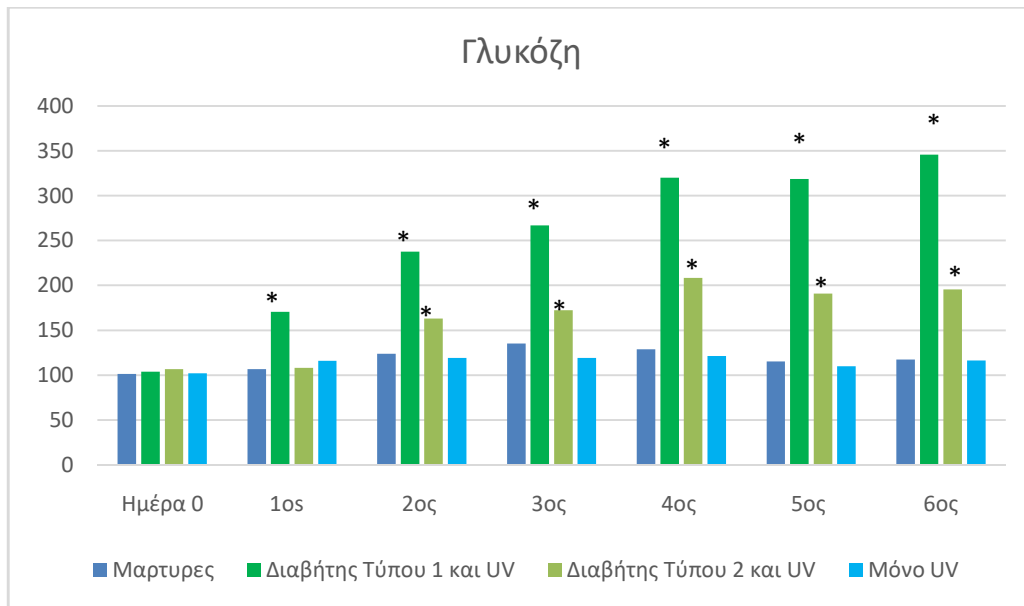
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα των μυών που τους χορηγήθηκε στρεπτοζοτοκίνης.

Μήνας	Διαβήτης Τυπου Ι και UV	Διαβήτης Τυπου ΙΙ και UV
0-1ος	0.467	0.288
1ος-2ος	0.004	0.042
2ος-3ος	0.013	0.027
3ος-4ος	0.018	0.039
4ος-5ος	0.366	0.299
5ος-6ος	0.04	0.402

Πίνακας 31 |Paired T-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις δύο ομάδες γεγονός που σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα δεν ανέβηκαν με την πρώτηδόση.
- Μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά και στις δύο ομάδες γεγονός που σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μεταβλήθηκαν σημαντικά και στις 2 ομάδες μεταξύ των δύοΜηνών.
- Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου I και UV. Το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζης μεταβλήθηκαν. Στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου II παρέμειναν σταθερά και ίδια με τον 2^ο μήνα.
- Μεταξύ του 3^{ου} και 4^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου I και UV. Το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζης μεταβλήθηκαν. Στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου II παρέμειναν σταθερά και ίδια με τον 3^ο μήνα.
- Μεταξύ του 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου II και UV. Το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζηςμεταβλήθηκαν. Στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου I παρέμειναν σταθερά και ίδια με τον 4^ο μήνα.
- Μεταξύ του 5^{ου} και 6^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου I και UV. Το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα γλυκόζηςμεταβλήθηκαν. Στην ομάδα με Διαβήτη Τύπου II παρέμειναν σταθερά και ίδια με τον 5^ο μήνα.
- Στους μύες που ανήκουν στην Ομάδα 1 και 4 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε κάποιο ζεύγος Μηνών, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς δεν τουςχορηγήθηκεστρεπτοζοτοκίνη.



Διάγραμμα 35 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Βάρος

Έλεγχος Κανονικότητας

	Ημέρα 0	1ος Μήνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.671	0.225	0.091	0.2	0.601	0.267	0.328
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.431	0.895	0.09	0.418	0.725	0.132	0.731
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.917	0.06	0.956	0.662	0.291	0.104	0.297
Μόνο UV	0.488	0.891	0.111	0.132	0.816	0.996	0.38

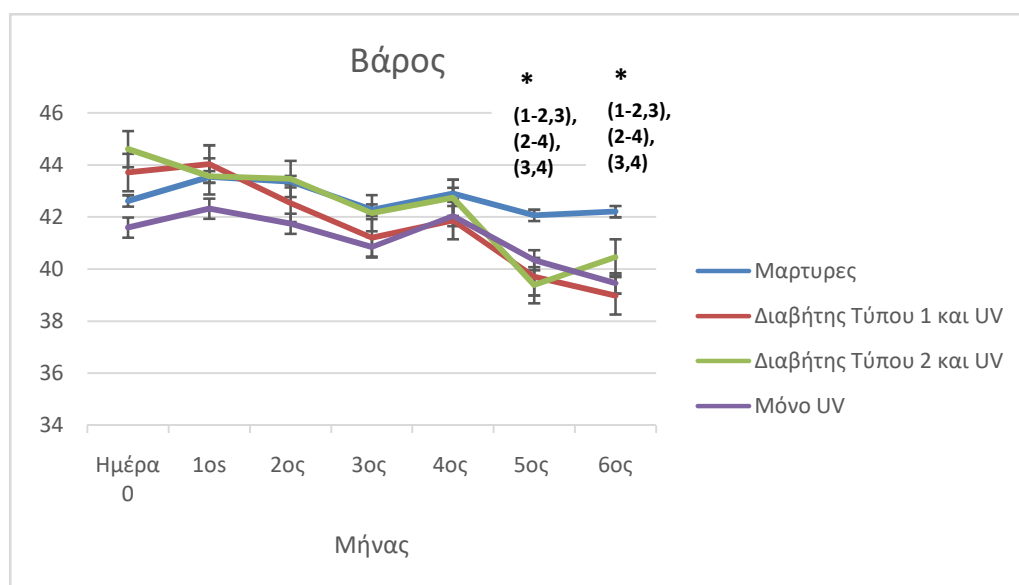
Πίνακας 32 | Test Κανονικότητας Shapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε έναν από τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα, $P\text{-value} > 0.05$. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις του Βάρους των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Παρακάτω παραθέτουμε τους πίνακες με τη Μέση Τιμή και την Τυπική Απόκλιση των μετρήσεων αυτών για κάθε Ομάδα ξεχωριστά και τα διαγράμματα για την Μέση Τιμή και την Τυπική απόκλιση.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	42.622	43.713	44.613	41.6
	SD	2.9491	3.0385	2.6925	2.7495
1 ^{ος}	M.O	43.548	44.037	43.565	42.325
	SD	2.1691	3.0242	5.0783	2.7782
2 ^{ος}	M.O	43.362	42.537	43.468	41.744
	SD	3.0227	3.334	4.5642	2.2904
3 ^{ος}	M.O	42.273	41.204	42.154	40.846
	SD	3.9533	3.677	4.1061	2.2712
4 ^{ος}	M.O	42.911	41.869	42.747	42.044
	SD	3.9324	3.7746	4.2291	2.3639
5 ^{ος}	M.O	42.069	39.714	39.388	40.347
	SD	3.3891	2.8839	3.1625	1.7868
6 ^{ος}	M.O	42.213	38,983	40.475	39.457
	SD	3.5069	2.1876	2.5756	2.2022

Πίνακας 33 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων Γλυκόζης



Διάγραμμα 36 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων Βάρους

Στο παραπάνω διάγραμμα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) Μάρτυρες: Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του Βάρους των μυνών παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) Διαβήτης Τύπου 1 και UV: Παρατηρούμε ότι η Μέση Τιμή του βάρους παρουσιάζει καθοδική τάση με την πάροδο του πειράματος. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι ενδοκυτταρική υπογλυκαιμία προκαλεί τη γλυκογένεση και τη γλυκονεογένεση που οδηγεί σε διάσπαση των λιπών (προκαλώντας διαβητική κετοξέωση) και μειώνει την πρωτεϊνική σύνθεση και τις γάμμα σφαιρίνες (προκαλώντας καχεξία, πολυφαγία και εξασθετισμένη επούλωση τραυμάτων), οδηγώντας στην πολυδιψία και επομένως συχνουρία χάνοντας μ' αυτό τον τρόπο πολλά υγρά και ηλεκτρολύτες και μη μπορώντας ο οργανισμός να αποθηκεύσει γρήγορα τις πρωτεΐνες και ότι άλλο απαραίτητο από την τροφή, οδηγεί σε μείωση βάρους .
- iii) Διαβήτης Τύπου II και UV : Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή παρουσιάζει μέχρι τον 5ο μήνα μία καθοδική τάση και στην συνέχεια από τον 5^ο μέχρι και τον έκτο παρατηρείται μικρή αύξηση.
- vi) Μόνο UV: Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της γλυκόζης στο αίμα παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με μικρή πτώση τους τελευταίους δύο μήνες, πιθανόν επειδή η UV ακτινοβολία που δέχτηκαν να τους προκάλεσε υψηλό στρες.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων (Ομάδα)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WEIGHT_0	Between Groups	41.342	3	13.781	1.68	.193
	Within Groups	237.873	29	8.203		
	Total	279.215	32			
WEIGHT_1	Between Groups	38.745	3	12.915	1.08	.359
	Within Groups	1154.928	97	11.906		
	Total	1193.672	100			
WEIGHT_2	Between Groups	64.742	3	21.581	1.85	.140
	Within Groups	1523.575	131	11.630		
	Total	1588.317	134			
WEIGHT_3	Between Groups	38.516	3	12.839	.984	.403
	Within Groups	1304.332	100	13.043		
	Total	1342.849	103			
WEIGHT_4	Between Groups	13.284	3	4.428	.330	.804
	Within Groups	846.574	63	13.438		
	Total	859.858	66			
WEIGHT_5	Between Groups	68.570	3	22.857	2.72	.048
	Within Groups	485.126	58	8.364	4	
	Total	553.697	61			
WEIGHT_6	Between Groups	44.591	3	14.864	2.00	.034
	Within Groups	185.549	25	7.422		
	Total	230.140	28			

Διάγραμμα 37 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι από τον 1^ο έως τον 4^ο Μήνα που έγιναν οι μετρήσεις **P-value > 0.05** το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές του Βάρους α) των Μαρτύρων, β) των μυών με Διαβήτη τύπου I και χορήγηση UV, γ) των μυών με διαβήτη τύπου II και χορήγηση UV, και δ) των μυών που τους χορηγήθηκε μόνο UV τους μήνες αυτούς είναι ίσες μεταξύ τους. Παρατηρούμε επίσης όμως ότι για τον 5^ο και 6^ο Μήνα **P-value < 0.05** το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές του Βάρους μεταξύ των Ομάδων διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό οφείλετε στο ότι οι μύες που ανήκουν στις ομάδες 2 και 3 παρουσίασαν απώλεια Βάρους και διαφοροποιήθηκαν από τις άλλες 2 ομάδες. Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε έλεγχο μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων για να δούμε μεταξύ ποιων ομάδων εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του βάρους.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		P-Value
1	2	0.042
	3	0.000
	4	0.532
2	3	0.283
	4	0.031
3	4	0.000
Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		P-Value
1	2	0.004
	3	0.000
	4	0,137
2	3	0,178
	4	0.000
3	4	0.000

Πίνακας 34 | T-test για τον 5^ο και 6^ο Μήνα

Από τους παραπάνω πίνακες με βάση τιμή του P-value του t-test βγάζουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Η μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 1 με αυτές των ομάδες 2,3 διαφέρει στατιστικά σημαντικά τον 5^ο και 6^ο Μήνα
- Η μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 1 είναι ίση με την μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 4 τον 5^ο και 6^ο Μήνα.
- Η μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 2 είναι ίση με την μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 3 τον 5^ο και 6^ο Μήνα.
- Η μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 2 με αυτή της ομάδας 4 διαφέρει στατιστικά σημαντικά τον 5^ο και 6^ο Μήνα.
- Η μέση τιμή του Βάρους της ομάδας 3 με αυτή της ομάδας 4 διαφέρει στατιστικά σημαντικά τον 5^ο και 6^ο Μήνα.

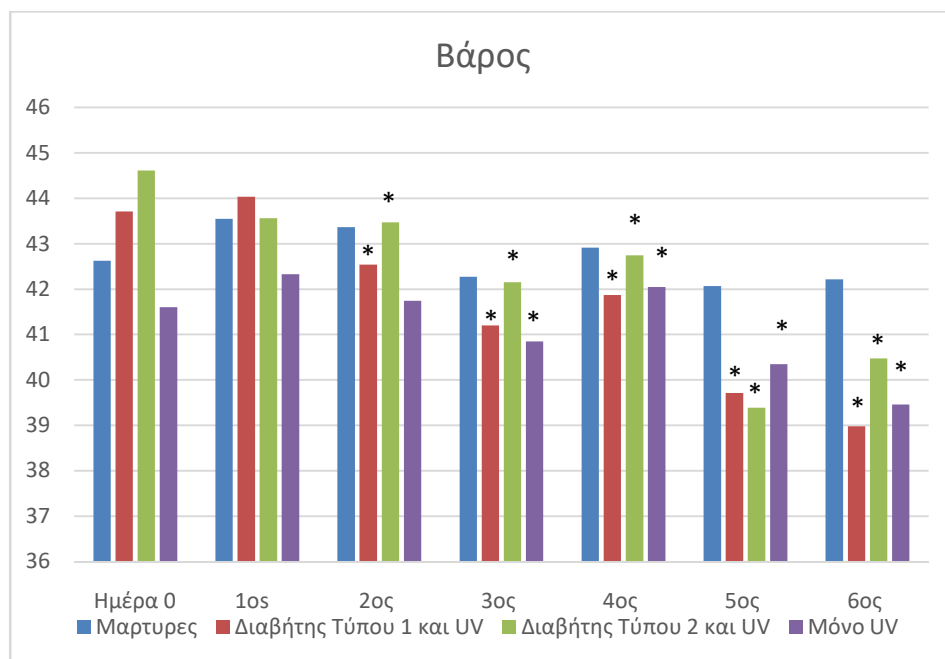
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το βάρος των μυών.

Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.194	0.271	0.791	0.496
1ος-2ος	0.080	0.156	0.571	0.655
2ος-3ος	0.392	0.000	0.000	0.003
3ος-4ος	0.085	0.161	0.414	0.001
4ος-5ος	0.065	0.009	0.000	0.042
5ος-6ος	0.916	0.047	0.787	0.232

Πίνακας 35 | Paired t-test

Από τον παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του βάρους.
- Διαβήτης Τύπου 1 και UV: Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα, 4^{ου} με 5^{ου} και 5^{ου} με 6^{ου} παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή του Βάρους.
- Διαβήτης Τύπου 2 και UV: Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα και 4^{ου} με 5^{ου} παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή του Βάρους.
- Μόνο UV: Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα, 3^{ου} και 4^{ου} Μήνα και 4^{ου} με 5^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του βάρους.



Διάγραμμα 38 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Άδηλη απώλειανερού

ΈλεγχοςΚανονικότητας

	Ημέρα 0	1ος Μήνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.305	0.594	0.606	0.290	0.601	0.162	0.123
Διαβήτη Τύπου 1 και UV	0.471	0.142	0.245	0.052	0.725	0.145	0.078
Διαβήτη Τύπου 2 και UV	0.877	0.464	0.465	0.064	0.291	0.100	0.473
Μόνο UV	0.530	0.276	0.688	0.069	0.816	0.075	0.092

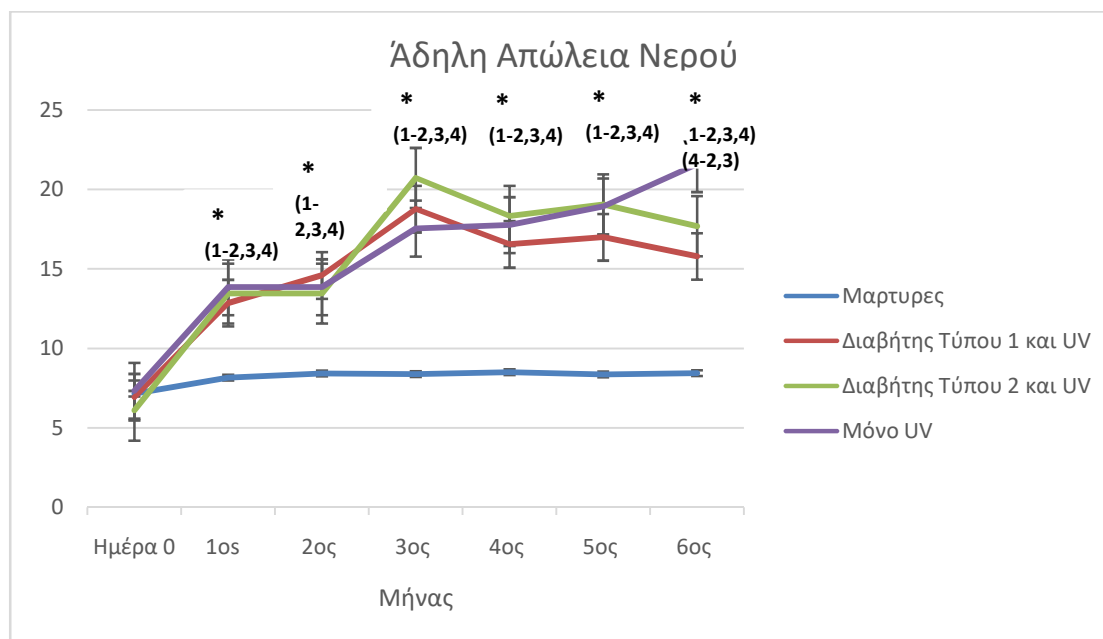
Πίνακας 36 | TestΚανονικότηταςShapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε ένα από τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value > 0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις της Άδηλης απώλειας νερού των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	7.16	6.94	6.1	7.34
	SD	1.1365	1.1365	1.5549	1.3898
1ος	M.O	8.17	12.86	13.46	13.86
	SD	0.8367	2.0754	1.7696	2.4914
2ος	M.O	8.44	14.6	16.75	15.43
	SD	0.624	2.8245	1.7343	2.8725
3ος	M.O	8.4	18.77	20.74	17.55
	SD	1.1988	5.3521	3.6357	6.9054
4ος	M.O	8.513	16.55	18.35	17.77
	SD	0.8288	6.1868	1.8495	6.857
5ος	M.O	8.388	17	19.07	18.94

	SD	0.7936	6.3024	1.78450	6.8282
6ος	M.O	8.45	15.8	17.17	21.65
	SD	0.8300	5.8306	1.4499	7.8683

Πίνακας 37 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση μετρήσεων



Διάγραμμα 39 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων Άδηλης απώλειας νερού

Στα παραπάνω 2 διαγράμματα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή της Άδηλης απώλειας νερού των μυών παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV:** Παρατηρούμε ότι η Μέση Τιμή της Άδηλης απώλειας νερού παρουσιάζει ανοδική πορεία μέχρι τον 3^ο μήνα και έπειτα από τον 3^ο μέχρι τον 5^ο σταθερότητα. Στη συνέχεια τον τελευταίο μήνα παρατηρείται βελτίωση καθώς μειώνεται πάλι η άδηλη απώλεια νερού του δέρματος των μυών, επομένως θα αυξάνει η ενυδάτωση τους.

- iii) **Διαβήτης Τύπου II και UV** : Παρατηρούμε ακριβώς την ίδια πορεία με τους μύες της δεύτερης ομάδας.
- iv) **Μόνο UV**: Παρατηρούμε ότι η Τιμή της Άδηλης απώλειας νερού παρουσιάζει ανοδική πορεία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Έλεγχος ισότητας μέσω των τιμών μεταξύ των ομάδων

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TEWL_0 Between Groups	9.019	3	3.006	1.835	.158
Within Groups	58.972	36	1.638		
Total	67.991	39			
TEWL_1 Between Groups	209.691	3	69.897	19.489	.000
Within Groups	129.113	36	3.586		
Total	338.804	39			
TEWL_2 Between Groups	407.289	3	135.763	27.674	.000
Within Groups	176.610	36	4.906		
Total	583.899	39			
TEWL_3 Between Groups	764.141	3	254.714	10.613	.000
Within Groups	815.990	34	24.000		
Total	1580.131	37			
TEWL_4 Between Groups	533.495	3	177.832	7.527	.001
Within Groups	803.240	34	23.625		
Total	1336.735	37			
TEWL_5 Between Groups	652.059	3	217.353	9.122	.000
Within Groups	810.174	34	23.829		
Total	1462.233	37			
TEWL_6 Between Groups	788.449	3	262.816	10.077	.000
Within Groups	886.766	34	26.081		
Total	1675.215	37			

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 **p-value > 0.05**, δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.**

- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value<0.05**, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από 1^{ος} έως και 6^{ος} δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Παρακάτω παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσειςμεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonfer- roni
1ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
2ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
3ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
4ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
5ος	1	2	0.023	0.005	0.028
		3	0.006	0.006	0.009
		4	0.000	0.000	0.000
6ος	1	2	0.013	0.004	0.008
		3	0.006	0.006	0.009
		4	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.004	0.009	0.01

Πίνακας 38 | Έλεγχος Ισότητας Μέσων τιμών Μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Και τους 6 μήνες ο μέσος όρος της Άδηλης απώλειας νερού της ομάδας 1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτών των υπολοίπωνομάδων.

- Τον 6^ο μήνα παρατηρούμε στατιστικά σημαντική διαφορά και μεταξύ της ομάδας 4 με τις ομάδες 2 και 3.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπόλοιπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.
- Συνεπώς στους Υγιείς μύες τα επίπεδα της Άδηλης απώλειας νερού παρέμειναν σταθερά κατά την διάρκεια του πειράματος ενώ στις υπόλοιπες ομάδες μεταβλήθηκαν από τον 1^ο μέχρι τον 6^ο Μήνα.

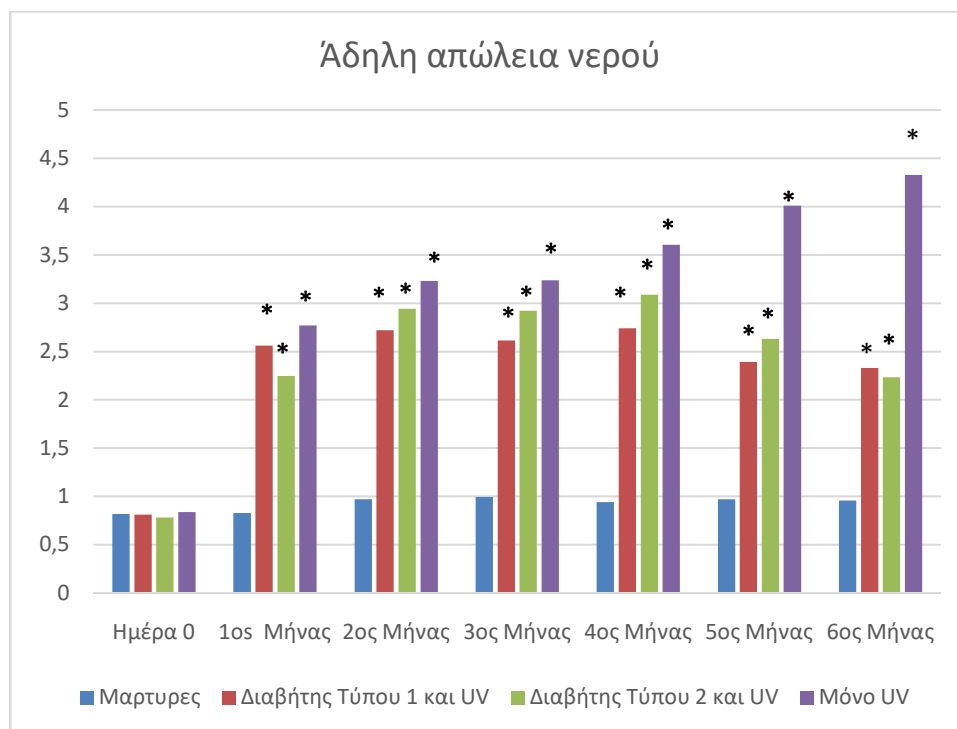
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά η άδηλη απώλεια νερού των μυών.

Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.119	0.000	0.001	0.000
1ος-2ος	0.220	0.003	0.000	0.104
2ος-3ος	0.577	0.035	0.008	0.202
3ος-4ος	0.442	0.043	0.137	0.867
4ος-5ος	0.210	0.009	0.037	0.128
5ος-6ος	0.250	0.002	0.000	0.001

Πίνακας 1 Πίνακας Paired t-test

Από τον παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού
- Διαβήτη Τύπου 1 και UV: Παρατηρούμε ότι για όλα τα ζεύγη Μηνών είχαμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού.
- Διαβήτη Τύπου 2 και UV: Παρατηρούμε ότι μόνο μεταξύ του 3^{ου} και 4^{ου} Μήνα δεν είχαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού.
- Μόνο UV: Μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα, και 5^{ου} με 6^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού.



Διάγραμμα 40 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Ερύθημα

Έλεγχος Κανονικότητας

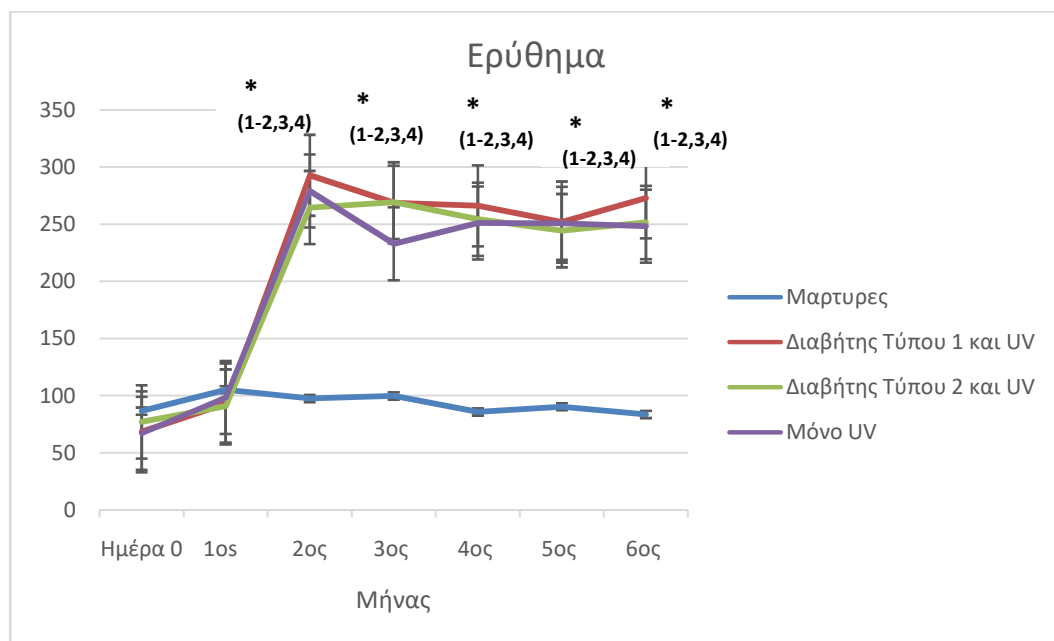
Πίνακας1 TestΚανονικότηταςShapiro-Wilk

t	Ημέρα 0	1ος Μηνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.861	0.101	0.160	0.390	0.558	0.165	0.338
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.420	0.758	0.968	0.314	0.698	0.551	0.449
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.058	0.737	0.053	0.220	0.746	0.094	0.085
Μόνο UV	0.839	0.434	0.854	0.063	0.518	0.133	0.805

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε έναν από τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value > 0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις του Ερυθήματος των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	86.60	68.38	77.13	67.13
	SD	11.918	9.319	8.323	15.282
1ος	M.O	105.30	93	91	98.63
	SD	8.832	19.435	12.130	18.508
2ος	M.O	97.60	293	264.75	279.25
	SD	12.843	61.179	23.057	60.909
3ος	M.O	99.90	268.88	269.38	233
	SD	18.442	32.224	45.544	50.737
4ος	M.O	85.88	266.29	254.50	251.29
	SD	9.717	36.040	30.109	69.310
5ος	M.O	90.38	252.14	244.50	251
	SD	19.294	33.083	30.878	77.559
6ος	M.O	83.63	273.17	251.63	248.43
	SD	4.984	29.755	35.757	60.879

Πίνακας 39 | Μέση Τιμή και Τυπική απόκλιση Μετρήσεων



Διάγραμμα 41 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων

Στα παραπάνω διάγραμμα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή του Ερυθήματος των μυών παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV, Διαβήτης Τύπου II και UV, Μόνο UV:** Παρατηρούμε ότι και στις 3 ομάδες η Μέση Τιμή του Ερυθήματος παρουσιάζει απότομη άνοδο από τον 1^ο έως τον 2^ο μήνα, ενώ από τον 3^ο Μήνα και μετά παρουσιάζει μία σταθερότητα μέχρι το τέλος του πειράματος.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων
ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
R_0	Between Groups	2220.475	3	740.158	2.543	.140
	Within Groups	4006.025	30	133.534		
	Total	6226.500	33			
R_1	Between Groups	1118.496	3	372.832	1.651	.199
	Within Groups	6773.975	30	225.799		
	Total	7892.471	33			
R_2	Between Groups	235470.365	3	78490.122	41.040	.000
	Within Groups	57375.400	30	1912.513		
	Total	292845.765	33			
R_3	Between Groups	181360.615	3	60453.538	42.305	.000
	Within Groups	42869.650	30	1428.988		
	Total	224230.265	33			
R_4	Between Groups	173135.735	3	57711.912	34.397	.000
	Within Groups	43623.732	26	1677.836		
	Total	216759.467	29			
R_5	Between Groups	147875.568	3	49291.856	24.675	.000
	Within Groups	51938.732	26	1997.644		
	Total	199814.300	29			
R_6	Between Groups	175872.668	3	58624.223	40.952	.000
	Within Groups	35788.298	25	1431.532		
	Total	211660.966	28			

Πίνακας 40 | Αποτελέσματα ελέγχου Μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 και τον 1^ο Μήνα $p\text{-value} > \alpha = 0.05$, δηλαδή Δεναπορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 και τον 1^ο Μήνα είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 5\%$.

- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value < 0.05**, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι **μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από 2^ο έως και 6^ο** δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο **σημαντικότητας α=5%**.

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
2ος	1	2	0.000	0.001	0.001
		3	0.000	0.001	0.001
		4	0.000	0.001	0.001
3ος	1	2	0.000	0.001	0.001
		3	0.000	0.001	0.001
		4	0.000	0.001	0.001
4ος	1	2	0.002	0.007	0.001
		3	0.003	0.004	0.001
		4	0.001	0.001	0.000
5ος	1	2	0.004	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
6ος	1	2	0.003	0.005	0.003
		3	0.002	0.002	0.001
		4	0.000	0.000	0.000

Πίνακας 41 | Έλεγχος ισότητας μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Και τους 5 μήνες ο μέσος όρος του Ερυθήματος της ομάδας 1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτών των υπολοίπων ομάδων.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπολοίπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.
- Συνεπώς στους Υγιείς μύες το Ερύθημα παρέμεινε σταθερό κατά την διάρκεια του πειράματος ενώ στις υπόλοιπες ομάδες διαφοροποιήθηκε από την μέση τιμή του ερυθήματος των Υγιών μυών από τον 2^ο μέχρι και τον 6^ο Μήνα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το Ερύθημα.

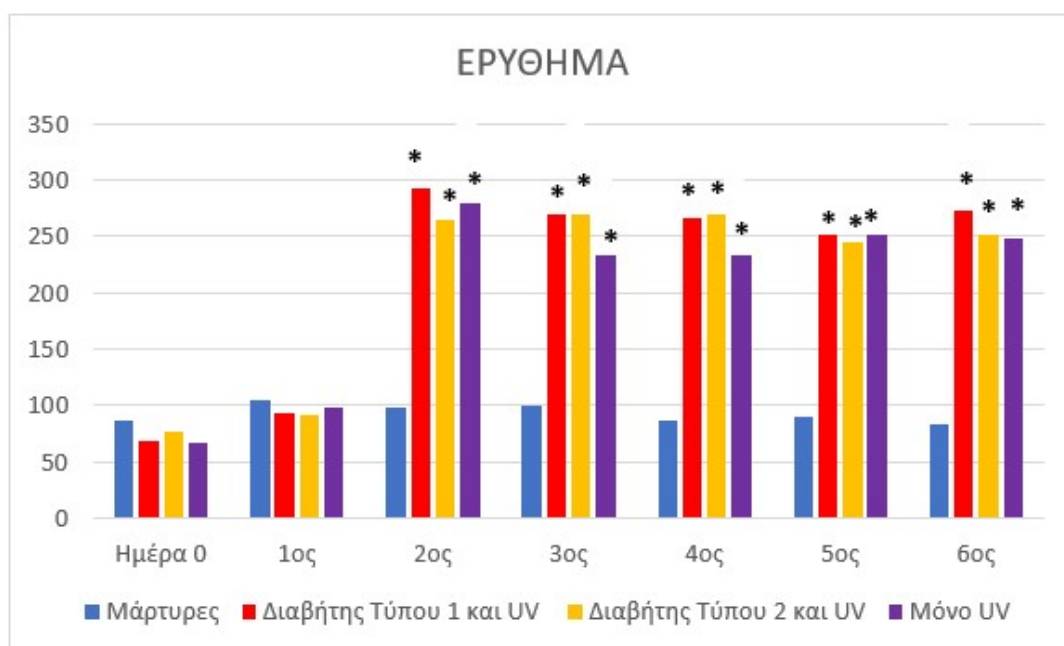
Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.001	0.159	0.022	0.141
1ος-2ος	0.165	0.000	0.000	0.000
2ος-3ος	0.672	0.141	0.972	0.188
3ος-4ος	0.066	0.299	0.503	0.547
4ος-5ος	0.378	0.035	0.044	0.534
5ος-6ος	0.345	0.576	0.133	0.676

Πίνακας 42 | Paired t-Test

Από τον παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά τον 1^ο μήνα στην μεταβολή του Ερυθήματος για τους Μήνες του πειράματος.
- Διαβήτη Τύπου 1 και UV: Μεταξύ του 1^{ου} και του 2^{ου} Μήνα, και 4^ο με 5^ο Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή του ερυθήματος.
- Διαβήτη Τύπου 2 και UV: Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα και 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του ερυθήματος.

- Μόνο UV: Μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του ερυθήματος.



Διάγραμμα 42 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Μελανίνη

Έλεγχος Κανονικότητας

	Ημέρα 0	1ος Μηνάς	2ος Μηνάς	3ος Μηνάς	4ος Μηνάς	5ος Μηνάς	6ος Μηνάς
Μάρτυρες	0.113	0.239	0.064	0.515	0.642	0.507	0.228
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.315	0.187	0.700	0.131	0.674	0.992	0.854
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.171	0.185	0.834	0.967	0.557	0.251	0.169
Μόνο UV	0.386	0.096	0.640	0.088	0.497	0.682	0.974

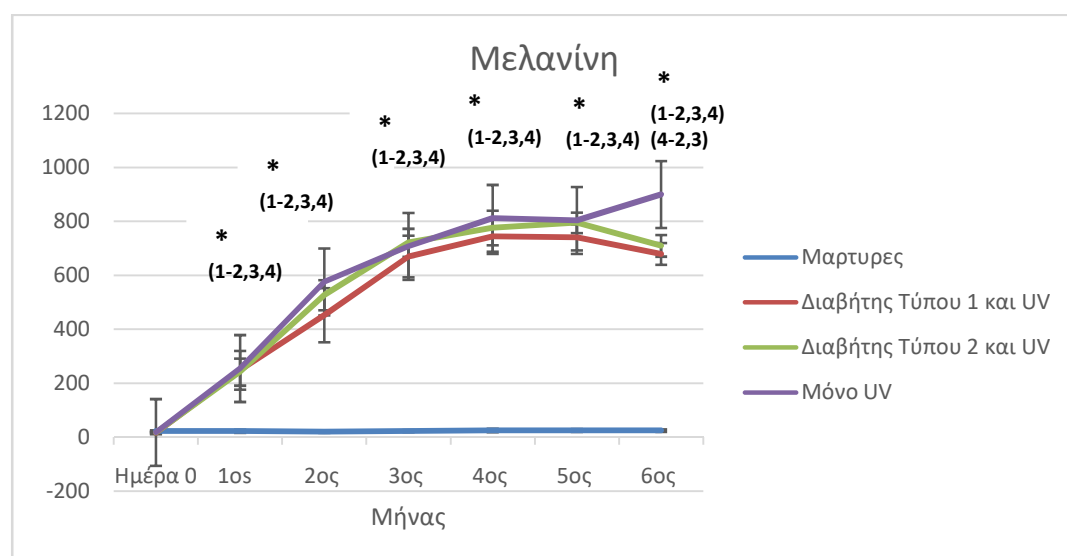
Πίνακας 43 | Test Κανονικότητας Shapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε έναν από τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value>0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης , το

οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις της Μελανίνης των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	22.60	16.30	17	18
	SD	4.033	5.697	4.690	5.055
1ος	M.O	22.90	248.60	241.78	255.20
	SD	7.520	82.042	109.600	55.377
2ος	M.O	20.40	452.70	527	576.50
	SD	4.300	123.937	112.285	131.854
3ος	M.O	23.13	670.33	721.56	708.33
	SD	3.523	87.277	60.036	68.149
4ος	M.O	25.63	745	776.33	812.78
	SD	7.999	65.744	79.748	76.280
5ος	M.O	25.38	740.85	795.33	804.78
	SD	5.236	48.426	57.845	38.314
6ος	M.O	25.13	740.13	768	890.78
	SD	5.643	48.760	51.624	41.091

Πίνακας 44 | Μέση Τιμή και Τυπική απόκλιση μετρήσεων



Διάγραμμα 43 | Μέση τιμή και τυπική απόκλιση μετρήσεων

Στα παραπάνω διάγραμμα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή της Μελανίνης των μυών παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτη Τύπου 1 και UV, Διαβήτη Τύπου II και UV, Μόνο UV:** Παρατηρούμε ότι και στις 3 ομάδες η Μέση Τιμή της Μελανίνης παρουσιάζει απότομη άνοδο από τον 1^ο έως τον 4^ο μήνα, ενώ από τον 4^ο Μήνα και μετά παρουσιάζει η ομάδα μυών που έλαβε μόνο UV συνεχίζει την ανοδική τάση, σε αντίθεση με τη 2^η και 3^η ομάδα, που ξεκινούν καθοδική τάση προς σταθεροποίηση.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών μεταξύ των Ομάδων

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
MEL_0 Between Groups	239.244	3	79.748	2.305	.061
Within Groups	844.500	35	24.129		
Total	1083.744	38			
ζMEL_1 Between Groups	380174.621	3	126724.874	24.003	.000
Within Groups	184784.456	35	5279.556		
Total	564959.077	38			
MEL_2 Between Groups	1922076.436	3	640692.145	56.664	.000
Within Groups	395743.000	35	11306.943		
Total	2317819.436	38			
MEL_3 Between Groups	2840846.788	3	946948.929	231.121	.000
Within Groups	127013.097	31	4097.197		
Total	2967859.886	34			
MEL_4 Between Groups	3514504.455	3	1171501.485	274.184	.000
Within Groups	132453.431	31	4272.691		
Total	3646957.886	34			
MEL_5 Between Groups	3527600.834	3	1175866.945	639.998	.000
Within Groups	55118.931	30	1837.298		
Total	3582719.765	33			
MEL_6 Between Groups	3554550.930	3	1184850.310	687.623	.000
Within Groups	51693.306	30	1723.110		
Total	3606244.235	33			

Πίνακας 45 | Αποτελέσματα ελέγχου Μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 **p-value > 0.05**, δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%**.
- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value<0.05**, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από 1^{ος} έως και 6^{ος} δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%**.

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
2ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
3ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
4ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
5ος	1	2	0.023	0.005	0.028
		3	0.006	0.006	0.009
		4	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.042	0.014	0.045
		3	0.017	0.030	0.021
6ος	1	2	0.023	0.005	0.028
		3	0.006	0.006	0.009
		4	0.000	0.000	0.000
	2	4	0.000	0.000	0.000

3	4	0.008	0.002	0.01
---	---	-------	-------	------

Πίνακας 46 | Έλεγχος ισότητας μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Και τους 5 μήνες η Μελανίνη της ομάδας 1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτών των υπολοίπων ομάδων.
- Τον 5^ο Μήνα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα Μελανίνης της ομάδας 4 διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 2 και 3.
- Τον 6^ο Μήνα τα επίπεδα Μελανίνης της ομάδας 2 και 3 είναι ίδια μεταξύ τους αλλά διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 4.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ των υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπόλοιπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

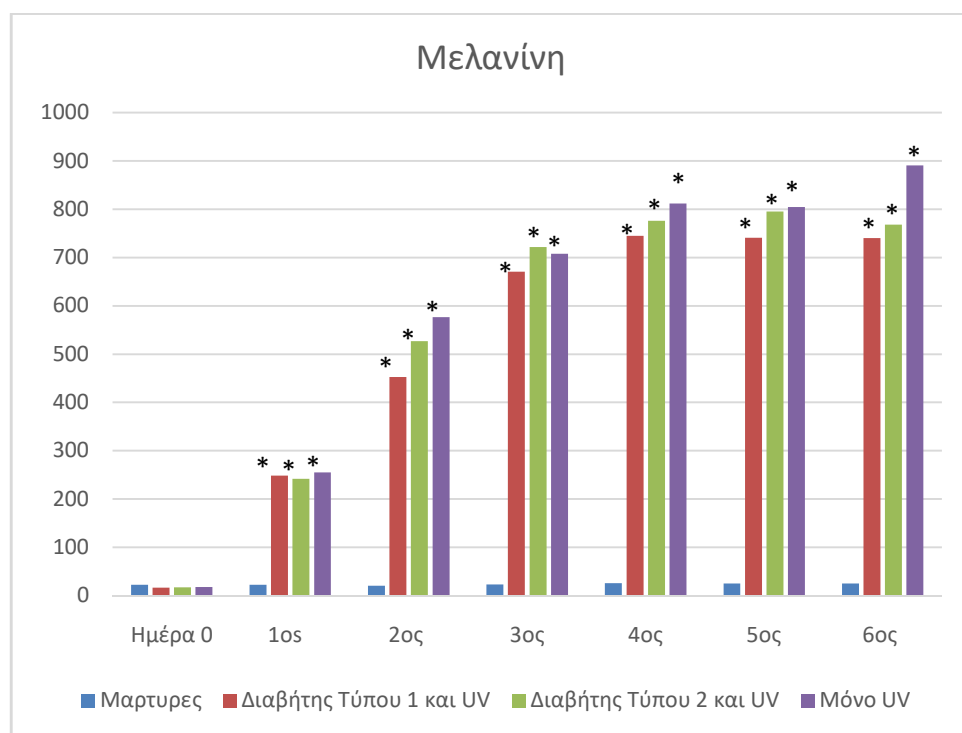
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά η μελανίνη στους μύες.

Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.863	0.000	0.000	0.000
1ος-2ος	0.133	0.003	0.000	0.000
2ος-3ος	0.069	0.024	0.001	0.267
3ος-4ος	0.281	0.004	0.141	0.002
4ος-5ος	0.847	0.338	0.707	0.821
5ος-6ος	0.649	0.753	0.001	0.000

Πίνακας 47 | Paired t-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της Μελανίνης για τους Μήνες του πειράματος.
- Διαβήτης Τύπου 1 και UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 1^{ου} και 2^{ου}, 2^{ου} με 3^{ου} Μήνα και 3^{ου} με 4^{ου} Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή της Μελανίνης.
- Διαβήτης Τύπου 2 και UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 1^{ου} και 2^{ου}, 2^{ου} με 3^{ου} Μήνα και 5^{ου} με 6^{ου} Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή της Μελανίνης.
- Μόνο UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 1^{ου} με 2^{ου}, 3^{ου} με 4^{ου} Μήνα και 5^{ου} με 6^{ου} Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή της Μελανίνης.



Διάγραμμα 44 | Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0

Ενυδάτωση Έλεγχος Κανονικότητας

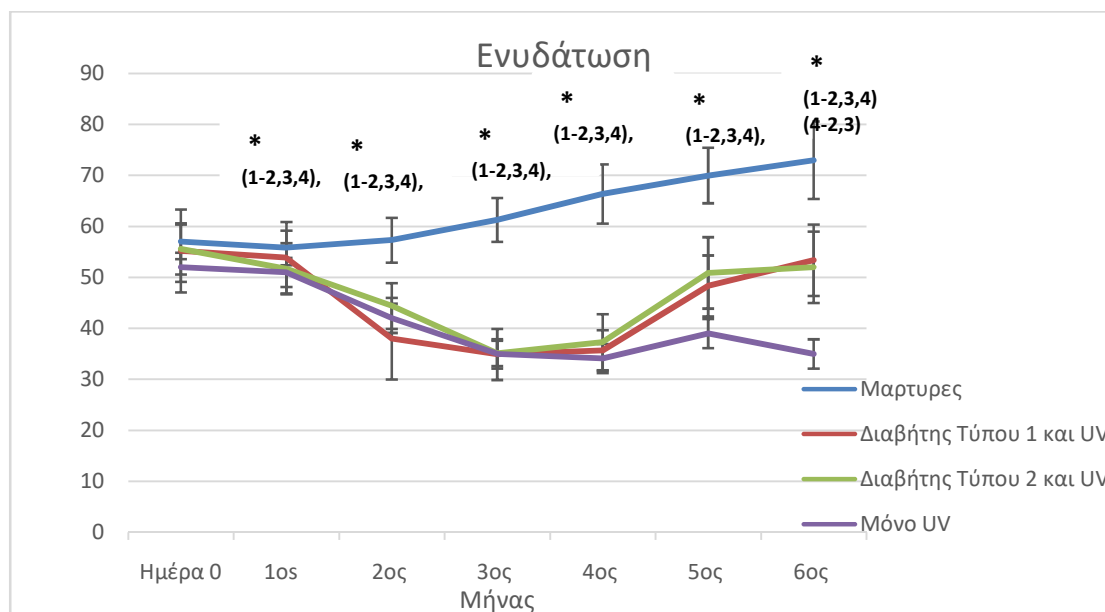
	Ημέρα 0	1ος Μηνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.531	0.501	0.511	0.511	0.413	0.449	0.418
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.520	0.423	0.165	0.165	0.462	0.759	0.116
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.081	0.083	0.401	0.401	0.575	0.134	0.866
Μόνο UV	0.867	0.697	0.437	0.437	0.553	0.849	0.663

Πίνακας 48| TestΚανονικότηταςShapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε ένα από τους μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value > 0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις της Ενυδάτωσης των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	57	55.2	55.6	51.7
	SD	3.399	8.149	5.816	5.376
1ος	M.O	55.8	53.9	51.7	51.2
	SD	3.458	7.549	7.243	5.712
2ος	M.O	57.3	38	44.4	41.9
	SD	4.498	9.031	3.565	4.533
3ος	M.O	61.3	34.9	35.1	34.6
	SD	4.373	5.322	6.657	2.797
4ος	M.O	66.38	35.67	37.3	34.11
	SD	5.805	4.77	3.945	7.288
5ος	M.O	70	48.33	50.9	37.78
	SD	5.451	8.031	10.418	6.648
6ος	M.O	73	53.38	52.8	34.56
	SD	7.597	7.745	6.088	7.65

Πίνακας 49 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση μετρήσεων



Διάγραμμα 45 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση

Στα παραπάνω 2 διαγράμματα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή της Ενυδάτωσης των μυών παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV, Διαβήτης Τύπου II και UV, Μόνο UV:** Παρατηρούμε ότι και στις 3 ομάδες η Μέση Τιμή του Ερυθήματος παρουσιάζει απότομη άνοδο από τον 1^ο έως τον 4^ο μήνα, ενώ από τον 4^ο Μήνα και μετά παρουσιάζει η ομάδα μυών που έλαβε μόνο UV συνεχίζει την ανοδική τάση, σε αντίθεση με τη 2^η και 3^η ομάδα, που ξεκινούν καθοδική τάση προς σταθεροποίηση.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HYD_0 Between Groups	152.275	3	50.758	1.443	.246
Within Groups	1266.100	36	35.169		
Total	1418.375	39			
HYD_1 Between Groups	134.900	3	44.967	1.168	.335
Within Groups	1386.200	36	38.506		
Total	1521.100	39			
HYD_2 Between Groups	2096.200	3	698.733	20.696	.000
Within Groups	1215.400	36	33.761		
Total	3311.600	39			
HYD_3 Between Groups	5241.675	3	1747.225	70.178	.000
Within Groups	896.300	36	24.897		
Total	6137.975	39			
HYD_4 Between Groups	5884.025	3	1961.342	63.857	.000
Within Groups	982.864	32	30.714		
Total	6866.889	35			
HYD_5 Between Groups	4523.767	3	1507.922	23.487	.000
Within Groups	2054.456	32	64.202		
Total	6578.222	35			
HYD_6 Between Groups	6262.588	3	2087.529	39.807	.000
Within Groups	1625.697	31	52.442		
Total	7888.286	34			

Πίνακας 50 | Έλεγχος Μέσης τιμής ανά Ομάδα

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 και τον 1^ο Μήνα **p-value > $\alpha=0.05$** , δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$** .
- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value < 0.05** , δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από τον 2^ο έως και τον 6^ο δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$** .

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonfer-roni
2ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
3ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
4ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
5ος	1	2	0.023	0.005	0.028
		3	0.006	0.006	0.009
		4	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.006	0.009	0.042
		3	0.041	0.019	0.040
6ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
	2	4	0.000	0.000	0.000
3		4	0.000	0.000	0.000

Πίνακας 51 | Έλεγχος ισότητας Μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Και τους 5 μήνες η Ενυδάτωση της ομάδας 1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτών των υπολοίπων ομάδων.
- Τον 5^ο Μήνα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα Ενυδάτωσης της ομάδας 2 διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 3 και 4.
- Τον 6^ο Μήνα τα επίπεδα Ενυδάτωσης της ομάδας 2 και 3 είναι ίδια μεταξύ τους αλλά διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 4.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπολοίπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

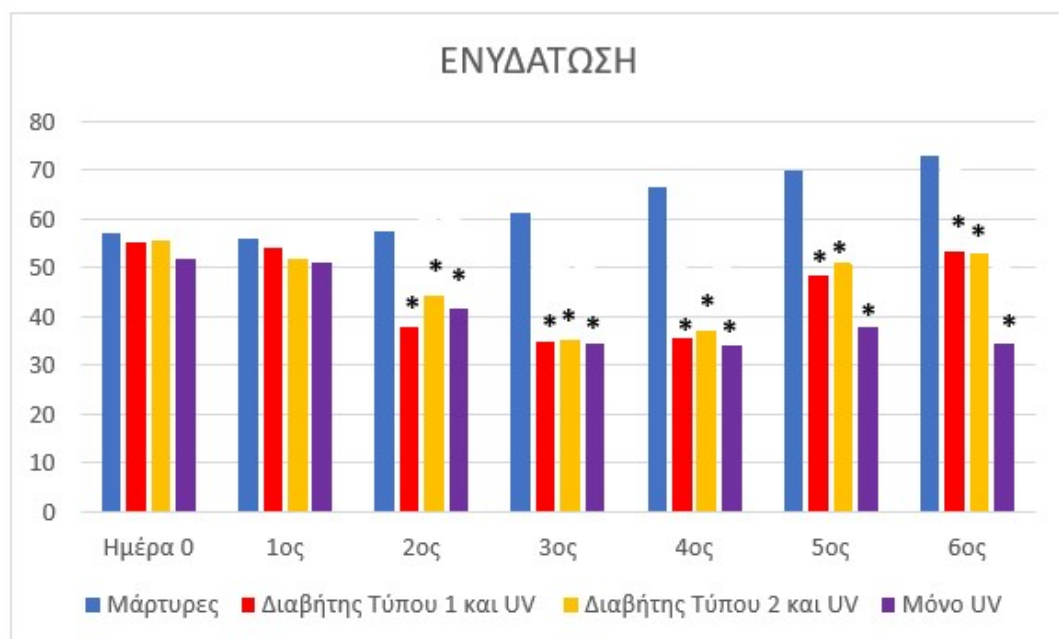
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το επίπεδο Ενυδάτωσης των μυών.

Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.329	0.380	0.020	0.544
1ος-2ος	0.270	0.004	0.019	0.006
2ος-3ος	0.037	0.363	0.002	0.000
3ος-4ος	0.347	0.466	0.369	0.409
4ος-5ος	0.061	0.001	0.037	0.222
5ος-6ος	0.387	0.607	0.369	0.324

Πίνακας 52 | Paired t-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του 2^{ου} και 3ου στην μεταβολή της ενυδάτωσης για τους Μήνες του πειράματος.
- Διαβήτης Τύπου 1 και UV: Μεταξύ του 1ου και 2^{ου} Μήνα και 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα 3ου στην μεταβολή της ενυδάτωσης για τους Μήνες του πειράματος.
- Διαβήτης Τύπου 2 και UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} μήνα, 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα, 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα , και 4^{ου} με 5^{ου} υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ενυδάτωσης.
- Μόνο UV: Μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα και 2^{ου} με 3^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ενυδάτωσης.



Διάγραμμα 46|Έλεγχος ισότητας Μέσων Τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Ελαστικότητα

Έλεγχος Κανονικότητας

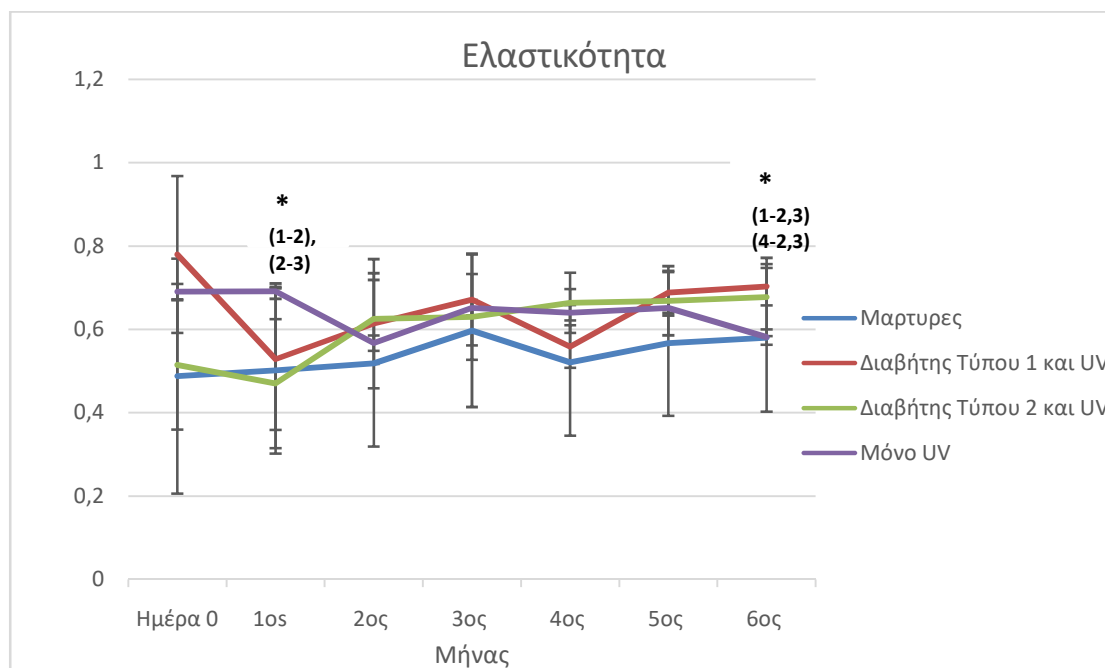
	Ημέρα 0	1ος Μηνάς	2ος Μηνάς	3ος Μηνάς	4ος Μηνάς	5ος Μηνάς	6ος Μηνάς
Μάρτυρες	0.134	0.090	0.502	0.311	0.546	0.454	0.537
Διαβήτη Τύπου 1 και UV	0.068	0.285	0.683	0.238	0.937	0.495	0.157
Διαβήτη Τύπου 2 και UV	0.159	0.374	0.203	0.389	0.124	0.424	0.408
Μόνο UV	0.168	0.371	0.871	0.215	0.932	0.238	0.526

Πίνακας 53 | TestΚανονικότηταςShapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για όλες τις Ομάδες και για κάθε ένα από τους μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value > 0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις της Ενυδάτωσης των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μηνάς		Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	0.488	0.780	0.515	0.691
	SD	0.282	0.252	0.188	0.294
1ος	M.O	0.502	0.529	0.470	0.692
	SD	0.279	0.185	0.081	0.251
2ος	M.O	0.519	0.614	0.626	0.567
	SD	0.227	0.164	0.093	0.109
3ος	M.O	0.597	0.672	0.630	0.652
	SD	0.183	0.112	0.060	0.103
4ος	M.O	0.521	0.559	0.664	0.640
	SD	0.176	0.051	0.089	0.072
5ος	M.O	0.567	0.689	0.669	0.652
	SD	0.174	0.049	0.057	0.083
6ος	M.O	0.580	0.703	0.678	0.582
	SD	0.177	0.049	0.058	0.094

Πίνακας 54 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση μετρήσεων



Διάγραμμα 47 | Μέση Τιμή και τυπική Απόκλιση

Στα παραπάνω 2 διαγράμματα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή της Ελαστικότητας των μυών παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV:** Παρατηρούμε καθοδική τάση τον πρώτο μήνα, που στη συνέχεια αλλάζει σε ανοδική μέχρι που σταθεροποιείται μέχρι το πέρας του πειράματος.
- iii) **Διαβήτης Τύπου II και UV:** Παρατηρούμε μικρή ανοδική τάση μέχρι το πέρας του πειράματος.
- iv) **Μόνο UV:** Παρατηρούμε μικρή μείωση από τον πρώτο στον δεύτερο μήνα και έπειτα μικρή άνοδο και σταθεροποίηση στις αρχικές τιμές.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
EL_0	Between Groups	.592	3	.197	2.976	.044
	Within Groups	2.387	36	.066		
	Total	2.979	39			
EL_1	Between Groups	.291	3	.097	2.126	.114
	Within Groups	1.644	36	.046		
	Total	1.935	39			
EL_2	Between Groups	.071	3	.024	.950	.427
	Within Groups	.897	36	.025		
	Total	.968	39			
EL_3	Between Groups	.031	3	.010	.681	.570
	Within Groups	.547	36	.015		
	Total	.578	39			
EL_4	Between Groups	.092	3	.031	2.779	.057
	Within Groups	.354	32	.011		
	Total	.446	35			
EL_5	Between Groups	.073	3	.024	2.439	.083
	Within Groups	.318	32	.010		
	Total	.391	35			
EL_6	Between Groups	.104	3	.035	3.177	.038
	Within Groups	.340	31	.011		
	Total	.444	34			

Πίνακας 55 | Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για τους 1^ο, 2^ο, 3^ο, 4^ο, 5^ο **p-value > 0.05**, δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τον 1^ο, 2^ο, 3^ο, 4^ο, 5^ο Μήνα είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% .**

- Για τους υπόλοιπους Μήνες $p\text{-value} < 0.05$, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες την Ημέρα 0 και τον 6ο Μήνα δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% .

Για το λόγο αυτό θα προβούμε σε περαιτέρω ανάλυση για τους Μήνες που απορρίφθηκε ο έλεγχος ώστε να εντοπίσουμε τις μεταξύ τους διαφορές χρησιμοποιώντας τα κριτήρια Post-Hoc του Spss(Tukey, Bonferroni, LSD).

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις με αξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
Ημέρα 0	1	2	0.007	0.016	0.009
	2	3		0.027	
6 ^{ος}	1	2		0.026	
		3		0.048	
	2	4		0.024	
	3	4	0.000	0.044	0.000

Πίνακας 56 | Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών μεταξύ των ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. .Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Την ημέρα 0 η Ελαστικότητα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των 1-2 , 1-3, 2-3.
- Τον 6^ο Μήνα Ελαστικότητα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των 1-2, 1-3, 2-4, 2- 3.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ των υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπόλοιπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

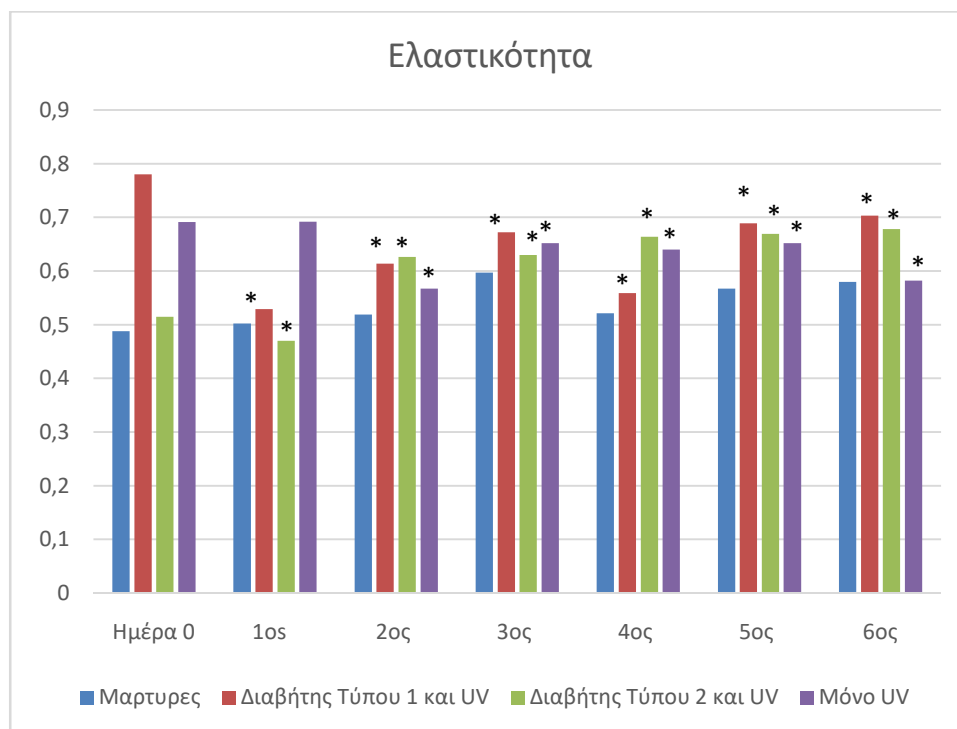
Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά η ελαστικότητα των μυών.

Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.113	0.016	0.580	0.976
1ος-2ος	0.798	0.271	0.001	0.209
2ος-3ος	0.103	0.049	0.821	0.007
3ος-4ος	0.877	0.438	0.609	0.006
4ος-5ος	0.409	0.000	0.037	0.001
5ος-6ος	0.197	0.607	0.002	0.032

Πίνακας 57 | Paired t-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- **Μάρτυρες:** Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ελαστικότητας για τους Μήνες του πειράματος.
- **Διαβήτης Τύπου 1 και UV:** Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 2^ο με 3^ο Μήνα, 4^ο με 5^ο Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ελαστικότητας.
- **Διαβήτης Τύπου 2 και UV:** Μεταξύ του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα, 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα, και 5^{ου} με 6^{ου} υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ελαστικότητας.
- **Μόνο UV:** Μεταξύ του 2^{ου} και 3^{ου} Μήνα, 3^{ου} και 4^{ου} Μήνα, 4^{ου} με 5^{ου} και 5^{ου} με 6^{ου} Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή της ελαστικότητας.



Διάγραμμα 48 | *Έλεγχος ισότητας μέσω των τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

1.8 Σμήγμα

Έλεγχος Κανονικότητας

	Ημέρα 0	1ος Μηνάς	2ος Μηνάς	3ος Μηνάς	4ος Μηνάς	5ος Μηνάς	6ος Μηνάς
Μάρτυρες	0.466	0.090	0.089	0.273	0.107	0.159	0.060
Διαβήτης Τύπου 1 και UV	0.102	0.001	0.083	0.001	0.037	0.520	0.090
Διαβήτης Τύπου 2 και UV	0.102	0.025	0.003	0.089	0.124	0.187	0.198
Μόνο UV	0.659	0.004	0.003	0.002	0.001	0.007	0.000

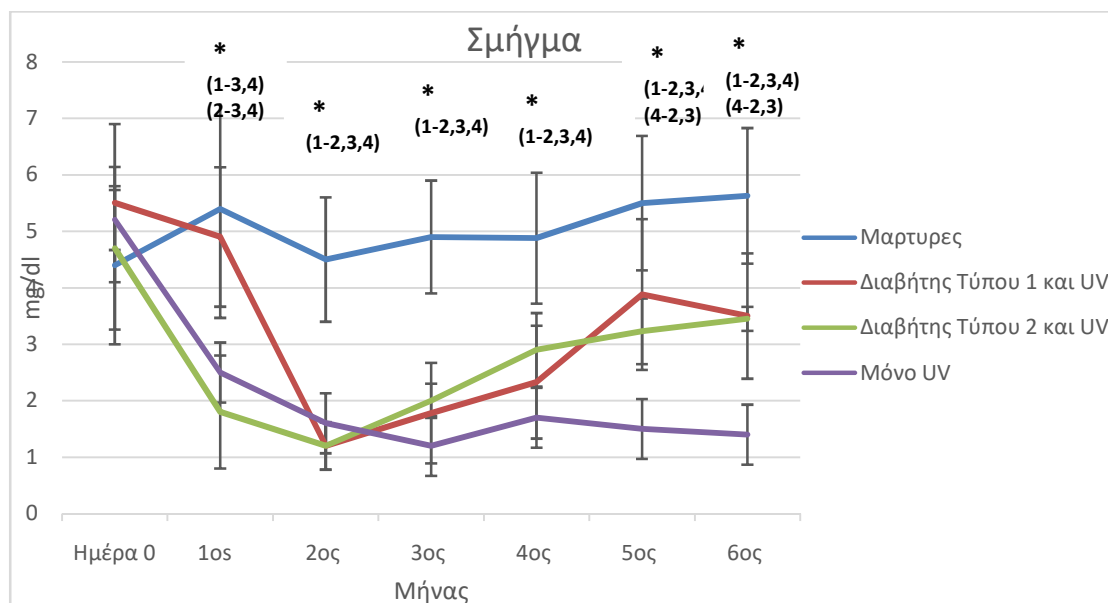
Πίνακας 58 | Test Κανονικότητας Shapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι σε πολλούς μήνες τα δεδομένα μας δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στα δεδομένα μας σε πολλούς μήνες παρατηρήθηκε ότι πολλοί μύες είχαν την ίδια τιμή στη μέτρηση του σμήγματος. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι σε πολλούς μήνες διάφορες ομάδες είχαν εύρος τιμών 1 και 2 το οποίο δηλώνει ότι η κατανομή είναι δυνουμική.

Το γεγονός αυτό αναμένεται να επηρεάσει την ισχύ των παρακάτω ελέγχων και για αυτό το λόγο το διάγραμμα της μέσης τιμής του σμήγματος έχει μεγαλύτερη ισχύ από τους ελέγχους.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	4.40	5.50	4.70	5.20
	SD	1.49	1.50	1.89	1.440
1ος	M.O	6.40	4.90	1.80	2.50
	SD	1.932	1.234	0.675	1.000
2ος	M.O	4.5	1.20	1.20	1.60
	SD	1.114	0.422	0.422	0.416
3ος	M.O	4.900	1.78	2.00	1.20
	SD	1.011	0.89	0,887	0.303
4ος	M.O	4.880	2.33	2.90	1.70
	SD	1.165	1.071	1.183	0.652
5ος	M.O	5.500	3.88	3.20	1.5
	SD	1.190	1.385	1.214	0.583
6ος	M.O	5.630	3.50	3.40	1.40
	SD	1.220	1.195	1.025	0.212

Πίνακας 59 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση μετρήσεων



Διάγραμμα 49 | Μέση Τιμή Σμήγματος ανά Ομάδα

Στο παραπάνω διάγραμμα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του Σμήγματος των μυών παρουσιάζουν μεταβολές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η μεταβολές αυτές δημιουργούν μια διακύμανση στη τιμή του σμήγματος η οποία όμως είναι γύρω από τη συνολική μέση τιμή. Από το διάγραμμα φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από τις ομάδες.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV, Διαβήτης Τύπου II και UV:** Παρατηρούμε ότι και στις 2 ομάδες η Μέση Τιμή του σμήγματος παρουσιάζει απότομη κάθοδο από τον 1^ο έως τον 2^ο μήνα, στην συνέχεια παρατηρείται απότομη άνοδος με το πέρας των μηνών. Η μέση τιμή των δύο φαίνεται να είναι ίδια και στις δύο ομάδες και να διαφέρει από αυτή της ομάδας 1 και 4.
- iii) **Μόνο UV:** Για την ομάδα αυτή παρατηρούμε ότι από τον 1^ο έως τον 3^ο μήνα παρουσιάζεται μεγάλη πτώση στη μέση τιμή του σμήγματος. Στην συνέχεια η τιμή του σμήγματος σταθεροποιείται σε χαμηλές τιμές και μένει στα ίδια επίπεδα μέχρι το τέλος του πειράματος. Από το διάγραμμα από τον 3^ο μέχρι τον 6^ο μήνα η μέση τιμή διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες ομάδες.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων

ANOVA

	SumofSquares	df	MeanSquare	F	Sig.
SM_0 BetweenGroups	11.275	3	3.758	.791	.507
WithinGroups	171.100	36	4.753		
Total	182.375	39			
SM_1 BetweenGroups	126.200	3	42.067	4.926	.006
WithinGroups	307.400	36	8.539		
Total	433.600	39			
SM_2 BetweenGroups	21.900	3	7.300	11.136	.000
WithinGroups	23.600	36	.656		
Total	45.500	39			
SM_3 BetweenGroups	24.736	3	8.245	5.535	.003
WithinGroups	49.156	33	1.490		
Total	73.892	36			
SM_4 BetweenGroups	22.557	3	7.519	5.305	.004
WithinGroups	117.875	33	3.572		
Total	140.432	36			
SM_5 BetweenGroups	73.581	3	24.527	7.930	.000
WithinGroups	98.975	32	3.093		
Total	172.556	35			
SM_6 BetweenGroups	49.631	3	16.544	9.022	.000
WithinGroups	58.675	32	1.834		
Total	108.306	35			

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 και τον 4^ο Μήνα παρατηρούμε ότι **p-value > $\alpha=0.05$** , δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.**
- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value < $\alpha=0.05$** , δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι **μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες 2 έως και 6 δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$.**

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonferroni
1 ^{ος}	1	3	0.006	0.001	0.007
		4	0.025	0.005	0.030
	2	3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
2 ^{ος}	1	2	0.032	0.007	0.039
		3	0.064	0.014	0.085
		4	0.002	0.000	0.002
3 ^{ος}	1	2	0.045	0.010	0.057
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.036	0.008	0.046
4 ^{ος}	1	2	0.015	0.038	0.027
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.013	0.003	0.015
	4	2	0.012	0.003	0.014

		3	0.000	0.001	0.003
5 ^{ος}	1	2	0.022	0.014	0.031
		3	0.064	0.014	0.085
		4	0.002	0.000	0.002
	4	2	0.025	0.012	0.051
		3	0.021	0.010	0.042
6 ^{ος}	1	2	0.036	0.008	0.046
		3	0.015	0.038	0.027
		4	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.012	0.007	0.012
		3	0.011	0.009	0.011

Πίνακας 60 | Έλεγχος Μέσης τιμής μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά..Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Τον 1^ο Μήνα η μέση τιμή του σμήγματος διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων 1-3,1-4 αλλά και 2-3,2-4.
- 2^ο και 3^ο Μήνα το σμήγμα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων 1-2 , 1-3 και 1-4.
- Τον 4^ο μήνα το σμήγμα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων 1-2 , 1-3 και 1-4 αλλά και 4-2,4-3.
- Τον 5^ο Μήνα το σμήγμα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων 1-2,1-3 , 1-4 αλλά και 4-2 ,4-3.
- Τον 6^ο Μήνα το σμήγμα διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων 4-1,4-2,4-3 και 4-2,4-3. Από αυτές τις διαφορές και το διάγραμμα του σμήγματος μπορούμε να βγάλουμε το συμπέρασμα ότι στο τέλος του πειράματος το σμήγμα στην ομάδα 4 έμεινε σταθερό και διατήρησε την καθοδική πορεία που είχε πάρει τους πρώτους μήνες λόγω της UV ακτινοβολίας. Αντίθετα στην ομάδα 2 και 3

παρόλο που στους μυς των ομάδων αυτών λόγω της ακτινοβολίας το σμήγμα έπεσε τους πρώτους μήνες, στην συνέχεια παρουσίασε ανοδική τάση. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στο ότι στο τέλος του πειράματος όλοι οι μυς είχαν πλέον νοσήσει με διαβήτη στις συγκεκριμένες κατηγορίες.

- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπόλοιπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Pairedt-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα των μυών που τους χορηγήθηκε στρεπτοζοτοκίνη.

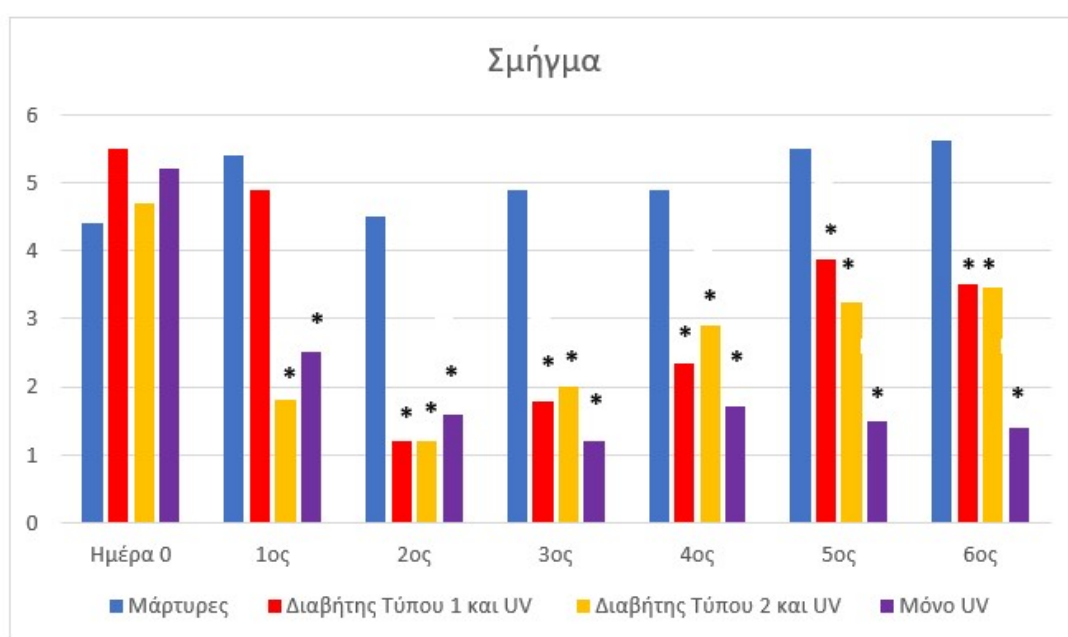
Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτης Τύπου 1 και UV	Διαβήτης Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.113	0.016	0.580	0.976
1ος-2ος	0.798	0.271	0.001	0.209
2ος-3ος	0.103	0.049	0.821	0.007
3ος-4ος	0.877	0.438	0.609	0.006
4ος-5ος	0.409	0.000	0.037	0.001
5ος-6ος	0.197	0.607	0.002	0.032

Πίνακας 61 | Paired t-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- **Μάρτυρες:** Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του σμήγματος για τα ζεύγη Ημέρα 0 με 1^ο Μήνα, 1^ο Μήνα με 2^ο Μήνα και 3^ο με 4^ο Μήνα. Από τις παραπάνω τιμές παρατηρούμε ότι η μέση τιμή του σμήγματος δεν είναι σταθερή. Από το διάγραμμα και από τις τιμές της τυπική απόκλισης βλέπουμε ότι δεν υπάρχει κάποια τάση (ανοδική η καθοδική) αλλά μία ημιτονοειδή πορεία γύρω από τη μέση τιμή.
- **Διαβήτης Τύπου 1 και UV:** Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 2^ο με 3^ο και 4^ο με 5^ο Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή του σμήγματος.

- **Διαβήτης Τύπου 2 και UV:** Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, 1^ο με 2^ο Μήνα και 4^ο με 5^ο Μήνα παρατηρούμε στατιστική σημαντική διαφορά στην μεταβολή του σμήγματος.
- **Μόνο UV:** Μεταξύ της Ημέρας 0 με 1^ο Μήνα και 1^{ου} με 2^ο Μήνα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του Σμήγματος. Από το διάγραμμα του σμήγματος παρατηρούμε ότι η πτώση τους Μήνες που παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά είναι μεγάλη.



Διάγραμμα 50 | Έλεγχος ισότητας μέσων τιμών ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0.

Πάχος

Έλεγχος Κανονικότητας

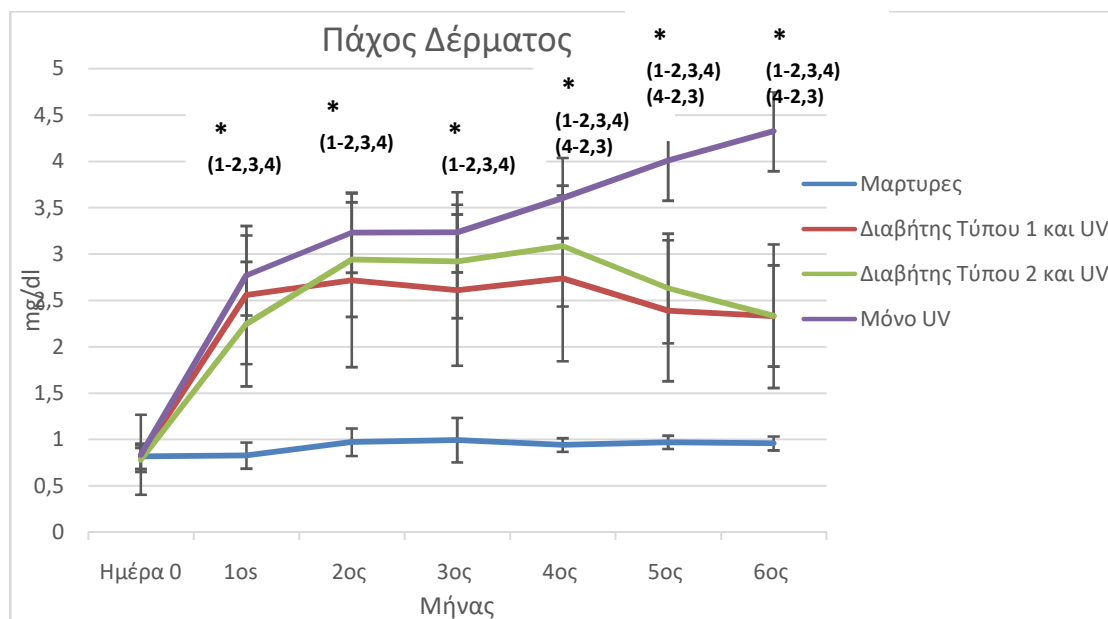
	Ημέρα 0	1ος Μήνας	2ος Μήνας	3ος Μήνας	4ος Μήνας	5ος Μήνας	6ος Μήνας
Μάρτυρες	0.111	0.207	0.410	0.570	0.107	0.259	0.154
Διαβήτη Τύπου 1 και UV	0.423	0.829	0.497	0.497	0.619	0.531	0.477
Διαβήτη Τύπου 2 και UV	0.266	0.056	0.212	0.651	0.124	0.490	0.264
Μόνο UV	0.965	0.291	0.589	0.687	0.932	0.744	0.378

Πίνακας 62 | Test Κανονικότητας Shapiro-Wilk

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε ότι για τις Ομάδες και για κάθε έναν από τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το Πείραμα **P-value > 0.05**. Συνεπώς δεν υπάρχουν ισχυρά στατιστικές ενδείξεις για απόρριψη της Μηδενικής Υπόθεσης, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι οι μετρήσεις του πάχους του δέρματος των μυών ακολουθούν Κανονική Κατανομή.

Μήνας		Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
Ημέρα 0	M.O	0.819	0.813	0.781	0.837
	SD	0.140	0.127	0.128	0.130
1ος	M.O	0.828	2.56	2.246	2.771
	SD	0.141	0.745	0.496	0.672
2ος	M.O	0.972	2.719	2.942	3.232
	SD	0.149	0.937	0.630	0.618
3ος	M.O	0.994	2.613	2.922	3.236
	SD	0.24	0.816	0.918	0.612
4ος	M.O	0.941	2.74	3.088	3.606
	SD	0.074	0.895	0.701	0.657
5ος	M.O	0.971	2.391	2.631	4.01
	SD	0.071	0.761	0.616	0.591
6ος	M.O	0.958	2.331	2.234	4.327
	SD	0.074	0.774	0.667	0.546

Πίνακας 63 | Μέση Τιμή και Τυπική Απόκλιση Μετρήσεων.



Διάγραμμα 51 | Μέση τιμή και τυπική απόκλιση

Στα παραπάνω 2 διαγράμματα για κάθε Ομάδα παρατηρούμε τα εξής (ανά κατηγορία) :

- i) **Μάρτυρες:** Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του Πάχους δέρματος των μυών παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ii) **Διαβήτης Τύπου 1 και UV, Διαβήτης Τύπου II και UV:** Παρατηρούμε ανοδική πορεία μέχρι και τον 4^ο μήνα, ενώ από τον 4^ο στον 6^ο υπάρχει μείωση, δηλαδή βελτίωστος πάχους δέρματος, κάτι στο οποίο φαίνεται να επιδρά ο διαβήτης.
- iii) **Μόνο UV:** Παρατηρούμε ανοδική τάση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Έλεγχος Ισότητας Μέσων Τιμών Μεταξύ των Ομάδων

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TH_0 Between Groups	.016	3	.005	.314	.815
Within Groups	.626	36	.017		
Total	.642	39			
TH_1 Between Groups	23.011	3	7.670	24.089	.000
Within Groups	11.463	36	.318		
Total	34.474	39			
TH_2 Between Groups	31.155	3	10.385	17.037	.000
Within Groups	21.944	36	.610		
Total	53.100	39			
TH_3 Between Groups	30.316	3	10.105	16.494	.000
Within Groups	22.056	36	.613		
Total	52.372	39			
TH_4 Between Groups	33.594	3	11.198	14.330	.000
Within Groups	25.788	33	.781		
Total	59.382	36			
TH_5 Between Groups	39.446	3	13.149	31.210	.000
Within Groups	13.481	32	.421		
Total	52.927	35			
TH_6 Between Groups	50.035	3	16.678	47.564	.000
Within Groups	11.221	32	.351		
Total	61.255	35			

Πίνακας 64 | Έλεγχος ισότητας Μέσης τιμής

Στον παραπάνω πίνακα παραθέτονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τον έλεγχο των μέσων τιμών μεταξύ των Ομάδων παρατηρούμε ότι:

- Για την Ημέρα 0 **p-value > 0.05**, δηλαδή Δεν απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων την Ημέρα 0 είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.**
- Για τους υπόλοιπους Μήνες **p-value<0.05**, δηλαδή Απορρίπτουμε την Μηδενική Υπόθεση, το οποίο πρακτικά σημαίνει ότι **οι μέσες τιμές μεταξύ των ομάδων τους μήνες από 1^ο έως και 6^ο δεν είναι ίσες μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.**

Παρακάτω σας παραθέτουμε τον Πίνακα με τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αλλά και τον μήνα που παρατηρήθηκαν αυτές.

Μήνας	Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων		Tukey HSD	LSD	Bonfer-roni
1ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
2ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
3ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
4ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
5ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
	3	4	0.000	0.000	0.000
6ος	1	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000
		4	0.000	0.000	0.000
	4	2	0.000	0.000	0.000
		3	0.000	0.000	0.000

Πίνακας 65| Έλεγχος Ισότητας Μέσης τιμής μεταξύ των Ομάδων

Στον παραπάνω Πίνακα παρατηρούμε τις συγκρίσεις των μέσων τιμών που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μπορούμε να βγάλουμε τα εξής συμπεράσματα:

- Και τους 6 μήνες το Πάχος δέρματος των μυών της ομάδας 1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτών των υπολοίπων ομάδων.
- Τον 5^ο Μήνα παρατηρούμε ότι το πάχος δέρματος των μυών της ομάδας 4 διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 2 και 3.

- Τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι το πάχος δέρματος των μυών της ομάδας 4 διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά από αυτά της ομάδας 2 και 3.
- Το γεγονός ότι δεν αναφέρονται άλλες συγκρίσεις μεταξύ των υπολοίπων ομάδων μεταξύ τους, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μέσες τιμές των υπόλοιπων ομάδων είναι ίσες μεταξύ τους και τους 6 μήνες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε Paired t-test για να ελέγξουμε αν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά το Πάχος δέρματος των μυών ανά μήνα σε κάθε Ομάδα ξεχωριστά.

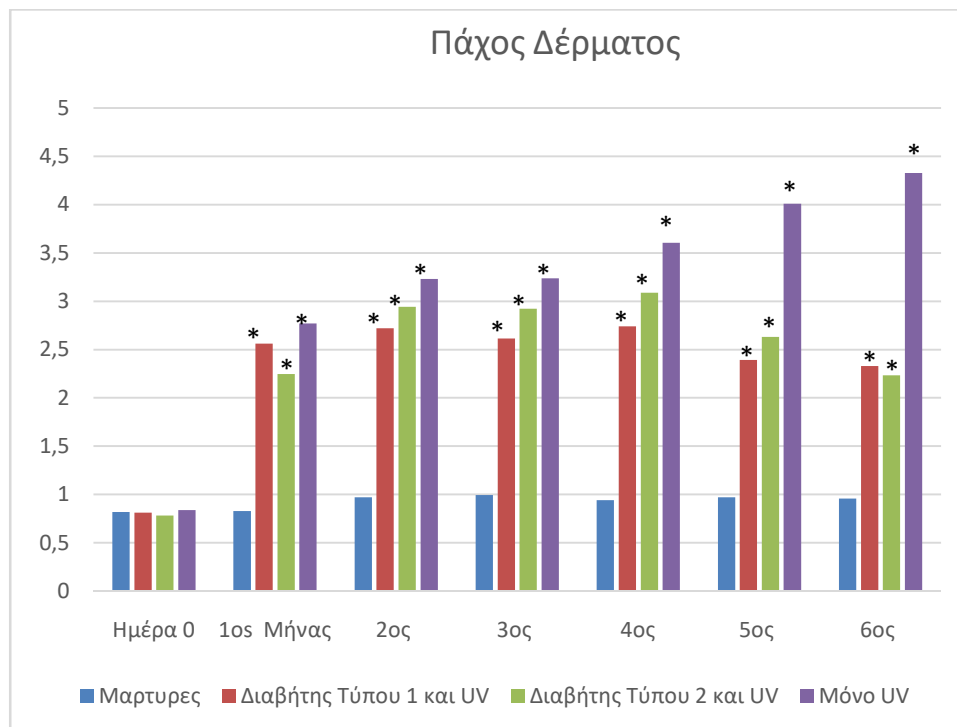
Μήνας	Μάρτυρες	Διαβήτη Τύπου 1 και UV	Διαβήτη Τύπου 2 και UV	Μόνο UV
0-1ος	0.159	0.000	0.000	0.000
1ος-2ος	0.069	0.599	0.031	0.046
2ος-3ος	0.661	0.655	0.343	0.155
3ος-4ος	0.219	0.932	0.604	0.237
4ος-5ος	0.412	0.040	0.150	0.043
5ος-6ος	0.234	0.043	0.010	0.013

Πίνακας 66 | Πίνακας Paired t-test

Από το παραπάνω πίνακα ο οποίος έχει τις τιμές P-value των ελέγχων καταλήγουμε στα εξής αποτελέσματα:

- Μάρτυρες: Για τα διαφορετικά ζεύγη από την Ημέρα 0 έως τον 6^ο Μήνα παρατηρούμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του Πάχους δέρματος για τους Μήνες του πειράματος.
- Διαβήτη Τύπου 1 και UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, , 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα και 5^{ου} με 6^{ου} υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του βάρους των μυών.
- Διαβήτη Τύπου 2 και UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, του 1^{ου} και 2^{ου} Μήνα ,και 5^{ου} με 6^{ου} υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του πάχους δέρματος των μυών.

- Μόνο UV: Μεταξύ της Ημέρας 0 και του 1^{ου} Μήνα, , 4^{ου} και 5^{ου} Μήνα ,και 5^{ου} με 6^{ου} υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μεταβολή του βάρους των μυών.



Διάγραμμα 52 | Έλεγχος Ισότητας Μέσης Τιμής ανά ομάδα σε σχέση με την Ημέρα 0

3.3 HPLC- Ανάλυση

Η κινητή αποτελούνταν από μεθανόλη και νερό περιέχουσα τα προαναφερθέντα άλατα. Η ταχύτητα ροής ήταν ίσος με 1,2 ml/min και ο ενυόμενος όγκος ίσος με 20 μl. Η ρύθμιση του ανιχνευτή επιτεύχθηκε σε τάση 600 mV, Range 16, Response : STD, Oxidation. Η στήλη μας ήταν ανάστροφης φάσης, τα χαρακτηριστικά της οποίας θα αναφερθούν παρακάτω, και ο χρόνος ροής (runtime) για τις αναλύσεις ουρικού και ασκορβικού οξέος ήταν περίπου 6 λεπτά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών μορίων βασίστηκε στο εμβαδόν των κορυφών των χρωματογραφημάτων. Για τον υπολογισμό των αλλαγών της ευαισθησίας του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή συχνά ενέθηκαν πρότυπα διαλύματα ουρικού, ασκορβικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων κατά διαστήματα στη διάρκεια των ενέσεων των δειγμάτων.

Κατασκευή Πρότυπων Καμπύλων Αναφοράς

Για ουρικό & ασκορβικό οξύ

Ενέθηκαν πρότυπα διαλύματα ασκορβικού και ουρικού οξέος συγκεντρώσεων : 10 μM, 5 μM, 1 μM, 0.5 μM, 0.05 μM. Κάθε συγκέντρωση έδινε μία κορυφή στο χρωματογράφημα, η οποία αντιστοιχούσε σε συγκεκριμένη ένδειξη σήματος του ανιχνευτή. Κατόπιν ολοκλήρωσης των κορυφών λήφθηκαν τα εξής δεδομένα:

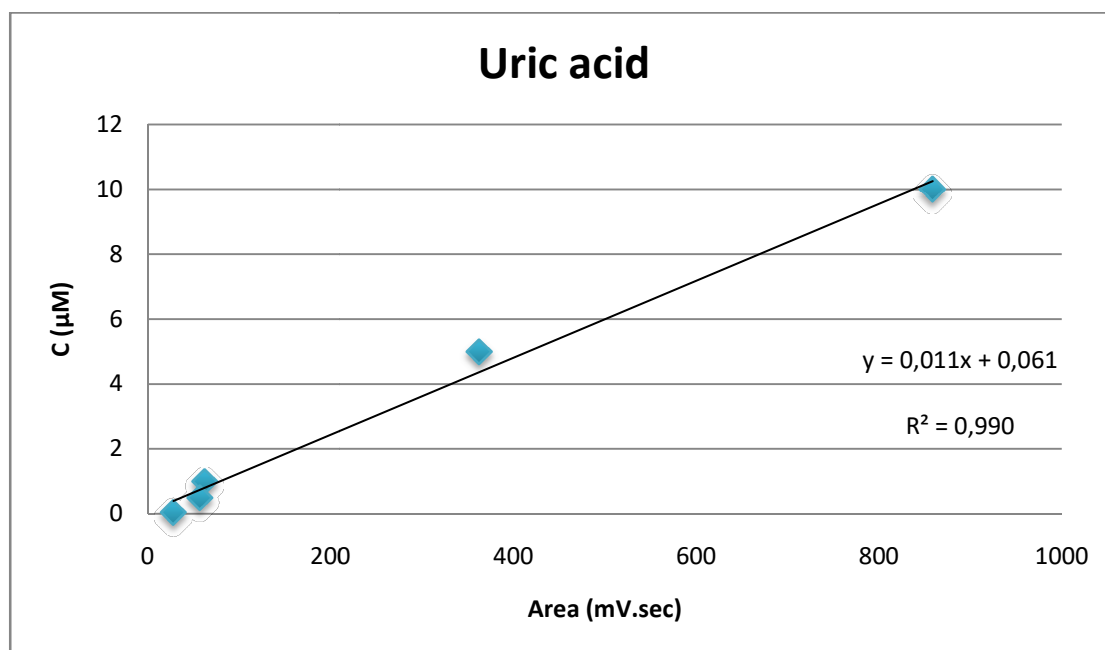
C ουρικού οξέος (μM)	Area (mV.sec)
10	858,815
5	362,66
1	62,106
0,5	56,709
0,05	28,11

Πίνακας 67 | Δεδομένα πρότυπων διαλυμάτων ουρικού οξέος

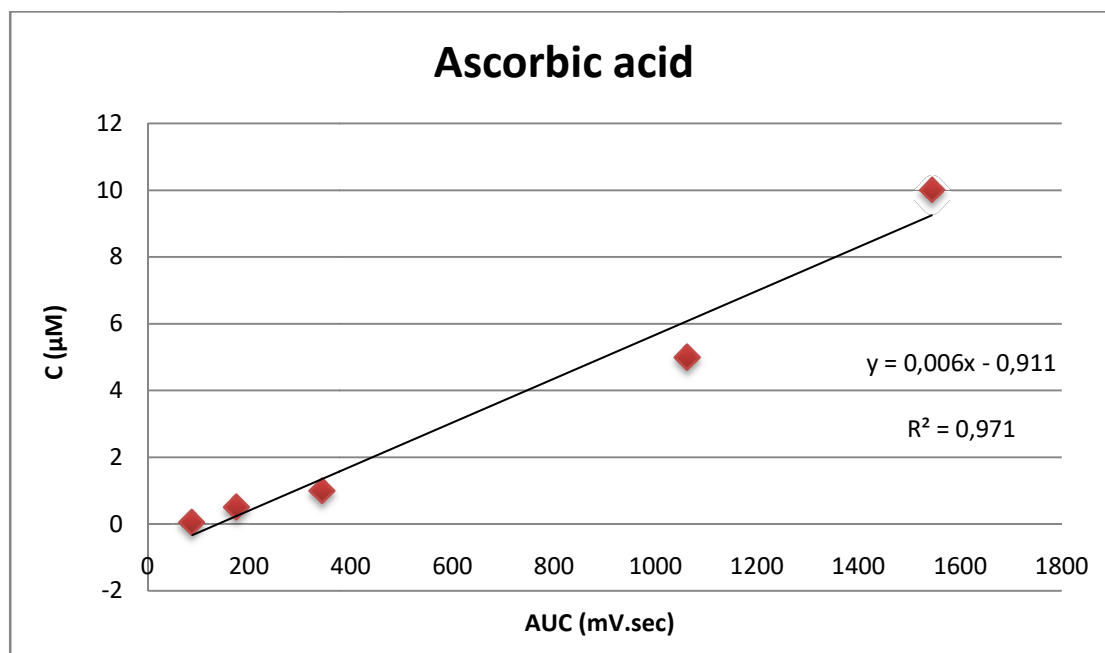
C ασκορβικού οξέος (μM)	Area (mV.sec)
10	1544,389
5	1062,078
1	343,308
0,5	174,222
0,05	87,363

Πίνακας 68 | Δεδομένα πρότυπων διαλυμάτων ασκορβικού οξέος

Από τα δεδομένα των παραπάνω πινάκων κατασκευάζονται οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το ουρικό και ασκορβικό οξύ αντίστοιχα.

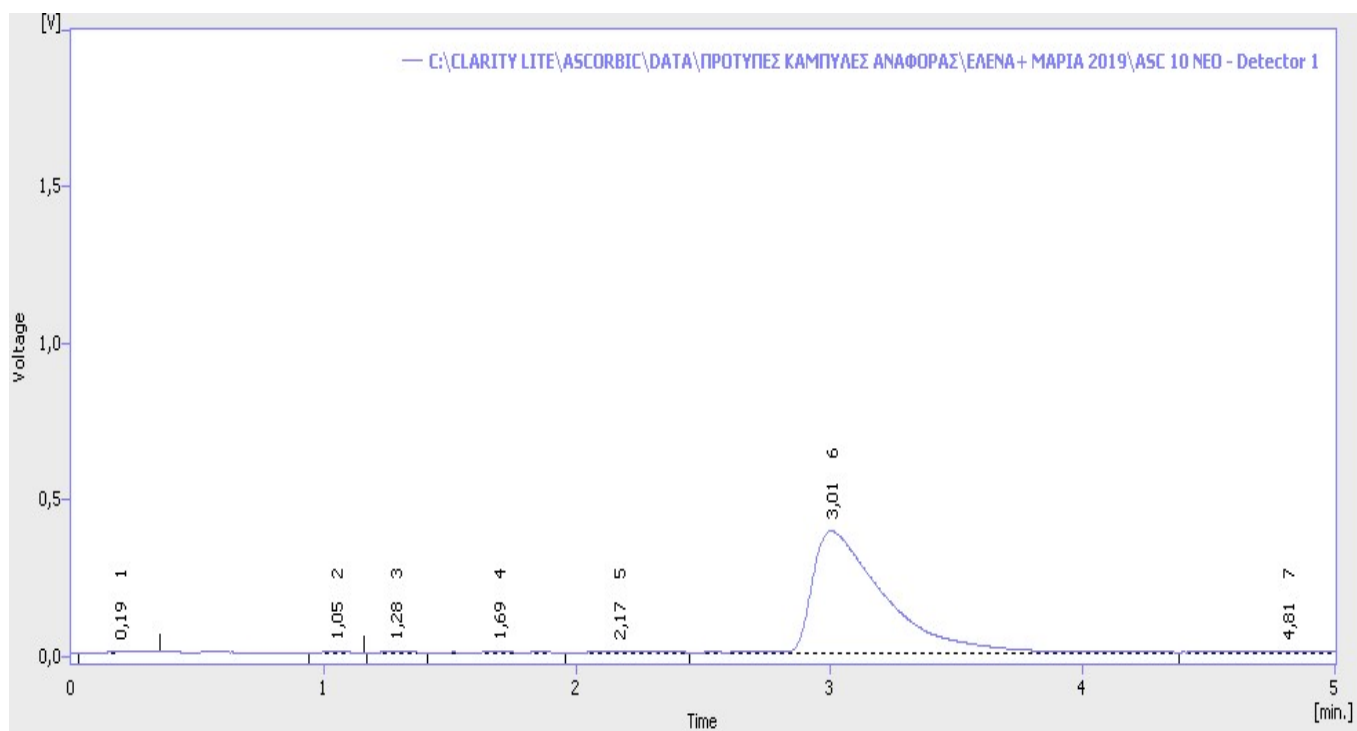


Διάγραμμα 53 | Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ουρικού οξέος

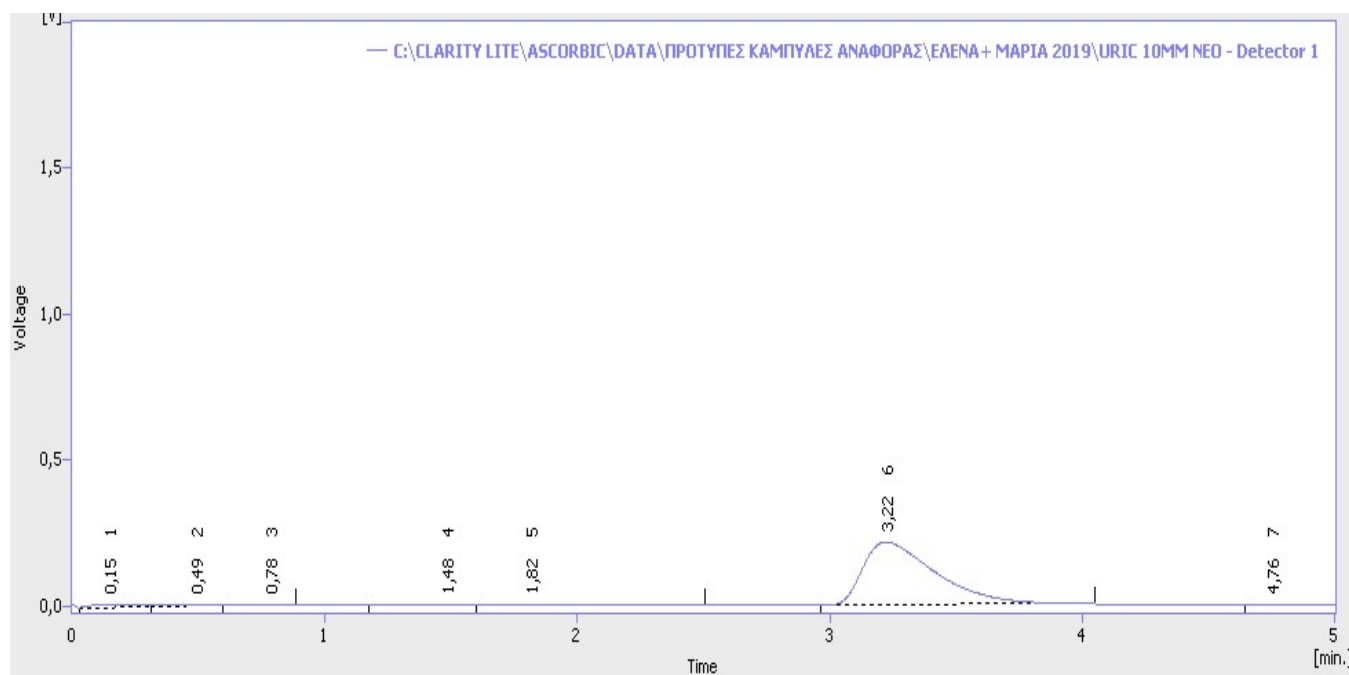


Διάγραμμα 54 | Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων και την πορεία της λιπιδικής εκχύλισης τα αντιοξειδωτικά εξάγονται ποσοτικά και μπορούν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις τους στους ιστούς με σύγκριση των ενδείξεων των κορυφών των χρωματογραφήματων τους και αυτών των πρότυπων δειγμάτων των αντιοξειδωτικών ουσιών γνωστών συγκεντρώσεων, μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς. Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια από τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων των μελετηθέντων μορίων.



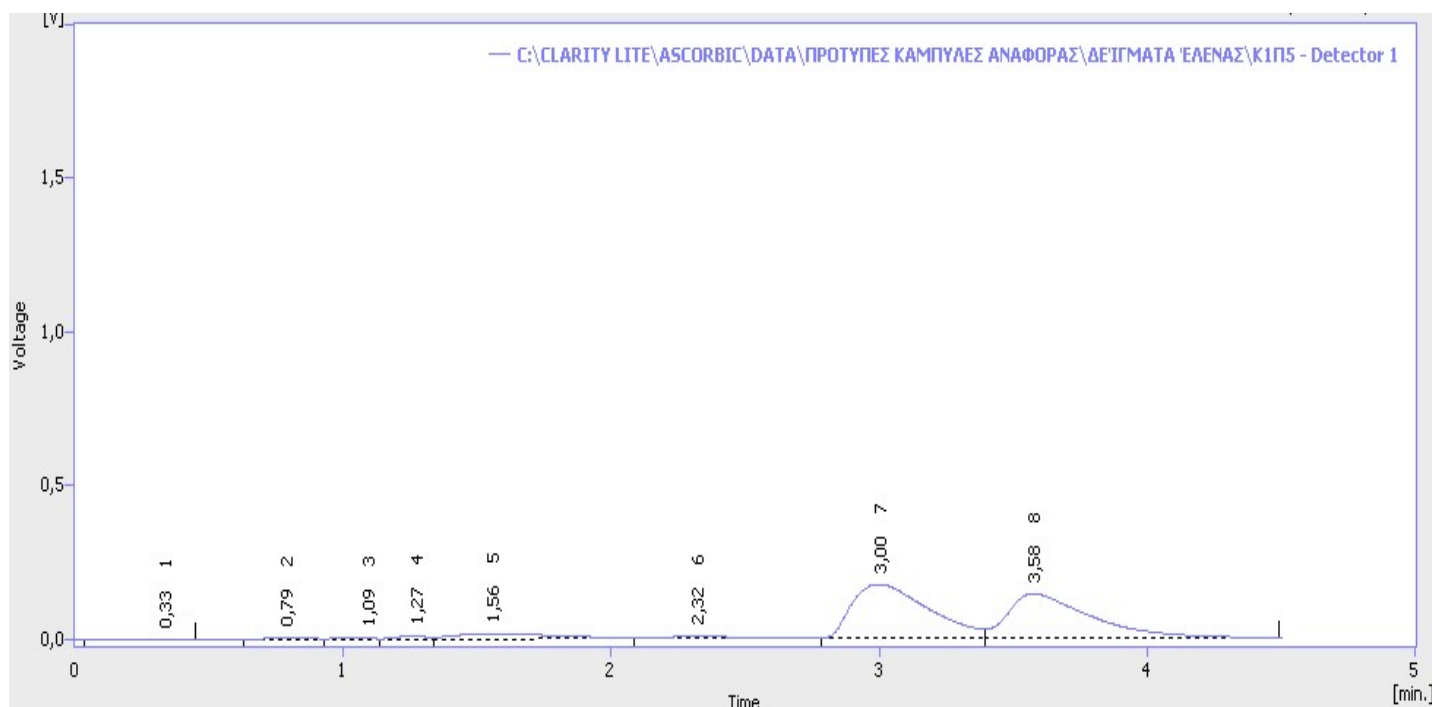
Εικόνα 42 | Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος 10 μM



Εικόνα 43 | Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος ουρικού οξέος 10 μM

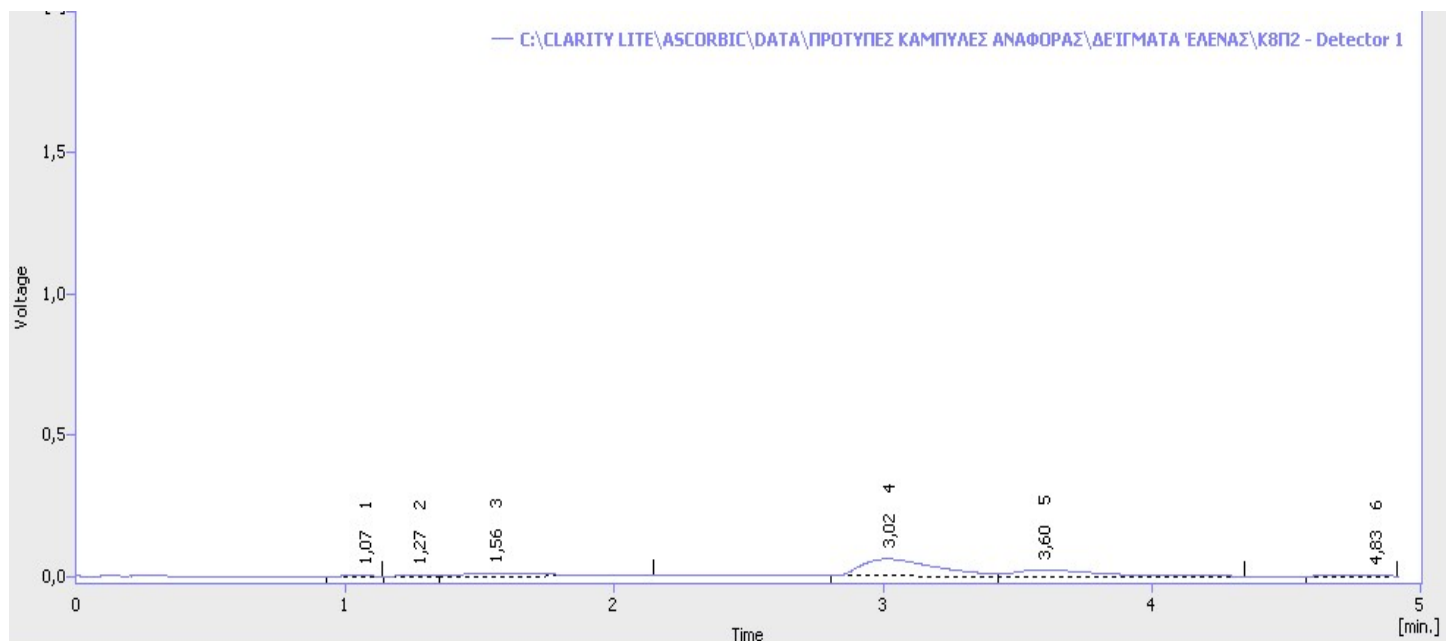
Μετά την επεξεργασία των δειγμάτων το περιεχόμενο φυλάσσεται σε πάγο, προστατευμένο από το φως και ακολουθεί ένεση στην HPLC. Από τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν μπορούν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών μορίων που μελετώνται στην επιφάνεια της κεράτινης στοιβάδας (strippings) με σύγκριση των ενδείξεων των κορυφών των χρωματογραφημάτων τους και αυτών των πρότυπων δειγμάτων των αντιοξειδωτικών ουσιών γνωστών συγκεντρώσεων, μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς. Προκύπτουν έτσι τα παρακάτω αποτελέσματα μετά 6 μήνες ακτινοβολήσης.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποια χρωματογραφήματα των δειγμάτων μας:



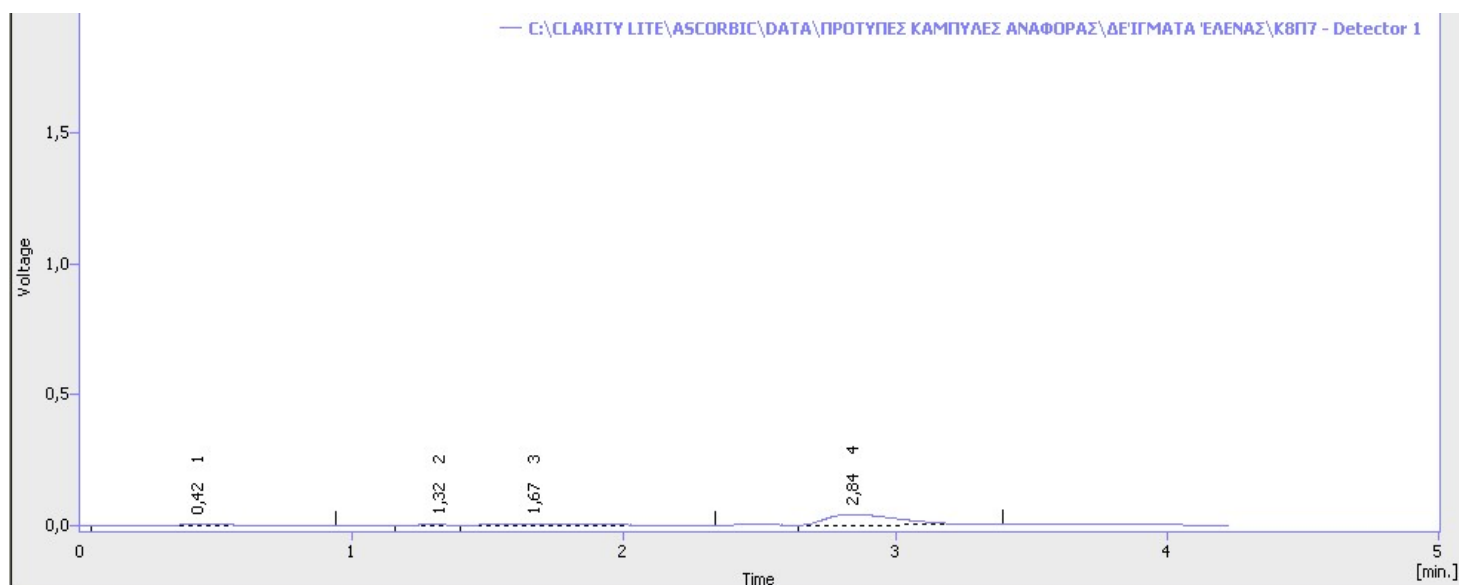
Εικόνα 44 |Χρωματογράφημα δείγματος από μν που έπασχε από διαβήτη τύπου I & δέχτηκε εξάμηνη UV ακτινοβολία.

Παρατηρούμε ότι το δείγμα μας περιέχει και ασκορβικό οξύ (1^η κορυφή) και ουρικό οξύ (2^η κορυφή).



Εικόνα45 | Χρωματογράφημαδείγματος από μυ που έπασχε από διαβήτη τύπου II & δέχτηκε εξάμηνη UVακτινοβολία.

Παρατηρούμε ότι το δείγμα μας περιέχει και ασκορβικό οξύ (1^η κορυφή) και ουρικό οξύ (2^η κορυφή)



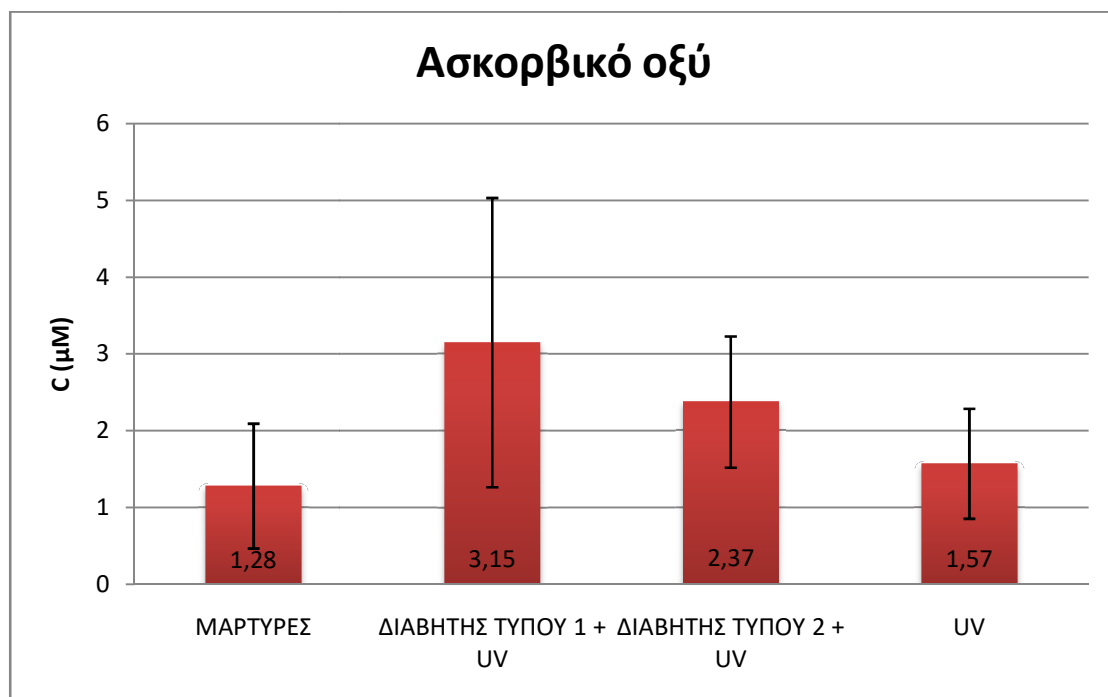
Εικόνα 46|Χρωματογράφημαδείγματος από υγιή μυ που δέχτηκε εξάμηνη UVακτινοβολία.

Παρατηρούμε ότι το δείγμα μας περιέχει μόνο ασκορβικό οξύ, και καθόλου ουρικό οξύ.

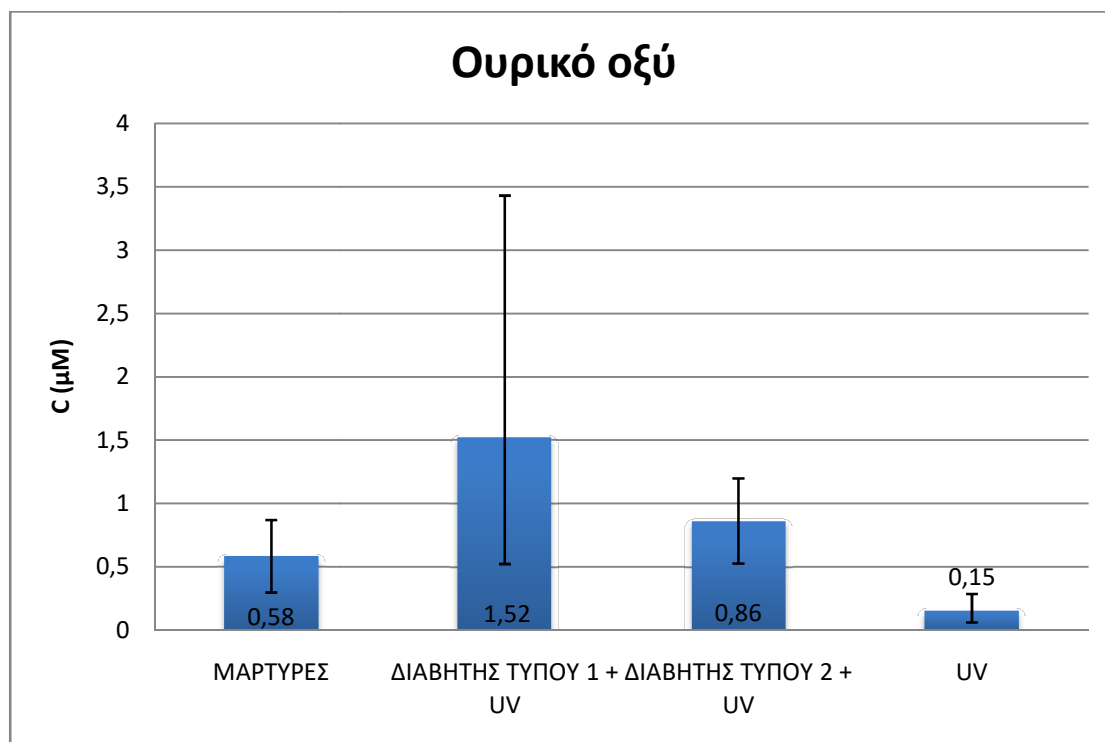
	Ασκορβικό οξύ	Ουρικό οξύ
	C (μM)	C (μM)
ΜΑΡΤΥΡΕΣ	1,28±0,81	0,58±0,28
ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1 + UV	3,15±1,88	1,52±1,90
ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2 + UV	2,37±0,85	0,86±0,33
UV	1,57±0,71	0,51±0,38

Πίνακας 69 | Αποτελέσματα συγκεντρώσεων ασκορβικού και ουρικού οξέος μετά από 6 μήνες ακτινοβολήσης για κάθε ομάδα.

Με βάση τα δεδομένα του πίνακα κατασκευάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα, τα οποία απεικονίζουν τη συγκέντρωση κάθε αντιοξειδωτικού μορίου σε κάθε ομάδα.



Διάγραμμα 55 | Μέσος όρος συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος σε κάθε ομάδα (6 μήνες ακτινοβολήσης) – Σύγκριση



Διάγραμμα 56| Μέσος όρος συγκέντρωσης ουρικού οξέος σε κάθε ομάδα (6 μήνες ακτινοβόλησης) – Σύγκριση

Παρατηρούμε ότι το διαβητικό δέρμα παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση ασκορβικού και ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε σχέση με το φυσιολογικό και το φυσιολογικό ακτινοβολημένο δέρμα. Συγκεκριμένα, οι μύες με διαβήτη τύπου I και UV ακτινοβολία παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε ασκορβικό οξύ, έπειτα ακολούθησαν οι μύες με διαβήτη τύπου II και UV ακτινοβολία, με ακόλουθους τους υγιής μύες που δέχτηκαν μόνο UV ακτινοβολία, και τέλος οι υγιής μύες. Την ίδια διάκριση στα επίπεδα συγκεντρώσεως ακολουθεί και το ουρικό οξύ, με τη διαφορά ότι οι υγιής μύες παρουσιάζουν υψηλότερη σε σχέση με τους υγιής ακτινοβολημένους.

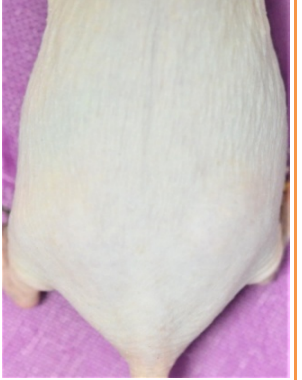
Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η UV ακτινοβολία οδηγεί σε μείωση των αντιοξειδωτικών στο δέρμα, όπως γνωρίζουμε, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των αντιοξειδωτικών ουσιών της κεράτινης στιβάδας στην HPLC, μόνο ένας μυσ από τους 10 της 4^{ης} ομάδας έδειξε να έχει ουρικό οξύ, και μάλιστα σε χαμηλή συγκέντρωση ($C=0,24 \mu\text{M}$). Αντιθέτως, οι μύες με διαβητικό δέρμα, και μάλιστα εκείνοι με τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης είχαν μεγάλες συγκεντρώσεις και ασκορβικού και ουρικού

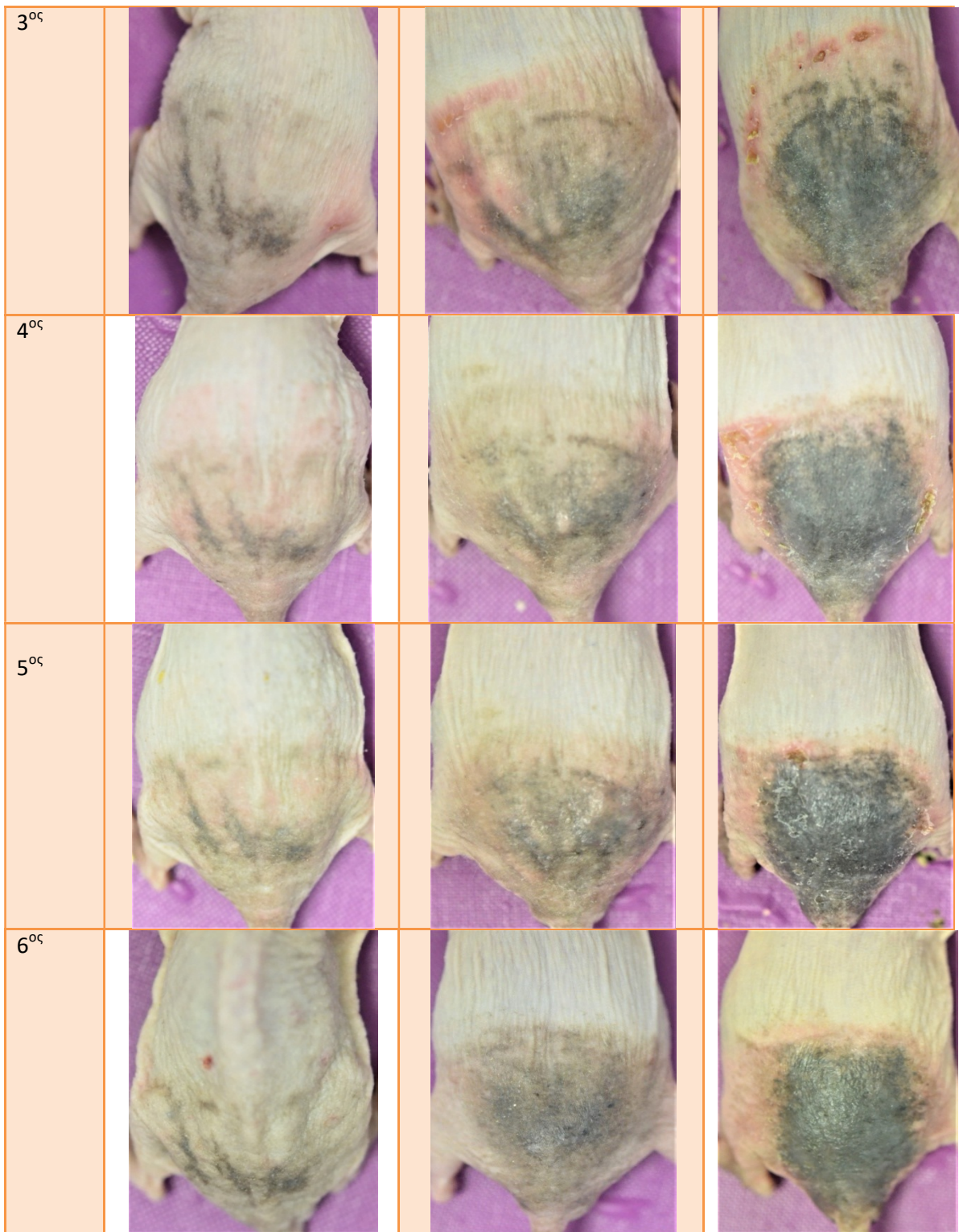
οξέος, πιθανώς ως άμεση αντίδραση του οργανισμού να ενισχύσει την αντιοξειδωτική του άμυνα έναντι της ακτινοβολίας.

Ακόμη, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεγάλη τυπική απόκλιση που υπάρχει στην 2^η ομάδα και στα δύο αντιοξειδωτικά, οφείλεται δε μύες που παρουσίασαν πολύ υψηλή συγκέντρωση των ουσιών σε σχέση με τους υπόλοιπους μύες της αντίστοιχης ομάδας.

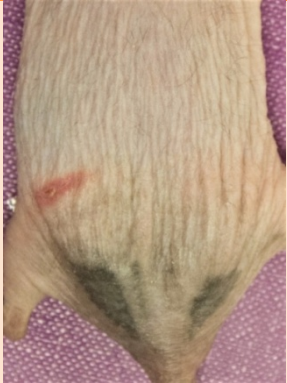
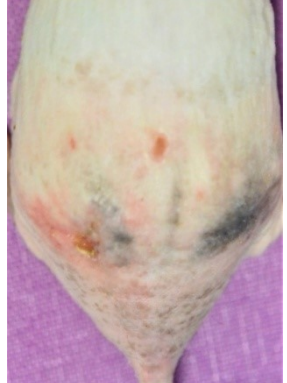
3.4 Φωτογραφίες με Φωτογραφική κάμερα

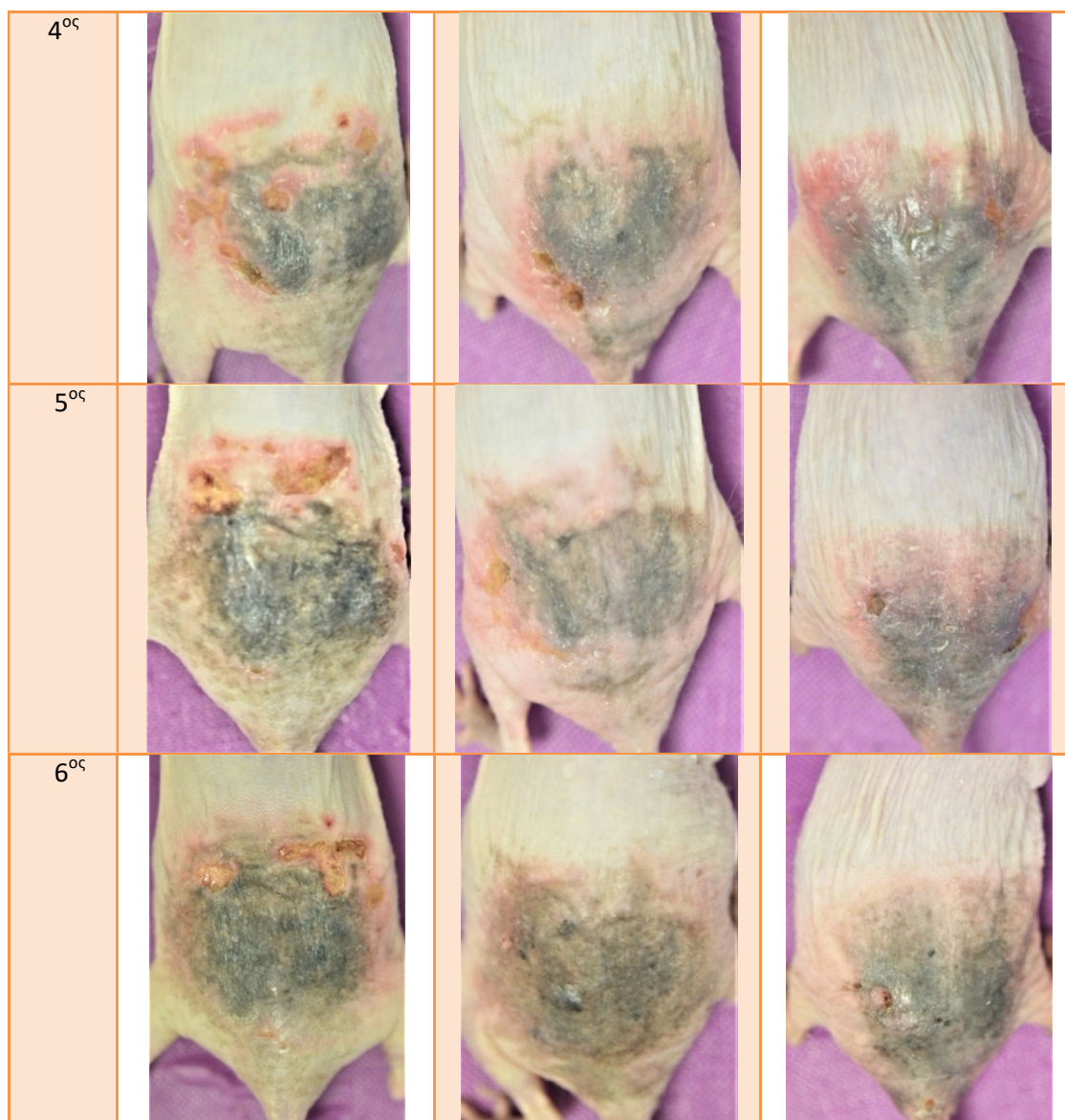
Πίνακας 70 | Σύγκριση ομάδων

Μήνας	Διαβήτης Τύπου Ι & UV Γλυκόζη: >600 mL/dL	Διαβήτης Τύπου ΙΙ & UV Γλυκόζη: 186 mL/dL	UV
0			
1 ^{ος}			
2 ^{ος}			

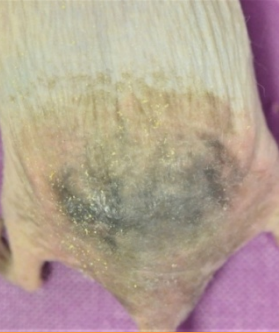


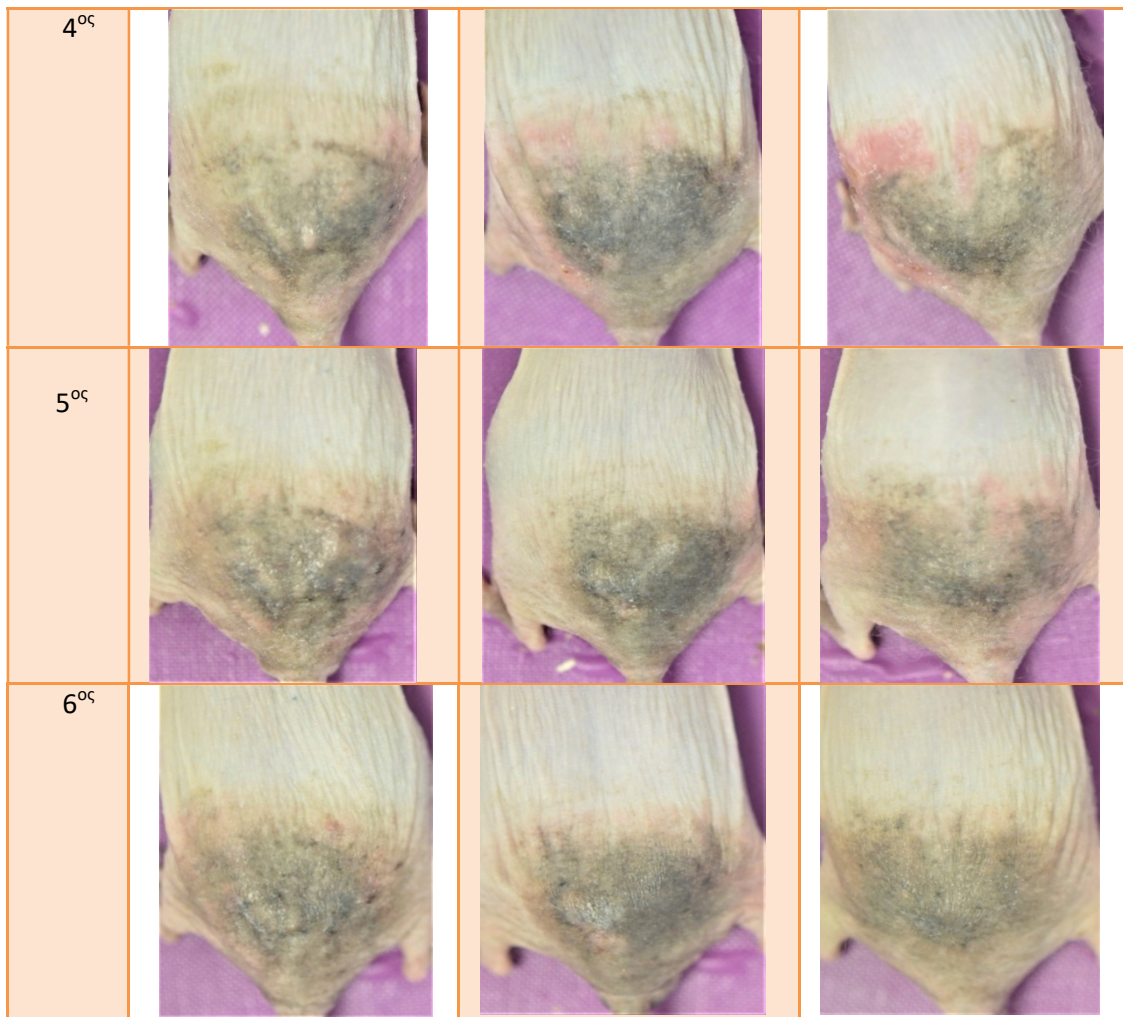
Πίνακας 71 |Μύες με UVακτινοβολία

Μήνας	UV	UV	UV
0			
1 ^{ος}			
2 ^{ος}			
3 ^{ος}			

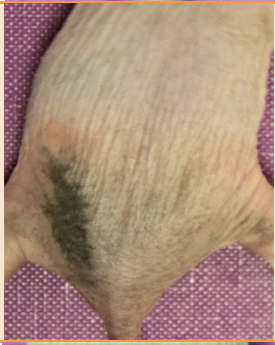


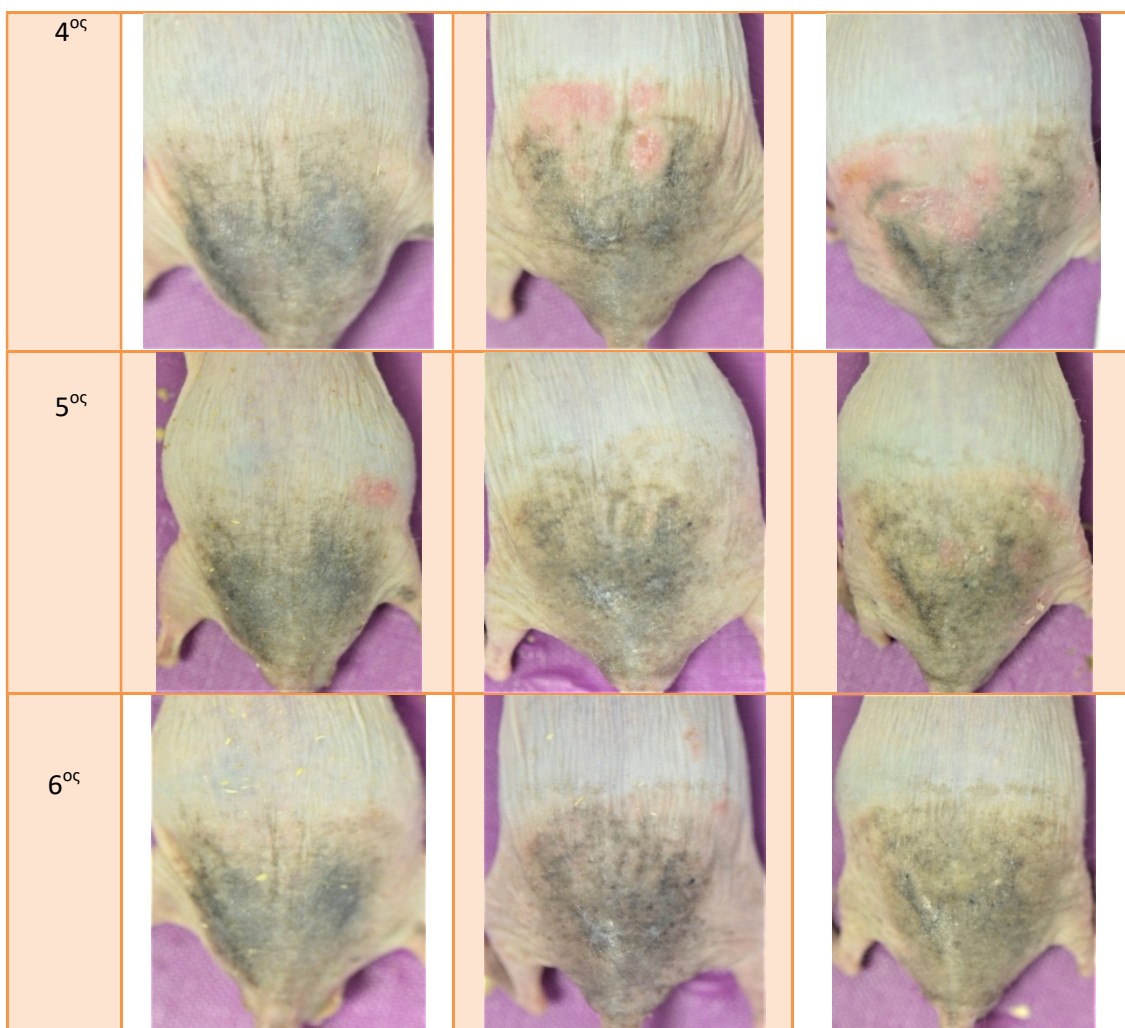
Πίνακας 72| Μύες με διαβήτη τύπου II & UV ακτινοβολία

Μήνας	Διαβήτης Τύπου II & UV Γλυκόζη: 176 mL/dL	Διαβήτης Τύπου II & UV Γλυκόζη: 158 mL/dL	Διαβήτης Τύπου II & UV Γλυκόζη: 183 mL/dL
0			
1 ^{ος}			
2 ^{ος}			
3 ^{ος}			



Πίνακας 73|Μύες με διαβήτη τύπου I &UV

Μήνας	Διαβήτης Τύπου I &UV Γλυκόζη: >600 mL/dL	Διαβήτης Τύπου I &UV Γλυκόζη: 545 mL/dL	Διαβήτης Τύπου I &UV Γλυκόζη: 597 mL/dL
0			
1 ^{ος}			
2 ^{ος}			
3 ^{ος}			



Στους παραπάνω πίνακες απεικονίζονται μύες από την κάθε ομάδα τον κάθε μήνα του πειράματος.

Παρατηρούμε ότι κατά το πέρας του κάθε μήνα αυξάνεται η μελανίνη και το ερύθημα στην περιοχή που ακτινοβολούνταν οι μύες (κάτω μέρος της ράχης). Συγκεκριμένα, σε όλες τις ομάδες από τον 2^ο μέχρι τον 4^ο μήνα υπάρχει έξαρση τους δέρματος με έντονη κοκκινίλα σε πολλά σημεία. Το δέρμα μπορεί να χαρακτηριστεί φλεγμένο, ξεκινώντας ήπια ξηροδερμία.

Από τον 5^ο μήνα και έπειτα, αρχίζουν να διαχωρίζονται οι ομάδες μεταξύ τους. Οι ακτινοβολημένοι μύες με διαβήτη τον 5^ο και τον 6^ο μήνα του πειράματος παρουσιάζουν βελτίωση ως προς τη φλεγμονή, την πάχυνση του δέρματος (μειώνεται) και την ξηροδερμία, ιδίως οι μύες που έχουν πολύ υψηλή γλυκόζη. Αντίθετα, η ομάδα των υγιών μυών που έλαβε μόνο UV ακτινοβολία, κάθε μήνα σημείωνε έξαρση των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, τον τελευταίο μήνα

παρατηρείται εκτεταμένη διάβρωση του ιστού, έντονη ξηροδερμία, υπερπάχυνση του δέρματος και σχηματισμό εξογκωμάτων,πληγές και αρχικά στάδια έλκους και ελκομένων οζιδίων.

Επειδή ήταν δύσκολη η διάγνωση μόνο από τις φωτογραφίες με χρήση κάμερας, χρησιμοποιήθηκε δερματοσκόπιο και έπειτα έγινε ιστοπαθολογική εξέταση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.5 Δερματοσκόπιο

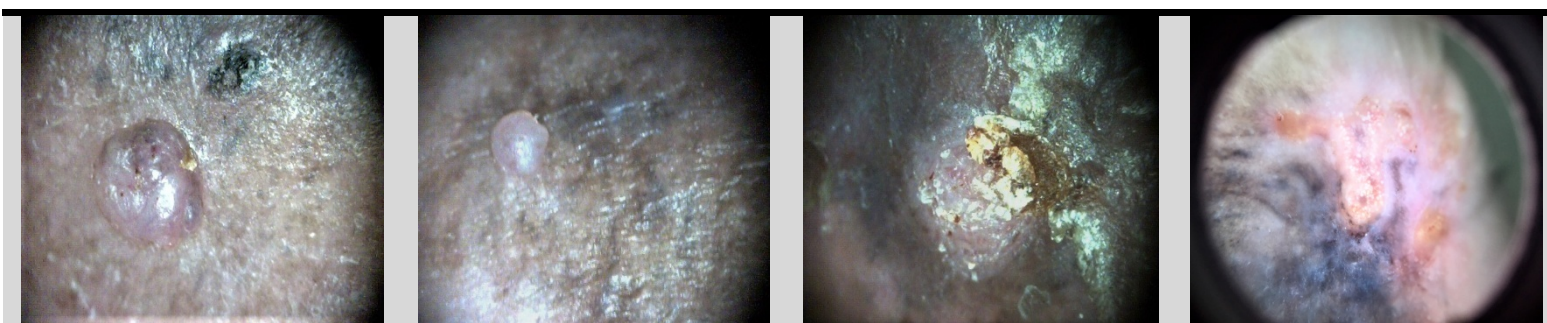
Πίνακας 74 | Μύες με διαβήτη τύπου Ι&UVακτινοβολία



Πίνακας 75 | Μύες με διαβήτη τύπου ΙΙ &UVακτινοβολία



Πίνακας 76|Μύες με UVακτινοβολία





Υγιής μύς



Στις παραπάνω εικόνες απεικονίζονται μύες από κάθε ομάδα. Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε τον 6^ο μήνα. Στις εικόνες εμφανίζονται έντονα οι διαφορές μεταξύ του διαβητικού ακτινοβολημένου δέρματος και του υγιούς ακτινοβολημένου δέρματος. Συγκεκριμένα, στην ομάδα των ακτινοβολημένων μυών χωρίς διαβήτη, παρατηρείται εκτεταμένη διάβρωση του ιστού, σε κάποιους μύες προσκολλημένη κρούστα πάνω σε ογκίδιο, που αποτελεί συχνό χαρακτηριστικό του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος. Το ογκίδιο (ή όγκος) αυτό εξέχει από την επιφάνεια του δέρματος, εμφανίζει επιφάνεια ανώμαλη και βλαστική, ερυθρά, είναι σκληρό, ανώδυνο ή ελαφρώς επώδυνο και αιμορραγεί εύκολα. Η βάση του όγκου εμφανίζεται σκληρή λόγω διήθησης. Η σανιδώδης αυτή σκλήρυνση συνήθως ξεπερνά και τα όρια του όγκου.

Επίσης, χαρακτηριστικά είναι και τα κόκκινα εξανθήματα που ξεφλουδίζουν και το ξεκίνημα ελκών σε κάποιους μύες. Χαρακτηριστική στις εικόνες είναι η έντονη ξηροδερμία και το ξεφλούδισμα κομματιών κεράτινης στιβάδας. Ακόμη, σε πολλά σημεία εμφανίζουν μαύρα στίγματα που εξέχουν, των οποίων η εικόνα παραπέμπει σε

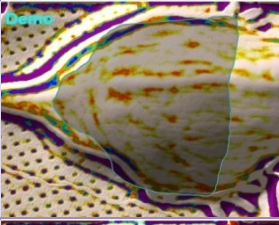
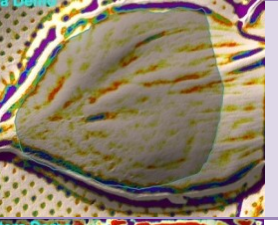
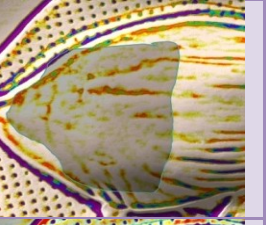
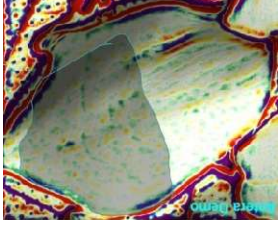
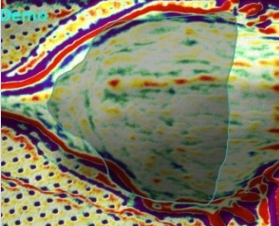
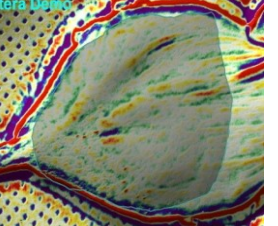
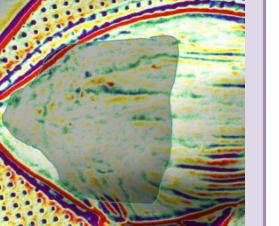
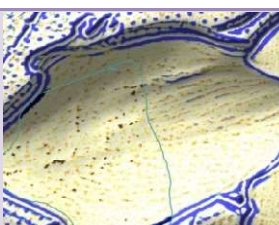
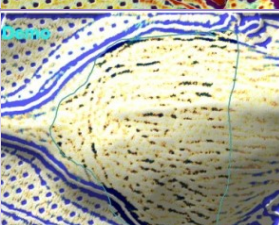
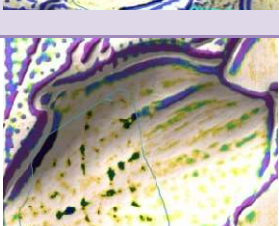
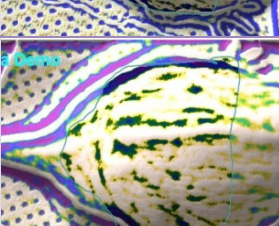
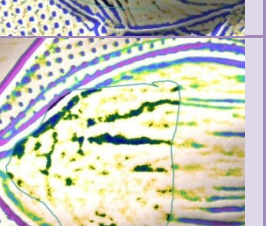
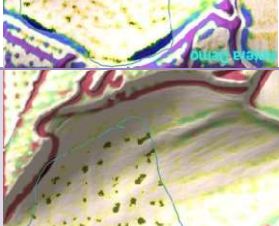
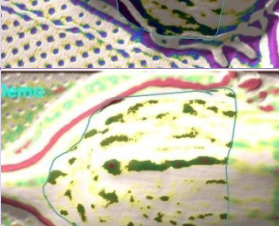
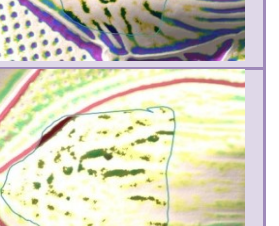
μελανωματικό καρκίνωμα. Συνήθως, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα αρχίζει ως μικρό οζίδιο και καθώς διευρύνεται το κέντρο του, γίνεται νεκρωτικό και απογυμνώνει και μετατρέπεται σε έλκος. Άλλοτε εμφανίζεται σαν υπερυψωμένος εξωφυτικός μυρμηκιώδης όγκος χωρίς τάση να ελκωθεί.

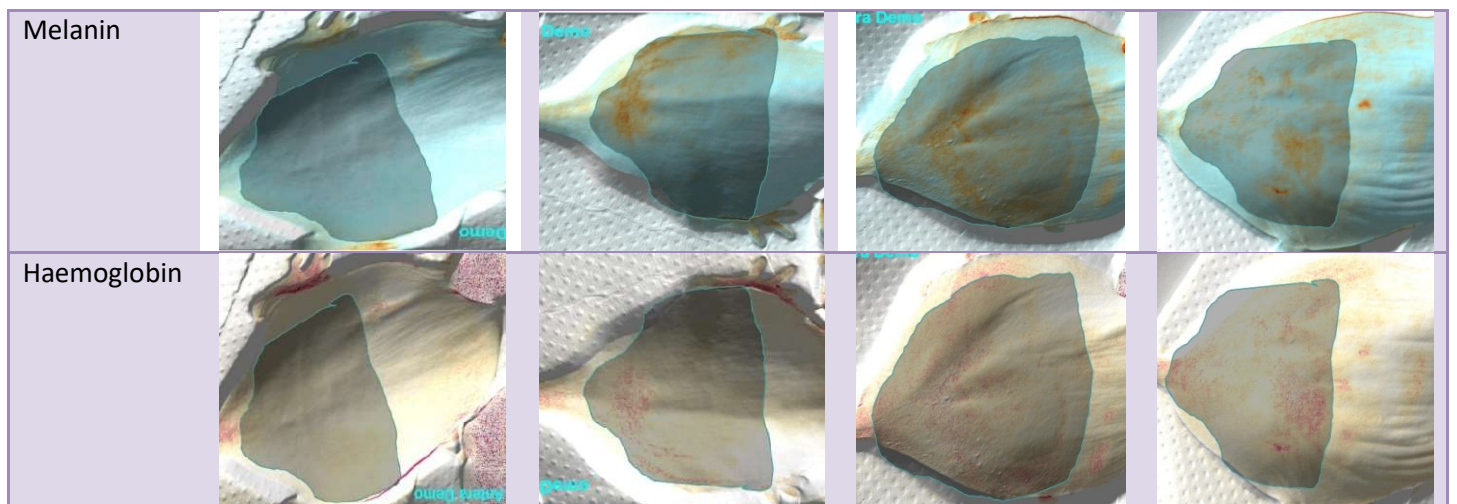
Αντιθέτως, οι ακτινοβολημένοι διαβητικοί μύες, δεν παρουσιάζουν καμία παρόμοια εικόνα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ήπια ξηροδερμία, νεκρωτικός ιστός και μερικά ήπια μαύρα στίγματα χωρίς να εξέχουν.

Γενικά, τον 6^ο μήνα του πειράματος ξεκινάνε προκαρκινικές βλάβες στους υγιείς ακτινοβολημένους ιστούς, ενώ στους ακτινοβολημένους διαβητικούς δεν υπάρχουν προκαρκινικά σημεία.

3.6 ANTERA

Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν τον Μάρτιο (3^{ος} μήνας).

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	Μάρτυρες (Υγιή)	Διαβήτης Τύπου I & UV (k1p5)	Διαβήτης Τύπου II & UV (k3p4)	UV (k6p8)
Χωρίς παράμετρο				
Wrinkles				
Texture				
Pores				
Depressions				
Elevations				

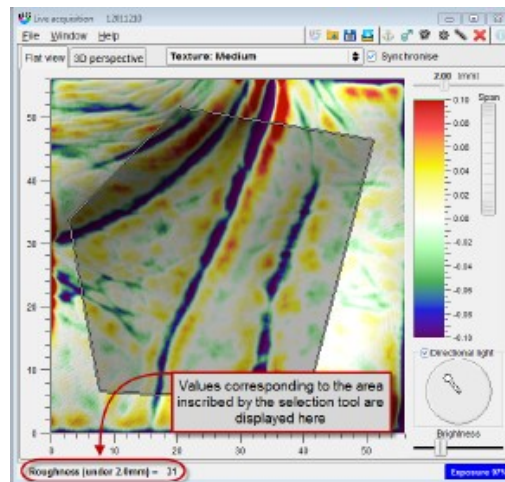


Πίνακας 77 | Απεικόνιση μυών κάθε ομάδας για κάθε παράμετρο

Antera: Παράγοντες αξιολόγησης για κάθε παράμετρο

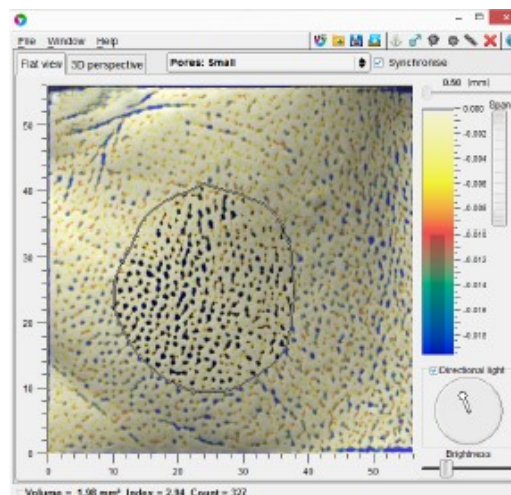
- ☞ **Wrinkles:** Small (1mm filter): Κατάλληλο φίλτρο για λεπτές γραμμές (finelines)
Το Μοβ χρώμα της εικόνας φανερώνει τα πιο βαθιά χαρακτηριστικά, σε σχέση με την επιφάνεια της εικόνας (λευκό χρώμα).
 - Παράμετρος μέτρησης: **indentation** (=εσοχή) **index** (παρόμοια παράμετρος με το roughness που σχετίζεται με το texture). Υπολογίζονται μόνο οι εσοχές και όχι οι προεξοχές του δέρματος.
- ☞ **Texture:** Small (0.1-1 mm)
 - Παράμετρος μέτρησης: **Average Roughness Ra** (λογισμικό antera), ποσοτικοποιείται από τις κάθετες αποκλίσεις της πραγματικής επιφάνειας ως προς την ιδανικής της μορφή. Ο τύπος υπολογισμού του Ra είναι ο εξής:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$



☞ Pores: Small (0.1-0.5 mm)

- Παράμετρος μέτρησης: **Volume** (mm^3), ο συνολικός όγκος των εσοχών του δέρματος που οφείλεται στην παρουσία πόρων στην επιλεγμένη περιοχή.

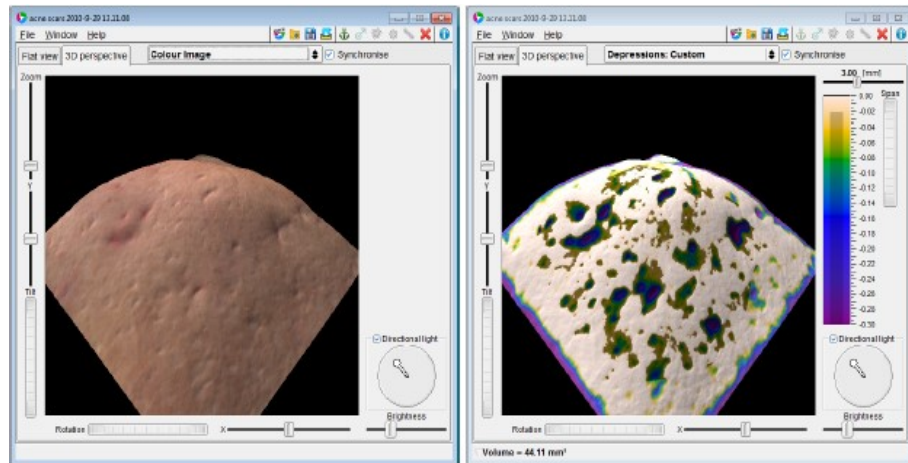


☞ Depressions: Small (0.1-1 mm), κατάλληλο φίλτρο για λεπτές γραμμές (finelines)

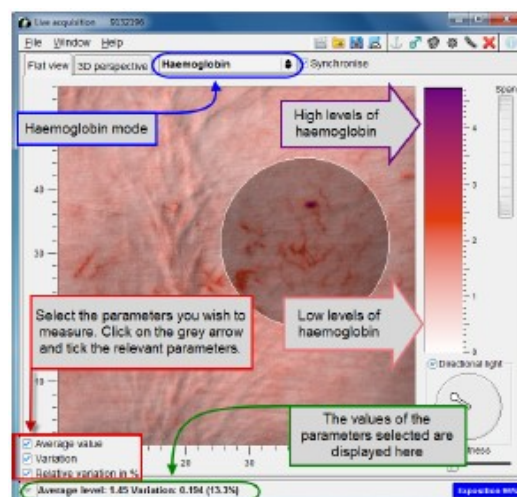
- Παράμετρος μέτρησης: **Volume** (mm^3) των depressions στην επιλεγμένη περιοχή (περιοχή ενδιαφέροντος).

☞ Elevations (ανύψωση, κατάλληλη για μέτρηση ουλών): Small (0.1-1 mm)

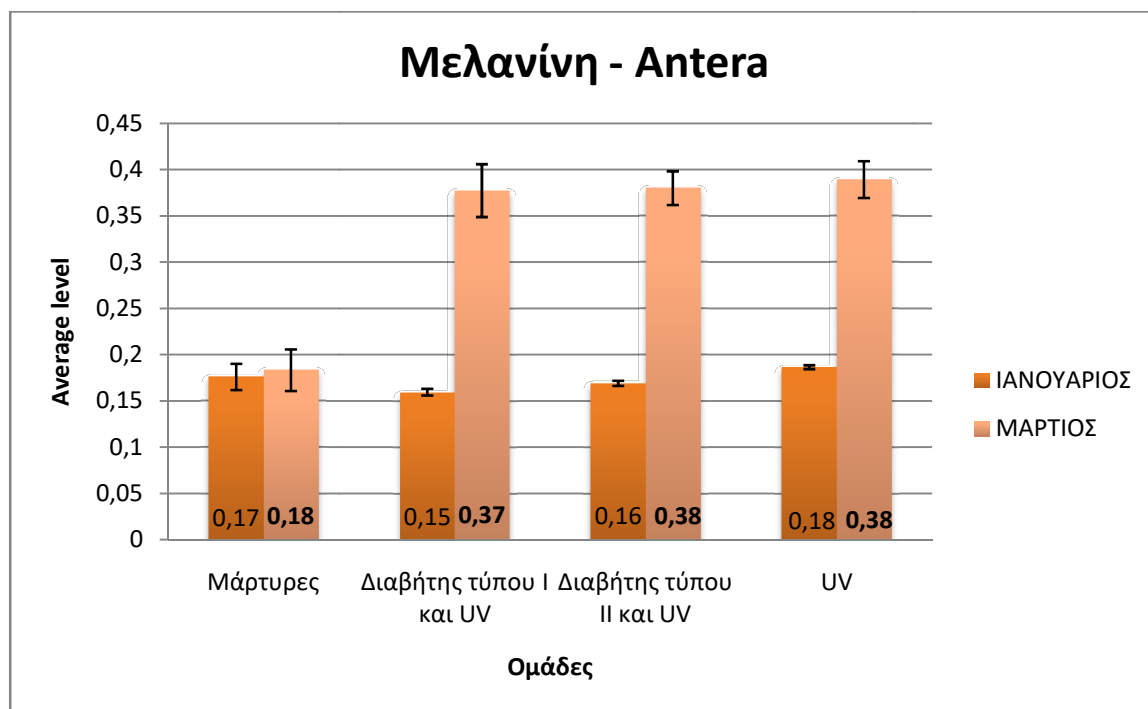
- Παράμετρος μέτρησης: **Volume** (mm^3) των elevations στην περιοχή ενδιαφέροντος.



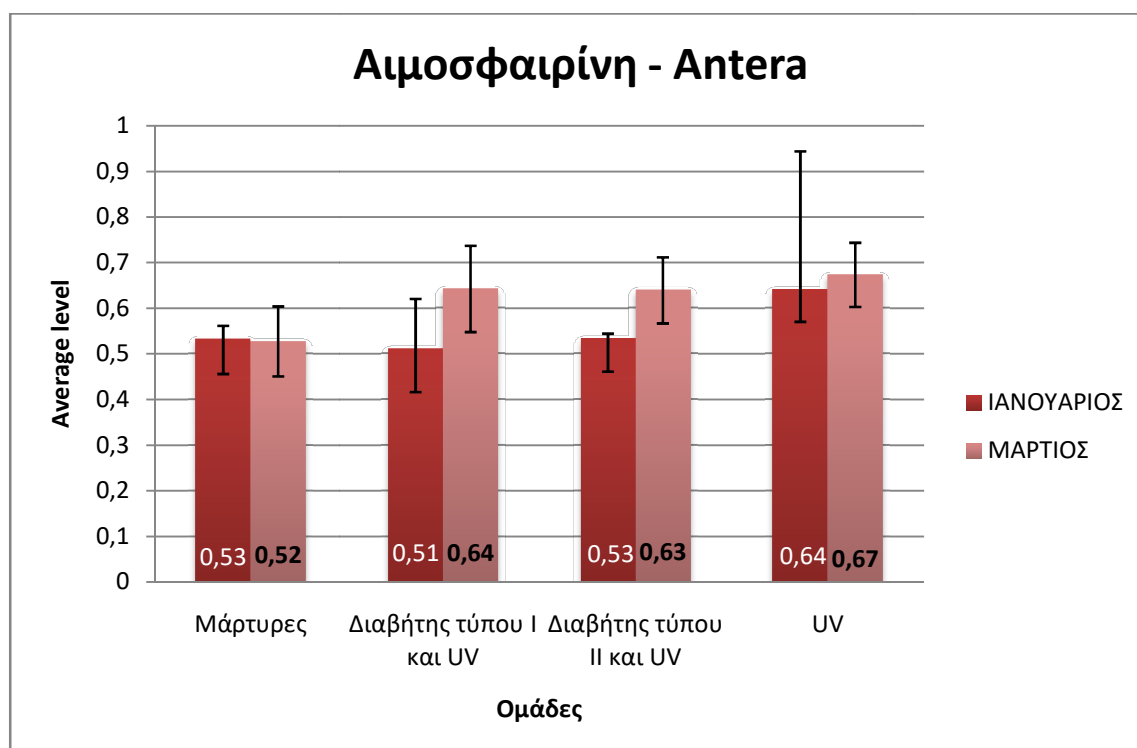
- ✎ **Melanin:** Χαρτογραφείται η κατανομή της μελανίνης στην περιοχή ενδιαφέροντος και μετριέται η μέση συγκέντρωσή της.
 - Παράμετρος μέτρησης: **Average level** (μέση συγκέντρωση μελανίνης στην περιοχή ενδιαφέροντος).
- ✎ **Haemoglobin:** Χαρτογραφείται η κατανομή της αιμογλοβίνης (ή αλλιώς αιμοσφαιρίνης) στην περιοχή ενδιαφέροντος και μετριέται η μέση συγκέντρωσή της (πιο σκούρο κόκκινο χρώμα φανερώνει πιο αυξημένη συγκέντρωση αιμογλοβίνης).
 - Παράμετρος μέτρησης: **Average level** (μέση συγκέντρωση αιμογλοβίνης στην περιοχή ενδιαφέροντος).



Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους που υπολογίστηκαν από τις φωτογραφίες, προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα σχετικά με τη μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη του δέρματος των μυών όλων των ομάδων.



Διάγραμμα 57 | Μελανίνη πριν την έναρξη ακτινοβολήσης και τον 3^ο μήνα



Διάγραμμα 58 | Αιμοσφαιρίνη πριν την έναρξη ακτινοβολήσης και τον 3^ο μήνα

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι μετά την έναρξη της ακτινοβολήσης και μάλιστα τον τρίτο ήδη μήνα τα επίπεδα μελανίνης στο δέρμα των μυών αυξήθηκαν σημαντικά, ενώ στους υγιείς μύες δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή.

Επίσης, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης στην ακτινοβολημένη περιοχή των μυών με διαβήτη τύπου I και II έδειξαν αύξηση σε σχέση με τους υγιείς και τους υγιείς ακτινοβολημένους μύες, κάτι που εξηγείται παρακάτω.

Γενικά η ποσότητα της χρωστικής εξαρτάται από την ηλιακή ένταση. Οπότε, όσο περισσότερο εκτίθενται οι μύες στη UV ακτινοβολία, τόσο υψηλότερη θα είναι η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης και αντίστοιχα και της μελανίνης.

Πέραν αυτού, η υποξία του όγκου έχει συνδεθεί με την εξέλιξη του όγκου, την ανάπτυξη της αντίστασης της θεραπείας και επομένως την κακή πρόγνωση. Η αναιμία (χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης), λοιπόν, αποτελεί μείζονα παράγοντα που προκαλεί υποξία του όγκου και η συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στο αίμα (cHb) και της κατάστασης οξυγόνωσης του όγκου κρίνεται σημαντική.

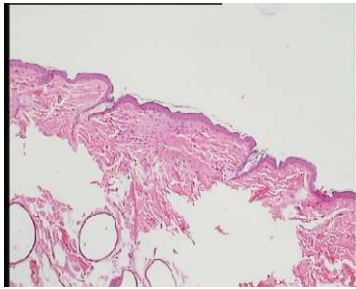
Η υποξία του όγκου εμφανίζεται όταν αναπτύσσεται ο όγκος, και λόγω αυτού μειώνεται η ικανότητα του τοπικού μικροαγγειακού συστήματος να προμηθεύει οξυγόνο στα κύτταρα όγκου. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι όγκοι είναι περισσότερο υποξικοί από τη γύρω τους φυσιολογική περιοχή.

Επιπλέον, η ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελευθέρων ριζών εντός κυττάρων. Με την παρουσία οξυγόνου, οι ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές και αλληλεπιδρούν με το DNA και την κυτταρική μεμβράνη για να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Όταν τα κύτταρα είναι υποξικά, οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι σταθερές και ο κυτταρικός θάνατος δεν μπορεί να συμβεί. [191]

Η οξυγόνωση του όγκου επηρεάζεται κυρίως από το ρυθμό ροής αίματος, τη μικροκυκλοφορία και τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Hb). Επομένως, η διόρθωση-αύξηση του επιπέδου της Hb θα βελτιώσει τον όγκο.

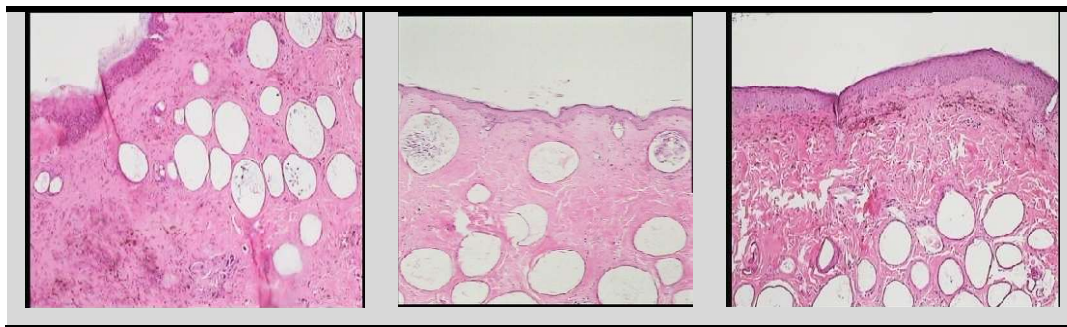
3.7 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Πίνακας 78 | Υγιής μυς



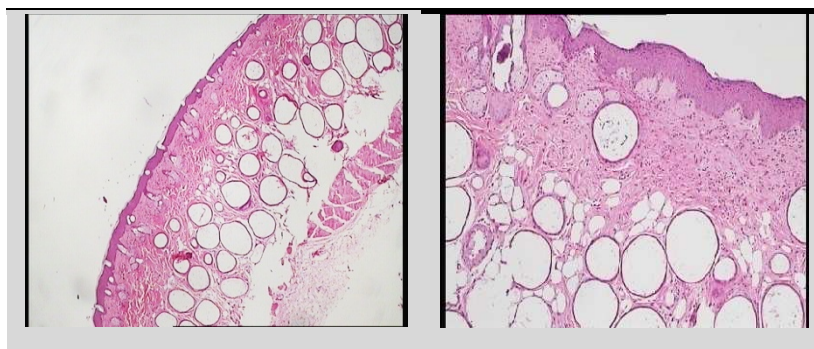
Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται το δέρμα ενός υγιούς μυός και παρατηρούμε πως δεν παρουσιάζει κάποια φλεγμονή, υπερκεράτωση, υπερπλασία ή οτιδήποτε άλλο παρατηρήθηκε στους παρακάτω μύες που έλαβαν UVακτινοβολία. Απεικονίζεται ένα υγιές δέρμα.

Πίνακας 79 | Ακτινοβολημένοι μύες με Διαβήτη τύπου I



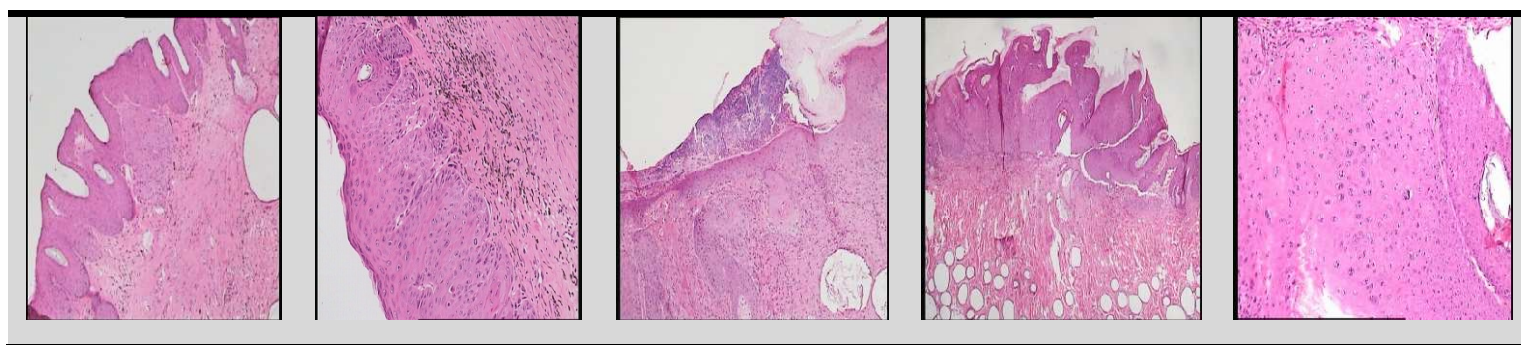
Στις παραπάνω 3 εικόνες απεικονίζεται το δέρμα διαβητικών μυών με διαβήτη τύπου I που έλαβαν UVακτινοβολία. Και στις 3 φωτογραφίες παρατηρείται μεγάλη εναπόθεση μελανίνης, αυξημένος αριθμός ιδρωτοποιών αδένων σε σχέση με το υγιές δέρμα (οι λευκοί μεγάλοι κύκλοι), ήπια στοιχεία φλεγμονής, μικρή υπερκεράτωση, κανένα στοιχείο κακοήθειας.

Πίνακας 80 | Ακτινοβολημένοι μύες με Διαβήτη τύπου II



Στις παραπάνω δύο εικόνες απεικονίζεται το δέρμα διαβητικών μυών με διαβήτη τύπου II που έλαβαν UV ακτινοβολία. Παρατηρείται αύξηση των ιδρωτοποιών αδένων, εναπόθεση της μελανίνης όμως μικρότερη σε σχέση με τους μύες με διαβήτη τύπου I και UV ακτινοβολία, υπερπλασία της επιδερμίδας, μικρή φλεγμονή και έντονη ελάστωση στο ανώτερο χόριο (τάση για δημιουργία ουλής).

Πίνακας 81 | Ακτινοβολημένοι μύες (υγιείς που έλαβαν μόνο UV ακτινοβολία)



Ο παραπάνω πίνακας περιέχει εικόνες έπειτα από ιστοπαθολογική εξέταση υγιών μυών που ακτινοβολήθηκαν με UV ακτινοβολία, οι οποίες παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με τις άλλες 3 ομάδες.

Συγκεκριμένα, στην 1^η από τις 4 εικόνες (με σειρά από αριστερά προς δεξιά) παρατηρείται σμηγματορροϊκή κεράτωση, μικρά θηλώματα, αυξημένη εναπόθεση μελανίνης, το οποίο είναι πιο ευδιάκριτο στη 2^η κατά σειρά εικόνα που είναι η

μεγέθυνση της 1^{ης}, υπερπλασία, υπερκεράτωση και εστιακά δυσπλασία ολικού πάχους, insitu ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Στην 3^η κατά σειρά εικόνα, παρατηρείται αρκετά έντονη φλεγμονή, ελάστωση, υπερπλασία, εξέλκωση και μάλιστα έλκος με φλεγμονώδη επίπαγο (η λεγόμενη κρούστα) και μικρή ατυπία κυττάρων που χαρακτηρίζεται ως εστιακή δυσπλασία και πρώιμο στάδιο ακανθοκυτταρικού καρκινώματος.

Στην 4^η κατά σειρά εικόνα, παρατηρείται υπερκεράτωση, εξέλκωση, έντονη υπερπλασία και δυσπλασία και μεγάλη ατυπία κυττάρων, όπως φαίνεται πιο χαρακτηριστικά στην τελευταία εικόνα που είναι σε μεγέθυνση, δηλαδή insitu ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι όλοι οι μύες της ομάδας αυτής, όπως και των δύο προηγούμενων, παρουσίασαν μεγάλο αριθμό ιδρωτοποιών αδένων σε σύγκριση με το υγιές δέρμα.

Επομένως συμπεραίνουμε ότι οι μύες που ακτινοβολήθηκαν με UV ακτινοβολία παρουσίασαν μεγάλο αριθμό ιδρωτοποιών αδένων σε σύγκριση με τους μύες που δεν ακτινοβολήθηκαν. Επίσης, οι διαβητικοί μύες παρόλο που έλαβαν την ίδια δόση ακτινοβολίας με την 4^η ομάδα των υγιών μυών, δεν έδειξαν έντονη φλεγμονή, εξέλκωση ή ατυπία κυττάρων και insitu ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Πρόκληση Διαβήτη Τύπου II

Σε αυτό το πείραμα, περιγράφηκαν 2 διαφορετικά πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη τύπου II σε μύες. Οι διαβητικοί μύες έχουν σαφή πλεονεκτήματα έναντι άλλων ειδών, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους των ζώων, τη σύντομη περίοδο επαγωγής διαβήτη, την ευκολία στην πρόκληση του διαβήτη και το μειωμένο κόστος. [192] Ωστόσο, επειδή η STZ μπορεί να είναι τοξική σε όργανα και ιστούς εκτός των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα μοντέλα STZ δεν μιμούνται με ακρίβεια την ανθρώπινη κατάσταση. Ενώ ο διαβήτης τύπου II είναι η κυρίαρχη μορφή του διαβήτη στους ανθρώπους, στην ανάπτυξη ενός τέτοιου ζωικού μοντέλου οι προκλήσεις είναι μεγαλύτερες από ό, τι για το διαβήτη τύπου I. Γενετικά μοντέλα, ειδικά το πρότυπο διαβητικών και παχύσαρκων μυών db / db, ίσως να προσομοιάζουν καλύτερα την ανθρώπινη νόσο. Παρ' όλα αυτά, η χρήση τους είναι περιορισμένη επειδή παρουσιάζουν ορισμένες σημαντικές διαφορές από την ανθρώπινη κατάσταση [193] και είναι πολύ ακριβά. Γι' αυτό το λόγο θέλαμε να δούμε αν προκαλείται διαβήτης τύπου II σε άτριχους μύες, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο εύκολα σε μια μελλοντική μελέτη διαδερμικής χορήγησης αντιδιαβητικών φαρμάκων. Αναλυτικότερα, εφαρμόσαμε δύο μοντέλα διαβήτη τύπου II που χρησιμοποιούνται περισσότερο συχνά σε αντίστοιχες μελέτες.

Το διαβητικό μοντέλο, που αναπτύχθηκε με STZ / NAD, έχει χαρακτηριστικά αρκετά παρόμοια με τον μη-παχύσαρκο διαβήτη τύπου II, όπως υποδεικνύεται από τα ακόλουθα σημαντικά χαρακτηριστικά. Πιο αναλυτικά, το μοντέλο διαβητικού μυός που προκαλείται από STZ / NAD είναι ο μη παχύσαρκος τύπος, στον οποίο η ανοχή γλυκόζης ήταν ελαφρά εξασθενημένη. Έδειξε μερικώς αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης νηστείας την 3^η εβδομάδα (όπου την 5η εβδομάδα, η γλυκόζη είχε αυξηθεί αρκετά), μείωση σωματικού βάρους και φυσιολογικά επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος, χωρίς δηλαδή να αναπτύσσεται αντίσταση στην ινσουλίνη, αν και πρέπει έχει μειωμένη περιεκτικότητα σε παγκρεατική ινσουλίνη.

Στο δεύτερο μοντέλο τα STZ / HFD διαβητικά ποντίκια ανέπτυξαν αρκετά εύκολα αντίσταση στην ινσουλίνη, όταν ταΐστηκαν με δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και σουκρόζη. Το μοντέλο με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι

θεωρείται γενικά το καλύτερο μοντέλο για το χαρακτηρισμό πολλών επιπλοκών που σχετίζονται με τον ανθρώπινο διαβήτη.

Όσον αφορά την αντίσταση στην ινσουλίνη, είναι η κατάσταση κατά την οποία έχει χαθεί, εν μέρει, η ικανότητα της ινσουλίνης να ωθεί τη γλυκόζη μέσα στους ιστούς του σώματος. Η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για να εισέλθει η γλυκόζη στα περισσότερα κύτταρα του σώματος, όπου χρησιμοποιείται για να παράγει ενέργεια. Μετά από ένα σύνθηες γεύμα που περιέχει υδατάνθρακες, η γλυκόζη κυκλοφορεί στο αίμα και «ενεργοποιεί» το πάγκρεας να παράγει ινσουλίνη. Χωρίς την ινσουλίνη, πολύ λίγη γλυκόζη μπορεί να εισέλθει στα μυϊκά κύτταρα και σε άλλους ιστούς (στον εγκέφαλο η γλυκόζη εισέρχεται χωρίς τη βοήθεια της ινσουλίνης). Η ινσουλίνη βοηθάει επίσης τα αμινοξέα (τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών) να εισέλθουν στα μυϊκά κύτταρα. Τέλος η ινσουλίνη εμποδίζει την λιπόλυση, δηλαδή τη διάσπαση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων και την έξοδο των λιπαρών οξέων από τις αποθήκες τους προς την κυκλοφορία του αίματος. Όταν υπάρχει αντίσταση στην ινσουλίνη, το πάγκρεας αναγκάζεται να παράγει περισσότερη ποσότητα ινσουλίνης από το κανονικό (διπλάσια ή ακόμα και τετραπλάσια ποσότητα) κι έτσι τελικά η γλυκόζη εισέρχεται μέσα στα μυϊκά κύτταρα για να δώσει ενέργεια. Η υπερπαραγωγή ινσουλίνης(υπερινσουλιναιμία) σημαίνει ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει εύκολα στα μυϊκά κύτταρα, στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Το πάγκρεας παράγει μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης για να υπερνικήσει την αντίσταση των κυττάρων. Σταδιακά, αυτή η κατάσταση μπορεί να εξαντλήσει τα β-κύτταρα του παγκρέατος και να τα κάνει να χάσουν την παραγωγική τους ικανότητα. Μερικές φορές, τα β-κύτταρα του παγκρέατος αρχίζουν να αποπύπτουν με ρυθμό 4% το χρόνο και έτσι δεν μπορεί να παραχθεί πλέον αρκετή ινσουλίνη. Το αποτέλεσμα είναι η γλυκόζη να παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στο αίμα, δηλαδή να εμφανίζεται ο διαβήτης τύπου 2. Ένας διαβητικός ασθενής αρχικά εμφανίζει υπερινσουλιναιμία και στη συνέχεια αρχίζει να έχει μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης. Αντίσταση στην ινσουλίνη έχουν κατά πάσα πιθανότητα αυτοί που εμφανίζουν τις τέσσερις «κακές» ενδείξεις: υψηλή γλυκόζη στο αίμα, πολλά τριγλυκερίδια, λίγη καλή χοληστερόλη (HDL) και υψηλή αρτηριακή πίεση. Πίσω από αυτή την τετράδα που ο ενδοκρινολόγος Gerald Reaven του Πανεπιστημίου Στάνφορντ αποκάλεσε αρχικά Σύνδρομο X (τώρα λέγεται Μεταβολικό Σύνδρομο) κρύβεται η αντίσταση στην ινσουλίνη (υπερινσουλιναιμία) [196, 197] σημαίνει ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει εύκολα στα μυϊκά κύτταρα,

στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Το πάγκρεας παράγει μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης για να υπερνικήσει την αντίσταση των κυττάρων. Σταδιακά, αυτή η κατάσταση μπορεί να εξαντλήσει τα β-κύτταρα του παγκρέατος και να τα κάνει να χάσουν την παραγωγική τους ικανότητα. Μερικές φορές, τα β-κύτταρα του παγκρέατος αρχίζουν να αποπίπτουν με ρυθμό 4% το χρόνο και έτσι δεν μπορεί να παραχθεί πλέον αρκετή ινσουλίνη. Το αποτέλεσμα είναι η γλυκόζη να παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στο αίμα, δηλαδή να εμφανίζεται ο διαβήτης τύπου II. Ένας διαβητικός ασθενής αρχικά εμφανίζει υπερινσουλιναιμία και στη συνέχεια αρχίζει να έχει μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης. Αντίσταση στην ινσουλίνη έχουν κατά πάσα πιθανότητα αυτοί που εμφανίζουν τις τέσσερις «κακές» ενδείξεις: υψηλή γλυκόζη στο αίμα, πολλά τριγλυκερίδια, λίγη καλή χοληστερόλη (HDL) και υψηλή αρτηριακή πίεση. Πίσω από αυτή την τετράδα που ο ενδοκρινολόγος Gerald Reaven του Πανεπιστημίου Στάνφορντ αποκάλεσε αρχικά Σύνδρομο X (τώρα λέγεται Μεταβολικό Σύνδρομο) κρύβεται η αντίσταση στην ινσουλίνη. [194]

Η αντίσταση στην ινσουλίνη στο ήπαρ θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε περίπτωση κατανάλωσης δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. [195] Υπάρχουν πολλές έρευνες στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι η διατροφή πλούσια σε λιπαρά προκαλεί παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη. [196, 197] Μετά από ένα τυπικό γεύμα, ενώ κυκλοφορεί αρκετή γλυκόζη και ινσουλίνη στο αίμα, υπάρχει συγχρόνως ακατάσχετη έξοδος λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό που φτάνουν στο ήπαρ και μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια. Η γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια ανταγωνίζονται μεταξύ τους ποιο θα αποτελέσει το καύσιμο των κυττάρων. Ωστόσο τόσο η γλυκόζη όσο και τα τριγλυκερίδια δεν παύουν να βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο αίμα. Έτσι προκύπτουν τα δύο βασικά χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου. Βάσει της σημαντικής μείωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μετά από μια διατροφή πολύ υψηλή σε λίπος και κορεσμένα λιπαρά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι μια τέτοια δίαιτα μπορεί να είναι επιζήμια για την ομοιόσταση της γλυκόζης και θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου II. Κρίσιμες παράμετροι Για το μοντέλο STZ/NAD, οι κύριες μεταβλητές είναι οι δόσεις του NAD (60 έως 290 mg / kg, i.p.) και της STZ (45 έως 100 mg / kg, i.p. ή i.v.), και όχι τόσο το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο ενέσεων, καθώς υπάρχει γενική ομοφωνία στα 15 λεπτά. [198] Στο μοντέλο STZ / HFD, οι μεταβλητές είναι πιο πολλές και πιο κρίσιμες, καθώς υπάρχει

περίπτωση να αλλάζει η περιεκτικότητα του λίπους (40% έως 60%), η διάρκεια της διατροφής πριν από την ένεση STZ (2 έως 12 εβδομάδες), η συμπερίληψη (ή όχι) σακχαρώξης, η δόση και η οδός χορήγησης της STZ (15, 35 ή 50 mg / kg ενδοφλεβίως ή 25 έως 75 mg / kg, i.p) [199]. Πράγματι, σε μια έρευνα, η STZ χορηγήθηκε σε νεογνικούς μύες, ακολουθούμενη από τη δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. [200] Ευαισθησία του μυός στην STZ. Υπάρχει έντονη επιρροή του φύλου στους μύες για την ανάπτυξη του διαβήτη. Ενώ τα θηλυκά είναι ανθεκτικά στα αποτελέσματα των χαμηλών δόσεων STZ, αυτό μπορεί να ξεπεραστεί αυξάνοντας τη δόση. [187] Αυτό συμβαίνει γιατί οι αρσενικοί μύες έχουν πιο επιρρεπή παγκρεατικά β-κύτταρα από τους θηλυκούς μύες, σε προκαλούμενη από STZ κυτταρο τοξικότητα, λόγω της έλλειψης οιστρογόνων. [202] Τα διαφορετικά είδη μυών εμφανίζουν διαφορετικές ευαισθησίες στην STZ. Ζωικά πρότυπα όπως τα CD-1 και C57BL/6 ποντίκια είναι ευαίσθητα σε αυτή την τοξίνη. [201, 204] Σε αντίθεση, τα Balb / cJ είναι ανθεκτικά στο διαβήτη (Zuninoetal., 1994). Εάν τα επίπεδα γλυκόζης-νηστείας στο αίμα δεν ξεπερνούν τα 126 mg / dl σε 3 ή 4 εβδομάδες μετά την ένεση της STZ (AmericanDiabetesAssociation, 2014), είναι πιθανόν αυτά τα ζωικά πρότυπα να μην είναι ευαίσθητα σε αυτή την τοξίνη. Στο πείραμά μας, στο πρωτόκολλο NAD, ήδη από τη 2η εβδομάδα, τα είδη ΑΣΠΡΑ, ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, είχαν >130 mg/dl γλυκόζη νηστείας, ενώ τα ΑΡΟΕ, την 5η εβδομάδα κατάφεραν να ξεπεράσουν αυτό το όριο. Στο πρωτόκολλο HFD, οι τιμές γλυκόζης-νηστείας έχουν μια πιο βραδεία αύξηση που σαφώς οφείλεται και στη μικρότερη δόση της STZ, αλλά και στον διαφορετικό μηχανισμό ανάπτυξης διαβήτη τύπου II. Και εδώ ξεχωρίζουν τα ΚΑΦΕ, καθώς από την 2η εβδομάδα έχουν ξεπεράσει τα 126 mg/dl στη γλυκόζη νηστείας. Τα υπόλοιπα είδη έχουν παρόμοια βραδεία αύξηση και μόνο τα ΑΣΠΡΑ κατάφεραν να ξεπεράσουν τα 126mg/dl την 5η και τελευταία εβδομάδα. Σε προηγούμενες μελέτες, τα διαβητικά μοντέλα τύπου II έγιναν σε μύες ή επίμυες με πολλαπλή χορήγηση χαμηλής δόσης (MLD) της STZ (40 mg / kg, ip, κάθε 5 ημέρες), με στόχο την προσαρμογή του βαθμού καταστροφής των β κυττάρων. [205] Το μοντέλο MLD-STZ χρειάζεται, ωστόσο, τουλάχιστον δώδεκα εβδομάδες για να γίνουν τα διαβητικά συμπτώματα σταθερά. Επιπλέον, για τον πλήρη έλεγχο της ασθένειας χρειάζεται εκλεπτυσμένη προσαρμογή της δόσης της STZ καθ'όλη τη διάρκεια της χορήγησής της. Στο μη παχύσαρκο-διαβητικό μοντέλο τύπου II με συνδυασμένη εφαρμογή STZ και NAD που εφαρμόσαμε, χρειάστηκαν μόνο 5 εβδομάδες για την καθιέρωση του διαβήτη. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό σε αυτό το μοντέλο ποντικίου είναι ότι η

έκκριση ινσουλίνης στο πλάσμα ήταν φυσιολογική και δεν έδειξε την ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη σε αντίθεση με το παχύσαρκο μοντέλο διαβητικού μυός, όπου η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά προκάλεσε ινσουλινο αντίσταση στο ήπαρ. Αιτία της εμφάνισης ανοχής στην ινσουλίνη πιθανώς να είναι η εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας στα παχύσαρκα ποντίκια. Τα παρόντα μοντέλα διαβητικών μυών είναι πολύ χρήσιμα για τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού στα μη παχύσαρκα και παχύσαρκα άτομα του διαβήτη τύπου II και για τον έλεγχο πιθανών φαρμάκων για την καταστολή της ανάπτυξης της αντίστασης στην ινσουλίνη στον διαβήτη τύπου II. Ανακεφαλαιώνοντας, στο πρωτόκολλο NAD, τα ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, έδειξαν να είναι πιο επιρρεπή στην STZ, ενώ στο πρωτόκολλο HFD, τα ΑΣΠΡΑ & ΚΑΦΕ. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι τα άλλα ζωικά πρότυπα δεν μπορούν να αναπτύξουν διαβήτη τύπου II, αλλά προφανώς αδυνατούν να τον αναπτύξουν κάτω από αυτές τις συνθήκες. Δηλαδή, αν αλλάζαμε κάποιες κρίσιμες παραμέτρους, όπως π.χ. τη δόση της STZ ή την ηλικία των χρησιμοποιούμενων μυών, ίσως να παίρναμε διαφορετικά αποτελέσματα. Συμπεραίνεται ότι η μοντελοποίηση του διαβήτη με έγχυση STZ απαιτεί ευρέως την ανάγκη βελτιστοποίησης των ζωικών προτύπων ώστε αυτά να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν καλύτερα τη ανθρώπινη παθολογική κατάσταση σε περίπτωση διαβήτη.

Καρκίνος του δέρματος & Διαβήτης

Με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους του πειράματος, επιλέχθηκε η ομάδα των άτριχων μυών SKH-hr-2 και το πρωτόκολλο πρόκλησης διαβήτη τύπου II με NAD + STZ, καθώς έδωσαν τις βέλτιστες τιμές γλυκόζης σε μικρότερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το πρωτόκολλο HFD, ώστε να ξεκινήσει η μελέτη της προκλήσεως ακανθοκυτταρικού καρκινώματος με υπεριώδες φως σε μύες με διαβήτη τύπου I και II.

Οι δερματικές επιπλοκές είναι συχνές στον διαβήτη. Ο διαβήτης προκαλεί αλλοιώσεις στις λειτουργικές και μηχανικές ιδιότητες του δέρματος. Οι δερματικές παθήσεις προέρχονται από την εξασθενημένη ομοιόσταση του δέρματος που θεωρείται ότι οφείλονται είτε σε ανωμαλίες του μεταβολισμού λόγω της ασθένειας είτε σε διαβητικές επιπλοκές, όπως αγγειοπάθεια και νευροπάθεια. [212] Ο μη φυσιολογικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα των ασθενών με διαβήτη επηρεάζουν τις λειτουργίες της κεράτινης στιβάδας. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλλοιωμένες βιοχημικές και φυσικές καταστάσεις της επιδερμίδας λόγω της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης. Υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά του δέρματος σε ασθενείς με διαβήτη. Η επιδερμίδα είναι ένας γλυκολυτικός ιστός. Τα κερατινοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς ινσουλίνης που εμφανίζουν ένα σύστημα πρόσληψης γλυκόζης που εξαρτάται από την ινσουλίνη. Σε προηγούμενες μελέτες, η ινσουλίνη φαίνεται να διεγείρει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Αυτές οι έρευνες υποδεικνύουν ότι η ινσουλίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της επιδερμίδας. [210]

Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι η υπεργλυκαιμία και τα μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης εμπλέκονται στη μη φυσιολογική λειτουργία του δέρματος στη μειωμένη κατάσταση ενυδάτωσης της κεράτινης στιβάδας και στη μειωμένη δραστηριότητα του σμηγματογόνου αδένου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Η κατάσταση ενυδάτωσης είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται κυρίως από τρεις παράγοντες στην κεράτινη στιβάδα, δηλαδή από υδατοδιαλυτούς φυσικούς παράγοντες ενυδάτωσης που αποτελούνται κυρίως από αμινοξέα, μεσοκυττάρια λιπίδια και λιπίδια του σμήγματος. Οι τιμές της άδηλης απώλειας νερού στους διαβητικούς ασθενείς ήταν αυξημένες. Η πάχυνση του δέρματος σε διαβητικούς ασθενείς δεν είχε στατιστικά σημαντική

διαφορά από τους υγιείς. Πιστεύεται πως είναι αποτέλεσμα τροποποίησης δομικών πρωτεϊνών, όπως δερματικού κολλαγόνου από μη ενζυματική γλυκοζυλίωση. Η ελαστικότητα του δέρματος ελαττώνεται σε ασθενείς με διαβήτη, όπως επίσης και το επίπεδο των λιπιδίων στο δέρμα. [210]

Σε πείραμα άτριχων μυών με διαβήτη που προκλήθηκε με στρεπτοζοτοκίνη, τα επίπεδα αμινοξέων και κεραμιδίων στην κεράτινη στιβάδα ήταν φυσιολογικά. Το επίπεδο των λιπιδίων στην επιφάνεια του δέρματος ήταν μειωμένο στους διαβητικούς άτριχους μύες σε σχέση με τους φυσιολογικούς. Ακόμα, στους διαβητικούς μύες βρέθηκαν διαφορές στα συστατικά του σμήγματος σε σχέση με το δέρμα των φυσιολογικών. [211]

Στην παρούσα εργασία, οι διαβητικοί μύες τύπου I και II, μετά από την επιθυμητή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα τους και την έναρξη της UV ακτινοβολίας παρουσίασαν μείωση της ενυδάτωσης μέχρι και τον 4^ο μήνα, ενώ από τον 4^ο μέχρι και τον 6^ο μήνα, η ενυδάτωση των μυών και των δύο ομάδων αυξήθηκε σχεδόν μέχρι τις αρχικές τιμές που είχαν πριν την έναρξη της ακτινοβολίας. Η ενυδάτωση στην ομάδα των φυσιολογικών μυών που έλαβε μόνο υπεριώδες φως, μειώθηκε σημαντικά μέχρι το πέρας του πειράματος. Η ελαστικότητα σε αντίθεση με τα πειράματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για ασθενείς και μύες με διαβήτη ή καρκίνο του δέρματος, μετά από μείωση τον 1^ο μήνα, σημείωσε σταδιακά μικρή αύξηση μέχρι το πέρας του πειράματος. Το πάχος του δέρματος των τριών ομάδων που έλαβαν UV αυξήθηκε σημαντικά, με τη διάκριση όμως των διαβητικών μυών που από τον 4^ο μήνα και μετά έδειξαν μείωση της πάχυνσης. Το ερύθημα αυξήθηκε σημαντικά και στις 3 ομάδες ακτινοβολημένων μυών ήδη από τον πρώτο μήνα ακτινοβολίας και σχεδόν σταθεροποιήθηκε μέχρι το πέρας του πειράματος χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Επίσης η μελανίνη και η άδηλη απώλεια του νερού σημείωσε ανοδική πορεία και στις 3 ακτινοβολημένες ομάδες μέχρι και τον 5^ο μήνα, ενώ τον τελευταίο, οι διαβητικοί μύες έδειξαν μικρή μείωση και των δύο παραμέτρων. Σχετικά με το σμήγμα, στους ακτινοβολημένους διαβητικούς μύες, τον 1^ο μήνα μειώθηκε σημαντικά, ενώ από τον 2^ο και έπειτα άρχισε να αυξάνεται μέχρι και τον 6^ο μήνα, ενώ στην ομάδα των υγιών ακτινοβολημένων μυών, το σμήγμα μειώθηκε μέχρι και τον 3^ο μήνα και έπειτα έμεινε σταθερό. Τέλος, τα βάρη των ακτινοβολημένων μυών μειώθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με την ομάδα των μυών με διαβήτη τύπου II να αυξάνουν το μέσο βάρος τους κατά τον τελευταίο μήνα.

Οι μη αναμενόμενες αλλαγές στα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των μυών, πραγματοποιήθηκαν τους μήνες που οι διαβητικοί μύες ανέβασαν τα επιθυμητά επίπεδα γλυκόζης. Συμπερασματικά, η υψηλή γλυκόζη στους μύες φαίνεται να προστατεύει το δέρμα από το υπεριώδες φως, συμβάλλοντας τελικά αντίθετα στις βιοφυσικές παραμέτρους, όπως για παράδειγμα μείωση της έντονης ξηροδερμίας του δέρματος, σημαντική αύξηση της ενυδάτωσης, της ελαστικότητας, μείωση υπερπάχυνσης, ενώ ο διαβήτης αλλά και το υπεριώδες φως «αφυδατώνουν» το δέρμα, ενισχύοντας τη γήρανσή του. Οι φυσιολογικοί μύες παρουσίασαν σταθερότητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Οι μετρήσεις των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών παραγόντων στο δέρμα με τη μέθοδο HPLC, έπειτα από λήψη strippings της κεράτινης στιβάδας και εκχύλισή τους.

Στοιχεία έδειξαν ότι η χρόνια υπεργλυκαιμία οδηγεί σε μια σειρά βιοχημικών αλλαγών, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS και τη πιθανή δημιουργία οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες στο διαβήτη συνυπάρχει με μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία μπορεί να αυξήσει τις επιβλαβείς επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιώδη συνάφεια και στις επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη. Η αυξημένη ποσότητα ελευθέρων ριζών που παράγονται μπορεί να αντιδρούν με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στην κυτταρική μεμβράνη και να προκαλείται λιπιδική υπεροξείδωση, κ αυτή με τη σειρά της να οδηγεί πάλι σε αύξηση παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης μπορεί να είναι μια αντανάκλαση της μείωσης των ενζυμικών και μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων. Τα αντιοξειδωτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από τη ζημία που προκλήθηκε από τις ROS. Στο φυσιολογικό μεταβολισμό υπάρχει ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας των ελευθέρων ριζών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας. Μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C και η E, διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο προλαμβάνοντας την οξείδωση των θεμελιωδών συστατικών των κυττάρων. [213]

Το δέρμα περιέχει μια δεξαμενή προστατευτικών αντιοξειδωτικών. Περιλαμβάνει ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως υπεροξειδάση γλουταθειόνης, δισμουτάση υπεροξειδίου και καταλάση και μη-ενζυματικό χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικά όπως ισομορφές βιταμίνης E, βιταμίνη C, η γλουταθειόνη (GSH) και

το ουρικό οξύ. Τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά στο πλάσμα είναι τοπυροσταφυλικό, ουρικό οξύ, ασκορβικό οξύ, χολερυθρίνη και η γλουταθειόνη και διαλυτή στα λιπίδια άλφα-τοκοφερόλη. Γενικά, η επιφάνεια του δέρματος, η επιδερμίδα, περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών από το χόριο. Η κεράτινη στιβάδα (SC) βρέθηκε να περιέχει τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Οι βιταμίνες C και E (και οι δύο αγ και α-τοκοφερόλη) καθώς επίσης και η GSH και το ουρικό οξύ βρέθηκαν να υπάρχουν στην κεράτινη στιβάδα. [214] Με βάση μελέτες που διεξήχθησαν, τα αντιοξειδωτικά μειώνονται στο δέρμα και στο αίμα κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. [215]

Μελέτες που έγιναν σε διαβητικό δέρμα έδειξαν ότι η συγκέντρωση ουρικού οξέος αυξάνεται πριν από τη διάγνωση του διαβήτη και στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ασθένειας μειώνεται. [206] Το ουρικό οξύ, το τελικό προϊόν οξείδωσης του μεταβολισμού πουρίνης στους ανθρώπους, χρησιμοποιείται συνήθως ως κλινικός δείκτης για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας και της ουρικής αρθρίτιδας. Οι ερευνητές έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες, όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία, η καρδιαγγειακή νόσο και η αντίσταση στην ινσουλίνη. Σε αρκετές μελέτες, τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος έχουν επίσης αναγνωρισθεί ως ένας ισχυρός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου II και του προδιαβήτη. Πρόσφατη ανασκόπηση, μετα-αναλύσεις και μελέτες τυχαιοποίησης έδειξαν ότι υπήρχαν έντονες ενδείξεις για αύξηση ουρικού οξέος και του κινδύνου διαταραχής της γλυκόζης νηστείας ή του διαβήτη. Μεταξύ των ατόμων με μειωμένη γλυκόζη νηστείας ή με μειωμένη ανοχή γλυκόζης, το ουρικό οξύ του ορού έχει επίσης βρεθεί ότι αποτελεί πρόβλεψη του διαβήτη.[207, 208]

Από τα αποτελέσματα που πήραμε από την ανάλυση των αντιοξειδωτικών, το ουρικό και ασκορβικό οξύ της κεράτινης στιβάδας όλων των μυών του πειράματός μας, παρατηρούμε ότι το διαβητικό ακτινοβολημένο δέρμα παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση ασκορβικού και ουρικού οξέος στην κεράτινη στιβάδα σε σχέση με το φυσιολογικό και το φυσιολογικό ακτινοβολημένο δέρμα. Συγκεκριμένα, οι μύες με διαβήτη τύπου I και UV ακτινοβολία παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε ασκορβικό οξύ, έπειτα ακολούθησαν οι μύες με διαβήτη τύπου II και UV ακτινοβολία, κατόπιν ο φυσιολογικοί μύες που δέχτηκαν μόνο UV ακτινοβολία, και τέλος οι φυσιολογικοί μύες. Την ίδια διάκριση στα επίπεδα συγκεντρώσεως

ακολουθεί και το ουρικό οξύ, με τη διαφορά ότι οι φυσιολογικοί μύες παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού σε σχέση με τους φυσιολογικούς ακτινοβολημένους. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η UV ακτινοβολία οδηγεί σε μείωση των αντιοξειδωτικών στο δέρμα, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των αντιοξειδωτικών ουσιών της κεράτινης στιβάδας στην HPLC, μόνο ένας από τους 10 μύες της ομάδας των φυσιολογικών ακτινοβολημένων μυών έδειξε να έχει ουρικό οξύ, και μάλιστα σε χαμηλή συγκέντρωση ($C=0,24 \mu M$). Αντιθέτως, οι μύες με διαβητικό δέρμα, και μάλιστα εκείνοι με τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης έδωσαν μεγάλες συγκεντρώσεις ασκορβικού και ουρικού οξέος, πιθανώς ως άμεση αντίδραση του οργανισμού να ενισχύσει την αντιοξειδωτική του άμυνα έναντι της ακτινοβολίας. Δηλαδή, οι ακτινοβολημένοι διαβητικοί μύες μοιάζουν αν έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς.

Η ιστοπαθολογική εξέταση που έγινε στα δέρματα των μυών, έδειξε ότι οι διαβητικοί ακτινοβολημένοι μύες δεν παρουσίασαν κάποια ένδειξη κακοήθειας, πέρα από ήπια φλεγμονή σε δύο μύες και ελαφριά πάχυνση της επιδερμίδας. Αντιθέτως, οι υγιείς μύες που ακτινοβολήθηκαν με υπεριώδες φως έδειξαν χαρακτηριστικά πρώιμο στάδιο ακανθοκυτταρικού καρκίνου (insitusec), μεγάλη ατυπία κυττάρων, έντονη δυσπλασία, εξέλκωση σε κάποιους μύες αλλά και ακτινική κεράτωση. Μάλιστα, με βάση τη βιβλιογραφία, η ακτινική κεράτωση αποτελεί πρόδρομο στάδιο για το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. [209]

Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, ο διαβήτης τύπου I (υψηλά επίπεδα γλυκόζης) αλλά και ο διαβήτης τύπου II (πιο χαμηλά επίπεδα γλυκόζης) δρουν προστατευτικά έναντι του υπεριώδους φωτός στο δέρμα, αποτρέποντας την πιθανότητα ανάπτυξης ακανθοκυτταρικού καρκινώματος.

Παρόλα αυτά, κάποια αποτελέσματα δεν συνάγουν με την έως τώρα βιβλιογραφία και για το λόγο αυτό θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες μελέτες στο μέλλον σχετικά με τη συσχέτιση του διαβήτη και του καρκίνου του δέρματος, καθώς και να γίνουν επαναλήψεις του πειράματος, ώστε να βρεθούν και οι ακριβείς μηχανισμοί συσχέτισης των δύο ασθενειών.

Συμπεράσματα

- Και τα δύο πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη τύπου II έδωσαν ικανοποιητικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των μυών, ενεργοποιώντας διαφορετικό μηχανισμό δράσης το καθένα. Για τη συνέχεια του πειράματος, επιλέχθηκε το πρωτόκολλο συνδυασμού νικοτιναμιδίου και στρεπτοζοτοκίνης, διότι έδωσε υψηλά επίπεδα γλυκόζης σε σύντομο σχετικά χρονικό διάστημα.
- Από τα τέσσερα ζωικά πρότυπα επιλέχθηκαν τα SKH-hr 2, καθώς έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρόκληση διαβήτη τύπου II.
- Το δέρμα των φυσιολογικών ακτινοβολημένων μυών παρουσίασε **σμηγματορροϊκή** κεράτωση, μικρά θηλώματα, αυξημένη εναπόθεση μελανίνης, υπερπλασία, υπερκεράτωση και εστιακά δυσπλασία ολικού πάχους, **insitu ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα**, αρκετά έντονη φλεγμονή, ελάστωση, εξέλκωση και μάλιστα έλκος με φλεγμονώδη επίπαγο (κρούστα) και ατυπία κυττάρων που χαρακτηρίζεται ως **εστιακή δυσπλασία και πρώιμο στάδιο ακανθοκυτταρικού καρκινώματος**. Επίσης παρουσίασε υπερπάχυνση, αυξημένη άδηλη απώλεια νερού, μειωμένη ενυδάτωση, μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία, υψηλό ερύθημα.
- Το δέρμα των διαβητικών ακτινοβολημένων μυών παρουσίασε ήπια πάχυνση, ενώ η ενυδάτωση και η άδηλη απώλεια νερού στο τέλος του πειράματος επέστρεψαν στα αρχικά φυσιολογικά επίπεδα. Παρατηρήθηκε εναπόθεση μελανίνης, αυξημένος αριθμός ιδρωτοποιών αδένων σε σχέση με το φυσιολογικόδέρμα και ήπια στοιχεία φλεγμονής και υπερκεράτωσης. **Οι διαβητικοί μύες αν και έλαβαν την ίδια δόση ακτινοβολίας με την ομάδα των φυσιολογικών μυών, δεν έδειξαν έντονη φλεγμονή, εξέλκωση ή ατυπία κυττάρων και insitu ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.**
- Οι ποσότητες των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών στην κεράτινη στιβάδα των διαβητικών ακτινοβολημένων μυών ήταν υψηλότερες συγκριτικά με τις ποσότητες αυτών στους φυσιολογικούς ακτινοβολημένους μύες. Οι μύες με τα υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης (διαβήτης τύπου I) παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία στο δέρμα από τους μύες με διαβήτη τύπου II.

- Το δέρμα διαβητικών ακτινοβολημένων μυών φάνηκε πιο προστατευμένο έναντι της υπερϊώδης ακτινοβολίας από το φυσιολογικό ακτινοβολημένο δέρμα.

ΚΕΦ 5^ο |Βιβλιογραφία

- [1]DavidJGawkrödger, Basicprinciples: Microanatomyoftheskin, Dermatologythirdedition: An illustrated colourtext;1(3)
- [2] Αντωνίου Χ., Κατσάμπας Α. Δερματολογία-Αφροδισιολογία. Πασχαλίσσης, Αθήνα.
- [3] Burns DA, Breathnach SM, Cox N, Griffiths CE, eds. Rook's Text-book of Dermatology. 8th edn. WileyBlackwell, New York
- [4] ΠαπαϊωάννουΓ., Κοσμητολογία. Αθήνα 2010
- [5] Afag F., Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection, Arch Biochem Biophys 2011 Apr 15;508 (2):144-51
- [6] William D. James, Timothy G. Berger, Dirk M. Elston, Νοσήματατουδέρματος, 9th edition, 2000
- [7] Cummings B., Campbell, Reece, "The body's defenses", in Biology 6th edition, 2002; 1(3):chap 43
- [8]Young, Barbara; Heath, John W. (2000). Wheater's Functional Histology (4th ed.). Churchill Livingstone. p. 162.
- [9] Mescher, Anthony L (2016). Junqueira's Basic Histology. McGraw-Hill Education
- [10] Τεκνετζής Α., Σιγλετίδης Λ., «Επαγγελματικές δερματοπάθειες, Επαγγελματικές παθήσεις», κεφ.17
- [11] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Essential CellBiology p601*. Garland, 1998.
- [12] Brenner M, Hearing VJ, 2008, "The protective role of melanin against UV damage in human skin". Photochemistry and Photobiology. 84 (3): 539–49
- [13] Meredith P, Riesz J, 2004, "Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin". Photochemistry and Photobiology. 79 (2): 211–6.

- [14] R.R. Anderson and J.A. Parrish, The science of photomedicine Chapter 6: Optical properties of human skin, Plenum Press, 1982.
- [15] James, William; Berger, Timothy; Elston, Dirk, 2005, Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology (10th ed.). Saunders. Pages 1, 11–12
- [16] Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA, 2002, "Elastic fibres". Journal of Cell Science. 115 (Pt14): 2817–28.
- [17] Di Lullo, Gloria A.; Sweeney, Shawn M.; Körkkö, Jarmo; Ala-Kokko, Leena & San Antonio, James D., 2002, "Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen". J. Biol. Chem. 277 (6): 4223–4231.
- [18] James, William D.; Berger, Timothy; Elston, Dirk M., 2006, Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology. Saunders Elsevier. p.7
- [19] Prost Squarcioni C. Histology of skin and hair follicle. Med Sci (Paris), 2006; 22:131-7
- [20] Proksch E, Brandner JM, Jensen JM, 2008, "The skin: an indispensable barrier". Exp Dermatol. 17(12): 1063–72
- [21] Madison KC, 2003, "Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis". J Invest Dermatol. 121 (2): 231–4
- [22] Desmond J. Tobin, "Introduction to skin aging", 2017, Volume 26, Issue 1, Pages 37-46
- [23] Christine Moissl-Eichinger, Alexander J. Probst, Giovanni Birarda, Anna Auerbach, Kaisa Koskinen, Peter Wolf, and Hoi-Ying N. Holman, "Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin", 2017, doi: 10.1038/s41598-017-04197-4
- [24] Song SJ, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. Elife, 2013;2:e00458
- [25] Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: "How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense", Trends Immunol, 2009;30:131-41

- [26] Moissl-Eichinger C, Probst AJ, Birarda G, Auerbach A, Koskinen K, Wolf P, Holman HN, “ Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin”, 2017, 7(1):4039.
- [27] Attila Oláh ,Attila Gábor Szöllősi, Tamás Bíró, “The Channel Physiology of the Skin”, 2012, Part of the Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology book series (REVIEWS, volume 163, pp 65-131)
- [28] Candi E., Schmidt R, Melino G., “The cornified envelope: a model of cell death in the skin.”, *Nat. Rev Mol Cell Biol.*, 2005;4:328-40
- [29] Lai Y., Di Nardo A., Nakatsuji T., “Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury.” *Nat Med.*, 2009, 15:1377-82
- [30] Girardi M, 2007, Cutaneous perspectives on adaptive immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 33:4–14
- [31] Nestle FO, Di MP, Qin JZ et al, 2009, Skin immune sentinels in health and disease, *Nat Rev Immunol* 9:679–691
- [32] Takeuchi O, Akira S, 2010, Pattern recognition receptors and inflammation *Cell*, 140:805–820
- [34] Gallo RL, Huttner KM, 1998, Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 111(5):739–743
- [35] John D’Orazio, Stuart Jarrett, Alexandra Amaro-Ortiz, and Timothy Scott, “UV Radiation and the Skin“, 2013, 14 (6): 12222-12248.
- [36] Slominski A., Tobin D.J., Shibahara S., Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 2004;84:1155–1228
- [37] Riley P.A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1997,29:1235–1239.
- [38] Meredith P., Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment. Cell Res*, 2006,19:572–594.
- [38] Slominski A., Paus R. Are l-tyrosine and l-dopa hormone-like bioregulators? *J. Theor. Biol.*, 1990,143:123–138.

- [39] Slominski A. Neuroendocrine activity of the melanocyte. *Exp. Dermatol.*, 2009, 18:760–763
- [40] Slominski A., Zmijewski M.A., Pawelek J. l-tyrosine and l-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment. Cell Melanoma Res.*, 2012, 25:14–27.
- [41] Ito S., Wakamatsu K., Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment. Cell Res.*, 2000, 13:103–109.
- [42] Vincensi M.R., d’Ischia M., Napolitano A., Procaccini E.M., Riccio G., Monfrecola G., Santoianni P., Protà G. Pheomelanin *versus* eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: A pilot study. *Melanoma Res.*, 1998, 8:53–58
- [43] Benedetto J.P., Ortonne J.P., Voulot C., Khatchadourian C., Protà G., Thivolet J. Role of thiol compounds in mammalian melanin pigmentation: Part I. Reduced and oxidized glutathione. *J. Invest. Dermatol.*, 1981, 77:402–405
- [44] Benedetto J.P., Ortonne J.P., Voulot C., Khatchadourian C., Protà G., Thivolet J. Role of thiol compounds in mammalian melanin pigmentation. II. Glutathione and related enzymatic activities. *J. Invest. Dermatol.*, 1982, 79:422–424
- [45] Sealy R.C., Hyde J.S., Felix C.C., Menon I.A., Protà G., Swartz H.M., Persad S., Haberman H.F. Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: Distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1982, 79:2885–2889.
- [46] Costantini C., d’Ischia M., Palumbo A., Protà G. Photochemistry of 5-S-cysteinyl-dopa. *Photochem. PhotoBiol.*, 1994, 60:33–37
- [47] Protà G. Melanins, melanogenesis and melanocytes: Looking at their functional significance from the chemist’s viewpoint. *Pigment. Cell Res.*, 2000, 13:283–293
- [48] Mitra D., Luo X., Morgan A., Wang J., Hoang M.P., Lo J., Guerrero C.R., Lennerz J.K., Mihm M.C., Wargo J.A., et al. An ultraviolet-radiation-independent

pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature.*, 2012, 491:449–453

[49] Scherer D., Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer—A review. *Mutat. Res.*, 2010, 705:141–153.

[50] Lu H., Edwards C., Gaskell S., Pearse A., Marks R. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. *Br. J. Dermatol.*, 1996, 135:263–267.

[51] Andreassi L., Flori M.L., Rubegni P. Sun and skin—Role of phototype and skin color. *Rheumaderm.*, 1999, 455:469–475.

[52] Kawada A. Risk and preventive factors for skin phototype. *J. Dermatol. Sci.*, 2000, 23:S27–S29

[53] Ravnbak M.H. Objective determination of Fitzpatrick skin type. *Dan. Med. Bull.*, 2010, 57:B4153

[54] Slominski A., Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.*, 2000, 21:457–487.

[55] Slominski A., Wortsman J., Luger T., Paus R., Solomon S. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol. Rev.*, 2000, 80:979–1020

[56] Slominski A.T., Zmijewski M.A., Skobowiat C., Zbytek B., Slominski R.M., Steketee J.D. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 2012, 212:v-115.

[57] Slominski A., Tobin D.J., Shibahara S., Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.*, 2004, 84:1155–1228.

[58] Holick M.F. Sunlight “D”ilemma: Risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. *Lancet.*, 2001, 357:4–6

[59] Holick M. Does sunscreen block the skin's ability to make vitamin D? If so, how can I get enough of this vitamin without raising my risk of skin cancer? *Health News.*, 2002, 8:12.

- [60] Tangpricha V., Turner A., Spina C., Decastro S., Chen T.C., Holick M.F. Tanning is associated with optimal vitamin D status (serum 25-hydroxyvitamin D concentration) and higher bone mineral density. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80:1645–1649.
- [61] Holick M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, 80:1678S–1688S.
- [62] Rajakumar K., Greenspan S.L., Thomas S.B., Holick M.F. SOLAR ultraviolet radiation and vitamin D: A historical perspective. *Am. J. Public Health.*, 2007, 97:1746–1754.
- [63] Holick M.F., Chen T.C., Lu Z., Sauter E. Vitamin D and skin physiology: A D-lightful story. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, 22:V28–V33.
- [64] Holick M.F. Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: How much sunlight do we need? *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008, 624:1–15.
- [65] Holick M.F. Vitamin D and sunlight: Strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, 3:1548–1554.
- [66] Carbone L.D., Rosenberg E.W., Tolley E.A., Holick M.F., Hughes T.A., Watsky M.A., Barrow K.D., Chen T.C., Wilkin N.K., Bhattacharya S.K., et al. 25-Hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism.*, 2008, 57:741–748
- [67] Clydesdale G.J., Dandie G.W., Muller H.K. Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell. Biol.*, 2001, 79:547–568.
- [68] Matsumura Y., Ananthaswamy H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, 195:298–308.
- [69] Skobowiat C., Dowdy J.C., Sayre R.M., Tuckey R.C., Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: Regulation by ultraviolet radiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2011, 301:E484–E493.

- [70] Skobowiat C., Sayre R.M., Dowdy J.C., Slominski A.T. Ultraviolet radiation regulates cortisol activity in a waveband-dependent manner in human skin *ex vivo*. *Br. J. Dermatol.*, 2013, 168:595–601
- [71] Bayerl C., Taake S., Moll I., Jung E.G. Characterization of sunburn cells after exposure to ultraviolet light. *PhotoDermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 1995, 11:149–154
- [72] Coelho S.G., Choi W., Brenner M., Miyamura Y., Yamaguchi Y., Wolber R., Smuda C., Batzer J., Kolbe L., Ito S., et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2009, 14:32–35.
- [73] Scott T.L., Christian P.A., Kesler M.V., Donohue K.M., Shelton B., Wakamatsu K., Ito S., D’Orazio J. Pigment-independent cAMP-mediated epidermal thickening protects against cutaneous UV injury by keratinocyte proliferation. *Exp. Dermatol.*, 2010, 21:771–777.
- [74] Slominski A., Wortsman J., Pisarchik A., Zbytek B., Linton E.A., Mazurkiewicz J.E., Wei E.T. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J.*, 2001, 15:1678–1693.
- [75] D’Orazio J.A., Nobuhisa T., Cui R., Arya M., Spry M., Wakamatsu K., Igras V., Kunisada T., Granter S.R., Nishimura E.K., et al. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature.*, 2006, 443:340–344.
- [76] Slominski A., Wortsman J., Tuckey R.C., Paus R. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2007, 265–266:143–149.
- [77] Cui R., Widlund H.R., Feige E., Lin J.Y., Wilensky D.L., Igras V.E., D’Orazio J., Fung C.Y., Schanbacher C.F., Granter S.R., et al. Central role of p53 in the Suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.*, 2007, 128:853–864.
- [78] McGill G.G., Horstmann M., Widlund H.R., Du J., Motyckova G., Nishimura E.K., Lin Y.L., Ramaswamy S., Avery W., Ding H.F., et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.*, 2002, 109:707–718

- [79] Widlund H.R., Fisher D.E. Microphthalmia-associated transcription factor: A critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene.*, 2003, 22:3035–3041
- [80] Rouzaud F., Costin G.E., Yamaguchi Y., Valencia J.C., Berens W.F., Chen K.G., Hoashi T., Bohm M., Abdel-Malek Z.A., Hearing V.J. Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by melanocortin 1 receptor isoforms. *FASEB J.*, 2006, 20:1927–1929.
- [81] Levy C., Khaled M., Fisher D.E. MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.*, 2006, 12:406–414.
- [82] Mitra D., Fisher D.E. Transcriptional regulation in melanoma., *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, 2009, 23:447–465
- [83] Park S.B., Huh C.H., Choe Y.B., Youn J.I. Time course of ultraviolet-induced skin reactions evaluated by two different reflectance spectrophotometers: DermaSpectrophotometer and Minolta spectrophotometer CM-2002. *PhotoDermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 2002, 18:23–28.
- [84] Beattie P.E., Dawe R.S., Ferguson J., Ibbotson S.H. Dose-response and time-course characteristics of UV-A1 erythema. *Arch. Dermatol.*, 2005, 141:1549–1555.
- [85] Chedekel M.R., Zeise L. Sunlight, melanogenesis and radicals in the skin. *Lipids.*, 1988, 23:587–591
- [86] Slominski A., Tobin D.J., Paus R. Does p53 regulate skin pigmentation by controlling proopiomelanocortin gene transcription? *Pigment. Cell Res.*, 2007, 20:307–308.
- [87] Kripke M.L., Fisher M.S. Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1976, 57:211–215.
- [88] Kripke M.L., Lofgreen J.S., Beard J., Jessup J.M., Fisher M.S. *In vivo* immune responses of mice during carcinogenesis by ultraviolet irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, 59:1227–1230.
- [89] Kripke M.L. Effects of UV radiation on the immune system: Consequences for UV carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1979, 121:589–598.

- [90] Kripke M.L. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol. Rev.*, 1984, 80:87–102.
- [91] Schade N., Esser C., Krutmann J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: Molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem. PhotoBiol. Sci.*, 2005, 4:699–708.
- [92] Norval M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2006, 92:108–118.
- [93] De Gruijl F.R. UV-induced immunosuppression in the balance. *Photochem. PhotoBiol.*, 2008, 84:2–9.
- [94] Kripke M.L. Reflections on the field of photoimmunology. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, 133:27–30.
- [95] Polefka T.G., Meyer T.A., Agin P.P., Bianchini R.J. Effects of solar radiation on the skin. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2012, 11:134–143.
- [96] Sklar L.R., Almutawa F., Lim H.W., Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochem. PhotoBiol. Sci.*, 2013, 12:54–64
- [97] Pfeifer G.P., You Y.H., Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.*, 2005, 571:19–31.
- [98] Tyrrell R.M. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem. Soc. Symp.*, 1995, 61:47–53.
- [99] Sander C.S., Chang H., Hamm F., Elsner P., Thiele J.J. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Dermatol.*, 2004, 43:326–335.
- [100] Burke K.E. Photoaging: The role of oxidative stress. *G Ital. Dermatol. Venereol.*, 2010, 145:445–459.
- [101] De Gruijl F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB. *Methods Enzymol.*, 2000, 319:359–366.

- [102] Ikehata H., Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.*, 2011, 52:115–125.
- [103] Sage E., Girard P.M., Francesconi S. Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem. PhotoBiol. Sci.*, 2012, 11:74–80.
- [104] Dany Graindorge, Sylvain Martineau, Christelle Machon, Philippe Arnoux, Jérôme Guitton, Stefania Francesconi, Céline Frochot, Evelyne Sage, and Pierre-Marie Girard, “Singlet Oxygen-Mediated Oxidation during UVA Radiation Alters the Dynamic of Genomic DNA Replication”, 2015, 10(10): e0140645.
- [105] Halliday GM, Byrne SN, Damian DL, 2011, "Ultraviolet A radiation: its role in immunosuppression and carcinogenesis". *Semin Cutan Med Surg.* 30 (4): 214–21.
- [106] Lavker R.M., Gerberick G.F., Veres D., Irwin C.J., Kaidbey K.H. Cumulative effects from repeated exposures to suberythemal doses of UV B and UV A in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1995, 32:53–62.
- [107] Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H, 2002. "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis". *Mutat. Res.* 511 (2): 145–78.
- [108] Nichols A Joi, Katiyar K. Santosh, “Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms”, 2010, 302(2):71-83
- [109] Mancebo SE, Wang SQ., “ Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis.”, 2014, 29(3):265-73
- [110] Abhimanyu, Coussens AK, “The role of UV radiation and vitamin D in the seasonality and outcomes of infectious disease.”, 2017, 16(3):314-338
- [111] K. Κώστα, 2010, Βιταμίνη D και σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2: ανακαλύπτοντας μια παλιά σχέση, *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 23, 2: 128-141
- [113] Α. Γεωργιάδης, Γ. Βαρθολομάτος, Α. Δρόσος, “Η λειτουργία της πρωτεΐνης P53 και η σχέση της με τα αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα», 2000, 17(3):293-299

- [114] Williams AB , Schumacher B, “p53 in the DNA-Damage-Repair Process.”, 2016, 2;6(5).
- [115] Brázda V, Coufal J, “Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein.”, 2017, 10;18(2).
- [116] Navita Sinha and Timothy A. Kral, “Effect of UVC Radiation on Hydrated and Desiccated Cultures of Slightly Halophilic and Non-Halophilic Methanogenic Archaea: Implications for Life on Mars”,2018, 6(2):43.
- [117] Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K, “Oxidative stress in aging human skin.”, 2015,5(2):545-89.
- [118] Barland, C. Z. E. B. B. Y. J., 2004, Imiquimod-induced interleukin 1 alpha stimulation improves barrier homeostasis in aged murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.*122, p. 330–336.
- [119] Martini, F., 2004, *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. Benjamin-Cummings, San Francisco.
- [120] Fenske, N. a. L. C., 1986, Structural and functional changes of normal aging skin. *J. Amer. Acad.Dermatol.* 15, p. 571–585.
- [121] Sudel, K. V. K. M. H. e. a., 2005, Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin beneficial effects of soy extract. *Photochem. Photobiol.*81, p. 581–587.
- [122] Gilchrest, B., 2004, review of skin aging and its medical therapy. *Br. J. Dermatol.* 135, p. 867–875.
- [123] Kang, S. C. J. L. J. F. G. W. D. E. a. V. J., 2003, Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 120, p. 835–841.
- [124] Yu SH, Bordeaux JS, Baron ED, “The immune system and skin cancer.”, 2014, 810:182-91
- [125] Maverakis E., Miyamura Y., BowenMP, Corre G, Ono Y, Goodarzi H, “Light including ultraviolet.”, 2010, 34(3):J247-57
- [126] S. Rangwala and K.Y. Tsai, “Roles of the Immune System in Skin Cancer”,2011, 165(5): 953–965.

- [127] CHRISTINA SEEBODE, JANIN LEHMANN and STEFFEN EMMERT, 2016, Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies, 1371-1378
- [128] Alam, M., & Ratner, D., Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma, 2001, 344(13), 975–983.
- [129] Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ , 2004, Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 43:326–35
- [130] Cerutti P, Shah G, Peskin A, Amstad P, 1992, Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. *Ann NY AcadSci* 663:158–66
- [131] Golberg L, Martin LE, Batchelor A, 1962, Biochemical changes in the tissues of animals injected with iron. 3. Lipid peroxidation. *Biochem J* 83:291
- [132] Serri F, Bartoli GM, Seccia A, Borrello S, Galeotti T, 1979, Age-related mitochondrial lipoperoxidation in human skin. *J Invest Dermatol* 73:123–5
- [141] Gaschler MM, StockwellBR, Lipid peroxidation in cell death, 2017, 15;482(3):419-425.
- [142] Antonio Ayala, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles, 2014, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.
- [143] Feng Liu-Smith, JinjingJia, and Yan Zheng, 2017, UV-Induced Molecular Signaling, Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer.
- [144] Michael G. Brandt, MD, FRCSCa, Corey C. Moore, MD, MSc, FRCSCb, Nonmelanoma Skin Cancer, 2019, 1–13.
- [145] Madan V, Lear JT, Szeimies R-M. Nonmelanoma skin cancer. *Lancet* 2010, 375(9715):673–85; and Lee DA, Miller SJ. Nonmelanoma skin cancer, 2009, 17(3):309–24.
- [146] From Albert MR, Weinstock MA. Keratinocyte carcinoma. *CA Cancer J Clin*, 2003, 53(5):294; with permission.

- [147] Syril Keena T. Que, MD, Fiona O. Zwald, MD, and Chrysalyne D. Schmults, MD, MSCE, 2018, Cutaneous squamous cell carcinoma. Incidence, risk factors, diagnosis and staging.
- [148] Paul Gruber, Patrick M. Zito, 2019, Cancer Skin (Integument).
- [149] Howell JY, Ramsey ML., Cancer, Squamous Cell of the Skin, 2018 Jan
- [150] Ricardo Bosch, Neena Philips, Jorge A. Suárez-Pérez, Angeles Juarranz, Avani Devmurari, Jovinna Chalensouk-Khaosaat and Salvador González, Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals, 2015, 248-268.
- [151] Piotr Dziunycz, Guergana Iotzova-Weiss, Jyrki J. Eloranta, Severin Läuchli, Jürg Hafner, Lars E. French, Günther F.L. Hofbauer, Squamous Cell Carcinoma of the Skin Shows a Distinct MicroRNA Profile Modulated by UV Radiation, 2010, Volume 130, Issue 11, Pages 2686–2689
- [152] Jerzy Bełtowski, Grażyna Wójcicka, Anna Jamroz-Wiśniewska, 2018, Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus
- [153] Sofie Hædersdal, MD; Asger Lund, MD, PhD; Filip K. Knop, MD, PhD; and Tina Vilsbøll, MD, DMSc, The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes, 2018, 93(2):217-239
- [154] Sajid Hamid Akash, Kanwal Rehman,² and Aamira Liaqat^{1,3}, Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Muhammad Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119:105–110
- [155] Anastasia Katsarou¹, Soffia Gudbjörnsdottir^{2,3}, Araz Rawshani^{2,3}, Dana Dabelea⁴, Ezio Bonifacio⁵, Barbara J. Anderson⁶, Laura M. Jacobsen⁷, Desmond A. Schatz⁷ and Åke Lernmark, 2017, Type 1 diabetes mellitus
- [156] Linda A DiMeglio, Carmella Evans-Molina, Richard A Oram Lancet, Type 1 diabetes, 2018, 391: 2449–62

- [157] Sudesna Chatterjee, Kamlesh Khunti, Melanie J Davies, Type 2 diabetes, 2017, S0140-6736(17)30058-2
- [158] American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Diabetes Care, 2014, 37(Supplement 1): S81-S90.
- [159] B. Behm, S. Schreml, M. Landthale, P. Babilas, Skin signs in diabetes mellitus, 2012, Pages 1203-1211
- [160] UllahAsmat, Khan Abad and Khan Ismail, Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, 2016, 24(5): 547–553.
- [161] Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I et al., 1991, The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress, 30:9305–13
- [162] Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A., Rotilio, G., 1977, An attempt to evaluate the rate of the Haber–Weiss reaction by using OH radical scavengers, 80, 130–132.
- [163] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989, In: Free Radical in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford University Press, Oxford, pp. 160–165.
- [164] Kohen, R., Fanberstein, D., Tirosh, O., 1997, Reducing equivalents in the aging process. Arch.Gerontol. Geriatr. 24, 103-123.
- [165] Athar M, 2002, Oxidative stress and experimental carcinogenesis. Indian J Exp Biol 40:656–67
- [166] Cerutti P, Shah G, Peskin A, Amstad P, 1992, Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. Ann NY Acad Sci 663:158–66
- [167] Nishigori C, Hattori Y, Toyokuni S, 2004, Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis, 6:561–70
- [168] Nakamura Y, Colburn NH, Gindhart TD, 1985, Role of reactive oxygen in tumor promotion: implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cells by TPA, Carcinogenesis 6:229–35
- [169] Saudi Pharm J., UllahAsmat, Khan Abad and Khan Ismail, Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, 2016, 24(5): 547-553.

- [170] Rohit Arora, Adarsh Pal Vig and Saroj Arora, Lipid Peroxidation: A Possible Marker for Diabetes, 2013
- [171] A. Marjani, 2010, Lipid Peroxidation Alterations in Type 2 Diabetic Patients. Pakistan Journal of Biological Sciences, 13: 723-730.
- [172] Eun-Ji Won, Yeonjung Lee, Jeonghoon Han, Un-Ki Hwang, Kyung-Hoon Shin, Heum Gi Park, Jae-Seong Lee, Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclops nanus*, 2014, Pages 60-66
- [173] S Briganti, M Picardo, 2003, Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new.
- [174] Madan V, Lear JT, Szeimies RM. Non-melanoma skin cancer. Lancet, 2010, 375:673-85
- [175] Lansbury L, Bath-Hextall F, Perkins W et al, Interventions for non-metastatic squamous cell carcinoma of the skin: systematic review and pooled analysis of observational studies, 2013, 347:6153
- [176] Maria-Magdalena CONSTANTIN, Elena POENARU, Calin POENARU, Traian CONSTANTIN, Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies, 2014, 9(1): 33-38.
- [177] Courage +Khazaka FAQ Corneometer. Available at: <https://www.courage-khazaka.de/index.php/en/faq-en/faq-scientific-devices/61-corneometer>. (Accessed: 11th June 2018)
- [178] Courage & Khazaka Mexameter. Available at: <https://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/130-mexameter>., 2018
- [179] ANTERA 3D ® CS- User Manual
- [180] Courage + Khazaka Tewameter. Available at: <https://www.courage-khazaka.de/index.php/en/component/content/article/59english/products/scientific/139-tewameter>., 2018

- [181] Brian L Furman, 2015, Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats
- [182] Tomonori NAKAMURA, Tomoko TERAJIMA, Taeko OGATA, Koichi UENO, Naotake HASHIMOTO, Kageyoshi ONO, and Shingo YANO, 2006, Establishment and Pathophysiological Characterization of Type 2 Diabetic Mouse Model Produced by Streptozotocin and Nicotinamide **29**(6) 1167—1174
- [183] Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., and Ribes, G. 1998. Experimental NIDDM: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47:224-229.
- [184] Ghasemi, A., Khalifi, S., and Jedi, S.S. 2014. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiol. Hungarica* 101:408-420.
- [185] Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48:2129-2139.
- [186] Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Gadbois, T.M., and Reaven, G.M. 2000. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 49:1390-1394.
- [187] Kolb, H. 1987. Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozotocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab. Rev.* 3:751-778.
- [188] Boivin, A., & Deshaies, Y. (1995). Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metabolism*, 44(12), 1540–1547.
- [189] Harrington, C.F. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends. Anal. Chem.* 2000, 19, 167-179.
- [190] Kuba, P.; Guchardi, R.; Hauser, P.C. Trace-metal analysis with separation methods. *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 192-198.

- [191] Khan F A, Shukla A N, Joshi S C, Anaemia and cancer treatment: a conceptual change, 2008, 49(1 0) : 759
- [192] Wu, K.K., and Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 191, 241–249.
- [193] Wang, B., Chandrasekera, P.C., and Pippin, J.J. (2014). Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 10, 131–145.
- [194] Kim, S.H., and Abbasi, F. (2019). Myths about Insulin Resistance: Tribute to Gerald Reaven. *EndocrinolMetab (Seoul)* 34, 47–52.
- [195] Lee, K.U., Lee, H.K., Koh, C.S., and Min, H.K. (1988). Artificial induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin infusion leads to insulin resistance in man. *Diabetologia* 31, 285–290.
- [196] Akiyama, T., Tachibana, I., Shirohara, H., Watanabe, N., and Otsuki, M. (1996). High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 31, 27–35.
- [197] Pedersen, O., Kahn, C.R., Flier, J.S., and Kahn, B.B. (1991). High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats. *Endocrinology* 129, 771–777.
- [198] Ghasemi, A., Khalifi, S., and Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *ActaPhysiol Hung* 101, 408–420.
- [199] Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation* 5, 349–358.
- [200] Mancini, J.E., Ortiz, G., Croxatto, J.O., and Gallo, J.E. (2013). Retinal upregulation of inflammatory and proangiogenic markers in a model of neonatal diabetic rats fed on a highfat-diet. *BMC Ophthalmol* 13, 14.
- [201] Like, A.A., and Rossini, A.A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415–417.
- [202] Paik, S.G., Michelis, M.A., Kim, Y.T., and Shin, S. (1982). Induction of

insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes* 31, 724–729.

[203] Zunino, S.J., Simons, L.F., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1994). Interleukin-1 promotes hyperglycemia and insulinitis in mice normally resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Am. J. Pathol.* 145, 661–670.

[204] Rossini, A.A., Appel, M.C., Williams, R.M., and Like, A.A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* 26, 916–920.

[205] Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K., and Naruse, A. (2001). Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9, 71–78.

[206] Juraschek SP, McAdams-Demarco M, Miller ER, Gelber AC, Maynard JW, Pankow JS, Young H, Coresh J, Selvin E, Temporal relationship between uric acid concentration and risk of diabetes in a community-based study population, 2014,179(6):684-91

[207] De Cosmo S, Viazzi F, Pacilli A, Giorda C, Ceriello A, Gentile S, Russo G, Rossi MC, Nicolucci A, Guida P, Feig D, Johnson RJ, Pontremoli R, Serum Uric Acid and Risk of CKD in Type 2 Diabetes, 2015, 6;10(11):1921-9

[208] JunhongLeng, Leishen Wang, Jing Wang, Weiqin Li, Huikun Liu, Shuang Zhang, Lili Li, Huiguang Tian, PengchengXun, Xilin Yang, Zhijie Yu and Gang Hu, Uric Acid and Diabetes Risk among Chinese Women with a History of Gestational Diabetes Mellitus, 2017, 134: 72–79.

[209] Fernandez Figueras MT, From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited, 2017, 2:5-7.

[210]H Seirafi, K Farsinejad, A Firooz, SM Davoudi, RM Robati, MS Hoseini, AH Ehsani, B Sadr, Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study, 2009, 23, 146–149

- [211] Sakai S, Endo Y, Ozawa N *et al.* Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus. *J Invest Dermatol* 2003; **120**: 79–85
- [212] Shingo Sakai, Yoko Endo, Naoko Ozawa, Tomoko Sugawara, Ayumi Kusaka, Tetsuya Sayo, Hachiro Tagami, and Shintaro Inoue, Characteristics of the Epidermis and Stratum Corneum of Hairless Mice with Experimentally Induced Diabetes Mellitus, 2013
- [213] BB Sokmen, H Basaraner and R Yanardag , Combined effects of treatment with vitamin C, vitamin E and selenium on the skin of diabetic rats , 2013, 32(4) 379–384
- [214] BORUT POLJSK, RAJA DAHMANE & ALEKSANDAR GODIC , Skin and antioxidants , 2013, 15: 107–113
- [215] Anne-Katrin Greul Jens-Uwe Grundmann Felix Heinrich, Inka Pfitzner Jürgen Bernhardt, Andreas Ambach, Hans-Konrad Biesalski Harald Gollnick, Photoprotection of UV-Irradiated Human Skin: An Antioxidative Combination of Vitamins E and C, Carotenoids, Selenium and Proanthocyanidins, 2002, 15:307–315